# 大腸菌における RNase E と RNA 結合タンパク質 Hfq 間の相互作用領域の解析

池田 幸樹

目次

・・・・・・・P. 2

要旨

・・・・・・・P. 3

背景

・・・・・・・P. 4

結果

・・・・・・・P. 7

考察

・・・・・・・P. 42

材料、方法

・・・・・・・P. 48

謝辞

・・・・・・・P. 56

引用文献

・・・・・・・P. 57

副論文

・・・・・・・P. 61

## 要旨

大腸菌において Hfq 依存的な機能性低分子 RNA（sRNA）は RNA シャペンロンである Hfq を介して RNase E と結合する。RNase E/Hfq 間の相互作用の役割は、sRNA が標的とする mRNA に対し、RNase E をリクルートさせることである。それにより、標的 mRNA、及び sRNA それぞれの速やかな分解が引き起こされる。また、RNase E の C 末端に存在する RNase E の scaffold 領域は Hfq と結合する能力を持つ。そこでまず RNase E を C 末端側から段階的に欠失した RNase E 変異株を構築した。これらの RNase E は部分的に scaffold 領域を欠失する。解析の結果、750 番目のアミノ酸まで欠失した RNase E である RNase E750 は sRNA 依存的に標的 mRNA を速やかに分解する能力を維持していた。また RNase E750 は、RNase E（全長）に比べて結合力は低下していたが、Hfq との結合能力を有していた。一連の C 末端部分欠失変異 RNase E を同様に解析し、最終的には RNase E の 711 から 750 領域における Hfq との相互作用領域が *ptsG* mRNA の速やかな分解において必須であると結論付けた（副論文）。

RNase E の scaffold 領域には、Hfq の他に RhlB を含む数種のタンパク質因子が結合する。また、先行研究により Hfq、あるいは RhlB は同時に RNase E に結合しないことが示されている。本研究で示した RNase E/Hfq 間の相互作用領域である 711-750 領域は RhlB の結合領域を含んでいる。そこで、RNase E/Hfq 間の結合に対する RhlB の過剰発現の影響を解析した結果、RNase E/Hfq の結合が阻害され、*ptsG* mRNA の速やかな分解が阻害されることを見出した（副論文）。このことは、RNase E との結合に対して Hfq、及び RhlB が競合状態にある可能性を示唆する。さらに RhlB 以外の RNase E 結合タンパク質因子の共沈実験の結果を示し、複数の RNase E を基盤とした RNA 分解複合体の存在と sRNA による標的 mRNA 分解の生理学的意義について最後に考察する。

## 背景

RNase E は大腸菌における主要な endoribonuclease であり、mRNA の分解や RNA のプロセシングを担っている（Carpousis, 2002; 2007）。また RNase E は RNA degradosome と呼ばれる RNA 分解複合体を形成していると考えられている。この RNase E を基盤とした複合体の主要な結合タンパク質因子として 3' exonuclearase である Polynucleotide phosphorylase（PNPase）、ATP 依存的 DEAD-box RNA helicase B（RhlB）、解糖系酵素である enolase がある（Carpousis *et al.*, 1994; Miczak *et al.*, 1996; Py *et al.*, 1996）。degradosome 中の RNase E と PNPase は協調して RNA 分解に働き、RhlB が標的 RNA の二次構造を開くことで、RNase E や PNPase による分解を補助していると予想されている。実際に、ColE1 RNA I の分解において RNase E と PNPase が協調して働いていることが *in vitro* において示されている（Xu and Cohen, 1995）。また、RhlB は RNase E と PNPase による mRNA の分解を促進することが *in vitro* および *in vivo* において示されている（Vanzo *et al.*, 1998; Cobum *et al.*, 1999; Leroy *et al.*, 2002; Khemici and Carpousis, 2004; Khemici *et al.*, 2005）。さらに、Morita らは enolase 自身が機能性小分子 RNA(small RNA; sRNA)である SgrS の転写誘導に必要であることを示した（Morita *et al.*, 2004; 2005）。このことは転写（補助）因子としての enolase の新規機能の可能性を示唆するが、その一方で degradosome における enolase の役割については未だ明らかになっていない。上述したタンパク質因子の他に、RNase E と相互作用するタンパク質因子として polyphosphate kinase や DnaK、GroEL が知られている（Miczak *et al.*, 1996; Blum *et al.*, 1997; Regonesi *et al.*, 2006）。これらは主要な degradosome 構成因子に比べると結合している複合体量は化学量論的には少ない。さらに近年の研究から RNase E を基盤とした複合体は大腸菌において複数存在しており、これらの複合体の様式は細胞環境によって大きく変わることが報告されている（Carpousis, 2007）。例えば、DEAD-box RNA helicase である CsdA はコールドショック時に発現し、低温時において RNase E と相互作用することが示されている（Prud'homme-Genereux *et al.*, 2004）。degradosome のこのような変化はコールドショックに応答した細胞内 mRNA の安定性の変化の原因である可能性がある（Awano *et al.*, 2007）。また、degradosome の機能は RNase E の活性を阻害する RraA 及び RraB によっ

て調節を受けていることが報告されている（Gao *et al.*, 2006）。

RNase E と相互作用する因子のひとつとして RNA 結合タンパク質である Hfq がある。Hfq は sRNA による標的 mRNA への塩基対形成を促進する（Valentin-Hansen *et al.*, 2004; Aiba, 2007; Brennan and Link, 2007）。近年、Morita らは Hfq が安定的に RNase E に相互作用していること、及び、少なくとも SgrS 及び RyhB の２つの sRNA が Hfq を介して RNase E に結合することを示した（Morita *et al.*, 2005）。SgrS は Glucose-６-phosphate(G-6-P)、あるいは Glucose の非代謝アナログである α-Methyl glucoside-6-P(αMG-6-P)の蓄積によるストレス時にグルコース透過装置タンパク質をコードする *ptsG* mRNA に作用し、翻訳阻害、及び mRNA 分解により *ptsG* mRNA を抑制する。また RNase E/Hfq/sRNA の結合が標的 mRNA の速やかな分解に重要であることが示唆されている（Masse *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2005; Udekwu *et al.*, 2005）。これらの解析結果は、以下に示す sRNA による mRNA 抑制系の分子機構を明らかにした。RNase E/Hfq/sRNA から構成される RNA タンパク質複合体は sRNA により標的化された mRNA にリクルートされる。sRNA/標的 mRNA 間に形成された塩基対により標的 mRNA の翻訳は阻害され、標的 mRNA は速やかに分解される（Morita *et al.*, 2005, Morita *et al.*, 2006）。また、鉄枯渇ストレス時に誘導される sRNA である RyhB を含む数種の sRNA が、標的 mRNA の分解と共役して分解されることが示されている（Masse *et al.*, 2003）。これらのことから、sRNA による mRNA 抑制系における RNase E/Hfq 間の相互作用の役割は sRNA/標的 mRNA 上に RNase E をリクルートさせ、標的 mRNA、及び sRNA のそれぞれを速やかに分解させることだと考えられる。その一方で、Morita らは標的 mRNA への RNase E のリクルートは Hfq/sRNA による mRNA の翻訳阻害には必要ないこと、および mRNA の翻訳阻害が sRNA による mRNA 抑制の直接の原因であることを示した（Morita *et al.*, 2006）。しかし、標的 mRNA、あるいは sRNA の速やかな分解の生理学的な意義は不明である。

これまでの解析から RNase E/Hfq 複合体は、RNase E に結合する主要な因子である enolase 及び RhlB を含まないことが示されている（Morita *et al.*, 2005）。また RNase E/Hfq の結合が一本鎖核酸特異的ヌクレアーゼである micrococcal nuclease 処理により影響を受けなかったことから、タンパク質間相互作用であることが示唆されていた（Morita *et al.*, 2005）。その一方で、Worrall らは、それぞれ独立に精製した Hfq、RNase E の主要 RNA 結合領域、および

scaffold 領域の一部（RNase E、628-843）との結合を *in vitro* で解析した結果、RNA 存在下で RNase E/Hfq 間の結合が検出されることを報告した（Worrall *et al.*, 2008）。Hfq が結合する scaffold 領域に加えて、主要な RNA 結合領域の一部を含むという点は残るが、彼らはこれらの結果から、micrococcal nuclease に影響を受けないような RNA が RNase E/Hfq 間の結合に介在している可能性、あるいは RNA により RNase E/Hfq 間の結合が増強される可能性を示唆した。さらにこれまでの解析から、scaffold 領域内に Arginine に富む二次的 RNA 結合領域（AR2 領域; 798-819 アミノ酸領域）が存在することが示されている（Carpousis, 2007）。RNase E/Hfq 間の結合に対するこの AR2 領域の関与の有無も含めて、機能的な Hfq/RNase E 間の結合の詳細は未解決の問題の一つである。

RNase E は、N 末端領域の 1-529 アミノ酸までが球形の catalytic 領域になっており、C 末端領域の 530-1061 アミノ酸までが構造をとらない non-catalytic 領域となっている。この C 末端領域には RNA degradosome の構成因子が物理的かつ機能的に相互作用している（Marcaida *et al.*, 2006; Carpousis, 2007; Worrall *et al.*, 2008）。604-688 領域の Arginine に富んだ部位は主要な RNA 結合領域とされ、RNase E の RNA 分解活性を上昇させる。その一方で、701-1061 領域は RNase E と相互作用する因子が結合する scaffold 領域となっている。生化学的な解析から、PNPase, enolase, RhlB の結合領域はそれぞれ、1021-1061, 833-850, 696-762 領域であることが同定されている。近年の解析から、RNase E の scaffold 領域を欠失するようにゲノム上の *rne* 遺伝子を組換えた *rne701-FLAG* 株において、RNase E701 と Hfq が結合しないことが共沈実験により示された（Morita *et al.*, 2005）。このことは、Hfq が RNase E の scaffold 領域に結合していることを示している。また *rne701-FLAG* 株においては、sRNA により標的化された mRNA の速やかな分解が起こらなかったことから、RNase E/Hfq 間の相互作用が sRNA による mRNA 分解の促進に必要であることが示唆された（Morita *et al.*, 2005）。しかし、scaffold 領域中のどの領域が Hfq と結合しているかについてはまだ明らかになっていない。

本研究では以上の点を踏まえ、RNase E の scaffold 領域における Hfq の結合領域の同定、および複数の RNase E を基盤とした RNA 分解複合体の存在の生理学的意義を明らかにすることを目的とした。

## 結果

### C 末端部分欠失 RNase E の発現

すでに、ゲノム上の *rne* 遺伝子をそれぞれ RNase E-FLAG, RNase E844-FLAG, RNase E701-FLAG を発現するように組換えた変異 *rne* 遺伝子が作成されている（Morita *et al.*, 2004）。RNase E-FLAG は全長の RNase E 配列（1061 アミノ酸）の C 末端に FLAG タグ配列を付加したものである。また RNase E844-FLAG 及び RNase E701-FLAG は C 末端領域をそれぞれ 217、360 アミノ酸欠失し、C 末端に FLAG タグ配列を付加したものである。RNase E844-FLAG は、sRNA 依存的な mRNA の速やかな分解能力を維持している。その一方で、RNase E701-FLAG は sRNA 依存的な mRNA の速やかな分解能力を失う（Morita *et al.*, 2005）。これらは sRNA を介した標的 mRNA の速やかな分解に必要である RNase E 上の Hfq 結合領域が 702-844 間に存在することを示唆している。RNase E 上の Hfq の機能的な結合領域をより詳細に同定するために、ゲノム上で 702-844 の間を段階的に欠失するように組換えた変異 *rne* 遺伝子を構築した。作成した変異株は RNase E800-FLAG, RNase E750-FLAG, RNase E710-FLAG を発現するように組換えた株である（Fig. 1）。RNase E の scaffold 領域に結合する因子に関するこれまでの解析から、RNase E800-FLAG は RhlB 結合領域を持っているが PNPase 及び enolase の結合領域は失っていることが予想される。また、RNase E750-FLAG 及び RNase E710-FLAG は PNPase 及び enolase に加え RhlB の結合領域も失っていることが予想される。構築したそれぞれの変異株において変異 RNase E が発現しているかどうかについて抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting によって調べた。Fig. 2 に示すように、全ての変異株において変異 RNase E は安定的に発現していた。この結果から、これらの変異株が Hfq/RNase E 間の機能的結合を明らかにすることに有用であると考えられる。

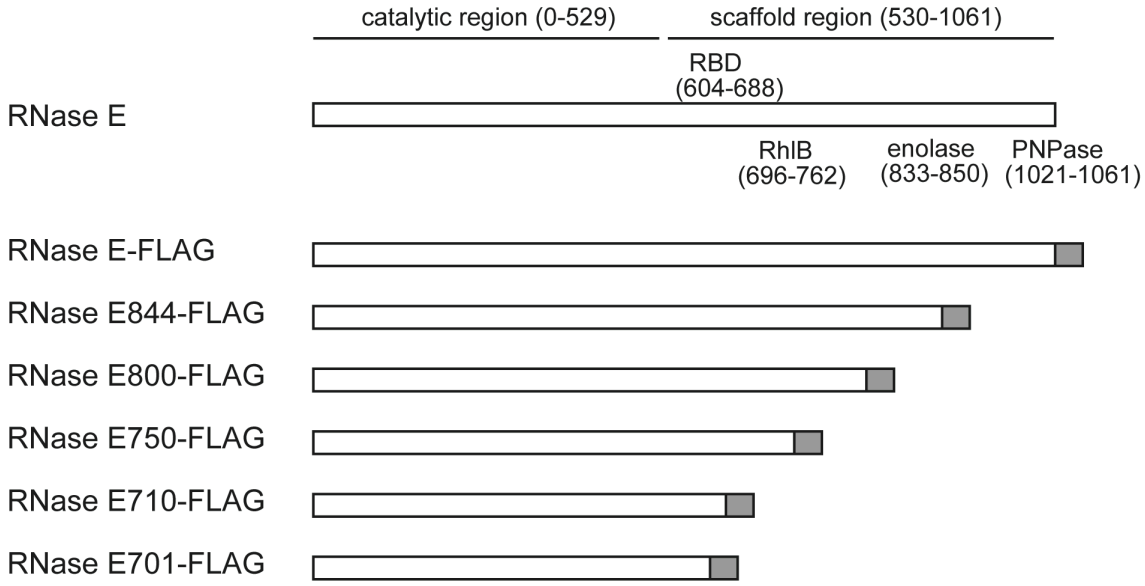


Fig. 1.　構築した変異 RNase E モデル

報告されている RNase E の構造について一番上に示した（Marcaida *et al.*, 2006; Carpousis, 2007; Worrall *et al.*,）。その下に先行研究（Morita *et al.*, 2004）で用いた、あるいは本研究で作成した変異 RNase E について図示した。これらの変異 RNase E はゲノム上に構築し、それぞれの変異 RNase E の後方には FLAG タグ配列が付加されている。

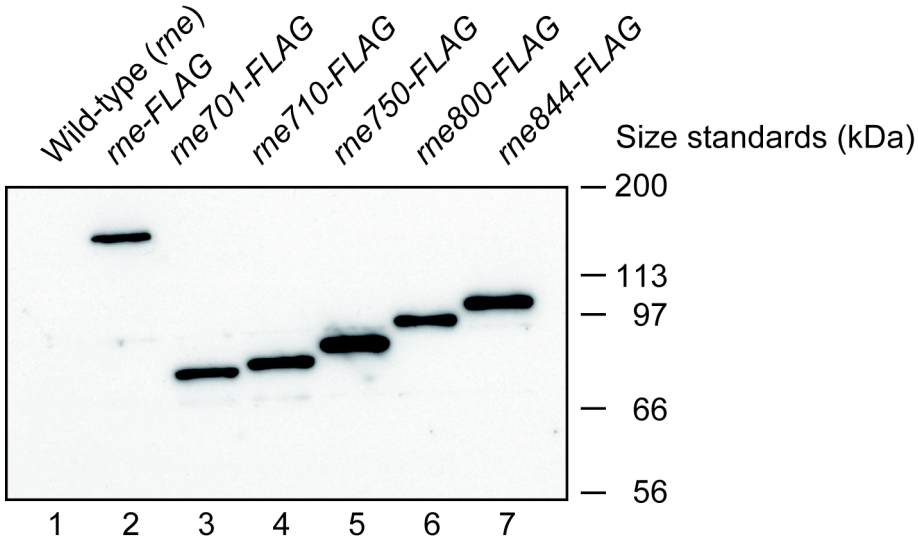


Fig. 2.　構築した変異 RNase E の発現

全長の RNase E-FLAG あるいは本研究で作成した FLAG 配列を付加した変異 RNase E の発現について抗 FLAG 抗体による Western blotting により解析した。

