

大腸菌小分子機能性 RNA の 3'末端は  
Hfq 機能的結合領域である

大鷹 弘紀

学位論文 主論文

大腸菌小分子機能性 RNA の 3'末端は  
Hfq 機能的結合領域である

名古屋大学大学院 理学研究科

大鷹 弘紀

## 目次

要旨	3 頁
序論	5 頁
結果	9 頁
考察	35 頁
材料と方法	40 頁
表	46 頁
謝辞	51 頁
引用文献	53 頁
副論文	
参考論文	

## 要旨

細菌の小分子機能性 RNA (以下 sRNA) の多くは、Hfq の作用を受けて標的 mRNA と塩基対形成することで、標的 mRNA の翻訳と安定性を制御する。Hfq 依存型の sRNA は、標的 mRNA との塩基対形成領域、Hfq 結合領域、および Rho 因子非依存型転写終結領域 (以下ターミネーター) の 3 つの領域から成る。多くの sRNA において、塩基対形成領域と、転写終結領域については研究が進んでいるものの、Hfq 結合領域については RNA の一本鎖 AU リッチ配列特異的に結合するという以外にほとんど報告がない。

本研究では、Hfq の作用に必要な sRNA の領域を決定することを目的とし、SgrS をモデル sRNA として変異体を構築し生化学的な解析を行った。その結果、SgrS のターミネーターのポリ U 配列を短鎖化すると SgrS は Hfq との結合能を失い、標的である *ptsG* mRNA 抑制機能も失うことを発見した。さらに、いくつかの Hfq 依存型 sRNA においても、ターミネーターのポリ U 配列の短鎖化により Hfq との結合機能、および標的 mRNA 抑制機能が失われることを明らかにした。これらから、sRNA のターミネーターのポリ U 配列は Hfq の作用において必須であると結論した。

## 序論

塩基対形成を介して mRNA を制御する小分子機能性 RNA (以下 sRNA と表記する) は様々なストレス条件下で転写誘導される (1)。sRNA は標的 mRNA と部分的に相補的な領域を持ち、その領域で塩基対を形成することで標的 mRNA の翻訳、および安定性を制御する (1-3)。この sRNA の標的 mRNA 制御機能は RNA シャペロンである Hfq に依存している。

大腸菌の SgrS は最もよく解析されている Hfq 依存型 sRNA の 1 つである (4、5)。SgrS はグルコース-6-リン酸の蓄積などの糖リン酸ストレスに応答して転写が誘導され、主要なグルコース透過装置の膜部位をコードする *ptsG* の発現を抑制する (6)。これまでに SgrS-*ptsG* 抑制系をモデルに sRNA の作用機構についていくつかの重要な原理が明らかにされた。SgrS が *ptsG* mRNA の翻訳開始領域と塩基対形成し *ptsG* mRNA の分解と翻訳の阻害を誘起すること (7)、SgrS/*ptsG* mRNA 間の塩基対が翻訳阻害の実体であること (8)、翻訳の阻害が *ptsG* mRNA の発現抑制に一義的であること (9)、Hfq により SgrS/*ptsG* mRNA 間の塩基対形成が促進されること (7)、Hfq を介して主要なエンドリボヌクレアーゼである RNase E をリクルートし *ptsG* mRNA の速やかな分解を誘起すること (10)、である。また、これらの sRNA の作動原理は SgrS 以外の sRNA においても同様であることが確認された (9、10、11)。これらの結果から図 1 に示すようなモデルが提唱されている。また、他の Hfq 依存型 sRNA と同様に、Hfq により SgrS は安定化される (12)。

図 1 に示した通り、Hfq は sRNA による標的 mRNA 抑制の実体ではないが、 $\Delta hfq$  株ではほぼ全ての sRNA は機能しない。このことは、Hfq の作用が sRNA 機能に重要であることを示している。しかし、Hfq の sRNA/mRNA 間の塩基対形成促進作用、あるいは sRNA の安定化作用の詳細な分子機構は明らかではない。

Hfq 依存型 sRNA は、標的 mRNA との塩基対形成領域、Hfq 結合領域、および Rho 因子非依存型転写終結領域 (以下ターミネーター) の 3 つの領域から成る。塩基対形成領域は標的 mRNA と相補的な領域であり、多くの sRNA で詳細に研究されている。その機能は標的 mRNA と部分的な塩基対を形成することである。SgrS の場合、3'側の 31 塩基 (157-187 塩基、図 2A) が *ptsG* mRNA の S.D.配列 (リボソーム結合部位) と開始コドンを含む 32 塩基と部分的に相補的である (6)。この中で、SgrS の 168-181 塩基の 14 塩基が *ptsG* mRNA

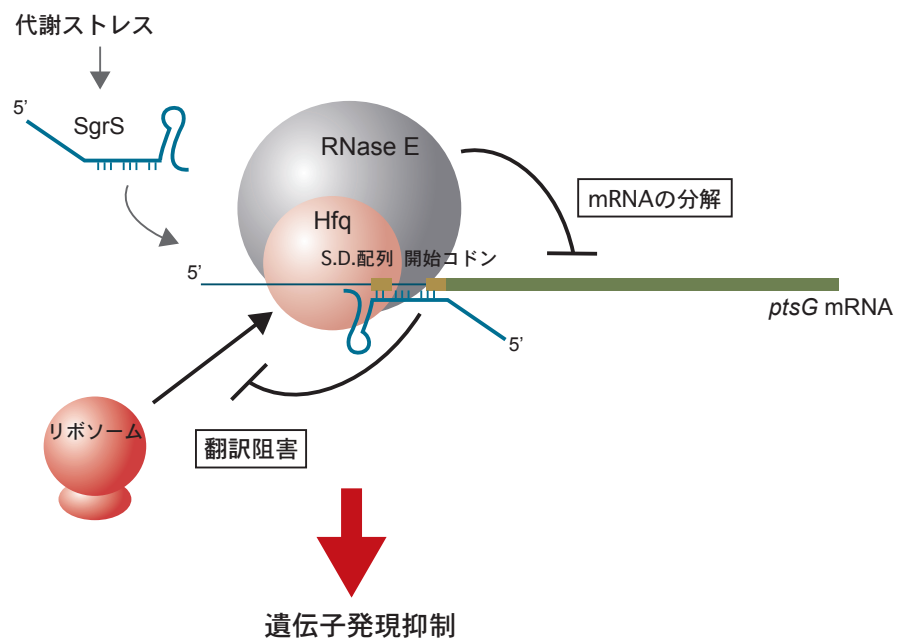


図1  
SgrSによる*ptsG* mRNA抑制モデル

1. Hfqによる促進作用によりSgrS/*ptsG* mRNA間の塩基対が形成される。
2. 形成された塩基対により*ptsG* mRNAの翻訳が阻害される。この翻訳阻害が*ptsG* mRNA抑制において第一義的である。
3. Hfqとの結合によりmRNA上にリクルートされるRNase Eは*ptsG* mRNAを速やかに分解する。



の翻訳阻害に十分であることが示された(13)。多くの sRNA が SgrS と同様に、標的 mRNA の翻訳開始領域と部分的な塩基対を形成し機能するのに対して、Hfq 依存型 sRNA の 1 つである MicC は、*ompD* mRNA の開始コドンから約 60 塩基下流の領域と塩基対を形成し、*ompD* mRNA を抑制する (14)。また、Hfq 依存型 sRNA である RybB は *ompC* mRNA の約 30 塩基上流と塩基対を形成し、*ompC* mRNA を抑制する (15)。

GC リッチの回文配列とそれに続くポリ U 配列で定義されるターミネーターもよく研究されている。ターミネーターの主要な役割は、転写を終結させることである。SgrS の場合、GC リッチのステムループ配列とそれに続く 8 連続の U 塩基からなる Rho 因子非依存型ターミネーターを持つ (6、図 2)。また、ターミネーターの一部であるステム構造は 3' エキソリボヌクレアーゼによる分解から転写後の RNA を保護するという一般的な役割を持つ (16、17)。

上述した 2 つの領域に対して、sRNA の Hfq 結合領域は不明な点が多い。これまでにフットプリント法などの *in vitro* の解析から OxyS (18) や、Spot42 (19)、DsrA (20)、RyhB (21)、RybB (15) などのいくつかの sRNA において Hfq 結合領域が同定された。これらの Hfq 結合領域は sRNA の内部のステムループ構造の近傍に存在する一本鎖 AU リッチ配列である。しかしながら、RyhB において、フットプリントから同定された Hfq 結合領域を変異させても *in vivo* での量と標的 mRNA 抑制機能に影響がなかった (21、22)。このことは、*in vitro* で同定された Hfq 結合領域の中に、*in vivo* での sRNA 機能とは相関しない領域が含まれる可能性を示唆する。これは、これまでの sRNA の Hfq 結合領域に関する報告に共通する課題である。また、SgrS の機能的な Hfq 結合領域は未同定である。

本研究の目的は、SgrS をモデルに用いて sRNA の Hfq 機能的結合領域を決定することである。そこで、*sgrS* 遺伝子に様々な変異を導入し SgrS の *ptsG* mRNA 抑制機能、および Hfq 結合機能に対する変異の影響を *in vivo* で解析した。その結果、SgrS の Rho 因子非依存型ターミネーターのポリ U 配列が Hfq の結合に必須であり、そのため *ptsG* mRNA の抑制にも必須であることが示唆された。また、Rho 因子非依存型ターミネーターのポリ U 配列は Hfq 結合型の他の sRNA の機能にも必要であることを明らかにした。

## 結果

## 機能的な Hfq 結合領域は SgrS の 3'領域に存在する

本研究で用いた SgrS をはじめとする sRNA 転写領域のターミネーター付近の塩基配列を表 1 に示した。以降は野生型の *sgrS* からの転写産物を SgrS と記し、変異型の場合は SgrS-S、あるいは SgrS-7U と示した。ポリ U 配列の最後の U 塩基で転写終結が起こると考えた場合、SgrS は 227 塩基である (図 2A・B)。また、*ptsG* mRNA との最小の塩基対形成領域は 3'側の 168-181 塩基の領域に存在している (13)。一方で、SgrS の 5'側には 43 アミノ酸のポリペプチドの SgrT がコードされている (23)。SgrS 上の Hfq 結合領域を決定するため、プラスミド DNA 上のアラビノース誘導型プロモーターの下流に 1-167 塩基を欠失させた変異 *sgrS* (*sgrS-S*) をクローニングした。*sgrS-S* からは、60 塩基の SgrS-S が転写されると考えられる (図 2A)。pSgrS-S を含む図 2 に示すプラスミド DNA で野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株)、および  $\Delta hfq$  株を形質転換した。それぞれの形質転換体をアラビノース存在下で培養し、SgrS、および SgrS-S をノーザンブロッティングにより解析した。その結果、野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株)において、全長 SgrS、および SgrS-S が検出された (図 2C、レーン 3、5)。また、SgrS-S の量は全長の SgrS に比べて減少した。このことは、SgrS の 1-167 塩基が SgrS の安定性に影響する可能性を示唆する。しかしながら、SgrS-S の量は、 $\Delta hfq$  株において、野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株)より減少した (図 2C、レーン 5、6)。このことは、SgrS-S が、SgrS と同様に、Hfq により安定化される可能性、すなわち 1-167 塩基を欠失させた SgrS-S が Hfq と結合できることを示唆する。次に SgrS-S の発現による *ptsG* mRNA、およびその翻訳産物である IICB<sup>Glc</sup> への影響をノーザンブロッティング、およびウェスタンブロッティングにより解析した。解析の結果、SgrS-S は SgrS 同様に Hfq 依存的に、*ptsG* mRNA の効率的な翻訳阻害と速やかな分解を誘起した (図 3)。このことから、SgrS-S は *ptsG* mRNA を抑制する十分な機能を持つことが示された。以上の結果は、SgrS の 1-167 塩基の領域は、Hfq の作用に必須ではないことを示している。すなわち、SgrS の機能的な Hfq 結合領域は 168-227 塩基に存在することが示された。

