

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

2018 年 2 月

宮本 龍樹

Tatsuki MIYAMOTO

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

2018 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
生命医科学専攻 環境生命科学研究

宮本 龍樹

Tatsuki MIYAMOTO

目次

第1章 緒論

1.1 研究背景	5
1.2 Toxin-Antitoxin 機構 (その分類と生物学的役割)	9
1.2.1 Toxin-Antitoxin 機構の分類	9
1.2.2 Toxin-Antitoxin 機構の生物学的意義	15
1.3 本論文の構成	19

第2章 MazF Toxin エンドリボヌクレアーゼの切断配列推定手法の確立

2.1 序論	21
2.1.1 研究背景	21
2.1.2 既往の配列特異的 RNA 切断酵素の切断配列同定手法	22
2.1.3 MazF の生物工学的応用事例	24
2.2 実験方法	28
2.3 実験結果	37
2.3.1 超並列シーケンシング法を用いた切断候補配列同定系の確立	37
2.3.2 <i>Pseudomonas putida</i> 由来の MazF の獲得及びその活性測定	44
2.3.3 MazFpp の切断配列の同定	46
2.3.4 超並列シーケンシング法および RNA 切断活性検出法の組み合わせの評価	52
2.4 考察	56
2.5 総括	60

第3章 *Nitrosomonas europaea* に保存された MazF Toxin エンドリボヌクレアーゼの解析

3.1 序論	62
3.2 NE0921 にコードされた MazF エンドリボヌクレアーゼ (MazFne1) の解析	65
3.2.1 実験方法	65

3.2.2 実験結果	69
3.2.2.1 MazEFne1 の転写実験, MazFne1 の毒性試験	69
3.2.2.2 MazEFne1 の取得およびその酵素活性測定	71
3.2.2.3 超並列シーケンシング法による切断配列の推定	72
3.2.2.4 蛍光共鳴エネルギー移動を利用した切断配列の同定	74
3.2.3 考察	77
3.3 NE1191 にコードされた MazF エンドリボヌクレアーゼ (MazFne3) の解析	82
3.3.1 実験方法	82
3.3.2 実験結果	86
3.3.2.1 MazEFne3 の取得およびその酵素活性測定	86
3.3.2.2 超並列シーケンシング法による切断配列の推定	87
3.3.2.3 蛍光消光現象を利用した MazFne3 の切断配列の同定	90
3.3.3 考察	94
3.4 総括	98
第4章 結言, 展望	100
4.1 結言	100
4.2 展望	101
謝辞	104
参考文献	106
付録 (Appendix)	122

第一章

緒論

第1章 緒論

1.1 研究背景

河川や海洋，森林や土壌など，自然環境中には多種多様な微生物が存在する。またヒトの皮膚や腸内，産業分野における微生物発酵槽や排水処理場など，我々の身の周りを見渡してみても，種々の微生物が存在し，多岐に渡る役割を担っている。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下での生存戦略として，細胞内で自身の遺伝子発現やタンパク質翻訳を複雑かつ精密に制御するための機構を獲得してきた[1-4]。

微生物細胞における増殖制御機構・ストレス応答機構は数多く存在するが，Toxin-Antitoxin (TA) 機構はその最たるものと言える。本機構は原核生物に広く保存された増殖抑制機構であり，環境ストレス下での微生物の生存に肝要となる[5]。その名に冠される通り，TA 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[6, 7]。通常環境下では，Toxin 分子の毒性が Antitoxin 分子により抑制されている。しかしながら，微生物細胞が環境ストレスに曝された際には Antitoxin が優先的に分解され，細胞内で Toxin が遊離する。その結果，微生物細胞の増殖が抑制される (図 1.1)。Toxin 分子が微生物の増殖を抑制する分子機構は種々あるが，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[6, 7]。

MazF は代表的な RNA 切断型の Toxin タンパク質であり，Antitoxin タンパク質 MazE と共に MazEF 機構を構成する (図 1.1) [8]。本機構の発見は 1996 年の Aizenman らの報告に遡る[9]。微生物研究の多分に漏れず，大腸菌は TA 機構研究におけるモデル微生物であり，

MazEF 機構も大腸菌において初めて同定された。現在までに、本モデル微生物において MazF の活性化を誘起するストレス因子が調べられてきている[10, 11]。MazF 研究におけるもう一つの大きな発見は、2003 年の Zhang らによる報告である。彼らは MazF が一本鎖 RNA 領域の ACA 配列を認識・切断する配列特異的 RNA 分解酵素であることを例証した (図 1.1) [12]。以来、MazF の機能について様々な研究がなされ、現在では、ACA 配列の切断を介し大腸菌の翻訳が包括的に制御されることが知られている[13, 14]。このように MazF の転写後修飾因子としての重要性が明らかとなりつつある。

大腸菌が有する MazF の研究が最も進められていることは疑うべくもないが、その他の微生物に保存された MazF に関する知見も蓄積されつつある。バイオインフォマティクス解析により、*mazF* 遺伝子はプロテオバクテリアやファーミキューテス門を主として、アクチノバクテリア、スピロヘータ、サイトファーガ-フラボバクテリア-バクテロイデス、デインコッカスサーマス、ユーリアキアオータ門に広く散在していることが知られている[15]。興味深いことに、これら門に分類される微生物からこれまで単離・精製されてきた 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 (表 1.1) [16, 17]。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ると考えられ、種々の微生物に保存された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と考えられた [16, 17]。

以上を踏まえ、本研究では MazF 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 (第二章)。またこれら手法を化学独立栄養細菌である *Nitrosomonas europaea* が有する MazF に適用した (第三章)。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五組もの *mazEF* 機構の存在が予見されている[15, 18]。加えて、*N. europaea* に関する様々な生理学、生化学、分子生物学的知見が蓄積しており[19]、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。本論文は構築した手法の有用性、

是非を評価し論ずるものである。元来, “ma-ze”はヘブライ語で“What is this?”を意味するものであるが, 本研究における成果が “What is this?”に対する回答の一助となれば幸いである。

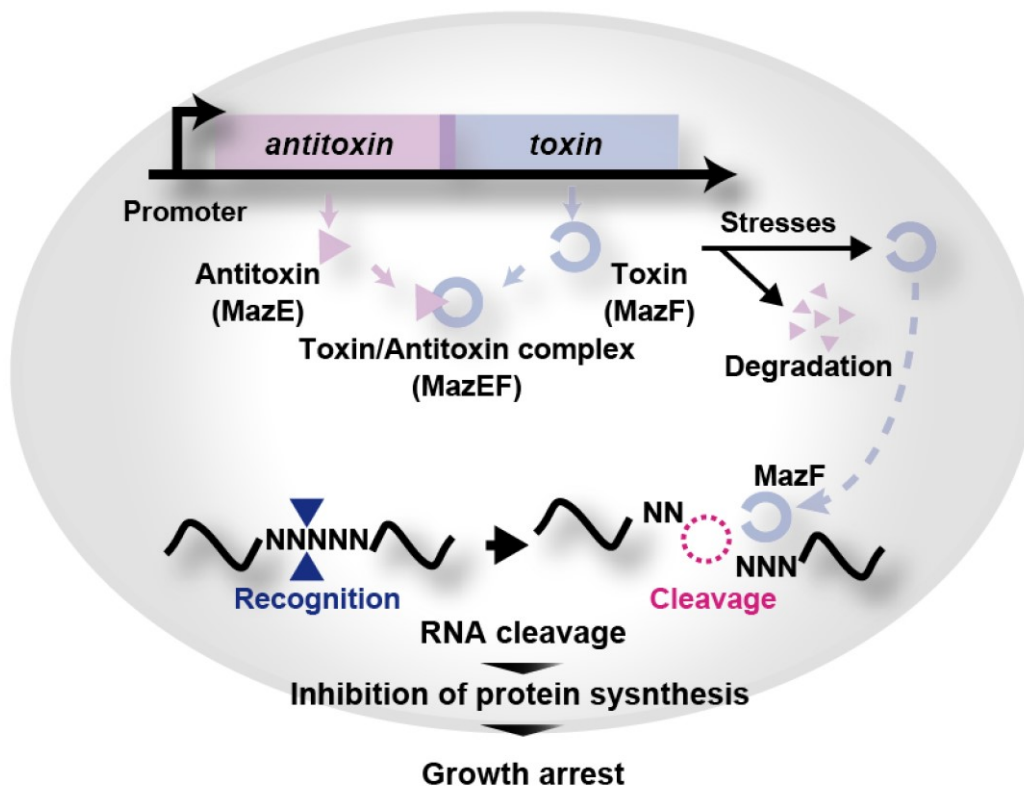


図 1.1 Toxin-Antitoxin 機構

表 1.1 単離精製された MazF およびその切断配列

Name	Microbes	RNA target	Cleavage specificity ^a	Reference
MazF-ec	<i>Escherichia coli</i>	16S rRNA, mRNA	/ACA, A/CA	Zhang et al. 2003 [12], Miyamoto et al. 2016 [20]
MazF-sa	<i>Staphylococcus aureus</i>	mRNA	U/ACAU	Zhu et al. 2009 [21]
MazF-bs	<i>Bacillus subtilis</i>	mRNA	U/ACAU	Park et al. 2011 [22]
MazF-pp	<i>Pseudomonas putida</i>	mRNA	U/AC	Miyamoto et al. 2016 [20]
MazF-ne3	<i>Nitrosomonas europaea</i>	mRNA	A/AU	Miyamoto et al. 2016 [23]
MazF-mt1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	mRNA	U/AC	Zhu et al. 2006 [24]
MazF-mt3	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16S/23S rRNA, mRNA	U/CCUU	Schifano et al. 2013 [25]
MazF-mt6	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23S rRNA, mRNA	UU/CCU	Schifano et al. 2014 [26]
MazF-mt7	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	mRNA	U/CGCU	Zhu et al. 2008 [27]
MazF-mt9	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	tRNA, (mRNA)	UU/U + stem	Schifano et al. 2016 [28]
MazF-hw	<i>Haloquadra walsbyi</i>	mRNA	UU/ACUCA	Yamaguchi et al. 2012 [29]
MazF-cd	<i>Clostridium difficile</i>	mRNA	U/ACAU	Rothenbacher et al. 2012 [30]
MazF-sq	<i>Staphylococcus equorum</i>	mRNA	U/ACAU	Schuster et al. 2013 [31]
MazF-dr	<i>Deinococcus radiodurans</i>	mRNA	U/ACA	Miyamoto et al. 2017 [32], Li et al. 2107 [33]

^a/ は RNA 切断箇所を示す。

1.2 Toxin-Antitoxin 機構 (その分類と生物学的役割)

1.2.1 Toxin-Antitoxin 機構の分類

Toxin-Antitoxin 機構は Antitoxin 分子の性質, および Antitoxin 分子が Toxin 分子の毒性を抑制する分子機構により, 現在, I~VI の型に分類されている (図 1.2)[6]。これらの機構において Toxin 分子は常にタンパク質であり, 一般的にその安定性は高い。一方, Antitoxin 分子は RNA (I 型および III 型) もしくはタンパク質 (II 型, IV 型, V 型, VI 型) であり, Toxin 分子に比べその安定的性は低いとされる (図 1.2)。歴史的な観点から, これらの中でも I 型および II 型に関する知見が大部分を占める。現状, III 型および IV 型に関しては数例の報告例が, V 型および VI 型に関しては共に一例が知られるのみである[6, 7]。以下に, 各機構の特徴を述べる。次頁に示した図 1.2 と共に参照されたい。

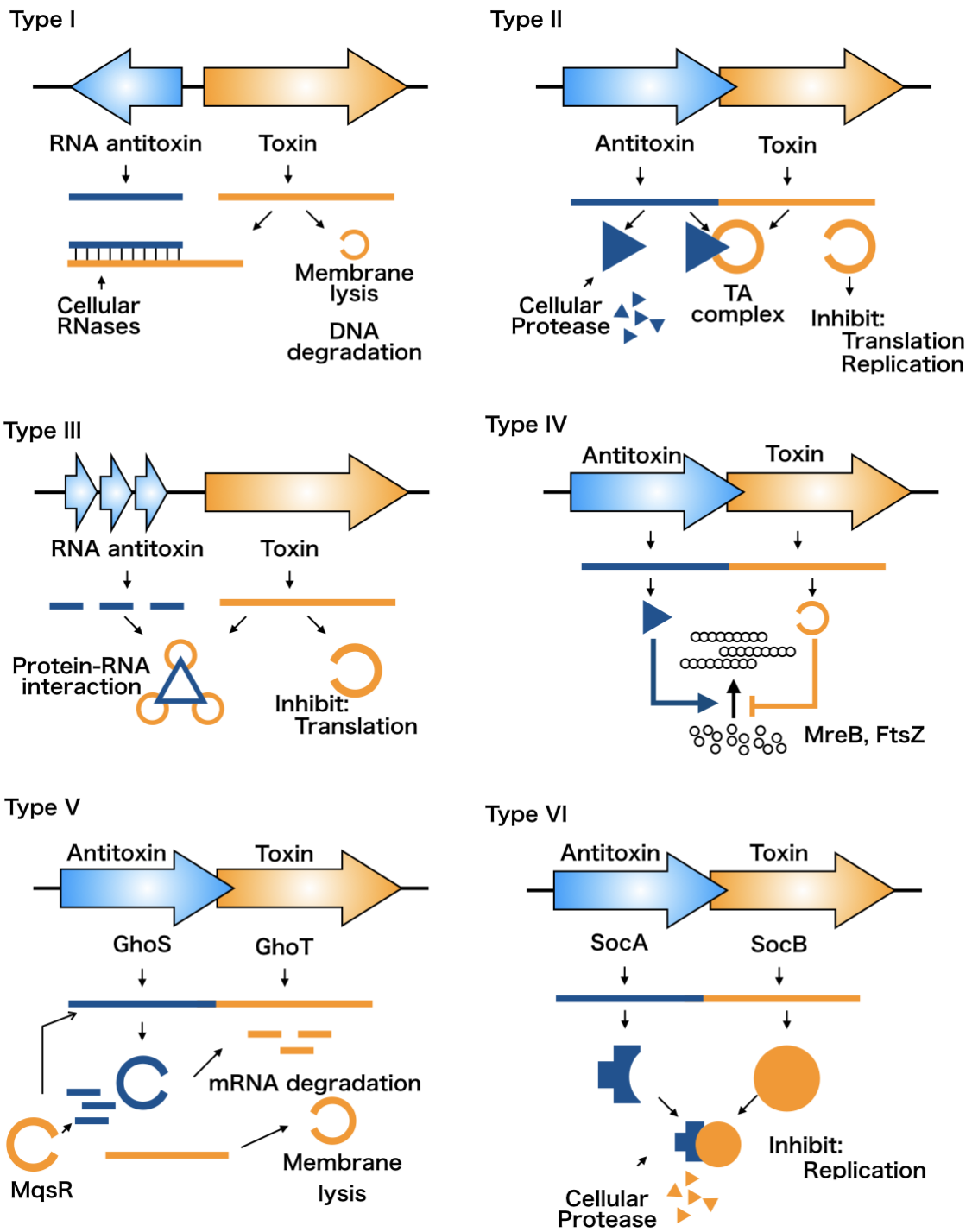


図 1.2 Toxin-Antitoxin 機構の分類

(1) I型

I型は歴史上初めて同定された TA 機構であり、「分離後細胞死」と呼ばれるプラスミド維持機構の役割を有する機構として発見されてきた [34]。以来、様々な I 型機構が微生物のゲノムもしくはプラスミドに存在することが報告されている (表 1.2)。I 型 TA 機構では Antitoxin が RNA であり、本 RNA 型 Antitoxin が Toxin の毒性を抑制する。その分子機構は (i) Toxin の mRNA 分解、もしくは (ii) Toxin の翻訳阻害の二種類に大別される[35]。前者に関しては、Toxin 配列に相補的な RNA が *toxin* 遺伝子から転写された転写産物と二本鎖を形成、形成された二本鎖が細胞内 RNA 分解酵素に分解されることで Toxin の翻訳が阻害される。一方、後者に関しては、転写された Antitoxin RNA がリボソーム結合部位を蓋うことで、Toxin の翻訳阻害を成し得ている。

(2) II型

II 型 TA 機構は Toxin タンパク質と Antitoxin タンパク質から形成され、*toxin* 遺伝子、*antitoxin* 遺伝子が一つのオペロンを形成する。本クラスの TA 機構では、転写・翻訳された Toxin タンパク質、Antitoxin タンパク質が Toxin-Antitoxin 複合体を形成し (タンパク質・タンパク質複合体)、Toxin の毒性が抑制されている。細胞が環境ストレスに晒された際には、Antitoxin がプロテアーゼにより分解され、Toxin が遊離する。II 型機構は Toxin の配列相同性からさらに幾つかのファミリーに分類され、Phd-Doc, HipBA, ParDE, HicBA, VapBC, MazEF, RelEB, MqsRA 等々、様々なものが知られる[36, 37]。これらファミリーにおける Toxin の細胞内標的は種類に富み、翻訳伸長因子 EF-tu, グルタミル tRNA 合成酵素, DNA ジャイレース等が知られるが、最も報告例が多い標的は細胞内 RNA (mRNA, tRNA, および rRNA) [38]であり、その増殖抑制機構はこれらの RNA 分子の切断によるタンパク質の合成阻害である (表 1.2)[7]。

(3) III 型

2009 年, Fineran らは植物病原性微生物である *Pectobacterium atrosepticum* (旧名: *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) が有する ToxI および ToxN が III 型 TA 機構を構成することを報告した[39]。本クラスも I 型 TA 機構と同じく, RNA 型 Antitoxin が Toxin の毒性を抑制するものである。しかしながら, 本クラスでは偽結節構造をとった RNA ToxI が ToxN 分子と「直接」複合体を形成することで, その毒性を抑制する (RNA・タンパク質複合体)[40, 41]。なお III 型 TA 機構に関しては真正細菌を中心にその存在が予測されており, Toxin 配列の相同性からさらに三種の亜科 (ToxIN, CptIN, TenpIN) に分類される[42]。また本機構において, Toxin 分子は RNA 切断酵素であることが知られている (表 1.2)[43, 44]。

(4) IV 型

IV 型 TA 機構の発見は大腸菌のゲノム上に存在する *yeeUV* に端を発する。元来, *yeeUV* 子はその遺伝子座の特徴から, II 型 TA 機構であると予測されていた。2011 年, Tan らは本遺伝子座から翻訳された Toxin タンパク質 YeeV が細胞骨格タンパク質 FtsZ や MreB を標的とすることを報告した。微生物細胞の正常な分裂にはこれら細胞骨格タンパク質の重合が必要となるが, YeeV は FtsZ や MreB に結合することでその重合を阻害する[45]。興味深いことに, YeeV の対となる Antitoxin YeeU は YeeV と直接的に Toxin-Antitoxin 複合体を形成しない。本 Antitoxin は YeeV が細胞骨格タンパク質に結合する部位に競合的に結合することで, YeeV の細胞骨格タンパク質への結合を阻害, 細胞骨格タンパク質の重合を促進することが知られている (表 1.2)[46]。なお上述した分子機構から, Tan らは YeeV を CbtA (Cytoskeleton Binding Toxin), YeeU を CbeA (Cytoskeleton bundling-enhancing factor A) と命名した。

(5) V 型

現状, V 型 TA 機構の報告は大腸菌において同定された GhoST のみである。本機構は Antitoxin タンパク質 GhoS ならびに Toxin タンパク質 GhoT から構成される。2012 年, Wang らは II 型 TA 機構に分類される MqsRA と相互制御を行う TA 機構として同定した[47, 48]。本クラスでは I 型 TA 機構と同じく Antitoxin 分子により Toxin の翻訳阻害が行われるが, GhoS が RNA 分解酵素という点において I 型 TA 機構とその分子機構を異にしている。Wang らは GhoS が配列特異的・立体構造特異的 RNA 分解酵素であり, Toxin である GhoT の mRNA を切断し, その翻訳を阻害することを示した[47]。なお GhoT は膜貫通型のタンパク質であり, ストレス環境下では本 Toxin を介した細胞膜の脱分極, ATP 合成阻害を引き起こされる[49]。

(6) VI 型

VI 型 TA 機構に関する情報は SocAB 機構に基づいており, 現状, 類例は存在しない。本機構は *Caulobacter crescentus* において同定され, SocA Antitoxin ならびに SocB Toxin から構成される。一般的な TA 機構と異なり, 本機構では SocA Antitoxin が接合タンパク質として働く。SocA は SocB Toxin と複合体を形成するとプロテアーゼである ClpXP によって認識され, 分解される。したがって, 本機構では SocB Toxin が絶えず分解されることがその毒性抑制に繋がっている。なお SocA タンパク質が不在の際は, SocB タンパク質は β スライディングクランプの働きを阻害することで, DNA の複製を阻害する[50]。

これら機構 I 型 ~ VI 型 TA 機構における代表的なものや Toxin の増殖阻害様式を次頁にまとめた (表 1.2)。

表 1.2 Toxin-Antitoxin 機構の分類, および Toxin タンパク質の細胞内標的 [7]

Toxin	Class	Mode of action	Target
HokB	1	Membrane depolarization	Membrane
Fst	1	Membrane depolarization	Membrane
HipA	2	Phosphorylation	Glutamyl-tRNA synthetase
RelE	2	Endonuclease	mRNA/tmRNA
YafO	2	Endonuclease	mRNA
VapC	2	Endonuclease	tRNA/rRNA
MazF	2	Endonuclease	mRNA/tRNA/rRNA
MqsR	2	Endonuclease	mRNA
Kid (PemK)	2	Endonuclease	mRNA
HicA	2	Endonuclease	mRNA
FicT	2	Adenylylation (AMPylation)	GyrB/ParE
Doc	2	Phosphorylation	EF-Tu
CcdB	2	Protein-Protein Interaction	DNA Gyrase (GyrA Subunit)
ParE	2	Protein-Protein Interaction	DNA Gyrase (GyrA Subunit)
Zeta	2	Phosphorylation	Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine
Hha	2	Transcriptional Regulator	DNA
TacT	2	Acetylation	tRNA
ToxN	3	Endonuclease	mRNA
CbtA (YeeV)	4	Protein-Protein Interaction	FtsZ and MreB
GhoT (YjdO)	5	Membrane depolarization	Membrane
SocB	6	Protein-Protein Interaction	DnaN (Beta-sliding clamp)

1.2.2 Toxin-Antitoxin 機構の生物学的意義

(1) 中毒モジュール

先に述べた通り、I型 TA 機構における *hok/sok* はプラスミドの維持に関わることが知られている。本機構は「分離後細胞死」と呼ばれ、プラスミド上に存在する TA 機構の多くがこの役割を持つとされる。通常、微生物細胞が分裂する際、細胞内に存在するプラスミドは必ずしも均等に分配されない。したがって、微生物細胞が分裂を繰り返すたび、一定の割合でプラスミドが脱落する細胞が出現する (図 1.3 右図)。一方、TA 機構がプラスミド上に存在する際は、プラスミドが分配されていない細胞内では不安定な分子である Antitoxin が直ちに分解される。このような細胞では、Antitoxin の追加供給が行われなため、遊離した Toxin が細胞内で毒性を発揮し、細胞死 (増殖抑制) が誘起される (図 1.3 左図)。この結果、生存細胞内には常にプラスミドが存在する。このように細胞の生死がプラスミドの存在に「依存的」な状態を指すことから、TA 機構は別名中毒モジュールとも呼ばれる[51]。

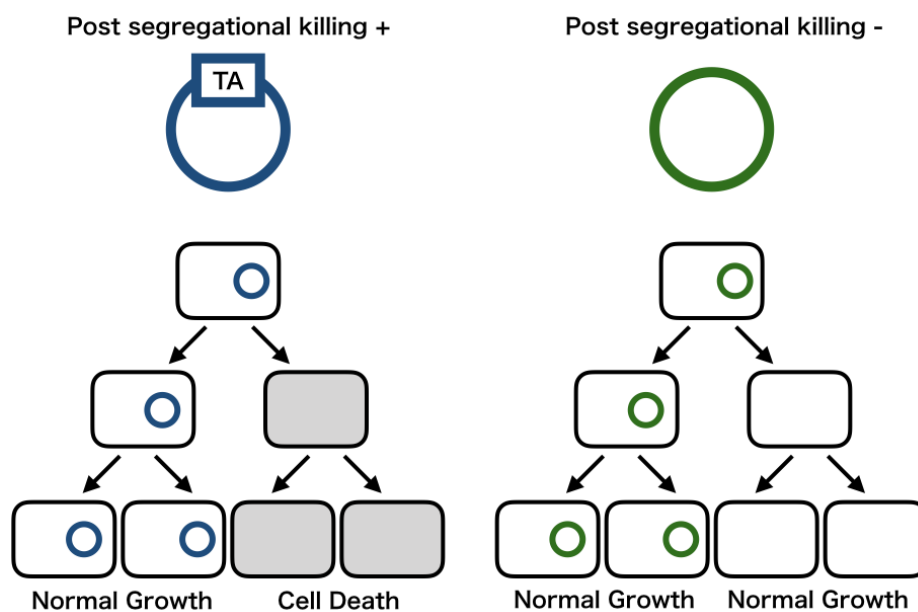


図 1.3 分離後細胞死の概要

(2) ファージに対する免疫応答機構

III型 TA 機構 (ToxIN 機構) [39] や一部の II型 TA 機構 (RnlAB 機構[52], LsoAB 機構[53] 等) では, TA 機構がバクテリオファージに対する防御機構として働くことが知られている。これらの機構ではファージが真正細菌に感染した際, Toxin の働きが活性化される。活性化した Toxin タンパク質は RNA 切断酵素として働き, ファージの RNA を分解し, その増殖を妨げる。2012 年, Otsuka らは真正細菌・ファージ間で, 「進化的軍拡競走」が行われていることを報告した。これはファージが有する Dmd と呼ばれるタンパク質が Antitoxin 分子として働き, 細菌が有する RNA 分解型 Toxin である RnlA や LsoA の RNA 切断活性を抑制するというものである (図 1.4)[53, 54]。報告例は少ないが, このように TA 機構では Toxin 分子が「非自己」を標的とし, その活性を発揮することも知られている。

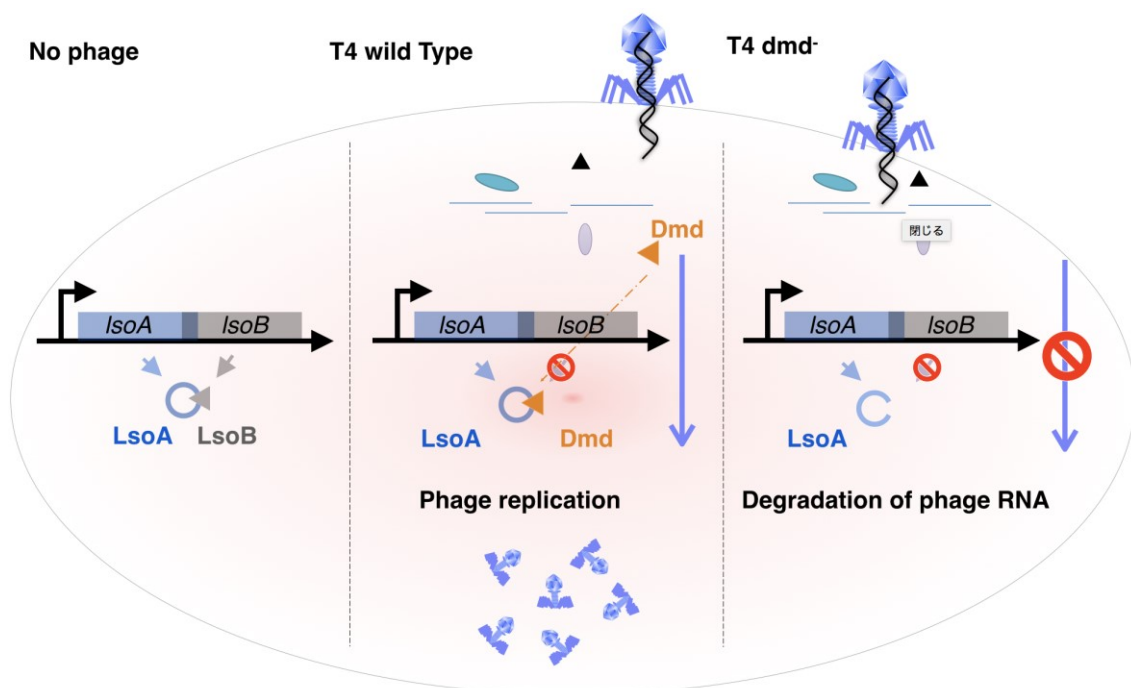


図 1.4 細菌-ファージ間での進化的軍拡競走 通常, LsoA Toxin は LsoB Antitoxin により不活性化されている (左)。ファージ感染時には, LsoB が分解され, LsoA Toxin が活性化する。活性化した LsoA がファージ RNA 切断することで, ファージの増殖が抑制される (右)。*dmd* 遺伝子を持つファージでは, 翻訳された Dmd タンパク質が LsoA と複合体を形成することで, LsoA の活性が抑制される。これによりファージの細胞内増殖が可能となる (中央)。

(3) 細菌の休止機構

TA 機構は微生物の休止化、休眠化にも関わるということが知られている。細菌集団に抗菌薬を暴露した際、一定の割合で抗菌薬に寛容性を示す細菌群が出現する。これら細菌群の中には、遺伝子変異を獲得し薬剤耐性を獲得したものも存在するが、遺伝子型に変異を伴わないにもかかわらず抗菌薬存在下で生存する亜集団が存在する。後者の細菌群は休止細菌と呼ばれる[55]。Maisonneuve らは大腸菌に存在する 10 の TA 機構をノックアウトした $\Delta 10$ 株を作製した。驚くべきことに、このような株をシプロフロキサシンやアンピシリンに暴露した際、ノックアウト株では休止細菌の出現率が二桁近く低下することが示されている(図 1.5)[56-58]。 *Mycobacterium tuberculosis* や *Salmonella enterica* においても TA 機構の休止化への関与が報告されており[59, 60]、今後、医学分野における TA 機構の研究がますます活発になることが予測される。

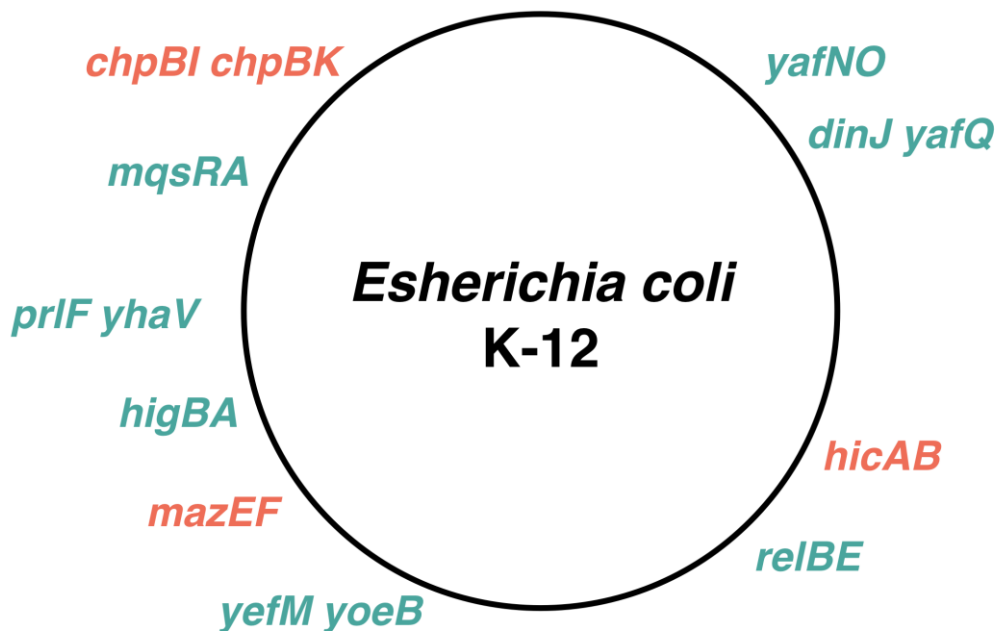


図 1.5 大腸菌における II 型 TA 機構 Toxin の作用機序に基づき配色。(赤) リボソーム非依存型 RNA 分解酵素, (緑) リボソーム依存型 RNA 分解酵素

以上，一部ではあるが TA 機構の既往の知見に関して，第一項，第二項を通して概説した。本節では TA 機構一般の知見に関して記載を行ったが，私個人の研究対象である MazEF 機構や *Nitrosomonas europaea* に関する既往の知見は次章以降に記載した。

1.3 本論文の構成

本論文は全四章から構成される。第一章では研究背景や既往の知見を概説した。続く第二章では MazEF 研究における既往の知見や自身が確立した MazF 酵素の解析技術に関して記載した。第三章では環境微生物 *Nitrosomonas europaea* が持つ MazF の酵素学的特性を述べた。またこれら特性から推察される MazF の生物学的意義に関する考察を記載した。第四章ではこれらの結果を総括すると共に今後の展望について述べた。

