

学位論文 主論文

大腸菌小分子 RNA における Hfq 結合モジュールの決定

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

石川 博一

目次

要旨	3 頁
序論	5 頁
結果	9 頁
考察	36 頁
材料と方法	43 頁
謝辞	53 頁
引用文献	55 頁
副論文	
参考論文	

要旨

機能性小分子 RNA (small RNA; sRNA) は、転写後段階で塩基対形成を介して標的 mRNA の発現を調節している。sRNA と mRNA 間の塩基対形成は RNA シャペロンである Hfq によって促進される。sRNA は、mRNA との塩基対形成領域、Hfq 結合領域、Rho 非依存性ターミネーターの 3 つの機能的領域を有している。sRNA が Hfq の塩基対形成促進作用を享受するために、Hfq 結合領域は必須な領域であるが、機能的結合に必要な RNA 配列の特徴や構造組成は部分的にしか明らかになっていない。最近、本研究グループは、大腸菌 sRNA の Rho 非依存性ターミネーターの長いポリ U 配列が Hfq との機能的結合に必須であることを証明した。本研究は、最も解析の進んでいる sRNA の 1 つである SgrS をモデルに、Hfq/sRNA の機能的結合に十分な sRNA 領域の決定を目的とした。本研究における遺伝子変異解析および生化学的解析から、SgrS の Rho 非依存性ターミネーターのポリ U 配列に加えて、U-rich 配列が直前に存在する内部ステムループ構造が SgrS の Hfq との機能的結合に必要な領域であることを明らかにした。これらの結果に基づいて、Hfq 依存性 sRNA の機能構造を解析し、塩基対形成領域と Rho 非依存性ターミネーターを含む Hfq 結合領域が近接するという特徴を明らかにした。また、SgrS の Hfq 結合領域に任意の mRNA の相補配列を連結させる手法により、任意の mRNA の発現を抑制した。これらの結果から、Rho 非依存性ターミネーターのポリ U 配列、および U-rich 配列が直前に存在する内部ステムループ構造を合わせた領域が、Hfq との機能的結合に十分な領域であること、すなわち Hfq 結合モジュールであると結論した。

序論

細菌において、RNA シャペロンである Hfq は、転写後段階で塩基対形成を介して標的 mRNA の発現を調節する機能性小分子 RNA (small RNA; sRNA) の機能に必須である。Hfq は、Q β ファージの感染の宿主因子 (host factor required for the replication of Q β bacteriophage) として同定されたタンパク質であり (Franze de Fernandez *et al.*, 1968)、その後の一連の解析により、細菌に広く保存された、遺伝子発現、特に転写後発現制御に関わる主要因子であると認識されている。Hfq は N 末端側の Sm ドメインを介してドーナツ型のホモ 6 量体の環構造を形成する (Moller *et al.*, 2002; Schumacher *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002)。また、Hfq は RNA 結合タンパク質であり、RNA シャペロン活性が確認されている。sRNA の作用における Hfq の機能的な役割は、標的 mRNA の翻訳や安定性を調節するために、sRNA と標的 mRNA の間の塩基対形成を促進することである (Kawamoto *et al.*, 2006)。sRNA による標的 mRNA の発現調節は、ほとんどの場合負に制御される (Gottesman & Storz, 2010; Vogel & Luisi, 2011)。Hfq のもう一つの役割は、sRNA-mRNA を不安定化するために、エンドリボヌクレアーゼである RNase E を標的 mRNA にリクルートすることである (Morita *et al.*, 2005)。また、Hfq により sRNA が安定化されることが知られている (Gottesman, 2004; Storz & Gottesman, 2006)。

Hfq 依存性 sRNA は、標的 mRNA との塩基対形成領域、Hfq 結合領域、Rho 非依存性ターミネーターの少なくとも 3 つの機能的な要素を有している。標的 mRNA と部分的な相補性をもつ塩基対形成領域は、多くの sRNA で明確にされている。塩基対形成領域で標的 mRNA と塩基対を形成することにより、sRNA は標的 mRNA の翻訳や安定性を調節する。また、GC-rich な回文配列の直後に連続した U 塩基が続く Rho 非依存性ターミネーターの役割も明確にされている。sRNA に限らず、多くの RNA の 3' 末端に位置する Rho 非依存性ターミネーターの第一義的な役割は、転写を終結させることである。また、回文配列により形成される RNA ステムループ構造により、転写された RNA が安定化されることも、ターミネーター領域の重要な役割である (Aiba *et al.*, 1991)。

その一方で、Hfq 結合領域は sRNA と標的 mRNA の間の塩基対形成を促す Hfq 機能を享受するために必須な領域であるが、機能的結合に必要な RNA 配列の特徴や構造組成は部分的にしか明らかになっていない。これまでの X 線結晶構造解析をはじめとした構造解析により、Hfq 6 量体は、proximal side で U-rich 配列の RNA と、distal side で A-rich 配列の RNA と結合することが示

された (Schumacher *et al.*, 2002、Link *et al.*, 2009)。また、生化学的解析により、OxyS (Zhang *et al.*, 2002)、Spot42 (Moller *et al.*, 2002)、DsrA (Brescia *et al.*, 2003)、RyhB (Geissmann & Touati, 2004)、RybB (Balbomtin *et al.*, 2010) のようないくつかの sRNA において、Hfq が AU-rich 配列と優先的に結合することが示された。これらの AU-rich 配列の大部分は sRNA 内部のステムループ構造の近くに位置している。このように、生化学的アプローチによる研究成果が蓄積していく一方で、上述した解析が断片化した RNA を用いて *in vitro* で行われていること、また Hfq 結合領域に関する *in vivo* での遺伝子変異解析はほとんど行われていないことから、これらの RNA 配列が sRNA 機能に直結する Hfq 結合領域であるかについては不明である。

最近、本研究グループの大鷹らの解析により、大腸菌 sRNA のターミネーターの長いポリ U 配列が Hfq との機能的な結合に必須であることが証明された (Otaka *et al.*, 2011)。また、Sauer らによる構造解析および生化学的解析により、Hfq が *in vitro* において RNA 分子の 3'末端の U-rich 配列に優先的に結合することが示された (Sauer & Weichenrieder, 2011)。これらの解析結果は、sRNA 機能と直接関係する sRNA の Hfq 機能的結合領域を示した重要な研究成果である。

本研究は、SgrS をモデル sRNA として、sRNA 機能に対する、ターミネーターのポリ U 配列以外の領域、特に AU-rich な潜在的 Hfq 結合領域の役割を検証し、Hfq/sRNA の機能的結合に十分な sRNA 領域の決定を目的とした。SgrS は、大腸菌においてグルコースリン酸ストレス下で発現が誘導される sRNA で (Vanderpool & Gottesman, 2004)、最も解析が進んでいる Hfq 依存性 sRNA の 1 つである。SgrS は、部分的な塩基対形成を介して、グルコース透過装置タンパク質 IICB^{Glc} をコードする *ptsG* mRNA の翻訳開始領域と結合し、*ptsG* mRNA の翻訳阻害と RNase E による速やかな分解を引き起こす (Aiba, 2007) (図 1、P. 8)。本研究における遺伝子変異解析および生化学的解析から、SgrS のターミネーターのポリ U 配列に加えて、U-rich 配列が直前に存在する内部ステムループ構造が SgrS の Hfq との機能的結合に必要な領域であることを明らかにした。また、ターミネーターのポリ U 配列、および U-rich 配列が直前に存在する内部ステムループ構造を合わせた領域が、Hfq との機能的結合に十分であること、すなわち sRNA の Hfq 結合モジュールであると結論した。

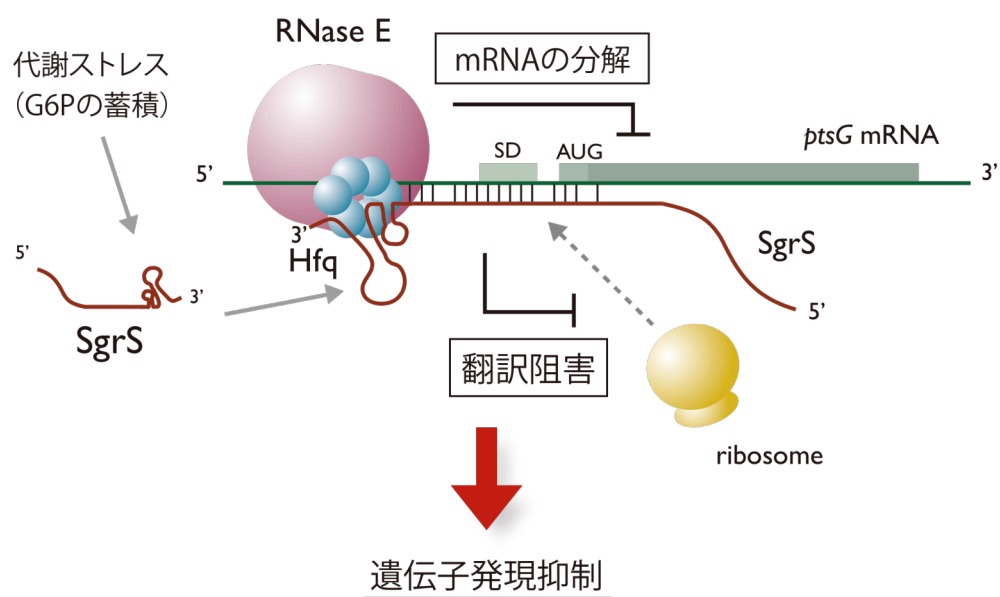


図1 SgrS による $ptsG$ mRNA 抑制の分子機構モデル

代謝ストレス(グルコースリン酸ストレス)により、SgrS の合成が誘導される。RNAシャペロンであるHfq の作用により、SgrSと $ptsG$ mRNA の翻訳開始領域の間の塩基対形成が促進される。その結果、 $ptsG$ mRNA の翻訳は阻害され、 $ptsG$ mRNA は抑制される。また、SgrS/Hfqと相互作用するRNase Eにより、 $ptsG$ mRNAは迅速に分解される。

結果

○ターミネーターの手前にあるステムループ構造は SgrS の機能に重要である

SgrS は、全長 227 塩基であり、157-187 塩基領域が *ptsG* mRNA の翻訳開始領域と部分的に相補的な配列である (図 2A、P. 12)。また、本研究グループの牧らは、このうち、168-181 塩基が *ptsG* mRNA の翻訳阻害を起こす十分な塩基対形成領域であることを示した。その一方で、牧らは、183-187 塩基に変異を持つ SgrS14 が、塩基対形成領域として以外の役割で、*ptsG* mRNA の抑制機能に影響を及ぼすことを示した (Maki *et al.*, 2010)。このことは、183-187 塩基が Hfq との機能的結合に必要な領域である可能性を示唆する。この可能性を検証する目的で、SgrS の 183-186 塩基が 193-196 塩基と塩基対を形成し、ステムループ構造を形成する可能性に着目した (図 2A、B)。また、このステムループ構造のループ領域に潜在的 Hfq 結合領域である A-rich 配列 (UAAAAU) が、同様にステムループ構造の直前に潜在的 Hfq 結合領域である U-rich 配列 (UAUU) が存在する。そこで、SgrS 機能に対する 179-182 塩基の UAUU、187-192 塩基の UAAAAU、および 183-186/193-196 塩基での塩基対で形成されるステムループ構造の重要性の検証を行った。

最初に、183-196 塩基での内部ステムループ構造の重要性を検証する目的で、SgrS14、および SgrS14R 変異体を解析に用いた (図 3A、P. 13)。SgrS14 は、183-187 塩基に変異を有する SgrS 変異体であり、これまでの解析から *ptsG* mRNA 抑制機能を失っていることが示されている (Maki *et al.*, 2010)。SgrS14R は、SgrS14 に導入した 183-187 塩基の変異と塩基対を形成するように、さらに 192-196 塩基に変異を導入した SgrS 変異体である (図 3A)。各々の変異 *sgrS* 遺伝子を pQE80L プラスミド上の IPTG 誘導プロモーターの制御下に置き、IPTG 存在下で、SgrS、*ptsG* mRNA および IICB^{Glc} (*ptsG* mRNA の翻訳産物) の発現をノーザンブロッティングあるいはウェスタンブロッティングにより解析した (図 3B)。その結果、野生株 (*hfq*⁺) において、野生型 SgrS が *ptsG* mRNA の発現を強く抑制した一方で、SgrS14 は *ptsG* mRNA の抑制機能が阻害された (図 3B、レーン 2、3)。また、ステムループ構造が再び形成されるよう SgrS14 にさらに変異を導入した SgrS14R は *ptsG* mRNA を抑制した (図 3B、レーン 4)。これらの結果は、内部ステムループ構造が SgrS の抑制機能に重要であることを示している。次に、野生株 (*hfq*⁺) と比較して、 Δhfq 株では野生型 SgrS 量が減少した (図 3B、レーン 2、6)。このことは、Hfq が SgrS

を安定化させることを示している。野生株 (*hfq*⁺) において、SgrS14 量は野生型 SgrS 量と比較してわずかに低下していた (図 3B、レーン 2、3)。また、SgrS14 量は野生株 (*hfq*⁺) と比較して Δhfq 株で低下していた (図 3B、レーン 3、7)。これらの結果は、183-196 塩基での内部ステムループ構造が、Hfq との結合に部分的に必要な可能性を示唆している。