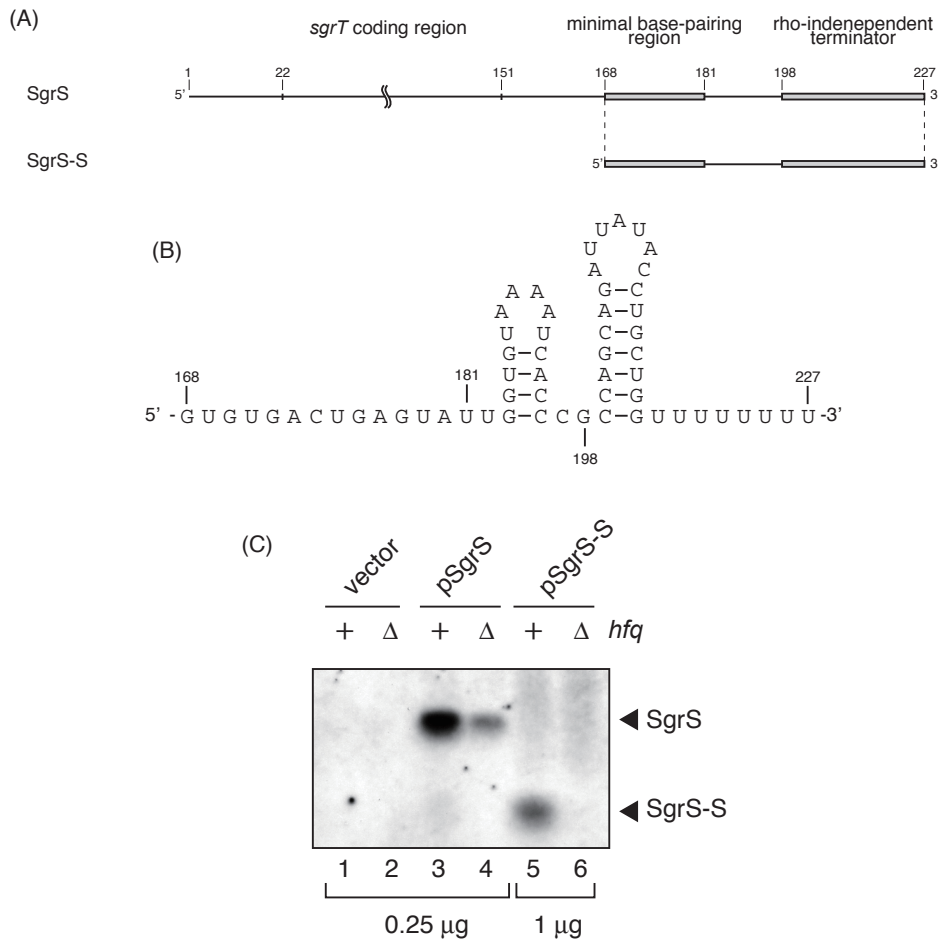


図2 SgrSの発現に対する1-167塩基欠失の影響

(A) SgrSとSgrS-Sの図を示す。SgrSは3'末端ポリU配列の最後のUで転写が終わるとした場合、227塩基である(6)。SgrSの5'部分(22-151塩基)は43アミノ酸のポリペプチド(SgrT)をコードしている(23)。SgrSの3'部分は最小の塩基対形成領域(168-181塩基)、ターミネーター領域(198-227)、およびスペーサー領域(182-197塩基)からなる。5'欠失型のSgrS(SgrS-S)は1-167塩基を欠失している。(B) SgrSの168-227塩基の塩基配列、および二次構造を示す。塩基配列は転写が3'末端ポリU配列の最後のU塩基で終わるとする仮定に基づく。(C) SgrS、およびSgrS-Sの発現を示す。図に示すプラスミドで形質転換させた野生株(*hfq*<sup>+</sup>株)およびTM589株( $\Delta hfq$ 株)を、アラビノースを加えたLB培地で培養した。A<sub>600</sub>=0.6付近でRNA試料を抽出しSgrSプローブ2を用いてノーザンブロットングにより解析した。以下の量のRNAを解析に用いた。レーン1-4:0.25µg、レーン5,6:1.0µg。

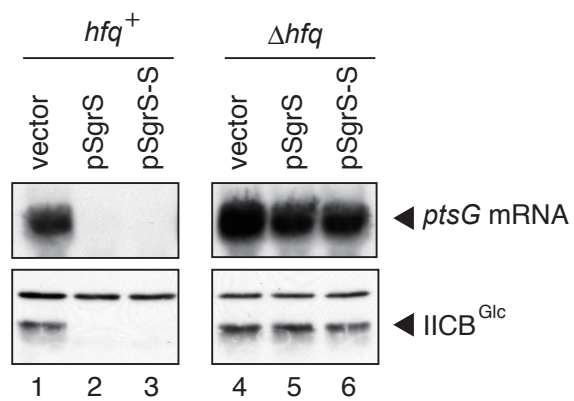


図3  
SgrSの*ptsG* mRNA抑制機能に対する1-167塩基欠失の影響

図に示すプラスミドで形質転換させた野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株)、およびTM589株 ( $\Delta hfq$ 株)を、アラビノースを加えたLB培地で培養した。A<sub>600</sub>=0.6付近でRNA試料を抽出し、*ptsG*プローブを用いたノーザンブロットィングに7μgを用いた。タンパク質試料も調製し、抗IIB抗体を用いたウェスタンブロットィングに0.025 A<sub>600</sub>に相当する試料を使用した。

ターミネーターステムループの AU リッチ配列は Hfq の作用に無関係である

SgrS の 3'側の領域 (168-227 塩基領域) は図 2 に示すように、塩基対形成領域 (168-181 塩基)、ポリ U 配列を含んだターミネーターのステムループ領域 (198-227 塩基)、およびスペーサー領域 (182-197 塩基) から成る。Rho 因子非依存型ターミネーターにはステムループ内の 6 塩基の AU リッチ配列と、末端のポリ U 配列という 2 つの潜在的な Hfq 結合領域があるため、Hfq との作用領域の候補としてターミネーターに着目した (図 2A・B)。これらの潜在的な Hfq 結合領域が Hfq の作用に必要であるかを検証するため、これらの領域に変異を導入し SgrS 機能に対する影響をノーザンブロットィング、およびウェスタンブロットィングにより解析した。まず、ループの AU リッチ配列を GC リッチ配列に置換した SgrS 変異体 (SgrS-LM: 図 4A、表 1) を運ぶプラスミド DNA を構築し、解析した。その結果、SgrS-LM は Hfq 依存の *ptsG* mRNA 抑制機能を保持していた (図 4B、中・下、レーン 3)。さらに、ターミネーターステムの領域の 5 つの G-C ペアと 2 つの A-U ペアという構成は変えずに、配列に変異を加えた pSgrS-SM1、および pSgrS-SM2 を運ぶプラスミド DNA をそれぞれ構築し、解析した (図 4A、表 1)。その結果、この 2 つの変異体は、SgrS-LM と同様に、Hfq 依存の *ptsG* mRNA 抑制機能を保持していた (図 4B、中・下、レーン 4、5)。これらから、ループの AU リッチ配列も含めて、SgrS ターミネーターの構成成分であるステムループ領域は、Hfq の作用に重要ではないことが示された。

(A)

SgrS (*sgrS*)                    5' - CCCG<sup>195</sup>CCAGCAGCAUUAUACCCUGCUGGUUUUUUUUU - 3'<sup>227</sup>

SgrS-LM (*sgrS-LM*)            5' - CCCGCCAGCAGACGCGACCUGCUGGUUUUUUUUU - 3'

SgrS-SM1 (*sgrS-SM1*)        5' - CCCGGGUCGUCAUUAUACGACGACCUUUUUUUUU - 3'

SgrS-SM2 (*sgrS-SM2*)        5' - CCCGGACGACCAUUAUACGGUCGUCUUUUUUUUU - 3'

(B)

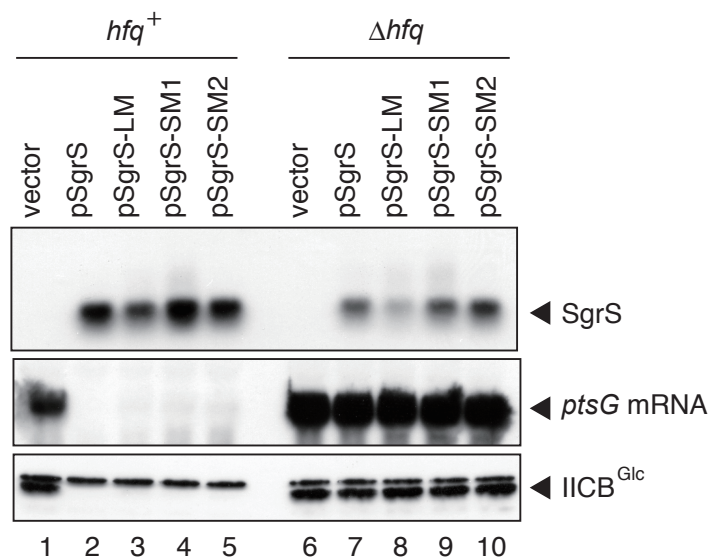


図4

SgrSの機能に対するターミネーターステムループ変異の影響

(A) SgrS変異体のRho因子非依存型ターミネーター周辺の塩基配列を示す。野生型SgrSから変異させた塩基配列を赤色で示す。下線部分は回文配列を示す。(B) 変異によるSgrSの発現、および*ptsG* mRNA抑制機能への影響を示す。図に示すプラスミドで形質転換させた野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株)、およびTM589株 ( $\Delta hfq$ 株)をアラビノースを加えたLB培地で培養した。A<sub>600</sub>=0.6付近でRNA試料を抽出し、SgrSプローブ1、および*ptsG*プローブを用いたノーザンブロットングに使用した。以下の量のRNAを解析に用いた。SgrS変異体:0.25μg、*ptsG* mRNA:7μg。タンパク質試料も抽出し、抗IIB抗体を用いたウェスタンブロットングに0.025 A<sub>600</sub>に相当する試料を使用した。

## SgrS の 3'末端ポリ U 配列の短鎖化により Hfq 依存的な *ptsG* mRNA 抑制機能が低下する

次に、SgrS のターミネーターの構成成分であるポリ U 配列が Hfq の作用に関係するかについて検証するために、ターミネーターのポリ U 配列を 1 塩基ずつ短くした一連の変異体を運ぶプラスミド DNA を構築した(図 5A、表 1)。これらのプラスミド DNA でそれぞれ野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株)、および $\Delta hfq$  株を形質転換し、SgrS 変異体の発現、および *ptsG* mRNA 抑制機能をノーザンブロットィングとウェスタンブロットィングにより解析した (図 5B)。解析の結果まず、野生株において、U 塩基を短鎖化していくとともに、SgrS 量が減少した(図 5B、上、レーン 2-6)。このことは、ポリ U 配列の短鎖化によりターミネーターの機能が減衰し、*sgrS* の転写終結効率が低くなっていったためだと考えられる。次に、SgrS-7U は、SgrS と同様に、野生株に比べて $\Delta hfq$  株で減少した (図 5B、上、レーン 3、9)。また、SgrS と同様に、SgrS-7U は *ptsG* mRNA を抑制した (図 5B、中・下、レーン 3)。このことは、ポリ U の短鎖化に伴う転写効率の低下により SgrS-7U 量が減少する一方で、Hfq との機能的相互作用には十分であることを示唆している。その一方で、さらにポリ U 配列を短鎖化させた SgrS 変異体 (SgrS-4U、SgrS-5U) では、野生株、および $\Delta hfq$  株間での SgrS 変異体量の差は観察されず、また *ptsG* mRNA 抑制も観察されなかった (図 5B、レーン 5、6、11、12)。ポリ U 配列の短鎖化により SgrS 変異体量が減少しているため *ptsG* mRNA の抑制機能の欠損の原因の断定には至らないが、以上の結果は少なくとも、SgrS のポリ U 配列が Hfq との機能的相互作用領域である可能性を示している。



(A)

	195      199	227
SgrS ( <i>sgrS</i> )	5' - CCCGCCAGCAGAUUAU <u>ACCUGCUGG</u> UUUUUUUU - 3'	
SgrS-7U ( <i>sgrS-7T</i> )	5' - CCCGCCAGCAGAUUAU <u>ACCUGCUGG</u> UUUUUUUU - 3'	
SgrS-6U ( <i>sgrS-6T</i> )	5' - CCCGCCAGCAGAUUAU <u>ACCUGCUGG</u> UUUUUUUU - 3'	
SgrS-5U ( <i>sgrS-5T</i> )	5' - CCCGCCAGCAGAUUAU <u>ACCUGCUGG</u> UUUUUUUU - 3'	
SgrS-4U ( <i>sgrS-4T</i> )	5' - CCCGCCAGCAGAUUAU <u>ACCUGCUGG</u> UUUUUU - 3'	