第二章

MazF Toxin エンドリボヌクレアーゼの切断

配列推定手法の確立

第2章 MazF Toxin エンドリボヌクレアーゼの切断配列推定手法の 確立

2.1 序論

2.1.1 研究背景

微生物が環境中で生存するためには、種々の環境変化に対応・順応する能力が重要であり、微生物は遺伝子発現やタンパク質翻訳の制御を複雑精緻に行うことでストレス耐性を向上させる。これら制御機構に影響を与える因子を考える際、細胞内 RNA の転写量を考えることは重要であるが、一方で RNA 分子の細胞内安定性や細胞内分解による翻訳への影響を考えることもまた重要である。従来、細胞内 RNA の分解はいわゆる「RNase」の研究が主流であったが[61]、21世紀に入って以来、Toxin-Antitoxin 機構における Toxin 分子も細胞内での RNA 代謝に大きく関わる事が明らかとなり[12, 53, 62-68]、脚光を浴び始めている。

MazFはまさにこのような Toxin 分子であり、RNA 分解酵素である[12]。先に述べた通り、本酵素は Antitoxin MazE と TA 機構を形成する[9]。非ストレス環境下では MazE が MazF タンパク質とヘテロ六量体 (MazF₂-MazE₂-MazF₂) を形成することで MazF の活性が抑制されているが[69]、大腸菌が飢餓ストレスや酸化ストレス、高温条件や抗生物質に晒された際[10]、細胞内プロテアーゼ ClpAP により MazE が分解され[9]、MazF が細胞内で遊離する。遊離した MazF は細胞内の一本鎖 RNA 領域における ACA 配列を特異的に認識・切断し[12]、ストレス環境下における大腸菌細胞内の翻訳は包括的に「再編集」される[13, 14, 70]。

MazF は大腸菌以外の微生物にも広く保存されていることは緒論に述べた通りである。また表 1.1 に示した通り、各々の微生物が持つ MazF は多種多様な切断配列を持つ。その切断配列長は三~七塩基と多岐に渡り[16, 17]、このことから大腸菌の MazF のように大部分の翻訳を包括的に阻害するものもあれば、特定の転写産物の翻訳抑制するために存在するもの

もあると考えるのが自然であろう。何れにせよ各微生物に保存された MazF の生理学的意義を紐解くにあたって (また MazF の生物工学的応用を成すにあたって), その切断配列を同定することが本研究分野の第一歩となる。しかしながら, 研究開始当初, 配列特異的 RNA 切断酵素の切断配列を特定する手法はプライマー伸長法および質量分析法が存在するのみであり (それぞれの原理, 利点, 欠点は次項に記載), 原核生物界に遍く存在する MazF の生理学的意義を明らかにするためにも, 本酵素の切断配列を正確かつ高スループットに同定する手法の構築が必要不可欠であった。そこで本研究では次世代シーケンサーを用いた MazF の配列の高精度・高効率な同定手法の構築を行った。本章にその原理, 実験方法, 結果, 考察をまとめた。

2.1.2 既往の配列特異的 RNA 切断酵素の切断配列同定手法

・プライマー伸長法

2003 年, Zhang らは *Escherichia coli* 由来の機能未知のタンパクである MazF が一本鎖 RNA を ACA 部位で特異的に切断する RNA 切断酵素であることを報告した[12]。この際 Zhang らが用いた方法はプライマー伸長法に基づくものであり, 現在においても本手法が MazF の切断配列解析における標準的な手法であると言える[27]。本手法では細胞内での発現量や安定性が高いとされる RNA を MazF で切断後, 放射性同位体が標識されたプライマー, および逆転写酵素により cDNA を合成する。合成された cDNA, ならびにジデオキシ法の原理に基づき生成された異なる鎖長の DNA 断片を共に泳動した際, MazF が切断を行った箇所 (断片化 RNA の 5'末端) がバンドとして現れることから, 切断配列が判明する (図 2.1)。

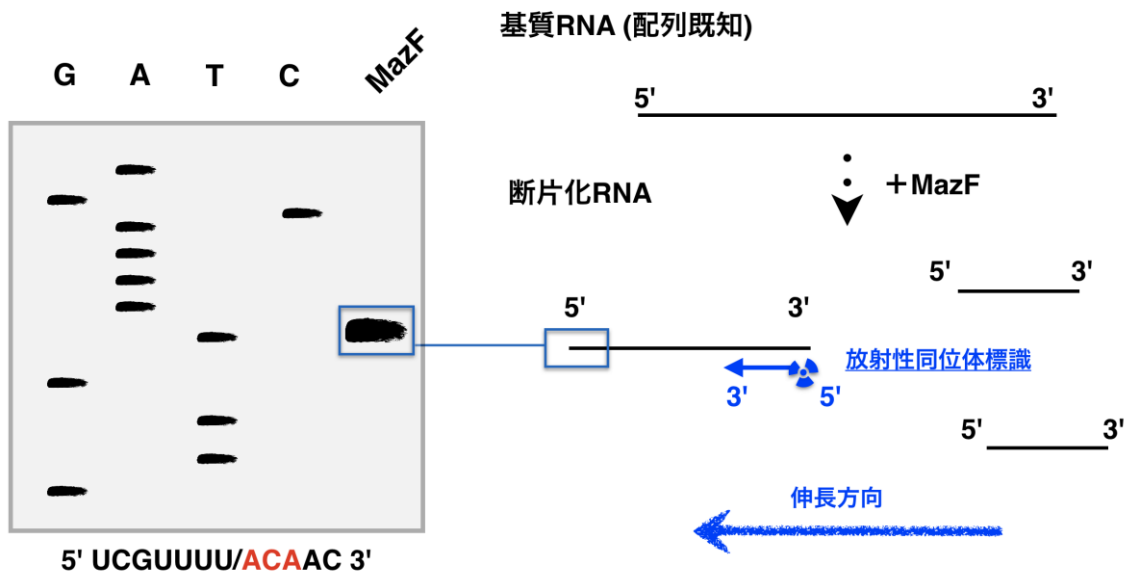


図 2.1 プライマー伸長法による切断配列同定の原理

本手法は直接的に RNA 切断を検出可能な点で優れているが、(1) スループット性に乏しい、(2) 基質 RNA の立体構造由来が誤って切断配列として検出される恐れがある、(3) 切断活性を経時的に追跡することが困難である、(4) MazF が五塩基以上の配列を特異的に切断する際、切断に必要な配列を特定出来ない可能性がある、(5) 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、といった問題点も多い。

・質量分析法

2012 年、Mckenzie らは質量分析法を用いて、配列特異的 RNA 分解酵素の切断配列を特定する手法の開発を行った。彼らは *Pyrobaculum aerophilum*, *Mycobacterium tuberculosis* に保存された II 型 TA 機構の Toxin であり、RNA 切断酵素である VapC の配列を同定した。本手法では RNA 切断酵素により断片化された RNA を MALDI TOF-MS で解析することで、RNA の断片化箇所を求める[71]。本手法は逆転写反応が不要であることや、質量からの直接的な RNA 切断箇所の同定ができる点が優れているが、プライマー伸長法と同様、(1) ス

ループット性に乏しい, (2) 切断活性を経時的に追跡することが困難である, (3) RNA 鎖が長くなるにつれて (解析最大鎖長が 500 nt 程度) 解像度が下がるため[72], MazF が五塩基以上を切断する際にはその切断配列が内部に含まれない可能性が高い, といった問題点を依然として持つ。

本研究では上記問題を解決するために, 超並列シーケンシング法, および蛍光消光現象を用いた RNA 切断活性検出法を組み合わせることでこれらの問題の解決を行った。

2.1.3 MazF の生物工学的応用事例

MazF はその配列特異性や毒性を利用した様々な生物工学的応用も行われている。本研究の目的からは少し遠ざかるが, これらの応用事例に関しても以下に数例紹介する。

・ SPP システム

SPP システムは Single Protein Production の略であり, タカラバイオ株式会社で実用化されている。Suzuki らによって開発された本技術は, その名前に示される通り, 高純度のタンパク質の取得を可能にする。通常, 大腸菌を用いたタンパク質の発現では大腸菌細胞を破碎した後, 目的タンパクと夾雑タンパクが混合されているタンパク分画から, 夾雑タンパクを除去する必要がある。しかしながら, SPP システムでは大腸菌細胞内で目的タンパクを発現させると同時に夾雑タンパクの排除を可能にする。

本システムでは mRNA の ACA を特異的に切断する MazF を組み込んだベクター, ACA 配列を同義置換した目的遺伝子を組み込んだベクターを宿主である大腸菌に形質転換し, 大腸菌内でそれぞれのタンパク質の発現を行う。大腸菌由来のタンパク質の内 mRNA に ACA を含むものは, MazF によりその mRNA が分解され翻訳が行われぬ。一方, ACA 配列を含まない目的遺伝子は細胞内で高発現される。したがって, 細胞内に目的タンパク質

が大量に生産されると同時に、夾雑タンパク質の除去も行われ、得られる目的タンパク質は高純度なものとなる[73, 74] (図 2.2)。

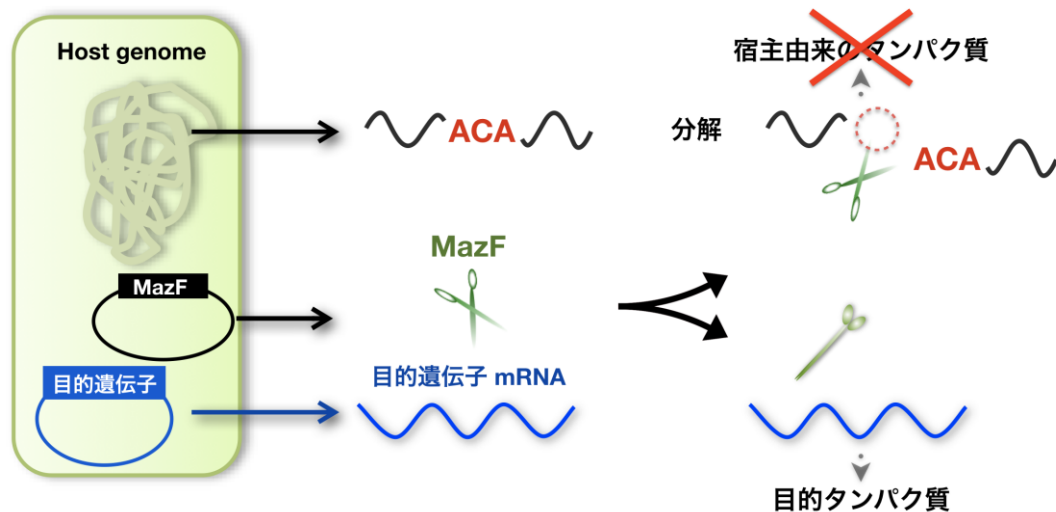


図 2.2 SPP システムの原理

・ MazF を用いた遺伝子発現抑制

2011 年, Yamaguchi らは好塩性古細菌 *Haloquadra walsbyi* から単離した MazF (MazF-hw) が UUAUCA の 7 塩基を特異的に切断する酵素であることを示した。大腸菌の必須遺伝子の中に UUAUCA を含むものは, *rpoB*, *rplC*, *rpmD*, *lolD* の 4 遺伝子存在する。MazF-hw を発現させた際は, これら遺伝子の mRNA が大腸菌細胞内で特異的に切断されることが示され, MazF を用いることによって, 特定遺伝子の不活化が可能となることが示された[29]。2013 年, Qi らによって CRISPRi が開発されるまで真正細菌における遺伝子発現の抑制が不可能であったため[75], 本報告は着目を集めた。MazF を用いた本手法は CRISPRi ほど自由な設計を行うことは不可能であるが, 誘導 RNA を使用する必要等はない。したがって, 今後, もし制限酵素のように種々の切断配列を持つ MazF が揃えられたならば, 特定の転写産物の遺伝子発現抑制を行う手法の一つとして使われる可能性がある。

・MazF を用いた遺伝子治療

Shapira らはヒト C 型肝炎ウイルス (HCV) の遺伝子治療を目的として MazF を用いるという着想を得た。彼らは、(1) 蛍光タンパク質 mCherry, (2) Toxin タンパク質 MazF, (3) HCV プロテアーゼが認識するペプチド配列, (4) Antitoxin タンパク質 MazE, (5) 膜アンカータンパクの PTP1B の融合タンパク作製し、本融合タンパクを小胞体で発現させることに成功した (図 2.3)。

HCV は小胞体で成熟し、その過程で自身のゲノムにコードされているプロテアーゼにより前駆体タンパク質を切断し、成熟する[76]。したがって、HCV が感染していない細胞では Toxin (MazF) の毒性を Antitoxin である MazE が抑制するのに対して、HCV 感染細胞では MazE, MazF 間に存在するプロテアーゼ配列が切断され、MazF が遊離する。この結果、MazF の毒性が発揮され、HCV 感染細胞が特異的に死滅する[77]。同様の発想は Park らによっても報告されており[78]、今後病原性 RNA ウイルスの遺伝子治療に MazF が用いられる可能性がある。

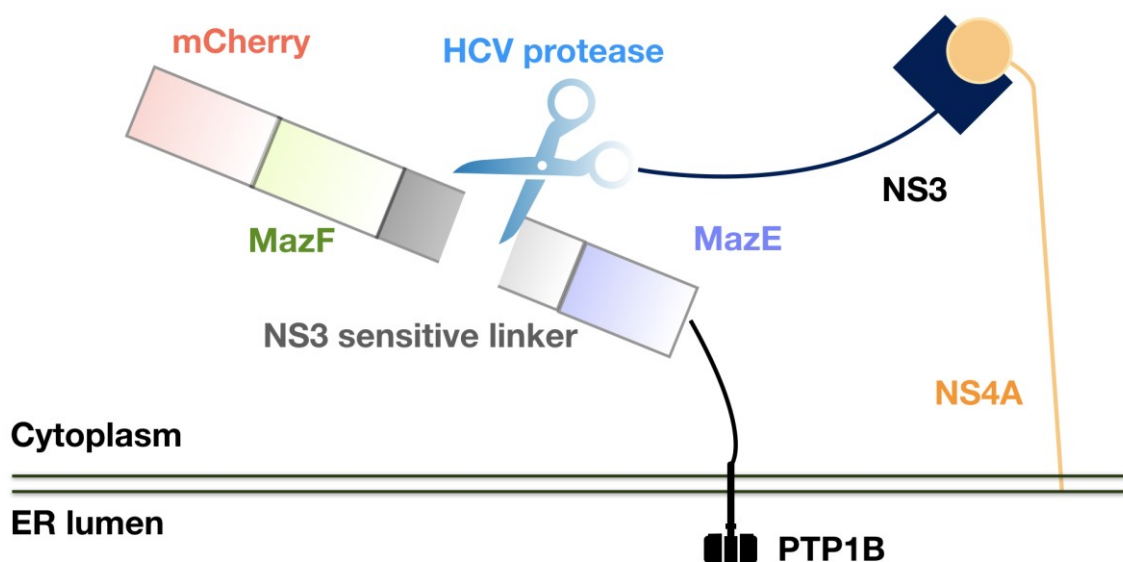


図 2.3 MazF を用いた HCV 感染細胞の駆逐

このように、MazFの酵素学的特性は生物工学的観点からも有用であり、今後MazFの酵素特性の解明を行なっていくことで、様々な応用事例が報告されることが期待される。

2.2 実験方法

2.2.1 使用菌株およびプラスミド

本研究では、クローニング用大腸菌宿主として DH5 α (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を、タンパク質発現用宿主として BL21 (DE3) pLysS (Novagen, Madison, WI, USA) を用いた。pET21c プラスミドは Novagen より購入した。 *graA* 遺伝子がクローニングされた pMD19 プラスミドは TakaraBio (Takara, Shiga, Japan) より購入した。

2.2.2 オリゴヌクレオチド

PCR プライマーは Tsukuba Oligo Service (Ibaraki, Japan) より購入した。また蛍光修飾オリゴヌクレオチドおよびバーコード RNA に関しては Japan Bio Services (Saitama, Japan) より購入した。バーコードは表 2.1 に記載したものをを用いた。

2.2.3 プラスミド構築

Pseudomonas putida のゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、本微生物に保存された *mazE* 遺伝子 (*mazEpp*) ならびに *mazF* 遺伝子 (*mazFpp*) を増幅した。ポリメラーゼには Taq HS DNA polymerase (Takara) を、プライマーは表 2.1 に記載したものをを用いた。得られた PCR 産物を PCR purification kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) によって精製した。pET21c および PCR 産物を *Bam*HI および *Eco*RI (Toyobo, Osaka, Japan) で切断後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿法により精製した。切断した *mazEpp* ならびに *mazFpp* 断片を DNA ligation kit (Takara) を用いて pET21c の制限酵素部位に組み込み、pET21c-*mazEpp* および pET21c-*mazFpp* を構築した。それぞれのプラスミドを大腸菌 DH5 α 株に形質転換し、100 μ g/mL のアンピシリンを含む LB プレートにて 37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。得られたコロニーを 100 μ g/mL のアンピシリンを含む LB 培地中でさらに一晩培養し、これら大腸菌から

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いてプラスミドの抽出を行った。プラスミド配列の確認には AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。

表 2.1 プライマー配列およびバーコード RNA 配列

Name	Sequence (5' to 3')
<i>mazEpp-forward</i>	GGGGATCCGGATGCAGATCAAGATTCAACAGTGG
<i>mazEpp-reverse</i>	GGGAATTCGGCACTTCACGCCCACTGG
<i>mazFpp-forward</i>	GGGGATCCGGGTGAAACGGTTGAAATTCGCCAG
<i>mazFpp-reverse</i>	GGGAATTCGGATCGAATAGGGTTTGCACACG
バーコード RNA	GCUGAUGGCGAUGAUGAACACUGCGUUUGCUGGCUUUGAUGAAA

2.2.4 MazEpp の発現, 精製

pET21c-*mazEpp* をヒートショック法により *E. coli* BL21 (DE3) pLysS へと導入した。本プラスミドを持つ大腸菌を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを含む LB 培地中, 37°C で一晩前培養後, 0.5 L の LB 培地 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリン) へと植え継いだ。大腸菌を 37°C で本培養し, OD600 が 2.0 に達した際に 1 mM のイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) の添加により MazEpp を誘導した。3.5 時間培養後, これら菌体培養液を 7,000 g で遠心し, 菌体を回収し, -80°C で保存した。MazEpp の誘導を行った大腸菌細胞を氷上で融解し, 菌体懸濁用緩衝溶液 (100 mM リン酸緩衝液, 300 mM NaCl, 2.5% グリセロール, 3.2 mM 2-メルカプトエタノール, および 10 mM イミダゾール) に懸濁した。Handy Sonic UR-20P (Tomy Seiko, Tokyo, Japan) を用いて細胞を超音波破碎した後, MazEpp が含まれる上清を 7,000 g で 15 分遠心し回収した。Ni-NTA アガロース (Qiagen) を加え, 2 時間低温室 (4°C) で転倒混和し, MazEpp を Ni-NTA レジンに結合させた。非特異的に吸着したタンパク質は洗浄用緩衝液 (90 mM リン酸緩衝液, 770 mM NaCl, 2.3% グリセロール, 2.9 mM 2-メルカプトエタ

ノール, および 20 mM イミダゾール), ならびに 100 mM 洗浄用緩衝液 (97.5 mM リン酸緩衝液, 290 mM NaCl, 2.4% グリセロール, および 100 mM イミダゾール) を用いて除去した。MazEpp は溶出用緩衝液 (92.5 mM リン酸緩衝液, 280 mM NaCl, 2.3% グリセロール, および 300 mM イミダゾール) で溶出を行った。取得したタンパク質の分子量ならびに純度を SDS-PAGE により確認した。タンパク質濃度は Qubit Protein Assay Kit (Life Technologies) によって決定した。

2.2.5 MazFpp の発現・精製

・小スケール

pET21c-*mazFpp* を *E. coli* BL21 (DE3) pLysS へと導入した。これらの大腸菌を 40 mL の LB 培地に植え継ぎ, 37°C で培養した。1 mM の IPTG を加え MazFpp の誘導を行った。37°C で 1 時間培養後, 7,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心し, 菌体を回収した。これら菌体を菌体懸濁用緩衝溶液 (50 mM KH₂PO₄, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10 % グリセロール, 0.5 % Triton X-100, 10 mM イミダゾール) に溶解した。懸濁した菌体を Handy Sonic UR-20P を用いて細胞を超音波破碎した後, 15,000 rpm で 10 分間遠心し, 上清を回収した。回収した上清に Ni-NTA レジンを加え, 4°C で 1 時間転倒混和した。非特異的に吸着したタンパク質は洗浄用緩衝溶液 (200 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 10 mM イミダゾール) で除き, MazFpp は溶出洗浄用緩衝液 (200 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 100 mM もしくは 250 mM イミダゾール) で溶出した。取得したタンパク質の分子量ならびに濃度は Agilent Technologies Protein 80 Kit により確認した (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)。

・大スケール

pET21c-*mazFpp* を *E. coli* BL21 (DE3) pLysS へと導入した。本プラスミドを持つ大腸菌を 100 µg/mL のアンピシリンを含む LB 培地中 37°C で一晩前培養後, 1 L の LB 培地 (100

μg/mL アンピシリン) へと植え継いだ。大腸菌を 37°C で本培養し、OD600 が 4.0 に達した際に 1 mM の IPTG の添加により誘導した。3.5 時間培養後、これら菌体培養液を 7,000 g で遠心した。回収した菌体は -80°C で保存した。MazFpp の誘導を行った大腸菌細胞を氷上で融解し、菌体懸濁用緩衝溶液 (20 mM リン酸緩衝液, 50 mM イミダゾール, 300 mM NaCl, および 5 mM 2-メルカプトエタノール) に懸濁した。Handy Sonic UR-20P を用いて細胞を超音波破碎した後、MazFpp が含まれる上清を 7,000 g で 15 分遠心し回収した。上清を 0.45 μm のろ過膜 (Millex, Darmstadt, Germany) に通し、細胞懸濁物を除いた。1 mL His-Trap HP カラム (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) を 10 mL の結合用緩衝液で平衡化し、カラムに添加した。32 mL の懸濁用緩衝液でカラムの洗浄を行った。除き切れていない非特異的吸着タンパク質と MazFpp は、AKTA pure plus (GE Healthcare) により徐々にイミダゾール濃度を上げることで分離した。取得したタンパク質の分子量および純度は SDS-PAGE により確認した。タンパク質濃度は Qubit Protein Assay Kit (Life Technologies) によって決定した。

2.2.6 *In vitro* 転写および精製

本研究では *graA* 遺伝子の転写産物および六種類の標準 RNA (500-2, 1000-1, 1000-2, 1000-3, 1000-4, および 1000-5) [79] を基質 RNA として用いた。六種類の標準 RNA は 5' 末端に三塩基のグアニンを、3' 末端に 30 塩基の連続したアデニン配列をもつ。*graA* 遺伝子をコードする pMD19 プラスミドを *Hind*III (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) で切断した。500-2, 1000-1, 1000-2, 1000-3, 1000-4 をコードする pUC19 プラスミドを *Bbs*I によって切断した。同様に 1000-5 をコードする pUC19 プラスミドを *Btg*ZI (New England Biolabs) によって切断した。切断断片を PCR purification kit で精製後、MEGAscript T7 Kit (Life Technologies) を用いて *In vitro* 転写を行った。操作は製造元の操作手順書に従った。RNA は RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research, Orange, CA, USA) により精製した。RNA の濃度は Qubit RNA Assay Kit (Life Technologies) によって決定した。

2.2.7 超並列シーケンシング

300 ng の標準 RNA 1000-1, 1000-2, 1000-3, 1000-4, および 1000-5 を混合し, これを切断基質とした。本基質を 37°C で 15 分, 2 U MazF (Takara) と 4U の RNase inhibitor (Takara) (RNase A の活性を阻害する) と混合し, 反応させた。酵素反応溶液には MazF buffer (Takara) を用いた。同様に, 本基質を 37°C で 15 分, 酵素反应用緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.01% TritonX-100, および 4 U の RNase inhibitor) 中で 300 ng の MazFpp と混合し, 反応を行った。対照反応として NEBNext RNase III Reaction Buffer (New England Biolabs) 中で本基質と 2.5 U の RNase III (New England Biolabs) を混合し, 37°C で 15 分酵素反応を行った。これら RNA を Clean & Concentrator™-5 で精製し, T4 Polynucleotide Kinase Buffer (Takara) および 1 mM ATP (Ambion, Austin, TX, USA) を含む溶液中で 20 U の T4 polynucleotide kinase (Takara) と混合し, 37°C で 1 時間反応させた。RNA を再度 RNA Clean & Concentrator™-5 で精製後, 125 pmol のバーコードおよび精製した RNA 断片を RNA ligation buffer (Takara) 中で 50 U の T4 RNA ligase (Takara) と混合し, 15°C で 18 時間反応させた。RNA は RNA Clean & Concentrator™-5 で精製し, RNA 濃度を Qubit RNA Assay Kit を用いて決定した。シーケンシングライブラリーは NEB Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina protocols (New England Biolabs) を用いて調整した。構築ライブラリーの評価には Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies) を用いた。シーケンシングには Illumina MiSeq を用い, 試薬キットは MiSeq 500 cycles reagent kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いた。

2.2.8 データ解析

リード 1 およびリード 2 の fastq ファイルを別々に解析した。解析ソフトとして CLC Genomics Workbench version 7.5.1 (CLC bio, Aarhus, Denmark) を用いた。得られた配列の質を担保するために, Limit = 0.05, a maximum number of ambiguities = 0 という解析値を用いて,

質の低い塩基の除去を行った。バーコード配列 3 塩基末端 15 塩基 (CTGGCTTTGATGAAA) を含むリードを mismatch cost = 5, gap cost = 5, minimum scores for internal match = 15 の解析値を用いて抽出した。抽出した配列からバーコード配列を除き, さらにその結果 15 塩基以下になったリードも除去した。これら処理済みリードをリファレンス配列 (1000-1, 1000-2, 1000-3, 1000-4, および 1000-5) にマッピングした。マッピングには以下解析値を用いた。 mismatch cost = 3, insertion cost = 3, deletion cost = 3, length fraction = 1, similarity fraction = 1。 Relative coverage increase を n+1 番目における塩基の冗長度 n 番目の塩基の冗長度で除算した値と定義した。これら値を全ての参照配列の各塩基において算出し, 降順に並べた。冗長度が 1000 未満のものは解析より除いた。これら塩基のうち Relative coverage increase が上位五のもの (図 2.5 B, 塩基 X) を 1000-1, 1000-2, 1000-3, 1000-4, および 1000-5 配列よりすべて抽出した。またこれら塩基の 5 塩基上流ならびに 5 塩基下流も抽出後, 全 25 配列を WebLogo[80]により解析した。Fastaq ファイルは DNA Data Bank of Japan Sequence Read Archive (DRA004282) に登録した。

2.2.9 MazFpp および MazEpp の活性測定

3 pmol の MazFpp を 0.3, 3, および 30 pmol の MazEpp と混合し, 室温で 10 分間反応させた。この後, 100 ng の標準 RNA 500-2 と混合し, 37°C で 30 分間, 酵素反応用緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.01% TritonX-100, および 4 U の RNase inhibitor) 中で反応を行なった。RNA Clean & Concentrator™-5 で精製後, Gel loading buffer II (Ambion) をそれぞれ反応系に加えたのち, 95°C で 5 分間加熱後, 7M 尿素を含んだ 10%ポリアクリルアミドゲルで泳動した。RNA は SYBR Gold (Life Technologies) で染色し, Typhoon 9210 imager (GE Healthcare) を用いて可視化した。

2.2.10 蛍光を用いた RNA 切断活性の検出

本研究では蛍光共鳴エネルギー移動を利用し、MazF の切断配列の同定を行った (図2.4)。100 ng の MazFpp, もしくは RNase A (Novagen) と 20 pmol の蛍光修飾オリゴヌクレオチドを酵素反応用緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.01% TritonX-100, および 4 U の RNase inhibitor) 中で混合し、37°C で反応させた。Light Cycler 480 system (Roche, Basel, Switzerland) を用いて、蛍光強度を 60 秒ごとに測定した。フィルターには 483 nm の励起フィルターおよび 533 nm の検出フィルターを用いた。なお実験は n=3 で行った。

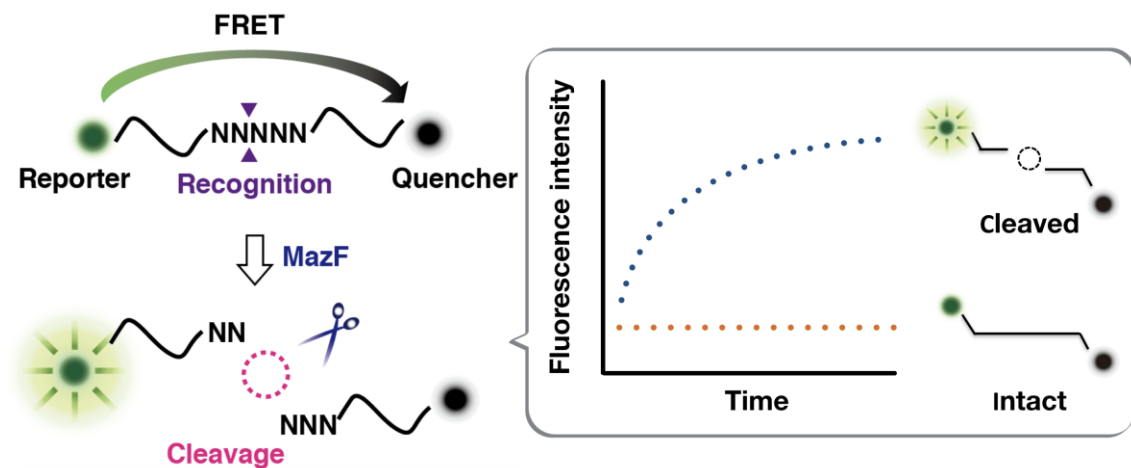


図 2.4 蛍光共鳴エネルギー移動を用いた RNA 切断活性測定 本手法では 5' 末端に蛍光基 (6-FAM: 6-carboxyfluorescein), 3' 末端に消光基 (BHQ-1: black hole quencher-1) を修飾した短鎖オリゴヌクレオチドと MazF 酵素と反応を行う。酵素反応前は蛍光共鳴エネルギー移動により、5' 末端の蛍光が消光状態にある。蛍光修飾オリゴヌクレオチド内部に含まれる配列 (図中 NNNNN) が MazF の切断配列と一致した際、蛍光修飾オリゴヌクレオチドが切断され、蛍光共鳴エネルギー移動が解消される。したがって、5' 末端に修飾した 6-FAM の蛍光強度が増加する [75]。

2.2.11 *graA* 遺伝子の転写産物を用いた切断配列特異性の確認

100 ng の *graA* 転写産物もしくは RNA 500-2 に 50 ng の MazFpp を加え、37°C で反応させた。酵素反応用緩衝溶液には次の組成を用いた。20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.01% TritonX-100, および 4 U の RNase inhibitor (Takara)。1, 5, 15, 30 分後、Gel loading buffer II (Ambion) を加え、95°C で 5 分間加熱し、7M 尿素を含む 10%ポリアクリルアミドゲルで

泳動した。RNA は SYBR Gold (Life Technologies) で染色し, Typhoon 9210 imager (GE Healthcare) を用いて検出した。

2.2.12 5' RACE 解析

250 ng の標準 RNA500-2 を酵素反応用緩衝溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 0.01% TritonX-100) 中でバッチ精製した 25 ng の MazFpp と混合し, 37°C で 1 時間反応させた。本 RNA をフェノール/クロロホルム抽出および, イソプロパノール沈殿により回収した。沈殿を T4 Polynucleotide Kinase Buffer (Takara) に溶解し, T4 Polynucleotide kinase (Takara), および 1 mM ATP (Ambion) を加え, 37°C で 1 時間反応させた。バーコード RNA および T4 RNA ligase (Takara) を加え, RNA ligation buffer (Takara) 中で 37°C で 1 時間反応させた。これら 5' RACE adaptor (Ambion) をライゲーションし, 3' RACE adaptor (Ambion) を用いて逆転写した。アダプターは FirstChoice® RLM-RACE Kit (Ambion) 付属のものを使用し, プロトコルは本製造元のもの踏襲した。FirstChoice® RLM-RACE Kit 付属の 5' RACE inner primer (Ambion) および 3' RACE inner primer (Ambion), Taq HS DNA polymerase (Takara) を用いて, PCR 増幅した。増幅した PCR 産物をフェノール/クロロホルム抽出および, エタノール沈殿法を用いて精製した。DNA ligation kit (Takara) を用いて PCR 産物を pT7Blue T-Vector (Novagen) にライゲーションを行った。構築したプラスミドを大腸菌 DH5 α 株 (Nippon Gene) に導入し, プラスミドの増幅を行った。これらの大腸菌から QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いてプラスミドの抽出を行い, CEQ-8000 DNA sequencer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) によりそのシーケンスを確認した。

2.2.13 Accession 番号, GI 番号

本研究で使用した GenBank accession 番号, ならびに GI 番号は次の通りである。*mazEpp* 遺伝子 (NC_002947.3, 26986745), *mazFpp* 遺伝子 (NC_002947.3, 26986745), *graA* 遺伝子