**sRNA を介した標的 mRNA の分解に対する RNase E の C 末端領域欠失の影響**

RNase E の C 末端領域を欠失した変異株において sRNA を介した標的 mRNA の分解への影響について調べた。それぞれの変異株を LB 培地で培養し、培養液に Glucose(Glc)及び Glucose の非代謝アナログである a-Methyl glucoside(αMG)を添加し、10 分間培養を継続した。その後、RNA を細胞から抽出して DIG ラベルした *sgrS* 及び *ptsG* DNA プローブを用いて Northern blotting により解析を行った。Glucose 添加時には全ての株において *ptsG* mRNA の発現が確認され、SgrS は見られなかった（Fig. 3, *奇数のレーン*）。野生株、*rne-FLAG* 株、及び *rne844-FLAG* 株において、αMG 添加時 には SgrS が検出され、全長の *ptsG* mRNA は消失した（Fig. 3, *レーン 2, 4, 6*）。その一方で、*rne701-FLAG* 株において、αMG 添加時 に SgrS が検出されたが全長の *ptsG* mRNA も検出された（Fig. 3, *レーン 14*）。これは、これまでに示されている結果と同様に、RNase E の 702-844 領域が SgrS を介した *ptsG* mRNA の分解に重要であることを示す。同様の実験を本研究で構築した一連の変異株にて行った。すべての変異株で αMG の添加に応答した SgrS の合成が観察された（Fig. 3, *レーン 8, 10, 12*）。*rne800-FLAG* 株、及び *rne750-FLAG* 株においては、*ptsG* mRNA の速やかな分解が観察された（Fig. 3, *レーン 8, 10*）。その一方で、*rne710-FLAG* 株においては、*rne701-FLAG* 株と同様に、全長の *ptsG* mRNA が検出された（Fig. 3, *レーン 12*）。

また、これらの変異株の影響について RyhB を介して不安定化する *sodB* mRNA においても同様に検証を行った。RyhB は鉄枯渇によって誘導され、鉄を補因子として使用する superoxide dismutase B をコードする *sodB* mRNA を標的とし、翻訳の阻害及び速やかな不安定化を引き起こす（Masse and Gottesman, 2002; Masse *et al.*, 2003）。本研究では、それぞれの変異株において、培地中に 2, 2'-dipyridyl(Dip)を添加することで鉄枯渇ストレスを引き起こし、RyhB を誘導させた（Fig. 4, *偶数のレーン*）。RyhB を介した *sodB* mRNA の不安定化は *rne-FLAG* 株では確認できたが、*rne701-FLAG* 株及び *rne710-FLAG* 株では起こらなかった（Fig. 4, *レーン 2, 6, 8*）。また、*rne-FLAG* 株に比べ効果は弱いが、*rne750-FLAG* 株において *sodB* mRNA の不安定化は観察された（Fig. 4, *レーン 4*）。SgrS、あるいは RyhB による *ptsG* mRNA、あるいは *sodB* mRNA の不安定化を対象にした以上の解析結果より、RNase E の

751-1061 領域は sRNA を介した標的 mRNA の分解には基本的に必要ないことが示唆された。すなわちこれらの結果は、RNase E の 711-750 領域が sRNA を介した標的 mRNA の分解を引き起こすための Hfq との機能的な相互作用領域であることを示唆している。

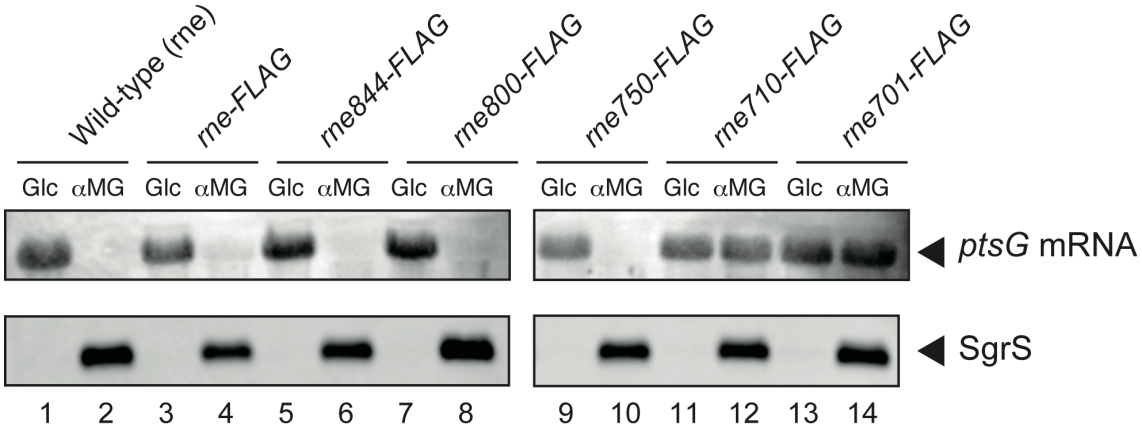


Fig. 3.　SgrS を介した *ptsG* mRNA の速やかな分解に対する RNase E の scaffold 領域欠失の影響

図に示す変異株を LB 培地で培養した。OD600 = 0.6 の時、Glc あるいは aMG を最終濃度 0.2%になるように加え、10 分間培養を継続した。細胞を集菌し、RNA を調製して DIG で標識した *ptsG* あるいは *sgrS* DNA probe を用いた Northern blotting により解析した。*ptsG* mRNA の検出には 15 μg、SgrS の検出には 5 μg の RNA 試料を用いた。

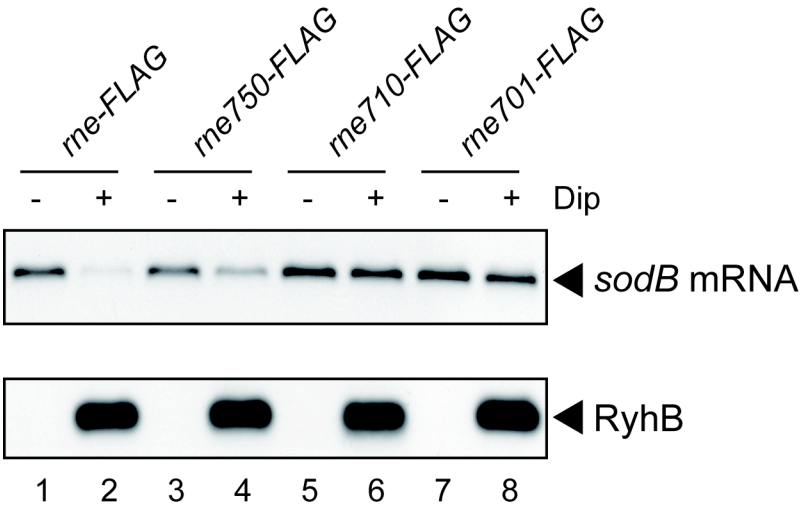


Fig. 4.　RyhB を介した *sodB* mRNA の速やかな分解に対する RNase E の scaffold 領域欠失の影響

図に示す変異株を LB 培地で培養した。OD600 = 0.6 の時、2, 2'-dipyridyl（Dip）を最終濃度 250 μM になるように加え、15 分間培養を継続した。細胞を集菌し、RNA を調製して DIG で標識した *sodB* あるいは *ryhB* DNA probe を用いた Northern blotting により解析した。*sodB* mRNA の検出には 3 μg、RyhB の検出には 3 μg の RNA 試料を用いた。

**それぞれの組換え RNase E と Hfq との相互作用**

これまでの結果は Hfq が RNase E の 711-750 領域と相互作用をしている可能性を強く示している。そこで、次にそれぞれに部分欠失した変異 RNase E-FLAG を、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降をすることよって、組換え RNase E と Hfq の結合について検証した。それぞれの変異株を LB 培地で培養し、細胞粗抽出液を調製した。それぞれの細胞粗抽出液に anti-FLAG M2-agarose beads を加えて反応させ、beads に結合したタンパク質を精製した。精製された変異 RNase E-FLAG を、抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting により解析した。解析の結果、FLAG 配列を付加した一連の組換え RNase E は効率よく精製画分に回収された(Fig. 5, 1 段)。また、RNase E に FLAG タグが付加されていない野生株では精製画分にバンドが確認できなかった(Fig. 5, 1 段, *レーン 1*)。次に、一連の変異 RNase E-FLAG に結合したタンパク質について抗 Hfq 抗体を用いて Western blotting によって解析した。これまでの解析から、Hfq は RNase E-FLAG とともに共沈降されるが、RNase E701-FLAG とは共沈降されないことが確認されている。解析の結果、RNase E710-FLAG 以外の他の組換え RNase E-FLAG についても Hfq との結合能が維持されていた (Fig. 5, 5 段)。この結果は、Northern blotting の結果から明らかになった Hfq との機能的結合領域が RNase E の 711-750 領域であるという結論と一致する。また、組換え RNase E-FLAG において Hfq との結合力は C 末端領域を欠失するにつれて減少していた(Fig. 5, 5 段)。RNase E844-FLAG において Hfq の結合量は僅かに減少していた(Fig. 5, 5 段, *レーン 3*)。これは RNase E の 845-1061 領域に何らかの形で Hfq が結合していることを示している。RNase E800-FLAG、及び RNase E750-FLAG では RNase E844-FLAG に比べさらに Hfq との結合能が低下していた(Fig. 5, 5 段, *レーン 4, 5*)。これらのことは、RNase E の 801-844 領域においても Hfq の結合領域が存在することを示している。最後に、RNase E710-FLAG では完全に Hfq が結合できなくなっていることから、RNase E の 711-750 領域にも Hfq の結合領域があることを示唆している(Fig. 5, 5 段, *レーン 6*)。以上の結果は、Hfq との機能的結合領域が RNase E の 711-750 領域であることに加えて、Hfq が RNase E に複数の位置（801-844 領域、845-1061 領域）で結合する、あるいは 801-844 領域、845-1061 領域が RNase E の 711-750 領域での Hfq との結合を安定化する可能性を示唆している。

また、αMG を添加して 10 分間の培養を行った後において、それぞれの

RNase E を免疫沈降した。LB 培地で培養した菌から調整した細胞粗抽出液を用いて行った先の実験結果と同様に、RNase E710-FLAG 及び RNase E701-FLAG では Hfq は共沈されなかった(Fig. 6, 中段, *レーン 2, 3*)。一方で、RNase E750-FLAG、RNase E800-FLAG、RNase E844-FLAG は Hfq との結合能を維持していた(Fig. 6, 中段, *レーン 4, 5, 6*)。次に、組換え RNase E に対し、ストレスによって誘導された SgrS が結合しているかどうかを調べるために、精製した画分をフェノール処理して RNA を調製し、Northern blotting により解析した。SgrS は RNase E-FLAG, RNase E844-FLAG, RNase E800-FLAG, RNase E750-FLAG の精製画分から検出された(Fig. 6, 下段, *レーン 4, 5, 6*)。しかし、RNase E710-FLAG, RNase E701-FLAG の精製画分からは検出されなかった(Fig. 6, 下段, *レーン 2, 3*)。これらの結果は RNase E の 711-750 領域が、標的 mRNA への RNase E のリクルートに必要な Hfq の結合領域であるという結論を支持する。さらに、G-6-P 蓄積ストレス及び鉄枯渇ストレスが Hfq/RNase E 間の相互作用に影響を及ぼすかどうかを検証するために、*rne-FLAG* 株及び *rne750-FLAG* 株を LB 培地で培養し、αMG 及び Dip を加えて 10 分間培養を継続した。それらの細胞から調整した細胞粗抽出液を用いて、RNase E-FLAG、及び RNase E750-FLAG を免疫沈降した。精製画分を Western blotting により解析した結果、αMG 及び Dip の添加は RNase E-FLAG 及び RNase E750-FLAG に対する Hfq の結合量に影響しなかった（Fig. 7）。この結果は、G6P ストレス及び鉄枯渇ストレスは RNase E-Hfq 間の相互作用に影響を与えないことを示している。

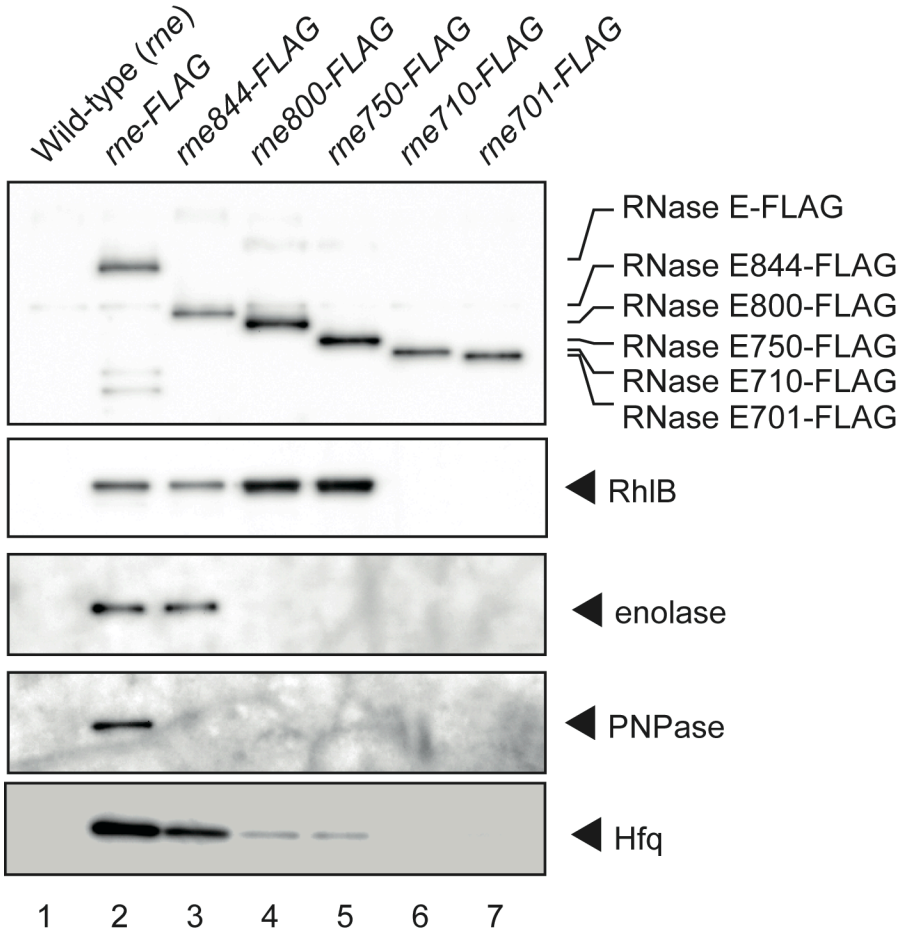


Fig. 5.　組換え RNase E と Hfq 及び主要な結合因子の相互作用

図に示す変異株を LB 培地で培養した。OD600 = 0.6 の時、細胞を集菌し、細胞粗抽出液を調製した。細胞粗抽出液に anti-FLAG M2-agarose beads を加えて反応させ、beads に結合したタンパク質を精製した。精製したタンパク質を、抗 FLAG 抗体、抗 RhlB 抗体、抗 enolase 抗体、抗 PNPase 抗体、抗 Hfq 抗体を用いた Western blotting により解析した。Western blotting の検出に用いた試料の量はそれぞれ RNase E 3 μl、RhlB 2 μl、enolase 2 μl、PNPase 2 μl、Hfq 5 μl である。