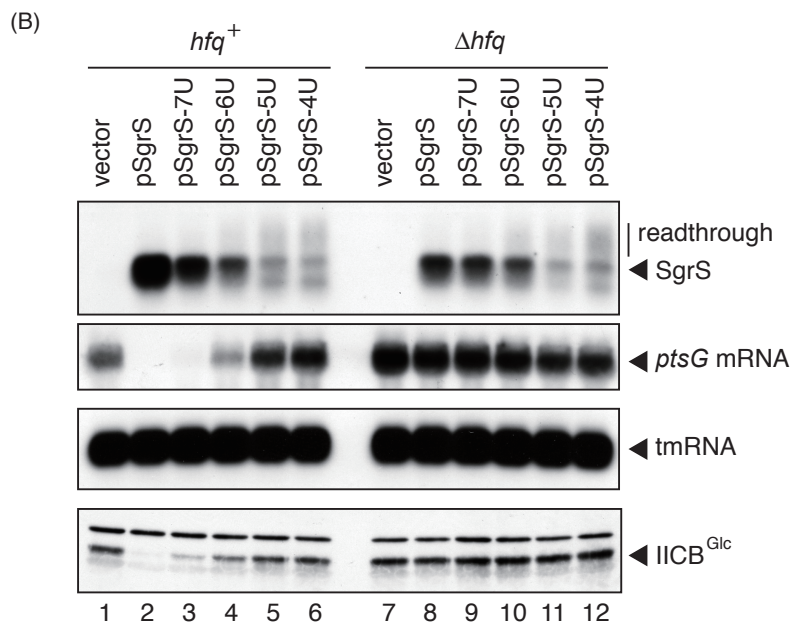


図5  
SgrSの機能に対する3'末端ポリU配列の短鎖化の影響-1

(A) SgrS変異体のRho因子非依存型ターミネーターの塩基配列を示す。下線部分は回文配列を示す。塩基配列は転写が3'末端ポリU配列の最後のU塩基で終わるという仮定に基づく。

(B) 3'末端ポリU配列短鎖化によるSgrSの発現、および*ptsG* mRNA抑制機能への影響を示す。図に示すプラスミドで形質転換させた野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株)、およびTM589株 ( $\Delta$ *hfq*株)をアラビノースを加えたLB培地で培養した。A<sub>600</sub>=0.6付近でRNA試料を抽出し、SgrSプローブ1、*ptsG*プローブ、およびtmRNAプローブを用いたノーザンブロットングに使用した

(tmRNAをloading controlに用いた)。以下の量のRNAを解析に用いた。SgrS変異体:0.25μg、*ptsG* mRNA:7μg、tmRNA:0.25μg。タンパク質試料も抽出し、抗IIB抗体を用いたウェスタンブロットングに0.025A<sub>600</sub>に相当する試料を使用した。

## ポリ U 配列の短い SgrS 変異体は Hfq 依存的な *ptsG* mRNA 抑制機能を失う

ポリ U 配列を短鎖化した SgrS 変異体の抑制機能の有無をさらに検証するため、SgrS 変異体の量を増加させることを試みた。このため、SgrS-4U のターミネーターの回文配列を 4 塩基の G と 4 塩基の C で延長した SgrS-LS4U を構築した (図 6A、表 1)。コントロールである SgrS-LS8U、SgrS-LS4U のそれぞれの量、および *ptsG* mRNA 抑制機能をノーザンブロットイング、およびウェスタンブロットイングにより解析した。その結果、野生株において、SgrS-LS4U は SgrS-LS8U と同程度発現した (図 6B、上、レーン 2、3)。次に SgrS-LS4U、および SgrS-LS8U の *ptsG* mRNA 抑制機能を検証した。SgrS-LS8U は野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株) において完全な *ptsG* mRNA 抑制機能を示したが、 $\Delta hfq$  株では抑制しなかった (図 6B、中・下、レーン 2、5)。このことは、ターミネーターシステムの延長が SgrS の Hfq 依存的な *ptsG* mRNA 抑制機能に影響しないことを示唆している。一方で、SgrS-LS4U は野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株) において十分な量が観察されたにも関わらず、*ptsG* mRNA を抑制しなかった (図 6B、中・下、レーン 3)。これらの結果から、3'末端ポリ U 配列を 4 塩基に短鎖化した場合、Hfq 依存的な *ptsG* mRNA 抑制機能が失われることが示された。すなわち、SgrS の 3'末端ポリ U 配列は *ptsG* mRNA 抑制機能に重要であることが示された。また、興味深いことに野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株) に比べて  $\Delta hfq$  株において SgrS-LS8U の量は減少しなかった (図 6B、上、レーン 2、5)。これは、Hfq 非存在下における SgrS の不安定化がターミネーターシステムの延長により阻害されたことを示している。このことは、Hfq による sRNA 安定化機構を解明する上で重要な手がかりになりうると考えられる。

(A)

SgrS-LS8U 5' - CCCGCCAGCAGCCCCAUUAUACGGGGCUGCUGGUUUUUUUUU - 3'

SgrS-LS4U 5' - CCCGCCAGCAGCCCCAUUAUACGGGGCUGCUGGUUUUU - 3'

(B)

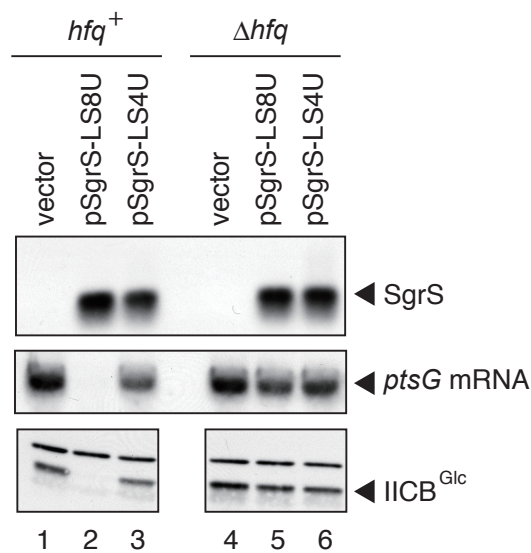


図6

SgrSの機能に対する3'末端ポリU配列の短鎖化の影響-2

(A) SgrS-LS4U、およびSgrS-LS8UのRho因子非依存型ターミネーター周辺の塩基配列を示す。太字はステムを延長した配列を示す。下線部分は回文配列を示す。(B) SgrS-LS4U、およびSgrS-LS8Uの発現、およびptsG mRNA抑制機能を示す。図に示すプラスミドで形質転換させた野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株)、およびTM589株 ( $\Delta hfq$ 株)をLB培地で培養した。A<sub>600</sub>=0.6付近でRNAを抽出し、SgrSプローブ1、およびptsGプローブを用いたノーザンブロットングに用いた。以下の量のRNAを解析に用いた。SgrS変異体:0.25μg、ptsG mRNA:7μg。タンパク質試料も抽出し、抗IIB抗体を用いたウェスタンブロットングに0.025A<sub>600</sub>に相当する試料を使用した。

### ポリ U 配列の短い SgrS 変異体は Hfq 結合機能を失う

これまでの解析から、SgrS の 3'末端のポリ U 配列が Hfq との機能的結合領域である可能性が示唆された。そこで次に、*in vivo* における SgrS 変異体と Hfq の結合を直接解析するため、*hfq-FLAG* 株を用いて免疫沈降を行った。図 7、8 に示す形質転換体を培養し調製した細胞抽出液を抗 FLAG M2 アガロースビーズとインキュベートし、アガロースビーズに結合したタンパク質を抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットティングにより解析した。また各画分をフェノール処理し、得られた試料をノーザンブロットティングにより解析した。その結果、SgrS-LS8U は Hfq-FLAG と共沈したが、SgrS-LS4U はしなかった (図 7、下、レーン 3、4)。また、SgrS、SgrS-6U、および SgrS-4U を発現する株を用いて同様の解析を行った。その結果、SgrS は Hfq-FLAG と共沈したが、SgrS-4U は共沈しなかった (図 8、下、レーン 6、8)。また、SgrS-6U はわずかに Hfq-FLAG と共沈した (図 8、下、レーン 7)。これらから、*in vivo* で SgrS の 3'末端ポリ U 配列を短鎖化すると Hfq との結合力が低下することが示された。またその結果として、ポリ U 配列を短鎖化させた SgrS 変異体は Hfq 依存的な *ptsG* mRNA 抑制機能が低下したと考えられる。以上の結果より、SgrS のターミネーターの 8 塩基の連続したポリ U 配列は、*ptsG* mRNA 抑制に必要な Hfq の作用を受けるために重要な領域であると結論した。

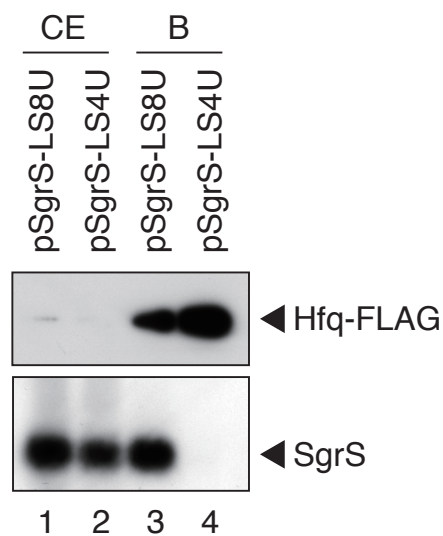


図7

*in vivo*でのSgrS変異体とHfqの結合-1

図に示すプラスミドで形質転換させたTM771株 ( $\Delta sgrS$ , *hfq-FLAG-cat*) を、アラビノースを加えたLB培地で $A_{600}=0.6$ 付近まで培養した。細胞抽出液を調製し、実験手法に示す抗FLAGアガロースビーズを用いた免疫沈降実験に用いた。粗抽出画分 (CE) (5 $\mu$ l) と結合画分 (B) (5 $\mu$ l) を抗Hfq抗体を用いたウェスタンブロッティングに用いた。RNAの解析には粗抽出画分 (CE) (5 $\mu$ l) と結合画分 (B) (5 $\mu$ l) をフェノール処理し、SgrSプロンプ1を用いたノーザンブロッティングに使用した。

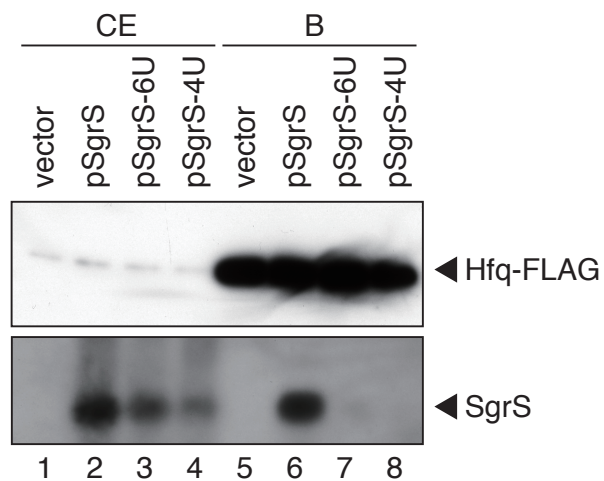


図8  
*in vivo*でのSgrS変異体とHfqの結合-2

図に示すプラスミドで形質転換させたTM771株 ( $\Delta sgrS$ , *hfq-FLAG-cat*) を、アラビノースを加えたLB培地で $A_{600}=0.6$ 付近まで培養した。細胞抽出液を調製し、実験手法に示す抗FLAGアガロースビーズを用いた免疫沈降実験に用いた。粗抽出画分 (CE) (5 $\mu$ l) と結合画分 (B) (5 $\mu$ l) を抗Hfq抗体を用いたウェスタンブロットティングに用いた。RNAの解析には粗抽出画分 (CE) (5 $\mu$ l) と結合画分 (B) (5 $\mu$ l) をフェノール処理し、SgrSプローブ1を用いたノーザンブロットティングに使用した。