(AE015451.1, 24987239), 500-2 (AB610940.1, 321117288), 1000-1 (AB610944.1, 321117292),
1000-2 (AB610945.1, 321117293), 1000-3 (AB610946.1, 321117294), 1000-4 (AB610947.1,
321117295), および 1000-5 (AB610948.1, 321117296)。

2.3 実験結果

2.3.1 超並列シーケンシング法を用いた切断候補配列同定系の確立

超並列シーケンシング法では対象となる核酸分子を「深く」シーケンシングすることが可能であり、本技術を用いて得られたデータの信頼性は高い。また一度の実験で得られる配列量は膨大な量にのぼり、大量のサンプルを並列的に解析することが可能である[81]。以上二点の理由から、本研究では超並列シーケンシングを用いることで高精度・高スループットな MazF 酵素の切断配列同定系の構築を試みることにした。

基質 RNA には (1) 二次構造を形成しづらく、(2) 内部に含まれる配列が多様性に富む、といった二点が求められた[27]。そこで本研究では標準 RNA (RNA 1000-1, 1000-2, 1000-3, 1000-4, および 1000-5) を使用することとした。これら配列は独自のコンピューターアルゴリズムによって設計されており、5'末端に 3 塩基のグアニンを、3'末端に 30 塩基の連続したアデニン配列を、内部に 1000 塩基の配列を持つ。内部の塩基はほぼ同数の A, U, G, C を含むためその配列は多様性に富み、強固な二次構造を形成しないため[79]、上述した二点の条件を満たす。

系を構築するにあたり、コントロールとして切断配列が既知の MazF を使用する必要があった。そこで本研究では大腸菌の MazF を実験に用いることにした。先に述べた通り、本酵素は歴史上初めて切断配列が同定された MazF であり、その認識切断配列は ACA であることは数多くの論文で証明されている[12, 70, 82]。

図 2.5 に本手法の概要を示した。MazF で RNA を切断した際、その 5'末端が MazF に切断された箇所と一致する。シーケンシングライブラリー構築の過程でこれら 5'末端が失われる可能性があったため、本研究では断片化 RNA の 5'末端に 45 nt のバーコード RNA のライゲーション反応を行い、その保護を図った (図 2.5 A)。したがって、本手法ではバーコー

ド RNA の 3'末端直下に存在する断片化 RNA の 5'末端が MazF の切断配列と一致する (図 2.5 A)。

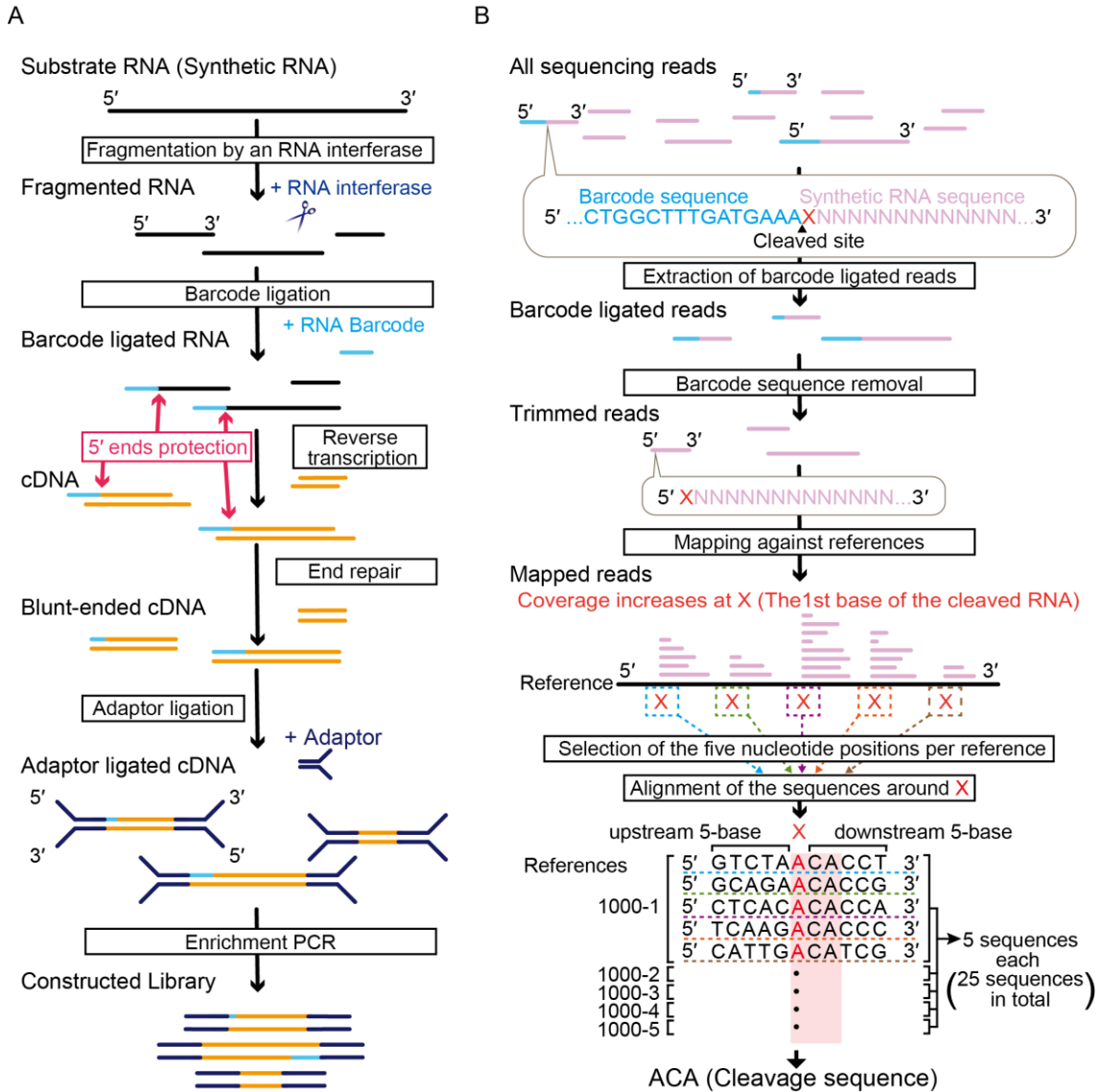


図 2.5 本手法の概要 (A) シーケンシングライブラリーの構築, (B) 解析手順 (詳しくは本文を参照)。

解析の過程ではバーコード RNA の 3'末端 15 塩基 (CTGGCTTTGATGAAA) の配列を含むリードを抽出し、本配列より上流にある全ての配列を除去した。これら処理済みリードを五種類の参照配列 (1000-1, 1000-2, 1000-3, 1000-4, および 1000-5) にマッピングを行った (図 2.5 B)。

バーコード配列を除去したリードをマッピングした結果、全ての参照配列において、冗長度に大きく上昇した塩基が観測された (図 2.6 A)。本手法ではこれらの塩基の上流または下流に保存された配列が切断配列となる (図 2.5 B)。そこでこれら配列を同定するために、解析の段階で次の二種類の基準を設定した。まず (1) 冗長度が 1000 を超える塩基のみを解析対象とした。これにより切断配列の誤検出を減ずることが可能となる (なおマッピングされた総リード数は 332,916 であった)。加えて、(2) Relative coverage increase (n+1 番目における塩基の冗長度 n 番目の塩基の冗長度で除算した値と定義) の値が大きなものを選定した。それぞれの参照配列において、各塩基の Relative coverage increase を降順に並べ、最大のものより上位五つのものを選定した (表 2.2)。この後、同定された塩基の五塩基上流および五塩基下流を抽出した (図 2.6 B)。抽出された計 25 配列 (五つの参照配列よりそれぞれ五配列) を整列し、WebLogo を用いて解析した。その結果、目的とする ACA 配列の抽出に成功した (図 2.6, 表 2.2)。このことから本手法が、MazF の配列同定系として有効であることが示された。

また本研究においては対照系として、二本鎖 RNA 特異的分解酵素である RNase III (5'-PO₄ を生成) を用いた。ライブラリーを構築し、マッピングを行なったところ、372,085 のリードが獲得された。そこで同様の手順で解析を行ったが、この場合は予測された通り、保存された塩基は存在しなかった (図 2.7, 表 2.3)。以上の結果から、本手法が配列特異的 RNA 分解酵素においてのみ有効であることが確認された。

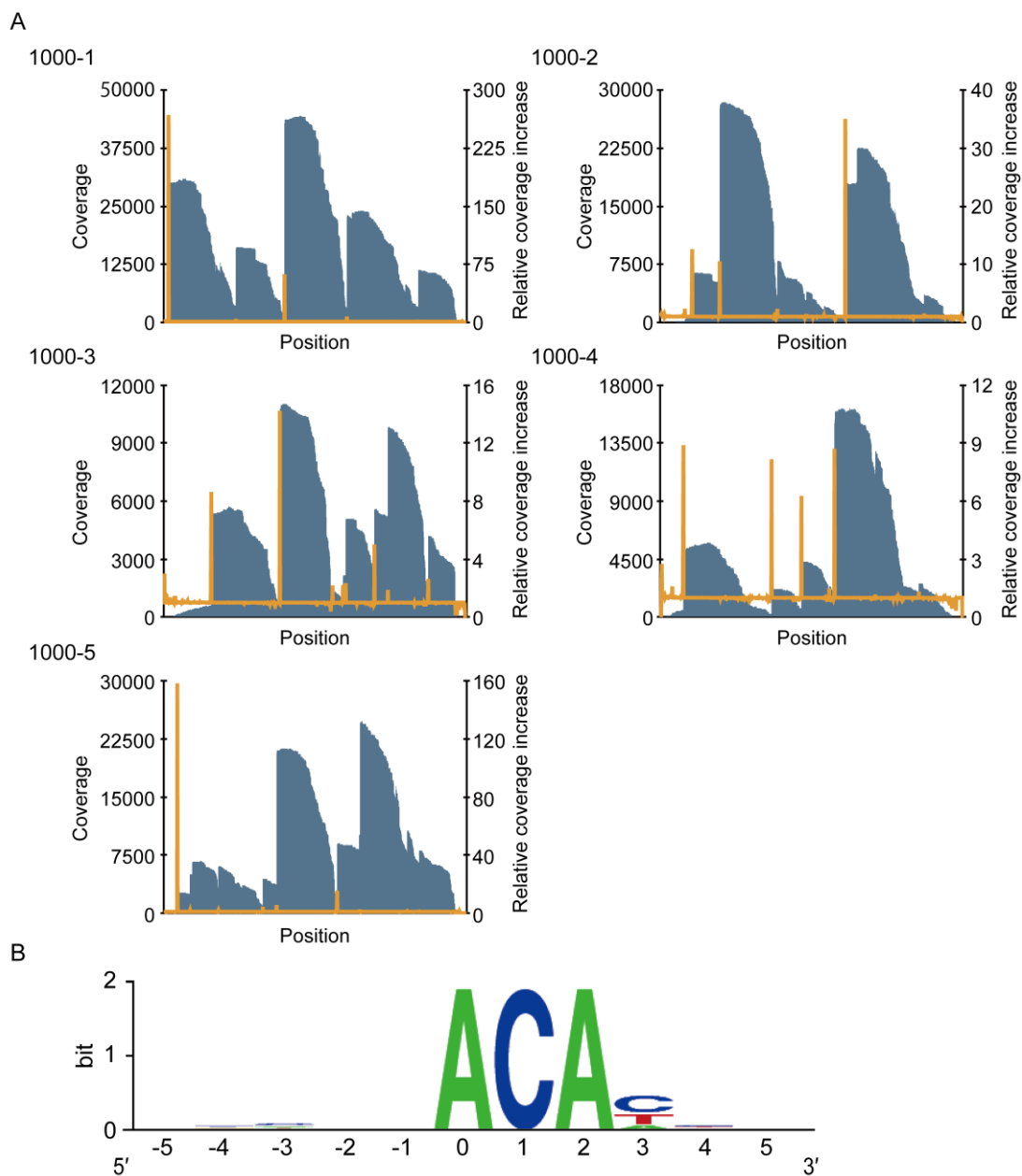


図 2.6 MazF における切断配列の同定 (A) 冗長度 (青) ならびに Relative coverage increase (橙), (B) 保存された塩基の抽出。Relative coverage increase が増加した塩基を 0 と設定した。解析には表 2.2 に示した計 25 配列を使用した。

表 2.2 大腸菌 MazF を用いて RNA 断片化時に抽出された全 25 配列

RNA	Rank	Position	Relative coverage increase	Coverage	Sequence (5' to 3') ^a
1000-1	1	16	268.2	29,499	GTCTA <u>A</u> CACCT
	2	412	62.3	42,992	GCAGAA <u>A</u> CACCG
	3	625	7.5	22,707	CTCAC <u>A</u> CACCA
	4	246	4.4	15,874	TCAAG <u>A</u> CACCC
	5	869	3.3	11,200	CATTG <u>A</u> CATCG
1000-2	1	632	35.1	17,683	AAAGG <u>A</u> CACTC
	2	109	12.6	6,249	ACCATA <u>A</u> CAACC
	3	203	10.5	27,614	GCCCA <u>A</u> CACGT
	4	400	2.3	7,877	ACCCA <u>A</u> CATAA
	5	901	1.5	3,566	CGTTT <u>A</u> CACCG
1000-3	1	396	14.2	10,600	TCAGG <u>A</u> CATAC
	2	162	8.6	5,241	GGCCG <u>A</u> CAAGT
	3	719	5.0	5,529	AGCGT <u>A</u> CATTC
	4	903	2.6	4,187	TCTAG <u>A</u> CAATA
	5	621	2.3	5,036	GGTAG <u>A</u> CACCG
1000-4	1	79	8.9	5,112	GCGTC <u>A</u> CACCT
	2	595	8.7	15,066	GGTAC <u>A</u> CACAG
	3	380	8.2	2,131	CTCTA <u>A</u> CACTC
	4	482	6.3	4,241	TGAAT <u>A</u> CACGT
	5	577	1.5	2,390	CGCGT <u>A</u> CATTT
1000-5	1	592	15.7	8,841	CCCATA <u>A</u> CAACC
	2	385	5.6	20,660	TAGATA <u>A</u> CACTC
	3	338	4.3	4,421	GAATA <u>A</u> CATGC
	4	48	2.7	2,619	GGAAC <u>A</u> CATCG
	5	670	2.4	24,424	GGACA <u>A</u> CATTC

^a 下線は Relative coverage increase が増加した塩基を表す。

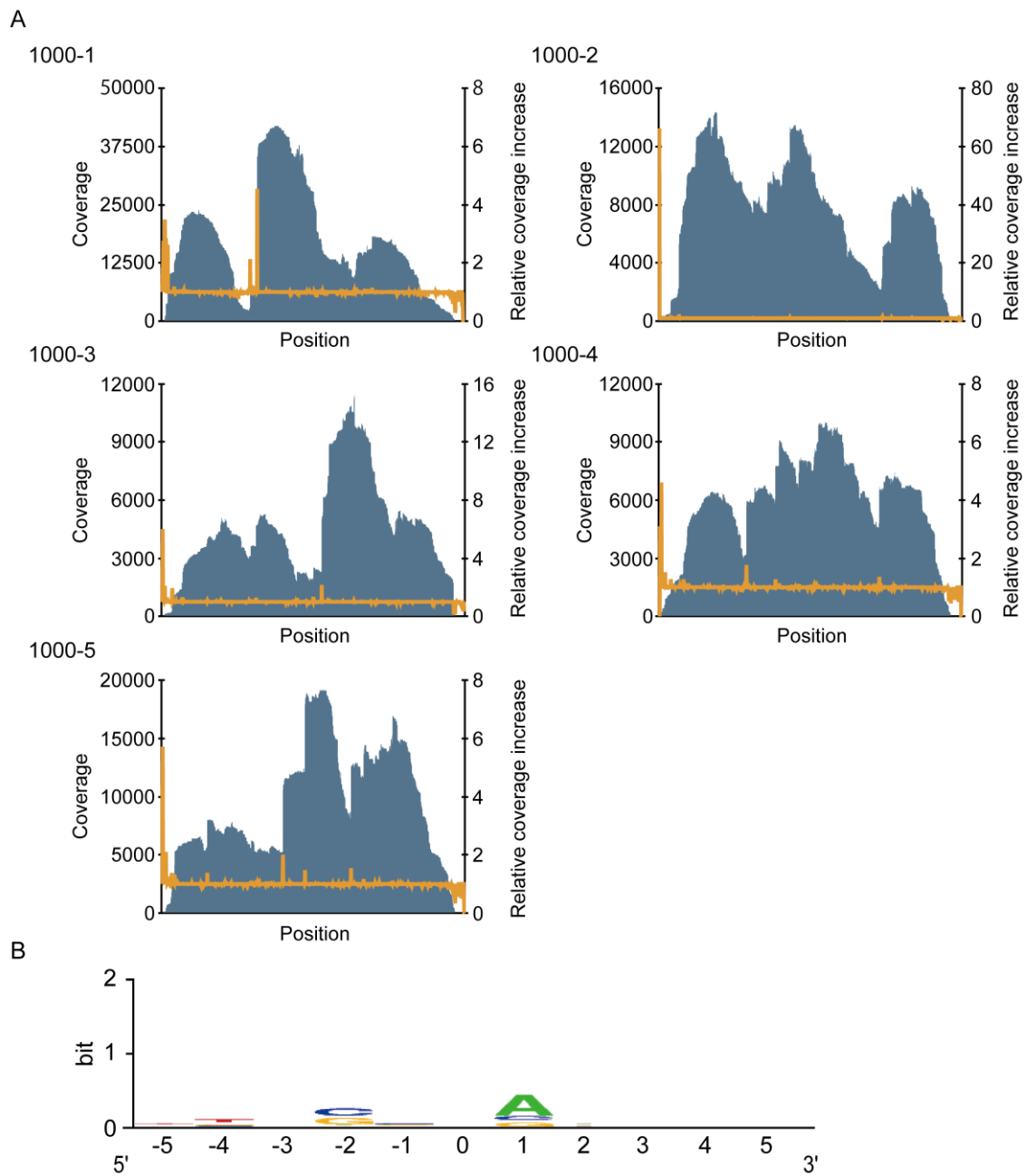


図 2.7 RNase III を用いた際の共通配列 (A) 冗長度 (青) ならびに Relative coverage increase (橙), (B) 保存された塩基の抽出。Relative coverage increase が増加した塩基を 0 と設定した。解析には表 2.3 に示した計 25 配列を使用した。

表 2.3 RNase III を用いて RNA 断片化時に抽出された全 25 配列

RNA	Rank	Position	Relative coverage increase	Coverage	Sequence (5' to 3') ^a
1000-1	1	326	4.6	35,230	TCCCT <u>I</u> CAGAA
	2	15	2.8	3,621	GGTCT <u>A</u> ACACC
	3	12	2.7	1,108	ATCGG <u>I</u> CTAAC
	4	21	2.6	9,945	ACACCT <u>A</u> TTCG
	5	302	2.1	5,853	TGAAGG <u>G</u> AACA
1000-2	1	69	2.3	5,301	TGACCG <u>A</u> AATCC
	2	41	2.0	1,350	TTTGAC <u>G</u> GTGC
	3	763	1.5	4,511	CTAGCG <u>G</u> AGGCG
	4	793	1.3	7,417	CTCGC <u>I</u> AGACG
	5	760	1.3	2,904	CTTCT <u>A</u> GCGAG
1000-3	1	546	2.2	4,967	TGTCC <u>I</u> AAGCT
	2	518	1.3	2,552	TGCGG <u>A</u> CTGTC
	3	72	1.3	2,301	CCTCT <u>A</u> ATTCG
	4	322	1.3	4,677	TCGCG <u>A</u> CTATC
	5	462	1.3	2,294	AGTTC <u>I</u> AAGGT
1000-4	1	299	1.8	5,684	TGTT <u>C</u> GATGCG
	2	752	1.4	6,519	ATCGA <u>A</u> TA
	3	41	1.3	1,477	ATACG <u>I</u> AAGGC
	4	84	1.3	2,835	ACACCT <u>I</u> GCTTA
	5	398	1.3	7,699	CAGGT <u>A</u> ATAGC
1000-5	1	414	2.0	10,590	GTACCG <u>A</u> AAGCT
	2	646	1.5	12,564	TTCGG <u>I</u> ATACC
	3	489	1.5	17,929	GAGAC <u>C</u> AACTA
	4	156	1.4	7,981	TTGGT <u>C</u> ACGCT
	5	35	1.4	2,403	TTCGG <u>A</u> ATCTT

^a 下線は Relative coverage increase が増加した塩基を表す。

2.3.2 *Pseudomonas putida* 由来の MazF の獲得及びその活性測定

大腸菌の MazF の切断配列を抽出することに成功したため、本研究では次に配列が未知の MazF が切断する配列を、超並列シーケンシング法を用いて推定可能であるかを調査することとした。*Pseudomonas putida* は物質生産に広く用いられる微生物である。また環境汚染物質の除去能を有することから、生物学的環境修復分野においても着目されている[83]。したがって、本微生物の生育に関わる酵素の特性解明は産業分野の観点から有用であると考えられた。そこで本研究では *P. putida* ゲノム上の PP0771 に存在が予見されている MazF (MazFpp) をモデルとして選定した。

MazFpp はアミノ酸の配列上、大腸菌の MazF と 34.8%の相同性を示す (図 2.8)。しかしながら、本酵素が真に RNA 切断酵素であるかは不明であった。そこで本研究ではアフィニティクロマトグラフィーを用いて MazFpp の取得を行った (図 2.9 A)。取得した酵素を基質 RNA と反応させ、RNA を泳動した際、複数の RNA 断片が確認された (図 2.9 B, レーン 3)。本結果から MazFpp が短鎖の RNA を切断する機能酵素であることが示唆された。

確認された RNA の切断が RNase の混入である可能性を除去するために、次に PP_0770 にコードされている Antitoxin 分子 (MazEpp) についても精製を行った (図 2.9 A)。MazFpp を MazEpp と混合した際、MazFpp の RNA 切断活性が MazEpp の酵素量依存的に阻害されることを観測した (図 2.9 B, レーン 4-6)。これらの結果から、MazEpp が MazFpp と TA 機構を構成することが判明した。

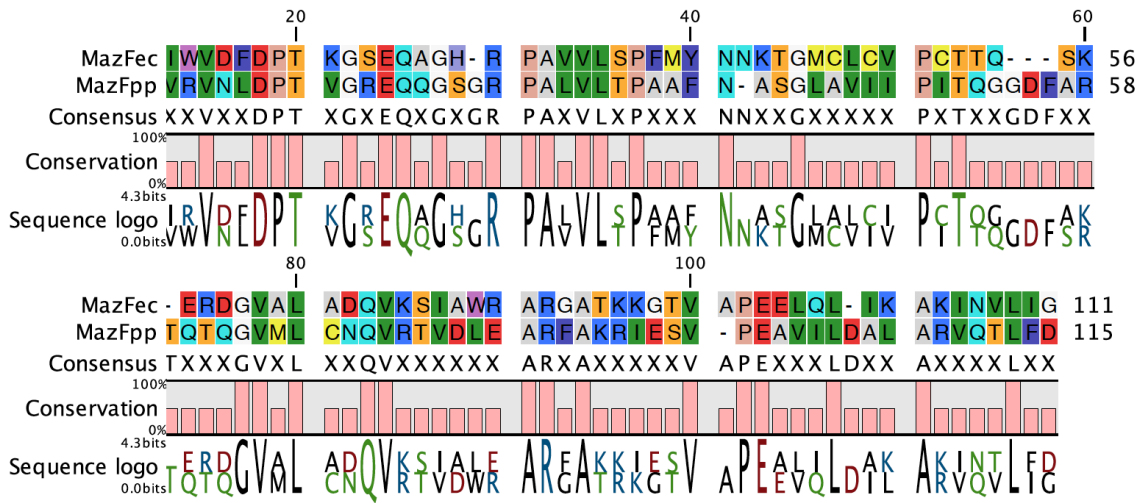


図 2.8 大腸菌の MazF (MazFec) と *P. putida* MazF (MazFpp) のアラインメント

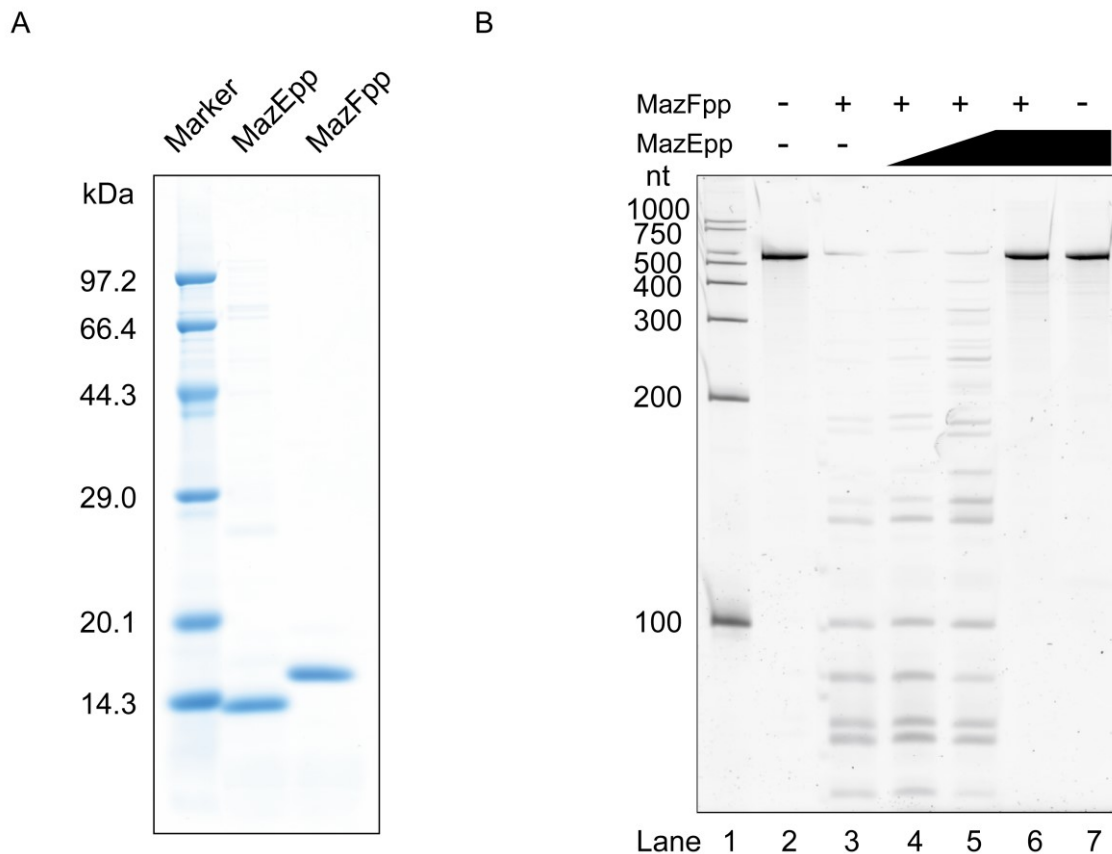


図 2.9 *P. putida* に保存された MazEF (A) ヒスチジンタグが付加された MazEpp および MazFpp の純度および分子量, (B) MazEpp および MazFpp の酵素活性の測定。533 base の標準 RNA 500-2 とこれらの酵素との反応を行った。レーン 1, ラダー。レーン 2, 対照反応。酵素非添加系。レーン 3-6, 3 pmol の MazFpp を添加。レーン 4-6, 0.3, 3 および 30 pmol の MazEpp をそれぞれ添加。レーン 7, 30 pmol の MazEpp を添加。

2.3.3 MazFpp の切断配列の特定

MazFpp が Toxin 分子として機能することが判明したため、次に本酵素の切断配列を超並列シーケンシング法により特定することとした。大腸菌の MazF で行った実験系と同様の手順で五種類の標準 RNA を MazFpp で切断後、超並列シーケンシング法を用いて RNA 切断箇所の解析を行った。WebLogo を用いて 25 の配列を解析した結果、UAC の三塩基が切断箇所周辺に保存されていることが判明した (図 2.10 B)。また、これらの配列において冗長度がアデニン (UAC) で増加していたことから、MazFpp が UAC 配列を特異的に切断し、RNA を U および A の間で切断していると考えられた (図 2.10, 表 2.4)。

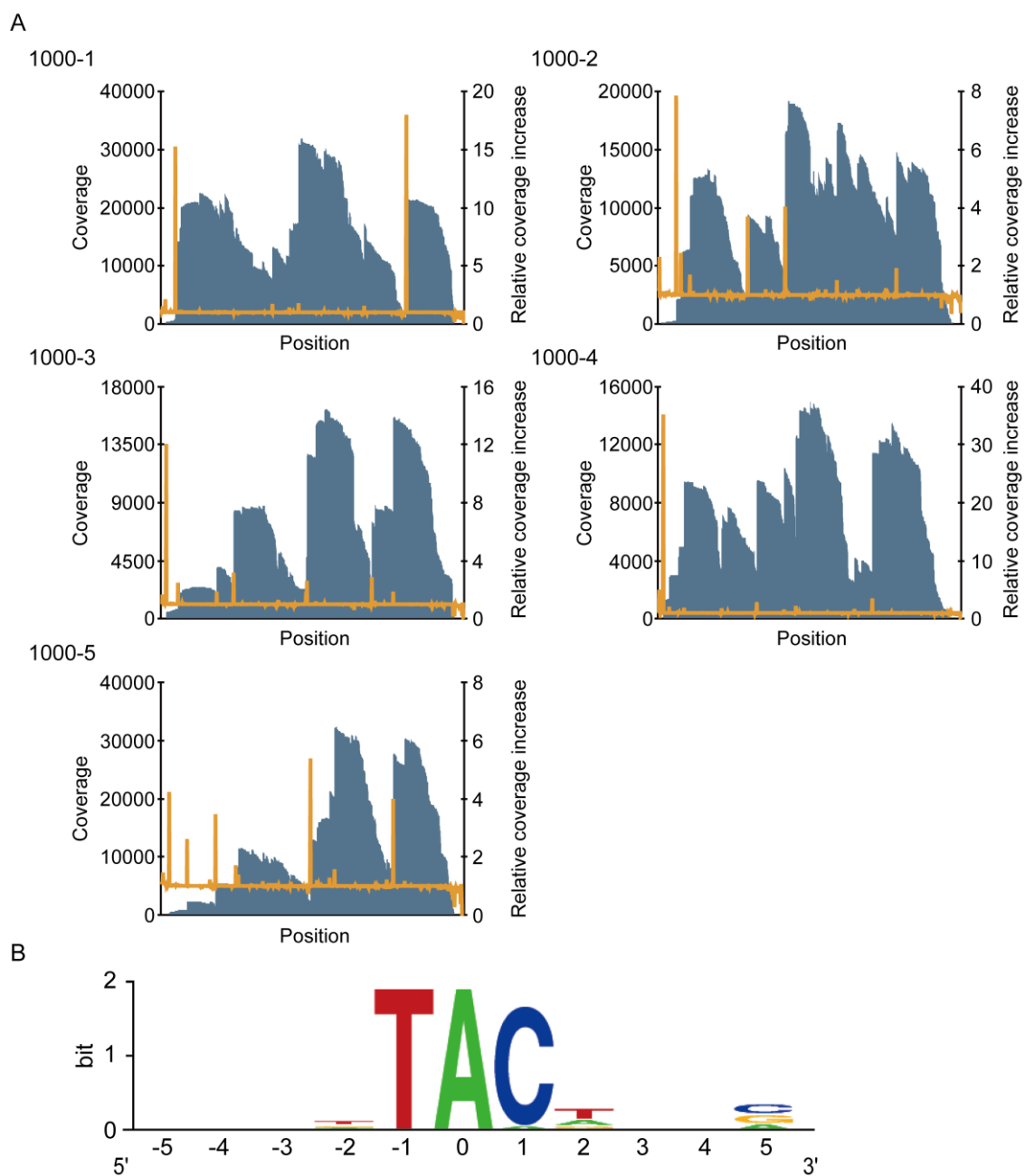


図 2.10 MazFpp における切断候補配列の特定 (A) 冗長度 (青), ならびに Relative coverage increase (橙), (B) 保存された塩基の抽出。Relative coverage increase が増加した塩基を 0 と設定した。解析には表 2.4 に示した計 25 配列を使用した。