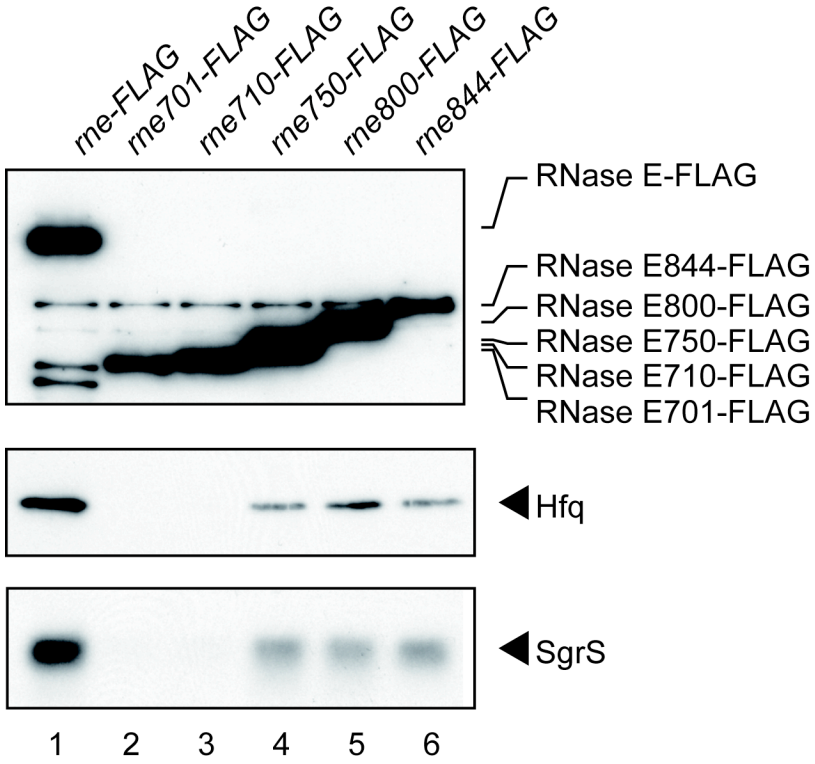


Fig. 6.　組換え RNase E と Hfq 及び SgrS の相互作用

図に示す変異株を LB 培地で培養した。OD600 = 0.6 の時、αMG を最終濃度 0.1%になるように添加し、10 分間継続して培養を行った。細胞を集菌し、細胞粗抽出液を調製した。細胞粗抽出液に anti-FLAG M2-agarose beads を加えて反応させ、beads に結合したタンパク質を精製した。精製したタンパク質を、抗 FLAG 抗体、抗 Hfq 抗体を用いた Western blotting により解析した。Western blotting の検出に用いた試料の量はそれぞれ RNase E 3 μl、Hfq 5 μl である。また、精製画分から RNA を調製し、DIG ラベルした *sgrS* DNA probe を用いて Northern blotting により解析を行った。

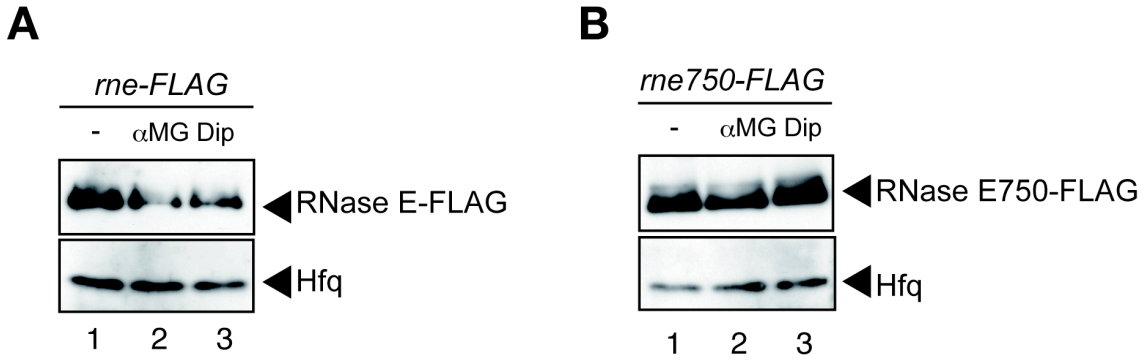


Fig. 7.　sRNA の発現による Hfq/RNase E 間の相互作用への影響

A. *rne-FLAG* 株及び B. *rne750-FLAG* 株を LB 培地で培養した。OD600 = 0.6 の時、αMG 及び 2, 2'-dipyridyl（Dip）を加え、10 分間培養を継続した。細胞を集菌し、細胞粗抽出液を調製した。細胞粗抽出液に anti-FLAG M2-agarose beads を加えて反応させ、beads に結合したタンパク質を精製した。精製したタンパク質を、抗 FLAG 抗体、抗 Hfq 抗体を用いた Western blotting により解析した。Western blotting の検出に用いた試料の量はそれぞれ RNase E 3 μl、Hfq 5 μl である。

### それぞれの組換え RNase E と PNPase, enolase, RhlB との相互作用

RNase E の 1021-1061, 833-850, 696-762 領域はそれぞれ PNPase, enolase, RhlB との相互作用に必要な最小領域であることが報告されている（Marcaida *et al.*, 2006; Carpousis, 2007; Worrall *et al.*, 2008）。本研究で構築したそれぞれの組換え RNase E と RNA degradosome を形成するこれら 3 つの主要な因子との相互作用について調べるために、一連の変異 RNase E-FLAG に結合したタンパク質を、抗 PNPase 抗体、抗 enolase 抗体、抗 RhlB 抗体を用いて Western blotting により解析した。これまでの解析より、RNase E-FLAG に対し、PNPase, enolase, RhlB が共沈降することを確認している（Morita *et al.*, 2005）。またこのとき RNase E701-FLAG に対してはこの三者が共沈降しない。Western blotting による解析の結果、本研究で構築した C 末端領域を欠失した組換え RNase E（RNase E800-FLAG、RNase E750-FLAG、RNase E710-FLAG）において PNPase は結合していなかった(Fig. 5, 5 段)。また、構築した組換え RNase E（RNase E800-FLAG、RNase E750-FLAG、RNase E710-FLAG）においては enolase が結合していなかった(Fig. 5, 4 段)。RNase E844-FLAG が enolase と結合することと合わせると、enolase との結合領域は RNase E の 801-844 であることを示している。その一方で、RNase E800-FLAG, RNase E750-FLAG はまだ RhlB と結合する能力を維持していたことから RhlB は RNase E の 711-750 領域に結合することを示している(Fig. 5, 3 段)。これらの結果は RNase E と結合タンパク質の関係を検証したこれまでの研究と矛盾しない（Marcaida *et al.*, 2006; Carpousis, 2007; Worrall *et al.*, 2008）。

### Hfq 結合領域を欠失した組換え RNase E の構築

Hfq 結合領域の役割をより詳細に調べるために、私達は RNase E の 702-750 領域を欠失した RNase EΔ1-FLAG 及び 702-844 領域を欠失した RNase EΔ2-FLAG を発現する変異 *rne* 遺伝子をゲノム上に構築した(*rneΔ1-FLAG*、*rneΔ2-FLAG* ; Fig. 8)。そしてこれらの *rne* 部分欠失株が SgrS を介した *ptsG* mRNA の分解に影響を与えるかどうか検証した。*rne-FLAG*、*rne701-FLAG*、*rneΔ1-FLAG*、及び *rneΔ2-FLAG* 株をそれぞれ LB 培地で培養し、Glc または αMG を添加後 10 分間継続して培養し、それらの細胞から RNA を調製して、*sgrS* 及び *ptsG* プローブを用いて Northern blotting により解析した。αMG の添加により、全ての株において SgrS が発現した(Fig. 9,*偶数レーン*)。

野生株、あるいは *rne701-FLAG* 株で RNase E の scaffold 領域依存的に SgrS による *ptsG* mRNA の不安定化が確認される条件下で、*rneΔ1-FLAG* 株において aMG の添加によって起こる *ptsG* mRNA の速やかな分解が部分的に抑圧されることを見出した(Fig. 9, *レーン 6*)。また *rneΔ2-FLAG* 株において、*ptsG* mRNA の分解は完全に抑圧された(Fig. 9, *レーン 8*)。

次に、RNase EΔ1-FLAG 及び RNase EΔ2-FLAG が Hfq と結合するかどうかについて免疫沈降により検証した。*rneΔ1-FLAG*、及び *rneΔ2-FLAG* 株において細胞粗抽出液を調製した。そこに anti-FLAG M2-agarose beads を加えて反応させ、beads に結合したタンパク質を精製した。精製したタンパク質は Western blotting によって解析した。解析の結果、RNase EΔ1-FLAG は僅かに Hfq との結合能が低下しているが、Hfq との結合能を維持していた(Fig. 10, *レーン 3*)。一方で、 RNase EΔ2-FLAG には Hfq は結合しなかった(Fig. 10, *レーン 4*)。これらの結果は C 末端を欠失した変異株の解析の結果を支持する。RNase EΔ1-FLAG は Hfq との結合能を十分に維持しているにも関わらず、sRNA を介した標的 mRNA の分解能が低下していた。すなわち、RNase E の 711-750 領域は sRNA を介した標的 mRNA の速やかな分解を引き起こすための Hfq との重要な相互作用部位であることを示唆する。さらに、Hfq は RNase E の scaffold 領域の複数の部位に結合しているが、RNase EΔ2-FLAG の精製画分の解析結果は RNase E の 845-1061 領域だけでは Hfq との結合に十分ではないことを示唆している(Fig. 10, *レーン 4*)。同時に RNase E の scaffold 領域に結合する因子について Western blotting により解析を行った。RNase EΔ1-FLAG は enolase と PNPase は結合できるが RhlB とは結合できなかった(Fig. 10, *レーン 3*)。一方、RNase EΔ2-FLAG は PNPase と結合できるが RhlB 及び enolase とは結合できないことが明らかになった (Fig. 10, *レーン 4*)。これらの結果は RNase E と結合タンパク質の関係を検証したこれまでの研究と矛盾しない (Marcaida *et al.*, 2006; Carpousis, 2007; Worrall *et al.*, 2008)。

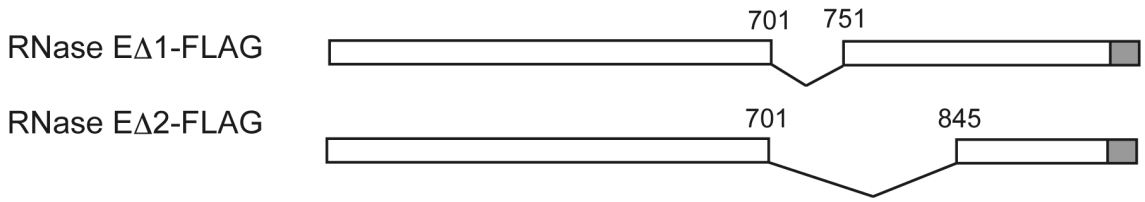


Fig. 8.　*rneΔ1-FLAG*、*rneΔ2-FLAG* 株の構築

図のような RNase E の 702-750 領域を欠失した RNase EΔ1-FLAG 及び 702-844 領域を欠失した RNase EΔ2-FLAG を発現する変異 *rne* 遺伝子をゲノム上に構築した。これらの変異 RNase E の C 末端には FLAG タグ配列を付加した。

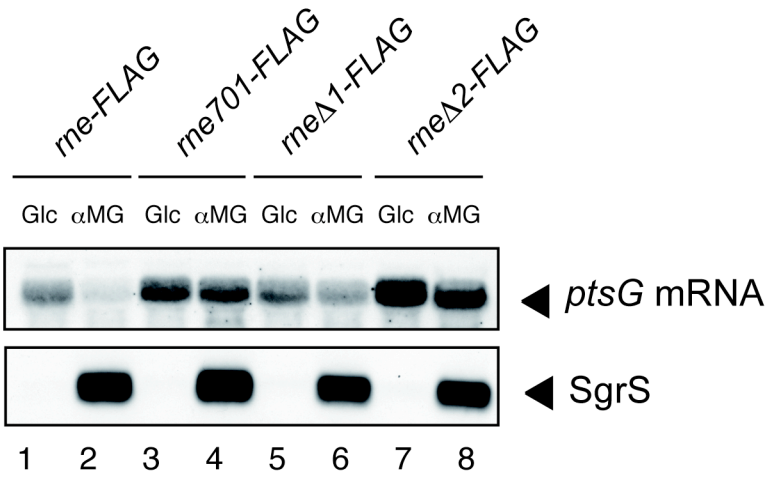


Fig. 9. SgrS を介した *ptsG* mRNA の速やかな分解に対する RNase EΔ1-FLAG 及び RNase EΔ2-FLAG の影響

*rne-FLAG*、*rne701-FLAG*、*rneΔ1-FLAG*、及び *rneΔ2-FLAG* 株をそれぞれ LB 培地で OD600 = 0.6 まで培養し、Glc または αMG を添加後 10 分間継続して培養し、それらの細胞から RNA を調製して、DIG 標識された *sgrS* 及び *ptsG* DNA プローブを用いて Northern blotting により解析した。*ptsG* mRNA の検出には 15 μg、SgrS の検出には 5 μg の RNA 試料を用いた。

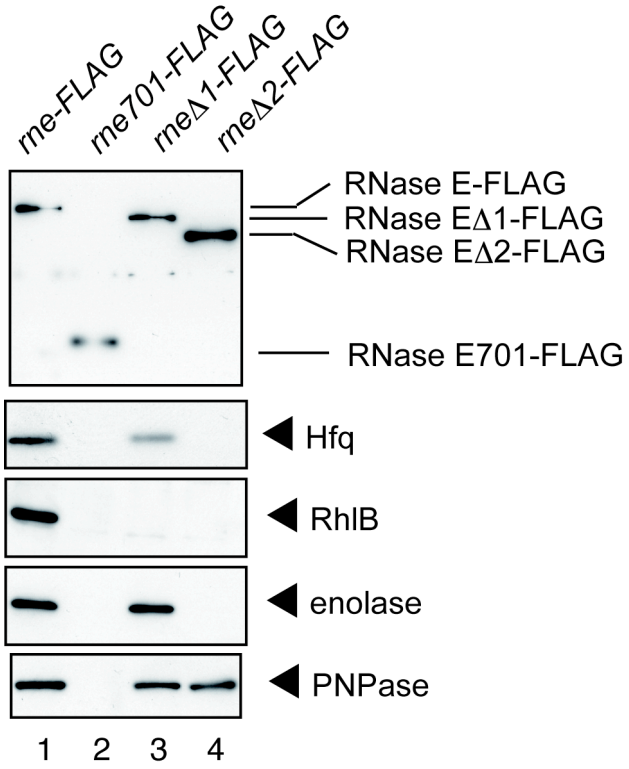


Fig. 10.　RNase EΔ1-FLAG 及び RNase EΔ2-FLAG と Hfq 及び主要な結合因子の相互作用

*rne-FLAG*、*rne701-FLAG*、*rneΔ1-FLAG*、及び *rneΔ2-FLAG* 株をそれぞれ LB 培地で OD600 = 0.6 まで培養し、細胞を集菌し、細胞粗抽出液を調製した。細胞粗抽出液に anti-FLAG M2-agarose beads を加えて反応させ、beads に結合したタンパク質を精製した。精製したタンパク質を、抗 FLAG 抗体、抗 RhlB 抗体、抗 enolase 抗体、抗 PNPase 抗体、抗 Hfq 抗体を用いた Western blotting により解析した。Western blotting の検出に用いた試料の量はそれぞれ RNase E 3 μl、RhlB 2 μl、enolase 2 μl、PNPase 2 μl、Hfq 5 μl である。