## 他遺伝子のターミネーターで置換した SgrS 変異体は *ptsG* mRNA 抑制機能を持つ

Hfq の作用における 3'末端ポリ U 配列の役割をさらに明らかにするため、*sgrS* のターミネーターを他遺伝子の Rho 因子非依存型ターミネーターで置換した SgrS キメラ変異体を構築し、ノーザンブロットィングにより解析した。少なくとも 8 塩基以上の T 塩基を DNA 配列上に持つ遺伝子をキメラ体構築の候補にした (図 9A)。解析の結果、全てのキメラ変異体は野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株) において野生型 SgrS と同程度発現した (図 9B、上、レーン 2-6)。一方で、全てのキメラ変異体は野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株) に比べて  $\Delta hfq$  株で量が減少した (図 9B、上、レーン 3-6、9-12)。これらの結果から、各 SgrS キメラ変異体が Hfq と結合できることが示唆された。次にこれらの SgrS キメラ変異体の発現による *ptsG* mRNA、および IICB<sup>Glc</sup> の発現に対する影響をノーザンブロットィング、およびウェスタンブロットィングにより解析した。その結果、全ての SgrS キメラ変異体は野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株) で *ptsG* mRNA を抑制し、 $\Delta hfq$  株では抑制しなかった (図 9B、下)。このことから、SgrS キメラ変異体は Hfq 依存的な *ptsG* mRNA 抑制機能を十分保持することが示された。以上の結果から、3'末端のポリ U 配列が十分に長ければどのような Rho 因子非依存型ターミネーターでも Hfq の機能的相互作用を受けられることが示唆された。

(A)

SgrS-RyhB (*sgrS-ryhB*) 5' - CCCAGCCAGCCGGGUGCUGGCUUUUUUUUU - 3'  
SgrS-OxyS (*sgrS-oxyS*) 5' - CCCGCGGAUCUCCAGGAUCCGCUUUUUUUUU - 3'  
SgrS-flhC (*sgrS-flhC*) 5' - CCCAGCAGCGGUAACGACGUACCGCUGCUUUUUUUUUU - 3'  
SgrS-pyrL (*sgrS-pyrL*) 5' - CCCAGCCCUCAAUCAGGGGCUUUUUUUUUU - 3'

(B)

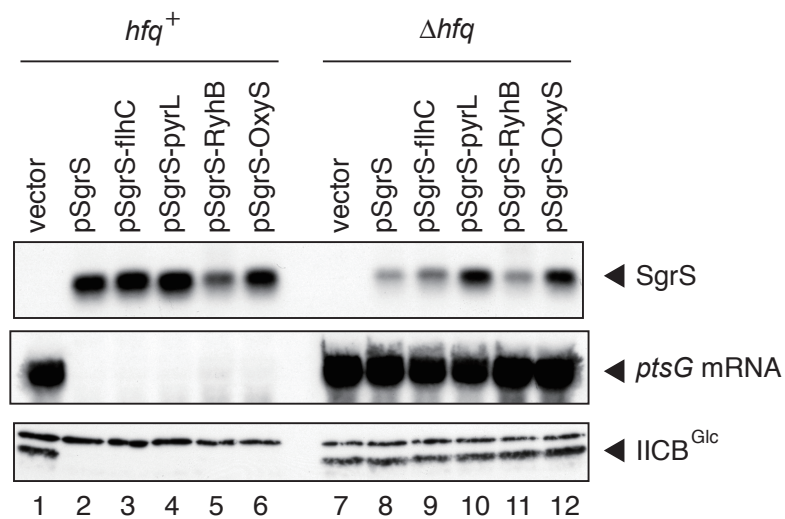


図9

SgrSの機能に対する他遺伝子ターミネーターによる置換の影響

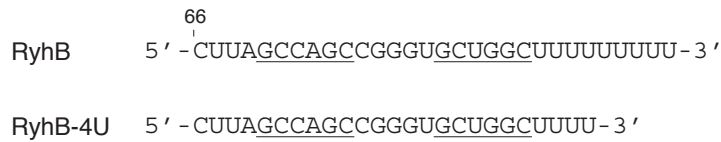
(A) SgrSキメラ変異体のRho因子非依存型ターミネーター周辺の塩基配列を示す。他遺伝子ターミネーターで置換した塩基配列を赤色で示す。下線部分は回文配列を示す。(B) SgrSキメラ変異体の発現、および*ptsG* mRNA抑制機能への影響を示す。図に示すプラスミドで形質転換させた野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株)、およびTM589株 ( $\Delta hfq$ 株)をアラビノースを加えたLB培地で培養した。A<sub>600</sub>=0.6付近でRNA試料を抽出し、SgrSプローブ1、および*ptsG*プローブを用いたノーザンブロットングに使用した。以下の量のRNAを解析に用いた。SgrS変異体:0.25μg、*ptsG* mRNA:7μg。タンパク質試料も抽出し、抗IIB抗体を用いたウェスタンブロットングに0.025 A<sub>600</sub>に相当する試料を使用した。



### 3'末端ポリ U 配列の短鎖化により RyhB の Hfq 依存的な *sodB* mRNA 抑制機能が低下する

次に、他の sRNA においても 3'末端ポリ U 配列が Hfq の結合と標的 mRNA 抑制機能に必要であるかを検証するため、sRNA の 1 つである RyhB に着目した。RyhB は活性酸素分解酵素をコードする *sodB* mRNA を抑制する sRNA である (24)。RyhB をコードする *ryhB* 遺伝子のターミネーター領域には、9 塩基の T が存在することから、RyhB の 3'末端ポリ U 配列は最長で 9 塩基である (図 10A、表 1)。まず SgrS 同様に、野生型の pRyhB、および 3'末端ポリ U 配列を 4 塩基に短鎖化した pRyhB-4U を構築した (図 10A、表 1)。pRyhB、および pRyhB-4U でそれぞれ野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株)、および  $\Delta hfq$  株を形質転換し、ノーザンブロッティングにより解析した。その結果、野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株) で、RyhB に比べて RyhB-4U の量が減少した (図 10B、上、レーン 2、3)。これは SgrS の場合と同様に、ポリ U 配列の短鎖化によりターミネーターの機能が減衰し、*ryhB* の転写終結効率が低くなったためだと考えられる。また、野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株) に比べて  $\Delta hfq$  株において RyhB の量は減少したが、RyhB-4U は減少しなかった (図 10B、上、レーン 2、3、5、6)。このことは RyhB-4U が Hfq 結合機能を失った可能性を示唆する。次に RyhB、および RyhB-4U の *sodB* mRNA 抑制機能を解析した。その結果、RyhB は野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株) において *sodB* mRNA を抑制したが、 $\Delta hfq$  株では抑制しなかった (図 10B、下、レーン 2、5)。一方で、RyhB-4U は野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株) においても *sodB* mRNA を抑制しなかった (図 10B、下、レーン 3)。ポリ U 配列の短鎖化により RyhB-4U の量が減少しているため *sodB* mRNA の抑制機能の欠損の原因の断定には至らないが、以上の結果は少なくとも、RyhB のポリ U 配列が Hfq との機能的相互作用領域である可能性を示している。

(A)



(B)

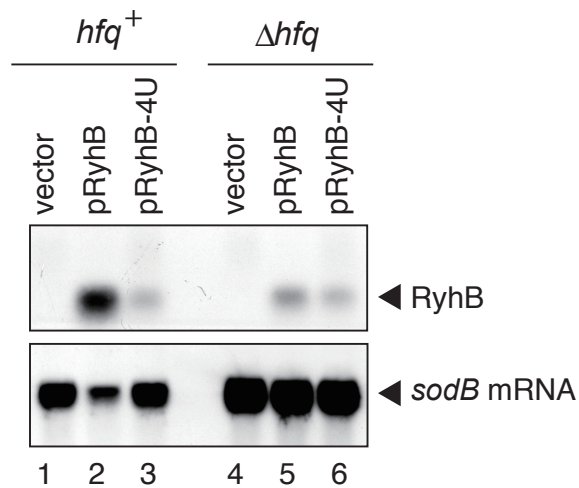


図10

RyhBの機能に対する3'末端ポリU短鎖化の影響

(A) RyhBとRyhB-4UのRho因子非依存型ターミネーター周辺の塩基配列を示す。(B) RyhB、およびRyhB-4Uの発現、および*sodB* mRNA抑制機能を示す。図に示すプラスミドで形質転換させた野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株)、およびTM589株 ( $\Delta hfq$ 株)をアラビノースを加えたLB培地で培養した。A<sub>600</sub>=0.6付近でRNA試料を抽出し、RyhBプローブ、および*sodB*プローブを用いたノーザンブロットティングに使用した。以下の量のRNAを解析に用いた。RyhB変異体:1μg、*sodB* mRNA:5μg。

**RyhB の 3'末端ポリ U 配列は Hfq との結合と *sodB* mRNA 抑制に必須である**

RyhB-4U の抑制機能の有無をさらに検証するため、RyhB-4U を運ぶ多コピープラスミドである pT-RyhB-4U を構築し、量を増加させることを試みた (図 11)。コントロールとして野生型の RyhB を運ぶ pT-RyhB を構築した。pT-RyhB-4U、および pT-RyhB で野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株) を形質転換し、ノーザンブロットイングにより解析した。その結果、pT-RyhB からは多量の RyhB が発現し、*sodB* mRNA の抑制機能も増大した (図 11、上、レーン 2)。一方で、pT-RyhB-4U から発現された RyhB-4U は pRyhB から発現された RyhB とほぼ同等量まで増加したにも関わらず、標的の *sodB* mRNA を抑制しなかった (図 11、レーン 3、4)。このことから、RyhB においても 3'末端のポリ U 配列は *sodB* mRNA 抑制に重要であることが示された。

また RyhB-4U は Hfq 結合機能を失った結果、*sodB* mRNA 抑制機能を失った可能性が示唆された。そこで *in vivo* における RyhB 変異体と Hfq の結合を解析するため、*hfq-FLAG* 株を用いて免疫沈降を行った。その結果 RyhB は Hfq と共沈するが、RyhB-4U は共沈しなかった (図 12、下、レーン 3、4)。これらから RyhB の 3'末端ポリ U 配列は Hfq との結合に必須であり、そのために *sodB* mRNA 抑制機能に必須であると考えられる。

RyhB は 3'末端ポリ U 配列の最後の U で転写が終結した場合、95 塩基であり比較的短い。そこで RyhB、および RyhB-4U 間の長さを比較した。RyhB、および RyhB-4U を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ノーザンブロットイングを行った (図 13)。その結果、RyhB-4U は RyhB よりも明らかに短かった。この結果は RyhB-4U が RyhB よりも短い 3'末端ポリ U 配列をもつことを示唆する。

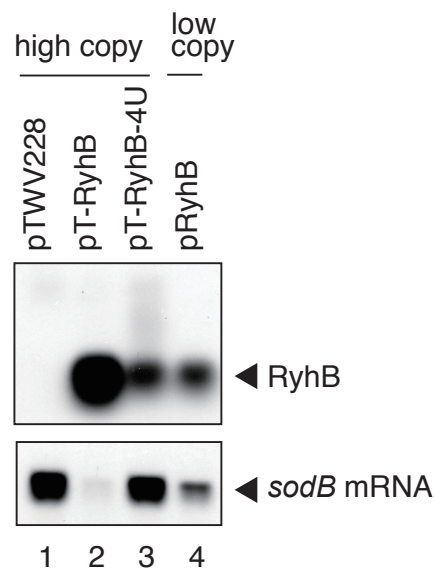


図11  
RyhB、およびRyhB-4Uの過剰発現の影響

図に示すプラスミドで形質転換させた野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株)、およびTM589株 ( $\Delta hfq$ 株)をアラビノースを加えたLB培地で培養した。A<sub>600</sub>=0.6付近でRNAを抽出し、RyhBプローブ、および *sodB*プローブを用いたノーザンプロットに使用した。以下の量のRNAを解析に用いた。RyhB変異体:1 $\mu$ g、*sodB* mRNA:5 $\mu$ g。