表 2.4 MazFpp を用いて RNA 断片化時に抽出された全 25 配列

RNA	Rank	Position	Relative coverage increase	Coverage	Sequence (5' to 3') ^a
1000-1	1	837	18.0	21,108	CTATT <u>A</u> CTTCG
	2	49	15.3	13,897	GATATA <u>A</u> CTGCC
	3	469	1.8	30,996	TTCTT <u>A</u> CCAGC
	4	380	1.7	13,145	TAAGT <u>A</u> CACGA
	5	693	1.6	17,256	GATTT <u>A</u> CTGCC
1000-2	1	62	7.9	2078	CGGCT <u>A</u> CTGAC
	2	434	4.0	16,347	GGCTT <u>A</u> CAGTG
	3	306	3.7	9,344	ATGATA <u>A</u> CTAGA
	4	78	2.5	5,406	CCCTT <u>A</u> CGTAA
	5	813	1.9	14,705	CTAGT <u>A</u> CAGCC
1000-3	1	248	3.2	8,281	AGATT <u>A</u> CTAGA
	2	719	2.9	7,459	AGCGT <u>A</u> CATTC
	3	498	2.6	12,618	ATAAT <u>A</u> CGACC
	4	58	2.5	1928	GCGTT <u>A</u> ATTAG
	5	190	1.9	3,960	GAGGT <u>A</u> CTTAG
1000-4	1	18	35.2	1302	ACTGT <u>A</u> CTCTC
	2	731	3.5	11,370	CGTTT <u>A</u> CTGAC
	3	337	2.9	9,459	CCAAT <u>A</u> CGTTG
	4	470	2.2	12,505	GGAGT <u>A</u> CTGAC
	5	38	2.1	2,849	ACCAT <u>A</u> CGTAA
1000-5	1	510	5.4	12,967	CGTTT <u>A</u> CTCAG
	2	792	4.0	27,649	CGTTT <u>A</u> CATCA
	3	186	3.5	5,388	CAGGT <u>A</u> CAATG
	4	89	2.6	2,214	TGACT <u>A</u> CACGG
	5	255	1.7	8,345	ACATT <u>A</u> CTGCG

^a 下線は Relative coverage increase が増加した塩基を表す。

そこで次に蛍光共鳴エネルギー移動を用いて、超並列シーケンシング法で判明した切断候補配列 (UAC) が真に MazFpp の切断配列であるかを確認することとした。図 2.4 に示した通り、本手法では蛍光修飾オリゴヌクレオチドが切断された際にのみ、蛍光強度の増加が観測される [84]。本研究では表 2.5 に記載したオリゴヌクレオチドを用いて、MazF の切断配列の特定を行った。

表 2.5 本研究で用いた蛍光修飾オリゴヌクレオチド

Name	Sequence (5' to 3') ^a
DR-13-UAC	AAAAA <u>UAC</u> AAAAA
D-13-AAA	AAAAAAAAAAAAA
R-13-UCUCG	<u>UCUCGGUGCGUUG</u>
R-13-GUUGU	<u>GUUGUCAUGCCGG</u>
R-13-UGACA	<u>UGACACGAACCGC</u>
DR-13-CAC	AAAAA <u>CAC</u> AAAAA
DR-13-AC	AAAAA <u>TAC</u> AAAAA
DR-13-UAU	AAAAA <u>UAU</u> AAAAA

^a 下線は RNA ヌクレオチドを、それ以外は DNA ヌクレオチドを示す。

超並列シーケンシング法の結果から導かれたように、内部に UAC を含む DNA/RNA キメラオリゴヌクレオチド (DR-13-UAC) と MazFpp を混合した際は、蛍光強度の迅速な上昇が確認された (図 2.11 A)。一方、DNA オリゴヌクレオチドである D-13-AAA を MazFpp により処理した際には、蛍光強度の上昇は確認されなかった (図 2.11 B)。また他の 3 種の RNA オリゴヌクレオチド R-13-UCUCG, R-13-GUUGU, および R-13-UGACA においても同様の結果が得られ (図 2.11 C-E), MazFpp が UAC を特異的に切断していることが判明した。

そこでさらにその配列特異性を詳細に調べるべく、DR-13-UAC を一塩基置換した 3 種類のオリゴヌクレオチド DR-13-CAC, DR-13-AC, DR-13-UAU を合成し、同様の実験を行った。予測された通り、一塩基目の U (UAC) を他のピリミジン塩基に置換したオリゴヌクレオチ

ド (DR-13-CAC および DR-13-AC) では MazFpp の RNA 切断活性が完全に抑制された (図 2.11 F, G)。ウラシルをチミンに置換したことで, RNA 切断活性が抑制されたことから, 2'OH もしくはメチル基の存在が MazFpp の RNA 切断に必要であると考えられる。また三塩基目の C (UAC) を U へと置換した際は弱い RNA 切断活性が観測されたことから (図 2.11 H), MazFpp が弱く切断する RNA 配列を UAC 以外にも持つことが示唆された。

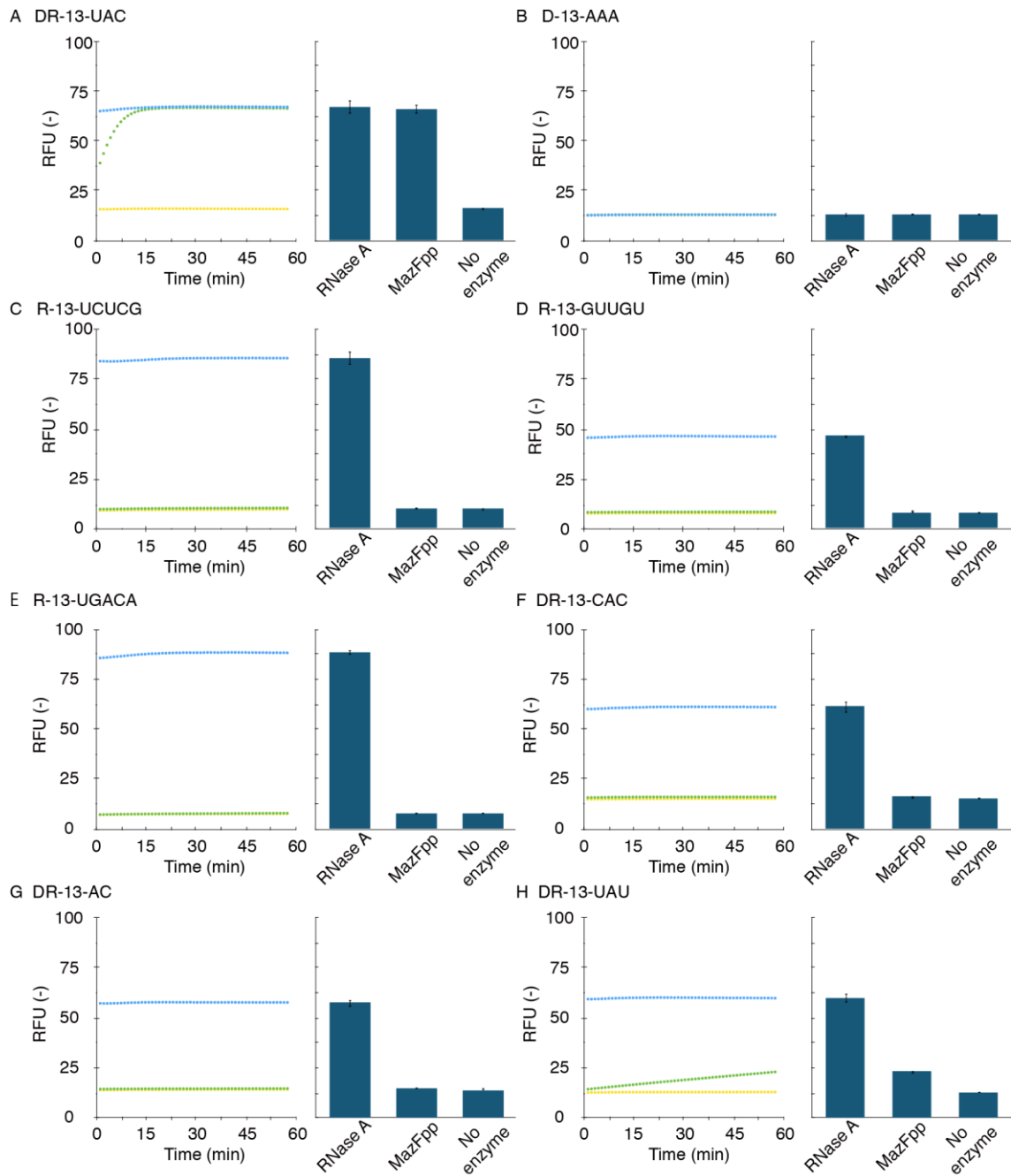


図 2.11 MazFpp による RNA の配列特異性 100 ng の RNase A (青), もしくは MazFpp (緑) と各種蛍光修飾オリゴヌクレオチドとの反応を行った。対照系として、酵素非添加系 (黄) における蛍光強度も測定した。左のグラフは蛍光強度の経時変化を, 右のグラフは反応終了時の蛍光強度を示す。

2.3.4 超並列シーケンシング法および RNA 切断活性検出法の組み合わせの評価

2.3.2 および 2.3.3 の結果から、超並列シーケンシング法および RNA 切断活性検出法を組み合わせることで、MazF の切断配列を「信頼に足りうる」精度を持って同定されることが考えられた。しかしながら、今後、構築した手法を他の微生物が有する MazF に適用する際、これらの手法から同定した MazF の切断配列に間違いがあってはならない。そこで本項では下記に述べる二つの方法を用いて、超並列シーケンシング法および RNA 切断活性検出法が「確実」に信頼しうる手法であることを確かめた。

・ *graA* 遺伝子の転写産物および MazFpp の混合実験

MazFpp が UAC を優先的に分解するエンドリボヌクレアーゼであるならば、理論上 UAC 配列を含まない転写産物は MazFpp による切断を受けない。そこで本研究では *Pseudomonas putida* ゲノム上に存在する CDS より UAC 配列を含まないものを抽出した。5,350 の CDS より、97 の CDS が抽出されたが、この中には GraA とよばれる Antitoxin タンパク[85]をコードする遺伝子が含まれていた。

そこで *graA* 遺伝子を UAC 配列を含まない解析対象配列として選択し、*In vitro* 転写によって本遺伝子の転写産物を準備した。本転写産物および MazFpp を混合し、酵素反応を行った。なお、対照実験として、RNA500-2 配列 (切断を受ける配列) と MazFpp の酵素反応も行った。酵素反応時間を複数用意し、それぞれのサンプルに対して電気泳動を行ったところ、標準 RNA500-2 が切断されるのに対し (図 2.12, レーン 3-6), *graA* 遺伝子の転写産物では RNA の切断が確認されなかった (図 2.12, レーン 9-12)。この結果からも MazFpp が UAC 特異的 RNA 分解酵素であることが裏付けられた。また余談ではあるが、この結果から *P. putida* 細胞内では TA 機構同士での相互に制御している可能性が示唆された。

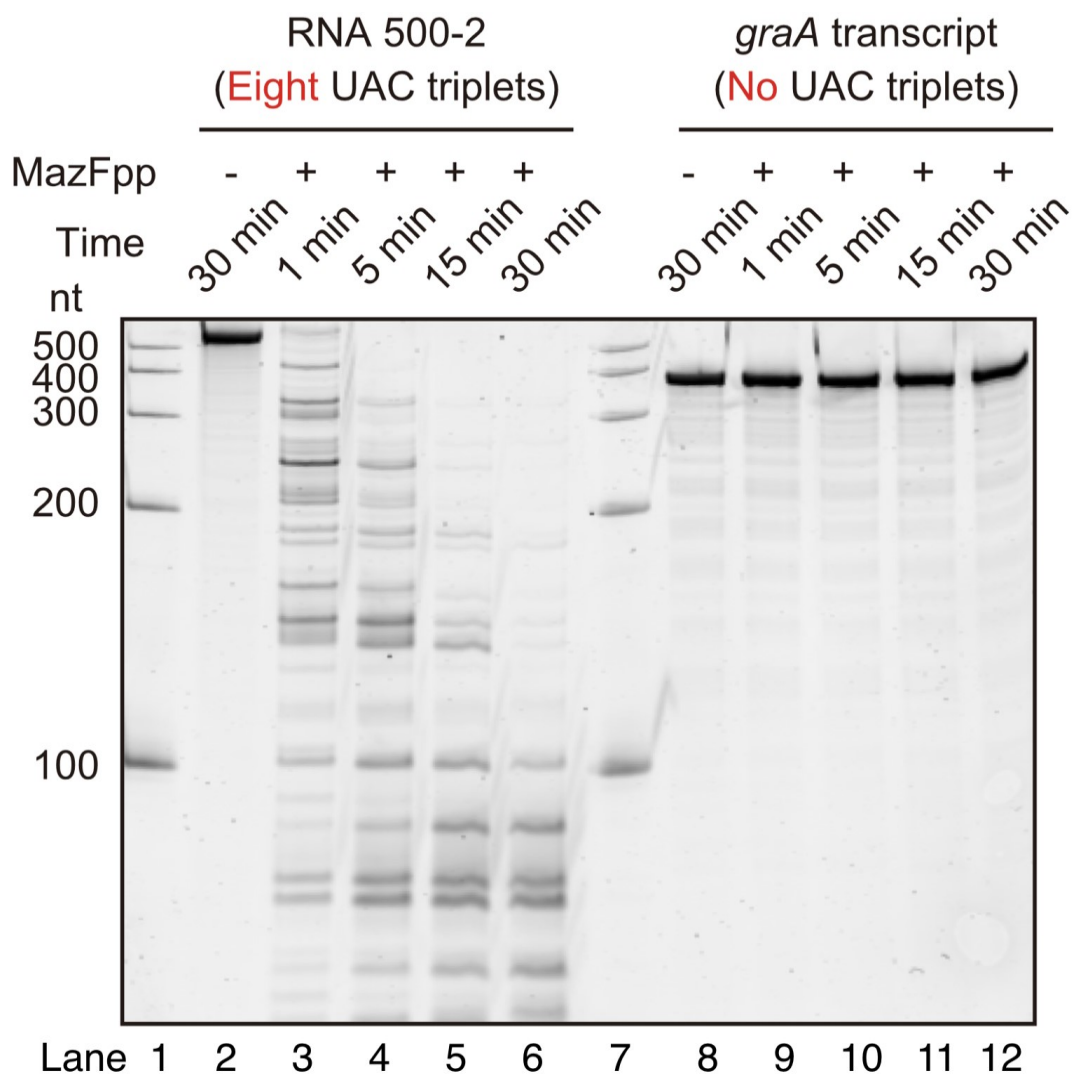
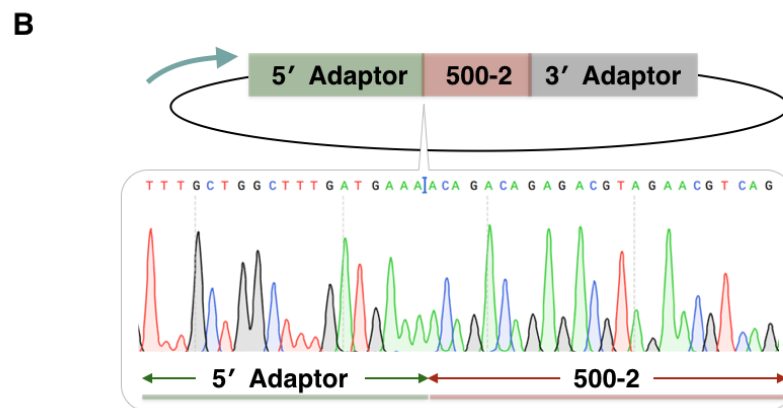
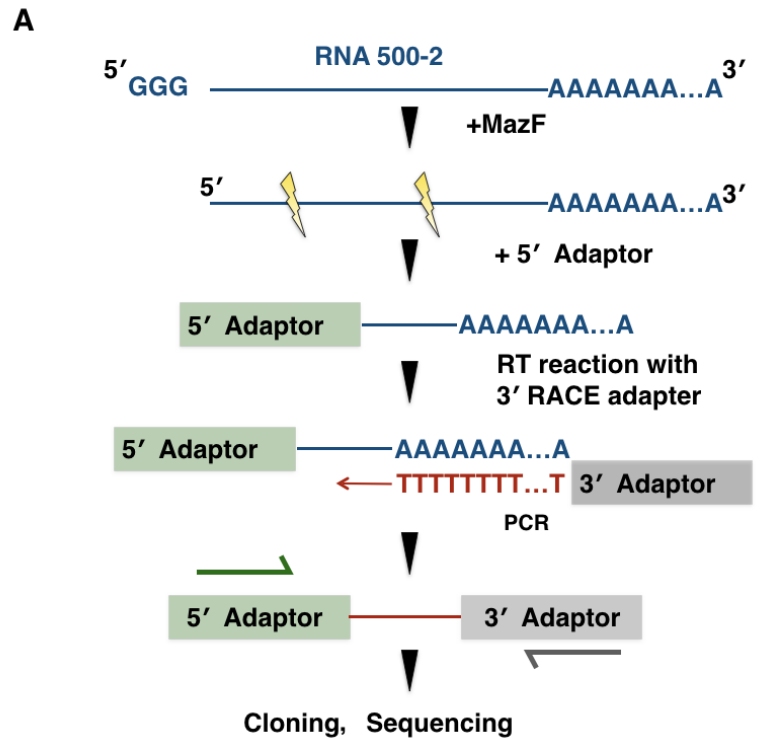


図 2.12 MazFpp による RNA の切断 レーン 1, 7 RNA ラダー。レーン 2, 8, コントロール反応。酵素非添加系。レーン 3-6, 100 ng の MazFpp を標準 RNA500-2 と混合し, 反応させた。レーン 9-12, 100 ng の MazFpp を *graA* 遺伝子の転写産物と混合し, 酵素反応を行った。

・ 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 解析

次に 5' RACE によって MazFpp の RNA 切断面の解析を行った。MazFpp で標準 RNA500-2 を切断し、これら RNA に 5'末端にアダプター配列のライゲーションを行った。この後、500-2 の 3'末端に存在する 30 塩基の連続したアデニン配列を利用し、逆転写反応を実施した。5'末端、3'末端に特異的なプライマーで PCR 後、本 PCR 産物を T-ベクターへとクローニングし、その配列をサンガーシーケンス法により解析した。図 2.13 に示した通り、標準 RNA500-2 は UAC 配列が存在する箇所で切断されており、その切断は U および A の間であった。この結果からも、MazFpp が UAC 特異的 RNA 分解酵素であることが裏付けられた。

以上、二種類の実験の結果から、超並列シーケンシング法ならびに RNA 切断活性検出法を用いることで、目的とする微生物の MazF の切断配列を特定できることが明らかとなった。



>RNA 500-2 sequence
 GGGUAAUACGACUCACUAUAGGGAGACUAAAUCUCGGCGUCGGU
 UCAUACGCGCGAUCGUUUGCUGUCAGGGCAUACUCGAAUCCGGA
 CUCCGACAAUUAUAGGCCAUCCUGAAUAGCCGAUCAUGCGAGUCA
 CGAUAAAGGCAGGCUCUGCGAUUAUCCGGAUUAUCUGGAGAAGCUG
 AAUCCCACCUAGAGCGAACUGUCAGAGGAUCGACCUCAGGCUCG
 CUAUCAUCAUAACGGCGGACGACCUGUGUCACAUUCCGAACGCUA
 CGUGACGAUUAUUCUGUCGAAAGGCAUAGAACGCCGUCAAUUAU
 CCUGCGCAUUCUCUUUAUCACCGGCUAUAACUACUAGGUUCCG
 CAGAUUAUAGACUGCGCACGGAACAUGUAGAUAGAUCGAGUAGGG
 UAGCGAUUUAACGACUCGACUUA**ACAGACAGAGACGUAGAACGUCA**
GACGAGUGGUAUGCCCACCAGAGGCGAUACAGGCUGUACCUGCG
UAGCACUAGAGUCGUGCGUCAUGCGGACCCUAUCUAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

図 2.13 5' RACE 解析による MazFpp の RNA 切断部位の確認 (A) シーケンシングサンプルの構築, (B) シーケンシング結果および標準 RNA500-2 の配列。赤字はシーケンシングで確認された配列を示す。

2.4 考察

微生物は環境ストレスに曝された際、TA 機構を用いて自身の増殖を抑制する。Toxin 分子が微生物の増殖を抑制する分子機構は種々あるが、その中でも、細胞内 RNA の切断は最も普遍的とされる。本章ではこれら RNA 切断型 Toxin 分子の中でも、配列特異的エンドリボヌクレアーゼである MazF に関して焦点を当て、その基質特異性の解明を試みた。興味深いことに、RNA 切断酵素が切断する配列は微生物ごとに異なることが知られており、これら酵素の切断配列の同定は「種々の微生物がどのような分子学的機構のもと環境ストレスに対応しているか？」という疑問を解決するための糸口となりうる。しかしながら、MazF を含む配列特異的 RNA 切断酵素の切断配列の同定手法はプライマー伸長法が主要な手法であり、精確性やスループット性等に問題を抱えていた。

本章では次世代シーケンサーを用いることで高効率・高精度に切断配列を推定する手法を開発、その有効性に関しての評価に関して記載した。本手法は大腸菌の MazF の切断配列を正しく同定したばかりではなく(図 2.6), 切断配列が未知であった *P. putida* の MazF が UAC 配列を特異的に切断することを明らかとした(図 2.10)。これらの結果から、本研究で構築した一連の実験手法、データ解析手順は配列特異的 RNA 切断酵素の基質特異性を特定する手法として有効といえる。

本手法の利点は次に述べる通りである。次世代シーケンサーは膨大な量のデータを一度の解析で可能とすることから、本手法を用いることで従来法と比較し、高スループットに切断配列を推定することが可能なる。また超並列シーケンシング法ではそれぞれの塩基を「深く」シーケンシングすることが可能であり、これにより切断に関わる配列を精確に浮かび上がらせることができる(図 2.6, 図 2.10)。加えて、本手法は切断に必要な配列中のどの箇所でも RNA 切断が行われたかをも特定可能にする。図 2.10 から推定された RNA

切断箇所は 5' RACE で同定された切断箇所と一致しており(図 2.13), この結果は本手法の「解像度」の高さを反映したものである。

以下に本系の今後の改良点を記載する。一点目の改良点としては、リン酸化反応、ライゲーション反応の際に生じるバイアスがあげられる。本手法ではバーコード RNA を付加することで MazF によって切断された RNA の 5' 末端を保護している。MazF で RNA を切断した際、断片化 RNA の 5' 末端には水酸基が存在する。そこで本手法では T4 RNA キナーゼを用いて断片化 RNA の 5' 末端をリン酸化し、T4 RNA リガーゼを用いることでバーコード RNA の付加反応を行う。なお T4 RNA リガーゼは 5' 末端にリン酸基を 1 つ持つ RNA のライゲーション反応を触媒する酵素であり、*In vitro* 転写によって用意された基質 RNA の 5' 末端 (3 つのリン酸基が存在 [72]) で冗長度が増加することはない。T4 RNA キナーゼや T4 RNA リガーゼは基質となる RNA の配列や構造によって、リン酸化効率、ライゲーション効率が大きく変化することが知られている[86, 87]。したがって、バーコード配列を付加する際にバイアスが生ずることとなり、検出がしづらい配列も存在することも確かである。技術的な点ではあるが、今後、リン酸化に関してはバイアスが低いとされる OptiKinase (Affymetrix) を用いることで、ライゲーションに関してはバーコード配列の 3' 末端に連続したランダムな配列 (NNNNNN) を付加することで、バイアスの改善に繋げていきたい。

二点目の改良点としては、RNA の配列多様性の問題が考えられる。本研究では 5 種類の 1033 塩基の標準 RNA (RNA 1000-1, 1000-2, 1000-3, 1000-4, および 1000-5) を基質として用いている。これら RNA は内部配列の多様性に富むように設計されており、事実、三塩基、四塩基、五塩基の組み合わせであれば、それぞれ 100%, 98.4%, 95.5%が網羅されている。これまで同定されてきた MazF の切断配列は五塩基までのものが多いことを考えると (表 1.1), これら基質 RNA を用いることでほぼ全ての MazF の切断配列を特定することが可能であると考えられる。例外として、*Haloquadra walsbyi* は七塩基を特異的に切断することが知られている。現状、本章で使用した五種類の基質 RNA の組み合わせでは、16,3847 (=4⁷) の

組み合わせのうち、25.6%しか網羅出来ておらず (表 2.6), 本基質の組み合わせでは六塩基以上を特異的に切断する MazF の切断配列は同定できない可能性が高い。しかしながら, 超並列シーケンシング法の利点は基質の種類を制限なく増やすことができる点にあり, 本章で用いた RNA 以外の基質 RNA を設計し, 組み合わせることで切断に七塩基を必要とする MazF の解析も可能となる。現在, 当研究室では基質 RNA の追加設計や *In vitro* 転写を用いた基質 RNA の追加を行っており, 今後, このような MazF に関しても, 本章で開発した手法を適用出来る体制を整えている。

表 2.6 基質 RNA 中に含まれる 7 塩基の組み合わせの出現頻度

Number of occurrences	Number of the heptads
0	12188
1	3505
2	616
3	67
4	8

本手法で考えられうる弱点としては, 解析の際のノイズがある。具体例を挙げて述べると, 図 2.6 B における三番目に確認された C や T, 図 2.10 B における二番目のポジションに T が微かに検出された。WebLogo では塩基の出現頻度を文字の大きさに変換している。検出された C や T は切断配列に比べその出現頻度が低いことは瞭然としているが, これら切断に関わっている可能性を百パーセント否定することはできない。この弱点は蛍光共鳴エネルギー移動を用いた RNA 切断活性検出法を用いることで克服が可能である。本手法は切断活性を蛍光強度に置換していることから感度が良い。また RNA が MazF によって切断された時のみ強い蛍光を発するように設計されていることから, 様々な配列を内部に含むオリゴヌクレオチドを本手法で測定することで, 検出された塩基が真に切断に関わるもの

かの判別が可能となる。さらに切断された蛍光修飾オリゴヌクレオチドのモル数を検出可能であることから、これまでは困難であった経時的な RNA 切断活性の追跡が容易となる。

以上の理由から、超並列シーケンシング法と蛍光消光現象を利用した RNA 切断活性検出法は相性が良く、この二手法を組み合わせることが、MazF の切断配列を高感度・高精度・高効率に同定するための近道であると考えられた。

2.5 総括

本章では超並列シーケンシング法, および RNA 切断活性検出法を組み合わせることで, MazF Toxin エンドリボヌクレアーゼの切断配列を「高精度・高感度・高効率」に同定することが可能であることを示した。本手法は従来法の弱点であったスループット性の低さ, 切断活性の経時変化の追跡, 切断配列同定の精度の向上を可能とする。1.1 緒論で述べた通り, MazF Toxin エンドリボヌクレアーゼは真正細菌, 古細菌に広く保存された酵素である。本章で構築した手法は, 「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, 種々の微生物に保存された RNA 切断酵素に本章で開発した手法を適用することで, 原核生物の翻訳機構をより詳細に理解することが可能となる。

第三章

Nitrosomonas europaea に保存された MazF

Toxin エンドリボヌクレアーゼの解析

第3章 *Nitrosomonas europaea* に保存された MazF Toxin エンドリボヌクレアーゼの解析

3.1 序論

Nitrosomonas europaea は代表的なアンモニア酸化細菌であり、生育に必要なエネルギーや還元力の全てをアンモニア酸化反応によって補う。本微生物は β プロテオバクテリア綱に分類される細菌であり、土壌及び水域に生育する[19, 88, 89]。その生理学、生化学、分子生物学的研究は他の硝化細菌に比べても数多く存在し、今日までに様々な知見が蓄積されている。先人が積み重ねてきたこれら知見の一例として、本微生物の様々な環境下での増殖速度が挙げられる。現在では、*N. europaea* がアンモニア濃度、亜硝酸濃度、温度、pH、有機物、無機物、重金属など多種多様な環境変化に反応し、その増殖速度 (≡アンモニア酸化活性) を大きく変化させることが知られている[90-94]。

ここで微生物がこれら環境変化に対応するためにどのような戦略が有効であるかということ立ち止まって考えたい。微生物細胞が環境ストレスに曝された際、自身の代謝活性を抑制することで受ける損傷を最小限にとどめ、ストレス環境が過ぎ去った際に速やかに再増殖を行うことができれば、それは微生物の生存に有利に働くと考えられる。このような文脈のもと TA 機構を改めて考えると、微生物の可逆的な増殖速度の制御を可能にする本機構の洗練性を再確認できる[7]。

2005 年、Pandey らは種々の微生物ゲノム上に存在する TA 機構の網羅的な探索を行い、*N. europaea* を筆頭とする遅増殖性の独立栄養性の微生物ゲノム上に数多くの TA 機構が存在することを報告した[18]。*N. europaea* が多種多様な環境ストレスに反応し、その増殖速度を変化させることを鑑みると、これらの独立栄養性細菌が環境ストレス下で TA 機構を介した増殖制御を行っていることは想像に難くない。しかしながら、そのゲノム上に存在が予

見されている TA 機構は未だ謎に包まれており、本仮説は想像の域を出ない。また現状、大腸菌のようなモデル微生物を除くと、TA 機構に関する知見は病原性微生物のもの中心となっており、環境微生物学分野における TA 機構の研究は医学分野に比べ後塵を配していると言わざるを得ない。多面に渡る TA 機構の生物学的役割の新たな一面を明らかにするためにも、環境微生物学分野における TA 研究で先陣を切ることが切要であるように感じられた。

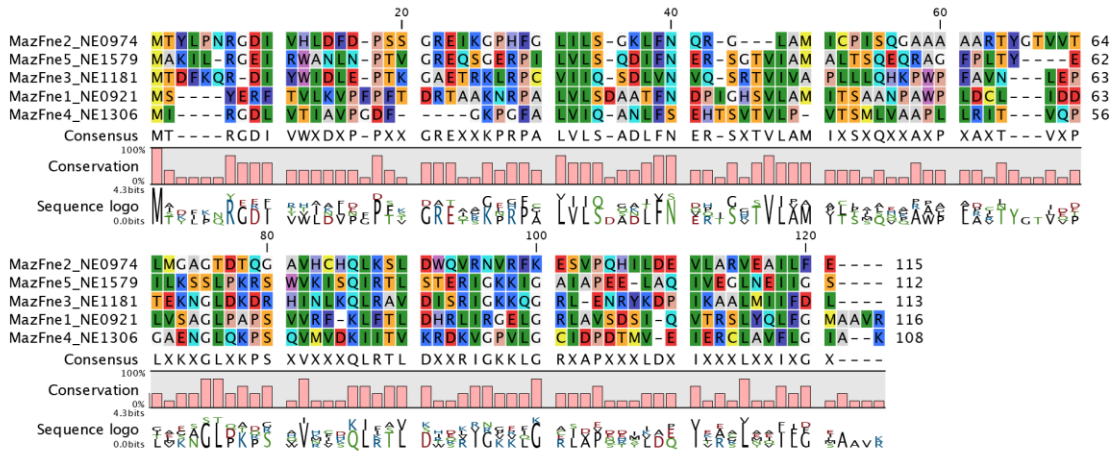
そこで本研究では *N. europaea* を遅増殖性の独立栄養細菌のモデル微生物とし、第二章で構築した手法を本微生物が有する MazF に適用することで、これらの MazF が「実際に機能を持つのか？」や「どの様に細胞内で働くのか？」といった問いに対する回答に資することを目的とした。緒論で述べた通り、*N. europaea* はそのゲノム上に五組もの MazEF 機構を有し (表 3.1)[16]、この数は他微生物が有する MazF の数と比べ多い。これらの機構における MazF 間の相同性は低く (図 3.1)、それぞれの MazF の切断配列は異なることが予測される。本章では筆者が博士後期課程在学中に解析に成功した二種類の MazF (*N. europaea* の遺伝子座 NE0921 ならびに NE1181 にそれぞれ存在する MazFne1 および MazFne3) の特性を記載し、その考察をまとめた。

表 3.1 *N. europaea* に保存された MazEF 機構

MazE					MazF				
Name	Locus	#aa	PI	MW (Da)	Name	Locus	#aa	PI	MW (Da)
MazEne1	NA ^a	76	4.49	8415.6	MazFne1	NE0921	116	8.74	12703.2
MazEne2	NE0974	81	6.57	8918.6	MazFne2	NE0975	115	7.01	12600.9
MazEne3	NE1182	80	4.65	9152.4	MazFne3	NE1181	113	10.11	13145.7
MazEne4	NE1307	110	7.02	12394.5	MazFne4	NE1306	108	6.41	11482.0
MazEne5	NE1580	80	4.73	9165.8	MazFne5	NE1579	112	10.06	12415.7

^a Not Assigned

A



B

		Percent of identity				
		1	2	3	4	5
Identity	MazFne2_NE0974	1	22.03	17.80	18.40	15.57
	MazFne5_NE1579	2	26	29.31	21.31	20.17
	MazFne3_NE1181	3	21	34	15.57	17.65
	MazFne1_NE0921	4	23	26	19	24.79
	MazFne4_NE1306	5	19	24	21	29

図 3.1 *N. europaea* に保存された MazF (A) 5 種類の MazF のアラインメント結果, (B) これらの MazF 間での相同性

3.2 NE0921 にコードされた MazF エンドリボヌクレアーゼ (MazFne1) の解析

3.2.1 実験方法

3.2.1.1 プラスミド, オリゴヌクレオチド, 菌株

mazEne1 をコードする pET24a, および *mazFne1* をコードする pET24a は GenScript Japan より購入した。大腸菌における翻訳効率を上げるため, *mazEne1* および *mazFne1* 配列に関してはコドンの最適化を施した。蛍光修飾オリゴヌクレオチドは Japan Bio Services より購入した。*Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 は National Institute of Technology and Evaluation of Japan (Chiba, Japan) より購入した。