**scaffold 領域のポリペプチドは Hfq と結合できる**

sRNA を介した mRNA の分解、及び免疫沈降実験は 711-750 間の Hfq 結合領域が RNase E の標的 mRNA へのリクルートに必要であることを示した。しかしながら、これらの実験は RNase E の N 末端に存在する catalytic 領域や中央に位置する RNA 結合領域が RNase E/Hfq 間の結合に影響しているという可能性を排除できていない。この可能性について検討するために、RNase E の 702-844 アミノ酸配列とその N 末端に 6xHis 配列、C 末端に FLAG 配列を持つように設計したポリペプチドをコードする組換え遺伝子を pQE80L 上にクローニングし、pQE-His-702-844-FLAG を作成した。同様に、His6-711-844-FLAG ポリペプチドを発現する組換え遺伝子を pQE プラスミド上に構築した。pQE-His-702-844-FLAG、あるいは pQE-HIS-711-844-FLAG で形質転換した野生株において、702-844 領域、あるいは 711-844 領域の C 末端に FLAG 配列、N 末端に His6 配列が付加されたポリペプチドが IPTG の添加により発現した(Fig. 11, *レーン 2, 3*)。抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting による解析では目的のポリペプチドより分子量の低い位置に異なったバンドが確認できるが、これはそれぞれのポリペプチドの分解産物であると考える(Fig. 11,アスタリスク)。IPTG の添加によってこれらのポリペプチドを発現誘導させた形質転換体から細胞粗抽出液を調製し、anti-FLAG M2-agarose beads を使って免疫沈降を行った(Fig. 11)。beads に結合したタンパク質を Western blotting によって解析した。Western blotting による解析によって二重タグのついたポリペプチドが効率的に結合画分に回収できることを確認した(Fig. 11, *レーン 5, 6*)。抗 Hfq 抗体による Western blot 解析により、His6-701-844-FLAG 及び His6-711-844-FLAG ポリペプチドと Hfq は共沈降することが明らかになった(Fig. 11, *レーン 5, 6*)。以上の結果より、Hfq が N 末端領域や中央の RNA 結合領域なしに RNase E の scaffold 領域と結合できることを示した。また、RhlB もまた二重タグポリペプチド両者と共沈降した(Fig. 11, *レーン 5, 6*)。さらに Hfq/ポリペプチドの結合を詳細に解析する目的で、精製過程において細胞粗抽出液に micrococcal nuclease 処理を行い、scaffold 領域ポリペプチドと Hfq 間の結合に micrococcal nuclease は影響しないことを示した(Fig. 12)。micrococcal nuclease は一本鎖 RNA を切断する RNase である。このことからこれらのポリペプチドと Hfq 間の結合は RNA を介していないことが示唆された。

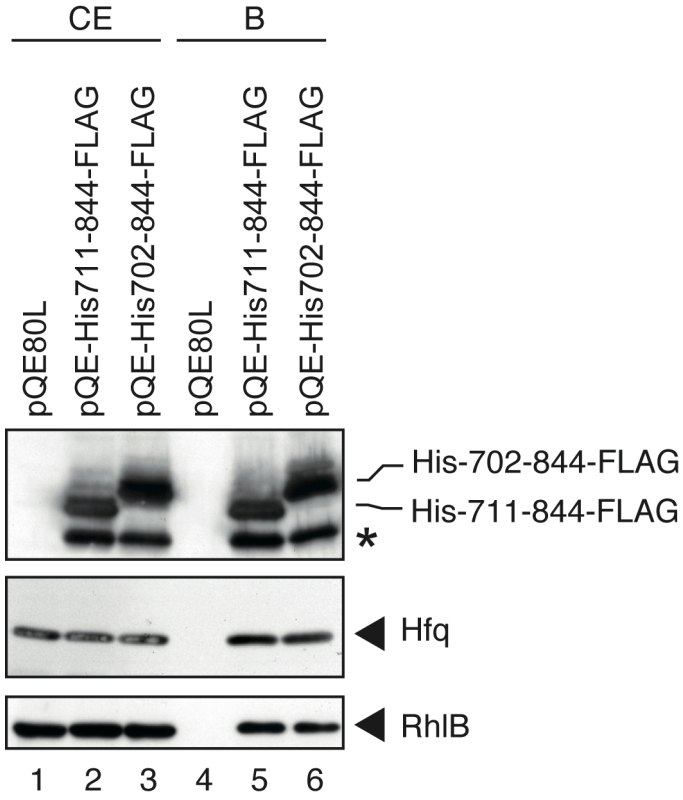


Fig. 11.　RNase E scaffold 領域ポリペプチドと Hfq 及び RhlB の相互作用

pQE-His-702-844-FLAG、あるいは pQE-HIS-711-844-FLAG で形質転換した野生株を 1 mM IPTG を含む LB 培地で培養した。OD600 = 0.6 の時、細胞を集菌し、細胞粗抽出液を調製した。細胞粗抽出液に anti-FLAG M2-agarose beads を加えて反応させ、beads に結合したタンパク質を精製した。精製したタンパク質を、抗 FLAG 抗体、抗 RhlB 抗体、抗 Hfq 抗体を用いた Western blotting により解析した。Western blotting の検出に用いた試料の量はそれぞれ RNase E 3 μl、RhlB 2 μl、Hfq 5 μl である。

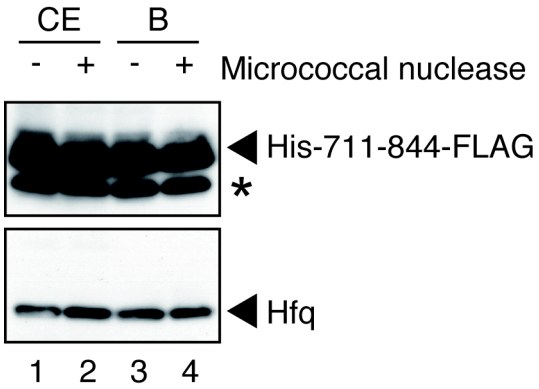


Fig. 12.　RNase E scaffold 領域ポリペプチドと Hfq の相互作用に及ぼす micrococcal nuclease の影響

pQE-HIS-711-844-FLAG で形質転換した野生株を 1 mM IPTG を含む LB 培地で培養した。OD600 = 0.6 の時、細胞を集菌し、細胞粗抽出液を調製した。細胞粗抽出液に 40 unit の micrococcal nuclease を添加し、2.5 mM $CaCl_2$ 存在下で 37℃、10 分間反応させた。その後 anti-FLAG M2-agarose beads を加えて反応させ、beads に結合したタンパク質を精製した。精製したタンパク質を、抗 FLAG 抗体、抗 RhlB 抗体、抗 Hfq 抗体を用いた Western blotting により解析した。Western blotting の検出に用いた試料の量はそれぞれ RNase E 3 μl、RhlB 2 μl、Hfq 5 μl である。

精製した scaffold ポリペプチドは精製した Hfq と結合する

scaffold 領域に相当するポリペプチド鎖に Hfq が結合する、またその結合は micrococcal nuclease の処理により影響を受けない、という以上の結果は、Hfq と RNase E の結合が RNA によらないということを示唆している。一方で、近年の *in vitro* の解析から、RNase E/Hfq 間の結合が RNA を介していることが示唆されている（Worrall *et al.*, 2008）。そこで私達は、精製した scaffold 領域ポリペプチドと精製した Hfq が *in vitro* において結合するかについて検証を行った。pQE-His-711-844-FLAG、あるいは pQE-Hfq-His（Kawamoto *et al.*, 2006）で形質転換させた *ΔhfqΔrhlB* 二重欠損株において、His-711-844-FLAG、あるいは His-Hfq をそれぞれ発現させ、細胞粗抽出液を調製した。二重タグ配列を持つ 711-844 ポリペプチド及び、C 末端に His 配列が付加された Hfq が細胞粗抽出画分に含まれることを、抗 FLAG 抗体、あるいは抗 Hfq 抗体を用いた Western blotting による解析によって確認した(Fig. 13 A, *レーン 2, 3*)。粗抽出画分中の RNA を分解するために RNase A 処理し、その後加熱処理を行った。熱に安定的な Hfq の精製には加熱処理は有効な手段であることが知られている（Brescia *et al.*, 2003）。これは、Hfq の活性に影響を与えずに多くの他のタンパク質が不溶化するからである。また私達は scaffold ポリペプチドが基本的に構造をとらないことから、His-711-844-FLAG が加熱処理に対し耐性を持つと考えた（Carpousis, 2007）。実際、加熱処理は His6-711-844-FLAG ポリペプチドの安定性に対しわずかしか影響を与えず、Hfq-His6 には影響を与えなかった(Fig. 13 A, *レーン 5, 6*)。さらに、加熱処理は RNA の二次構造をほどき、一本鎖の RNA 分解を行う RNase A による RNA 分解を促すことが考えられる。事実、このとき His 精製画分から RNA を調製し、ethidium bromide 染色することで残存する RNA の検出を試みたが、検出できない段階まで RNA が取り除かれていた（Fig. 15, *レーン 4, 5, 6*）。His6-711-844-FLAG ポリペプチド及び Hfq-His6 を Ni-NTA agarose resin によって精製した。Hfq-His の純度は SDS-PAGE の Coomassie Brilliant Blue 染色から約８０％程度であると概算される（Fig. 13 B, *レーン 9*）。一方で、His6-711-844-FLAG ポリペプチドの純度は非特異的なバンドがゲル上の同じ位置にくるため計算するのは難しい（Fig. 13 B, *レーン 8*）。さらに Fig. 13, A のアスタリスクで示したポリペプチドの分解産物は、Ni-NTA agarose による精製によっては確認されなかった (Fig. 13 A, *レーン 8*)。この結果は、分解産物がポ

リペプチドの N 末端を含まないことを示している。

次に、精製した Hfq-His6 と His6-711-844-FLAG ポリペプチドを混合し、anti-FLAG M2-agarose beads を加えて反応させた。そして beads に結合したタンパク質を溶出し、Western blotting により解析した。その結果、Hfq-His6 は His6-711-844-FLAG ポリペプチドと一緒に結合画分から回収された(Fig. 14, *レーン 2*)。精製した Hfq 単独では anti-FLAG M2-agarose beads と反応させても、結合画分に Hfq は回収されてこなかった(Fig. 14, *レーン 1*)。以上の結果は、精製した His6-711-844-FLAG ポリペプチドが精製した Hfq-His6 と *in vitro* において結合できることを示している。またこれらの結果は Hfq と RNase E の scaffold 領域が RNA 無しに結合できることを強く示唆している。

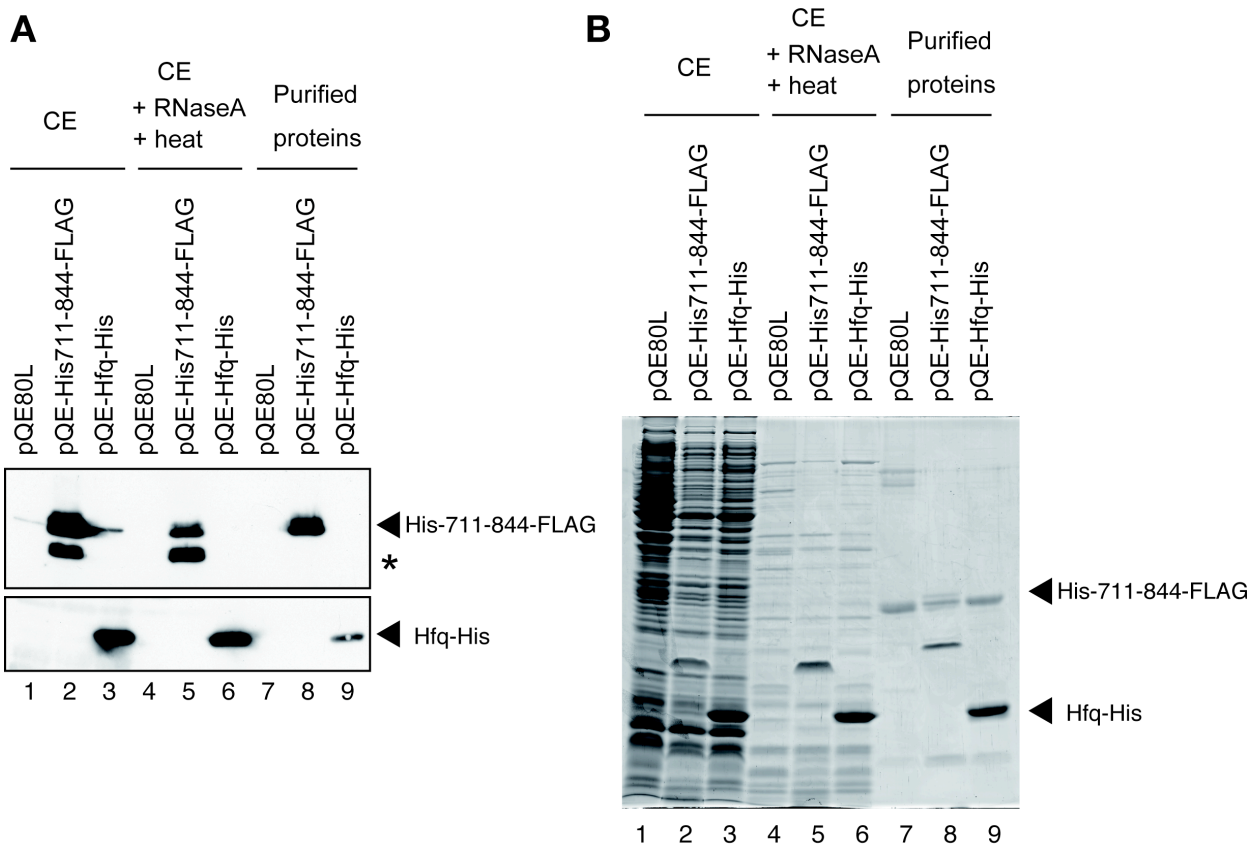


Fig. 13.　RNase E scaffold 領域ポリペプチドと Hfq の精製

A.　pQE-His-711-844-FLAG、あるいは pQE-Hfq-His（Kawamoto *et al.*, 2006）で形質転換させた *Δhfq ΔrhlB* 二重欠損株において、His-711-844-FLAG、あるいは His-Hfq をそれぞれ発現させ、細胞粗抽出液を調製した。細胞粗抽出液に RNase A（10μg/ml）を加えて氷上で 10 分間反応させ、その後 80℃で 10 分間加熱処理した。次に試料に $Ni^{2+}$-NTA agarose resin を加えて反応を行い、beads に結合したタンパク質を溶出し、Western blotting により解析した。Western blotting の検出に用いた試料の量はそれぞれ His-711-844-FLAG 0.5 μl、Hfq-His 0.1 μl である。また、His-711-844-FLAG ポリペプチドの分解産物をアスタリスクで示した。

B.　A と同一の試料を SDS-PAGE にて分離し、Coomassie Brilliant Blue 染色を行った。用いた試料の量はそれぞれ CE 画分 2 μl、CE（+RNase A + heat）画分 2 μl、His 精製画分 10 μl である。

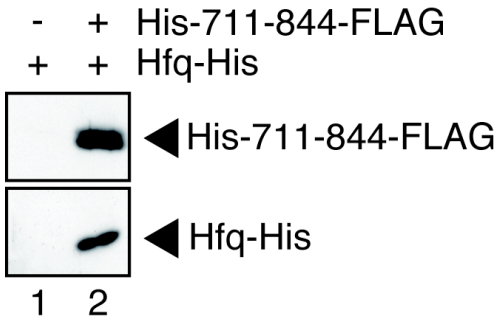


Fig. 14.　精製した RNase E scaffold 領域ポリペプチドと精製した Hfq の相互作用

精製した Hfq-His6 と His-711-844-FLAG ポリペプチドを混合し、anti-FLAG M2-agarose beads を加えて反応させた。そして beads に結合したタンパク質を溶出し、Western blotting により解析した。Western blotting の検出に用いた試料の量はそれぞれ His-711-844-FLAG 2.5 μl、Hfq-His 5 μl である。