SgrS14 は 183-187 塩基の変異に加えて最小の塩基対形成領域の上流部分にもいくつかの変異を有している (図 3A)。そこで、SgrS の機能における内部ステムループ構造の役割をさらに検証するために、183-187 塩基にのみ変異を導入した内部ステムループ構造の破壊変異体 (SgrS14a、SgrS14b) を構築した (図 4A、P. 14)。また、SgrS14a あるいは SgrS14b に導入した変異と相補的な配列を 192-196 塩基にさらに導入した変異体 (SgrS14aR、SgrS14bR) も構築した (図 4A)。各々の変異 *sgrS* 遺伝子を少コピー数のプラスミド上のアラビノース誘導プロモーターの制御下に置き、野生株 (*hfq*⁺) においてアラビノース存在下で SgrS 変異体の *ptsG* mRNA 抑制機能を解析した。その結果、SgrS14a および SgrS14b は *ptsG* mRNA 抑制機能を失っていた一方で、SgrS14aR および SgrS14bR は *ptsG* mRNA 抑制機能を保持していた (図 4B、レーン 3~6)。これらの結果は、図 3 の結果と同様に、183-196 塩基のステムループ構造が SgrS 機能に重要であることを示している。また、内部ステムループ構造の破壊変異体 (SgrS14a、SgrS14b) を多コピー数のプラスミド上から発現させた結果、SgrS14a および SgrS14b の発現量が上昇し、*ptsG* mRNA はわずかに抑制された (図 4B、レーン 7、8)。これらの結果は、183-196 塩基領域でステムループ構造が形成されない場合においても、SgrS はわずかに機能を保持することを示唆する。また、図 3 で示した SgrS14 が、多コピープラスミドから発現しているにもかかわらず、*ptsG* mRNA 抑制機能をほぼ失っていたことは、SgrS14 が塩基対形成領域上流にも複数の点変異を持つためであると考ええる。

○内部ステムループ構造直前の U-rich 配列は SgrS の機能に関与する

潜在的 Hfq 結合領域である UAUU (179-182 塩基)、および UAAAAU (187-192 塩基) が内部ステムループ構造付近に存在する (図 2A、B)。これらの配列が Hfq 依存的な SgrS の機能に関与するかを明らかにするために、これらの部位に変異を導入し、SgrS の *ptsG* mRNA 抑制機能に対する影響を検証した。まず、ステムループ構造内の UAAAAU を GAGCAC に置換した SgrS 変異体 (SgrS-LGC) を構築し (図 5A、P. 16)、解析した結果、SgrS-LGC は *ptsG* mRNA 抑制機能を保持していた (図 5B、レーン 3)。このことは、ループ領域の UAAAAU が SgrS の *ptsG* mRNA 抑制機能に関与しないことを示している。

次に、SgrS 機能における 179-182 塩基の UAUU の重要性の検証を行った。その際、179-181 塩基の UAU は最小の塩基対形成領域と重複しているので、UAUU を CCGC に置換した SgrS-CCGC とともに、182 塩基を U から C に置換した SgrS-182C を構築し (図 5A)、これらの *ptsG* mRNA 抑制機能を解析した。解析の結果、SgrS-CCGC は *ptsG* mRNA 抑制機能を欠失し、SgrS-182C の *ptsG* mRNA 抑制機能は大きく低下していた (図 5B、レーン 4、5)。このことは、UAUU が SgrS の機能に関与していることを示している。そこで、さらに詳細にこの領域の重要性を検証するために、UAUU の重要性を *ptsG* mRNA との塩基対形成と区別して解析することを目指し、UAUU の直前に UAU を挿入した SgrSi を構築した (図 6A、P. 17)。この SgrSi は、野生型 SgrS と同様に、168-181 塩基に *ptsG* mRNA との塩基対形成領域を持つ一方で、野生型 SgrS とは異なり 182-185 塩基に UAUU を持つため、内部ステムループ構造の直前に位置する UAUU の機能を *ptsG* mRNA との塩基対形成と区別して解析することが可能である。解析の結果、UAU の挿入は SgrS の発現および *ptsG* mRNA 抑制機能に影響しなかった (図 6B、レーン 3)。また、182-185 塩基の UAUU を CCGC、UUUU、AAAA に置換した一連の SgrSi 変異体を構築し (図 6A)、解析した結果、SgrSiUUUU は *ptsG* mRNA 抑制機能を保持していた一方で、SgrSiCCGC および SgrSiAAAA では *ptsG* mRNA 抑制機能は低下していた (図 6B、レーン 4~6)。これらの結果は、内部ステムループ構造直前の UAUU が、*ptsG* mRNA との塩基対形成以外の役割で、SgrS の *ptsG* mRNA 抑制機能に関与していることを示している。また、A-rich 配列ではなく U-rich 配列がステムループ構造の付近に存在するという性質が sRNA の機能に重要であることが強く示唆された。

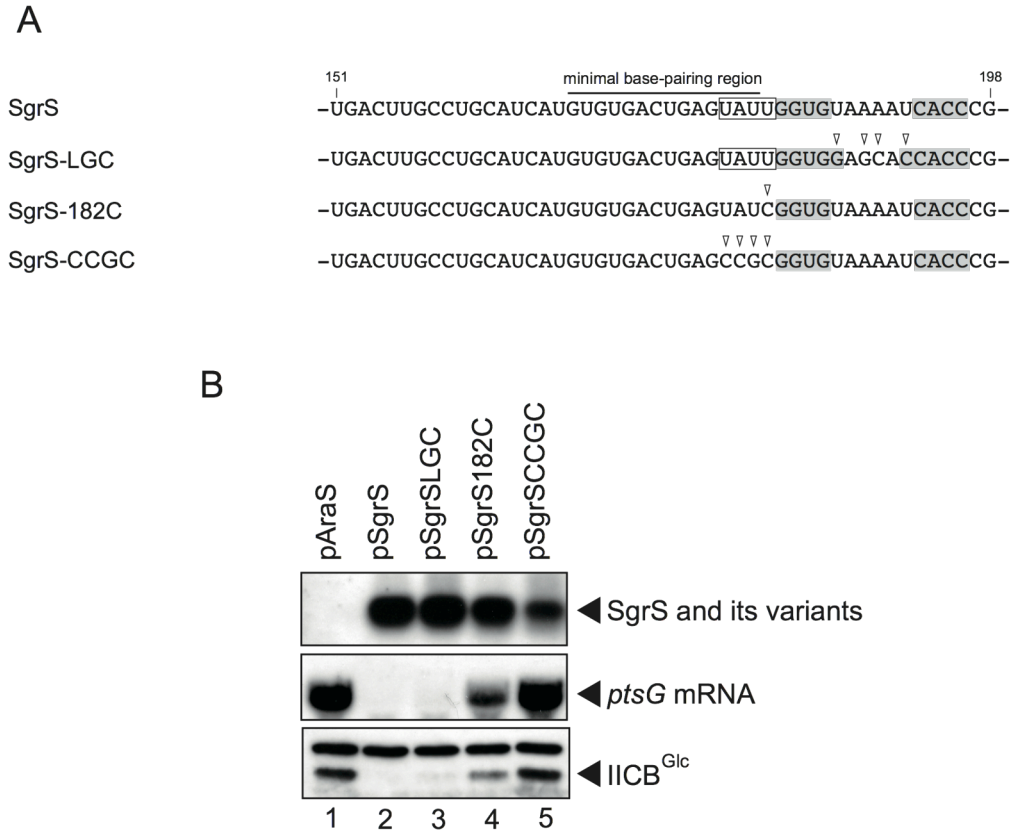
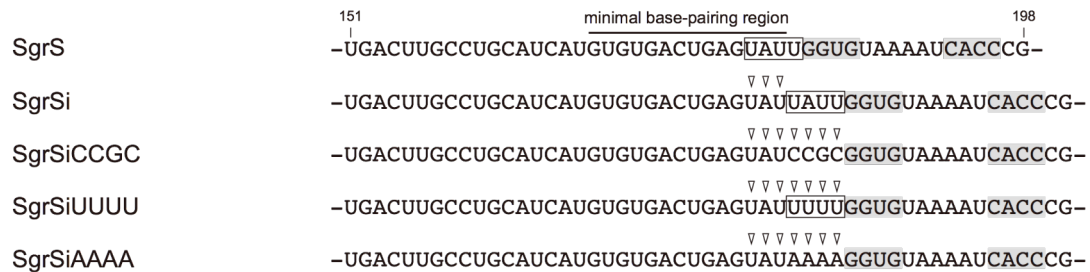


図 5 SgrS の *ptsG* mRNA 抑制機能に対する内在ステムループ構造付近の AU-rich 配列の変異の影響

A. SgrS 変異体の 151-198 塩基領域の塩基配列。野生型 SgrS の配列に変異を導入した塩基を矢頭 (▽) で示す。スパーサー領域における回文配列を網かけ文字で示す。内在ステムループ構造の直前の U-rich 配列を囲い文字で示す。

B. SgrS 変異体の *ptsG* mRNA 抑制機能の解析。図示したプラスミドを持つ野生株 (*hfq*+) を、アラビノース (終濃度 0.2%) を添加した LB 培地で $A_{600} = 0.6$ まで培養し、RNA 試料及びタンパク質試料を調製した。RNA 試料を SgrS プローブ 1 及び *ptsG* プローブを用いたノーザンブロッティングにより解析した。以下の量の RNA を解析に用いた。SgrS : 0.25 μ g、*ptsG* mRNA : 10 μ g。タンパク質試料 (0.04 A_{600} units) を抗 IIB^{Glc} 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。

A



B

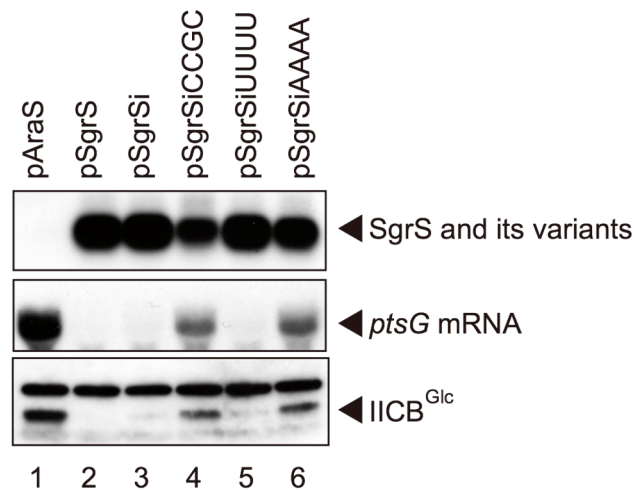


図 6 SgrS の *ptsG* mRNA 抑制機能に対する内在ステムループ構造の直前に存在する U-rich 配列の変異の影響

A. SgrS 変異体の 151-198 塩基領域の塩基配列。野生型 SgrS の配列に変異を導入した塩基を矢頭 (▽) で示す。スパーサー領域における回文配列を網かけ文字で示す。内在ステムループ構造の直前の U-rich 配列を囲い文字で示す。

B. SgrS 変異体の *ptsG* mRNA 抑制機能の解析。図示したプラスミドを持つ野生株 (*hfq*⁺) を、アラビノース (終濃度 0.2%) を添加した LB 培地で $A_{600} = 0.6$ まで培養し、RNA 試料及びタンパク質試料を調製した。RNA 試料を SgrS プローブ 1 及び *ptsG* プローブを用いた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。SgrS : 0.25 μ g、*ptsG* mRNA : 10 μ g。タンパク質試料 (0.04 A_{600} units) を抗 IIB^{Glc} 抗体を用いたウェスタンブロットングにより解析した。

○U-rich 配列が直前に存在する内部ステムループ構造は Hfq との結合に関与する

ここまでの一連の SgrS 変異体のノーザンブロットィング解析結果から、内部ステムループ構造とその直前に存在する U-rich 配列が SgrS の Hfq との結合に関与することが示唆された。そこで次に、SgrS 変異体と Hfq との結合を *in vivo* で解析する目的で、染色体遺伝子から Hfq-FLAG を発現する株において、抗 FLAG 抗体を用いて共沈実験を行った。細胞抽出液 (crude extract; CE) と anti-FLAG M2-agarose beads を反応させ、agarose beads に結合した画分 (bound; B) を、抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロットィングにより解析した。また、フェノール処理により各画分から RNA 試料を抽出し、SgrS プローブを用いたノーザンブロットィングにより解析した。その結果、野生型 SgrS が効果的に Hfq-FLAG と共沈降している一方で、短縮させたポリ U 配列をもつ SgrS-LS4U は共沈降しなかった (図 7、レーン 6、10、P. 19)。これらの結果は、これまでに本研究グループが報告した解析結果と一致する (Otaka *et al.*, 2011)。同条件下で、SgrS14b は Hfq-FLAG と共沈降しなかった (図 7、レーン 7)。その一方で、SgrS14bR は Hfq-FLAG と共沈降した (図 7、レーン 8)。これらの結果は、183-196 塩基において形成されるステムループ構造が SgrS の Hfq との結合に重要であることを示している。また、Hfq-FLAG と共沈降した SgrS-CCGC はわずかであった (図 7、レーン 9)。このことは、短縮させたポリ U 配列をもつ SgrS-LS4U と比較すると影響は弱い、SgrS-CCGC も Hfq との結合能が低下していること、すなわち UAUU (179-182 塩基) が Hfq との結合に関与することを示している。以上の結果は、UAUU (179-182 塩基)、ステムループ構造 (183-196 塩基) および 3'末端のポリ U 配列 (220-227 塩基) のすべて、すなわち 179-227 塩基領域が SgrS の機能的な Hfq 結合領域であることを強く示唆する。さらに、SgrS14b および SgrS-CCGC を過剰発現させた条件下で、Hfq-FLAG との結合を解析した結果、Hfq-FLAG と SgrS-CCGC との結合が弱く確認され、SgrS14b との結合がごくわずかに確認された (図 8、レーン 7、8、P. 20)。このことは、これらの SgrS 変異体が Hfq との結合能を完全には失っていないことを示している。これらの結果は、図 3-6 の SgrS 機能解析の結果を支持する。