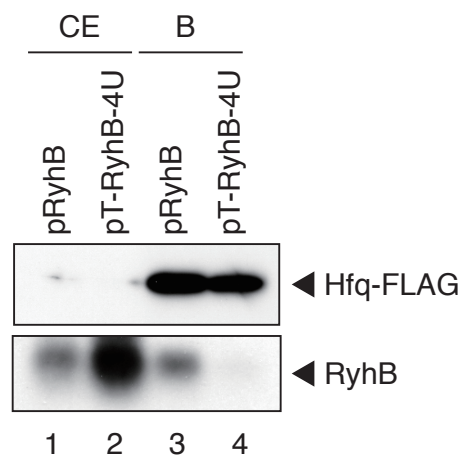


図12

*in vivo*におけるRyhB変異体とHfqの結合

図に示すプラスミドで形質転換させたTM615株 (*hfq-FLAG-cat*) をLB培地で $A_{600}=0.6$ まで培養した。細胞抽出液を調製し、実験手法に示す抗FLAGアガロースビーズを用いた免疫沈降実験に用いた。粗抽出画分 (CE) (5 $\mu$ l) と結合画分 (B) (5 $\mu$ l) を抗Hfq抗体を用いたウェスタンブロットティングに用いた。RNAの解析には粗抽出画分 (CE) (5 $\mu$ l) と結合画分 (B) (5 $\mu$ l) をフェノール処理し、RyhBプローブを用いたノーザンブロットティングに使用した。

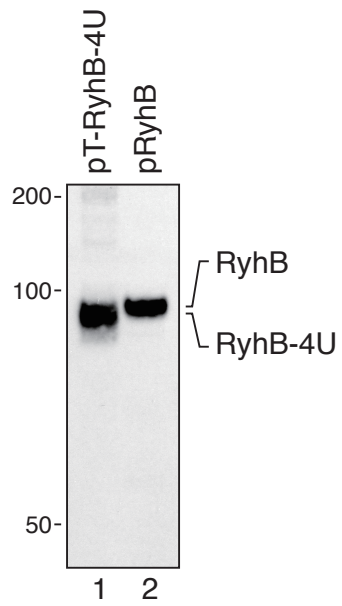


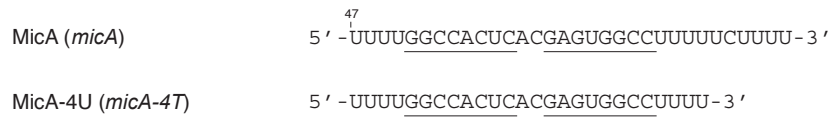
図13  
RyhB、およびRyhB-4U間の長さの比較

図に示すプラスミドで形質転換させた野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株) をアラビノースを加えたLB培地で培養した。A<sub>600</sub>=0.6付近でRNAを抽出し、RyhBプローブを用いたノーザンブロッティングに5μgを使用した (分離は8M尿素,10%アクリルアミドゲルで行った)。左にRNAマーカを示す。

### MicA と MicF の 3'末端ポリ U 配列は標的 mRNA 抑制に必要である

SgrS、および RyhB の解析から得られた標的 mRNA 抑制機能における sRNA 3'末端ポリ U 配列の重要性をさらに他の sRNA で検証するため、MicA、および MicF の 3'末端ポリ U 配列について解析を行った。全長の MicA、および MicF はそれぞれ 3'末端に 5UC4U、および 8U という配列を持つ(図 14A、15A)。それぞれの sRNA について野生型、および 3'末端ポリ U 配列を 4 塩基に短鎖化した pMicA-4U、および pMicF-4U を構築し、ノーザンブロットイングにより解析した(図 14A、15A)。その結果、MicA、および MicF は Hfq 依存的に標的である *ompA* mRNA、および *ompF* mRNA を抑制したが、MicA-4U、および MicF-4U は *ompA* mRNA、および *ompF* mRNA を抑制しなかった(図 14B、下、図 15B、下)。SgrS、および RyhB の結果も含めて、これらから、一般的に Hfq 結合型の sRNA おいて 3'末端ポリ U 配列は標的 mRNA 抑制機能に必須であることが強く示唆された。

(A)



(B)

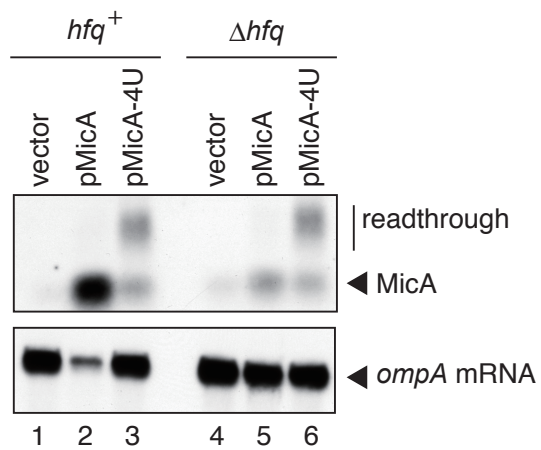


図14

MicAの機能に対する3'末端ポリU配列短鎖化の影響

(A) MicAのRho因子非依存型ターミネーター周辺の塩基配列を示す。下線部分は回文配列を示す。(B) MicA変異体の発現、および*ompA* mRNA抑制機能を示す。図に示すプラスミドで形質転換させた野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株)、およびTM589株 ( $\Delta hfq$ 株)をLB培地で培養した。A<sub>600</sub>=0.6付近でRNAを抽出し、MicAプローブ、および*ompA*プローブを用いたノーザンプロットングに用いた。以下の量のRNAを解析に用いた。MicA変異体:1μg、*ompA* mRNA:1μg。





### SgrS の 3'末端の 8 塩基のポリ U 配列は Hfq との結合に重要である

これまでの解析より明らかにした、Hfq との機能的結合における sRNA 3'末端の重要性をさらに検証する目的で、*in vitro* における sRNA/Hfq 結合実験を行った。大腸菌 RNA ポリメラーゼと異なり、T7 RNA ポリメラーゼは鋳型 DNA の末端まで転写反応を行うため、合成される RNA の 3'末端の配列を任意に設定できる。そこで、3'末端を図 16 に示すように転写合成させた一連の SgrS を合成し、*in vitro* のゲルシフトアッセイにより解析した (表 4、図 16A)。SgrS-S に対応する RNA を  $^{32}\text{P}$  で標識し、Hfq と結合させた結果、Hfq と SgrS-S との結合が確認された (図 16B、レーン 2)。同条件下で、図 16A に示す非標識の SgrS を過剰量加えた結果、SgrS-S-12U、および SgrS-S を過剰量加えた際に  $^{32}\text{P}$ -SgrS-S と Hfq との結合が阻害された (図 16B、レーン 3-6)。その一方で、SgrS-S-4U を過剰量加えた際には、SgrS-S/Hfq の結合は阻害されなかった (図 16B、レーン 7、8)。これらの結果は、SgrS の 3'末端の 8 塩基のポリ U 配列が Hfq との機能的結合に必須であるという結論を強く支持する。

(A)

SgrS-S-12U      5' - CCCGCCAGCAGAUUAUACCUGCUGGUUUUUUUUUUUU - 3'  
SgrS-S            5' - CCCGCCAGCAGAUUAUACCUGCUGGUUUUUUUUUU - 3'  
SgrS-S-4U        5' - CCCGCCAGCAGAUUAUACCUGCUGGUUUU - 3'

(B)

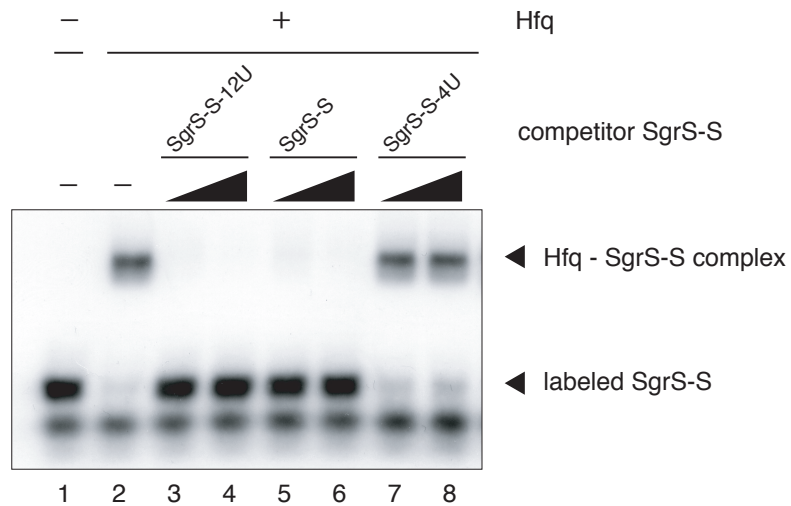


図16

SgrS/Hfq間の結合に対する3'末端ポリU配列の変異の影響

(A) ゲルシフトアッセイに用いたSgrS変異体の3'末端の配列を示す。解析に用いたSgrS変異体は全て1-167塩基を欠失させた。(B) ゲルシフトアッセイの結果を示す。<sup>32</sup>PラベルSgrS-S (0.2 pmol)、Hfq-His<sub>6</sub> (0.2 pmol)、非標識のSgrS変異体 (4 or 8 pmol) およびYeast tRNA (1μg) をreaction buffer中で混合し、37℃で15分間反応させた。その後、4%の非変性ポリアクリルアミドゲルに泳動し、ゲルシフトアッセイによりSgrS/Hfq間の結合を解析した。

考察

大腸菌やサルモネラ菌などのグラム陰性菌において、RNA シャペロンである Hfq の主要な役割は sRNA と標的 mRNA 間の塩基対形成を促進することであり、その結果 sRNA は標的 mRNA を負、あるいは正に制御する (1、3)。そのため、Hfq は、sRNA が標的 mRNA を制御するために必須のタンパク質因子である。しかしながら、Hfq による sRNA/mRNA 間の塩基対形成促進作用の詳細な分子機構は未解明である。

Hfq による sRNA/mRNA 間の塩基対形成促進作用の詳細な分子機構を解明するために、sRNA の Hfq 結合領域を明らかにすることは極めて重要な研究課題である。本研究では、SgrS をモデル sRNA として機能的な Hfq 結合領域の同定を試みた。種々の解析の結果、SgrS のターミネーターのポリ U 配列を短鎖化すると *ptsG* mRNA 抑制機能が低下することを見いだした (図 5)。このことは、SgrS の 3'末端のポリ U 配列が、Hfq との機能的結合領域であることを示唆する。ポリ U 配列を短鎖化すると SgrS の量が減少したことから次に、ポリ U 配列の短鎖化と同時にターミネーターシステムを延長することで量を増加させることを試みた。その結果、ポリ U 配列を短鎖化させた SgrS も SgrS と同等量の発現が確認された (図 6B、上、レーン 2、3)。また、3'末端ポリ U 配列の短鎖化により *ptsG* mRNA 抑制機能を失うことを再び示した (図 6B、中・下、レーン 3)。さらに、免疫沈降、およびゲルシフトアッセイにより、SgrS ターミネーターのポリ U 配列を 4 塩基に短鎖化すると Hfq 結合機能を失うことを示した (図 7、8、16)。これらから、SgrS のターミネーターポリ U 配列は Hfq の機能的相互作用に必須であると結論した。また、他のいくつかの sRNA においてもターミネーターのポリ U 配列の短鎖化により Hfq との結合機能、および標的 mRNA 抑制機能を失うことを発見した (図 11、12、14、15)。これらから sRNA の Rho 因子非依存型ターミネーターの 3'末端ポリ U 配列は、一般的に sRNA が Hfq の作用を受けるために必須であると結論した。実際に、Hfq 結合型の sRNA をコードする遺伝子の Rho 因子非依存型ターミネーターは多くの場合、7 連続以上の T 塩基を持つ (表 2)。

本研究で明らかにした sRNA の 3'末端ポリ U 配列が Hfq との機能的相互作用の必要領域であるという点は、Hfq による sRNA/mRNA 間の塩基対形成促進機構の解明において重要な手がかりである。この発見をもとに、今後 Hfq が持つ RNA 間塩基対形成促進機能の全容を解明するためには、Hfq との機能的結合に十分な sRNA 領域を決定することが必要だと考える。これまでいくつかの sRNA において、一本鎖 AU リッチ配列が Hfq との潜在的結合領域である