3.2.1.2 MazEFne1 の逆転写 PCR

1L あたり (NH₄)₂SO₄ (2.5 g), KH₂PO₄ (0.5 g), N-2-Hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid (11.92 g), NaHCO₃ (0.5 g), MgSO₄·7H₂O (0.1 g), CaCl₂·2H₂O (5 mg), Fe-EDTA (75 mg) を含む培地に *N. europaea* を植菌し, 28°C暗所で振盪培養した。これら *N. europaea* を 5,000 rpm で 10 分間遠心し, ビーズ破碎を行った。Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit (Zymo Research) を用いて菌体から RNA を回収した。回収した RNA を 4U の TURBO DNase (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) で処理後, RNA を RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research) により精製した。250 ng の RNA を基質とし, SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写反応を行った。cDNA を鋳型とし, 表 3.2 に示したプライマー, Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) を用いて PCR 反応を行った。PCR 産物は 2%アガロースゲルを用いて泳動した。

表 3.2 逆転写 PCR に用いたプライマーセット

Name	Sequence (5' to 3')
<i>mazEne1</i> forward (primer1)	CCTCAAAGGGACAGACCACG
<i>mazEne1</i> reverse (primer2)	GCGTTCCTCCACTGCTTTC
<i>mazFne1</i> forward (primer3)	CGTACGGCTGCCAAAACCG
<i>mazFne1</i> reverse (primer4)	AAGCTGATACAGAGATCGTGTG

3.2.1.3 MazFne1 の毒性調査

Escherichia coli strain BL21 (DE3) (BioDynamics Laboratory) に pET24a-*mazFne1* の形質転換を行った。これらの大腸菌を 50 µg/mL のカナマイシンを含む LB 培地で 37°C で一晩前培養した。前培養液を 1,000 倍希釈になるよう 10 mL の LB 培地に植え継いだ。用意した六つのフラスコのうち 3 系には、OD600 が 0.2 に達した際に 1 mM の IPTG を添加した。全 6 系のフラスコ (IPTG 添加系 3 系, IPTG 非添加系 3 系) の OD を 30 分ごとに測定した。

3.2.1.4 MazEne1 および MazFne1 の発現

Escherichia coli strain BL21 (DE3) (BioDynamics Laboratory) に pET24a-*mazEne1*, pET24a-*mazFne1* の形質転換を行った。これらの大腸菌を 50 µg/mL のカナマイシンを含む LB 培地で 37°C で一晩培養した。これらの大腸菌を 1 L の LB 培地に植え継ぎ、それぞれ OD600 が 0.6 もしくは 4.0 に達した際に 1 mM の IPTG を添加した。3.5 時間培養後、これらの菌体培養液を 7,000 g で遠心し、菌体を -80°C で保存した。

3.2.1.5 MazEne1 および MazFne1 の精製

MazEne1 および MazFne1 を誘導した大腸菌細胞を氷上で融解し、18 mL の菌体懸濁用緩衝溶液 (20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0), 300 mM NaCl, 40 mM イミダゾール, および 5 mM 2-メルカプトエタノール) に溶解した。細胞を超音波破碎し遠心した後、上清を回収した。

0.45 μm 膜 (Millex) で上清をろ過し、細胞懸濁物を除いた。1-mL His-Trap FF crude column (GE Healthcare) に上清を添加し、AKTA pure 25 (GE Healthcare) を用いて非特異的吸着タンパク質の除去を行った。ヘキサヒスチジンタグが付加された MazEne1 および MazFne1 は溶出用緩衝液 (20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0), 300 mM NaCl, 500 mM イミダゾール, および 5 mM 2-メルカプトエタノール) により溶出した。溶出には以下のプログラムを用いた。流速 1 mL/min, 溶出勾配 20 mL, 画分容量, 0.5 mL。MazEne1 に関しては溶出開始から 18 番目の画分を, MazFne1 に関しては溶出開始から 17, 18 番目の画分を実験に使用した。分子量ならびに純度は SDS-PAGE によって確認した。タンパク質濃度は Bio-Rad Protein Assay (Life Technologies) を用いて決定した。

3.2.1.6 MazEne1 および MazFne1 の活性測定

100 ng の RNA500-2 を 1, 3, 10 pmol の MazFne1 と酵素反応用緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.01% Triton X-100, および 4 U の RNase inhibitor (Takara)) と混合し, 37°C で 90 分間反応させた。また 10 pmol の MazF を 50 pmol の MazE と混合した。25°C で 10 分間反応させたのち, 100 ng の RNA を加え同様の処理を行った。RNA を RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research) により精製後, Gel loading buffer II (Ambion) を加えた。95°C で 5 分間熱処理をしたのち, 7M 尿素を含む 10% のポリアクリルゲル上を用いて泳動を行なった。ゲルは SYBR Gold (Life Technologies) により染色し, Typhoon 9210 imager (GE Healthcare) によって検出した。

3.2.1.7 超並列シーケンシングによる切断候補配列の推定

各 1 pmol の 5 種類の混合 RNA を基質とし, 50 ng の MazFne1 と酵素反応用緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.01% Triton X-100, および 4 U の RNase inhibitor (Takara)) 中, 37°C で 30 分間反応させた。リン酸化, バーコードライゲーション, シーケンシングラ

イブラリーの構築は 2.2.7 項で示した方法に基づき行った。解析値に関しては 2.2.8 項に記載したものをを用いた。冗長度が 500 未満のものは解析より除いた。これら塩基のうち Relative coverage increase が上位 25 のものを 1000-1, 1000-2, 1000-3, 1000-4, および 1000-5 配列より抽出し、これら塩基の 5 塩基上流ならびに 5 塩基下流も抽出した。抽出した全 25 配列を WebLogo[80]により解析した。

3.2.1.8 蛍光アッセイを用いた MazFne3 の活性測定

1 pmol の MazFne1 もしくは 100 ng の RNase A (Novagen) を酵素反应用緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.01% Triton X-100, および 4 U の RNase inhibitor (Takara)) 中で 20 pmol の蛍光修飾オリゴヌクレオチドと混合し、反応させた。対照反応系として、1 pmol の MazFne1 に 5 pmol の MazEne1 を混合し、25°C で 10 分間事前に反応させた系、酵素非添加系を用意し、実験を行った。全ての反応を 37°C で行い、蛍光強度を Light Cycler 480 system (Roche) を用いて一分間隔で測定した。

3.2.2 実験結果

3.2.2.1 MazEFne1 の転写実験および MazFne1 の毒性試験

表 3.1 に示した通り、*mazFne1* に対応する *mazEne1* に関しては遺伝子情報の記載がなされておらず、本 MazEF が TA 機構を形成するかは不明であった。そこでこれら遺伝子に関しては *Pseudomonas putida* に保存された *mazEF* (*mazEFpp*) や後述する *mazEFne3* に比べより詳細に検証することとした。

1.2.1 に示した通り、II 型に分類される TA 機構は一般的に *toxin*, *antitoxin* 遺伝子がオペロンを形成する。そこで *N. europaea* から RNA を抽出し、これら *mazEF* と推定される遺伝子が共に転写されているかを調べることにした。抽出した RNA をランダムプライマーで逆転写し、*mazE* と推定される遺伝子を特異的に増幅するプライマー (プライマー1 およびプライマー2)、*mazF* と推定される遺伝子を特異的に増幅するプライマー (プライマー3 およびプライマー4)、および *mazEF* を特異的に増幅するプライマー (プライマー1 およびプライマー4) を用いて PCR を行った。その結果、すべてのプライマーの組み合わせにおいて増幅が確認された (図 3.2 A, 右図 レーン 1, 2)。なお逆転写酵素非添加系では増幅が確認されなかったことから、これら増幅産物は RNA 抽出時において混入したゲノム DNA 由来のものではないといえる (図 3.2 A, 右図 レーン 3)。以上の結果から、*mazEFne1* は一つの転写産物として細胞内に存在しており、MazEFne1 は TA 機構として機能する可能性が示された。

そこで次に MazFne1 が毒性タンパク質であるかを簡易的に調査した。IPTG 誘導性プロモーターの下流に *mazFne1* 遺伝子を組み込んだベクターを構築し、本プラスミドを大腸菌に形質転換した。図 3.2 B に示した通り、IPTG を添加し MazFne1 の発現を誘導した系では大腸菌の生育が阻害された。以上の結果から、MazFne1 は毒性タンパク質であると考えられた。

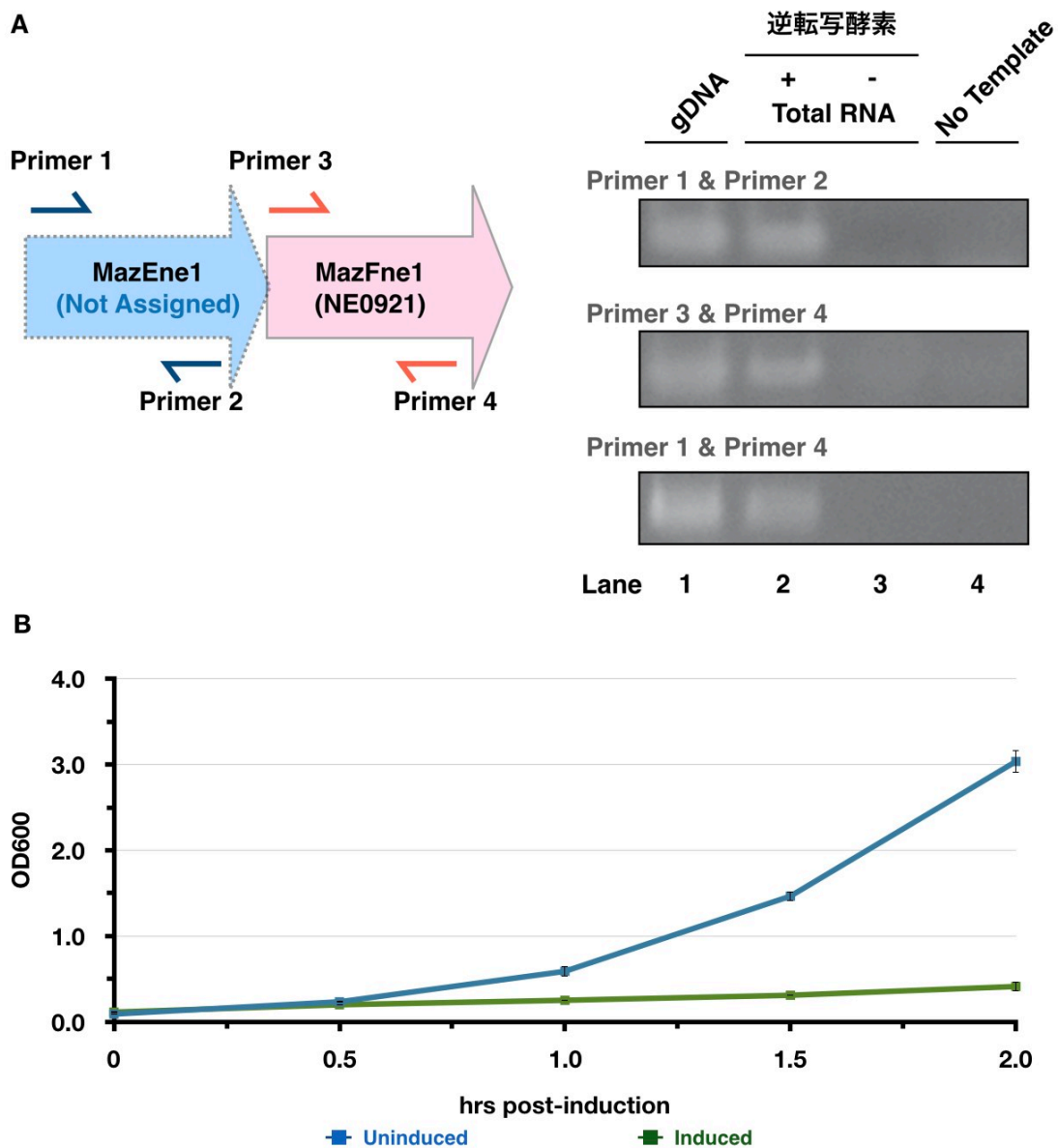


図 3.2 MazEne1 の転写実験および毒性試験結果。(A) それぞれの遺伝子座, および逆転写 PCR プライマーセット, PCR 産物の電気泳動。(B) MazFne1 発現による大腸菌の増殖速度への影響。(青) MazFne1 非誘導系, (緑) MazFne1 誘導系。

3.2.2.2 MazEFne1 の取得およびその酵素活性測定

MazEFpp を精製した際と同様, MazEne1 および MazFne1 を酵素学的な面から解析するため, これら酵素をアフィニティークロマトグラフィー法により精製した (図 3.3 A)。図 3.3 B に示した通り, 精製した MazFne1 は RNA 切断活性を有していた (レーン 2-4)。また MazEne1 が MazFne1 の RNA 切断活性を抑制したことから (図 3.3 B, レーン 5), これらの MazEne1, MazFne1 が TA 機構として機能することが判明した。

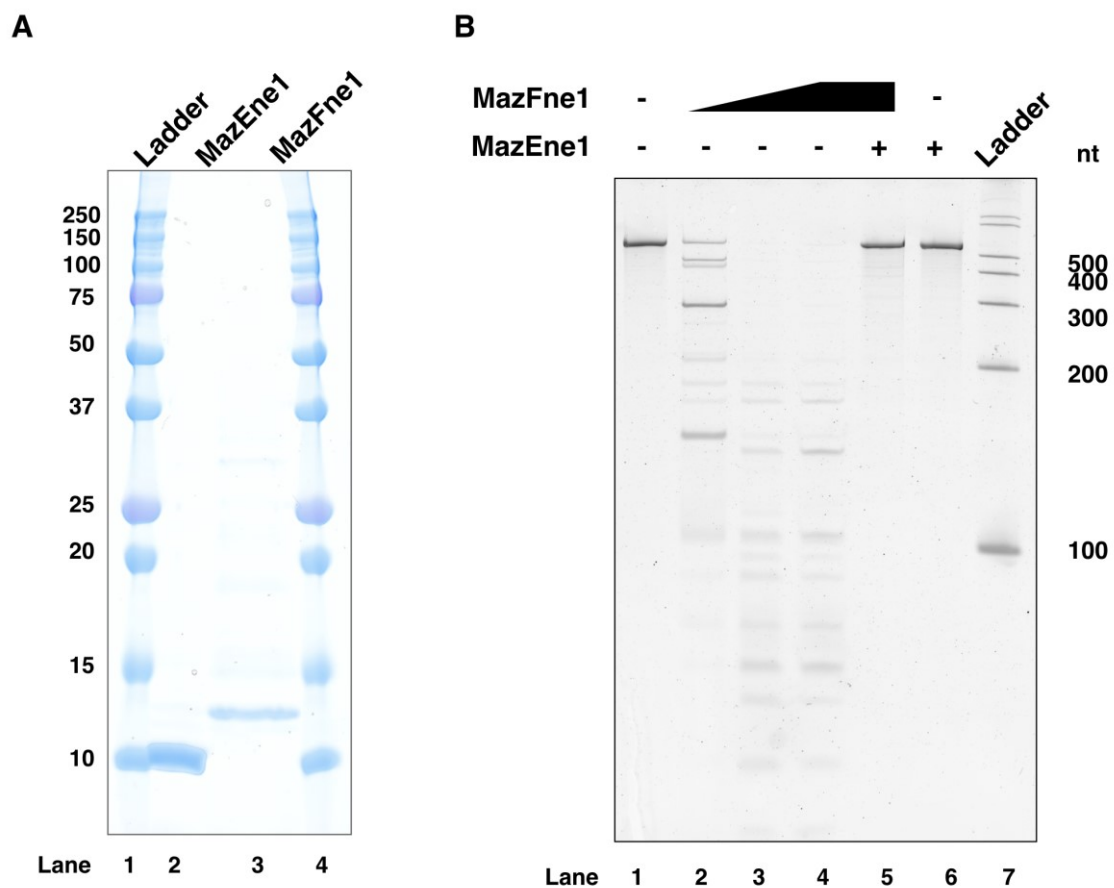


図 3.3 MazEFne1 の取得およびその酵素活性の測定 (A) MazEne1 および MazFne1 の純度および分子量 (kDa), (B) MazEne1 および MazFne1 の酵素活性。533 nt の標準 RNA 500-2 とこれら酵素のインキュベーションを行った。レーン 1, 対照反応。酵素非添加系。レーン 2-4, 1, 3, 10 pmol の MazFne1 を添加した。レーン 5, 10 pmol の MazFne1 および 50 pmol の MazEne1 をそれぞれ添加した。レーン 6, 50 pmol の MazEne1 を添加した。レーン 7, RNA ラダー。

3.2.2.3 超並列シーケンシング法による切断配列の推定

次に MazFne1 が切断する配列の推定を超並列シーケンシング法を用いて行った。MazFne1 により切断された RNA 分子の解析を第二章に記載した手法を用いて行ったところ、UGG 配列が本 MazF の切断候補配列として確認された (図 3.4, 表 3.3)。

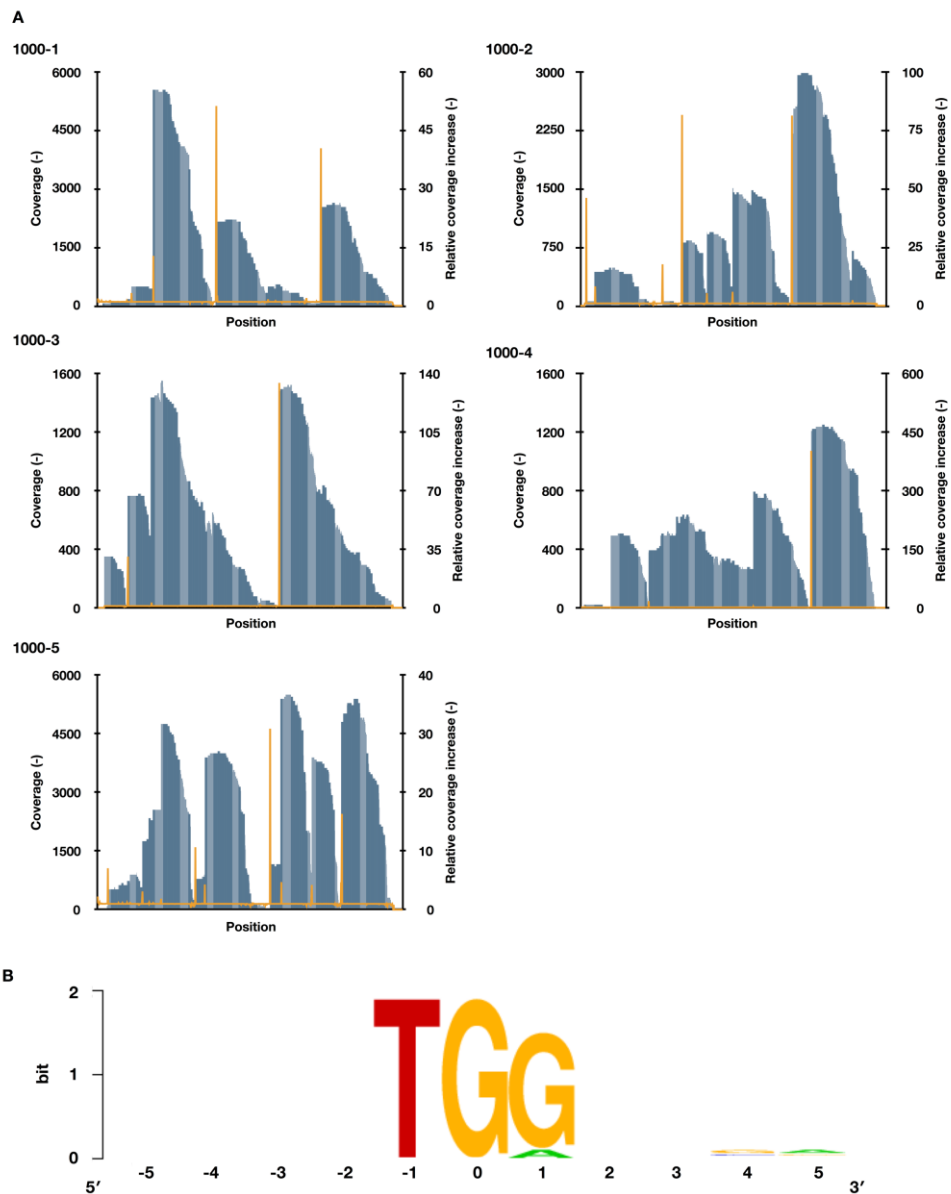


図 3.4 MazFne1 の切断候補配列の推定 (A) 冗長度 (青), ならびに Relative coverage increase (橙), (B) 保存された塩基の抽出. Relative coverage increase が増加した塩基を 0 と設定した。解析には表 3.3 に示した計 25 配列を使用した。

表 3.3 MazFne1 による RNA 断片化時に抽出された全 25 配列

Rank	Type	Position	Relative coverage increase	Coverage	Sequence (5' to 3') ^a
1	1000-4	782	401.667	1205	ACTTT <u>G</u> GTTGC
2	1000-3	616	134.273	1477	AACAT <u>G</u> GTAGA
3	1000-2	345	81.4	814	CTCGT <u>G</u> GAAGC
4	1000-2	717	81.111	2190	TAACT <u>G</u> GCCTG
5	1000-1	403	51.125	818	TTGAT <u>G</u> GTGGC
6	1000-1	757	40.302	2539	GCTTT <u>G</u> GTAGA
7	1000-5	585	30.892	1143	TTAGT <u>G</u> GCCCA
8	1000-3	104	30.52	763	CCAAT <u>G</u> GATGT
9	1000-5	828	16.357	4,809	ATGGT <u>G</u> GTACA
10	1000-1	190	12.758	5,524	TAAAT <u>G</u> GACAA
11	1000-5	332	10.662	821	TATCT <u>G</u> GAATA
12	1000-2	516	5.956	1495	TATAT <u>G</u> GGAGA
13	1000-2	429	5.356	932	CGTCT <u>G</u> GCTTA
14	1000-5	623	4.712	5,390	CATCT <u>G</u> GACGT
15	1000-5	364	4.315	3,909	CGAAT <u>G</u> GGCCG
16	1000-5	726	4.228	3,919	CGCTT <u>G</u> GATAA
17	1000-5	153	3.123	1758	CGGTT <u>G</u> GCAC
18	1000-3	184	3.097	1440	AATTT <u>G</u> GAGGT
19	1000-4	586	3.031	794	TTAGT <u>G</u> GGCGG
20	1000-1	406	2.645	2166	ATGGT <u>G</u> GCAGA
21	1000-1	406	2.645	2166	ATGGT <u>G</u> GCAGA
22	1000-2	922	2.344	708	CAAAT <u>G</u> GCGCA
23	1000-5	216	1.871	4775	TTCTT <u>G</u> AACCG
24	1000-3	389	1.323	651	GGTGT <u>G</u> ATCAG
25	1000-5	111	1.295	914	ACAGT <u>G</u> GTTCG

^a 下線は Relative coverage increase が増加した塩基を表す。

3.2.2.4 蛍光共鳴エネルギー移動を用いた切断配列の同定

そこで更に表 3.4 に示したオリゴヌクレオチドを用いて、UGG 配列が真に MazFne1 の標的配列であるかを検証した。

表 3.4 本節で用いた蛍光修飾オリゴヌクレオチド

Name	Sequence (5' to 3') ^a
DR-13-UGG	AAAAA <u>UGG</u> AAAAA
D-13-AAA	AAAAAAAAAAAAA
R-13-UCUCG	<u>UCUCGGUGCGUUG</u>
R-13-UGACA	<u>UGACACGAACCGC</u>
R-13-GUUGU	<u>GUUGUCAUGCCGG</u>
DR-13-CGG	AAAAA <u>CGG</u> AAAAA
DR-13-UGA	AAAAA <u>UGA</u> AAAAA
DR-13-UGU	AAAAA <u>UGU</u> AAAAA
DR-13-UGC	AAAAA <u>UGC</u> AAAAA

^a 下線は RNA ヌクレオチドを、それ以外は DNA ヌクレオチドを示す。

DR-13-UGG と MazFne1 を混合した結果、本基質オリゴヌクレオチドの迅速な分解が確認された (図 3.5A, 緑点)。また MazFne1 を加えた際、この切断が確認されなくなったことから (図 3.5A, 橙点)、本切断が MazF 特異的なものであることが証明された。加えて DNA オリゴヌクレオチド (DR-13-AAA) や RNA オリゴヌクレオチド (R-13-UCUCG, R-13-GUUGU, および R-13-UGACA) では、MazFne1 による切断は確認されなかった (図 3.5, B-E)。以上の結果から、MazFne1 が配列特異的に RNA を切断していること、実験時に核酸分解酵素が混入していないことが裏付けられた。

そこで最後に MazFne1 の配列特異性が如何に厳密であるかを調べるべく、UGG における U を C に置換したオリゴヌクレオチド (DR-13-CGG)、二番目の G を他塩基に置換したオリゴヌクレオチド (DR-13-UGA, DR-13-UGU, および DR-13-UGC) を合成し、MazFne1 との

混合を行なった。結果、MazFne1 はこれらのオリゴヌクレオチドに対して RNA 切断活性を
発揮せず (図 3.5, F-I), 本酵素が UGG を特異的に切断することを明らかとした。

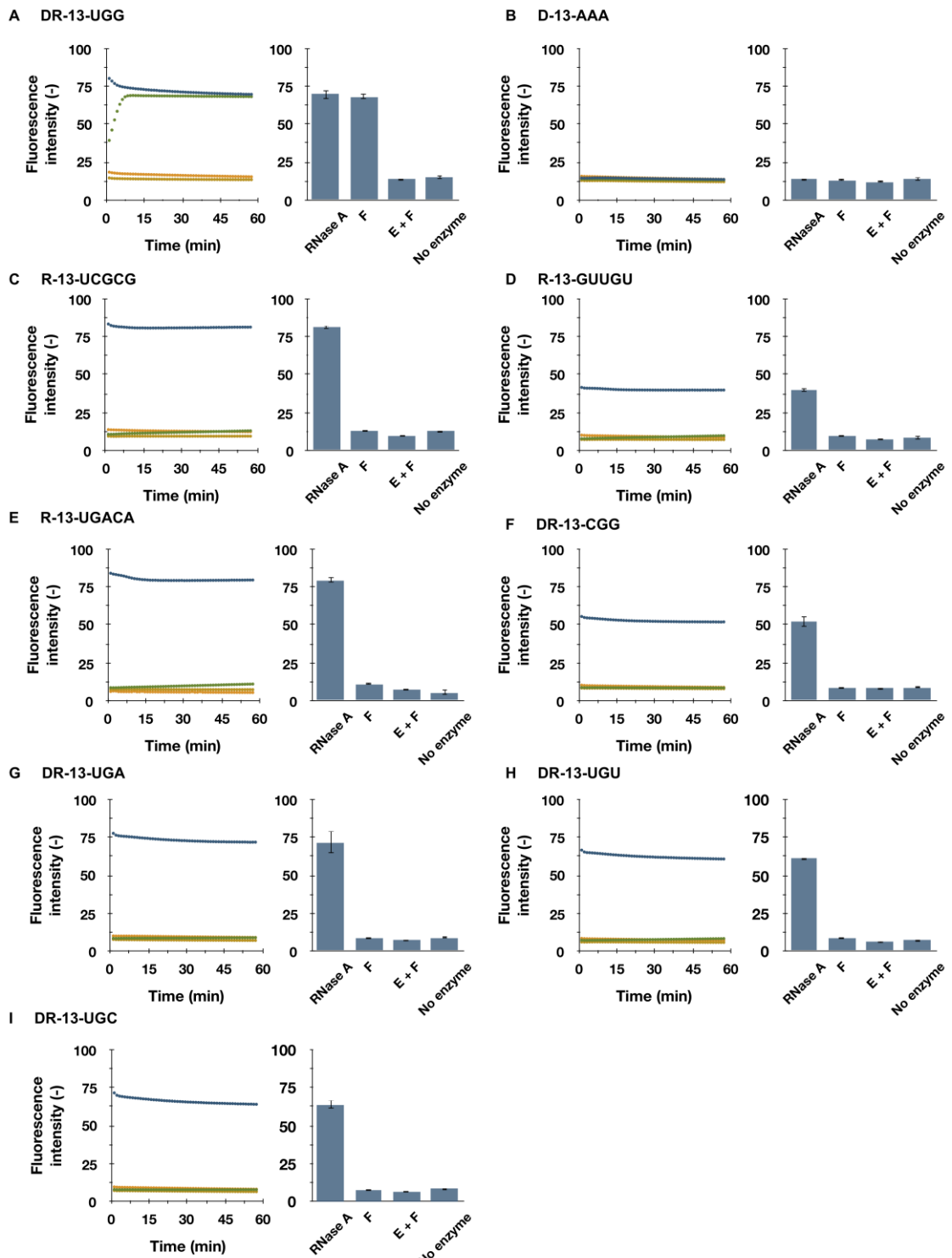


図 3.5 MazFne1 による RNA の配列特異性 RNase A (青), MazFne1 (緑), MazEne1 および MazFne1 (橙) と各種蛍光修飾オリゴヌクレオチドと反応させた。対照反応系として、酵素非添加系 (黄) における蛍光強度も測定した。左のグラフは蛍光強度の経時変化を、右のグラフは反応終了時での蛍光強度を示す。(A) DR-13-UGG, (B) D-13-AAA, (C) R-13-UCGCG, (D) R-13-GUUGU, (E) R-13-UGACA, (F) DR-13-CGG, (G) DR-13-UGA, (H) DR-13-UGU, (I) DR-13-UGC。

3.2.3 考察

本節では遺伝子座 NE0921 にコードされる MazF (MazFne1) および隣接する MazEne1 が TA 機構を構成することを報告した。また MazFne1 が UGG 配列を特異的に切断することを超並列シーケンシング法ならびに RNA 切断活性検出法を用いて明らかにした。

MazFne1 が UGG 配列を特異的に切断することから、本三塩基の含有率が高い遺伝子が MazFne1 の主要な細胞内標的であると考えられた。そこで *N. europaea* のゲノム情報を参照し、MazFne1 の標的と考えられる遺伝子群の抽出を試みることにした。各遺伝子における UGG が含まれる確率を p ($p = (\text{遺伝子配列中の U の割合}) \times (\text{遺伝子配列中の G の割合})^2$), 各遺伝子の長さを L とした際、その遺伝子に含まれると期待される UGG 数 E は

$$E = p(L-2)$$

によって算出される。UGG 配列が実際に特定の遺伝子中に含まれる数を K とすると、 K が E より十分に大きいものが MazFne1 の細胞内主要標的であると考えられる。この際、特定の遺伝子中に切断配列が K 回以上含まれる確率 P は次式で表される。

$$P = \sum_{i=K}^{L-2} p^i (1-p)^{L-2-i} \frac{(L-2)!}{i!(L-2-i)!}$$

P が低い値を示した場合は、各遺伝子において K が E より大きいことが偶然でないと考えられる。そこで全ての遺伝子において P 値を算出したところ、一部、 P 値が極めて低い遺伝子が存在することが判明した (図 3.6)。

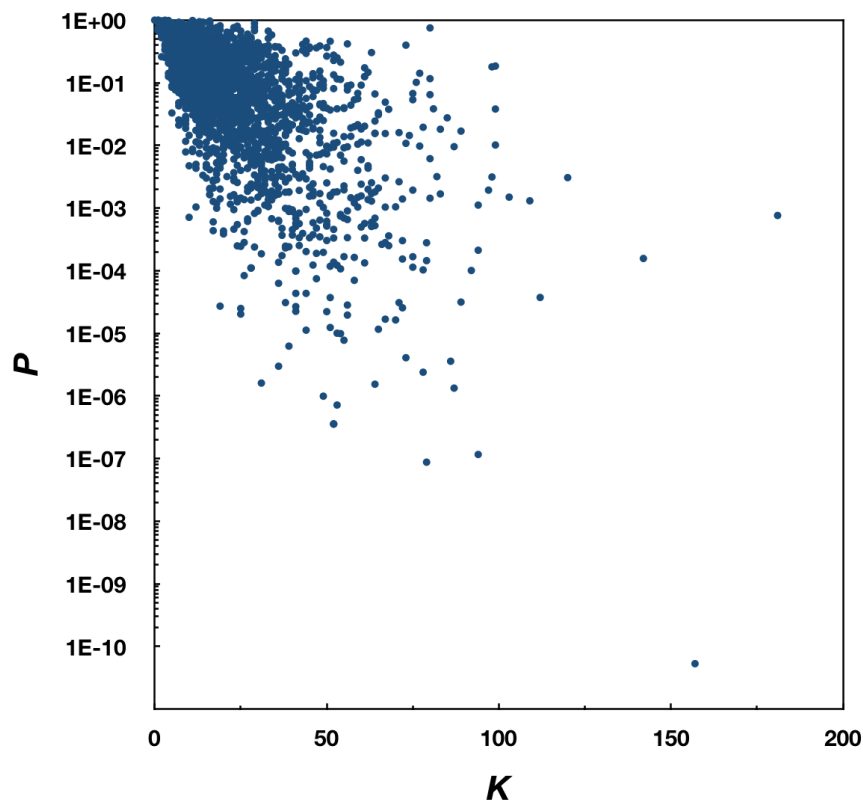


図 3.6 *N.europaea* が有する全遺伝子における UGG 配列の P 値と K 値との関係

そこで次に P の値が低い上位 10 の遺伝子を 2,462 の CDS より抽出した (表 3.5)。興味深いことに、これらの遺伝子中には、本化学独立栄養細菌に特有とされる *hao* 遺伝子や *cbbL* 遺伝子が存在した (表 3.5)。

