

博士論文概要

論文題目

配列特異的エンドリボヌクレアーゼの解析手法の確立及び独立栄養細菌が有する RNA 切断酵素への適用

A method toward the cleavage-sites identification of sequence-specific endoribonucleases and its application to those in a chemolithotrophic bacterium

申請者

宮本	龍樹
Tatsuki	MIYAMOTO

生命医科学専攻 環境生命科学研究

2017年12月

微生物は自然界のありとあらゆる環境に生息し、多岐に渡る活動を行っている。これら微生物が生息する環境下では、栄養塩の枯渇、浸透圧、温度および pH の変化、乾燥、重金属汚染や抗生物質投与等、様々な環境変化が目まぐるしく起こっており、この中には微生物の増殖阻害を惹起する環境ストレス因子として作用するものも多い。したがって、微生物は長きに渡る進化の過程で、これら環境ストレスに対応すべく、自身の転写・翻訳を複雑精緻に制御するための機構を獲得してきた。

Toxin-Antitoxin (TA) 機構はこのようなストレス応答機構として名高い。その名に冠される通り、本機構は毒性タンパク質である Toxin と抗毒性分子である Antitoxin から構成される。通常、Toxin タンパク質の毒性は Antitoxin 分子により抑制されているが、微生物細胞が環境ストレスに曝された際、Antitoxin が優先的に分解され、細胞内で Toxin が遊離する。Toxin 分子が微生物の増殖を抑制するメカニズムは種々あるが、その中で最も報告例が多いものは細胞内 RNA の切断、およびそれに続くタンパク質の合成阻害である。

MazF は大腸菌において初めて同定された代表的な RNA 切断型 Toxin であり、Antitoxin タンパク質 MazE と共に MazEF 機構を構成する。既往研究により、MazF は ACA 配列特異的なエンドリボヌクレアーゼであることが知られている。近年、ストレス環境下では MazF を介した RNA の切断により、大腸菌の翻訳プロファイルが包括的に「再プログラミング」されることが明らかとなり、MazF の転写後修飾因子としての重要性が認識されつつある。

大腸菌での研究が最も進められている MazF は、バイオインフォマティクス解析により、そのホモログが古細菌や真正細菌に広く散在することが明らかとなっている。興味深いことに、これらの微生物から単離された MazF の切断配列長（三〜七塩基）や切断配列は微生物種ごとに異なる。したがって、一口に MazF ホモログといえども、細胞内 RNA の選択的分解を介した翻訳制御機構は微生物種に特有であり、種々の微生物に保存された MazF の認識切断配列の同定が微生物細胞における翻訳制御機構を理解する上で重要である。

以上を踏まえ、本研究では MazF エンドリボヌクレアーゼの解析において枢要となる切断配列を高感度・高精度・高効率に同定する手法の構築を目的とした。また、構築した手法を、環境微生物が有する MazF に用いることでその切断配列の同定を行った。本論文は全四章より構成される。以下に各章の概要を述べる。

第一章では、Toxin-Antitoxin 機構の分類、および今日までに報告されてきた TA 機構の生物学的意義について述べた。また、これまで単離・精製されてきた MazF の基質特異性やその系統学的広がりに関して記載した。

第二章では、MazF の切断配列を特定するための新規手法の開発に関して記載した。従来、MazF を含む配列特異的 Toxin エンドリボヌクレアーゼの切断配列の同定にはプライマー伸長法が用いられていた。しかしながら、この手法は (1) 手順が煩雑でありスループット性に乏しい、(2) 基質 RNA の立体構造由来のノイズが切断配列として検出される恐れがある、(3) 基質中に含まれる配列多様性が低く、MazF の切断配列が含まれない可能性がある、(4) 切断活性の経時的な追跡が困難である、(5) 放

放射性同位体を使用するため特別な施設を必要とし、技術に習熟を要する、等の問題がある。そこで本研究では、超並列シーケンシング法により Toxin エンドリボヌクレアーゼの切断配列を同定する手法を構築し、さらに蛍光消光現象を利用した RNA 切断活性検出法と組み合わせることで上記の問題の解決を図った。

