

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成21年度博士課程 進学
氏 名 手塚 武揚
指導教員名 大西 康夫

論文題目

放線菌 *Streptomyces griseus* における small non-coding RNA に関する研究

small non-coding RNA (sRNA) はタンパク質に翻訳されることなく機能する RNA 分子である。原核生物における遺伝子発現制御は主に転写制御因子 (タンパク質) が担うものと考えられてきたが、近年になって DNA から RNA への転写後に行われる発現制御機構において sRNA が大きな役割を果たしていることが明らかになってきた。sRNA は塩基配列の相補性を利用して標的となる messenger RNA (mRNA) と結合し、mRNA の翻訳効率や安定性を調節することで遺伝子の発現を制御している。また、sRNA は RNA 結合タンパク質と結合して RNA-タンパク質複合体を形成し、この複合体が転写や翻訳、翻訳後のタンパク質の輸送などに関与していることが明らかにされている。sRNA の機能は原核生物の正常な生命活動の維持に不可欠のものであると予想されるが、これまでの sRNA 研究はゲノム塩基配列が解読された proteobacteria など一部の細菌に解析対象が限定されてきた。*Streptomyces* 属放線菌は複雑な形態分化と多様な二次代謝産物生産を特徴とするが、これらの現象を担う遺伝子群やその発現制御機構については不明な点が多く残されており、特に sRNA についての解析は全く報告されていなかった。本研究では、*Streptomyces griseus* において sRNA が形態分化や二次代謝の新たな制御因子として機能していると予想し、これまで報告のない sRNA の同定および機能解明を目的とした。

1. 通常の培養条件において発現している *S. griseus* sRNA の同定と機能解析¹⁾

これまでに報告されている sRNA のほとんどが ORF と ORF の境界領域 (intergenic region, IGR) から発見されていることから、まず IGR に対象を絞り *Streptomyces* 属放線菌において高度に保存されている配列を探索した。*S. griseus* のゲノム配列から ORF 領域を除いた IGR の配列を全て抽出し、*Streptomyces coelicolor* A3(2) および *Streptomyces avermitilis* のゲノム配列に対して BLAST 検索を行った。20 bp 以上配列が一致し、かつ E-value が 1×10^{-10} 以下の保存性を示す 321 領域を sRNA 遺伝子の候補領域とした。この中から sRNA ではないと個別に判断できるもの(複製起点、偽遺伝子、transfer RNA、ribosomal RNA など)を除いた。また、抽出された保存領域が隣接する ORF のコード配列と非常に近い位置 (10 bp 以内) に存在する場合、その隣接 ORF のプロモーターやターミネーターが保存されている可能性が高いと考えて除外した。最終的に、遺伝子間であるにもかかわらず *Streptomyces* 属放線菌において高度に保存されている 129 の領域を sRNA 候補とした。次に、保存された配列の全長が 80 bp 以上の 54 領域について以下に述べる転写解析を行った。

S. griseus 野生株を栄養豊富な固体培地で生育させ、回収した菌体から RNA を抽出した。この RNA に対して、それぞれの保存領域をカバーする DNA プローブを作製してノーザンブロット解析を行い、54 領域のうち 17 領域において 400 nt 以下の短い転写産物を検出した。この 17 領域について S1 マッピング解析を行い、転写の向きやおおよその転写開始点を決定した。これらの転写産物はいずれも生育時期特異的に発現量が変動しており、形態分化や二次代謝が起こらない変異株 (*adpA* 破壊株) ではこのうち 6 領域からの転写がほぼなくなっていた。同定した sRNA 遺伝子すべてを個々に欠失させた破壊株を作製したところ、形態分化に遅延が見られるものが 1 株、最少培地で生育が阻害されるものが 1 株、グリシンを炭素源として資化できないものが 2 株得られた。その後の解析により、最少培地で生育が阻害された 1 株とグリシンを資化できない 2 株はいずれも下流に隣接する遺伝子の発現が抑制されており、短い転写産物が検出された領域はこれらの隣接遺伝子の発現を調節する 5'非翻訳領域 (untranslated region, UTR) にあたることが判明した。下流の遺伝子では転写減衰機構による発現調節機構が存在し、5'-UTR で転写が終結してしまうために短い RNA が検出されたと考えられる。破壊株において形態分化に遅延が見られた sRNA は、走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察により気中菌糸の形態に異常が見られた。また、野生株に高コピー数ベクターで導入することで形態分化が促進された。*S. coelicolor* A3(2) および *S. lividans* では、高コピー数ベクターで導入することにより生育の遅延が生じた。その他の破壊株では形態分化、二次代謝とも野生株との間に顕著な差異は見られなかった。

上記の解析に続いて、次世代シーケンサーを用いた *S. griseus* 転写産物の網羅的シーケンス解析を行った。*S. griseus* 野生株を栄養豊富な固体培地または液体培地で培養した菌体からそれぞれ total RNA を抽出し、rRNA を除去した後シーケンス解析を行った。cDNA ライブラリー

は RNA をランダムに断片化して作製したもの、および RNA の 5'末端 25 nt のみを高度に濃縮して作製したものの 2 種類を用意し、それぞれシーケンス解析した。その結果、ゲノム上の転写領域とその転写開始点および転写の向きが高解像度で明らかになったことから、遺伝子間領域に検出された転写領域に注目し、配列の保存性からは見出されなかった領域の解析を行った。