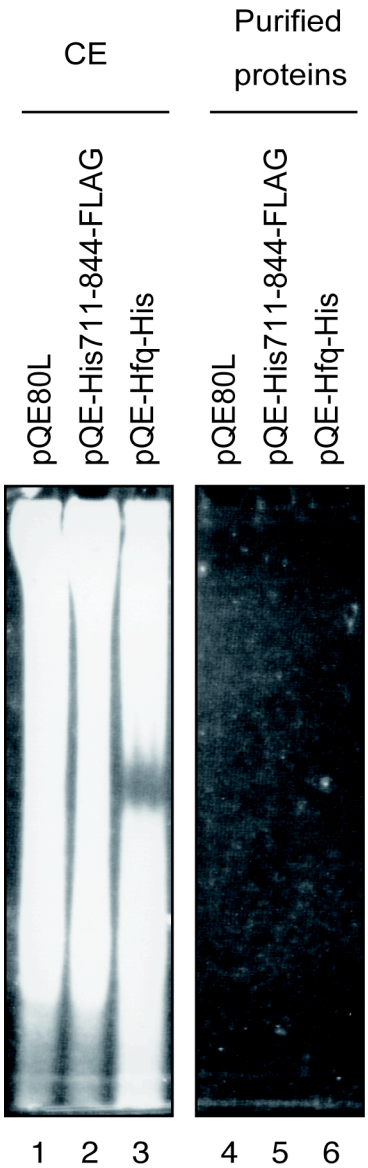


Fig. 15.　精製した RNase E scaffold 領域ポリペプチドと精製した Hfq に含まれる核酸の検出

pQE-His-711-844-FLAG、あるいは pQE-Hfq-His（Kawamoto *et al.*, 2006）で形質転換させた *Δhfq ΔrhlB* 二重欠損株において、His-711-844-FLAG、あるいは His-Hfq をそれぞれ発現させ、細胞粗抽出液を調製した。細胞粗抽出液に RNase A（10μg/ml）を加えて氷上で 10 分間反応させ、その後 80℃で 10 分間加熱処理した。次に試料に $Ni^{2+}$-NTA agarose resin を加えて反応を行い、beads に結合したタンパク質を溶出した。それぞれの試料から RNA を調製し、6% Native PAGE によって分離を行い、ethidium bromide 染色をして、UV（365 nm）により核酸を検出した。

**RhlB の過剰発現は Hfq と RNase E との結合を阻害する**

ここまでの結果で示した Hfq との機能的結合領域として決定した RNase E の 711-750 領域は、RhlB の結合領域と重複する。このことは、Hfq と RhlB は RNase E への結合に対し、お互いに排他的である可能性を示す。これまでに示された、Hfq-FLAG、あるいは RhlB-FLAG の精製画分に RNase E は確認される一方で、RhlB、あるいは Hfq は確認されないという実験結果は、この可能性を強く支持する（Morita, *et al.,* 2005）。そこで次に、RhlB の過剰発現が RNase E/Hfq 間の相互作用に影響を与えるかどうか解析した。このために、pQE-His-RhlB プラスミドを構築した。このプラスミドは IPTG 添加によって 6 ×His 配列が付加された RhlB が発現する。この pQE-His-RhlB プラスミドを、ゲノム上に *rne-FLAG* を持つ TM522 株に形質転換した。IPTG の添加によって他のタンパク質に影響を与えずに His 配列を持った RhlB の過剰発現が確認された(Fig. 16, *レーン 2*)。この細胞において細胞粗抽出液を調製し、anti-FLAG M2-agarose beads と反応させ、結合画分を Western blotting によって解析した。抗 FLAG 抗体による Western blotting により、FLAG 配列を付加した RNase E が効率よく結合画分に回収されていることを確認した(Fig. 16, 1 段, *レーン 3, 4*)。このとき RNase E-FLAG と共沈降したタンパク質を抗 RhlB、及び抗 Hfq 抗体を用いた Western blotting によって解析した。結合画分中の Hfq 量は RhlB 過剰発現時において明らかに減少した(Fig. 16, 2 段, *レーン 4*)。また結合画分中の RhlB 量はわずかに増加していた(Fig. 16, 3 段, *レーン 4*)。これらの結果は、RhlB の過剰発現が RNase E/Hfq 間の相互作用を有意に阻害しており、Hfq 及び RhlB の RNase E に対する結合がお互いに排他的であることを示唆している。しかしながら、結合画分中の RhlB 量の増加がわずかであることから、RhlB の過剰発現による他の影響で RNase E/Hfq 間の結合が阻害された可能性は排除できない。

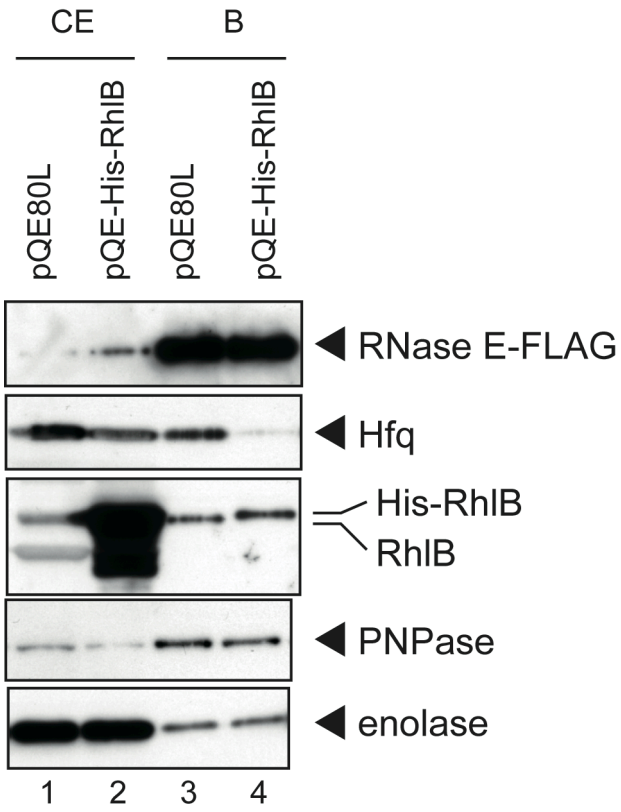


Fig. 16. Hfq/RNase E 間の相互作用に対する RhlB の過剰発現の影響

pQE-His-RhlB プラスミドで、ゲノム上に *rne-FLAG* を持つ TM522 株を形質転換し、1 mM IPTG を含む LB 培地で培養した。OD600 = 0.6 の時、細胞を集菌し、細胞粗抽出液を調製した。細胞粗抽出液に anti-FLAG M2-agarose beads を加えて反応させ、beads に結合したタンパク質を精製した。精製したタンパク質を、抗 FLAG 抗体、抗 RhlB 抗体、抗 enolase 抗体、抗 PNPase 抗体、抗 Hfq 抗体を用いた Western blotting により解析した。Western blotting の検出に用いた試料の量はそれぞれ RNase E 3 μl、RhlB 2 μl、enolase 2 μl、PNPase 2 μl、Hfq 5 μl である。

**SgrS/Hfq/RNase E による速やかな *ptsG* mRNA の分解に対する RhlB の過剰発現の影響**

RhlB 過剰発現時において RNase E に結合している Hfq 量が低下することから、sRNA による標的 mRNA の速やかな分解に影響を与えることが考えられる。この可能性を検証するために、私達は RhlB 過剰発現時において、SgrS を介した *ptsG* mRNA の速やかな分解に与える影響を解析した。pQE-His-RhlB で形質転換した野生株を、LB 培地において IPTG 存在下及び非存在下で培養した。その後、Glc もしくは αMG を添加し、10 分間継続して培養を行い、細胞から RNA を抽出して、*sgrS* または *ptsG* DIG プローブを用いた Northern blotting によって解析した。その結果、IPTG 非存在下において αMG によって SgrS を誘導した時、SgrS は *ptsG* mRNA の速やかな分解を引き起こした(Fig. 17, *レーン 2*)。一方、IPTG 存在下においては、αMG によって SgrS が通常通り誘導されているにもかかわらず、*ptsG* mRNA の分解は有意に阻害された(Fig. 17, *レーン 4*)。この結果は、RhlB の過剰発現が RNase E 依存的な *ptsG* mRNA の速やかな分解を部分的に阻害することを示唆する。このことは、Hfq の機能的結合領域が RNase E の 711-750 領域であるというこれまでの結果を支持する。本研究により明らかになった RNase E/Hfq 間の相互作用領域モデルについて Fig. 18 に図示した。

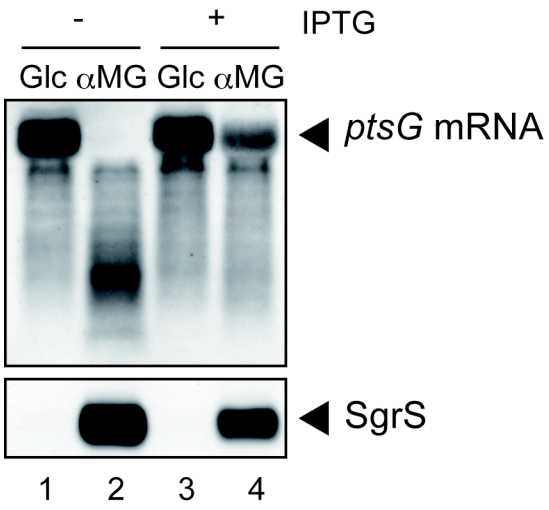


Fig. 17.　*ptsG* mRNA の分解に対する RhlB の過剰発現の影響

pQE-His-RhlB プラスミドで野生株を形質転換し、1 mM IPTG を含む LB 培地で培養した。OD600 = 0.6 の時、Glc 及び αMG を最終濃度 0.1%になるように加え、10 分間培養を継続した。細胞を集菌し、RNA を調製して DIG で標識した *ptsG* あるいは *sgrS* DNA probe を用いた Northern blotting により解析した。*ptsG* mRNA の検出には 15 μg、SgrS の検出には 5 μg の RNA 試料を用いた。

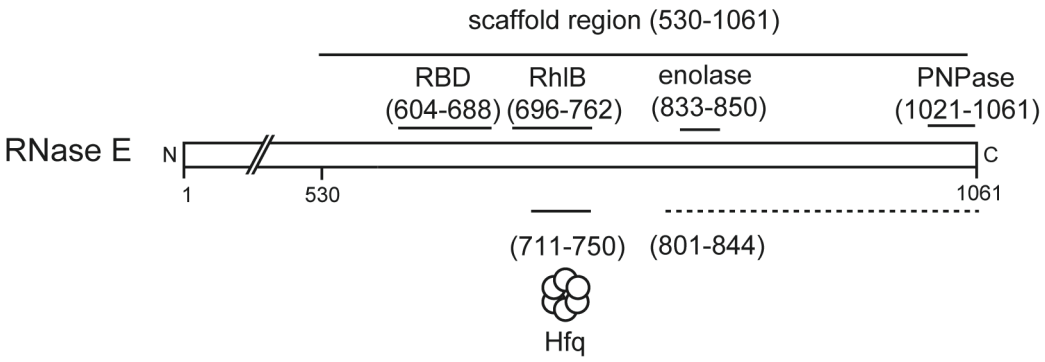


Fig. 18.　Hfq と RNase E の scaffold 領域の相互作用領域モデル

RNase E の scaffold 領域における Hfq の相互作用領域を図示した。本研究から RNase E の 711-750 領域と Hfq は機能的な相互作用をしていることが明らかとなった。この領域は RhlB の RNase E に対する相互作用領域と重複している。また、Hfq は RNase E の 801-844 領域及び 845-1061 領域とも物理的な相互作用をしていると考えられる。

RNase E を基盤とした複合体は細胞内に複数存在する

Morita らは、RNase E/Hfq 複合体が RNase E に結合する主要な因子である enolase 及び RhlB を含まないことを示した（Morita *et al.*, 2005）。本研究により RNase E への結合に対し、Hfq 及び RhlB は競合的であることが示唆された。これらのことは細胞内に複数の RNase E を基盤とした RNA 分解複合体が存在する可能性を示唆している。そこで RNase E を基盤とした複合体についてより詳細に解析するために、RNase E の scaffold 領域に結合するとされる主要な因子である PNPase 、RhlB、enolase の三者に加えて、Hfq の四者それぞれの C 末端領域に FLAG タグ配列を付加した株を用いて共沈実験を行うことで、それぞれのタンパク質に結合するタンパク質因子の解析を行った。Hfq-FLAG を発現する株は、Hfq の C 末端に FLAG タグ配列が付加した遺伝子をゲノム上に持つ *hfq-FLAG rne-HA*（TM645）株を用いた（Morita *et al.*, 2005）。PNPase 、RhlB、enolase それぞれの C 末端領域に FLAG 配列を付加した遺伝子を Datsenko らが開発した系（Datsenko and Wanner 2000）によりゲノム上の相同組換えにより形質転換し、*pnp-FLAG* 株、*rhlB-FLAG* 株、*eno-FLAG* 株をそれぞれ構築した。その後、*rne-HA-cat* 遺伝子を、それぞれの大腸菌株に P1 ファージを用いて形質導入した。このようにして、*pnp-FLAG rne-HA-cat*（YI11）、*rhlB-FLAG rne-HA-cat*（TM648）、及び *eno-FLAG rne-HA-cat*（YI9）、株を構築した。目的の遺伝子が形質導入されたことを確認するために、*rne-HA* 株（TM641）、YI9、YI11 株、及び TM648 株を LB 培地で培養し、試料を調製した。この試料を SDS-PAGE により分離し、抗 FLAG 抗体、及び抗 HA 抗体を用いて Western blotting により解析した。enolase は約 48kDa、PNPase は約 80kDa、RhlB は約 50kDa である。抗 FLAG 抗体による Western blotting 解析により、それぞれ目的の位置にバンドを検出した（Fig. 19, 上段）。また、それぞれの株において抗 HA 抗体により、同じ位置に RNase E-HA のバンドが検出された（Fig. 19, 下段）。この結果から、*pnp-FLAG rne-HA-cat*（YI11）、*rhlB-FLAG rne-HA-cat*（TM648）、及び *eno-FLAG rne-HA-cat*（YI9）株の構築が確認された。

次に *rne-FLAG*（TM522）、YI11、TM648、YI9 及び TM645 株において、anti-FLAG M2 agarose beads を用いた共沈実験を行った。集菌した細胞から細胞粗抽出液を調製し、anti-FLAG M2 agarose beads と反応させ、精製画分を調製した。精製画分を Nu-PAGE Gel(4%-12% gradient gel)によって分離し、

銀染色法によりタンパク質を染色した（Fig. 20）。このとき、それぞれの精製画分中の RNase E 量が均一になるように試料の量を調節した（Fig. 20, 矢頭）。RNase E に結合する RhlB、enolase、PNPase が同時に RNase E に対して結合しているならば、RNase E 量を揃えた際には、精製したタンパク質以外の RNase E 結合因子に関しては同程度検出されることが予想される。しかし、PNPase-FLAG、RhlB-FLAG、enolase-FLAG、Hfq-FLAG に結合してきたタンパク質のパターンは RNase E-FLAG の結合画分で示されたパターンとは明らかに異なっていた（Fig. 20）。このことは、PNPase、RhlB、enolase、及び Hfq に結合している RNase E がそれぞれで異なる複合体を形成している可能性を示している。

このことをさらに詳細に解析する目的で、RNase E 量を揃えた先の実験条件で、それぞれの結合画分を抗 HA 抗体、抗 FLAG 抗体、抗 PNPase 抗体、抗 RhlB 抗体、抗 enolase 抗体、抗 Hfq 抗体を用いて Western blotting によって解析した。PNPase-FLAG と共沈したそれぞれのタンパク質因子（RhlB、enolase、Hfq）は、RNase E-FLAG の結合画分に検出されたそれぞれの因子とほぼ同程度検出された（Fig. 21, *レーン 2, 3*）。その一方で、RhlB-FLAG の結合画分には、PNPase がわずかに検出され、enolase と Hfq は検出されなかった（Fig. 21, *レーン 4*）。また同様に、enolase-FLAG、あるいは Hfq-FLAG の結合画分には、それぞれ PNPase がわずかに検出され、RhlB、Hfq、あるいは RhlB、enolase が検出されなかった（Fig. 21, *レーン 5, 6*）。これらの結果は、RNase E/PNPase を核として、さらに RhlB、enolase、あるいは Hfq がそれぞれ独立に結合した RNase E 複合体が形成されていることを示唆する。これは RhlB、enolase、Hfq の三者は同時に RNase E と結合できない、すなわちお互いに排他的に RNase E に作用することを示唆している。