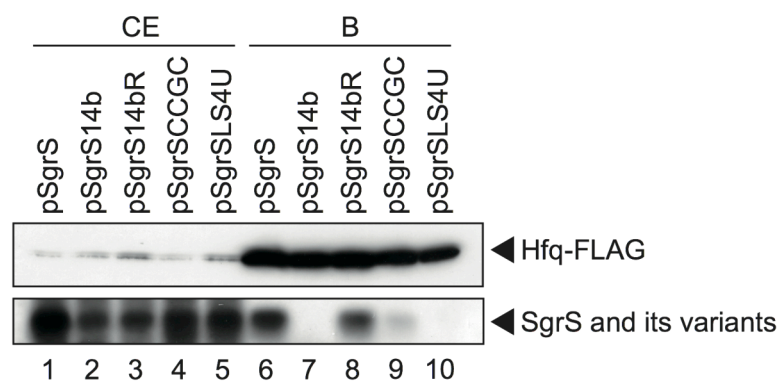


図7 Hfq 結合能に対するステムループ構造の破壊変異及び内在ステムループ構造の直前の U-rich 配列の変異の影響

図示したプラスミドを持つ TM771 株 ($\Delta sgrS$, *hfq-FLAG-cat*) から調製した粗抽出液を、抗 FLAG アガロースビーズを用いて免疫沈降した。粗抽出液 (CE)(5 μ l) 及び結合画分 (B)(5 μ l) 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 の解析は、粗抽出液 (3 μ l) 及び結合画分 (3 μ 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ティングにより解析した。

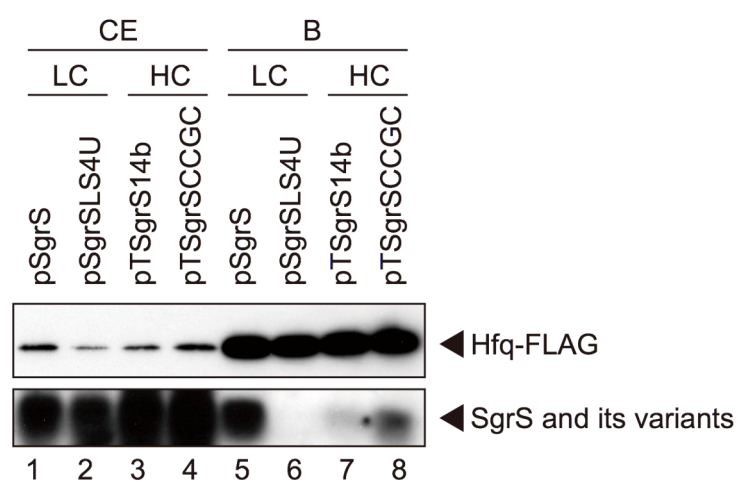


図8 多コピー数プラスミドから発現させた SgrS 変異体の Hfq 結合能の解析

図示したプラスミドを持つ TM771 株 (*hfq-FLAG-cat*, Δ *sgrS*) から調製した粗抽出液を、抗 FLAG アガロースビーズを用いて免疫沈降した。粗抽出液 (CE)(5 μ l) 及び結合画分 (B)(5 μ l) を、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタブロットティングにより解析した。RNA の解析は、粗抽出液 (3 μ l) 及び結合画分 (3 μ l) をフェノール処理し、SgrS プロブ 1 を用いたノーザンブロットティングにより解析した。

○*in vitro* での SgrS 変異体の Hfq 結合

ここまでの遺伝子変異解析および生化学的解析から、*in vivo* において、内部ステムループ構造 (183-196 塩基)、UAUU (179-182 塩基)、3'末端のポリ U 配列 (220-227 塩基) に変異を導入することで、SgrS の *ptsG* mRNA 抑制機能が阻害されること、また Hfq との結合が阻害されることが示された。そこで次に、SgrS と Hfq との結合をより詳細に解析することを目的として、*in vitro* において SgrS 変異体と Hfq との結合をゲルシフト実験により解析した。まず、一定量の ^{32}P 標識した野生型 SgrS (^{32}P -SgrS) を、濃度を段階的に増加させた Hfq-His₆ と混合し反応させた後に、非変性ゲル電気泳動により複合体の形成を解析した。その結果、40 nM の ^{32}P -SgrS と 20 nM の Hfq-His₆ を反応させた時、 ^{32}P -SgrS 単独に相当するバンドに加えて、 ^{32}P -SgrS/Hfq-His₆ 複合体 (complex I) が観察された (図 9、レーン 2、P. 23)。また、40 nM の SgrS と 40nM Hfq-His₆ を反応させた時、complex I のバンドのみが検出された (図 9、レーン 3)。さらに、反応させる Hfq-His₆ の量を増加させた条件下では、complex I に加えて、泳動度の遅い複合体の形成が観察された (図 9、レーン 4~7)。 ^{32}P -SgrS:Hfq-His₆ の比率が 2:1 の時、 ^{32}P -SgrS 単独および complex I に相当するバンド以外にバンドが検出されなかったこと、また Hfq-His₆ を過剰量加えた際に、 ^{32}P -SgrS/Hfq-His₆ の多量体のバンドが複数検出されたことから、complex I が最小の複合体であることが強く示唆された。また、混合した濃度比から、SgrS/Hfq₆ は 1:1 で結合している可能性が示唆された。

次に、非標識の SgrS、あるいは SgrS 変異体を用いて、 ^{32}P -SgrS の Hfq-His₆ との結合 (complex I の形成) に対する競合実験を行った。40 nM の ^{32}P -SgrS と 80 nM の Hfq-His₆ とを反応させた時、complex I が検出された (図 10、レーン 2、P. 24)。同条件下で、図に示す非標識の RNA を同時に加え、complex I の形成阻害を観察した。200 nM、400 nM の非標識 SgrS を反応液に添加した際に、complex I の形成阻害が観察された (図 10、レーン 3、4)。このことは、 ^{32}P -SgrS と非標識 SgrS が競合的に Hfq と結合していることを示している。一方で、ターミネーターのポリ U 配列を短縮した変異体である SgrS-4U は、complex I の形成に影響しなかった (図 10、レーン 5、6)。このことは、SgrS-4U の Hfq 結合能が大きく低下していることを示している。この結果は、SgrS-4U および SgrS-LS4U が *in vivo* で Hfq との結合能を失っていた結果と一致する (図 7、8; Otaka *et al.*, 2011)。他の変異体に関しても、同様の競合実験を行なった。

SgrS14b、および SgrS-CCGC は、野生型 SgrS に比べると影響は弱い、complex I の形成を部分的に阻害した (図 10、レーン 7、8、11、12)。また、complex I の形成阻害は、SgrS-CCGC に比べて SgrS14b の方が弱かった。これらの結果は、これら 2 つの変異体で変異を導入した領域が Hfq との結合に関与していることを示している。また、UAUU (179-182 塩基) よりも内部ステムループ構造 (183-196 塩基) の方が Hfq との結合に重要であることを示している。さらに、SgrS14bR は complex I の形成を効果的に阻害した (図 10、レーン 9、10)。このことは、SgrS14bR の Hfq 結合能が野生型 SgrS とほぼ同等であることを示している。これらの結果より、野生型 SgrS、および SgrS 変異体の相対的な Hfq 結合能が、SgrS = SgrS14bR > SgrSCCGC > SgrS14b > SgrS4U の順序で低下することが示唆された。すなわち、i) UAUU (179-182 塩基)、ii) 内部ステムループ構造 (183-196 塩基)、および iii) ターミネーターのポリ U 配列 (220-227 塩基) は、iii) > ii) > i) の順で Hfq との結合に重要であることを示している。*in vitro* での結合実験の結果から導かれたこれらの結合力の順序は、図 7、8 で示した *in vivo* での Hfq 結合実験の結果、および図 3-6 で示した SgrS の機能解析の結果と矛盾しない。したがって、これらの結果は、SgrS 変異体の *ptsG* mRNA 抑制機能と Hfq 結合能が相関関係にあることを強く示唆している。すなわち、導入した変異は、SgrS の Hfq との機能的結合に影響を及ぼすものであり、その結果、SgrS の *ptsG* mRNA 抑制機能が阻害されたと考えられる。また、それぞれの変異 SgrS の添加により、³²P-SgrS/Hfq 結合と競合させた際に、³²P-SgrS 単独のバンド、および complex I に相当するバンドのみが検出されたことから、i)-iii) の 3 ヶ所それぞれで、SgrS が複数の Hfq と独立に結合している可能性は低いと考えられる。すなわち、SgrS の 183-227 領域が 1 つの Hfq 機能単位と結合することを強く示唆している。

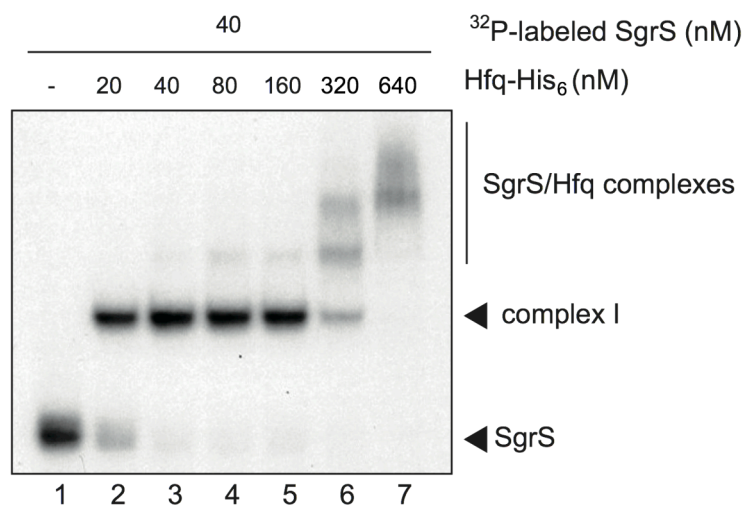


図9 *in vitro* での SgrS の Hfq 結合能の解析

図示した各々の量の精製した Hfq-His₆と³²P-SgrS(40nM) を混合し、binding buffer(5 μl) 中で、37℃で15 分間反応させた。反応後、4% 非変性ポリアクリルアミドゲルを用いたゲルシフト実験により、SgrS/Hfq 間の結合を解析した。

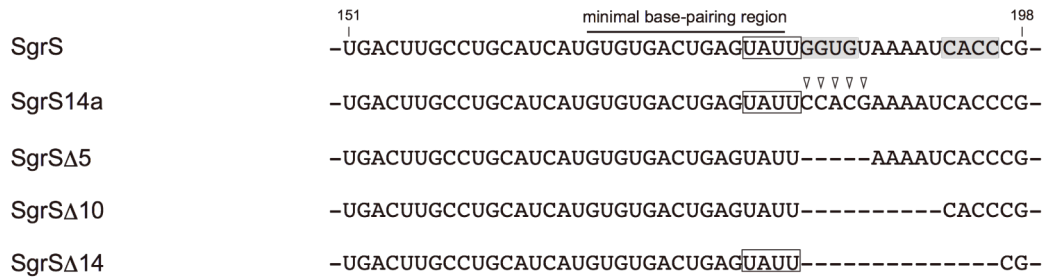
○ターミネーターのステムループ構造の直前に U-rich 配列をもつ SgrS 変異体は機能的である

ここまでの結果から、ステムループ構造の直前に U-rich な配列が存在することが、Hfq との機能的な結合に必要であることが示された。このことから、内部ステムループ構造を破壊した SgrS 変異体においても、ターミネーターのステムループ構造の直前に U-rich 配列が位置するよう変異を導入すれば、Hfq と機能的な結合ができる可能性が考えられる。この可能性を検証する目的で、SgrS14a の 193-196 塩基領域を UUUU に置換した SgrS14aUUUU を構築し(図 11A、P. 27)、*ptsG* mRNA 抑制機能を解析した。その結果、SgrS14aUUUU は Hfq 依存的に *ptsG* mRNA を抑制した(図 11B、レーン 3、6)。一方で、SgrS14a の 193-196 塩基領域を AAAA あるいは CCCC に置換した SgrS 変異体(図 11A)では、*ptsG* mRNA の抑制機能が阻害された(図 11B、レーン 4、5)。これらの結果は、内部ステムループ構造の代わりにターミネーターのステムループ構造の直前に U-rich 配列を配置した場合においても、SgrS が Hfq 依存的に機能することを示す。野生株 (*hfq*⁺) において、SgrS14aUUUU 量が SgrS14a 量と比較して増加した(図 11B、レーン 2、3)。また、 Δhfq 株において、SgrS14aUUUU 量が野生株 (*hfq*⁺) と比較して減少した(図 11B、レーン 3、6)。このことは、SgrS14aUUUU が Hfq と結合することを強く示唆している。これらの結果から、U-rich 配列+ステムループ構造が sRNA と Hfq との結合に重要な一般的特徴である可能性が示唆された。