ことが、*in vitro* の生化学的解析により示されている。最近、*in vitro* 解析によりこれまでに示されていた RyhB の Hfq 潜在的結合領域の中に、*in vivo* での RyhB 機能と相関しない領域があることが示された (22)。このことは、Hfq が RNA の一本鎖 AU リッチ配列を好んで結合するという重要な証拠をもたらした一方で、*in vitro* 解析を用いる sRNA の Hfq 機能的結合領域の決定法が完全ではないことを意味している。本研究で用いた sRNA の Hfq 機能的結合領域の決定法は、Hfq との結合のみならず、標的 mRNA の抑制機能を合わせて *in vivo* で解析した点で、効果的な解析方法だと考えられる。また、同方法で決定した SgrS 領域が、*in vitro* においても Hfq との結合に重要な領域であることが示されたことから、本研究で用いた実験ストラテジーが有力であったと言える。これらのことから、本研究と同様のストラテジーで、SgrS の Hfq 機能的結合領域の十分領域の決定を行いたい。すでに、本研究グループにおいて、SgrS の 179-182 塩基領域に位置する UAUU、および直後に位置するステムループ構造 (183-196 塩基領域) が Hfq との機能的な結合に必要であることが示された (25)。これらの結果を包括し、SgrS の Hfq 機能的結合領域の最小十分領域 (機能的結合モジュール) を決定したい。また、SgrS 解析で決定した機能的結合モジュールをもとに、他の sRNA においても Hfq との機能的結合様式を検証したい。

ターミネーターの一部であるステム構造を延長させた SgrS 変異体は、*in vivo* での SgrS の Hfq 機能的結合領域の決定に大きく貢献した。これまでに、Hfq は sRNA を安定化することが示されている (2, 26)。実際に、本研究においても、 $\Delta hfq$  株で SgrS、RyhB、MicA、および MicF の量の減少が観察された (図 5、10、14、15)。このことから、Hfq との機能的結合領域に変異を持つ sRNA は、野生株 ( $hfq^+$  株) においても量の減少が予想され、その結果、標的 mRNA の抑制機能が損なわれた sRNA 変異の原因を結論することは困難になる。すなわち、sRNA 量の減少によるものか、あるいは sRNA 機能の欠失によるものかを判断できない。SgrS の 3'末端のポリ U 配列を短鎖化させた SgrS-4U は量が減少した一方で、ターミネーターの一部であるステム構造を延長させた SgrS-LS4U は SgrS-LS8U と同等量確認された (図 6B、上、レーン 2、3)。また SgrS-LS4U は、*ptsG* mRNA の抑制活性を損ない、Hfq との結合も確認されなかった (図 6B、下、レーン 3、図 7、下、レーン 4)。これらの結果から、SgrS 3'末端のポリ U 配列の短鎖化による *ptsG* mRNA 抑制機能の欠損が、SgrS 量の減少ではなく、SgrS 機能が損なわれた結果であると結論した。同様に、RyhB では、多コピープラスミドを用いて量を調節することにより、標的 mRNA の抑

制機能が損なわれた原因が、sRNA 量の減少ではなく、sRNA 機能が損なわれた結果であることを確認した (図 11、レーン 3、4)。最近、Hfq 依存型 sRNA の 1 つである RybB において、RybB の機能に影響をおよぼす点変異がスクリーニングにより単離された (15)。単離された点変異の中には、*in vitro* において Hfq との結合が弱くなっている変異体もあったことから、単離された点変異を含む領域が Hfq 機能的結合領域であることが示唆された。しかしながら、*in vivo* においては、SgrS と同様に点変異 RybB 量の減少が観察されたため、点変異により標的 mRNA 抑制機能が損なわれた原因の最終的な結論は不十分だと考えられる。点変異 RybB においても、本研究で行った LS の構築、あるいは多コピープラスミドを利用した方法により検証することで、単離された RybB の点変異が標的 mRNA 抑制機能に影響を与えた原因を強く結論することができると考える。

図 6 の結果から、ターミネーターを構成するステム構造を延長すると、Hfq 非存在下においても SgrS が安定化することが見いだされた (図 6B、上、レーン 2、5)。この結果はターミネーターステムの延長、および Hfq との結合が、SgrS に対して同じ質の安定化作用をもたらす可能性を示唆する。また、一般的にターミネーター構造は転写後の RNA を 3'エキソリボヌクレアーゼによる分解から保護する役割を持つ (16、17)。これらと、SgrS の 3'末端ポリ U 配列が Hfq との機能的結合に必須であることを合わせて考えると、Hfq は sRNA の 3'末端ポリ U 配列に結合することで 3'エキソリボヌクレアーゼによる分解から sRNA を保護し安定化させる可能性が考えられる。また、この仮説は最近報告された 6 量体 Hfq/オリゴ RNA (6U) 複合体の X 線結晶構造の解析からも支持される (27)。この結合様式において Hfq は RNA の 3'末端 U のリボース 3'位-OH 基を特異的に認識することが示された。この特徴は 3'末端ポリ U 配列に結合した Hfq が 3'エキソリボヌクレアーゼによる分解から RNA を保護する際に合理的である。今後は、*hfq* 変異に加えて様々な 3'エキソリボヌクレアーゼに変異を持つ株を作製し、sRNA の量を比較することで Hfq による sRNA 安定化作用の理解が深まると思われる。

本研究では、DNA 配列でのポリ T 配列を変化させることで、Hfq との機能的相互作用における sRNA 3'末端のポリ U 配列の重要性を明らかにしたが、実際に *in vivo* での sRNA の 3'末端の RNA 配列の解析には至っていない。一般的に、Rho 因子非依存型ターミネーターの転写終結においてはポリ T (A) 配列上で RNA ポリメラーゼが鋳型 DNA から解離する結果、転写産物は異なる 3'

末端を持つと考えられている (28)。また、転写のリードスルーや転写後のエキソヌクレアーゼによるプロセッシング (29)、および転写産物に対するポリ A 鎖の付加 (30) が起こる可能性もある。すなわち、転写後の RNA の 3'末端は均一ではなく、様々な 3'末端配列を持つ RNA 分子が混合して存在すると考えられる。一方で、RyhB-4U が RyhB と比較して短くなっていることを示した (図 13)。このことは RyhB-4U の 3'末端ポリ U 配列が RyhB のものよりも短い可能性を示唆している。また、*in vitro*において 3'末端ポリ U 配列の短い SgrS を合成し、ゲルシフトアッセイを行った結果、*in vivo*の結果と同様に、3'末端ポリ U 配列の短い SgrS は Hfq との結合力が低下することを明らかにした (図 16B、レーン 7、8)。このことから、*in vivo*においても多くの SgrS が鋳型の T の数に対応した 3'末端配列を持つ可能性が示唆される。今後は、sRNA とその変異体の 3'末端を 3'RACE 法等で決定することで実際の sRNA の 3'末端を解析し、sRNA 機能と転写終結の関係性についての理解を深めたい。また、この解析を通して、分子機構の詳細が未解明である Rho 因子非依存型転写終結のメカニズムの全容の解明につなげたい。

Rho 因子非依存型ターミネーターは、多くの mRNA、および安定的な RNA が 3'末端に保持する構造である (28、31)。ターミネーターポリ U 配列の主要な役割は転写終結のシグナルとして機能することである。本研究は sRNA の標的 mRNA 抑制機能を制御するターミネーターポリ U 配列の新規の重要な機能を明らかにしただけでなく、RNA 代謝における Hfq、およびターミネーターポリ U 配列の新たな制御機能の可能性を提起している。すなわち、長い 3'末端ポリ U 配列を転写終結領域に持つ mRNA が Hfq との結合により何らかの作用を受ける可能性が考えられる。特に Hfq による安定化作用は長い 3'末端ポリ U 配列を持つ mRNA においても観察される可能性がある。今後は  $\Delta hfq$  株を用いて、長い 3'末端ポリ U 配列を持つ mRNA の RNA の量の解析を行い、sRNA 以外の RNA における 3'末端ポリ U 配列と Hfq の機能について検証したい。



## 材料と方法

## 培養条件

本研究では液体培地として LB 培地を用い、菌体は好気条件下において 37°C で培養した。波長 600 nm で濁度を計測し、菌体の増殖を測定した。sRNA の誘導のためアラビノースを最終濃度 0.4% (RNA サンプル調製時)、あるいは 1% (タンパク質サンプル調製時) 添加した。また必要に応じて kanamycin (最終濃度 15 µg/ml)、ampicillin (最終濃度 50µg/ml) を加えた。

## 本研究で用いた大腸菌とプラスミド DNA

本研究で用いた大腸菌株を表 3 に示す。本研究では、大腸菌 K12 株である IT1568 株 (W3110 *mlc*) を野生株 (*hfq*<sup>+</sup>株) として、TM589 株 ( $\Delta hfq$ ) を  $\Delta hfq$  株としてそれぞれ用いた。TM771 株 ( $\Delta sgrR$ -*sgrS*, *hfq-FLAG-cat*) を構築するため、TM615 株 (*hfq-FLAG-cat*) の *hfq-FLAG-cat* 遺伝子を TM542 株 ( $\Delta sgrR$ -*sgrS*) に P1 トランスダクションにより移した。

本研究で用いたプラスミド DNA を表 3 に示す。W3110 ゲノム DNA あるいはプラスミド DNA を鋳型に PCR を行った。プライマーとして表 4 に示す DNA オリゴを用いた。*araC-araBAD* プロモーター領域から転写開始点までを含む DNA 断片を PCR で増幅させ、*EcoRI* と *SaII* で処理し、同処理をした少コピープラスミドの pMW218 にクローニングし pAraS を構築した。同様に、*araC-araBAD* プロモーターの DNA 断片を PCR で増幅させ、*EcoRI* と *XbaI* で処理し、同処理をした pMW218 にクローニングし pAraX を構築した。sRNA 変異体については、各変異体の転写領域を含む DNA 断片を増幅させ、*SaII* と *HindIII*、あるいは *XbaI* と *HindIII* で処理し、同処理をした pAraS、あるいは pAraX を DNA 断片とのライゲーション反応により連結させ、プラスミド DNA を構築した。シークエンス反応により構築物を確認した。また pRyhB、および pRyhB-4U を *EcoRI*、*HindIII* 処理し得られた DNA フラグメントを、同様の処理をした多コピープラスミドの pTWW228 にサブクローニングし pT-RyhB、および pT-RyhB-4U を得た。

## RNA の抽出

培養液に氷を加えて急冷し、直ちに遠心分離 (3.5 krpm、5 分、4 °C) し、集菌した。菌体を 400 µl RNA バッファー (0.5 % SDS、20 mM CH<sub>3</sub>COONa、10 mM EDTA (pH 5.5)) に懸濁した。RNA バッファー飽和フェノールを等量加え、65 °C で 5 分間緩やかに振盪した後、遠心分離 (12 krpm、5 分、室温)

し、上清に 2.5 倍量のエタノールを加え、遠心分離 (13 krpm、10 分、4 °C) により沈殿を得た。この沈殿を 70%エタノールでリンスした後、400  $\mu$ l RNA バッファーに溶解させ、1 ml のエタノールを加えた。この操作を 2 回繰り返した。得られた沈殿を自然乾燥させ、適量の RNA バッファーに溶解させた。吸光度を計測し、RNA 濃度を測定した。

### ノーザンブロットティング

抽出した RNA 試料の必要量を deionized formamide 溶液 (1 xMOPS buffer、6 % formaldehyde、50% formamide、4%glycerol) に溶解させた後、65°C で 5 分間加温した。氷上に 5 分間静置させた後、RNA Dye を加え、1.2 % アガロースゲル (1 xMOPS buffer、6 % formaldehyde) で電気泳動した (図 1 のみ 1.8 % アガロースゲルを用いた)。泳動後、ゲル中の RNA をキャピラリーブロットティングによりナイロンメンブレン (GE healthcare 社、Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>) に転写した。ブロットティングバッファーには 20xSSC (3 M NaCl、0.3 M sodium citrate) を用いた。50 mM NaOH によるアルカリ固定処理により RNA をメンブレンに固定した。ハイブリダイゼーションバッファー (DIG Easy Hyb Granules (Roche 社)) にメンブレンを加え、50°C で 10 分間反応させた。10 分後、PCR DIG probe Synthesis Kit (Roche 社) を用いて合成した DNA プローブを加えて、さらに 50 °C で一晩反応させた。メンブレンを洗浄バッファー (0.2 xSSC、0.1 % SDS) で洗浄した。洗浄したメンブレンをマレイン酸バッファー (100 mM maleic acid、150 mM NaCl pH 7.5) で平衡化させた後、ブロッッキングバッファー (liquid blocking agent (Roche 社)) : マレイン酸バッファー=1 : 10) で 20 分間振盪した。さらにブロッッキングバッファーで希釈した Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche 社、1/10000 希釈) で 1 時間反応させた。0.3 % Tween マレイン酸バッファーでメンブレンを洗浄した後、pH を緩衝するために 10 ml buffer A (100 mM Tris-HCl pH 9.5、300 mM NaCl) で 5 分間処理した。CDP-star detection reagent (Roche 社) をメンブレンの表面に注ぎ、アルカリホスファターゼ反応 (室温、10 分) を行い、X 線フィルムを感光させた。