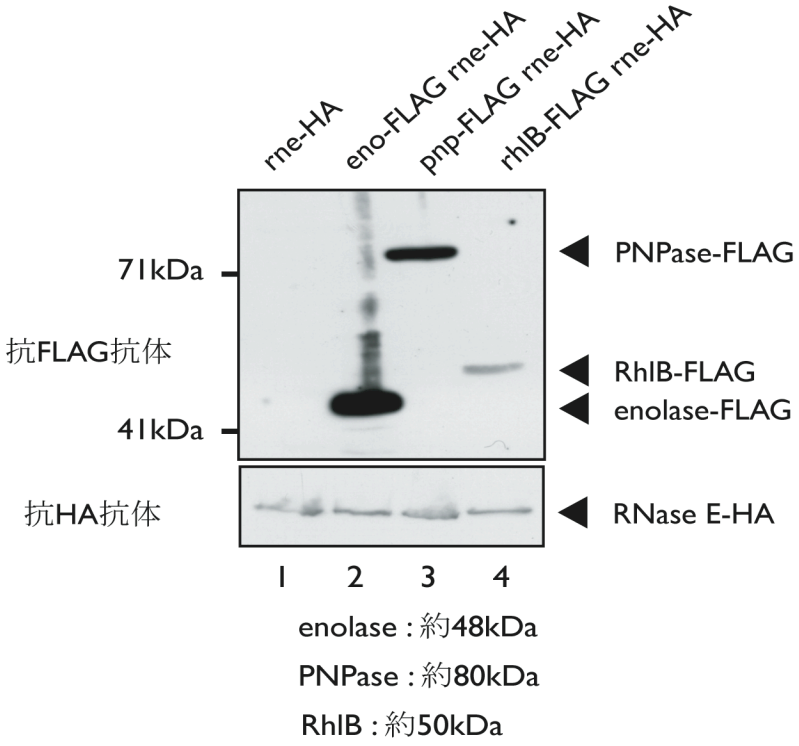


Fig. 19.　*eno-FLAG rne-HA* 株と *pnp-FLAG rne-HA* 株の構築

enolase-FLAG、及び PNPase-FLAG を検出する目的で、*rne-HA* 株（TM641）、*eno-FLAG rne-HA* 株（YI9）、*pnp-FLAG rne-HA* 株（YI11）、*rhlB-FLAG rne-HA* 株（TM648）を LB 培地で培養し、細胞を集菌してタンパク質試料を調製した。試料を SDS-PAGE により分離し、抗 FLAG 抗体、及び抗 HA 抗体を用いて Western blotting により解析した。

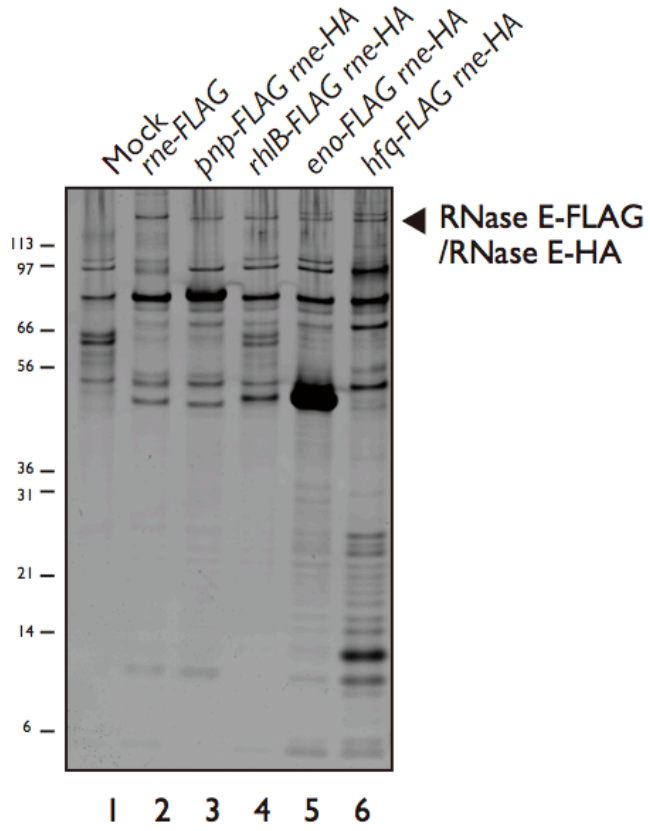


Fig. 20.　RNase E と PNPase、RhlB、enolase、Hfq の相互作用

*rne-HA* 株（TM641）、*eno-FLAG rne-HA* 株（YI9）、*pnp-FLAG rne-HA* 株（YI11）、*rhlB-FLAG rne-HA* 株（TM648）を LB 培地で培養し、OD600 = 0.6 の時、細胞を集菌して細胞粗抽出液を調製した。細胞粗抽出液に anti-FLAG M2-agarose beads を加えて反応させ、beads に結合したタンパク質を精製した。精製したタンパク質を Nu-PAGE Gel(4%-12% gradient gel)によって分離し、銀染色法によりタンパク質を染色した。このとき、それぞれの精製画分中の RNase E 量が均一になるように試料の量を調節した。解析に用いた精製画分試料の量はそれぞれ Mock 0.25 μl、RNase E-FLAG 0.25 μl、PNPase-FLAG 0.5 μl、RhlB-FLAG 0.5 μl、enolase-FLAG 1 μl、Hfq-FLAG 1 μl である。

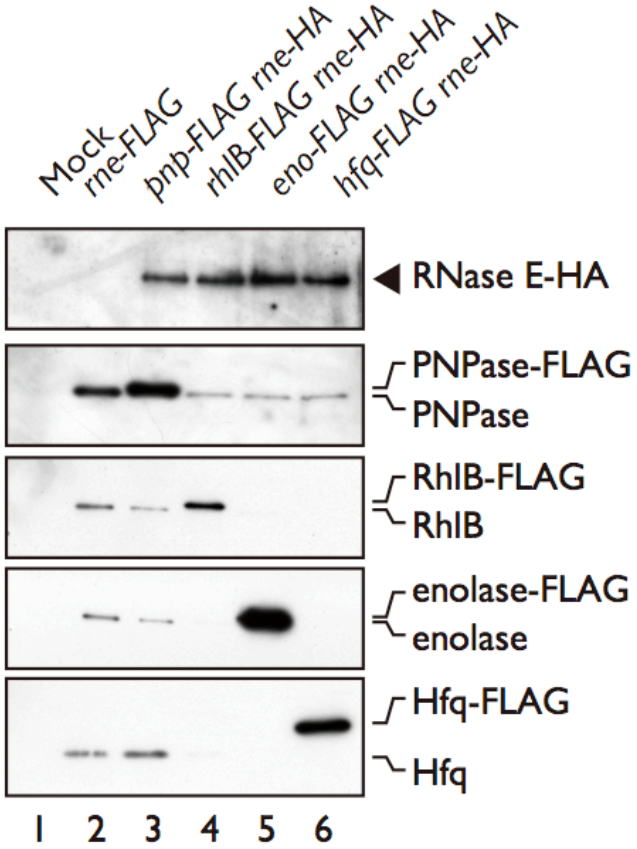


Fig. 21.　RNase E、Hfq 及び主要な結合因子それぞれの共沈実験による相互作用因子の解析

*rne-HA* 株（TM641）、*eno-FLAG rne-HA* 株（YI9）、*pnp-FLAG rne-HA* 株（YI11）、*rhlB-FLAG rne-HA* 株（TM648）を LB 培地で培養し、OD600 = 0.6 の時、細胞を集菌して細胞粗抽出液を調製した。細胞粗抽出液に anti-FLAG M2-agarose beads を加えて反応させ、beads に結合したタンパク質を精製した。精製したタンパク質を、抗 FLAG 抗体、抗 RhlB 抗体、抗 enolase 抗体、抗 PNPase 抗体、抗 Hfq 抗体を用いた Western blotting により解析した。このとき、それぞれの精製画分中の RNase E 量が均一になるように試料の量を調節した。解析に用いた精製画分試料の量はそれぞれ Mock 0.25 μl、RNase E-FLAG 0.25 μl、PNPase-FLAG 0.5 μl、RhlB-FLAG 0.5 μl、enolase-FLAG 1 μl、Hfq-FLAG 1 μl である。

## 考察

RNA 結合タンパク質である Hfq と Hfq 結合性 sRNA は RNase E と結合する因子であることが Morita らの研究から明らかになった（Morita *et al.*, 2005）。RNase E、Hfq に対し、SgrS や RyhB といったそれぞれの特異的 sRNA が結合した RNA-タンパク質複合体はストレス存在下において標的 mRNA に働き、塩基対を形成することによって翻訳阻害を引き起こし、RNase E 依存的な mRNA/sRNA それぞれの分解を引き起こす（Masse *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2005; Udekwu *et al.*, 2005）。このとき、RNase E/Hfq 間の相互作用の役割は標的 mRNA への RNase E のリクルート及び、RNase E による mRNA、および sRNA それぞれの速やかな分解を促すことである（Morita *et al.*, 2006）。

RNase E の C 末端に位置する scaffold 領域中の degradosome を構成する因子の結合部位は詳細に報告されている（Marcaida *et al.*, 2006; Carpousis, 2007; Worrall *et al.*, 2008）。Morita らは Hfq が RNase E の scaffold 領域に結合することを示した（Morita *et al.,* 2005）。さらに本研究により RNase E の scaffold 領域における Hfq の機能的結合領域を同定した。RNase E の C 末端領域を段階的に欠失させ、かつ C 末端に FLAG タグ配列を付加した変異 RNase E をゲノム上に持つ株を作成した（Fig. 1, 2）。これらの株を用いた解析は、750 アミノ酸残基までを持つ変異 RNase E が sRNA を介した標的 mRNA の速やかな分解能を維持していることを明らかにした（Fig. 3, 4）。そして、RNase E844、RNase E800、RNase E750 は Hfq 結合能を維持しているが、RNase E710 は sRNA の有無に関わらず、Hfq 結合能を失っていた（Fig. 5, 6）。これらの結果は、RNase E の 711-750 領域が Hfq との機能的結合領域であることを示唆する。また、711-750、あるいは 711-844 領域を欠失した RNase EΔ1-FLAG、あるいは RNase EΔ2-FLAG を発現する変異 *rne* 遺伝子をそれぞれゲノム上に作成した。*rneΔ1-FLAG* 株において、αMG の添加によって起こる *ptsG* mRNA の速やかな分解が部分的に阻害されることを見出した(Fig. 9)。また *rneΔ2-FLAG* 株において、*ptsG* mRNA の分解は完全に阻害された(Fig. 9)。RNase EΔ1-FLAG は *ptsG* mRNA の分解能は著しく失っているが一方で、Hfq の結合能は維持している(Fig. 10)。この結果は、Fig. 5 の共沈実験の結果により Hfq が RNase E の複数の箇所で結合しており、その中で RNase E による sRNA を介した mRNA の標的化に必要である機能的 Hfq 結合領域が RNase E の 711-750 であるという先

の結論を支持する。また RNase EΔ1-FLAG において *ptsG* mRNA の分解能がわずかに残っていたのは、801-844 領域に結合している Hfq によりリクルートされた RNase E が部分的に *ptsG* mRNA を分解したためであると考える(Fig. 9, 10)。

また本研究から RNase E の 801-844 と 845-1061 領域は Hfq と物理的な相互作用をしていることが明らかとなった。しかし、RNase E の内部部分欠失株による解析は 845-1061 間領域のみでは Hfq が安定して結合できないことを示している（Fig. 10)。さらに、RNase E750 が sRNA を介した *ptsG* mRNA の分解を速やかに行うことから、RNase E の 801-844 と 845-1061 領域と Hfq の結合は sRNA を介した標的 mRNA の分解に必要な RNase E/Hfq 間の機能的な結合には寄与していないと考えられる。このことから RNase E の 801-844 及び 845-1061 領域における Hfq の結合の役割は 711-750 領域と Hfq 間の機能的な結合を安定化するためであると考えられる。さらに、RhlB の過剰発現は Hfq の RNase E への結合を 711-750 領域のみではなく、801-844, 845-1061 領域までも阻害した（Fig. 16)。どのように RNase E/RhlB 間の相互作用が RhlB の結合領域と重複しない領域の RNase E と Hfq との結合に影響を与えているかは興味深い。

Morita らは、精製過程において細胞粗抽出液に micrococcal nuclease 処理を行っても、RNase E と共沈する Hfq 量に影響しないことを示した(Morita *et al.*, 2005)。これは Hfq が RNA なしに RNase E と結合できる可能性を示唆している。その一方で、Worrall らは、それぞれ独立に徹底的に精製した Hfq、あるいは RNase E の 628-843（主要 RNA 結合領域、および C 末端 scaffold 領域の一部）との結合を *in vitro* で解析した結果、反応液中にさらに RNA を加えた条件下で RNase E/Hfq 間の結合が検出されることを報告した(Worrall *et al.*, 2008)。これらの結果から彼らは、RNase E/Hfq 間の結合に一本鎖核酸を分解する micrococcal nuclease で分解されないような構造に富む RNA、あるいは Hfq/RNase E と強固に結合している RNA が存在する可能性を論じた。しかしながら、本研究では、micrococcal nuclease 処理を行っただけではなく RNase A 処理を行った実験も行い、*in vitro* における RNase E ペプチド(711-844-FLAG)/Hfq 間の結合に RNase A 処理が影響しないことを示した（Fig. 14)。このように、nuclease 処理による実験からは RNA が RNase E /Hfq 間の結合を媒介している、または上昇させる証拠を得られなかった。さらに、二次的な RNA 結合領

域である AR2（798-819 領域）を欠いた RNase E800 や RNase E750 はまだ Hfq 結合能を維持しており、sRNA を介した標的 mRNA の分解を引き起こす。このことは AR2 が RNA を介した RNase E/Hfq 間の相互作用能力を持っていたとしても、RNase E と Hfq 間の機能的な相互作用には必要ないことを示している。一方で、Worrall らの用いた RNase E ポリペプチドには Hfq が結合する scaffold 領域に加えて、主要な RNA 結合領域（604-688 領域）を含んでいる。これまでの解析から、主要 RNA 結合領域のみのポリペプチドを発現させた場合に Hfq とポリペプチドの共沈降が確認され、この相互作用は、本研究で示した 711-844 ポリペプチドの実験結果とは異なり、micrococcal nuclease 処理により影響を受けることが示されている（八木、未発表）。このことは、RNase E の主要 RNA 結合領域（604-688 領域）のポリペプチドは非特異的な RNA を介して Hfq と結合することを示している。また RNase E701-FLAG では Hfq との共沈降が確認されないことから、主要 RNA 結合領域のポリペプチドと Hfq との非特異的な相互作用に関与した RNA は通常は RNase E の触媒領域の活性により通常は分解されていることが示唆される。RNase E の scaffold 領域のみのポリペプチドを用いた本研究は、主要な RNA 結合領域（604-688 領域）なしに RNase E の scaffold 領域と Hfq が結合できることを示している（Fig. 11）。本研究で行った *in vitro* における結合実験では、細胞粗抽出液の RNase A 処理に加え、熱処理を行い、His タグによる affinity 精製を行っている。これらの処理により、精製画分には少なくとも ethidium bromide 染色によって確認できない段階まで RNA が取り除かれていることを確認している（Fig. 15）。これらのことから高い可能性として、Hfq は RNA を介さずに RNase E の scaffold 領域と直接結合していると考えられる。しかし、本研究からはまだ、ごく少量の RNA 断片が精製した Hfq や scaffold ポリペプチドに結合して残っており、RNase E /Hfq 間の結合を介しているという可能性を完璧に排除することはできない。

ここまでで示した結果は、RNase E/Hfqの機能的な相互作用をより詳細に明らかにした。その一方で、標的mRNAへのRNase Eのリクルートが Hfq/sRNAによるmRNAの翻訳阻害には必要ないこと、およびmRNAの翻訳阻害がsRNAによるmRNA抑制の直接の原因であること（Morita *et al.*, 2006）から、RNase Eによる標的mRNAの速やかな分解、及びそれと共役して起こるsRNAの分解の生理学的意義は未解決の問題である。最近Husseinらは、Hfqと結合するRNAをプラスミドから過剰に供給させることにより、Hfqに依存した

sRNAによるmRNA抑制が部分的に阻害されることを示した（Hussein *et al.*, 2010）。このことは、sRNAによるmRNA抑制系において、Hfqが量的制限を持つ可能性を示唆する。またMakiらは、*in vitro*においてSgrS/*ptsG* mRNA/Hfq複合体が安定に存在することを示した（Maki, *et al.*, 2008）。これらのことを合わせて、RNase EによるmRNAの速やかな分解、及びそれと共役して起こるsRNAの分解の生理学的な意義の一つとして、sRNA/mRNAと複合体を形成したHfqの速やかな解放が考えられる。この可能性の検証も含め、RNase Eによる標的mRNA、及びsRNAが速やかな分解の生理学的な意義を明らかにすることは取り組みたい問題の一つである。