次に、sRNA/Hfq の機能的結合における U-rich 配列+ステムループ構造の重要性をさらに検証する目的で、SgrS の 183-196 塩基を欠失した場合、UAUU (179-182 塩基) がターミネーターステムの直前に位置するようになることに着目した。そこで、SgrS183-196 領域を段階的に欠失させた SgrS 変異体 (SgrS Δ 5、SgrS Δ 10、SgrS Δ 14) を構築し(図 12A、P. 28)、*ptsG* mRNA の抑制機能に対する影響を解析した。その結果、野生株 (*hfq*⁺) において、SgrS Δ 14 は *ptsG* mRNA を抑制した一方で、 Δhfq 株では抑制しなかった(図 12B、レーン 6、7)。このことは、UAUU が直前に存在するターミネーターのステムループ構造が Hfq 結合領域として機能するのに十分であることを示している。また、SgrS Δ 10 (Δ 183-192塩基)、SgrS Δ 5 (Δ 183-187塩基) は、*ptsG* mRNA を抑制しなかった(図 12B、レーン 4、5)。これらの SgrS 変異体は、UAUU がターミネーターステムからそれぞれ 5 あるいは 10 塩基離れている。これらの結果は、

U-rich 配列が Hfq 結合のシグナルとして機能するためには、ステムループ構造の直前、少なくとも 4 塩基以内に存在しなければならないことを示している。

A



B

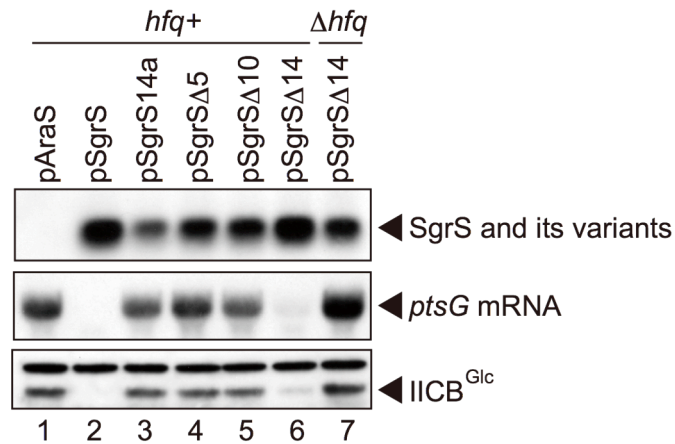


図 12 SgrS の *ptsG* mRNA 抑制機能に対するスペーサー領域の欠失変異の影響

A. SgrS 変異体の 151-198 塩基領域の塩基配列。野生型 SgrS の配列に変異を導入した塩基を矢頭 (▽) で示す。スペーサー領域における回文配列を網かけ文字で示す。ターミネーター及び内在ステムループ構造の直前の U-rich 配列を囲い文字で示す。

B. SgrS 変異体の *ptsG* mRNA 抑制機能の解析。図示したプラスミドを持つ野生株 (*hfq*+) 及び TM589 株 (*Δhfq*) を、アラビノース (終濃度 0.2%) を添加した LB 培地で $A_{600} = 0.6$ まで培養し、RNA 試料及びタンパク質試料を調製した。RNA 試料を SgrS プローブ 1 及び *ptsG* プローブを用いたノーザンブロッティングにより解析した。以下の量の RNA を解析に用いた。SgrS : 0.25 μ g、*ptsG* mRNA : 10 μ g。タンパク質試料 (0.04 A_{600} units) を抗 IIB^{Glc} 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。

○SgrS の機能に対する Hfq 結合領域と塩基対形成領域の間の距離の影響

図 11 で示した SgrS14aUUUU が *ptsG* mRNA を抑制した結果は、*ptsG* mRNA 抑制機能を失うことなく、塩基対形成領域と Hfq 結合領域の間の一次配列上の距離を少なくとも 10 塩基離すことが可能であることを示している。そこで次に、sRNA の機能構造の理解を目的として、塩基対形成領域と Hfq 結合領域の関係性、特に位置関係に着目し、塩基対形成領域と Hfq 結合領域の間の一次配列上の距離を段階的に増加させることによる影響を解析した。解析には、SgrS の 178 塩基と 179 塩基の間に 5 から 40 塩基までの異なる長さのスペーサー配列を挿入した SgrS 変異体を用いた (図 13A、P. 31)。スペーサー配列には、*gfp* mRNA の配列から、それ自体では強固な二次構造を形成しないと予測された領域の配列を選択した。また、構築したスペーサー変異体が目的としない二次構造を形成する可能性を減少させる目的で、SgrS 機能を有する最小の SgrS-S (168-227 塩基領域) をもとにして、スペーサー配列を挿入した SgrS 変異体を構築した。解析の結果、10 塩基までのスペーサー配列を挿入しても、SgrS の *ptsG* mRNA 抑制機能に影響しないことが示された (図 13B、レーン 2~4)。すなわち、Hfq 結合領域が塩基対形成領域から一次配列上 10 塩基以内 (下流) に存在している時には、sRNA は効果的に機能できることを示唆している。また、スペーサー配列の長さをさらに増加させた SgrS 変異体 (SgrS-S+15、SgrS-S+20) は *ptsG* mRNA 抑制機能が減少し、40 塩基のスペーサー配列を挿入した SgrS-S+40 は、*ptsG* mRNA 抑制機能が著しく低下した (図 13B、レーン 5~7)。

SgrS-S+40 をはじめとして、スペーサー配列が *ptsG* mRNA 抑制機能に影響を及ぼした原因には、2 領域間の一次配列上の距離が離れたことで抑制機能を失った可能性、および挿入したスペーサー配列が塩基対形成領域あるいは Hfq 結合領域と塩基対を形成し、それぞれの領域の機能を阻害した可能性が考えられる。そこで、これらの可能性を検証する目的で、まず SgrS-S+20、および SgrS-S+40 と Hfq との結合を、*in vivo* 共沈実験により解析した。解析の結果、SgrS-S+40 および SgrS-S+20 が Hfq-FLAG と共沈降した (図 14、P. 32)。この結果は、40 塩基の挿入により SgrS の Hfq 結合能は損なわれていないことを示している。次に、Mfold プログラム (Zuker, 2003) による RNA 二次構造予測を行った結果、SgrS-S+10、SgrS-S+15、SgrS-S+20、SgrS-S+40 において、スペーサー配列と塩基対形成領域が塩基対を形成することを確認した (図

15、P. 33)。しかしながら、SgrS-S+10、および SgrS-S+15 が効果的な *ptsG* mRNA 抑制機能を保持していたことから、予測されたスパーサー配列と塩基対形成領域との塩基対は、塩基対形成領域の機能に影響を与えない可能性が高いと考えられる。また、RNA 二次構造予測の結果、全てのスパーサー配列が Hfq 結合領域の二次構造に影響を与えないことを確認した。これらの結果から、塩基対形成領域と Hfq 結合領域の間の一次配列上の距離は、sRNA 機能に重要な意義を持つと結論づけた。すなわち、sRNA が効果的な標的 mRNA 抑制機能を発揮するためには、塩基対形成領域が Hfq 結合領域の上流に近接する必要があることが示された。

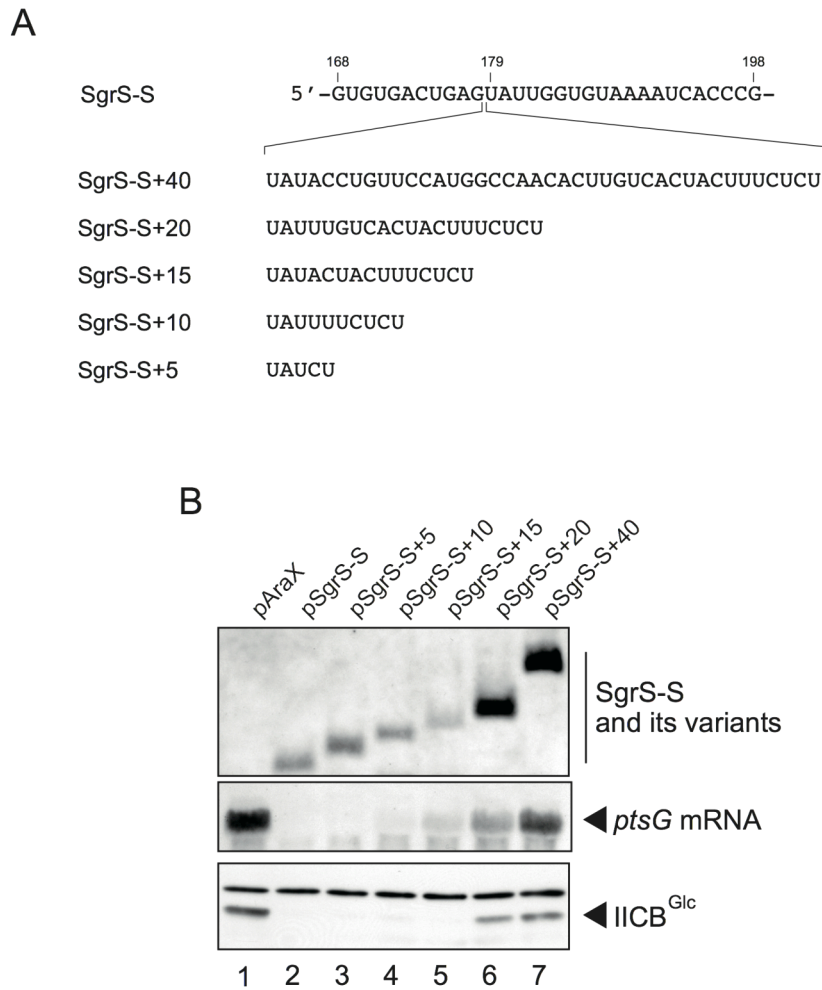


図 13 SgrS の *ptsG* mRNA 抑制機能に対する塩基対形成領域と Hfq 結合モジュール間のスペーサー配列の増加の影響

A. 挿入したスペーサーの塩基配列と挿入した位置。スペーサー配列には、*gfp* mRNA の配列から、それ自体では二次構造を形成しないと予測された領域の配列を選択した。

B. スペーサー変異体の *ptsG* mRNA 抑制機能の解析。図示したプラスミドを持つ野生株 (*hfq*+) を、アラビノース（終濃度 0.2%）を添加した LB 培地で $A_{600} = 0.6$ まで培養し、RNA 試料及びタンパク質試料を調製した。RNA 試料を 8M urea 10% ポリアクリルアミドゲルで分離し、SgrS プローブ 2 及び *ptsG* プローブを用いたノーザンブロッティングにより解析した。以下の量の RNA を解析に用いた。SgrS : 15 μ g、*ptsG* mRNA : 15 μ g。タンパク質試料 (0.04 A_{600} units) を抗 IICB^{Glc} 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。

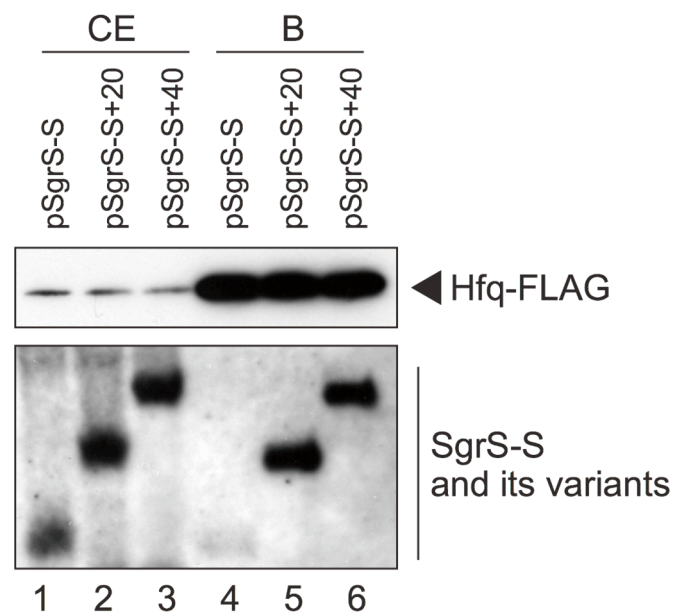


図 14 SgrS の Hfq 結合能に対する塩基対形成領域と Hfq 結合モジュール間のスペーサー配列の増加の影響

図示したプラスミドを持つ TM771 株 ($\Delta sgrS$, *hfq-FLAG-cat*) から調製した粗抽出液を、抗 FLAG アガロースビーズを用いて免疫沈降した。粗抽出液 (CE)(5 μ l) 及び結合画分 (B)(5 μ l) 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。RNA の解析は、粗抽出液 (200 μ l) 及び結合画分 (20 μ l) をフェノール処理し、8M urea 10% ポリアクリルアミドゲルで分離し、SgrS プロブ 2 を用いたノーザンブロットティングにより解析した。