図 11 では 8M 尿素 10%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により試料を分離した。泳動前には 6 $\mu$ L の RNA バッファーに溶かした RNA 試料を等量の PA (10mM EDTA pH8.0、80% formamide、0.2% bromophenol blue、0.2% xylenecianol) と混ぜ、97°C で 5 分間加温し、氷上で 5 分間静置した。泳

動後はゲルを 0.5 x TBE (45mM Tris-borate, pH8.3, 1mM EDTA) で 15 分間、2.5 x TBE で 30 分間、0.5 x TBE で 15 分間処理した。その後ゲル中の RNA をホライズプロット (アトー株式会社) でナイロンメンブレンに転写した。プロッティングバッファーには 0.5 x TBE を用いた。転写後はアガロースゲルの場合と同じ操作を行った。

DIG ラベルの DNA プローブは DIG-dUTP を用いた PCR により調製した。以下にそれぞれの相補領域、および長さを示す。*ptsG* プローブ: *ptsG* mRNA の 5' 領域の 305bp。SgrS プローブ 1: SgrS の 5' 側の 1-150 塩基の 150bp。SgrS プローブ 2: SgrS の 3' 側の 168-227 塩基の 60bp。*sodB* プローブ: *sodB* mRNA の 5' 領域の 210bp。RyhB プローブ: *ryhB* の 87bp。*ompA* プローブ: *ompA* mRNA の 5' 領域の 235bp。*ompF* プローブ: *ompF* mRNA の 5' 領域の 220bp。MicF プローブ: *micF* の 85bp。MicA プローブには *micA* の 1-50 塩基アンチセンス鎖の 5' 末端 DIG ラベル合成 DNA (理科研) を用いた。RNA マーカーとして RA Low II Easy Load (BioDynamics Laboratory) を用いた。

#### ウェスタンブロットティング

試料は以下のように調製した。培養液を分注し、遠心分離 (12 krpm、1 分、4 °C) した後、上清を取り除いた。細胞は純水と 2 x SDS buffer (120 mM Tris-HCl pH 6.8、3.8 % SDS、19 % グリセロール、9.6 % b-メルカプトエタノール、0.02 % bromophenol blue) で懸濁した。抽出したタンパク質試料の必要量を 100 °C で 5 分間加温した後、SDS-PAGE により分離した。分離後ゲルを Milli-Blot™ Graphite Electoblotter (Millipore) を用いてメンブレン (Immobilion PDVF) に転写した (2.5 mA/ cm<sup>2</sup>)。転写後のメンブレンは 5 % スキムミルク-Tween-PBS (0.1 % Tween、0.15 M NaCl、10 mM NaH<sub>2</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH7.5) で 30 分〜一晩ブロッキングした。5 % スキムミルク-Tween-PBS で 1/5000 に希釈した一次抗体 (抗 IIB<sup>Glc</sup> 抗体、あるいは抗 FLAG 抗体) を 50 分間反応させ、その後 Tween-PBS で 15 分間洗浄した。続いて、5 % スキムミルク-Tween-PBS で 1/5000 に希釈した二次抗体を 50 分間反応させ、その後 Tween-PBS で 15 分間洗浄した。メンブレンを ECL Western blotting 検出システムにより検出した。

#### 免疫沈降

各プラスミド DNA で形質転換させた TM771 株 ( $\Delta$ *sgrR-sgrS*,

*hfq-FLAG-cat*)、あるいは TM615 株 (*hfq-FLAG-cat*) を 200mL の LB 培地で波長 600 nm=0.6 まで培養し、集菌した。ペレットは 10mL の STE バッファー (100mM NaCl、10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA) で洗浄した。その後ペレットを氷上で 10mL の IP バッファー (20mM Tris-HCl pH8.0、0.1M KCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、10% グリセロール、0.1% Tween20) に懸濁した。懸濁液を超音波破碎し、遠心分離 (4500rpm、30 分、4 °C) した。その後、上清 (粗抽出液) を抗 FLAG アガロースビーズ液 (Sigma) と、4 °C で 30 分間インキュベーションした。混合液は mini chromatography column (BioRad) により精製した。アガロースビーズは 10mL の IP バッファーにより 2 回洗浄した。アガロースビーズに結合したタンパク質は 0.4mg/mL FLAG ペプチド (Sigma) 含有の 50 $\mu$ L IP バッファーで抽出し、結合画分 (B) とした。各サンプルを抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。RNA の解析のため、粗抽出画分 (10  $\mu$ L) と結合画分 (10  $\mu$ L) をフェノール処理し、エタノール沈殿させた後、10  $\mu$ L の RNA バッファーに溶かした。その内 5  $\mu$ L をノーザンブロッティングに用いた。

### ***in vitro* 転写系を用いた RNA の調製**

*in vitro* 転写反応に用いる鋳型 DNA 断片を PCR により調製した。鋳型として pSgrS を使い、Forward プライマーには 1331 を、Reverse プライマーには各変異 SgrS-S に応じて設計したもの (表 4) を用いた。1331 は T7 プロモーター配列に続いて SgrS の 168-197 の配列を持つ。これにより全ての SgrS の鋳型 DNA において SgrS の 1-167 塩基に当たる領域を欠失させた。PCR 産物はポリアクリルアミドゲル電気泳動で濃度、長さを確認した後、*in vitro* 転写に用いた。

*in vitro* 転写反応には CUGA7 (ニッポンジーンテック) を使い、調製した鋳型 DNA 断片を用いて転写反応を行った。<sup>32</sup>P ラベル SgrS-S の作製時には、転写反応液に [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-UTP (Perkin Elmer) を加えた。転写産物は 5%ポリアクリルアミドゲルでサイズ、濃度を確認した。また、非標識の SgrS 変異体については吸光度から RNA 濃度を測定した。

### **ゲルシフトアッセイ**

Hfq-His<sub>6</sub> は Maki らの方法に従い、精製した (8)。reaction buffer (20mM Tris-HCl pH8.0、1mM DTT、1mM MgCl<sub>2</sub>、20mM KCl、10mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH8.0) 内で、<sup>32</sup>P ラベル SgrS-S (0.2pmol)、Hfq-His<sub>6</sub> (0.2pmol)、非標識の SgrS-S 変異体 (4、あるいは 8pmol)、および Yeast tRNA (1μg) を混合し 37°C で 15 分間インキュベーションした (全 5μl)。その後、loading dye (20%glycerol、0.04% bromophenol blue) を 5μl 加えて、全 10μl を 4%の非変性ポリアクリルアミドゲル (0.5 x TBE, 5% glycerol を含む) で分離した。電気泳動は 4°Cで行った。電気泳動後、ゲルを減圧乾燥して、オートラジオグラフィで検出した。

表

表 1 本研究で用いた sRNA の Rho 因子非依存型ターミネーター周辺の塩基配列

<i>sgrS/sgrS-S</i>	5'-CCCGCCAGCAGATTATACCTGCTGGTTTTTTTTAT-3'
<i>sgrS-LM</i>	5'-CCCGCCAGCAGACGCGACCTGCTGGTTTTTTTTAT-3'
<i>sgrS-SM1</i>	5'-CCCGGGTCGTCATTATACGACGACCTTTTTTTTTAT-3'
<i>sgrS-SM2</i>	5'-CCCGGACGACCATTATACGGTCGTCCTTTTTTTTTAT-3'
<i>sgrS-7T</i>	5'-CCCGCCAGCAGATTATACCTGCTGGTTTTTTTTAT-3'
<i>sgrS-6T</i>	5'-CCCGCCAGCAGATTATACCTGCTGGTTTTTTTTAT-3'
<i>sgrS-5T</i>	5'-CCCGCCAGCAGATTATACCTGCTGGTTTTTTTTAT-3'
<i>sgrS-4T</i>	5'-CCCGCCAGCAGATTATACCTGCTGGTTTTAT-3'
<i>sgrS-LS8T</i>	5'-CCCGCCAGCAGCCCCATTATACGGGGCTGCTGGTTTTTTTTAT-3'
<i>sgrS-LS4T</i>	5'-CCCGCCAGCAGCCCCATTATACGGGGCTGCTGGTTTTAT-3'
<i>sgrS-ryhB</i>	5'-CCCAGCCAGCCGGGTGCTGGCTTTTTTTTTTGA-3'
<i>sgrS-oxyS</i>	5'-CCCGCGGATCTCCAGGATCCGCTTTTTTTTTGTC-3'
<i>sgrS-flhC</i>	5'-CCCAGCAGCGGTAACGACGTACCGCTGCTTTTTTTTTGTC-3'
<i>sgrS-pyrL</i>	5'-CCCAGCCCCCTCAATCGAGGGGCTTTTTTTTTGTC-3'
<i>ryhB</i>	5'-CTTAGCCAGCCGGGTGCTGGCTTTTTTTTTTGA-3'
<i>ryhB-4T</i>	5'-CTTAGCCAGCCGGGTGCTGGCTTTTTGA-3'
<i>micA</i>	5'-TTTTGGCCACTCACGAGTGGCCTTTTTCTTTTCTGTCAGG-3'
<i>micA-4T</i>	5'-TTTTGGCCACTCACGAGTGGCCTTTTCAGG-3'
<i>micF</i>	5'-TCAACCGGATGCCTCGCATTCGGTTTTTTTTACCC-3'
<i>micF-4T</i>	5'-TCAACCGGATGCCTCGCATTCGGTTTTACCC-3'



表 2 大腸菌の Hfq 結合型 sRNA の Rho 因子非依存型ターミネーターの 3'末端ポリ U (T) 配列

Name of sRNA gene	Sequence of polyT tail of rho-independent terminator
<i>ryhB</i>	TTTTTTTTT (9T)
<i>micC</i>	TTTTTTTTT (9T)
<i>sgrS</i>	TTTTTTTTTATT (8TA2T)
<i>rseX</i>	TTTTTTTTT (8T)
<i>oxyS</i>	TTTTTTTTT (8T)
<i>omrA</i>	TTTTTTTTT (8T)
<i>omrB</i>	TTTTTTTTT (8T)
<i>micF</i>	TTTTTTTTT (8T)
<i>gcvB</i>	TTTTTTTTT (8T)
<i>rprA</i>	TTTTTTTTT (8T)
<i>mgrR</i>	TTTTTTTTT (8T)
<i>dsrA</i>	TTTTTTTTTATT (7TA2T)
<i>glmZ</i>	TTTTTTTTAT (7TAT)
<i>chiX (micM)</i>	TTTTTTTT (7T)
<i>spf (SpoT42)</i>	TTTTTTTATT (6TA2T)
<i>rybB</i>	TTTTTTTGTT (6TG2T)
<i>arcZ</i>	TTTTTT (6T)
<i>micA</i>	TTTTTCTTTT (5TC4T)
<i>rydC</i>	TTTTCTTT (4TC3T)
<i>cyaR</i>	TTATTTTTT (2TA6T)