本研究により明らかになったRNase EのC末端scaffold領域におけるHfq の結合領域は他のタンパク質の結合領域と併せて Fig. 16 に図示した（Marcaida *et al.*, 2006; Carpousis, 2007; Worrall *et al.*, 2008）。機能的なHfqの結合領域はRhlBの結合領域と重複している。実際に本研究においてRhlBの過剰発現の影響を解析し、RhlBの過剰発現によりHfq/RNase E間の結合が阻害され、標的mRNAの速やかな分解が抑圧されることを示した（Fig. 16, 17）。これはHfqとRhlBがRNase Eに対して同時に結合できないというMoritaらの研究結果と一致する（Morita *et al.*, 2005）。さらに、本研究の結果はHfqとRhlBのRNase Eへの結合はお互いに競合的であるということを示唆している(Fig. 16)。しかし、RhlBの過剰発現が及ぼす他の影響によりRNase EとHfqの結合を阻害する可能性は否定できない。一方で、Moritaら、あるいは本研究結果においても、RhlB-FLAG の精製画分には Hfq は共沈されないことが示された（Morita *et al.,* 2005, Fig. 21, *レーン 4*）。このことからRhlBとHfqは直接結合できないと考えられ、Hfqが過剰発現したRhlBにトラップされているとは考えにくい。

HfqとRhlBはRNase Eに対して同時に結合できない（Morita *et al.*, 2005）。また本研究からHfqとRhlBだけではなくenolaseを含む三者がRNase Eに対して同時に結合できないことが示唆された（Fig. 21）。このことから、現在まで広く考えられていたRNA degradosomeと呼ばれるRNA分解複合体は一様ではなく、多様に存在する可能性が示唆された。また細胞内でRNase E/Hfq複合体が減少することはsRNAを介した速やかな標的mRNA分解機構を阻害する（Fig. 17, *レーン4*）。これはRNase E/Hfq複合体がsRNA/mRNAの分解に特化したRNA分解複合体であることを示唆している。このことはRNase Eの幅広い

RNA基質認識能はRNase Eのscaffold領域に結合するタンパク質因子によって制御されている可能性を示唆している。本研究により少なくともRNase E/RhlB/PNPase、RNase E/enolase/PNPase、RNase E/Hfq/PNPaseという三種のRNase Eを基盤とした複合体が細胞内に存在することが考えられる。RhlB及びenolaseを含むRNase E複合体の機能についても解析を進めることはRNase Eを基盤として構成される複合体の包括的な理解に重要である。これまでのRNase E複合体様式、あるいはscaffold領域と結合因子の相互作用の知見は、プラスミドから発現させたscaffold領域に対応する組換えタンパク質を用いた解析によりもたらされている。本研究で用いた内部部分欠失変異をはじめとする一連の変異RNase Eは、ゲノム上の*rne*遺伝子を組み換えることにより発現系を構築している。そのため、これらの変異RNase Eは、プラスミドから発現させる組換えRNase Eと比較し、より自然に近い発現パターンを示す。このことから、これらの変異株がRNase Eと結合因子との結合が細胞内でどうのように機能しているかを解析するのに、より有用なツールだと考えられる。本研究で作成したRNase EΔ1-FLAGにはscaffold領域に結合する主要な因子のうち、Hfq、およびRhlBが結合できない（Fig. 10）。またRNase E844-FLAGにはPNPaseが結合できない（Fig. 5）。このようにRNase Eに結合する因子の一部が結合できなくなる変異において、細胞内RNAの安定性を評価することで、RNase Eを基盤とした様々なRNA分解複合体が存在する意義について今後検証する必要がある。

上述したようにRNase E複合体が多様に存在するだけでなく、それらRNase E複合体の存在比率が細胞環境に応答してダイナミックに変化している可能性が、現在提唱されつつある。(Carpousis, 2007)。DEAD-box RNA helicaseであるCsdAはコールドショック時に発現し、低温時においてRNase Eと相互作用することが示されている（Prud'homme-Genereux *et al.*, 2004）。本研究において糖代謝ストレス、及び鉄枯渇ストレスといった細胞状態の変化によっても、RNase E /Hfqの結合量に差は見られなかった（Fig. 6, 7）。このことはHfqがある頻度で恒常的にRNase Eと複合体を形成しており、そこにsRNAの有無は関与しない可能性を示唆している。その一方で、PNPase、RhlB、enolaseに関しては、細胞状態の変化によるRNase Eとの結合量の違いは未解析である。これまでに、RNase Eの変異株、あるいは結合因子の変異株でマイクロアレイを行い、RNase E、及び１つの結合因子の変異でのみ安定性に影響を受けるmRNAが存

在することが確認されている（Bernstein *et al.*, 2004）。このことはRNase E、およびその結合因子の相互作用に依存したRNA分解経路でmRNAが分解されている可能性を示唆している。それぞれのRNase E複合体によるRNA分解能が異なるとして、その対象のmRNAの翻訳産物の機能や、遺伝子発現パターンから、もしそれらの遺伝子が環境変化に依存して発現が調節されているmRNA（遺伝子）であれば、その環境条件化におけるRNase E複合体の解析を行うことは、RNase E複合体形成のダイナミクスを明らかにする第一歩だと考える。結合因子にタグを付加した一連の大腸菌株、および部分欠失したRNase E発現株を用いて、共沈実験、及びNorthern blottingにより解析することで、RNase Eを基盤とする複数の複合体がおりなす多様なRNA分解経路の全容を明らかにしたい。

## 材料、方法

### 培養条件

液体培地はLB（1% Bact-tryptone, 0.5% Bact-Yeast Extract, 1% NaCl, 2 mM NaOH）培地を用い、実験に際し、chloramphenicol（最終濃度 15 μg/ml）、ampicillin（最終濃度 50 μg/ml）を適宜加えて用いた。菌体は好気条件下、37℃において振蕩培養を行った。また菌体の培養経過は波長 600nm における濁度（$OD_{600}$）で測定した。

### 大腸菌株、プラスミド

本研究に用いた大腸菌及び plasmid DNA は Table 1 にそれぞれ示した。IT1568（W3110 *mlc*）株を wild type として株の構築を行った。TM338（*rne-FLAG-cat*）, TM527（*rne844-FLAG-cat*）, TM528（*rne701-FLAG-cat*）株は先行研究にて報告されている（Morita *et al.*, 2004）。MY02（*rne800-FLAG-cat*）,TM719（*rne750-FLAG-cat*）, MY12（*rne710-FLAG-cat*）株の構築は、IT1568 株を元に Datsenko-Wanner らが開発した pSU313 を用いる系を改変して行った（Uzzau *et al.*, 2001）。TM782（*rneΔ1-FLAG-cat*）及び TM783（*rneΔ2-FLAG-cat*）株はそれぞれ RNase E の 702-750、702-844 領域を欠失した株であり、次のように作成した。まず、TM744（*rne701-HA*）株を TM642（*rne701-HA-cat*）株から二つの FRT 配列を用いて *cat* 遺伝子を除去することで作成した。そして、RNase E の 751-1061 アミノ酸とその C 末端に FLAG-cat 配列を持つ DNA 断片 1 を TM338（*rne-FLAG-cat*）のゲノムから primer1219（AAACGTCAGGCGCAACAAGAAGCGAAGGCGCTGAATGTTGAAGAGGCCGAACCAATTGTTCAGGA）及び primer1223（ATGTTTTGTCTGCCTGCTCTGGGATCGCTGGGGCGGGCATTTTTTTGCCT）を用いて PCR により増幅した。primer1219 の下線で示した 5'側の配列は TM774 株の *rne701* 遺伝子の 3'末端と相同性を持つ配列である。また、primer1223 は TM338 株の *rne-FLAG-cat* 遺伝子に存在する FRT-*cat*-FRT 配列の下流に位置する配列である。この DNA 断片 1 を用いて pKD46（Datsenko and Wanner, 2000）を形質転換した TM774 に形質導入し、chloramphenicol に耐性を持った株をセレクションした。*rneΔ1-FLAG-cat* 遺伝子はこの DNA 断

片 1 と TM774 間の相同組換えによって作成した。この遺伝子について DNA 配列を確認した上で、TM338 に遺伝子を移し、TM782 株とした。同様に、RNase E の 845-1061 アミノ酸とその C 末端に *FLAG-cat* 配列を持つ DNA 断片 2 を TM338（*rne-FLAG-cat*）のゲノムから primer1220（AAACGTCAGGCGCAACAAGAAGCGAAGGCGCTGAATGTTGAAGAGCGCTATCCAATTGTACGTCC）及び primer1223 を用いて PCR により増幅した。この DNA 断片 2 を用いて pKD46 を形質転換した TM774 に形質導入し、*rneΔ2-FLAG-cat* 遺伝子を作成した。この遺伝子領域を TM338 株と置き換えることで TM783 株を作成した。TM675（*rne844-FLAG*）株は TM527（rne844-FLAG-cat）株から *cat* 遺伝子を除去することで作成した。TM777（*ΔrhlB Δhfq∷cat*）は次のように作成した。まず、TM390（*ΔrhlB∷cat*）株（Morita *et al.*, 2004）から *cat* 遺伝子を除去することで TM726（*ΔrhlB*）株を作成した。そして、TM587 株（Morita *et al.*, 2005）の *Δhfq∷cat* 遺伝子領域を TM726 と置き換えた。

pQE-His-702-844-FLAG プラスミドは次のように作成した。RNase E の 702-844 アミノ酸部分の配列を持つ DNA 断片を TM675（*rne844-FLAG*）のゲノムから primer1225（GCGCGGATCCCAATCTGTTCAGGAAACCGA）及び primer796（GCGCGTCGACGCTCTGGGATCGCTGGGGCGGGCAT）を用いて PCR により増幅した。この DNA 断片を制限酵素である BamHI 及び SalI で処理し、pQE80L（Qiagen）上にクローニングして pQE-His-702-844-FLAG を作成した。同様に RNase E の 711-844 アミノ酸部分の配列を持つ DNA 断片を TM675（*rne844-FLAG*）のゲノムから primer1224（GCGCGGATCCGAACGTGTACGTCCGGTTCA）及び primer796（GCGCGTCGACGCTCTGGGATCGCTGGGGCGGGCAT）を用いて PCR により増幅した。この DNA 断片を制限酵素である BamHI 及び SalI で処理し、pQE80L 上にクローニングして pQE-His-702-844-FLAG を作成した。また、pQE-His-RhlB プラスミドは次のように作成した。rhlB 遺伝子領域を持つ DNA 断片を IT1568 株のゲノムから primer923（CGCGCGGATCCAGCAAAACACATTTAAC）及び primer924（CCCAAGCTTACCAGCATATGAAAAC）を用いて PCR により増幅した。この DNA 断片を制限酵素である BamHI 及び HindⅢで処理し、pQE80L 上にクローニングした。

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

| Strain/plasmid | Relevant genotype and property | Source |
|---|---|---|
| Strain | | |
| IT1568 | W3110*mlc* | Laboratory stock |
| TM338 | W3110*mlc rne-FLAG-cat* | Morita *et al*. (2004) |
| TM528 | W3110*mlc rne701-FLAG-cat* | Morita *et al*. (2004) |
| TM527 | W3110*mlc rne844-FLAG-cat* | Morita *et al*. (2004) |
| YM02 | W3110*mlc rne800-FLAG-cat* | This study |
| TM719 | W3110*mlc rne750-FLAG-cat* | This study |
| YM12 | W3110*mlc rne710-FLAG-cat* | This study |
| TM522 | W3110*mlc rne-FLAG* | Morita *et al*. (2005) |
| TM642 | W3110*mlc rne701-HA-cat* | Morita *et al*. (2005) |
| TM774 | W3110*mlc rne701-HA* | This study |
| TM782 | W3110*mlc rneΔ1(Δ702-750)-FLAG-cat* | This study |
| TM783 | W3110*mlc rneΔ1(Δ702-844)-FLAG-cat* | This study |
| TM675 | W3110*mlc rne844-FLAG* | This study |
| TM390 | W3110*mlc ΔrhlB::cat* | Morita *et al*. (2004) |
| TM726 | W3110*mlc ΔrhlB* | This study |
| TM587 | W3110*mlc Δhfq::cat* | Morita *et al*. (2005) |
| TM777 | W3110*mlc ΔrhlB Δhfq::cat* | This study |
| TM641 | W3110*mlc rne-HA-cat* | Morita *et al*. (2005) |
| TM645 | W3110*mlc hfq-FLAG rne-HA-cat* | Morita *et al*. (2005) |
| TM646 | W3110*mlc hfq-FLAG rne701-HA-cat* | Morita *et al*. (2005) |
| TM648 | W3110*mlc rhlB-FLAG rne-HA-cat* | This study |
| YI9 | W3110*mlc eno-FLAG rne-HA-cat* | This study |
| YI11 | W3110*mlc pnp-FLAG rne-HA-cat* | This study |
| Plasmid | | |
| pQE80L | vector plasmid | Qiagen |
| pQE-Hfq-His | Derivative of pQE80L carrying *hfq-His6* | Kawamoto *et al*. (2006) |
| pQE-His-711-844-FLAG | Derivative of pQE80L carrying *His6-rne711-844-FLAG* | This study |
| pQE-His-702-844-FLAG | Derivative of pQE80L carrying *His6-rne702-844-FLAG* | This study |
| pQE-His-RhlB | Derivative of pQE80L carrying *His6-rhlB* | This study |
| pKD46 | Red recombinase expression vector | Datsenko and Wanner (2000) |

## P1 Transduction

目的の遺伝子を持つ菌体を LB 培地、好気条件下、37℃において一晩、振蕩培養を行った。培養液 2 ml をとり、最終濃度 10 mM になるように $CaCl_2$ を加え、さらに P1 phage lysate（PFU=~$10^8$）を 50 μl 加えて、軽く混ぜた。37℃で 15 分間静置後、LB-TOP agar（LB, 0.75% Bactoagar）培地を 4 ml 加え、さらに最終濃度 10 mM になるように $CaCl_2$ を加えた。LB 寒天培地（LB, 1.5% Bactoagar）上に LB-TOP agar 培地を含む培養液を注ぎ、LB-TOP agar 培地が固化した後、37℃で一晩培養した。

培養後、LB-TOP agar を回収し、LB 培地を 2 ml 加え、さらに最終濃度 10mM

になるように $CaCl_2$ を加えた。$CHCl_3$ を 1 ml 添加し、遠心分離（3.5 krpm, 4℃, 10 min.）を行った。上清を 1 ml 分離し、$CHCl_3$ を 100 μl 添加して、遠心分離（5 krpm, 4℃, 10 min.）を行った。上清を 500 μl 分離して、目的の遺伝子を含む P1 phage lysate とし、$CHCl_3$ を 100 μl 添加して、4℃で保存した。

次に、形質導入を行う菌体を LB 培地、好気条件下、37℃において OD600 = 0.6 になるまで培養し、集菌した。菌体を LB 培地 1 ml に懸濁し、最終濃度 10 mM になるように $CaCl_2$ を加えた。調製した目的遺伝子を含む P1 phage lysate を 50 μl 加えて、軽く混ぜた。37℃で 15 min.静置後、遠心分離（3.5 krpm, 4℃, 10 min.）を行った。上清を完全に除いて菌体を LB 培地 1 ml に懸濁し、LB 培地 20 ml を加えて、37℃で 1 時間振蕩培養を行った。遠心分離（3.5 krpm, 4℃, 10 min.）をして集菌し、菌体を LB 培地 500 μl に懸濁して、そのうち 100 μl を LB 寒天培地（抗生物質を含む）上に蒔き、37℃で一晩培養した。培養後、菌体を LB 寒天培地（抗生物質を含む）で二度、シングルコロニーアイソレーションし、目的の株を構築した。構築した株が目的の遺伝子を持つことを Western blotting により確認した。