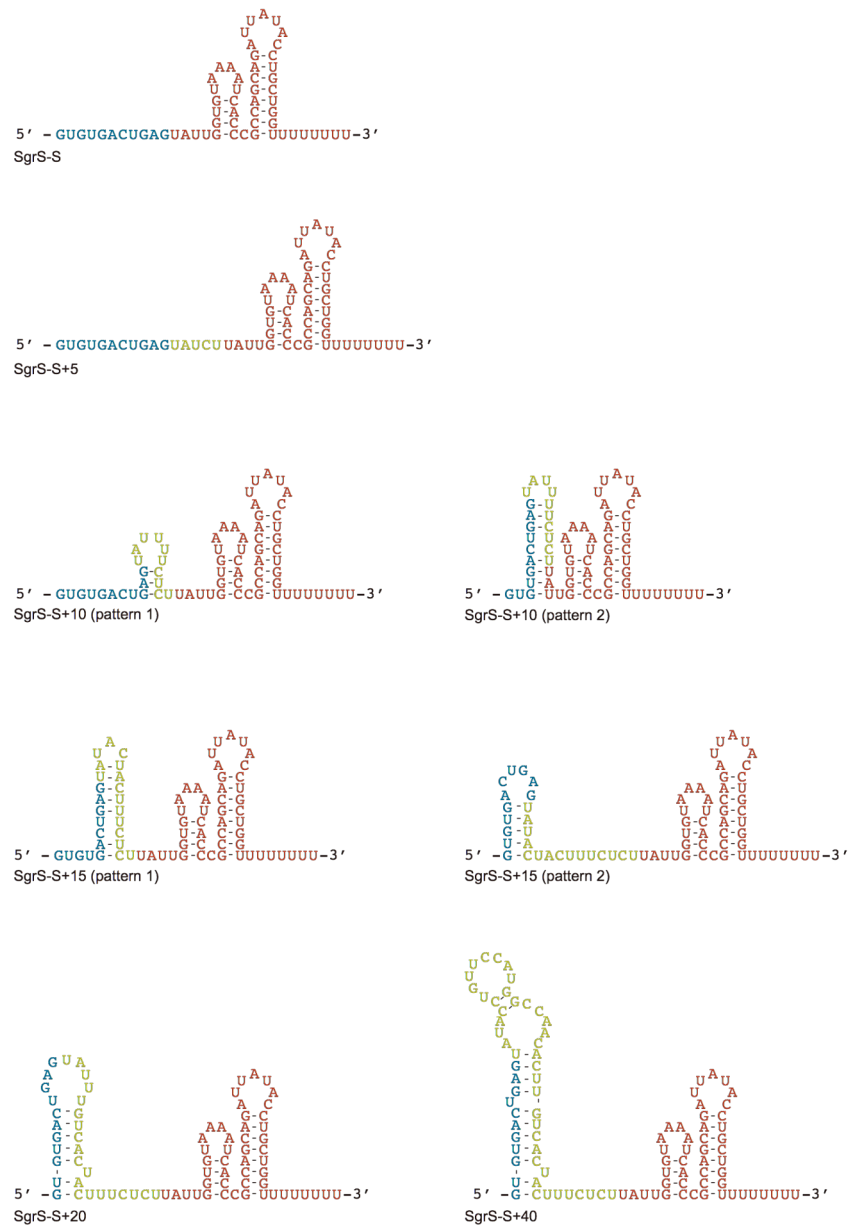


図 15 SgrS-S 及びスペーサー変異体の予測される二次構造

最小の塩基対形成領域を青色で示す。挿入したスペーサー配列を黄緑色で示す。Hfq 結合モジュールを赤色で示す。SgrS-S+10 及び SgrS-S+15 に関しては予測される 2 つのパターンを示す。

○人工的 Hfq 結合 sRNA のデザイン

図 13 の結果から、標的 mRNA 抑制機能を失うことなく、塩基対形成領域と Hfq 結合領域を 10 塩基の範囲内で離すことが可能であることを示した。このことは、一定の範囲内に存在すれば、2 つの領域は独立に機能できることを示している。また、牧らは、SgrS において、効果的な *ptsG* mRNA 抑制機能に必要な塩基対形成領域が 168-181 塩基領域の 14 塩基で十分であることを示した (Maki *et al.*, 2010)。これらのことから、任意の mRNA の翻訳開始領域と相補的な 14 塩基以上の配列を Hfq 結合領域に連結させた場合、このキメラ RNA は任意の標的 mRNA を効果的に抑制できることが予想される。この仮説を検証するために、SgrS の Hfq 結合領域のすぐ上流に *sodB* mRNA、*ompA* mRNA、*ompF* mRNA の翻訳開始領域と相補的な配列 (20 塩基) を有する人工的な sRNA の発現系プラスミドを構築し (図 16A、P. 35)、これらの人工 sRNA の発現、および標的 mRNA 抑制機能を解析した。その結果、野生株 (*hfq*⁺) において、全ての人工 sRNA が安定的に発現し、それぞれの標的 mRNA の発現を効果的に抑制した一方で、 Δhfq 株では抑制しなかった (図 16B)。また、 Δhfq 株において、人工 sRNA 量が野生株と比較して減少していた (図 16B)。これらの結果は、構築したすべての人工 sRNA が Hfq 依存的に、対応する標的 mRNA を抑制することを示している。この結果は、任意の mRNA の翻訳開始領域と相補的な配列を Hfq 結合領域に連結させる手法により、任意の mRNA を抑制する Hfq 依存性の人工 sRNA のデザインが可能であることを示している。

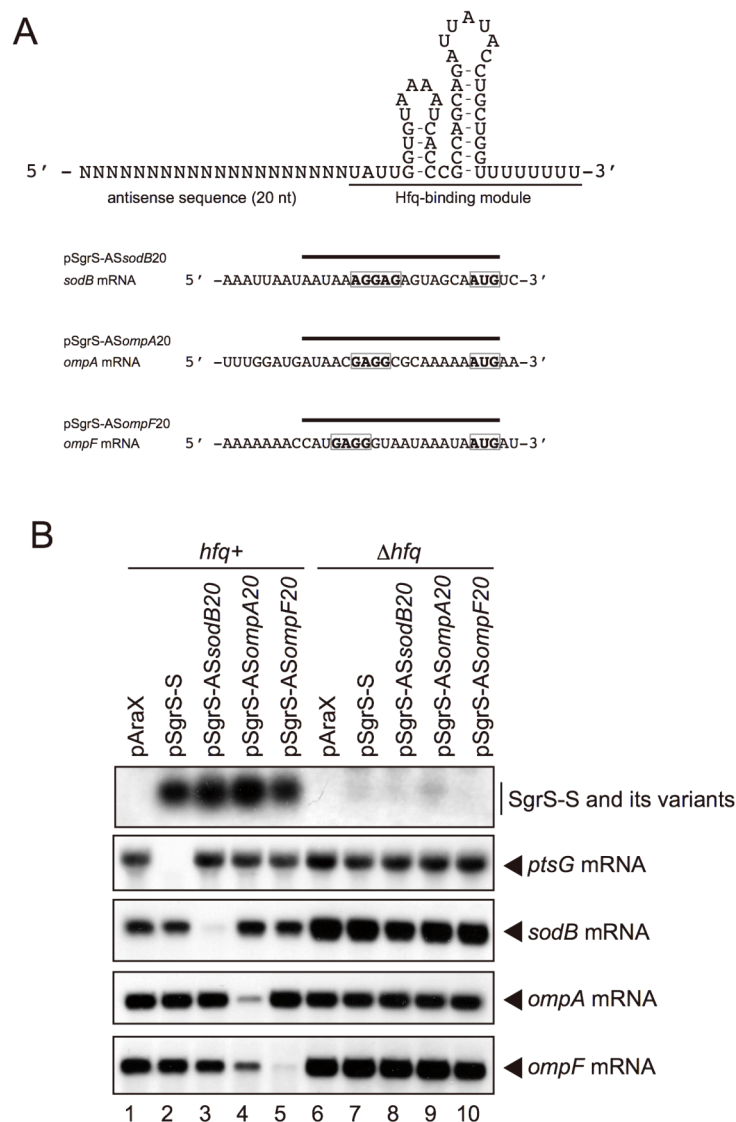


図 16 人工的 Hfq 結合型 sRNA による標的 mRNA の抑制機能の解析

A. 解析に用いた人工的 Hfq 結合型 sRNA を示す。SgrS の Hfq 結合モジュールと連結させた、標的 mRNA の翻訳開始領域の相補配列 (20 塩基) を「N」で示す。下段に、*sodB* mRNA、*ompA* mRNA、*ompF* mRNA の翻訳開始領域の配列を示す。この配列の上線は使用した相補配列の領域を示す。SD 配列及び開始コドン を囲い文字で示す。

B. 人工的 sRNA の発現及び抑制機能の解析。図示したプラスミドを持つ野生株 (*hfq*+) 及び TM589 株 (Δhfq) を、アラビノース (終濃度 0.2%) を添加した LB 培地で $A_{600} = 0.6$ まで培養し、RNA 試料を調製した。RNA 試料を SgrS プローブ 2、*ptsG* プローブ、*sodB* プローブ、*ompA* プローブ、*ompF* プローブ を用いた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。

SgrS : 5 μ g、*ptsG* mRNA : 10 μ g、*sodB* mRNA : 5 μ g、*ompA* mRNA : 1 μ g、*ompF* mRNA : 1 μ g。

考察

RNA シャペロン活性を持つ Hfq は、sRNA の機能に必須である。sRNA 作用機構における Hfq の第一義的な役割は、sRNA/標的 mRNA 間の塩基対形成を促進させることである。これまでに Hfq による sRNA/標的 mRNA の塩基対形成促進の分子メカニズムとして 2 つのモデルが提案されている (Storz *et al.*, 2004; Valentin-Hansen *et al.*, 2004)。第一として、Hfq が RNA シャペロン活性により、sRNA および標的 mRNA の二次構造を再編し、それぞれの RNA を塩基対形成に適した RNA 構造に変化させることで、sRNA/標的 mRNA の塩基対形成を促進するというモデルである。第二のメカニズムは、Hfq が sRNA と標的 mRNA の両方に結合し、その結果として sRNA、および標的 mRNA の局所濃度を増加させ、塩基対形成を促進するというモデルである。これらの 2 つのモデルは相互に排他的ではない。最近、Hfq が sRNA および mRNA の構造を再編することが、sRNA/標的 mRNA の塩基対形成促進に重要であることがいくつかの sRNA 解析で示されている。その 1 つとして、Soper らは、Hfq が *rpoS* mRNA のリーダー領域内の二次構造を再編することで、*rpoS* mRNA の塩基対形成領域が開放され、DsrA sRNA/*rpoS* mRNA 間の塩基対形成が可能になることを示した (Soper and Woodson, 2008)。また、牧らは、*in vitro*において、全長の SgrS は Hfq 非存在下では *ptsG* mRNA の翻訳を阻害しない一方で、SgrS の最小の塩基対形成領域に対応する 14 塩基の RNA オリゴヌクレオチドは Hfq 非存在下においても *ptsG* mRNA の翻訳を阻害することを示した (Maki *et al.*, 2010)。さらに Hao らは、塩基対形成領域以外の部分を大きく欠失した RyhB 変異体が、*in vivo*において Hfq 非存在下で *sodB* mRNA を効果的に抑制することを示した (Hao *et al.*, 2011)。これらの結果はすべて、Hfq の作用により sRNA および mRNA の構造が塩基対形成しやすいよう再編されることが、標的 mRNA の翻訳調節を引き起こすのに重要であることを強く示唆している。

上述した一連の研究を含め、活発に研究が展開されていることから分かるように、Hfq による sRNA/mRNA 間の塩基対形成促進メカニズムを詳細に解明することは、未解決、かつ重要な研究課題である。そこで、本研究グループでは、Hfq による sRNA/mRNA 間の塩基対形成促進機構の全容解明に取り組み、最近大鷹らは、その成果の 1 つとして、sRNA の Rho 非依存性ターミネーターの長いポリ U 配列が機能的な Hfq 結合、および標的 mRNA 抑制機能に必須であることを明らかにした (Otaka *et al.*, 2011)。本研究では、さらに

sRNA/Hfq の機能的結合様式を明らかにする目的で種々の解析を行い、Hfq との機能的結合における sRNA 内部の U-rich 配列、およびステムループ構造の重要性を明らかにした。これらの解析結果は、Hfq による sRNA/mRNA 間の塩基対形成促進機構の全容の解明につながる重要な成果であると考えられる。

本研究では、SgrS をモデル sRNA として、Hfq との機能的結合領域の解析を行った。種々の SgrS 変異体に関する機能解析の結果、U-rich 配列が直前に存在する内部ステムループ構造が、SgrS の *ptsG* mRNA 抑制機能に必要なことを示した (図 3~6)。また、*in vivo* および *in vitro* での結合実験により、この U-rich 配列が直前に存在する内部ステムループ構造が SgrS の Hfq との結合に必要なことを示した (図 7~10)。さらに、塩基対形成領域が Hfq 結合領域の上流の一定範囲内に存在すれば、sRNA が標的 mRNA 抑制機能を果たすこと、また Hfq 結合領域の上流に任意に選択した mRNA との相補配列を配置すると、Hfq 依存的に選択した mRNA を抑制できることを示した (図 11~16)。これらのことから、SgrS のターミネーターのポリ U 配列、および U-rich 配列が直前に存在する内部ステムループ構造を合わせた領域が、Hfq との機能的結合に十分であること、すなわち、前後にポリ U 配列を持つ二重のステムループ構造が機能的な Hfq 結合モジュールの 1 つの型であることを提案する。