前述した通り、*N. europaea* はアンモニアを亜硝酸へと酸化することでしかエネルギーを獲得する術を持たない。アンモニア酸化は、アンモニアをヒドロキシアミンに酸化する前段の反応、およびヒドロキシアミンを亜硝酸へと変換する後段の反応の二段階で行われ、後者の反応はヒドロキシルアミン酸化還元酵素 (HAO: hydroxylamine oxidoreductase, *hao* 遺伝子によってコード) によって触媒される[19]。したがって、MazFne1 が細胞内で遊離した際は、アンモニア酸化活性が低下すると予測され、*N. europaea* の ATP および NADH の獲得が阻害されると考えられる。また、本独立栄養細菌は二酸化炭素を固定する際、カルビ

ンベンソン回路を使用する。本回路において重要とされる反応が二酸化炭素を取り込む反応であり、この反応はリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCo: Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) によって触媒される。既往研究により、*N. europaea* が持つ RuBisCo は大サブユニットならびに小サブユニットから成る I 型に分類されるものであることが報告されている[95-98]。本研究では大サブユニットをコードする *cbbL* 遺伝子が MazFne1 の主要ターゲットとして検出された (表 3.5)。したがって、MazFne1 によって本酵素の翻訳が阻害された場合、*N. europaea* の同化反応が停止すると考えられる。また本微生物がカルビンベンソン回路を使用する際には、ATP や NADH といったエネルギーや還元力を使用する必要があるが、先に述べた通りアンモニア酸化に関わる HAO の翻訳が阻害されることから、理論上、ATP や NADH の獲得効率も低下し、本回路の使用は阻害される。これら事実を合わせて鑑みた際、MazFne1 は効率的に *N. europaea* の増殖を抑制する酵素であると考えられる。

表 3.5 MazFne1 の主要標的と予測される遺伝子群

Rank	Name	Protein	Length (bp)	Expected	Actual	P
1	NE0161	Hemolysin-type calcium-binding region:RTX N-terminal domain	9195	89.43	157	5.30E-11
2	NE1652	Possible dolichol monophosphate mannose synthase	2679	41.25	79	8.75E-08
3	hsdR	Restriction enzymes type I helicase subunits and related helicases	3150	52.46	94	1.16E-07
4	hao2	Hydroxylamine oxidoreductase	1713	23.91	52	3.56E-07
5	hao1	Hydroxylamine oxidoreductase	1713	23.91	52	3.56E-07
6	hao3	Hydroxylamine oxidoreductase	1713	23.91	52	3.56E-07
7	cbbL	Ribulose bisphosphate carboxylase, large chain	1422	25.22	53	7.15E-07
8	NE1467	Fatty acid desaturase, type 2:Fatty acid desaturase, type 1	1197	22.82	49	9.90E-07
9	NE1757	Hypothetical protein	3453	50.25	87	1.33E-06
10	ftsH	Cell division protein	1860	33.6	64	1.54E-06

3.1 項において、遅増殖性の微生物には TA 機構が数多く存在することを記載した [18]。本研究の結果から、MazFne1 が細胞内で遊離した際、細胞内における生化学的な反応が減衰することが予測され、TA 機構は微生物の遅増殖性に関与する可能性が示唆された。

細菌の中には「生きているが培養できない (VBNC: Viable but non-culturable)」や「休止」と形容されるものも多く存在し、これらの細菌は一般的にストレス環境に強いとされる。また近年の報告により、TA 機構が VBNC や休止細菌といった表現系を誘起することも知られ始めている [56, 99]。したがって、*N. europaea* に関しても MazFne1 を用いることでストレス環境下で自身の増殖を抑制し、細胞が受ける損傷を最小限にとどめている可能性がある。TA 機構を介して休止細菌となった細菌では、ストレス因子 (抗生物質) を取り除いた際には速やかに再増殖することが知られている [57]。*N. europaea* に関しても、周囲の環境が増殖に適したものになった際に MazFne1 によって抑制されていた増殖抑制が解除されるのかもしれない。

現状、どのようなストレスが MazFne1 の転写・翻訳を亢進するかは不明である。今後、トランスクリプトームやプロテオーム解析を行うことで、MazFne1 の生物学的意義をより深く議論することが可能になると考えられる。また現状、硝化細菌への遺伝子組み換え技術の適用は技術的に難しいが、将来的にこれら技術が確立され、MazFne1 の過剰発現株やノックアウト株を作成することが出来たならば、上述した環境ストレス下での *N. europaea* の表現系 (増殖速度や生存率) の比較、ひいては MazFne1 のストレス耐性への寄与を評価することが可能となり得る。

なお *N. europaea* のゲノム中より UGG 配列を含まない CDS (≡ストレス環境下で優先的に翻訳されると考えられる遺伝子群) の抽出も行ったが、2,462 の CDS のうち、リボソームの小サブユニットをコードする遺伝子 (*rpsU*) が抽出されたのみであった。以上の結果も、MazFne1 が特定のタンパク質を優先的に翻訳させる機能を持つというよりは、細胞内の代

謝活性を低下させ、休眠状態に移行するための「スイッチ」として働く可能性を示しているのかもしれない。

3.3 NE1191 にコードされた MazF エンドリボヌクレアーゼ (MazFne3) の解析

3.3.1 実験方法

3.3.1.1 プラスミドおよびオリゴヌクレオチド

mazEne3 をコードする pET19b ベクターは GenScript Japan (Tokyo, Japan) より, *mazFne3* をコードする pMK-T ベクターは Life Technologies Japan Ltd. (Tokyo, Japan) より購入した。これらの *mazE* 遺伝子, *mazF* 遺伝子の配列に関しては大腸菌内での翻訳効率を考え, コドンの最適化を行った。蛍光修飾オリゴヌクレオチドは Japan Bio Services より購入した。

3.3.1.2 プラスミド構築

pMK-T をコードする *mazFne3* および pET21c を *XhoI* および *BamHI* (Toyobo) で切断した。これらの直鎖 DNA を MinElute PCR purification kit (Qiagen) によって精製した。*mazFne3* 断片は DNA ligation kit (Takara) を用いて pET21c に組み込み, pET21c-*mazFne3* を構築した。それぞれのプラスミドを大腸菌 DH5 α 株に形質転換し, これらの大腸菌から QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いてプラスミドの抽出を行った。プラスミド配列の確認には AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。

3.3.1.3 MazEne3 発現・精製

pET19b-*mazEne3* を *E. coli* BL21 (DE3) (BioDynamics Laboratory Inc.) へと導入した。本プラスミドを持つ大腸菌を一晩前培養後, 1 L の LB 培地へと植え継いだ。大腸菌を 37°C で培養し, OD600 が 1.0 に達した際に 1 mM の IPTG を添加した。3.5 時間培養後, これらの菌体培養液を 7,000 g で遠心し, 菌体を回収し, -80°C で保存した。

MazEne3 の誘導を行った大腸菌細胞を氷上で融解し, 14 mL の菌体懸濁用緩衝液 (20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0), 300 mM NaCl, 40 mM イミダゾール, および 5 mM 2-メルカプトエ

タノール) に溶解した。細胞を超音波破碎し遠心した後、上清を回収した。0.45 μm 膜 (Millex) でろ過し、細胞懸濁物を除いた。1-mL His-Trap FF カラム (GE Healthcare) に上清を添加し、AKTA pure 25 (GE Healthcare) を用いて非特異的吸着タンパク質の除去を行った。デカヒスチジンタグが付加された MazEne3 は溶出用緩衝液 (20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0), 300 mM NaCl, 500 mM イミダゾール, および 5 mM 2-メルカプトエタノール) により溶出した。溶出には以下のプログラムを用いた。流速 1 mL/min, 溶出勾配 20 mL, 画分容量 0.5 mL。溶出開始から 38 番目の画分を実験に使用した。分子量ならびに純度は Agilent 2200 TapeStation P200 ScreenTape Assay (Agilent Technologies) によって確認した。タンパク質濃度は Qubit Protein Assay Kit (Life Technologies) により決定した。

3.3.1.4 MazFne3 の発現・精製

pET21c-*mazFne3* を *E. coli* BL21 (DE3) (Nippon Gene) へと導入した。本プラスミドを持つ大腸菌を一晩前培養後、1 L の 3%塩濃度の LB 培地へと植え継いだ。大腸菌を 37°C で一晩本培養し、1 mM の IPTG を添加した。3.5 時間培養後、これらの菌体培養液を 7,000 g で遠心し、菌体を回収し、-80°C で保存した。

MazFne3 の誘導を行った大腸菌細胞を氷上で融解し、14 mL の菌体懸濁用緩衝液 (20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0), 0.05% Triton X-100, 300 mM NaCl, 40 mM イミダゾール, および 5 mM 2-メルカプトエタノール) に溶解した。細胞を超音波破碎し遠心した後、上清を回収した。0.45 μm 膜 (Millex) でろ過し、細胞懸濁物を除いた。1-mL His-Trap FF カラム (GE Healthcare) に上清を添加し、AKTA pure 25 (GE Healthcare) を用いて、非特異的吸着タンパク質の除去を行った。ヘキサヒスチジンタグが付加された MazFne3 は溶出用緩衝液 (20 mM リン酸バッファー (pH 8.0), 0.05% Triton X-100, 300 mM NaCl, 500 mM イミダゾール, および 5 mM 2-メルカプトエタノール) により溶出した。溶出には以下のプログラムを用いた。流速 1 mL/min, 溶出勾配 20 mL, 画分容量 0.5 mL。溶出開始から 22 番目の画分を実験に

使用した。分子量ならびに純度は Agilent 2200 TapeStation P200 ScreenTape Assay (Agilent Technologies) によって確認した。タンパク質濃度は Qubit Protein Assay Kit (Life Technologies) により決定した。

3.3.1.5 MazEne3 および MazFne3 の活性測定

30 pmol の MazFne3 を 20, 60, および 180 pmol の MazEne3 と室温で 10 分間混合した。これらのサンプルと 100 ng の RNA500-2 を酵素反応用緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.01% Triton X-100, および 4 U の RNase inhibitor (Takara)) と混合し, 37°C で 30 分間反応させた。サンプルを RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research) により精製後, Gel loading buffer II (Ambion) を加えた。95°C で 5 分間熱処理をしたのち, 7M 尿素を含む 10% のポリアクリルアミドゲルを用いて泳動した。ゲルは SYBR Gold (Life Technologies) により染色し, Typhoon 9210 imager (GE Healthcare) によって検出した。

3.3.1.6 超並列シーケンシング

1.5 µg の 5 種類の混合 RNA を基質とし, 400 ng の MazFne3 と酵素反応用緩衝溶液を混合し, 37°C で 30 分間反応させた。リン酸化, バーコードライゲーション, シーケンシングライブラリーの構築は 2.2.7 項で示した方法に基づき行った。解析値に関しては 2.2.8 項に記載したものをを用いた。超並列シーケンシングのデータは DDBJ Sequence Read Archive (DRA004562) に登録した。

3.3.1.7 蛍光アッセイを用いた MazFne3 の活性測定

200 ng の MazFne3 もしくは 1 U の RNase I (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) を酵素反応用緩衝溶液中で 20 pmol の蛍光修飾オリゴヌクレオチドと混合した。反応は 37°C で行い, 蛍光強度を Light Cycler 480 system (Roche) を用いて一分間隔で測定した。

3.3.1.8 蛍光アッセイを用いた MazEne3 による MazFne3 活性抑制

10 pmol の MazFne3 を 2, 10, 50 pmol の MazEne3 とを混合し、室温で反応させた。その後、反応溶液に 20 pmol の蛍光修飾オリゴヌクレオチド (DR-13-AAU) および酵素反应用緩衝溶液を加え、37°Cで反応させた。対照反応として 1 U の RNase I (Epicentre) 添加系、酵素非添加系を用意し、同様の条件のもと蛍光強度の測定を行った。

3.3.2 実験結果

3.3.2.1 MazEFne3 の取得およびその酵素活性測定

MazFne3 の切断活性を調べるためにアフィニティークロマトグラフィー法を用いて本酵素の精製を行った (図 3.7 A)。本酵素および大腸菌由来の MazF (MazFec) を 533-nt の基質 RNA と混合した結果, RNA の切断が確認された (図 3.7 B)。また RNA の切断断片が ACA 配列を特異的に切断する MazFec で処理したものと異なっていたことから (図 3.7 B), MazFne3 が機能酵素であり, 独自の切断配列を持つことが示唆された。

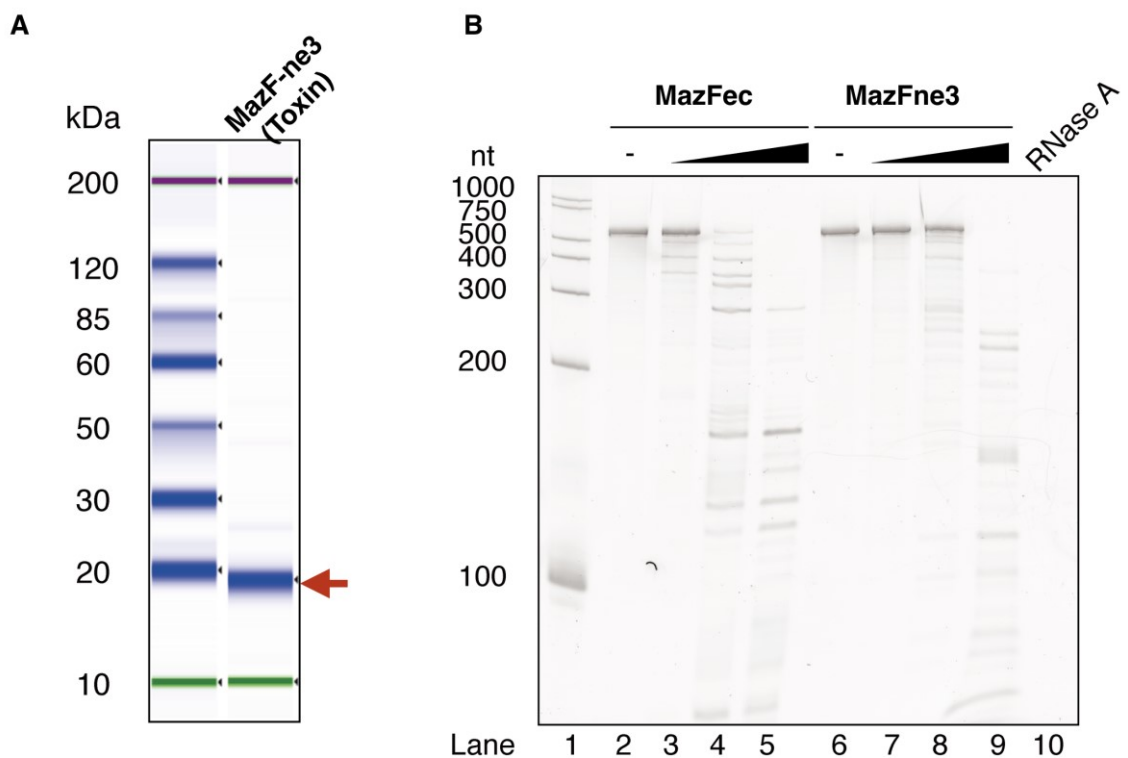


図 3.7 MazFne3 の精製, および酵素活性の測定 (A) 精製した MazF の電気泳動結果。赤い矢印は精製された MazFne3 を示す。(B) MazFne3 および大腸菌の MazF による RNA 切断。レーン 1, RNA ラダー。レーン 2, 6, 酵素非添加系。レーン 3-5, 10, 50, および 250 ng の MazFec 添加系。レーン 7-9, 10, 50, および 250 ng MazFne3 の添加系。レーン 10, 100 ng の RNase A 添加系。

次に Antitoxin である MazEne3 の精製を行い (図 3.8 A), MazEne3 が MazFne3 の切断を抑制するかを検証した。図 3.8 B に示した通り, MazEne3 と MazFne3 を混合した場合, MazFne3 の RNA 切断活性は MazEne3 の濃度に依存して抑制され (レーン 4-6), MazEne3 と MazFne3 が TA 対を構築することが判明した。

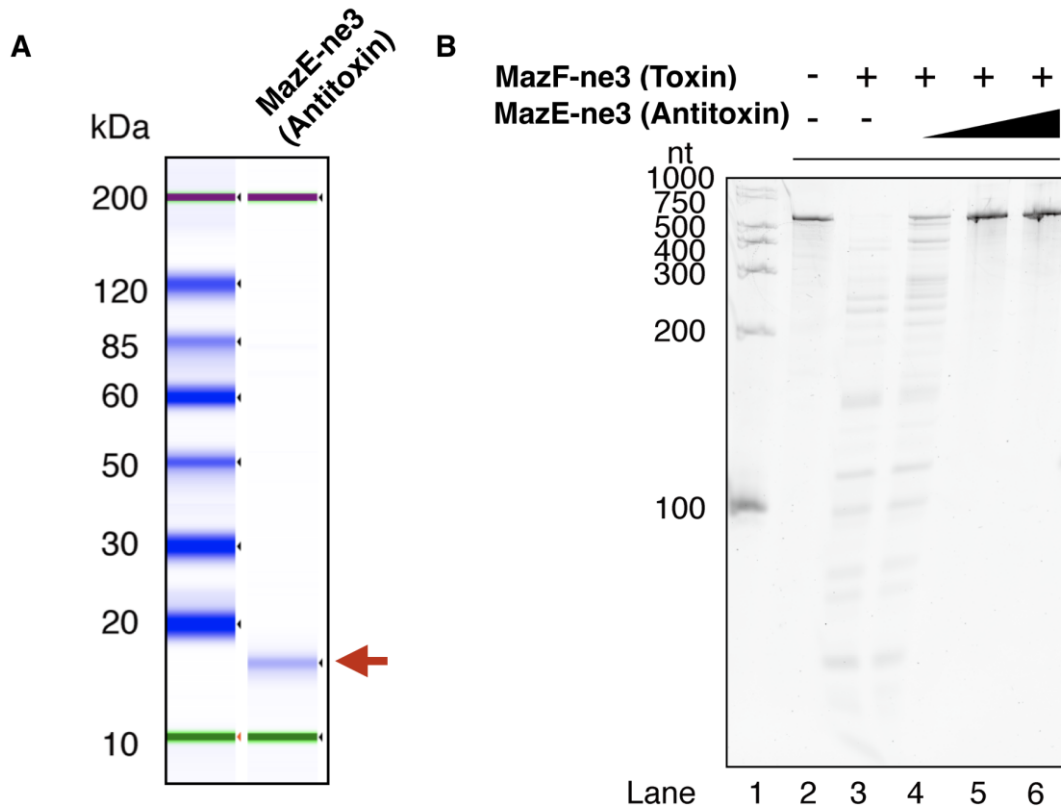


図 3.8 MazEne3 の精製, および酵素活性の測定 (A) 精製した MazE の電気泳動結果。赤い矢印は精製された MazEne3 を示す。(B) MazEne3 による MazFne3 の酵素活性の抑制。レーン 1, RNA ラダー。レーン 2, 酵素非添加系。レーン 3-6, 30 pmol の MazFne3 を添加。レーン 4-6, 20, 60, もしくは 180 pmol の MazEne3 を添加。

3.3.2.2 超並列シーケンシング法による切断配列の推定

第二章で構築した超並列シーケンシング法を用いて MazFne3 の切断配列の推定を行った。その結果, 本酵素は AAU 配列を特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼであることが示唆された (図 3.9)。

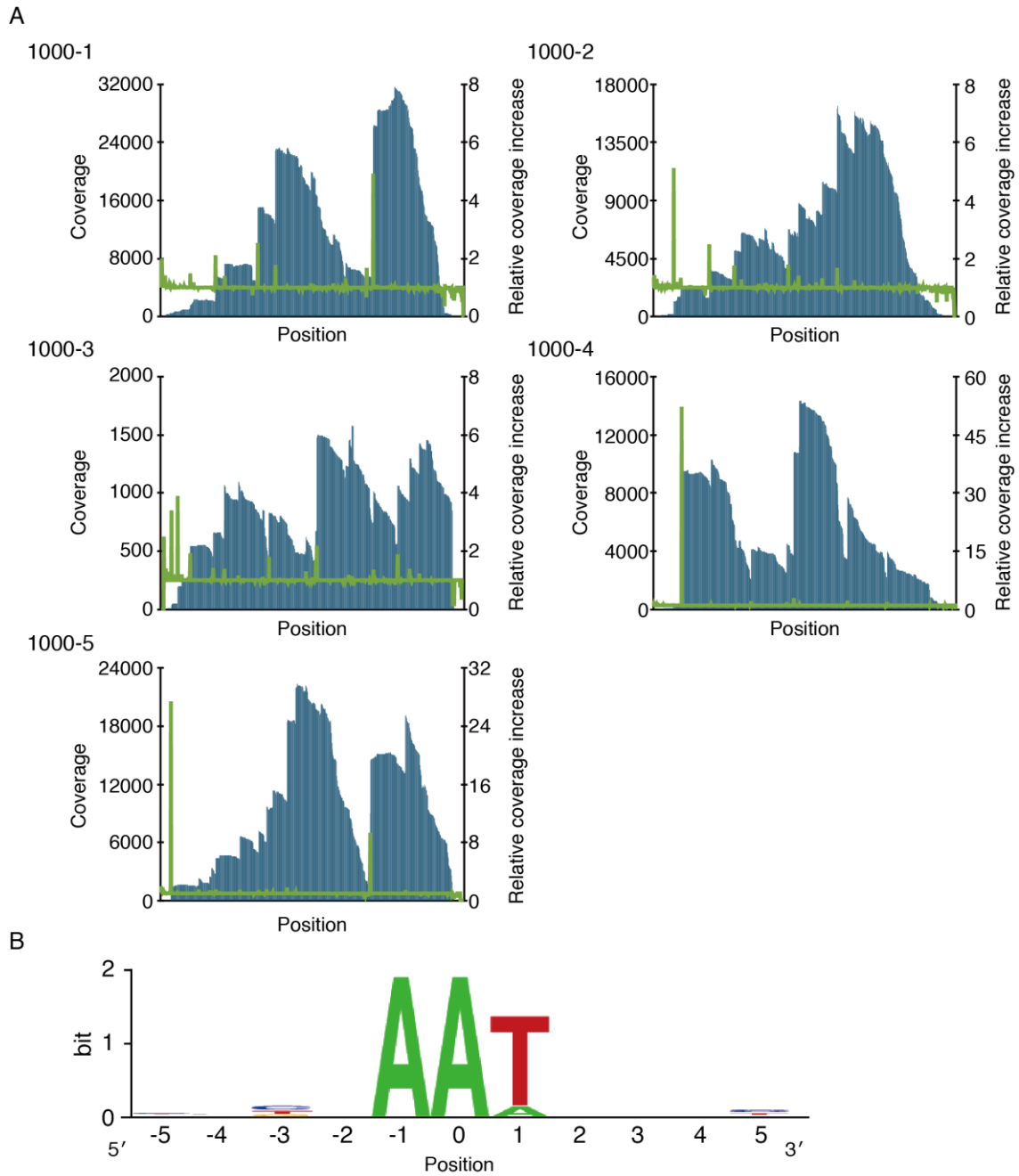


図 3.9 MazFne3 における切断候補配列の特定 (A) 冗長度 (青), ならびに Relative coverage increase (緑), (B) 保存された塩基の抽出。Relative coverage increase が増加した塩基を 0 と設定した。解析には表 3.6 に示した計 25 配列を使用した。

表 3.6 MazFnc3 を用いて RNA 断片化時に抽出された全 25 配列

RNA type	Rank	Position	Relative coverage increase	Coverage	Sequence (5' to 3') ^a
1000-1	1	725	4.93	25,940	CCCAA <u>A</u> TAGAC
	2	332	2.53	14,909	CAGAA <u>A</u> TCACT
	3	188	2.11	5,407	CCTAA <u>A</u> TGGAC
	4	392	1.78	22,871	CGCCA <u>A</u> TCTCT
	5	703	1.68	5,667	CGAGA <u>A</u> TCATG
1000-2	1	71	5.12	1,151	ACCGAA <u>A</u> TCCCT
	2	192	2.49	3,703	ATTTA <u>A</u> TGTTT
	3	461	1.79	6,739	CTTCA <u>A</u> TTTGT
	4	277	1.75	5,066	TCGTA <u>A</u> TGGTT
	5	628	1.68	16,116	GCGCA <u>A</u> AGGAC
1000-3	1	533	2.19	1,472	AATGA <u>A</u> TATCG
	2	808	1.89	1,061	TCCCA <u>A</u> TTCAA
	3	218	1.39	1,067	TTGAA <u>A</u> TCACC
	4	849	1.39	1,294	TTCGA <u>A</u> TTTTCG
	5	726	1.36	1,015	ATTCA <u>A</u> TCTAC
1000-4	1	98	52.27	9,200	TCCCA <u>A</u> TAGTT
	2	480	2.88	10,727	CCTGA <u>A</u> TACAC
	3	663	2.21	7,650	CCTTA <u>A</u> TAAGC
	4	335	2.06	4,102	GCCCA <u>A</u> TACGT
	5	798	1.81	3,956	AGCTA <u>A</u> TCGGA
1000-5	1	36	27.44	1,427	TCGGA <u>A</u> TCTTT
	2	715	9.34	8,969	CATGAA <u>A</u> TGAA
	3	432	1.81	18,470	CGCGA <u>A</u> AGGAT
	4	716	1.61	14,443	ATGAA <u>A</u> TGAAC
	5	362	1.58	9,653	TACGA <u>A</u> TGGGC

^a 下線は Relative coverage increase が増加した塩基を表す。

3.3.2.3 蛍光消光現象を用いた MazFne3 の切断配列の同定

MazFne3 が切断する配列を同定するため、表 3.7 に示した蛍光修飾オリゴヌクレオチドを用いて RNA 切断活性の測定を行った。

表 3.7 本節で用いた蛍光修飾オリゴヌクレオチド

Name	Sequence (5' to 3') ^a
DR-13-AAU	<u>AAAAAAAAUAAAAA</u>
DR-13-AAA	<u>AAAAAAAAAAAAAA</u>
D-13-AAA	<u>AAAAAAAAAAAAAA</u>
R-13-UCUCG	<u>UCUCGGUGCGUUG</u>
R-13-GUUGU	<u>GUUGUCAUGCCGG</u>
R-13-UGACA	<u>UGACACGAACCGC</u>
DR-13-GAU	<u>AAAAAGAUAAAAA</u>
DR-13-AAC	<u>AAAAAAACA AAAA</u>

^a 下線は RNA ヌクレオチドを、それ以外は DNA ヌクレオチドを示す。

DR-13-AAU を MazFne3 と共に混合した際、蛍光強度の顕著な増加が観測された。この結果から、超配列シーケンシング法で示されたとおり、MazFne3 が AAU 配列を切断することが明らかとなった (図 3.10 A)。超配列シーケンシング法では微かながら AAA も MazFne3 の切断を受けることが示唆されていたため (図 3.9 B)、次に DR-13-AAA を合成し、本オリゴヌクレオチドに対しても同様の実験を行った。結果、本オリゴヌクレオチドも MazFne3 による切断を受けることが判明した (図 3.10 B)。しかしながら、DR-13-AAU が 15 分以内に完全に切断されたのに対し、DR-13-AAA は反応終了時においても約 50% のオリゴヌクレオチドが未切断と RNA 切断速度は大きく異なった。以上結果から、本酵素の主要標的配列は AAU 配列であると考えられた。

なお MazFne3 はアデニンから構成されるか DNA オリゴヌクレオチド (DR-13-AAA) や 3 種類の RNA オリゴヌクレオチド (R-13-UCUCG, R-13-GUUGU, および R-13-UGACA) と

MazFne3 を混合した際、MazFne3 はこれらオリゴに対して全く切断活性を示さない、あるいは非常に弱い切断活性しか持たなかった (図 3.10 C-F)。加えて DR-13-AAU を MazFne3 および MazEne3 と混合した際は、MazEne3 濃度依存的に DR-13-AAU の切断が抑制される結果となった (図 3.11)。これら結果から、DR-13-AAU の切断は精製したタンパク質画分に混入した DNase や RNase による反応ではないこと、また MazFne3 は無作為に RNA の切断を触媒する酵素でないことが示された。

そこで最後に内部配列 AAU の最初の RNA 塩基であるアデニンを他プリン塩基に置換した DR-13-GAU, および最後の RNA 塩基であるグアニンを他ピリミジン塩基に置換した DR-13-AAC を用意し、これらオリゴヌクレオチドに対する MazFne3 の切断活性を調査した。図 3.10 G, H に示す通り、いずれの蛍光修飾オリゴヌクレオチドも MazFne3 の切断を受けなかった。以上全ての結果から、MazFne3 が AAU 配列を特異的に切断する酵素であることが証明された。

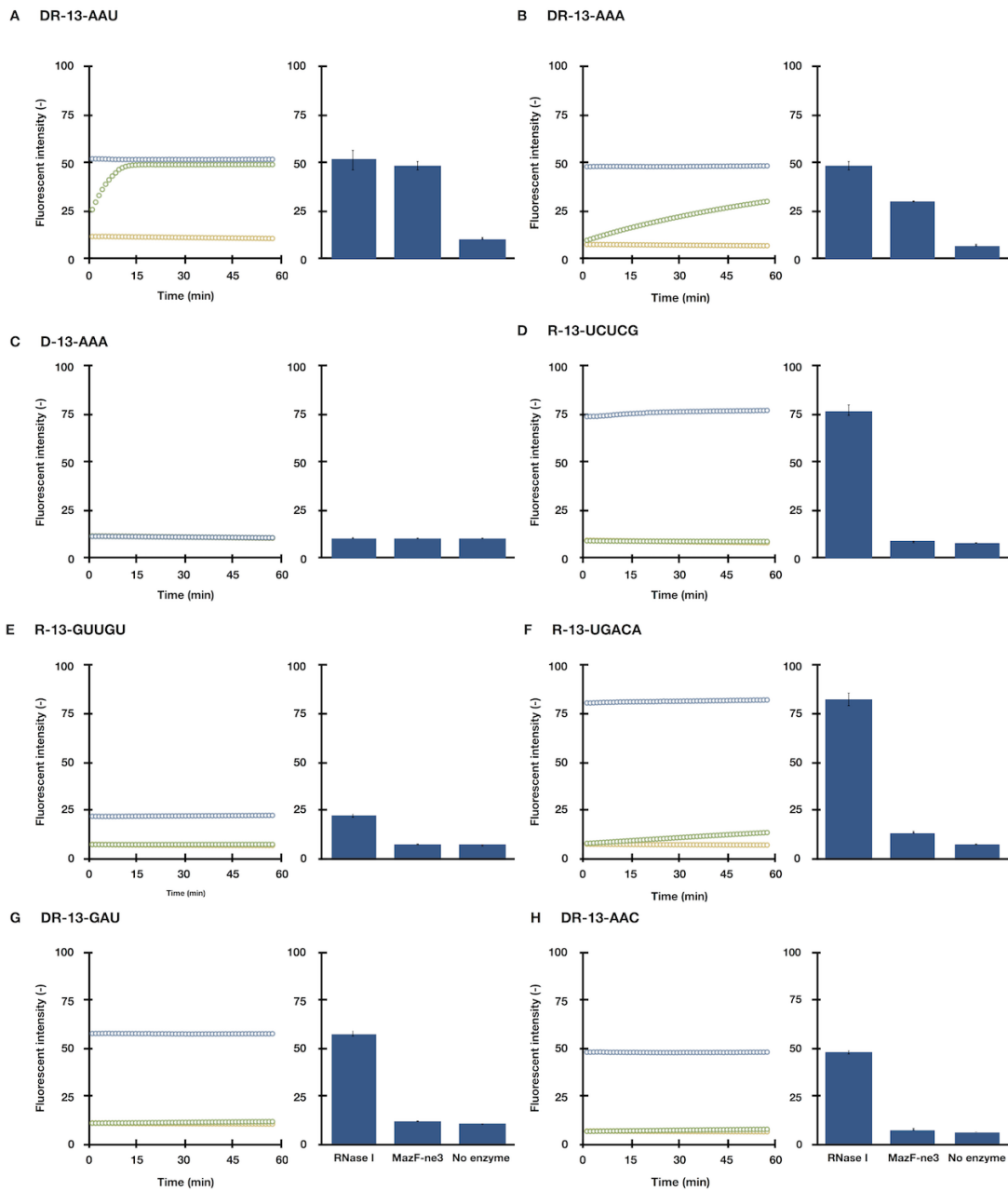


図 3.10 MazFne3 による RNA の配列特異性 1 U の RNase I (青), もしくは MazFne3 (緑) と各種蛍光修飾オリゴヌクレオチドと反応させた。対照系として、酵素非添加系 (黄) における蛍光強度も測定した。左のグラフは蛍光強度の経時変化を、右のグラフは反応終了時における蛍光強度を示す。(A) DR-13-AAU, (B) DR-13-AAA, (C) D-13-AAA, (D) R-13-UCUCG, (E) R-13-GUUGU, (F) R-13-UGACA, (G) DR-13-GAU, (H) DR-13-AAC。