理論上、MazF で RNA を断片化した際、その 5' 末端が MazF に切断された箇所と一致する。したがって、サンプルを逆転写後、超並列シーケンシング法を用いて解析した際、冗長度が増加する塩基の直前・直後に頻出する配列が MazF の切断配列であると考えた。まず、認識切断配列が既知 (ACA 配列) の大腸菌由来 MazF (MazFec) を用いて本アイデアの妥当性を評価した結果、100%の割合で ACA 配列が検出され、超並列シーケンシング法が MazF の切断配列の同定に有効であることが示された。また、構造特異的リボヌクレアーゼである RNase III を用いた際は、特定の配列が検出されず、構築した手法が配列特異的エンドリボヌクレアーゼでのみ機能することを確認した。

次に認識切断配列が未知の *Pseudomonas putida* 由来の MazF に本手法を適用し、その切断配列が同定可能であるかを検証した。*P. putida* のゲノム上に保存された *mazF* 遺伝子 (*mazFpp*) を PCR で増幅し、pET ベクターへのクローニングを行った。大腸菌を宿主として本酵素の発現を行い、アフィニティークロマトグラフィーを用いて MazFpp を精製した。超並列シーケンシング法を用いてその切断配列を探索した結果、本酵素が UAC 配列特異的な RNA 切断酵素であると考えられた。そこで次に蛍光消光現象を利用した RNA 切断活性検出法により、超並列シーケンシング法の結果を裏付けることとした。本研究で開発した RNA 切断アッセイは、内部に切断候補配列を含み、5' 末端にレポーター、3' 末端にクエンチャーを修飾したオリゴヌクレオチドと MazF を混合してインキュベーションを行う。通常、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) により、5' 末端のレポーターが消光状態にあるが、オリゴヌクレオチド内部に含まれる配列が MazF の切断配列と一致した場合、オリゴヌクレオチドが切断され、FRET の解消によってレポーターの蛍光が回復する。様々な配列のオリゴヌクレオチドと MazFpp を混合したところ、内部に UAC が含まれるオリゴヌクレオチドにおいてのみ、蛍光強度の迅速な上昇が確認された。以上の結果から、MazFpp が UAC 特異的な RNA 切断型 Toxin 分子であることが明らかとなった。また UAC 配列を含まない転写産物が MazFpp による分解を受けないことをゲル電気泳動で、MazFpp が RNA を U/AC 間 (//は RNA 切断箇所を示す) で切断することを 5' RACE 解析によって確認し、超並列シーケンシング法と蛍光消光現象を利用した RNA 切断活性検出法の組み合わせにより、MazF の切断配列を高感度・高精度・高効率に特定可能であることを明らかとした。

第三章では第二章で構築した一連の手法を用いて、化学独立栄養細菌 *Nitrosomonas europaea* が有する MazF の解析を行った。通常、微生物ゲノム上には零もしくは一組の *mazEF* 遺伝子が存在するのみであるが、驚くべきことに、本微生物のゲノム上には 5 組もの *mazEF* 機構の存在が予見されている。また本微生物は多種多様な環境変化に反応し、その増殖速度や遺伝子発現を変化させることが知られて

いる。このようにゲノム情報，生理学的知見，および分子生物学的知見が蓄積された本微生物は，構築した手法を適用する魅力的なモデルであると考えられた。

N. europaea の染色体上における遺伝子座 NE0921 および NE1181 にコードされた *mazF* 遺伝子 (*mazFne1* および *mazFne3*) を取得し，大腸菌を宿主としてこれら異種タンパク質を発現させた。これらの酵素の単離・精製を行った後，超並列シーケンシング法および RNA 切断活性検出法を用いて両酵素の基質特異性を検討した結果，MazFne1 および MazFne3 がそれぞれ UGG および AAU を切断することが判明した。

そこで *N. europaea* のゲノム配列を参照し，MazFne1 および MazFne3 の細胞内主要標的を推定することとした。これら遺伝子は細胞内で優先的にノックダウンされると考えられる。各遺伝子に含まれる塩基配列の割合，各遺伝子の長さを考慮し，その遺伝子に含まれる切断配列含有数が多いものを抽出した。その結果，MazFne1 の切断配列である UGG 配列はヒドロキシアミノオキシドレダクターゼやリブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼといったアンモニア酸化細菌に特有な酵素をコードする遺伝子に非常に多く保存されていることが明らかとなった。これら酵素はアンモニア酸化や炭酸固定に重要となる。したがって，MazFne1 が細胞内で遊離するような環境ストレス下では，本微生物のエネルギー・還元力獲得系や生合成系が停止することが予測され，本酵素が遅増殖性の一因である可能性が示唆された。一方，MazFne3 の切断配列である AAU の含有率が高い遺伝子群を同様に抽出した際には，独立栄養細菌特異的な遺伝子や共通した特徴は見られなかった。