免疫沈降

200 ml の LB 培地で菌体を $OD_{600}$＝0.6 になるまで培養し、培養液から菌体を集菌した。10 ml の STE buffer で buffer 交換した後、10 ml の IP buffer（20 mM Tris-HCl pH8.0, 0.25 M KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10% Glycerol, 0.1% Tween20）で懸濁した。懸濁液を超音波破砕し、遠心分離した（9.7 krpm, 4℃, 30 min.）。上清を分離し、一部を粗抽出画分（CE）として分離した。Anti-FLAG M2 affinity beads（Sigma 社）を 50 μl 加え、4℃で 30 分反応させた。このとき適宜、Anti-FLAG M2 affinity beads で反応させる前に、細胞粗抽出液に 40 unit の micrococcal nuclease を入れ、2.5 mM $CaCl_2$ 存在下で 10 分間、37℃で反応させた。Poly-Prep Clomatography Column（Bio Rad 社）を用いて M2 Affinity beads を分離した。M2 Affinity beads を 10 ml の IP buffer で 2 回洗浄後、FLAG Peptide（最終濃度 0.4 mg/ml）を含む IP buffer を 50 μl 加え、4℃で 10 分間反応させた。遠心分離（1krpm, 4℃, 3 min.）を行い、抽出画分（E）として分離した。

CE 画分と E 画分に 20 mM $CH_3COONa$, 10mM EDTA pH5.5 で飽和させた

RNA phenol を 200 μl 加え、さらに RNA buffer（0.5% SDS, 20 mM $CH_3COONa$, 10 mM EDTA pH5.5）を 200 μl 加えて、よく vortex した。室温で 5 分間静置後、遠心分離（14 krpm, room temperature, 10 min.）し、水層を分画した。そこに、2.5 倍量の 100% ethanol を加え、よく vortex を行い、遠心分離（14 krpm, 4℃, 10min.）を行うことで沈殿物を得た。この沈殿物を 70% ethanol で洗浄後、沈殿物を自然乾燥した後、適量の RNA buffer に懸濁し、Northern blotting の試料とした。

## Western blotting

試料と等量の 2×SDS buffer（120 mM Tris-HCl pH 6.8, 3.8% SDS, 19% Glycerol, 9.6% β-mercaptoethanol, 0.02% B. P. B.）を加え、100℃、5 min. 処理を行い、試料として用いた。RNase E の検出には 8%の polyacrylamide ゲルを用い、Hfq の検出には 15%の polyacrylamide ゲル、その他のタンパク質の検出には 12% polyacrylamide ゲルを用いて、試料を SDS-PAGE により分離し、ゲルを Milli-Blot™-Graphite Electroblotter（Millipore 社）を用いて、メンブレン（Immobilon PDVF）に転写した（2.5 or 5 mA/cm$^2$, 30min）。転写後、メンブレンを 5% スキムミルク-PBS-Tween buffer（0.1% Tween20, 0.15 M NaCl, 10mM $NaH_2$/ $Na_2HPO_4$ pH 7.5）によってブロッキングした。検出に用いた一次抗体はそれぞれ anti-FLAG monoclonal 抗体（Sigma 社）, anti-Hfq, anti-RhlB, anti-PNPase、そして anti-enolase polyclonal 抗体を用いた。polyclonal anti-Hfq 及び anti-enolase 抗体は Morita らが先行研究にて用いたものである（Morita *et al.*, 2004）。polyclonal anti-RhlB 及び anti-PNPase は Operon biotechnologies 社に作成を依頼した。5% スキムミルク-PBS-Tween buffer で希釈した一次抗体をメンブレンと 1 時間反応させ、その後 PBS-T buffer で 15 min.洗浄した。5% スキムミルク-PBS-T buf.で希釈した二次抗体をメンブレンと 10 min.反応させ、その後 PBS-T buf.で 15 min.洗浄した。メンブレンを ECL Western blotting 検出システムにより検出した。
また、試料を Nμ-PAGE Gel(4%-12% gradient gel（Invitrogen 社）)により分離し、Coomassie Brilliant Blue 染色を行った。

Northern blotting

RNA 試料は次の様に調製を行った。培養液に氷を加えて倒置撹拌によって急冷し、直ちに遠心分離（3.5 krpm, 4℃, 5 min.）を行い、集菌した。沈殿物を 400 μl の RNA buffer（0.5% SDS, 20 mM $CH_3COONa$, 10 mM EDTA pH5.5）に懸濁し、20 mM $CH_3COONa$, 10mM EDTA pH5.5 で飽和させた RNA phenol を 400 μl 加え、65℃で 5 分間、緩やかに振蕩した。振蕩後、遠心分離（12 krpm, room temperature, 10 min.）し、水層を分画した。そこに、2.5 倍量の 100% ethanol を加え、よく vortex を行い、遠心分離（14 krpm, 4℃, 10min.）を行うことで沈殿物を得た。この沈殿物を 70% ethanol で洗浄後、400 μl の RNA buffer に懸濁し、100% ethanol による沈殿物の回収、70% ethanol での洗浄を再度繰り返した。最終的に沈殿物を自然乾燥した後、適量の RNA buffer に懸濁した。上記の方法で調整した RNA を deionized formamide 溶液（1×MOPS buffer, 6% formaldehyde）に溶解させ、65℃で 5 分間保温した。氷上に 5 分間静置した後、formaldehyde-MOPS-1.2% agarose gel（1×MOPS buffer, 6% formaldehyde）で分離した。分離後、ゲル中の RNA をキャピラリーブロッティングによりナイロンメンブレン（Amersham 社、Hybound$^{TM}$-$N^+$）に転写した。Blotting buffer には、20×SSC（3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate）を用いた。
ブロッティング後のメンブレンを、50 mM NaOH によって固定処理した。メンブレンを Hybridization buffer（Dig Easy Hyb Granules: Roche 社）を用いて、50℃で 10 分間保温した。Digoxigenin で標識した DNA probe を 96℃、5 分間加熱し、氷上で 3 分間静置したあと、Hybridization buffer に加え、さらに 50℃で 4 時間保温した。用いた DIG DNA probe はそれぞれ、*ptsG* の 5'側に位置する 305 bp 断片、*sodB* の 5'側に位置する 500 bp 断片、*sgrS* の 150 bp 断片、*ryhB* の 87 bp 領断片である。その後、メンブレンを Wash buffer（0.2×SSC, 0.1% SDS）で 1 時間洗浄した。メンブレンを Maleic acid buffer（100 mM maleic acid, 150 mM NaCl; pH7.5）で平衡化させ、blocking buffer（liquid blocking reagent (Amersham 社)：Maleic acid buffer=1:10）で 20 分間処理した。blocking buffer で希釈した Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments（Roche 社）でメンブレンを 60 分間反応させた。Maleic acid buffer-0.3% Tween20 で洗浄した後、メンブレンの pH を 10 ml の bufferA（100 mM Tris-HCL pH9.5, 300 mM NaCl）で緩衝した。CDP-star detection reagent（Amersham 社）をメンブレンの表面に注ぎ、Alkaline phosphatase 反応（10min, r. t.）を行い、X 線フィルムを感光

させた。

共沈実験

200 ml の培養液から菌体を集菌し、STE で buffer 交換した後、10 ml の IP buffer（20 mM Tris-HCl pH8.0, 0.2 M KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10% Glycerol, 0.1% Tween20）で懸濁した。懸濁液を超音波破砕し、遠心分離した（9.7 krpm, 4℃, 60 min.）。上清を分離し、一部を粗抽出画分（CE）として分離した。Anti-FLAG M2 affinity beads（Sigma 社）を 50 μl 加え、4℃で 30 分反応させた。Poly-Prep Clomatography Column（Bio Rad 社）を用いて M2 Affinity Gel を分離した。M2 Affinity beads を 10 ml の IP buffer で２回洗浄後、FLAG Peptide（最終濃度 0.4 mg/ml）を含む IP buffer を 50 μl 加え、4℃で 10 分間反応させた。遠心分離（1krpm, 4℃, 3 min.）を行い、抽出画分（E）として分離した。

*in vitro* における Hfq 及び scaffold 領域ポリペプチドの結合解析

TM777 株に pQE-Hfq-His（Kawamoto *et al.*, 2006）または pHis-711-844-FLAG プラスミドを形質転換し、200 ml の LB 培地で 37℃にて培養を行った。$OD_{600}$＝0.2-0.3 になるまで培養し、1 mM の IPTG を培地に添加した後、継続して６０分間培養を行った。培養液から菌体を集菌し、10 ml の STE で buffer 交換した後、0.3 ml の buffer A（50 mM $Na_2HPO_4$, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0）で懸濁した。懸濁した細胞液に lysozyme（10 mg/ml）を添加して氷上で 10 分間反応させた後、細胞を超音波破砕し、遠心分離（14krpm, 4℃, 10 min.）を行った（CE）。上清を分離し、RNase A（10μg/ml）を加えて氷上で 10 分間反応させ、その後 80℃で 10 分間加熱処理した。試料を遠心分離（14krpm, 4℃, 10 min.）し、変性したタンパク質を除去した（CE +RNase A, +heat）。その後、試料に 60 μl の $Ni^{2+}$-NTA agarose resin（Qiagen）を加えて、20 分間、4℃で反応させた。agarose resin を遠心（14krpm, 4℃, 1 min.）により回収し、500 μl の buffer B（50 mM $Na_2HPO_4$, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0）で３回洗浄した。beads に結合したタンパク質は 60 μl の buffer C（50 mM $Na_2HPO_4$, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0）で溶出した。これらの操作によって精製された Hfq-$His_6$ 及び $His_6$-711-844-FLAG が得られた。

精製した Hfq-$His_6$ 20 μl を $His_6$-711-844-FLAG ポリペプチド 40 μl または buffer C（control）と混ぜ、800 μl の IP buffer 2（20 mM Tris-HCl pH8.0, 0.1 M KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10% Glycerol, 0.1% Tween20）を加えた。この試料に 50 μl の anti-FLAG M2-agarose beads（Sigma 社）を加えて、30 分間、4 ℃で反応させた。agarose beads を遠心（14krpm, 4℃, 1 min.）で回収し、500 μl の IP buffer 2 で 3 回洗浄した。beads に結合したタンパク質を 0.4 mg/ml の FLAG ペプチド（Sigma 社）を含む 50 μl の IP buffer 2 で溶出し、Western blotting により解析を行った。

謝辞

研究先として受け入れて頂き、研究を続ける上で様々なご配慮をして頂きました本間 道夫 教授に深く感謝致します。

五年間という長い間様々にご指導頂き、現在博士論文を提出するに至るような能力を獲得できたのはひとえに饗場 弘二 教授のおかげであり、真に感謝致します。

研究を行う上での考え方、考察法、実験手順、実験手法など研究の根幹たる様々な部分を熱心に指導していただいた 森田 鉄兵 助手に深く感謝致します。同じ研究室の後輩として日々苦楽を共にしてきた、石川博一さん、大鷹弘紀さん、飯田芳文さんに真に感謝致します。また、同時期に研究室に在籍されていた先輩、同輩、後輩の方々に深く感謝致します。

参考文献

Aiba, H. (2007) Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr Opin Microbiol* 10: 134–139.

Awano, N., Xu, C., Ke, H., Inoue, K., Inouye, M., and Phadtare, S. (2007) Complementation analysis of the coldsensitive phenotype of the *Escherichia coli csdA* deletion strain. *J Bacteriol* 189: 5808–5815.

Bernstein, J.A., Lin, P.H., Cohen, S.N., Lin-Chao, S. (2004) Global analysis of Escherichia coli RNA degradosome function using DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2758-63.

Blum, E., Py, B., Carpousis, A.J., and Higgins, C.F. (1997) Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol Microbiol* 26: 387–398.

Brennan, R.G., and Link, T.M. (2007) Hfq structure, function and ligand binding. *Curr Opin Microbiol* 10: 125–133.

Brescia, C.C., Mikulecky, P.J., Feig, A.L., and Sledjeski, D.D. (2003) Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. *RNA* 9: 33–43.

Butland, G., Peregrin-Alvarez, J.M., Li, J., Yang,W., Yang, X., Canadien, V., *et al.* (2005) Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli. Nature* 433: 531–537.

Carpousis, A.J. (2002) The *Escherichia coli* RNA degradosome: structure, function and relationship in other ribo- nucleolytic multienzyme complexes. *Biochem Soc Trans* 30: 150–155.

Carpousis, A.J. (2007) The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol* 61: 71–87.

Carpousis, A.J., Van Houwe, G., Ehretsmann, C., and Krisch, H.M. (1994) Copurification of E. coli RNase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* 76: 889–900.

Coburn, G.A., Miao, X., Briant, D.J., and Mackie, G.A. (1999) Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3′ exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. *Genes Dev* 13:

2594–2603.

Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6640–6645.

Gao, J., Lee, K., Zhao, M., Qiu, J., Zhan, X., Saxena, A., *et al.* (2006) Differential modulation of *E. coli* mRNA abundance by inhibitory proteins that alter the composition of the degradosome. *Mol Microbiol* **61**: 394–406.

Hussein, R., and Lim, H.N. (2010) Disruption of small RNA signaling caused by competition for Hfq. *Proc Natl Acad Sci USA* Dec 28. [Epub ahead of print]

Kawamoto, H., Koide, Y., Morita, T., and Aiba, H. (2006) Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq. *Mol Microbiol* **61**: 1013–1022.

Khemici, V., and Carpousis, A.J. (2004) The RNA degradosome and poly(A) polymerase of *Escherichia coli* are required *in vivo* for the degradation of small mRNA decay intermediates containing REP-stabilizers. *Mol Microbiol* **51**: 777–790.

Khemici, V., Poljak, L., Toesca, I., and Carpousis, A.J. (2005) Evidence *in vivo* that the DEAD-box RNA helicase RhlB facilitates the degradation of ribosome-free mRNA by RNase E. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 6913–6918.

Leroy, A., Vanzo, N.F., Sousa, S., Dreyfus, M., and Carpousis, A.J. (2002) Function in *Escherichia coli* of the noncatalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol Microbiol* **45**: 1231–1243.

Maki, K., Uno, K., Morita, T., and Aiba, H. (2008) RNA, but not protein partners, is directly responsible for translational silencing by a bacterial Hfq-binding small RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 10332–10337.

Marcaida, M.J., DePristo, M.A., Chandran, V., Carpousis, A.J., and Luisi, B.F. (2006) The RNA degradosome: life in the fast lane of adaptive molecular evolution. *Trends Biochem Sci* **31**: 359–365.

Masse, E., and Gottesman, S. (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4620–4625.

Masse, E., Escorcia, F.E., and Gottesman, S. (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **17**: 2374–2383.

Miczak, A., Kaberdin, V.R., Wei, C.L., and Lin-Chao, S. (1996) Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3865–3869.

Morita, T., Kawamoto, H., Mizota, T., Inada, T., and Aiba, H. (2004) Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**: 1063–1075.

Morita, T., Maki, K., and Aiba, H. (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev* **19**: 2176–2186.

Morita, T., Mochizuki, Y., and Aiba, H. (2006) Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 4858–4863.

Prud'homme-Genereux, A., Beran, R.K., Iost, I., Ramey, C.S., Mackie, G.A., and Simons, R.W. (2004) Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'. *Mol Microbiol* **54**: 1409–1421.

Py, B., Higgins, C.F., Krisch, H.M., and Carpousis, A.J. (1996) A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* **381**: 169–172.

Regonesi, M.E., Del Favero, M., Basilico, F., Briani, F., Benazzi, L., Tortora, P., *et al.* (2006) Analysis of the *Escherichia coli* RNA degradosome composition by a proteomic approach. *Biochimie* **88**: 151–161.

Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., and Bossi, L. (2001) Epitope タグging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 15264–15269.

Valentin-Hansen, P., Eriksen, M., and Udesen, C. (2004) The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol* **51**: 1525–1533.

Vanzo, N.F., Li, Y.S., Py, B., Blum, E., Higgins, C.F., Raynal, L.C., *et al.*

(1998) Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev* **12**: 2770–2781.

Worrall, J.A., Gorna, M., Crump, N.T., Phillips, L.G., Tuck, A.C., Price, A.J., *et al.* (2008) Reconstitution and analysis of the multienzyme *Escherichia coli* RNA degradosome. *J Mol Biol* **382**: 870–883.

Xu, F., and Cohen, S.N. (1995) RNA degradation in *Escherichia coli* regulated by 3′ adenylation and 5′ phosphorylation. *Nature* **374**: 180–183.