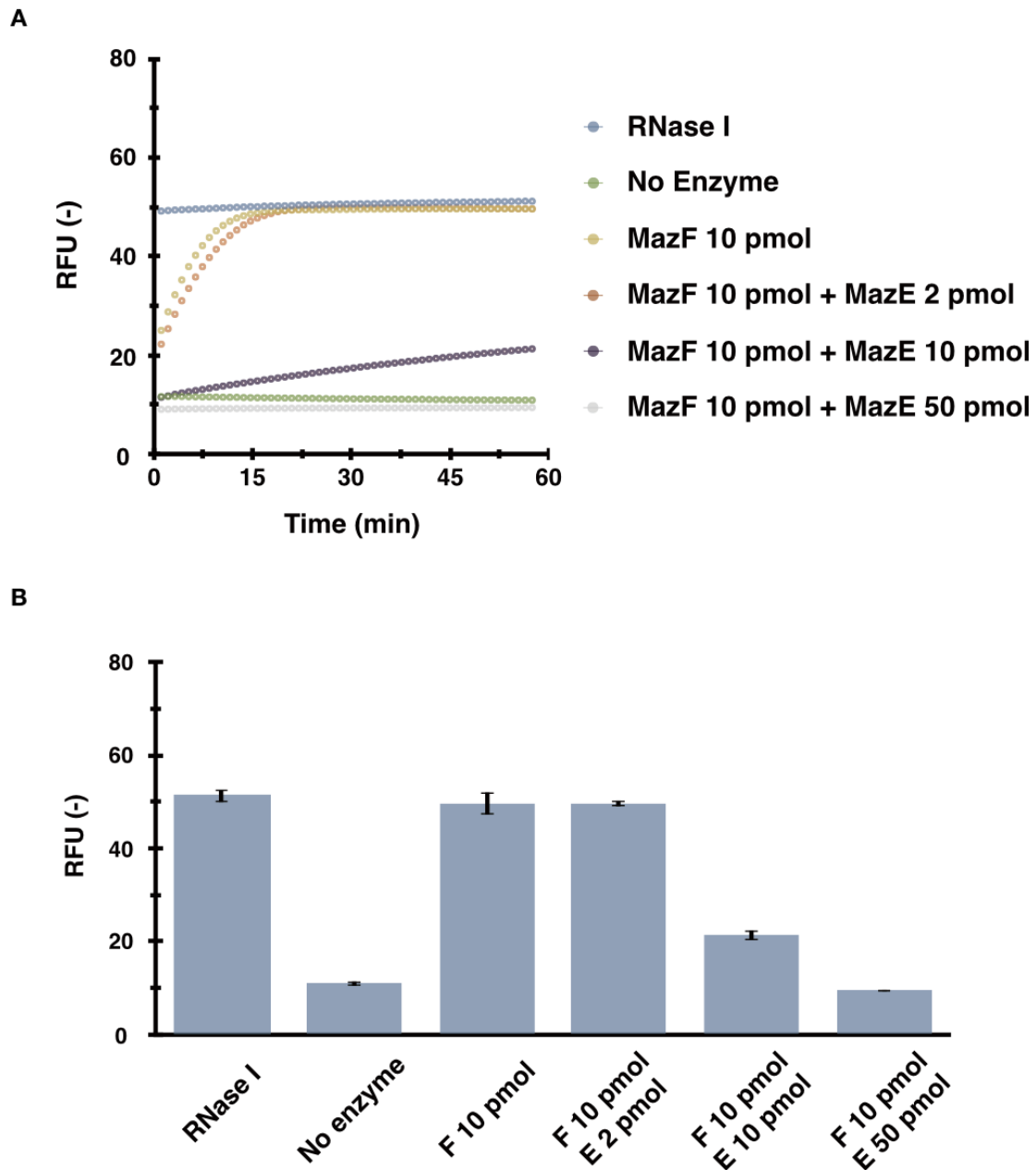


図 3.11 MazEne3 による MazFne3 の RNA 切断活性抑制 10 pmol の MazFne3 を 2 pmol (橙), 10 pmol (紫), 50 pmol (灰) の MazEne3 とあらかじめ反応させ, この後, 20 pmol の DR-13AAU を反応系に添加した。対照反応として 1 U の RNase I 添加系 (青) と酵素非添加系 (緑) を用意した。(A) 蛍光強度の経時変化, (B) 反応終了時の蛍光強度。

3.3.3 考察

本節では遺伝子座 NE1181 にコードされる MazF (MazFne3) が機能酵素であり、とりわけ RNA 配列 AAU に対し強い切断活性を持つ酵素であることを報告した。また、NE1182 にコードされた MazE (MazEne3) が MazFne3 の RNA 切断活性を抑制することを実験的に証明し、これらの酵素は互いに TA 対を構成していることを証明した。

AAU 配列が多く含まれる遺伝子は MazFne3 の主要な細胞内標的であると考えられる。前節と同様に、各遺伝子における AAU が含まれる確率を p ($p = (\text{遺伝子配列中の A の割合})^2 \times (\text{遺伝子配列中の U の割合})$)、各遺伝子の長さ L 、特定の遺伝子中に切断配列が K 回以上含まれる確率 P とし、全ての遺伝子において P 値を算出した (図 3.12)。

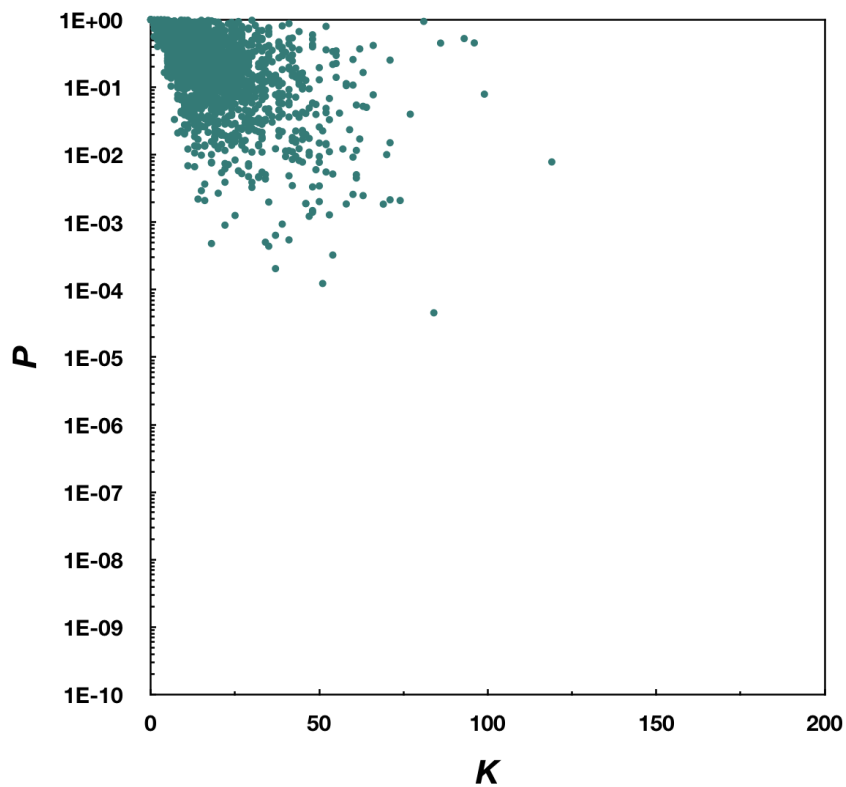


図 3.12 *N.europea* が有する全遺伝子における AAU 配列の P 値と K 値との関係

これら遺伝子群のうちの内、 P 値が低いもの上位 10 の遺伝子を抽出した (表 3.8)。しかしながら、表 3.8 に示した遺伝子群に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。

表 3.8 MazFne3 の主要標的と予測される遺伝子群

Rank	Name	Protein	Length (bp)	Expected	Actual	P
1	NE1298	TPR repeat	3498	53.02	84	4.54E-05
2	recN	ABC transporter	1686	29.05	51	1.24E-04
3	flgE	Flagella basal body rod protein	1233	19.36	37	2.05E-04
4	NE1802	Hypothetical protein	1575	32.63	54	3.26E-04
5	NE0799	Conserved hypothetical protein	1158	18.72	35	4.41E-04
6	NE0670	Possible membrane fusion protein MtrC	999	7.21	18	4.83E-04
7	NE1241	Tyrosinase	1503	18.11	34	5.05E-04
8	NE1935	Inorganic H ⁺ pyrophosphatase	2058	23.34	41	5.47E-04
9	NE1897	Peptidase family M48	1554	20.57	37	6.39E-04
10	trpD	Phosphoribosylanthranilate transferase	1026	10.26	22	9.04E-04

そこで次に *N. europaea* のゲノム中より、AAU 配列を含まない CDS の抽出を行った。第二章で示した通り切断配列を含まない転写産物は MazF の切断を受けない。したがって、これらのタンパク質は MazFne3 が細胞内で遊離した際、優先的に翻訳されると考えられる。CDS を抽出した結果、2,642 の CDS 中、8 の CDS において AAU 配列が含まれないことが判明した。興味深いことに、これら 8 遺伝子中 3 遺伝子 (*merE*, *merP*, *merT*) が水銀耐性に関わる遺伝子であった (表 3.9)。

表 3.9 AAU 配列を含まない CDS

Locus	Gene symbol	Length (bp)	Annotation
NE0390	<i>rpmH</i>	135	Ribosomal protein L34
NE2575	<i>merE</i>	240	mercury resistance protein
NE0841	<i>merP</i>	276	mercury scavenger protein
NE0842	<i>merT</i>	351	mercuric transport protein
NE1224	-	264	hypothetical protein
NE1344	-	279	hypothetical protein
NE2523	-	231	hypothetical protein
NE2538	-	912	hypothetical protein

真正細菌において、水銀耐性に関わる遺伝子群は *mer* と呼ばれるオペロンを構成することが知られている[100-102]。ゲノム解析の結果より、*N. europaea* においてはその構成遺伝子は *merTPCADE* であることが知られている (表 3.10)[97]。既往研究により、これらの遺伝子群は水銀存在下で著しく発現量が増加することが知られており[93]、このことから *N. europaea* における *mer* オペロン内の遺伝子群は機能遺伝子であることが推察される。また抽出された 3 遺伝子は水銀分子の輸送に関わることが知られていることから、MazFnc3 が遊離した細胞内では水銀分子の輸送系が活発化され、水銀の無毒化を促している可能性が示唆された。

表 3.10 *N.europea* における水銀耐性遺伝子

Locus	name	Gene product	Length (bp)	AAU occurrence
NE0842	<i>merT</i>	mercuric transport protein	351	0
NE0841	<i>merP</i>	mercury scavenger protein	276	0
NE0840	<i>merC</i>	mercury transport protein	423	2
NE0839	<i>merA</i>	mercuric reductase	1686	9
NE0838	<i>merD</i>	transcriptional regulator, MerR family	366	2
NE2575	<i>merE</i>	mercury resistance protein	237	0
NE0843	<i>merR</i>	transcriptional regulator, MerR family	426	4

さらに、NE1224 にコードされる遺伝子に関しても AAU 配列を含まない遺伝子であった。本遺伝子の遺伝子情報はその機能や名称が不明であるとされていたが(表 3.9), RASTA-Bacteria (Rapid Automated Scan for Toxins and Antitoxins in Bacteria) [103]と呼ばれるゲノム上の TA 機構を解析するソフトウェアを用いて *N. europaea* のゲノムを解析した際、本遺伝子が II 型 TA 機構に分類される VapB Antitoxin をコードしていることが判明した。II 型 TA 機構に分類される Antitoxin の多くがそのプロモーター領域に結合し、自身の転写活性を抑制することが知られている[104]。したがって、MazFne3 の細胞内で遊離した際、VapB Antitoxin が自身の上流のプロモーター領域に結合し、自身および隣接する VapC_{NE1225} (VapC: MazF とは別種の RNA 切断型 Toxin。第 1 章参照) の転写が抑制されると推察される。このことから *N. europaea* は VapC_{NE1225} および MazFne3 を周囲の環境に応じて使い分け、細胞内翻訳を制御していると考えられる。

3.4 総括

本章では遅増殖性の化学独立栄養細菌である *Nitrosomonas europaea* に保存された MazF の解析を行った。NE0921 および NE1181 それぞれの MazF (MazFne1 および MazFne3) の相同性をアミノ酸配列で比較した際、その相同性は 15.6 % と低く (図 3.1 B)、これらの MazF は異なる切断配列を持つことが予測されていた。超並列シーケンシング法および蛍光共鳴エネルギー移動を用いた RNA 切断活性検出法によりそれぞれの MazF の切断配列を実際に調査したところ、MazFne1 が UGG 配列を、MazFne3 が AAU 配列と、それぞれ異なる配列を切断することが判明した。

それぞれの切断配列の含有率が高い、もしくは切断配列を含まない CDS を抽出した際、各切断配列は特定の遺伝子群に共通して多い、もしくは存在しないことが明らかとなった。これら 2 種類の MazF は隣接する MazE (MazEne1 および MazEne3) と Toxin-Antitoxin 対を形成することと合わせて考えると、*N. europaea* はストレス環境下において、これらの MazEF 機構を用いて自身の増殖や翻訳を精妙に制御していると考えられる。

このように MazF の切断配列同定により、これまで蓄積されてきた *N. europaea* の生理・生化学的知見と MazF の特性を関連づけることが可能となった。本研究では、*N. europaea* が有する MazF を解析したが、これら結果から、第二章で構築した手法が微生物細胞内で起っている出来事を推察するための有力な手法であることを改めて明らかとした。今後、本研究で開発した手法が微生物細胞の翻訳制御機構を理解する上での有力な手法となることが期待される。

第四章

結言，展望

第4章 結言, 展望

4.1 結言

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 *N. europaea* 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。MazF は RNA 切断型 Toxin であり、その酵素特性・基質特異性の解明は微生物の転写・翻訳機構の解明に繋がる。本節では以下に結言として、各章をまとめ記載する。

第一章では Toxin-Antitoxin (TA) 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。

第二章では超並列シーケンシング法、RNA 切断活性検出法を組み合わせることで、MazF Toxin 分子の基質特異性を「高精度・高感度・高効率」に同定する手法の構築に関して記載した。超並列シーケンシング法では数千万という分子を一度に解析できるため、本手法を用いることで高スループット、高精度に切断候補配列の探索が可能となる。また蛍光消光現象を用いた RNA 切断活性検出法では反応時間が数十分と実験が簡便・迅速であるばかりでなく、経時的な RNA 切断活性の追跡が可能となる。本章ではこれら二つの手法の組み合わせが MazF の切断配列の同定に有効であることを示した。

第三章では化学独立栄養細菌である *Nitrosomonas europaea* に保存された MazF の解析を行った。NE0921 および NE1181 にコードされた遺伝子がそれぞれ UGG および AAU を切断する機能的な MazF (MazFne1 および MazFne3) であることを証明し、これらの MazF が隣接する MazE (MazEne1 および MazEne3) と Toxin-Antitoxin 対を形成することを報告した。興味深いことに、UGG 配列はアンモニア酸化や炭酸固定に関わる遺伝子群に非常に多く保存されていたことから、*N. europaea* はストレス環境下で自身の代謝を抑制し休眠状態に移行

する「スイッチ」として MazFne1 を使用しているのではないかと考えられた。また MazFne3 の切断配列である AAU を含まない遺伝子群を抽出した際、水銀耐性に関わる遺伝子群が抽出されたことから、MazFne3 が水銀耐性に関わる可能性が示唆された。

このように本研究で構築した手法は、従来法では困難であった高精度・高スループットな配列特異的 Toxin エンドリボヌクレアーゼの切断配列切の特定を可能にしており、本酵素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る。本研究で構築した一連の研究手法は、「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」、「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、これら手法が真正細菌や古細菌に保存された MazF に適用されていくことで、MazEF 機構を介した微生物の翻訳制御のより詳細な分子学的機構が明らかになると考えられる。

4.2 展望

上述した分子生物学的メカニズムの解明、ならびに MazF の生物学的意義を議論していく上では、本研究に加え、「MazF 自身がどのようなストレスに応答して、転写・翻訳量が亢進するのか？」や「MazF が細胞内で遊離した際に細胞内の翻訳にどの程度影響を与えるのか？」に関する情報が不可欠である。近年、シーケンシング技術が急速に発達しており、網羅的な遺伝子発現解析が容易となった。微生物細胞に種々のストレスを与え、MazF の遺伝子発現量を定量することで MazF の発現を誘起するストレス因子の同定を行うことが今後の研究において必要となる。またリボソームプロファイリングのように「今まさに翻訳されつつあるタンパク群」の網羅的同定技術も近年向上しており、MazF の発現量が上昇したストレス環境下で、タンパク翻訳プロファイルがどう変化するのかについても定量的な議論が行われることが期待される。シーケンシング技術を基とした解析に加えて、タンパク質翻訳からの解析も忘れてはならない。従来法のプロテオーム解析はもちろんのこと、

近年ではクリックケミストリーを用いて「特定の条件を細胞に与えたのち、細胞内で特異的に翻訳されるタンパク群」の検出することも可能となりつつある。今後、これらの技術を MazF 研究に適用していくことで、MazF が細胞内で遊離した際の影響を検討することが可能となり得る。第三章で述べた通り、MazF の研究は現状、大腸菌や枯草菌のようなモデル微生物、黄色ブドウ球菌や結核菌といった病原性微生物のものを中心として進められている。これら微生物と *N. europaea* のような環境微生物が生育する環境が異なることは明々白々であるが、今後、本研究で構築した MazF の切断配列特定手法、および上述した遺伝子の発現量・タンパク質の翻訳量を解析する技術を用いることで、我々が未だ知り得ない MazF の生理学的役割が明らかとなることが期待される。

加えて、MazF の研究を行なっていく上で「個々の細胞の個性」や「集団としての細胞の様相」も重要である。第二章で述べた大腸菌の休止化研究では、シングルセル観察を行っており、RNA 切断型の Toxin の発現量が一定の閾値を超えた細胞が休止化を成し遂げることが報告されている[57]。現状、MazF に着目したシングルセル解析の研究は行われていないが、本酵素に関してもその発現量に一定の揺らぎがあり、MazF が偶然に高発現している細胞が環境ストレス下で生き残るといった現象が観測されても不思議ではない。また大腸菌の MazF の活性がクオーラムセンシングによって制御されるという報告もなされおり[105]、本報告では細胞外致死因子 (Extracellular Death Factor: EDF) と呼ばれる短鎖ペプチドが MazF の RNA 切断活性を上昇させるとされる[106, 107]。当研究室ではその報告を再現することは出来なかったが、もし MazF の活性が真に細胞間相互作用によっても制御されうるものであるならば、これら報告は今後 MazF の研究を行なっていく上で重要な礎となりうる。このように MazF の生物学的意義を追求していく際、その研究は生理学・生化学・分子生物学・生態学と様々な方面に発展していくことが予測される。

さらに生物工学的観点からも MazF が将来的に様々な分野に用いられていく可能性もある。第二章で述べた通り、MazF を用いた生物工学的応用はいくつかの報告例が存在する。

既にタンパクの発現・精製技術として実用化がなされており[74]、今後はヒト C 型肝炎ウイルスやヒト免疫不全ウイルスといった病原性ウイルスに対する遺伝子治療に MazF が用いられる可能性もある[77, 78, 108-110]。事実、エイズの治療手法として MazF を用いた遺伝子治療が第 I 相臨床試験を迎えている。また MazF を利用した癌細胞の治療なども提唱されており[111]、医学分野において本酵素が治療手段の一つとして利用される潜在的可能性を秘めている。物質生産分野において、大腸菌では MazF を用いることで代謝の流れを一定程度制御可能であることも示されており[112]、MazF が化学工学の分野にも応用される可能性がある。

上述した生物工学的応用事例は大腸菌の MazF を用いたものが大半である。16S rRNA 遺伝子の相同性と MazF の相同性には一定の相関性はあるものの、これら MazF の切断配列は多種に渡る[15-17] (表 1.1)。今後、制限酵素のように種々の MazF が単離され、その情報が蓄積されたならば、本酵素の応用幅が広がることは疑うべくもない。第二世代に続き、第三・第四世代のシーケンサーが登場している昨今、得られる配列の精度や量が飛躍的に上昇している。またこれに伴い、メタゲノム解析やシングルセルゲノム解析の技術も急速に発展しており、シーケンシング技術は揺籃期から成熟期・全盛期に突入しつつある。解読される微生物ゲノムが大きく数を増すことは明らかであり、今まで以上に系統的に多様かつ様々な切断配列を有する MazF が発見されると考えられる。今後、生命現象の根幹を担う RNA 分子を対象とし切断する本酵素の幅広い分野における応用が期待される。

本研究は小さな一歩に過ぎないであろうが、本研究が今後、MazF 研究に関わる全ての研究者の一助となることを願う。

謝辞

産業技術総合研究所において本研究を行う機会を与えてくださり、終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました早稲田大学理工学術院 常田聡教授に心より感謝いたします。

本博士論文の審査において副査を担当して下さい、貴重なご教示とご助言を賜りました早稲田大学理工学術院 竹山春子教授、木賀大介教授に厚くお礼申し上げます。

研究を遂行するにあたり、産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門 関口勇地博士、野田尚宏博士をはじめとして、陶山哲志博士、横田亜紀子博士、佐々木章博士、松倉智子博士には研究に対する丁寧な御指導・御助言を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

また同研究所、先進バイオ研究グループの技術補助員である(あった) 大橋明子さん、吉池里和さん、バイオアナリティカル研究グループの技術補助員である高木妙子さん、釣賀雅子さん、塚越一也さんには実験を指導していただきましたことを深く感謝いたします。

常田研究室の先輩であり、時折飲みにご誘ってくださった森下総司博士、藤谷拓嗣博士。長岡技術大学の先輩であり、人生の師匠たる松浦哲久博士、黒田恭平博士。早稲田大学の同期であり、苦楽を共にし、本音を語り合えた牛木章友博士、村野享正博士。頼れる後輩でもあり、戦友でもある河合祐人さん、竹井拓さん、大田悠里さん、一色理乃さん。良い意味で型破りな後輩、葵理恵さん。皆様には公私ともに支えていただきました。

また常田研究室の皆様，ラトガース大学留学先研究室の皆様，生物プロセス研究部門生物資源情報研究グループの皆様，この博士課程の四年間挫折することなく研究を続けることができたのは，ひとえに皆様のおかげです。

最後に，経済的に私を支援してくださった両親に感謝の意を示し，本論文の結びと致します。

宮本龍樹

参考文献

1. Sharma UK, Chatterji D. Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and starvation by modulation of sigma activity. FEMS Microbiol Rev. 2010;34(5):646-57. Epub 2010/05/25. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00223.x. PubMed PMID: 20491934.
2. Balleza E, Lopez-Bojorquez LN, Martinez-Antonio A, Resendis-Antonio O, Lozada-Chavez I, Balderas-Martinez YI, et al. Regulation by transcription factors in bacteria: beyond description. FEMS Microbiol Rev. 2009;33(1):133-51. Epub 2008/12/17. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00145.x. PubMed PMID: 19076632; PubMed Central PMCID: PMCPMC2704942.
3. Maier T, Guell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. FEBS Lett. 2009;583(24):3966-73. Epub 2009/10/24. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.036. PubMed PMID: 19850042.
4. Starosta AL, Lassak J, Jung K, Wilson DN. The bacterial translation stress response. FEMS Microbiol Rev. 2014;38(6):1172-201. doi: 10.1111/1574-6976.12083. PubMed PMID: 25135187; PubMed Central PMCID: PMCPMC4227928.
5. Schuster CF, Bertram R. Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. FEMS Microbiol Lett. 2013;340(2):73-85. doi: 10.1111/1574-6968.12074. PubMed PMID: 23289536.
6. Page R, Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. Nat Chem Biol. 2016;12(4):208-14. doi: 10.1038/nchembio.2044. PubMed PMID: 26991085.
7. Hall AM, Gollan B, Helaine S. Toxin-antitoxin systems: reversible toxicity. Curr Opin Microbiol. 2017;36:102-10. doi: 10.1016/j.mib.2017.02.003. PubMed PMID: 28279904.

8. Ramisetty BC, Natarajan B, Santhosh RS. *mazEF*-mediated programmed cell death in bacteria: "what is this?". *Crit Rev Microbiol*. 2015;41(1):89-100. doi: 10.3109/1040841X.2013.804030. PubMed PMID: 23799870.
9. Aizenman E, Engelberg-Kulka H, Glaser G. An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(12):6059-63. doi: 10.1073/pnas.93.12.6059. PubMed Central PMCID: PMCPMC39188.
10. Hazan R, Sat B, Engelberg-Kulka H. *Escherichia coli mazEF*-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. *J Bacteriol*. 2004;186(11):3663-9. Epub 2004/05/20. doi: 10.1128/JB.186.11.3663-3669.2004. PubMed PMID: 15150257; PubMed Central PMCID: PMCPMC415763.
11. Sat B, Reches M, Engelberg-Kulka H. The *Escherichia coli mazEF* Suicide Module Mediates Thymineless Death. *J Bacteriol*. 2003;185(6):1803-7. doi: 10.1128/jb.185.6.1803-1807.2003.
12. Zhang YL, Zhang JJ, Hoeflich KP, Ikura M, Qing GL, Inouye M. MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Cell*. 2003;12(4):913-23. doi: Doi 10.1016/S1097-2765(03)00402-7. PubMed PMID: WOS:000186196100015.
13. Sauert M, Wolfinger MT, Vesper O, Muller C, Byrgazov K, Moll I. The MazF-regulon: a toolbox for the post-transcriptional stress response in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(14):6660-75. doi: 10.1093/nar/gkw115. PubMed PMID: 26908653; PubMed Central PMCID: PMCPMC5001579.
14. Amitai S, Kolodkin-Gal I, Hananya-Meltabashi M, Sacher A, Engelberg-Kulka H. *Escherichia coli* MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both "death proteins" and "survival proteins". *PLoS Genet*. 2009;5(3):e1000390. doi: 10.1371/journal.pgen.1000390. PubMed PMID: 19282968; PubMed Central PMCID: PMCPMC2646832.

15. Chopra N, Saumitra, Pathak A, Bhatnagar R, Bhatnagar S. Linkage, mobility, and selfishness in the MazF family of bacterial toxins: a snapshot of bacterial evolution. *Genome Biol Evol.* 2013;5(12):2268-84. doi: 10.1093/gbe/evt175. PubMed PMID: 24265503; PubMed Central PMCID: PMC3879964.
16. Schifano JM, Woychik NA. Cloaked dagger: tRNA slicing by an unlikely culprit. *RNA Biol.* 2017;14(1):15-9. doi: 10.1080/15476286.2016.1255396. PubMed PMID: 27841735; PubMed Central PMCID: PMC5270527.
17. Masuda H, Inouye M. Toxins of Prokaryotic Toxin-Antitoxin Systems with Sequence-Specific Endoribonuclease Activity. *Toxins.* 2017;9(4):140. doi: 10.3390/toxins9040140.
18. Pandey DP, Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(3):966-76. doi: 10.1093/nar/gki201. PubMed PMID: 15718296; PubMed Central PMCID: PMC549392.
19. Arp DJ, Sayavedra-Soto LA, Hommes NG. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch Microbiol.* 2002;178(4):250-5. doi: 10.1007/s00203-002-0452-0. PubMed PMID: 12209257.
20. Miyamoto T, Kato Y, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N. Characterization of MazF-Mediated Sequence-Specific RNA Cleavage in *Pseudomonas putida* Using Massive Parallel Sequencing. *PLoS One.* 2016;11(2):e0149494. doi: 10.1371/journal.pone.0149494. PubMed PMID: 26885644; PubMed Central PMCID: PMC4757574.
21. Zhu L, Inoue K, Yoshizumi S, Kobayashi H, Zhang Y, Ouyang M, et al. *Staphylococcus aureus* MazF specifically cleaves a pentad sequence, UACAU, which is unusually abundant in the mRNA for pathogenic adhesive factor SraP. *J Bacteriol.* 2009;191(10):3248-55. doi: 10.1128/JB.01815-08. PubMed PMID: 19251861; PubMed Central PMCID: PMC2687152.

22. Park JH, Yamaguchi Y, Inouye M. *Bacillus subtilis* MazF-bs (EndoA) is a UACAU-specific mRNA interferase. *FEBS Lett.* 2011;585(15):2526-32. doi: 10.1016/j.febslet.2011.07.008. PubMed PMID: 21763692; PubMed Central PMCID: PMC3167231.
23. Miyamoto T, Yokota A, Tsuneda S, Noda N. AAU-Specific RNA Cleavage Mediated by MazF Toxin Endoribonuclease Conserved in *Nitrosomonas europaea*. *Toxins (Basel)*. 2016;8(6). doi: 10.3390/toxins8060174. PubMed PMID: 27271670; PubMed Central PMCID: PMC4926141.
24. Zhu L, Zhang Y, Teh JS, Zhang J, Connell N, Rubin H, et al. Characterization of mRNA interferases from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 2006;281(27):18638-43. doi: 10.1074/jbc.M512693200. PubMed PMID: 16611633.
25. Schifano JM, Vvedenskaya IO, Knoblauch JG, Ouyang M, Nickels BE, Woychik NA. An RNA-seq method for defining endoribonuclease cleavage specificity identifies dual rRNA substrates for toxin MazF-mt3. *Nat Commun.* 2014;5:3538. doi: 10.1038/ncomms4538. PubMed PMID: 24709835; PubMed Central PMCID: PMC4090939.
26. Schifano JM, Edifor R, Sharp JD, Ouyang M, Konkimalla A, Husson RN, et al. *Mycobacterial* toxin MazF-mt6 inhibits translation through cleavage of 23S rRNA at the ribosomal A site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(21):8501-6. Epub 2013/05/08. doi: 10.1073/pnas.1222031110. PubMed PMID: 23650345; PubMed Central PMCID: PMC3666664.
27. Zhu L, Phadtare S, Nariya H, Ouyang M, Husson RN, Inouye M. The mRNA interferases, MazF-mt3 and MazF-mt7 from *Mycobacterium tuberculosis* target unique pentad sequences in single-stranded RNA. *Mol Microbiol.* 2008;69(3):559-69. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06284.x. PubMed PMID: 18485066.
28. Schifano JM, Cruz JW, Vvedenskaya IO, Edifor R, Ouyang M, Husson RN, et al. tRNA is a new target for cleavage by a MazF toxin. *Nucleic Acids Res.*

- 2016;44(3):1256-70. doi: 10.1093/nar/gkv1370. PubMed PMID: 26740583; PubMed Central PMCID: PMC4756823.
29. Yamaguchi Y, Nariya H, Park JH, Inouye M. Inhibition of specific gene expressions by protein-mediated mRNA interference. *Nat Commun.* 2012;3:607. doi: 10.1038/ncomms1621. PubMed PMID: 22215082.
 30. Rothenbacher FP, Suzuki M, Hurley JM, Montville TJ, Kirn TJ, Ouyang M, et al. *Clostridium difficile* MazF toxin exhibits selective, not global, mRNA cleavage. *J Bacteriol.* 2012;194(13):3464-74. doi: 10.1128/JB.00217-12. PubMed PMID: 22544268; PubMed Central PMCID: PMC3434716.
 31. Schuster CF, Park JH, Prax M, Herbig A, Nieselt K, Rosenstein R, et al. Characterization of a *mazEF* toxin-antitoxin homologue from *Staphylococcus equorum*. *J Bacteriol.* 2013;195(1):115-25. doi: 10.1128/JB.00400-12. PubMed PMID: 23104807; PubMed Central PMCID: PMC3536171.
 32. Miyamoto T, Ota Y, Yokota A, Suyama T, Tsuneda S, Noda N. Characterization of a *Deinococcus radiodurans* MazF: A UACA-specific RNA endoribonuclease. *Microbiologyopen.* 2017. Epub 2017/07/05. doi: 10.1002/mbo3.501. PubMed PMID: 28675659.
 33. Li T, Weng Y, Ma X, Tian B, Dai S, Jin Y, et al. *Deinococcus radiodurans* Toxin-Antitoxin MazEF-dr Mediates Cell Death in Response to DNA Damage Stress. *Front Microbiol.* 2017;8:1427. Epub 2017/08/12. doi: 10.3389/fmicb.2017.01427. PubMed PMID: 28798741; PubMed Central PMCID: PMC5526972.
 34. Van Melderen L, Saavedra De Bast M. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet.* 2009;5(3):e1000437. Epub 2009/03/28. doi: 10.1371/journal.pgen.1000437. PubMed PMID: 19325885; PubMed Central PMCID: PMC2654758.
 35. Brantl S. Bacterial type I toxin-antitoxin systems. *RNA Biol.* 2012;9(12):1488-90. doi: 10.4161/rna.23045. PubMed PMID: 23324552.