塩基配列は KEGG データベース(<http://www.genome.jp/kegg/>)から取得した。

表 3 本研究で用いた大腸菌 K12 株、およびプラスミド DNA

Strain/plasmid	Relevant genotype and property	Source/reference
Strain		
IT1568	W3110 <i>mlc</i>	Laboratory stock
TM589	W3110 <i>mlc</i> $\Delta$ <i>hfq</i>	Morita <i>et al.</i> (2005)
TM542 (2005)	W3110 <i>mlc</i> $\Delta$ ( <i>sgrR-sgrS</i> )	Kawamoto <i>et al.</i>
TM615	W3110 <i>mlc hfq-FLAG-cat</i>	Morita <i>et al.</i> (2005)
TM771	W3110 <i>mlc</i> $\Delta$ ( <i>sgrR-sgrS</i> ) <i>hfq-FLAG-cat</i>	This study
Plasmid		
pMW218	Low copy number plasmid vector	NIPPON GENE
pAraS	Derivative of pMW218 carrying the <i>araC-PBAD</i>	This study
pAraX	Derivative of pMW218 carrying the <i>araC-PBAD</i>	This study
pSgrS	Derivative of pAraS carrying the <i>sgrS</i>	This study
pSgrS-S	Derivative of pAraX carrying the <i>sgrS-S</i>	This study
pSgrS-LM	Derivative of pAraS carrying the <i>sgrS-LM</i>	This study
pSgrS-SM1	Derivative of pAraS carrying the <i>sgrS-SM1</i>	This study
pSgrS-SM2	Derivative of pAraS carrying the <i>sgrS-SM2</i>	This study
pSgrS-7U	Derivative of pAraS carrying the <i>sgrS-7T</i>	This study
pSgrS-6U	Derivative of pAraS carrying the <i>sgrS-6T</i>	This study
pSgrS-5U	Derivative of pAraS carrying the <i>sgrS-5T</i>	This study
pSgrS-4U	Derivative of pAraS carrying the <i>sgrS-4T</i>	This study
pSgrS-LS8U	Derivative of pAraS carrying the <i>sgrS-LS8T</i>	This study
pSgrS-LS4U	Derivative of pAraS carrying the <i>sgrS-LS4T</i>	This study
pSgrS-RyhB	Derivative of pAraS carrying the <i>sgrS-ryhB</i>	This study
pSgrS-OxyS	Derivative of pAraS carrying the <i>sgrS-oxyS</i>	This study
pSgrS-flhC	Derivative of pAraS carrying the <i>sgrS-flhC</i>	This study
pSgrS-pyrL	Derivative of pAraS carrying the <i>sgrS-pyrL</i>	This study
pRyhB	Derivative of pAraX carrying the <i>ryhB</i>	This study
pRyhB-4U	Derivative of pAraX carrying the <i>ryhB-4T</i>	This study
pMicA	Derivative of pAraX carrying the <i>micA</i>	This study
pMicA-4U	Derivative of pAraX carrying the <i>micA-4T</i>	This study
pMicF	Derivative of pAraX carrying the <i>micF</i>	This study
pMicF-4U	Derivative of pAraX carrying the <i>micF-4T</i>	This study
pTWV228	High copy number plasmid vector	TAKARA
pT-RyhB	Derivative of pTWV228 carrying the <i>araC-PBAD-ryhB</i>	This study
pT-RyhB-4U	Derivative of pTWV228 carrying the <i>araC-PBAD-ryhB-4T</i>	This study

図 4 本研究で用いた DNA プライマー

primer	sequence	plasmid or in vitro DNA template
926	CCCCGAATTCCTGATTCGTTACCAA	pAraS, pAraX (F)
927	CCCCGTCGACGGTATGGAGAAACAGTAG	pAraS (R)
975	CGCGCTAGAAACAGTAGAGAGITT	pAraX (R)
928	CCCCGTCGACGATGAAGCAAGGGGG	pSgrS, pSgrS-LM, -SM1, -SM2, -4U, -5U, -6U, -7U, -LS8U, -LS4U, -RyhB, -OxyS, -flhC, -pyrL (F)
930	CCCAAGCTTATAAAAAAACCAGCAGG	pSgrS (R)
1127	GCGCTCTAGATAGTGTGACTGAGTATTGGT	pSgrS-S (F)
929	CCCAAGCTTGTATAGCCATCAAAACAGC	pSgrS-S (R)
1236	CCCAAGCTTATAAAAAAACCAGCAGGTCGCGTCTGCTGGCGGGTGATTTTACAC	pSgrS-LM (R)
HO14	CCCAAGCTTATAAAAAAAGGTCGTCGTATAATGACGACCCGGGTGATTTTACAC	pSgrS-SM1 (R)
HO15	CCCAAGCTTATAAAAAAAGACGACCGTATAATGGTCGCCGGGTGATTTTACAC	pSgrS-SM2 (R)
HO17	CCCAAGCTTATAAAAAACCAGCAGGTATAATCTGCT	pSgrS-4U (R)
HO18	CCCAAGCTTATAAAAAACCAGCAGGTATAATCTGCT	pSgrS-5U (R)
HO19	CCCAAGCTTATAAAAAACCAGCAGGTATAATCTGCT	pSgrS-6U (R)
HO20	CCCAAGCTTATAAAAAACCAGCAGGTATAATCTGCT	pSgrS-7U (R)
1118	CCCAAGCTTATAAAAAAACCAGCAGCCCGTATAATGGGGCTGCTGGCGGGTGATTTTAC	pSgrS-LS8U (R)
1120	CCCAAGCTTATAAAAAACCAGCAGCCCGTATAATGGGGCTGCTGGCGGGTGATTTTAC	pSgrS-LS4U (R)
1176	CCCAAGCTTACGAAAGATCAAAAAAAGCCAGCACCCGGCTGGCTGGGTGATTTTACACCAATAC	pSgrS-RyhB (R)
1177	CCCAAGCTTTTTTATGGCAAAAAAAGCGGATCCTGGAGATCCGCGGGTGATTTTACACCAATAC	pSgrS-OxyS (R)
1172	CCCAAGCTTCGATTGGGGCAAAAAAAGCAGCGGTACGTCGTTACCGTGTGGGTGATTTTACACCAATAC	pSgrS-flhC (R)
1171	CCCAAGCTTACGCTGGGGCAAAAAAAGCCCTCGATTGAGGGGCTGGGTGATTTTACACCAATAC	pSgrS-pyrL (R)
1144	GCGCTCTAGATAGCGATCAGGAAGACCCTC	pRyhB, pRyhB-4U (F)
1145	CCCAAGCTTTGAGAACGAAAGATCAAAAA	pRyhB (R)
1152	CCCAAGCTTTGAGAACGAAAGATCAAAAGCCAGCACCCGGCTGG	pRyhB-4U (R)
1148	GCGCTCTAGATAGAAAGACGCGCATTGT	pMicA, pMicA-4U (F)
1149	CCCAAGCTTTGGAAAAACACGCCTGACAG	pMicA (R)
1154	CCCAAGCTTTGGAAAAACACGCCTGAAAAGCCACTCGTGAGTGG	pMicA-4U (R)
1150	GCGCTCTAGATAGCTATCATCATTAACCTT	pMicF, pMicF-4U (F)
1151	CCCAAGCTTAAAAGTGTGTAAGAAGGGT	pMicF (R)
1155	CCCAAGCTTAAAAGTGTGTAAGAAGGGTAAAACCGAATGCGAGGCATC	pMicF-4U (R)
1331	GAATTAATACGACTCACTATAGGTGTGACTGAGTATTGGGTGAAAATCACCC	T7 promoter-SgrS168 (F)
1332	AAAAAAAACCAGCAGGTATAATCTGCTGGC	SgrS-8U (R)
1333	AAAACCAGCAGGTATAATCTGCTGGC	SgrS-4U (R)
1338	AAAAAAAACCAGCAGGTATAATCTGCTGGC	SgrS-12U (R)

謝辭

本研究テーマと素晴らしい研究環境を与えて下さり、研究に際して熱心にご指導賜りました鈴鹿医療科学大学薬学部 饗場弘二教授に深く感謝致します。未熟な私に実験を一から教えて下さり、本論文作成に至るまで厚くご指導賜りました鈴鹿医療科学大学薬学部 森田鉄平助手に心か御礼申し上げます。また、ご指導、ご助言を頂いたことを名古屋大学理学研究科 牧貴美香技術職員に深く感謝致します。そして、5年間研究を行い、共に多くの時間を過ごした同期の石川博一さんに深く感謝致します。

博士課程後期課程に進学するにあたり、名古屋大学において素晴らしい研究環境を与えて下さった名古屋大学理学研究科 本間道夫教授に深く感謝致します。教育的な指導や研究室での生活環境など、須藤雄気准教授、小嶋誠司講師、西岡典子助手をはじめとし、本間研の全てのメンバーに大変お世話になりました。心より感謝致します。

最後に私の生活を支え、研究に専念させてくれた家族に深く感謝します。

## 引用文献

1. Gottesman S, Storz G (2010) Bacterial small RNA regulators: Versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(a003798):1–16.
2. Gottesman S (2004) The small RNA regulators of *Escherichia coli*: Roles and mechanisms. *Annu Rev Microbiol* 58:303–328.
3. Waters LS, Storz G (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* 136:615–628.
4. Vanderpool CK (2007) Physiological consequences of small RNA-mediated regulation of glucose-phosphate stress. *Curr Opin Microbiol* 10:146–151.
5. Aiba H (2007) Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr Opin Microbiol* 10:134–139.
6. Vanderpool CK, Gottesman S (2004) Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Mol Microbiol* 54:1076–1089.
7. 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.
8. 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.
9. 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.

10. Morita T, Maki K, Aiba H (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: Mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev* 19:2176–2186.
11. Urban JH, Vogel J (2007) Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs in vivo. *Nucleic Acids Res* 35:1018-1037.
12. Kawamoto H, et al. (2005) Implication of membrane localization of target mRNA in the action of a small RNA: Mechanism of post-transcriptional regulation of glucose transporter in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 19:328–338.
13. Maki K, Morita T, Otaka H, Aiba H (2010) A minimal base-pairing region of a bacterial small RNA SgrS required for translational repression of *ptsG* mRNA. *Mol Microbiol* 76:782–792.
14. Pfeiffer V, Papenfort K, Lucchini S, Hinton JC, Vogel J (2009) Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat Struct Mol Biol* 16:840-846.
15. Balbonti R, et al. (2010) Recognition of heptameric seed sequence underlies multi-target regulation by RybB small RNA in *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 78:380–394.
16. Abe H, Aiba H (1996) Differential contributions of two elements of rho-independent terminator to transcription termination and mRNA stabilization. *Biochimie* 78:1035–1042.
17. Aiba H, Hanamura A, Yamano H (1991) Transcriptional terminator is a positive regulatory element in the expression of the *Escherichia coli crp* gene. *J Biol Chem* 266:1721–1727.



18. Zhang A, Wassarman KM, Ortega J, Steven AC, Storz G (2002) The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol Cell* 9:11–22.
19. Moller T, et al. (2002) Hfq: A bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell* 9:23–30.
20. Brescia CC, Mikulecky PJ, Feig AL, Sledjeski DD (2003) Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. *RNA* 9:33–43.
21. Geissmann TA, Touati D (2004) Hfq, a new chaperoning role: Binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J* 23:396–405.
22. Hao Y, Zhang ZJ, Erickson DW, Huang M, Huang Y, Li J, Hwa T, Shi H (2011) Quantifying the sequence-function relation in gene silencing by bacterial small RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:12473–12478.
23. Wadler CS, Vanderpool CK (2007) A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:20454–20459.
24. Masse E, 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.
25. Ishikawa H, Otaka H, Maki K, Morita T, Aiba H. The functional Hfq-binding module of bacterial sRNAs consists of a double or single hairpin preceded by a U-rich sequence and followed by a 3' polyU tail. *RNA. in press*.

26. Masse E, Escorcía FE, Gottesman S (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 17:2374–2383.
27. Sauer E, and Weichenrieder O (2011) Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 13065–13070.
28. Reynolds R, Bermudez-Cruz RM, Chamberlin MJ (1992) Parameters affecting transcription termination by *Escherichia coli* RNA polymerase. I. Analysis of 13 rho-independent terminators. *J Mol Biol* 224:31–51.
29. Abe H, Abo T, Aiba H (1999) Regulation of intrinsic terminator by translation in *Escherichia coli*: Transcription termination at a distance downstream. *Genes Cells* 4:87–97.
30. Mohanty BK, Maples VF, Kushner SR (2004) The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 54:905–920.
31. d'Aubenton Carafa Y, Brody E, Thermes C (1990) Prediction of rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators. A statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J Mol Biol* 216:835–858.

副論文 1 冊

PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action

Otaka, H., Ishikawa, H., Morita, T., Aiba, H.

*Proc Natl Acad Sci USA*. 108(32): 13059–13064 (2011)

(細菌 sRNA の rho 因子非依存型転写終結配列のポリ U 配列は Hfq の作用に必須である)

参考論文 1 冊

A minimal base-pairing region of a bacterial small RNA SgrS required for translational repression of *ptsG* mRNA

Maki, K., Morita, T., Otaka, H. and Aiba, H.

*Molecular Microbiology*. 76(3) : 782-792 (2010)

(SgrS による *ptsG* mRNA の翻訳阻害に必要な塩基対形成の最小領域の決定)