遺伝子間において、(i) 転写領域の全長が 40 nt 以上、(ii) 全長にわたる平均 read 数が 1.6 以上、(iii) 隣接する転写領域との距離が 10 nt 以上、の 3 条件を満たすものを選抜したところ、固体培養と液体培養を合わせて 1493 領域から sRNA 候補となる転写が見られた。このうち発現量の多い 21 領域についてノーザンブロット解析を行い、8 領域から 400 nt 以下の短い転写産物を検出した。これら 8 領域について S1 マッピング解析を行ったところ、いずれの転写開始点もシーケンス解析で予想された転写開始点とよく一致し、また 4 領域については *adpA* 破壊株において転写が見られなかった。ノーザンブロット解析で転写が検出されなかった残りの 13 領域についても S1 マッピング解析を行ったところ、すべての領域で転写産物が検出できることを確認した。*adpA* 破壊株で転写が見られなかった 4 領域についてそれぞれの遺伝子破壊株を作製したが、形態分化および二次代謝に顕著な変化は認められなかった。

2. DNA 結合活性および RNase 活性を持つタンパク質 SGR6054 の解析

sRNA の機能発現において RNA シャペロンタンパク質 Hfq が重要な機能を担っていることが明らかにされている。Hfq は sRNA と標的 mRNA に結合して両者の相補的塩基対の形成を促進する一方、多くの sRNA の細胞内における安定性に不可欠の因子であると報告されている。したがって、sRNA の機能発現においてこのような RNA 結合性タンパク質の存在が不可欠であると考えられるが、*S. griseus* を含めこれまでにゲノム塩基配列が解読されている放線菌には Hfq と明確な相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子は存在しないことから、放線菌においては Hfq とは異なる RNA シャペロンタンパク質が存在すると予想される。そこで、Hfq とごく部分的な配列の類似性を示すタンパク質 SGR6054 に注目し解析を行った。

SGR6054 は過去に報告されているタンパク質 mIHF (mycobacterial integration host factor) と高い相同性 (Identity 58%) を有しており、mIHF は生育に必須な非特異的な DNA 結合活性を持つタンパク質であると報告されている。薬剤耐性遺伝子の挿入により *SGR6054* 破壊株の作製を試みたところ、*S. griseus* においては本遺伝子の破壊株は生育可能であったが野生株と比較して顕著な生育遅延を示した。S1 マッピング法による転写解析では生育時期に依存しない恒常的な発現が見られ、また *adpA* 破壊株では転写産物量が大幅に減少していた。C 末端に His タグを付加した組換えタンパク質を精製して *in vitro* で解析したところ、SGR6054 タンパク質は非特異的な DNA 結合活性に加えて RNase 活性を持つことが明らかになった。所属研究室で解明された SGR6054 の立体構造を基に活性に重要と予想される残基を Ala 置換した変異型タンパク質を作

製して解析した結果、DNA 結合活性や RNase 活性を完全に消失した変異型タンパク質は得られなかったものの活性に重要ないくつかの残基を同定できた。また、蛍光顕微鏡観察による局在解析を目的として赤色蛍光タンパク質をコードする *DsRed* との融合遺伝子を作製した。この融合遺伝子を *S. griseus* 野生株に導入した上で *SGR6054* 遺伝子を破壊した株では生育の遅延が見られなかった。*In vitro* での解析において *SGR6054*-*DsRed* 融合タンパク質は RNase 活性を失っており DNA と RNA の両方に結合したことから、*in vivo* での通常の生育には *SGR6054* の非特異的 DNA 結合活性が重要であることが示唆された。そこで、本タンパク質が核様体タンパク質として機能している可能性を考え検討を行ったが、明確な結論は得られなかった。

3. ストレプトマイシン生産に関与するタンパク質 EshA の解析 ²⁾

上述のように、*Streptomyces* 属放線菌のゲノム配列には RNA シャペロン Hfq と明確な相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子は存在しない。しかし、sRNA と標的 mRNA との結合や sRNA の安定性にはこのような RNA 結合性タンパク質の存在が不可欠であると予想される。そこで、sRNA の機能に関与する未知タンパク質の同定を目的として、*S. griseus* より RNA 結合タンパク質の精製を行った。

液体培養した *S. griseus* 野生株の粗抽出液から、*in vitro* での RNA 結合活性を指標として疎水性カラム、イオン交換カラム、ヘパリンカラムを用いたクロマトグラフィーにより活性画分を精製した。TOF-MS 解析により活性画分に含まれる 8 つのタンパク質を同定し、そのうち nucleotide-binding domain を持つ EshA に注目した。大腸菌で発現させた EshA タンパク質は不溶性であったため可溶化およびリフォールディングを行って精製したタンパク質は *in vitro* で RNA 結合活性を示した一方、*S. lividans* では可溶性タンパク質として発現し、精製タンパク質は RNA 結合活性を示さなかった。また、*eshA* 破壊株を作製し粗抽出液の RNA 結合活性を調べたところ、野生株と変化がなかったことから、EshA は RNA 結合活性を持たないと結論した。

所属研究室で行われた野生株と *adpA* 破壊株の転写産物を比較する DNA マイクロアレイ解析から *eshA* が *S. griseus* の形態分化と二次代謝を制御する転写因子 AdpA の制御下にあることが示唆されたことから、*eshA* についてさらに解析を行ったところ、*eshA* 破壊株では特定の培地条件下においてストレプトマイシン生産量の減少が見られたことから、ある条件では EshA がストレプトマイシン生産に関与していると考えられた。

1) Tezuka, T., Hara, H., Ohnishi, Y., Horinouchi, S. (2009) *J. Bacteriol.* **191**, 4896-4904.

2) Tezuka, T., Ohnishi, Y., Horinouchi, S. (2010) *Actinomycetologica* **24**, 45-50.