実際に、機能解析が比較的進んでいる Hfq 依存性 sRNA の中で、DsrA、Spot42 を含むいくつかはこれらの特徴を共有している (表 1、P. 42)。また、U-rich 配列がターミネーターのステムループ構造の直前に存在した場合には、SgrS の内部ステムループ構造が Hfq の作用に必要なことを示した (図 11、12)。このことは、U-rich 配列が直前に存在し、長いポリ U 配列が続くターミネーターのステムループ構造が、機能的な Hfq 結合モジュールの最もシンプルな型である可能性を示している。実際に、RyhB、OxyS を含むいくつかの sRNA は Rho 非依存性ターミネーターの直前に U-rich 配列を有している (表 1)。現在 Hfq 依存的に標的 mRNA を調節することが明らかになっている sRNA の大半は、上述のどちらかの特徴を持っていることから、U-rich 配列が直前に存在し、且つ 3'末端の長いポリ U 配列が続く二重あるいは単一のステムループ構造で構成される RNA 領域が、sRNA の一般的な Hfq 機能的モジュールであると結論する。その一方で、MicC や OmrA を含む一部の sRNA は、ターミネーターあるいは内部ステムループ構造の直前の U-rich 配列を欠いているように見える (表 1)。これらの場合において、長いポリ U 配列をもつターミネーターに加

えて、効果的な Hfq 結合に何か他の要素が必要であることを検証することは、興味深い課題である。

Rho 非依存性ターミネーターは、Hfq 結合モジュールに完全に含まれている。このことから、Hfq 結合モジュールと Rho 非依存性ターミネーターを切り離すことはできない。その一方で、本研究の解析結果より、塩基対形成領域は Hfq 結合モジュールから切り離すことが可能であることを示した。SgrS の塩基対形成領域と Hfq 結合モジュールの間の距離を増加させることで段階的に *ptsG* mRNA 抑制機能が減少したが、塩基対形成領域を機能的 Hfq 結合モジュールから、少なくとも一次配列上 10 塩基長の距離で切り離しても、効果的な *ptsG* mRNA 抑制機能を保持できることを示した (図 13)。この結果より、Hfq 依存性 sRNA の機能構造として、少なくとも 1 つの塩基対形成領域と Rho 非依存性ターミネーターを含む Hfq 結合モジュールが近接するという特徴を明らかにした。実際に、この見解に基づいて、任意の mRNA を抑制する人工 sRNA をデザインすることに成功した (図 16)。

Hfq6 量体構造に、少なくとも 2 ヶ所の RNA 結合領域があることが、X 線結晶構造解析から示されている (Schumacher *et al.*, 2002; Link *et al.*, 2009)。最近、Hfq の proximal side にある RNA 結合部位が U-rich な RNA の 3'末端と優位に結合することが示された (Sauer & Weichenrieder, 2011)。このことから、proximal side にある RNA 結合部位を介して、Hfq は sRNA のターミネーターのポリ U 配列と結合している可能性が高い。本研究は、ターミネーターのポリ U 配列に加えて、U-rich 配列が直前に存在する内部ステムループ構造も、SgrS の Hfq との機能的結合に必要であることを示した。ターミネーターのポリ U 配列、および内部ステムループ構造の直前に存在する U-rich 配列に、単一の Hfq 6 量体が同時に結合するのか、あるいは、この 2 つの部位を異なる複数の Hfq 6 量体が認識するのかは、興味深い疑問である。Hfq が SgrS と安定な 1:1 の複合体を形成するという観察 (図 9)、および *in vitro* 競合実験において、競合した条件下ではすべて単独の SgrS のバンドとして検出されたこと (図 10) は、単一の Hfq 6 量体がターミネーターのポリ U 配列、および内部ステムループ構造の直前にある U-rich 配列と同時に結合するという前者の見解を支持する。この場合、Hfq の proximal side がターミネーターのポリ U 配列と結合する一方で、内部ステムループ構造の直前に存在する U-rich 配列が同一の Hfq 分子の distal side 含む他の部分と結合する可能性が考えられる。最近、Wang

らは、X 線結晶構造解析を含むいくつかの解析から、U-rich の RNA オリゴヌクレオチドが Hfq6 量体の proximal side の RNA 結合部位だけでなく distal side の RNA 結合部位、およびその周縁とも相互作用することを示した (Wang *et al.*, 2011)。また Sauer らは、RybB sRNA の内部 Hfq 結合領域に相当する 3' 末端にポリ U 配列を持つ 16 塩基の RNA オリゴヌクレオチド(R16)を用いて、興味深い解析を行った。彼らは、*in vitro*において、野生型 RybB sRNA/Hfq を結合させた状態で R16 を混合させても、R16 は Hfq と結合しなかった一方で、3'末端の U の OH 基に修飾を加えた RybB sRNA (RybB-cP) と Hfq とを結合させた状態においては、R16 は Hfq と結合できることを示した。また、同条件下で、Hfq/RybB-cP/R16 の三者複合体が一部検出された。これらの結果は、sRNA の 3'末端のポリ U 配列が優先的に Hfq と結合することを示した重要な結果であるのと同時に、sRNA のターミネーターのポリ U 配列が Hfq の proximal side に結合する際に、同時に sRNA の内部 Hfq 結合領域が Hfq のその他の領域と結合する可能性を示唆するという点で、興味深い結果である (Sauer & Weichenrieder, 2011)。これらの結果は、sRNA のターミネーターのポリ U 配列が Hfq6 量体の proximal side の RNA 結合部位で結合する一方で、sRNA の内部ステムループ構造の直前に存在する U-rich 配列が、同一の Hfq6 量体の distal side の RNA 結合部位などの他の部位と結合するという考えを支持する。本研究で明らかにした Hfq 結合モジュール (49 塩基) に相当する RNA を用いて、RNA フットプリント実験、および X 線結晶構造解析を行うことにより、詳細な Hfq/sRNA 結合様式が解明できると考える。

これまでの解析より、ターミネーターのポリ U 配列を 6 塩基に短鎖化した SgrS 変異体は *ptsG* mRNA 抑制機能が大きく低下し、4 塩基に短鎖化した SgrS 変異体はほぼ機能を欠損することが示された (Otaka *et al.*, 2011)。これらの結果は、SgrS の Hfq との機能的結合には 8 塩基の U 塩基が必要であることを示している。その一方で、本研究で明らかにした内部ステムループの直前に位置するポリ U 配列は、4 塩基の U 配列で *ptsG* mRNA 抑制機能を果たした (図 5、6、11、12)。これらの結果は、ターミネーターのポリ U 配列と内部ポリ U 配列のそれぞれの性質が異なる可能性を示す。すなわち、この可能性は、上述したそれぞれのポリ U 配列が Hfq6 量体の異なる RNA 結合部位で結合するという考えを支持する。また、ターミネーターのステムループ構造の直前に 4 塩基のポリ U 配列、あるいは UAUU 配列を配置することで、内部ステムルー

プを欠失させても SgrS が *ptsG* mRNA 抑制機能を果たすことを示した一方で、ターミネーターのステムループの直前に UAUU 配列を配置した SgrS 変異体 (SgrS Δ 14) は、野生型 SgrS に比べるとわずかに *ptsG* mRNA 抑制機能は弱かった (図 12)。この結果は、最も効率良く標的 mRNA を抑制する sRNA は、2 つのステムループ構造を持つ SgrS 型の Hfq 結合モジュールである可能性を示唆する。興味深いこれら 2 つの点、すなわちターミネーターのポリ U 配列、および内部ポリ U 配列の性質の違い、あるいは Hfq 結合モジュールにおけるステムループ構造の数の意義についても、上述した SgrS の Hfq 結合モジュール (49 塩基) を用いた X 線結晶構造を含む RNA/タンパク質複合体解析により、詳細を検証できると考える。

表 1. Hfq 依存性 sRNA の 3'領域の配列

sRNA	Sequence
SgrS	-GUAUU GGUGUAAA <u>AAU</u> CACCCGCGCAGAGAUUAUACCU <u>GCUG</u> GUUUUUUU
MicF	-AUUUUAU ACCGU <u>CAU</u> UUCUUGAAU <u>GU</u> CUUUU <u>U</u> ACCC <u>CU</u> AUUU CAACCGGAU <u>GC</u> UCCGCAUUCGGUUUUUUUU
DsrA	-AUUUUUUU AAGUGCUUCUU <u>CGUU</u> AAGCAAGUUU <u>CAU</u> CCCGACCC <u>CCU</u> CAGGGUCCGGAAUUUUUUUU
Spot42	-AUUU GGCUGAUAUUUUUAGCCGCGCC <u>CC</u> CAGUCAGUAU <u>AG</u> ACUGGGGCGUUUUUUUAUU
RybB	-AUUUUU GUGGAGCCCAU <u>CA</u> ACCCCGCCAUUUCCGGUUCAAGGUUGAUUGGGUUUUUUUGUU
ArcZ	-GUUUU GGCGCAGUAUUCCGGCACC <u>CC</u> GGU <u>CU</u> AGCCGGGUCAUUUUUUU
MgrR	-CUGUU AGCGUAAAAGCAAAACACAAAU <u>CU</u> AUCCAU <u>GC</u> AAAGCAUUCACCCGCGUUUACUGCGGCGUUUUUUUU
RyhB	-GUAAUUACU AGCCAGCGGGGUG <u>CU</u> GGCUUUUUUUUU
RseX	-AUUUUUUU GGCGCGCAU <u>GAU</u> GCCGCGCUUUUUUUUU
OxyS	-CUUUU GGCGAU <u>CU</u> CCAGGAUCCGCUUUUUUUUU
GcvB	-AUUAAUGU AGCACCGCCCUAAUU <u>GC</u> GTGCUUUUUUUUUU
RprA	-GUUUUU GCCAU <u>CU</u> CCCGAGAU <u>GG</u> CUUUUUUUUU
GlmZ	-CUGUUUU AAGCCU <u>GC</u> UCCGUAAUAAAGAGCAGCGCUUUUUUUUU
Chix	-CUUUUU GACGGGGCAUAA <u>GC</u> GAUAUU <u>GG</u> CCAUUUUUUUUU
Mica	-AUUUUU GGCCACU <u>CA</u> CGAGUGGCUUUUUUUUUUU
RydC	-GUUUUU CGCCU <u>GU</u> ACCA <u>CG</u> GUUUUUUA <u>GU</u> ACAGGCGUUUUUUUU
CyaR	-CUCCUU AGCCU <u>GU</u> GAU <u>CU</u> CCCUUACAGGGGCUUAUUUUUUUU
MicC	-CCAUUGCAUUGCCACU <u>GAU</u> UUUUCCAACAUAUAAAAAGACAAAGCCCGGAACAGACAGUCCGGGCUUUUUUUUU
OmrA	-UCUUUGUAACCCU <u>GU</u> CUUU <u>GC</u> ACCAACCU <u>GC</u> GGGAU <u>GG</u> CGAGGUUUUUUUUU
OmrB	-GUUGAGCACAU <u>GAU</u> UAUUA <u>CA</u> CCAGCCU <u>GC</u> GCA <u>GU</u> GGCGAGGUUUUUUUUU

Rho 非依存性ターミネーターのポリ U 配列の最後の U で転写終結が起ると仮定して、対応する遺伝子 (<http://www.genome.jp/kegg/>) から転写される RNA 配列を示す。Rho 非依存性ターミネーターに対応する配列をイタリック体で示す。内在ヌクレオチド構造に対応する配列を網かけ文字で、ターミネーターあるいは内在ヌクレオチド構造の直前の U-rich 配列を囲い文字で示す。

材料と方法

○菌株とプラスミド

本研究で用いた大腸菌 K12 株とプラスミドを表 2 (P. 46) に示す。PCR 用 DNA プライマーとして表 3 (P. 47-48) に示す DNA オリゴを使用した。

pQE80L 由来の pQE-SgrS1 と pQE-SgrS14 は、河元ら、あるいは牧らが以前に用いたものを使用した (Kawamoto, *et al.*, 2006; Maki, *et al.*, 2010)。pQE-SgrS14R は以下のように構築した。プライマー401 と 1077 を用いて、pQE-SgrS14 を鋳型にして、変異を導入した領域を含む (*sgrS* の-2~+210) DNA 断片 1 を増幅させた。同様に、プライマー402 と 1076 を用いて、pQE-SgrS14 を鋳型にして、変異を導入した領域を含む (*sgrS* の+181~+247) DNA 断片 2 を増幅させた。次に、増幅させた DNA 断片 1 と 2 を合わせて鋳型にし、プライマー401 と 402 を用いて、目的の DNA 断片を増幅させた。得られた DNA 断片を *EcoRI* と *HindIII* で処理し、同処理した pQE80L とライゲーション反応により連結させ、pQE-SgrS14R を構築した。

pAraS および pAraX は、大鷹らが以前に用いたものを使用した (Otaka *et al.*, 2011)。pSgrS14a は以下のように構築した。プライマー928 と 1008 を用いて、pSgrS を鋳型にして、変異を導入した領域を含む (*sgrS* の+1~+200) DNA 断片 3 を増幅させた。同様に、プライマー930 と 1007 を用いて、pSgrS を鋳型にして、変異を導入した領域を含む (*sgrS* の+172~+229) DNA 断片 4 を増幅させた。次に、増幅させた DNA 断片 3 と 4 を合わせて鋳型にし、プライマー928 と 930 を用いて、目的の DNA 断片を増幅させた。得られた DNA 断片を *SaII* と *HindIII* で処理し、同処理した pAraS とライゲーション反応により連結させ、pSgrS14a を構築した。pSgrS14aR は以下のように構築した。プライマー928 と 1077 を用いて、pSgrS14a を鋳型にして、変異を導入した領域を含む (*sgrS* の+1~+210) DNA 断片 5 を増幅させた。同様に、プライマー930 と 1076 を用いて、pSgrS14a を鋳型にして、変異を導入した領域を含む (*sgrS* の+181~+229) DNA 断片 6 を増幅させた。次に、増幅させた DNA 断片 5 と 6 を合わせて鋳型にし、プライマー928 と 930 を用いて、目的の DNA 断片を増幅させた。得られた DNA 断片を *SaII* と *HindIII* で処理し、同処理した pAraS とライゲーション反応により連結させ、pSgrS14aR を構築した。pSgrS14b は以下のように構築した。プライマー928 と 1029 を用いて、pSgrS を鋳型にして、変異を導入した領域を含む (*sgrS* の+1~+197) DNA 断片 7 を増幅させた。同様に、プライマー930 と 1028 を用いて、pSgrS を鋳型にして、変異を導入した