次に各遺伝子より，切断配列が含まれない遺伝子群の抽出を行った。これら遺伝子群は各 MazF が細胞内で遊離した際に優先的に翻訳されることが予測される。MazFne1 の切断配列である UGG を含まない遺伝子を抽出した際は特に共通した性質を発見することはできなかったが，MazFne3 の切断配列である AAU 配列を含まない遺伝子群を抽出した際は，水銀耐性に関わる遺伝子群 (*merE*, *merP*, *merT*) を発見することができた。これら三遺伝子は水銀分子の輸送に関わることが知られており，このことから MazFne3 が遊離した細胞内では，水銀の輸送能が向上し，水銀の無毒化を促す可能性が示唆された。このように MazF の切断配列を同定することで，その酵素学的特性と微生物生理学的な知見を結びつけて考えることが容易となった。

第四章では本論文の総括および今後の展望を述べた。

以上，本研究では MazF の切断配列特定手法を構築し，硝化細菌に保存された MazF に適用し，その基質特異性を明らかとした。本研究で構築した一連のスキームは，「特定環境ストレス下での翻訳プロファイルの変化がどのような生物学的メカニズムのもと調整されているかに関する知見の獲得」，および「どのようなタンパク質がストレス耐性に重要であるかの推定」に有用である。今後，本研究で開発した手法を真正細菌や古細菌に保存された種々の MazF に適用していくことで，微生物細胞における MazEF 機構への理解がさらに深まることが期待される。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 宮本 龍樹 印

(2018年2月9日現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文 ○	1. <u>Miyamoto T</u> , Yokota A, Tsuneda S, Noda N. AAU-Specific RNA Cleavage Mediated by MazF Toxin Endoribonuclease Conserved in <i>Nitrosomonas europaea</i> . <i>Toxins (Basel)</i> . 2016; 8(6). doi:10.3390/toxins8060174.
○	2. <u>Miyamoto T</u> , Kato Y, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N. Characterization of MazF-Mediated Sequence-Specific RNA Cleavage in <i>Pseudomonas putida</i> Using Massive Parallel Sequencing. <i>PLoS One</i> . 2016; 11(2): e0149494. doi:10.1371/journal.pone.0149494.
その他	1. <u>Miyamoto T</u> , Ota Y, Yokota A, Suyama T, Tsuneda S, Noda N. Characterization of a <i>Deinococcus radiodurans</i> MazF: A UACA-specific RNA endoribonuclease. <i>MicrobiologyOpen</i> . 2017. Epub 2017/07/05. doi: 10.1002/mbo3.501.
	2. Furuta A, Tsubuki M, Endoh M, <u>Miyamoto T</u> , Tanaka J, Salam KA, et al. Identification of Hydroxyanthraquinones as Novel Inhibitors of Hepatitis C Virus NS3 Helicase. <i>Int J Mol Sci</i> . 2015;16(8):18439-53. doi: 10.3390/ijms160818439.

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<ol style="list-style-type: none"> <li data-bbox="288 405 1453 501">1. <u>Miyamoto T</u>, Yokota A, Ota Y, Tsuneda S, Noda N. Characterization of a chromosomal toxin-antitoxin module conserved in <i>Nitrosomonas europaea</i>, How Dead Is Dead V, Vienna, Austria, September 2017 <li data-bbox="288 539 1453 636">2. 宮本 龍樹, 横田 亜紀子, 大田 悠里, 常田 聡, 野田 尚宏, 硝化細菌におけるストレス応答機構の解明: Toxin-antitoxin 機構はなぜ必要なのか?, 第二回環境微生物系学会合同大会 2017, 仙台, 2017年8月 <li data-bbox="288 674 1453 770">3. <u>Miyamoto T</u>, Yokota A, Tsuneda S, Noda N. Characterization of a sequence-specific cutter conserved in the <i>Nitrosomonas europaea</i> chromosome, The 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017), València, Spain, July 2017 <li data-bbox="288 808 1453 904">4. <u>Miyamoto T</u>, Tsuneda S, Ysekiguchi Y, Noda N. The identification method for the sequence pattern at the cleavage sites of MazF family endoribonucleases using massive parallel sequencing, The 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015), Maastricht, The Netherlands, June 2015