領域を含む (*sgrS* の+173〜+229) DNA 断片 8 を増幅させた。次に、増幅させた DNA 断片 7 と 8 を合わせて鋳型にし、プライマー 928 と 930 を用いて、目的の DNA 断片を増幅させた。得られた DNA 断片を *SaII* と *HindIII* で処理し、同処理した pAraS とライゲーション反応により連結させ、pSgrS14b を構築した。その他の pSgrS 系のプラスミドは以下のように構築した。プライマー 928 と表 3 に示した各々のプライマーを用いて、目的の DNA 断片を増幅させた。得られた DNA 断片を *SaII* と *HindIII* で処理し、同処理した pAraS とライゲーション反応により連結させ、目的のプラスミドを構築した。pTSgrS 系のプラスミドは以下のように構築した。目的の変異をもつ pSgrS 系のプラスミドを *EcoRI* と *HindIII* で処理することで得た DNA 断片を、同処理した多コピー数プラスミドである pTWV228 とライゲーション反応により連結させ、目的の pTSgrS 系のプラスミドを構築した。pSgrS-S 系のプラスミドは以下のように構築した。プライマー 929 と表 3 に示した各々のプライマーを用いて、目的の DNA 断片を増幅させた。得られた DNA 断片を *XbaI* と *HindIII* で処理し、同処理した pAraX とライゲーション反応により連結させ、目的のプラスミドを構築した。pSgrS-AS 系のプラスミドは以下のように構築した。プライマー 929 と表 3 に示した各々のプライマーを用いて、目的の DNA 断片を増幅させた。得られた DNA 断片を *XbaI* と *HindIII* で処理し、同処理した pAraX とライゲーション反応により連結させ、目的のプラスミドを構築した。

表 2. 本研究で使した菌株及びプラスミド

Strain/plasmid	Relevant genotype and property	Source
Strain		
IT1568	W3110 <i>mlc</i>	Laboratory stock
TM589	W3110 <i>mlc</i> Δhfq	Morita <i>et al.</i> (2005)
TM771	W3110 <i>mlc hfq-FLAG-cat</i> $\Delta(sgrR-sgrS)$	Otaka <i>et al.</i> (2011)
Plasmid		
pQE80L	High copy number plasmid vector	Qiagen
pQE-SgrS1	Derivative of pQE80L carrying <i>sgrS</i>	Kawamoto <i>et al.</i> (2006)
pQE-SgrS14	Derivative of pQE80L carrying <i>sgrS14</i>	Maki <i>et al.</i> (2010)
pQE-SgrS14R	Derivative of pQE80L carrying <i>sgrS14R</i>	This study
pQE-Hfq-His	Derivative of pQE80L carrying <i>hfq-His₆</i>	Kawamoto <i>et al.</i> (2006)
pMW218	Low copy number plasmid vector	NIPPON GENE
pAraS	Derivative of pMW218 carrying <i>araC-PBAD</i>	Otaka <i>et al.</i> (2011)
pSgrS	Derivative of pAraS carrying <i>sgrS</i>	Otaka <i>et al.</i> (2011)
pSgrS14a	Derivative of pAraS carrying <i>sgrS14a</i>	This study
pSgrS14aR	Derivative of pAraS carrying <i>sgrS14aR</i>	This study
pSgrS14b	Derivative of pAraS carrying <i>sgrS14b</i>	This study
pSgrS14bR	Derivative of pAraS carrying <i>sgrS14bR</i>	This study
pSgrS-LS4U	Derivative of pAraS carrying <i>sgrS-LS4U</i>	Otaka <i>et al.</i> (2011)
pSgrS-LGC	Derivative of pAraS carrying <i>sgrSLGC</i>	This study
pSgrS-182C	Derivative of pAraS carrying <i>sgrS182C</i>	This study
pSgrS-CCGC	Derivative of pAraS carrying <i>sgrSCCGC</i>	This study
pSgrSi	Derivative of pAraS carrying <i>sgrS+UAAUU</i>	This study
pSgrSiCCGC	Derivative of pAraS carrying <i>sgrS+CCGC</i>	This study
pSgrSiAAAA	Derivative of pAraS carrying <i>sgrS+AAAA</i>	This study
pSgrSiUUUU	Derivative of pAraS carrying <i>sgrS+UUUU</i>	This study
pSgrS14aUUUU	Derivative of pAraS carrying <i>sgrS14aUUUU</i>	This study
pSgrS14aAAAA	Derivative of pAraS carrying <i>sgrS14aAAAA</i>	This study
pSgrS14aCCCC	Derivative of pAraS carrying <i>sgrS14aCCCC</i>	This study
pSgrSA14	Derivative of pAraS carrying <i>sgrSA14</i>	This study
pSgrSA10	Derivative of pAraS carrying <i>sgrSA10</i>	This study
pSgrSA5	Derivative of pAraS carrying <i>sgrSA5</i>	This study
pTWV228	High copy number plasmid vector	TAKARA
pTSgrS14a	Derivative of pTWV carrying <i>sgrS14a</i>	This study
pTSgrS14b	Derivative of pTWV carrying <i>sgrS14b</i>	This study
pTSgrS-CCGC	Derivative of pTWV carrying <i>sgrSCCGC</i>	This study
pAraX	Derivative of pMW218 carrying <i>araC-PBAD</i>	Otaka <i>et al.</i> (2011)
pSgrS-S	Derivative of pAraX carrying <i>sgrS-S</i>	Otaka <i>et al.</i> (2011)
pSgrS-S+5	Derivative of pAraX carrying <i>sgrS-S+5</i>	This study
pSgrS-S+10	Derivative of pAraX carrying <i>sgrS-S+10</i>	This study
pSgrS-S+15	Derivative of pAraX carrying <i>sgrS-S+15</i>	This study
pSgrS-S+20	Derivative of pAraX carrying <i>sgrS-S+20</i>	This study
pSgrS-S+40	Derivative of pAraX carrying <i>sgrS-S+40</i>	This study
pSgrS-ASsodB20	Derivative of pAraX carrying <i>sgrS-ASsodB20</i>	This study
pSgrS-ASompA20	Derivative of pAraX carrying <i>sgrS-ASompA20</i>	This study
pSgrS-ASompF20	Derivative of pAraX carrying <i>sgrS-ASompF20</i>	This study

表 3. 本研究で使した **DNA** プライマー

Name	Sequence	plasmids or <i>in vitro</i> DNA templates
401	CCCCGAATTCACGATGAAGCAAGGGGGTG	pQE-S _{grs} 14R (F)
402	CCCAAGCTTCTTTTACGCGCGGCGAGAAT	pQE-S _{grs} 14R (R)
1076	TTCCACGAAAAACGTGGCGCCACAGATTAT	pQE-S _{grs} 14R, pS _{grs} 14aR (F)
1077	ATAATCTGCTGGCGCCACGTTTTCGTGGAA	pQE-S _{grs} 14R, pS _{grs} 14aR (R)
928	CCCCGTCGACGATGAAGCAAGGGGG	pS _{grs} (F)
930	CCCAAGCTTAATAAAAAAACACAGCAGG	pS _{grs} (R)
1007	GACTGAGTATTCACGAAAAATCACCCGCC	pS _{grs} 14a (F)
1008	GGCGGGTGATTTTCGTGGAAATACTCAGTC	pS _{grs} 14a (R)
1028	ACTGAGTATTTAGCAAAAAATCACCCCG	pS _{grs} 14b (F)
1029	GGGTGATTTTGTCTAAATACTCAGT	pS _{grs} 14b (R)
1051	CCCAAGCTTAATAAAAAAACACAGCAGGTATAATCTGCTGGCGGTAGCAATTTTGTCTAAATACTCAGTCACACATGAT	pS _{grs} 14bR (R)
1341	CCCAAGCTTAATAAAAAAACACAGCAGGTATAATCTGCTGGCGGTGCTGCCACCAATACTCAGTCACACATGATG	pS _{grs} -LGC (R)
1349	CCCAAGCTTAATAAAAAAACACAGCAGGTATAATCTGCTGGCGGGTGATTTTACACCGATACTCAGTCACACATGAT	pS _{grs} -182C (R)
	GCAGGC	
1347	CCCAAGCTTAATAAAAAAACACAGCAGGTATAATCTGCTGGCGGGTGATTTTACACCGGGGCTCAGTCACACATGAT	pS _{grs} -CCGC (R)
	GCAGGCAAGT	
1395	CCCAAGCTTAATAAAAAAACACAGCAGGTATAATCTGCTGGCGGGTGATTTTACACCAATAATACTCAGTCACACATGA	pS _{grs} i (R)
1396	CCCAAGCTTAATAAAAAAACACAGCAGGTATAATCTGCTGGCGGGTGATTTTACACCGGGGATACTCAGTCACACATGA	pS _{grs} iCCGC (R)
1397	CCCAAGCTTAATAAAAAAACACAGCAGGTATAATCTGCTGGCGGGTGATTTTACACCAAAAAATACTCAGTCACACATGA	pS _{grs} iUUUU (R)
1398	CCCAAGCTTAATAAAAAAACACAGCAGGTATAATCTGCTGGCGGGTGATTTTACACCTTTTATACTCAGTCACACATGA	pS _{grs} iAAAA (R)
1376	CCCAAGCTTAATAAAAAAACACAGCAGGTATAATCTGCTGGCGGGTGATTTTATACTCAGTCAGTCA	pS _{grs} Δ5 (R)
1377	CCCAAGCTTAATAAAAAAACACAGCAGGTATAATCTGCTGGCGGGTGAATACTCAGTCA	pS _{grs} Δ10 (R)
1325	CCCAAGCTTAATAAAAAAACACAGCAGGTATAATCTGCTGGCGAATACTCAGTCACACATGATGCAGGC	pS _{grs} Δ14 (R)

1378	CCCAAGCTTATATAAAAAACCAGCAGGTATATCTGCTGGCGAAAAATTTCGTGGATACTCAGTCA	pS _{grS} 14aUUU (R)
1381	CCCAAGCTTATATAAAAAACCAGCAGGTATATCTGCTGGCGTTTATTTTCGTGGATACTCAGTCA	pS _{grS} 14aAAAA (R)
1382	CCCAAGCTTATATAAAAAACCAGCAGGTATATCTGCTGGCGGGGATTTTCGTGGATACTCAGTCA	pS _{grS} 14aCCCC (R)
929	CCCAAGCTTGATAGCCATCAAACAGC	pS _{grS} -S (R)
1128	GCAGCTAGATAGTGTGACTGAGTATACCTGTTCCATGGCCAAACACTTGTCACTACTTCTCTTATTTGGTGTAATAATCA CCCGCCAGCAGA	pS _{grS} -40 (F)
1131	GCAGCTAGATAGTGTGACTGAGTATTTGTCACTACTTCTCTTATTTGGTGTAATAATCACCCGCCAGCAGA	pS _{grS} +20 (F)
1138	GCAGCTAGATAGTGTGACTGAGTATACTTCTCTTATTTGGTGTAATAATCACCCGCCAGCAGA	pS _{grS} +15 (F)
1139	GCAGCTAGATAGTGTGACTGAGTATTTTCTCTTATTTGGTGTAATAATCACCCGCCAGCAGA	pS _{grS} +10 (F)
1140	GCAGCTAGATAGTGTGACTGAGTATCTTATTTGGTGTAATAATCACCCGCCAGCAGA	pS _{grS} +5 (F)
1387	GCAGCTAGATACATTTGCTACTCTCCTTATTTATTTGGTGTAATAATC	pS _{grS} -A <i>Sso</i> dH20 (F)
1388	GCAGCTAGATACATTTTTTGGCGCTCGTTATTTATTTGGTGTAATAATC	pS _{grS} -A <i>Somp</i> A20 (F)
1389	GCAGCTAGATACATTTATTTTACCCCTCATGTATTTGGTGTAATAATC	pS _{grS} -A <i>Somp</i> F20 (F)
1330	GAAATTATACGACTCACTATAGGATGAAGCAAGGGGTGCCCCATGCGTCAG	T7 promoter-S _{grS} (F)
1332	AAAAAAAAAACAGCAGGTATATCTGCTGGC	S _{grS} -8U (R)
1333	AAAAACCAGCAGGTATATCTGCTGGC	S _{grS} -4U (R)

○ノーザンブロッティング

RNA 試料は以下の方法で調製した。sRNA 発現プラスミドをもつ菌株を 37°C で LB 培地中において $A_{600} = 0.6$ まで震盪培養した。必要に応じて、ampicillin (終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$)、kanamycin (終濃度 15 $\mu\text{g/ml}$) を添加した。また、sRNA の発現を誘導するために、IPTG (終濃度 0.1 mM) あるいはアラビノース (終濃度 0.2%) を培養開始時に添加した。培養液が $A_{600} = 0.6$ になった後、培養液に氷を加え、直ちに遠心分離 (3500 rpm, 4°C, 5 分) し、集菌した。上清を取り除き、沈殿を 400 μl の RNA バッファー (0.5% SDS、20 mM CH_3COONa 、10 mM EDTA [pH 5.5]) で懸濁し、20 mM CH_3COONa 、10 mM EDTA [pH 5.5] で飽和させた RNA フェノールを 400 μl 加え、65°C で 5 分間、緩やかに振盪した。振盪後、混合物をエッペンドルフチューブに移し、遠心分離 (12000 rpm, 室温, 5 分) した。水溶性画分 280 μl を新しいエッペンドルフチューブに移し、2.5 倍量の 100% エタノールを加え、よく vortex し、-20°C で 10 分間静置させた後、遠心分離 (14000 rpm, 4°C, 10 分) した。上清をきれいに取り除き、沈殿を 300 μl の RNA バッファーで再懸濁し、2.5 倍量の 100% エタノールを加え、遠心分離 (14000 rpm, 4°C, 10 分) した。この作業を再度行い、上清を捨て、沈殿を 1 ml の 70% エタノールで洗浄し、得られた沈殿を 10 分間自然乾燥させた後、100 μl の RNA バッファーで懸濁した。最後に RNA 試料を適量の H_2O で希釈し、 A_{260} を測定し、RNA 試料の濃度を計測した。

上記の方法で調製した RNA 試料をアガロースゲルまたは Urea ポリアクリルアミドゲルを用いて分離した。アガロースゲルを用いる場合、RNA 試料を deionized formamide 溶液 (1xMOPS buffer、6% formaldehyde、50% formamide、4% glycerol) に溶解させ、65°C で 5 分間処理した。氷上で 5 分間静置させた後、formaldehyde-MOPS-1.2% アガロースゲル (1xMOPS buffer、6% formaldehyde) で電気泳動した。(図 7、8 では、2% アガロースゲルを使用した。) 泳動後、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 HybondTM-N⁺; GE healthcare 社) に転写した。ブロッティングバッファーには 20xSSC (3 M NaCl、0.3 M sodium citrate) を用いた。Urea ポリアクリルアミドゲルを用いる場合、RNA 試料を等量の PA (80% Formamide、5mM EDTA [pH 8.0]、0.02% BPB、0.02% XC) に溶解し、8 M Urea 10% ポリアクリルアミドゲル (0.5xTBE buffer [44.5 mM Tris-borate、44.5 mM boric acid、1 mM EDTA]) で分離した。分離後、ゲルを 0.5xTBE で 15

分間、2.5xTBE で 30 分間、再度 0.5xTBE で 15 分間洗浄した後、ゲル中の RNA を AE-6677 ホライズプロット (ATTO 社) でナイロンメンブレンに転写した (400mA, 30V, 60 分)。ブロッティングバッファーには、0.5xTBE を用いた。ブロッティング後、メンブレンを 50 mM NaOH でアルカリ固定処理した後、2xSSC で洗浄した。メンブレンをハイブリダイゼーションバッファー (DIG Easy Hyb Granules ; Roche 社) を用いて、50°C で 10 分間反応させた。100°C で 5 分間処理した後に氷上で静置させた Digoxigenin (DIG) で標識した DNA プローブをハイブリダイゼーションバッファーに加え、さらに 50°C で 4 時間反応させた。その後、メンブレンを洗浄バッファー (0.2xSSC、0.1% SDS) で、20 分 x 3 回洗浄した。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、ブロッキングバッファー (liquid blocking reagent [Roche 社] : マレイン酸バッファー = 1 : 10) で 20 分間振盪した。ブロッキングバッファーで 1/10000 に希釈した Anti-Digoxigenin-AP Fab fragment (Roche 社) でメンブレンを 1 時間反応させた。0.3% Tween マレイン酸バッファーで、10 分間で 2 回洗浄した後、メンブレンの pH を緩衝するためにバッファー A (100 mM Tris-HCl [pH 9.5]、300 mM NaCl) で 3 分間振盪した。バッファー A で希釈した 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, 10min) を行い、X 線フィルムを感光させた。

DIG 標識した DNA プローブは DIG-dUTP を用いた PCR により調製した。以下に各々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 および SgrS 変異体の検出に使用)。SgrS プローブ 2 : SgrS の 3' 側の 168-227 塩基の 60bp (SgrS-S および SgrS-S 変異体の検出に使用)。*sodB* プローブ : *sodB* mRNA の 5' 領域の 210bp。*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。

○ウェスタンブロッティング

タンパク質試料を以下の方法で調製した。sRNA 発現プラスミドをもつ菌株を 37°C で LB 培地中において $A_{600} = 0.6$ まで震盪培養した。必要に応じて、ampicillin (終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$)、kanamycin (終濃度 15 $\mu\text{g/ml}$) を添加した。また、sRNA の発現を誘導するために、IPTG (終濃度 0.1 mM) あるいはアラ

ビノース（終濃度 0.2%）を培養開始時に添加した。培養液を $A_{600}=0.6$ 付近まで培養後、1 ml 分注し、遠心分離（12000 rpm, 4°C, 3 分）により集菌した。沈殿を 0.005 OD₆₀₀/μl となるように、H₂O と 2xSDS サンプルバッファー（120 mM Tris-HCl [pH 6.8]、3.8% SDS、19% glycerol、9.6% β-mercaptoethanol、0.02% BPB）で懸濁し、100°C で 5 分間加熱処理を行い、タンパク質試料として用いた。

タンパク質試料を SDS-PAGE により分離し、分離後、平板型転写装置ホール型（日本エイドー株式会社）を用いてメンブレン（Immobilion PDVF ; Millipore 社）へ転写した。転写後、メンブレンを 5% スキムミルク-0.1% Tween-PBS（0.1% Tween20、0.15 M NaCl、10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ [pH 7.5]）によって 1 時間ブロッキングした。5% スキムミルク-0.1% Tween-PBS で 1/5000 に希釈した一次抗体とメンブレンを 1 時間反応させ、その後 0.1% Tween-PBS で 8 分 x 2 回洗浄した。5% スキムミルク-0.1% Tween-PBS で 1/5000 に希釈した二次抗体とメンブレンを 1 時間反応させ、その後 0.1% Tween-PBS で 8 分 x 2 回洗浄した。メンブレンを Lumi-light Western Blotting Substrate（Roche 社）により検出した。

○免疫沈降

sRNA 発現プラスミドをもつ TM771 株 (Δ sgrR-sgrS, hfq-FLAG-cat) を、0.4%（少コピー数プラスミド）あるいは 0.1%（多コピー数プラスミド）アラビノースを含む 100 ml の LB 培地で $A_{600} = 0.6$ まで震盪培養し、遠心分離（4500 rpm、5 分、4°C）により集菌した。ペレットを 10ml の STE バッファー（100mM NaCl、10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA）で洗浄した。洗浄後、氷上で沈殿を 12 ml の IP バッファー（20mM Tris-HCl [pH 8.0]、0.1M KCl、5mM MgCl₂、10% glycerol、0.1% Tween20）に懸濁した。懸濁液を超音波破碎し、遠心分離（10000 rpm、30 分、4°C）した。その後、上清（粗抽出液；CE）を抗 FLAG アガロースビーズ液（Sigma 社）と、4°C で 30 分間反応させた。混合液を mini chromatography column（BioRad 社）により精製した。アガロースビーズを 10 ml の IP バッファーで 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 0.4 mg/ml FLAG ペプチド（Sigma 社）含有の 50 μl IP バッファーで抽出し、結合画分（B）とした。各画分（5 μl）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 解析のため、粗抽出画分（10 μl）と結合画分（10 μl）をフェノール処理し、エタノール沈殿させた後、

20 μ l の RNA バッファーに溶かした。その内、粗抽出液画分 (CE) : 3 μ l、結合画分 (B) : 3 μ l をノーザンブロッティングにより解析した。

○*in vitro* 転写系を用いた RNA の調製

SgrS を T7 RNA ポリメラーゼ、および T7 プロモーターと SgrS に対応する転写配列を含む PCR で増幅させた鋳型 DNA を用いて、*in vitro* 転写で合成した。*in vitro* 転写反応には CUGA[®]7 *in vitro* 転写キットを使用した。³²P 標識した SgrS RNA の作製時には、転写反応液に [α -³²P]-UTP (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences 社) を加えた。SgrS、SgrS14b、SgrS14bR、SgrSCCGC の各々の鋳型 DNA は、それぞれ pSgrS、pSgrS14b、pSgrS14bR、pSgrSCCGC とプライマー1330 と 1332 (表 3) を用いて、PCR により増幅させた。SgrS4U の鋳型 DNA は pSgrS4U とプライマー1330 と 1333 (表 3) を用いて増幅させた。プライマー1330 は T7 プロモーター配列を含んでいる。プライマー1332 と 1333 は転写配列の 3'末端がそれぞれ 8U あるいは 4U に対応する鋳型 DNA が合成されるように設計した。PCR 産物をフェノール処理後、エタノール沈殿し、10~20 μ l の TE バッファーに溶解させた。RNA 転写物をフェノール処理後、エタノール沈殿し、50 μ l の H₂O で溶解させた。RNA の濃度は、ゲル泳動後エチジウムブロミドで染色することで測定した。

○ゲルシフトアッセイ

³²P 標識した SgrS RNA (40 nM) と図示した濃度の Hfq-His₆ を yeast tRNA 1 μ g を含む 5 μ l の binding buffer (20mM Tris-HCl [pH 8.0]、1mM DTT、1mM MgCl₂、20mM KCl、10mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ [pH 8.0]) に混合した。Hfq-His₆ は牧らの方法に従い、精製した (Maki, *et al.*, 2010)。競合実験のために、過剰量 (200 nM あるいは 400 nM) の非標識の SgrS 変異体を一緒に加えた。混合液を 37°C で 15 分間反応させた。その後、loading dye (25% glycerol、0.05% BPB) を 5 μ l 加えて、4%非変性ポリアクリルアミドゲル (0.5 x TBE、5.0% 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ーで検出した。

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 森田鉄兵助手に心より御礼申し上げます。2人の先生方には、本当にお世話になり、そして良くしていただき、感謝の気持ちを言葉では言い表わせません。ありがとうございました。また、研究に対するご指導、ご助言だけでなく、多くの面で助けて頂きました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大鷹弘紀さんに深く感謝致します。また、共に研究をしてきた名古屋大学理学研究科生命理学専攻 旧分子第一講座の皆様にも感謝致します。

博士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、分子第四講座の皆様にも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

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

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.

Balbontin R, Fiorini F, Figueroa-Bossi N, Casadesus J, Bossi L. 2010. Recognition of heptameric seed sequence underlies multi-target regulation by RybB small RNA in Salmonella enterica. *Mol Microbiol* 78:380-394.

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.

Franze de Fernandez MT, Eoyang L, August JT. 1968. Factor Fraction required for the synthesis of Bacteriophage Q β -RNA. *Nature* 219: 588-590.

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.

Gottesman S. 2004. The small RNA regulators of Escherichia coli: roles and mechanisms*. *Annu Rev Microbiol* 58:303-328.

Gottesman S, Storz G. 2010. Bacterial Small RNA Regulators: Versatile Roles and Rapidly Evolving Variations. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1:1-16.

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 U S A* 108:12473-12478.

Kawamoto H, Koide Y, Morita T, 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.

Link TM, Valentin-Hansen P, Brennan RG. 2009. Structure of Escherichia coli Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19292-19297.

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.

Moller T, Franch T, Hojrup P, Keene DR, Bachinger HP, Brennan RG, Valentin-Hansen P. 2002. Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell* 9:23-30.

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.

Otaka H, Ishikawa H, Morita T, Aiba H. 2011. PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:13059-13064.

Sauer E, Weichenrieder O. 2011. Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:13065-13070.

Schumacher MA, Pearson RF, Moller T, Valentin-Hansen P, Brennan RG. 2002. Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J* 21:3546-3556.

Soper TJ, Woodson SA. 2008. The rpoS mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA. *RNA* 14:1907-1917.

Storz G, Gottesman S. 2006. *Versatile Roles of Small RNA Regulators in Bacteria*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Storz G, Opdyke JA, Zhang A. 2004. Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol* 7:140-144.

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

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.

Vogel J, Luisi BF. 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* 9:578-589.

Wang W, Wang L, Zou Y, Zhang J, Gong Q, Wu J, Shi Y. 2011. Cooperation of Escherichia coli Hfq hexamers in DsrA binding. *Genes Dev* 25:2106-2117.

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.

Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31:3406-3415.