36. Shao Y, Harrison EM, Bi D, Tai C, He X, Ou HY, et al. TADB: a web-based resource for Type 2 toxin-antitoxin loci in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Database issue):D606-11. doi: 10.1093/nar/gkq908. PubMed PMID: 20929871; PubMed Central PMCID: PMC3013778.
37. Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biol Direct.* 2009;4:19. doi: 10.1186/1745-6150-4-19. PubMed PMID: 19493340; PubMed Central PMCID: PMC3013778.
38. Cook GM, Robson JR, Frampton RA, McKenzie J, Przybilski R, Fineran PC, et al. Ribonucleases in bacterial toxin-antitoxin systems. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1829(6-7):523-31. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.02.007. PubMed PMID: 23454553.
39. Fineran PC, Blower TR, Foulds IJ, Humphreys DP, Lilley KS, Salmond GPC. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(3):894-9. doi: 10.1073/pnas.0808832106. PubMed PMID: WOS:000262809700041.
40. Blower TR, Fineran PC, Johnson MJ, Toth IK, Humphreys DP, Salmond GP. Mutagenesis and functional characterization of the RNA and protein components of the *toxIN* abortive infection and toxin-antitoxin locus of *Erwinia*. *J Bacteriol.* 2009;191(19):6029-39. doi: 10.1128/JB.00720-09. PubMed PMID: 19633081; PubMed Central PMCID: PMC3013778.
41. Belanger M, Moineau S. Mutational Analysis of the Antitoxin in the *Lactococcal* Type III Toxin-Antitoxin System *AbiQ*. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(11):3848-55. Epub 2015/03/31. doi: 10.1128/AEM.00572-15. PubMed PMID: 25819963; PubMed Central PMCID: PMC3013778.
42. Blower TR, Short FL, Rao F, Mizuguchi K, Pei XY, Fineran PC, et al. Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in

- chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(13):6158-73. doi: 10.1093/nar/gks231. PubMed PMID: 22434880; PubMed Central PMCID: PMC3401426.
43. Blower TR, Pei XY, Short FL, Fineran PC, Humphreys DP, Luisi BF, et al. A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18(2):185-90. doi: 10.1038/nsmb.1981. PubMed PMID: 21240270; PubMed Central PMCID: PMC34612426.
44. Goeders N, Chai R, Chen B, Day A, Salmond GP. Structure, Evolution, and Functions of Bacterial Type III Toxin-Antitoxin Systems. *Toxins (Basel).* 2016;8(10). Epub 2016/10/01. doi: 10.3390/toxins8100282. PubMed PMID: 27690100; PubMed Central PMCID: PMC5086642.
45. Tan Q, Awano N, Inouye M. YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Mol Microbiol.* 2011;79(1):109-18. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07433.x. PubMed PMID: 21166897; PubMed Central PMCID: PMC3021753.
46. Masuda H, Tan Q, Awano N, Wu KP, Inouye M. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2012;84(5):979-89. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08068.x. PubMed PMID: 22515815.
47. Wang X, Lord DM, Cheng HY, Osbourne DO, Hong SH, Sanchez-Torres V, et al. A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nat Chem Biol.* 2012;8(10):855-61. doi: 10.1038/nchembio.1062. PubMed PMID: 22941047; PubMed Central PMCID: PMC3514572.
48. Wang X, Lord DM, Hong SH, Peti W, Benedik MJ, Page R, et al. Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS. *Environ Microbiol.* 2013;15(6):1734-44. doi: 10.1111/1462-2920.12063. PubMed PMID: 23289863; PubMed Central PMCID: PMC3620836.

49. Cheng HY, Soo VW, Islam S, McAnulty MJ, Benedik MJ, Wood TK. Toxin GhoT of the GhoT/GhoS toxin/antitoxin system damages the cell membrane to reduce adenosine triphosphate and to reduce growth under stress. *Environ Microbiol.* 2014;16(6):1741-54. doi: 10.1111/1462-2920.12373. PubMed PMID: 24373067.
50. Aakre CD, Phung TN, Huang D, Laub MT. A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the beta sliding clamp. *Mol Cell.* 2013;52(5):617-28. doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.014. PubMed PMID: 24239291; PubMed Central PMCID: PMC3918436.
51. Van Melderen L. Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? *Curr Opin Microbiol.* 2010;13(6):781-5. doi: 10.1016/j.mib.2010.10.006. PubMed PMID: 21041110.
52. Koga M, Otsuka Y, Lemire S, Yonesaki T. *Escherichia coli rmlA* and *rnlB* compose a novel toxin-antitoxin system. *Genetics.* 2011;187(1):123-30. doi: 10.1534/genetics.110.121798. PubMed PMID: 20980243; PubMed Central PMCID: PMC3018318.
53. Otsuka Y, Yonesaki T. Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnlA toxins. *Mol Microbiol.* 2012;83(4):669-81. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.07975.x.
54. Short FL, Blower TR, Salmond GP. A promiscuous antitoxin of bacteriophage T4 ensures successful viral replication. *Mol Microbiol.* 2012;83(4):665-8. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.07974.x. PubMed PMID: 22283468.
55. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol.* 2017. doi: 10.1038/nrmicro.2017.42. PubMed PMID: 28529326.
56. Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jorgensen MG, Gerdes K. Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(32):13206-11. Epub 2011/07/27. doi: 10.1073/pnas.1100186108. PubMed PMID: 21788497; PubMed Central PMCID: PMC3156201.

57. Maisonneuve E, Castro-Camargo M, Gerdes K. (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell*. 2013;154(5):1140-50. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.048. PubMed PMID: 23993101.
58. Germain E, Roghanian M, Gerdes K, Maisonneuve E. Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(16):5171-6. doi: 10.1073/pnas.1423536112. PubMed PMID: 25848049; PubMed Central PMCID: PMC4413331.
59. Tiwari P, Arora G, Singh M, Kidwai S, Narayan OP, Singh R. MazF ribonucleases promote *Mycobacterium tuberculosis* drug tolerance and virulence in guinea pigs. *Nat Commun*. 2015;6:6059. doi: 10.1038/ncomms7059. PubMed PMID: 25608501.
60. Helaine S, Cheverton AM, Watson KG, Faure LM, Matthews SA, Holden DW. Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science*. 2014;343(6167):204-8. doi: 10.1126/science.1244705. PubMed PMID: 24408438.
61. Laalami S, Zig L, Putzer H. Initiation of mRNA decay in bacteria. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(10):1799-828. doi: 10.1007/s00018-013-1472-4. PubMed PMID: 24064983; PubMed Central PMCID: PMC3997798.
62. Yamaguchi Y, Park JH, Inouye M. MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2009;284(42):28746-53. doi: 10.1074/jbc.M109.032904. PubMed PMID: 19690171; PubMed Central PMCID: PMC2781420.
63. Jorgensen MG, Pandey DP, Jaskolska M, Gerdes K. HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. *J Bacteriol*. 2009;191(4):1191-9. doi: 10.1128/JB.01013-08. PubMed PMID: 19060138; PubMed Central PMCID: PMC2631989.

64. Christensen SK, Pedersen K, Hansen FG, Gerdes K. Toxin–antitoxin Loci as Stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK Cleave Translated RNAs and are Counteracted by tmRNA. *J Mol Biol.* 2003;332(4):809-19. doi: 10.1016/s0022-2836(03)00922-7.
65. Zhang Y, Inouye M. The inhibitory mechanism of protein synthesis by YoeB, an *Escherichia coli* toxin. *J Biol Chem.* 2009;284(11):6627-38. doi: 10.1074/jbc.M808779200. PubMed PMID: 19124462; PubMed Central PMCID: PMC2652283.
66. Prysak MH, Mozdierz CJ, Cook AM, Zhu L, Zhang Y, Inouye M, et al. Bacterial toxin YafQ is an endoribonuclease that associates with the ribosome and blocks translation elongation through sequence-specific and frame-dependent mRNA cleavage. *Mol Microbiol.* 2009;71(5):1071-87. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06572.x. PubMed PMID: 19210620.
67. Christensen SK, Gerdes K. RelE toxins from Bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. *Mol Microbiol.* 2003;48(5):1389-400. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03512.x.
68. Christensen-Dalsgaard M, Jorgensen MG, Gerdes K. Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. *Mol Microbiol.* 2010;75(2):333-48. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06969.x. PubMed PMID: 19943910; PubMed Central PMCID: PMC2814082.
69. Kamada K, Hanaoka F, Burley SK. Crystal Structure of the MazE/MazF Complex. *Mol Cell.* 2003;11(4):875-84. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00097-2.
70. Vesper O, Amitai S, Belitsky M, Byrgazov K, Kaberdina AC, Engelberg-Kulka H, et al. Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in *Escherichia coli*. *Cell.* 2011;147(1):147-57. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.047. PubMed PMID: 21944167; PubMed Central PMCID: PMC2814082.

71. McKenzie JL, Duyvestyn JM, Smith T, Bendak K, Mackay J, Cursons R, et al. Determination of ribonuclease sequence-specificity using Pentaprobates and mass spectrometry. *RNA*. 2012;18(6):1267-78. doi: 10.1261/rna.031229.111. PubMed PMID: 22539524; PubMed Central PMCID: PMC3358648.
72. Kirpekar F, Nordhoff E, Kristiansen K, Roepstorff P, Lezius A, Hahner S, et al. Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of enzymatically synthesized RNA up to 150 kDa. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(19):3866-70. doi: 10.1093/nar/22.19.3866.
73. Suzuki M, Mao L, Inouye M. Single protein production (SPP) system in *Escherichia coli*. *Nat Protoc*. 2007;2(7):1802-10. Epub 2007/07/21. doi: 10.1038/nprot.2007.252. PubMed PMID: 17641648.
74. Suzuki M, Zhang J, Liu M, Woychik NA, Inouye M. Single protein production in living cells facilitated by an mRNA interferase. *Mol Cell*. 2005;18(2):253-61. doi: 10.1016/j.molcel.2005.03.011. PubMed PMID: 15837428.
75. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 2013;152(5):1173-83. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022. PubMed PMID: 23452860; PubMed Central PMCID: PMC3664290.
76. Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(12):1200-12. doi: 10.1016/j.addr.2007.04.014. PubMed PMID: 17825945.
77. Shapira A, Shapira S, Gal-Tanamy M, Zemel R, Tur-Kaspa R, Benhar I. Removal of hepatitis C virus-infected cells by a zymogenized bacterial toxin. *PLoS One*. 2012;7(2):e32320. doi: 10.1371/journal.pone.0032320. PubMed PMID: 22359682; PubMed Central PMCID: PMC3281143.
78. Park JH, Yamaguchi Y, Inouye M. Intramolecular regulation of the sequence-specific mRNA interferase activity of MazF fused to a MazE fragment with a linker cleavable

- by specific proteases. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(11):3794-9. doi: 10.1128/AEM.00364-12. PubMed PMID: 22447587; PubMed Central PMCID: PMCPMC3346410.
79. Akiyama H, Ueda Y, Nobumasa H, Ooshima H, Ishizawa Y, Kitahiro K, et al. A set of external reference controls/probes that enable quality assurance between different microarray platforms. *Anal Biochem.* 2015;472:75-83. Epub 2014/12/08. doi: 10.1016/j.ab.2014.11.012. PubMed PMID: 25481737.
80. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 2004;14(6):1188-90. Epub 2004/06/03. doi: 10.1101/gr.849004. PubMed PMID: 15173120; PubMed Central PMCID: PMCPMC419797.
81. Buermans HP, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(10):1932-41. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.06.015. PubMed PMID: 24995601.
82. Zhang Y, Zhang J, Hara H, Kato I, Inouye M. Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase. *J Biol Chem.* 2005;280(5):3143-50. doi: 10.1074/jbc.M411811200. PubMed PMID: 15537630.
83. Poblete-Castro I, Becker J, Dohnt K, dos Santos VM, Wittmann C. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;93(6):2279-90. Epub 2012/02/22. doi: 10.1007/s00253-012-3928-0. PubMed PMID: 22350258.
84. Wang NR, Hergenrother PJ. A continuous fluorometric assay for the assessment of MazF ribonuclease activity. *Anal Biochem.* 2007;371(2):173-83. doi: 10.1016/j.ab.2007.07.017. PubMed PMID: 17706586; PubMed Central PMCID: PMCPMC2443740.
85. Tamman H, Ainelo A, Ainsaar K, Horak R. A moderate toxin, GraT, modulates growth rate and stress tolerance of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol.* 2014;196(1):157-69.

- Epub 2013/10/29. doi: 10.1128/JB.00851-13. PubMed PMID: 24163334; PubMed Central PMCID: PMC3911119.
86. Lee C, Harris RA, Wall JK, Mayfield RD, Wilke CO. RNaseIII and T4 polynucleotide Kinase sequence biases and solutions during RNA-seq library construction. *Biol Direct*. 2013;8:16. Epub 2013/07/06. doi: 10.1186/1745-6150-8-16. PubMed PMID: 23826734; PubMed Central PMCID: PMC3710281.
 87. Zhuang F, Fuchs RT, Sun Z, Zheng Y, Robb GB. Structural bias in T4 RNA ligase-mediated 3'-adapter ligation. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(7):e54. Epub 2012/01/14. doi: 10.1093/nar/gkr1263. PubMed PMID: 22241775; PubMed Central PMCID: PMC3326334.
 88. Arp DJ, Stein LY. Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2003;38(6):471-95. doi: 10.1080/10409230390267446. PubMed PMID: 14695127.
 89. Bothe H, Jost G, Schloter M, Ward BB, Witzel K-P. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol Rev*. 2000;24(5):673-90. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00566.x.
 90. Groeneweg J, Sellner B, Tappe W. Ammonia oxidation in *Nitrosomonas* at NH₃ concentrations near km: Effects of pH and temperature. *Water Res*. 1994;28(12):2561-6. doi: 10.1016/0043-1354(94)90074-4.
 91. Stein LY, Arp DJ. Loss of ammonia monooxygenase activity in *Nitrosomonas europaea* upon exposure to nitrite. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(10):4098-102. PubMed PMID: WOS:000076295100088.
 92. Gvakharia BO, Permina EA, Gelfand MS, Bottomley PJ, Sayavedra-Soto LA, Arp DJ. Global transcriptional response of *Nitrosomonas europaea* to chloroform and chloromethane. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(10):3440-5. doi: 10.1128/AEM.02831-06. PubMed PMID: 17369330; PubMed Central PMCID: PMC391907119.

93. Park S, Ely RL. Candidate stress genes of *Nitrosomonas europaea* for monitoring inhibition of nitrification by heavy metals. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(17):5475-82. doi: 10.1128/AEM.00500-08. PubMed PMID: 18606795; PubMed Central PMCID: PMCPMC2546632.
94. Park S, Ely RL. Genome-wide transcriptional responses of *Nitrosomonas europaea* to zinc. *Arch Microbiol.* 2008;189(6):541-8. doi: 10.1007/s00203-007-0341-7. PubMed PMID: 18097650.
95. Hirota R, Kato J, Morita H, Kuroda A, Ikeda T, Takiguchi N, et al. Isolation and characterization of *cbbL* and *cbbS* genes encoding form I ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large and small subunits in *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002;66(3):632-5. Epub 2002/05/15. doi: 10.1271/bbb.66.632. PubMed PMID: 12005060.
96. Badger MR, Bek EJ. Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO₂ acquisition by the CBB cycle. *J Exp Bot.* 2008;59(7):1525-41. Epub 2008/02/05. doi: 10.1093/jxb/erm297. PubMed PMID: 18245799.
97. Chain P, Lamerdin J, Larimer F, Regala W, Lao V, Land M, et al. Complete Genome Sequence of the Ammonia-Oxidizing Bacterium and Obligate Chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol.* 2003;185(9):2759-73. doi: 10.1128/jb.185.9.2759-2773.2003.
98. Wei X, Sayavedra-Soto LA, Arp DJ. The transcription of the *cbb* operon in *Nitrosomonas europaea*. *Microbiology.* 2004;150(Pt 6):1869-79. Epub 2004/06/09. doi: 10.1099/mic.0.26785-0. PubMed PMID: 15184573.
99. Ayrapetyan M, Williams TC, Baxter R, Oliver JD. Viable but Nonculturable and Persister Cells Coexist Stochastically and Are Induced by Human Serum. *Infect Immun.* 2015;83(11):4194-203. Epub 2015/08/19. doi: 10.1128/IAI.00404-15. PubMed PMID: 26283335; PubMed Central PMCID: PMCPMC4598401.

100. Mathema VB, Thakuri BC, Sillanpaa M. Bacterial *mer* operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. *Arch Microbiol.* 2011;193(12):837-44. doi: 10.1007/s00203-011-0751-4. PubMed PMID: 21912976.
101. Hsu-Kim H, Kucharzyk KH, Zhang T, Deshusses MA. Mechanisms regulating mercury bioavailability for methylating microorganisms in the aquatic environment: a critical review. *Environ Sci Technol.* 2013;47(6):2441-56. doi: 10.1021/es304370g. PubMed PMID: 23384298.
102. Barkay T, Miller SM, Summers AO. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27(2-3):355-84. doi: 10.1016/s0168-6445(03)00046-9.
103. Sevin EW, Barloy-Hubler F. RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. *Genome Biol.* 2007;8(8):R155. doi: 10.1186/gb-2007-8-8-r155. PubMed PMID: 17678530; PubMed Central PMCID: PMCPMC2374986.
104. Gerdes K, Christensen SK, Lobner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(5):371-82. doi: 10.1038/nrmicro1147. PubMed PMID: 15864262.
105. Kolodkin-Gal I, Hazan R, Gaathon A, Carmeli S, Engelberg-Kulka H. A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for *mazEF*-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science.* 2007;318(5850):652-5. doi: 10.1126/science.1147248. PubMed PMID: 17962566.
106. Belitsky M, Avshalom H, Erental A, Yelin I, Kumar S, London N, et al. The *Escherichia coli* extracellular death factor EDF induces the endoribonucleolytic activities of the toxins MazF and ChpBK. *Mol Cell.* 2011;41(6):625-35. doi: 10.1016/j.molcel.2011.02.023. PubMed PMID: 21419338.

107. Kumar S, Kolodkin-Gal I, Engelberg-Kulka H. Novel quorum-sensing peptides mediating interspecies bacterial cell death. *MBio*. 2013;4(3):e00314-13. doi: 10.1128/mBio.00314-13. PubMed PMID: 23736285; PubMed Central PMCID: PMC3668371.
108. Chono H, Matsumoto K, Tsuda H, Saito N, Lee K, Kim S, et al. Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific *E. coli* mRNA interferase. *Hum Gene Ther*. 2011;22(1):35-43. doi: 10.1089/hum.2010.001. PubMed PMID: 20649483.
109. Okamoto M, Chono H, Kawano Y, Saito N, Tsuda H, Inoue K, et al. Sustained inhibition of HIV-1 replication by conditional expression of the *E. coli*-derived endoribonuclease MazF in CD4+ T cells. *Hum Gene Ther Methods*. 2013;24(2):94-103. Epub 2013/02/28. doi: 10.1089/hgtb.2012.131. PubMed PMID: 23442049.
110. Saito N, Chono H, Shibata H, Ageyama N, Yasutomi Y, Mineno J. CD4(+) T Cells Modified by the Endoribonuclease MazF Are Safe and Can Persist in SHIV-infected Rhesus Macaques. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3:e168. Epub 2014/06/11. doi: 10.1038/mtna.2014.20. PubMed PMID: 24914931; PubMed Central PMCID: PMC4078760.
111. Shapira S, Shapira A, Kazanov D, Hevroni G, Kraus S, Arber N. Selective eradication of cancer cells by delivery of adenovirus-based toxins. *Oncotarget*. 2017;8(24):38581-91. Epub 2017/04/27. doi: 10.18632/oncotarget.16934. PubMed PMID: 28445136; PubMed Central PMCID: PMC5503555.
112. Venturelli OS, Tei M, Bauer S, Chan LJG, Petzold CJ, Arkin AP. Programming mRNA decay to modulate synthetic circuit resource allocation. *Nat Commun*. 2017;8:15128. doi: 10.1038/ncomms15128. PubMed PMID: 28443619; PubMed Central PMCID: PMC5414051.

付録 (Appendix)

付録 1

第二章において超並列シーケンシングのデータ解析を行った。冗長度が増加した塩基を特定する際、Relative coverage increase という値を「n +1 番目の塩基の冗長度を n 番目の塩基の冗長度で除算した値」として定義し、本数値が大きいものを選定した。本解析方法が有効であることは第二章で示した通りであるが、冗長度が増加した塩基を特定する際「減算」の考え方を適用することも一つ有効な解析方法である。

「n +1 番目の塩基の冗長度から n 番目の塩基の冗長度を減じた値」を Δ Coverage と定義し、 Δ Coverage が大きい上位五つの塩基を同定した。次に各参照配列から同定した塩基の直前・直後に存在する配列を五配列ずつ抽出した (表 A.1, 図 A.1)。本解析手法においても、大腸菌由来の MazF を用いて RNA を切断した際には ACA 配列が 100 %の割合で検出された。一方、表 A.2, 図 A.2 に示した通り、二本鎖特異的 RNA 切断酵素である RNase III を用いて RNA の切断を行なった際には、共通する塩基は抽出されなかった。この結果から、いずれの解析方法を用いても MazF の切断 RNA 配列が推定可能であるといえる。

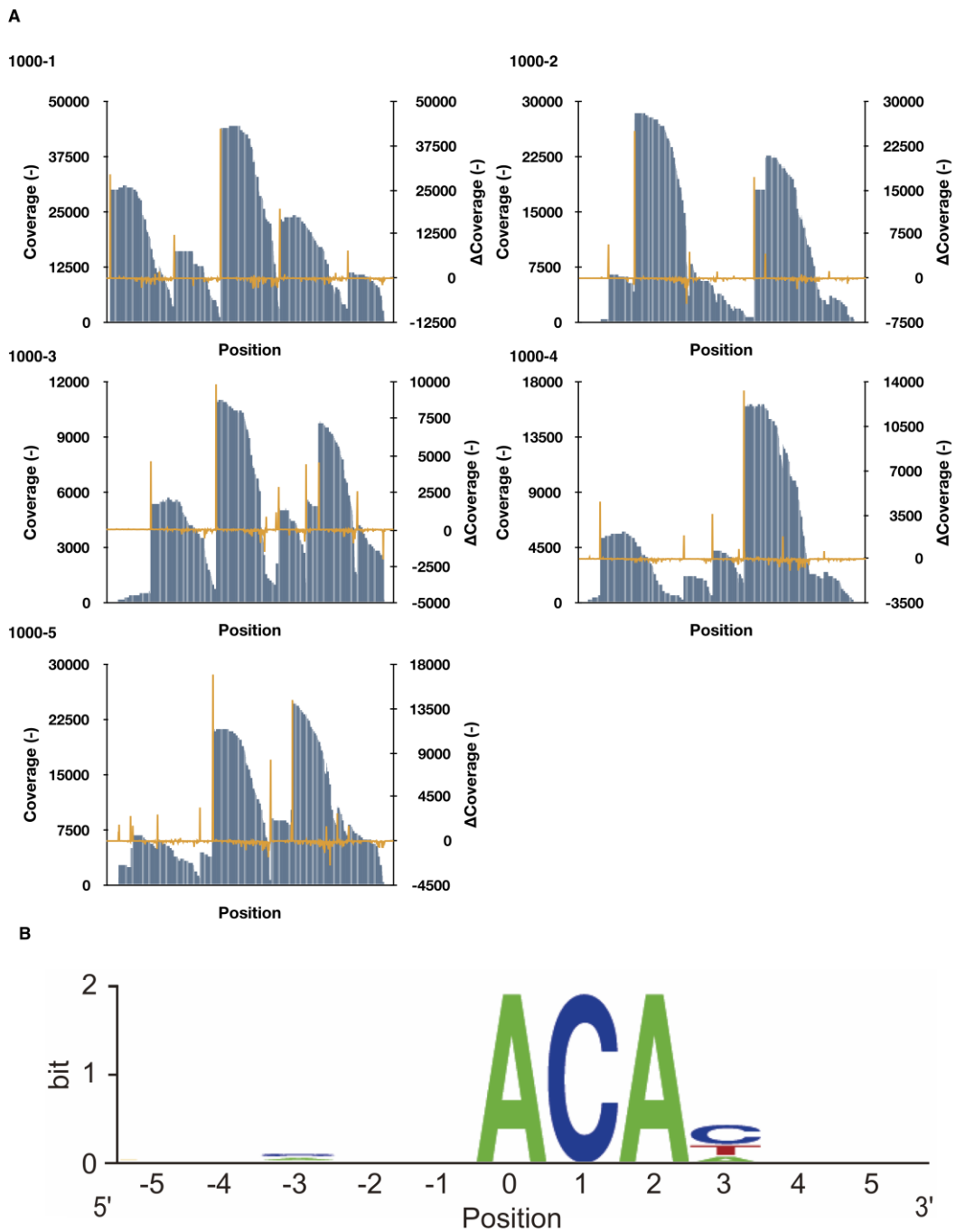


図 A.1 超並列シーケンシングによる大腸菌 MazF の認識切断配列の同定 (A) 冗長度 (青), ならびに Δ Coverage (橙), (B) 保存された塩基の抽出。 Δ Coverage が増加した塩基を 0 と設定した。解析には表 A.1 に示した計 25 配列を使用した。

表 A.1 MazF を用いて RNA 断片化時に抽出された全 25 配列

RNA	Rank	Position	Δ coverage	Coverage	Sequence (5' to 3') ^a
1000-1	1	412	42,302	42,992	GCAG <u>A</u> ACACCG
	2	16	29,389	29,499	GTCTA <u>A</u> CACCT
	3	625	19,693	22,707	CTCAC <u>A</u> CACCA
	4	246	12,277	15,874	TCAAG <u>A</u> CACCC
	5	869	7,825	11,200	CATTG <u>A</u> CATCG
1000-2	1	203	24,994	27,614	GCCCA <u>A</u> CACGT
	2	632	17,179	17,683	AAAGG <u>A</u> CACTC
	3	109	5,754	6,249	ACCATA <u>A</u> CAACC
	4	400	4,490	7,877	ACCCA <u>A</u> CATAA
	5	672	4,178	22,336	TCACA <u>A</u> CAACG
1000-3	1	396	9,855	10,600	TCAGG <u>A</u> CATAC
	2	162	4,634	5,241	GGCCG <u>A</u> CAAGT
	3	765	4,548	9,755	GTATG <u>A</u> CATAG
	4	719	4,427	5,529	AGCGT <u>A</u> CATTC
	5	621	2,889	5,036	GGTAG <u>A</u> CACCG
1000-4	1	595	13,336	15,066	GGTAC <u>A</u> CACAG
	2	79	4,537	5,112	GCGTC <u>A</u> CACCT
	3	482	3,565	4,241	TGAAT <u>A</u> CACGT
	4	380	1,870	2,131	CTCTA <u>A</u> CACTC
	5	735	1,792	12,867	TACTG <u>A</u> CACGA
1000-5	1	385	16,944	20,660	TAGATA <u>A</u> CACTC
	2	670	14,355	24,424	GGACA <u>A</u> CATTC
	3	592	8,277	8,841	CCCATA <u>A</u> CAACC
	4	338	3,402	4,421	GAATA <u>A</u> CATGC
	5	831	2,814	10,608	GTGGT <u>A</u> CAAAT

^a 下線は Δ Coverage が増加した塩基を表す。

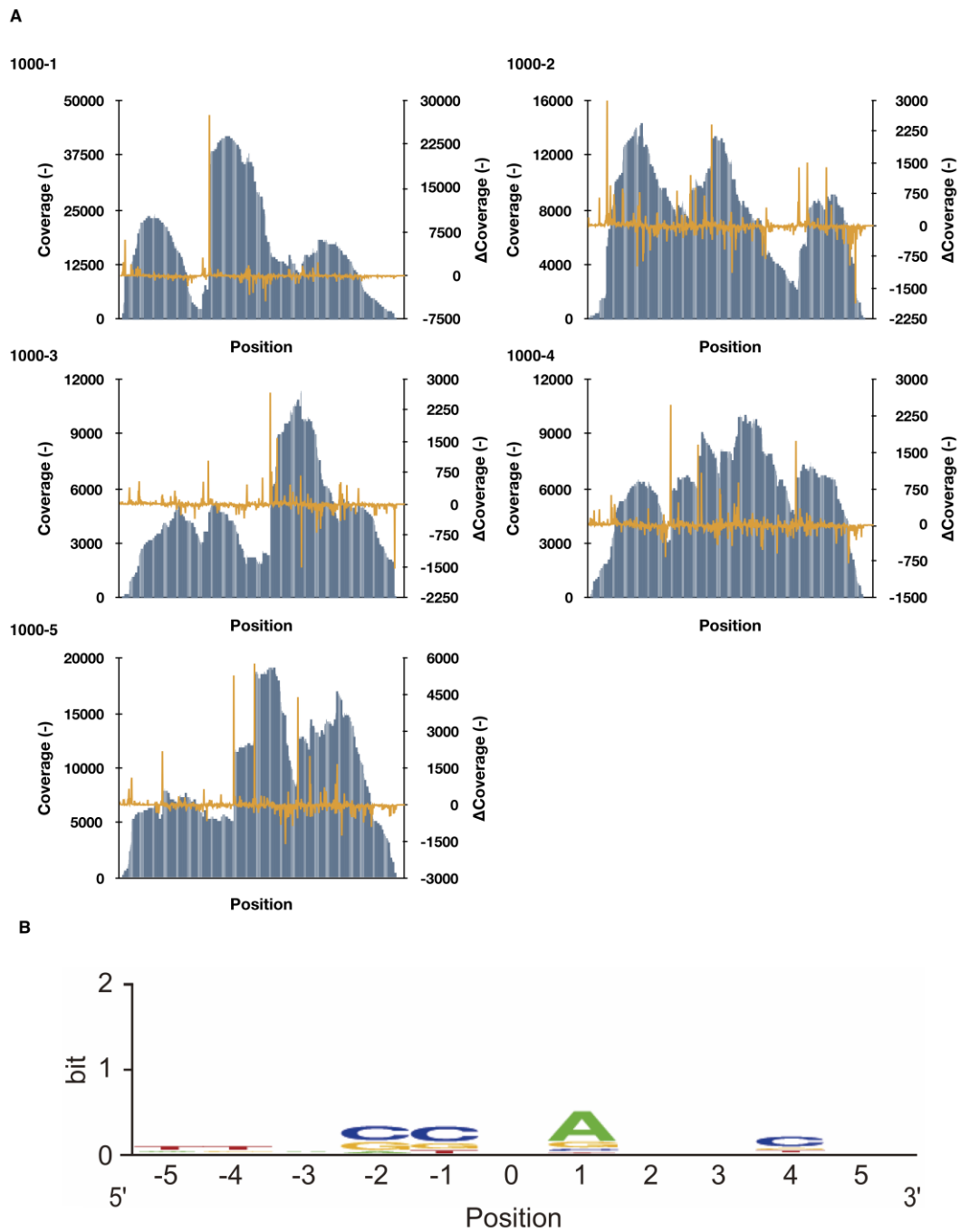


図 A.2 RNase III を用いた際の共通配列 (A) 冗長度 (青), ならびに Δ Coverage (橙), (B) 保存された塩基の抽出。 Δ Coverage が増加した塩基を 0 と設定した。解析には表 A.2 に示した計 25 配列を使用した。

表 A.2 RNase III を用いて RNA 断片化時に抽出された全 25 配列

RNA	Rank	Position	Δ coverage	Coverage	Sequence (5' to 3') ^a
1000-1	1	326	27,490	35,230	TCCCT <u>I</u> CAGAA
	2	21	6,158	9,945	ACACCT <u>A</u> TCGC
	3	302	3,107	5,853	TGAAG <u>G</u> GAACA
	4	15	2,347	3,621	GGTCT <u>A</u> ACACC
	5	718	2,316	18,109	TTACCA <u>A</u> ACCCA
1000-2	1	69	2,995	5,301	TGACCG <u>A</u> AATCC
	2	447	2,421	13,325	ATACCA <u>G</u> CCAT
	3	793	1,511	7,417	CTCGC <u>T</u> AGACG
	4	862	1,398	9,275	AGTCG <u>G</u> ATACG
	5	763	1,394	4,511	CTAGC <u>G</u> AGGCG
1000-3	1	546	2,670	4,967	TGTCCT <u>A</u> AAGCT
	2	571	1,584	8,838	TTAGG <u>A</u> TGCA
	3	322	1,041	4,677	TCGCG <u>A</u> CTATC
	4	551	783	6,154	TAAGC <u>I</u> GGCGG
	5	656	686	11,201	AATCG <u>A</u> AGGCC
1000-4	1	299	2,468	5,684	TGTT <u>C</u> GATGCG
	2	752	1,727	6,519	ATCGA <u>A</u> TACTG
	3	398	1,651	7,699	CAGGT <u>A</u> ATAGC
	4	410	1,075	8,826	TTTAC <u>C</u> AGCGC
	5	544	875	9,851	CTACCT <u>I</u> ATTTTC
1000-5	1	489	5,798	17,929	GAGAC <u>C</u> AACTA
	2	414	5,312	10,590	GTACCG <u>A</u> AAGCT
	3	646	4,421	12,564	TTCGG <u>I</u> ATACC
	4	156	2,202	7,981	TTGGT <u>C</u> ACGCT
	5	689	2,008	13,707	ATACCA <u>G</u> ATAG

^a下線は Δ Coverage が増加した塩基を表す。

付録 2

超並列シーケンシングのライブラリーを構築する際、基質 RNA の断片化が必要となる。本研究では ACA 特異的 RNA 分解酵素である MazF、および二本鎖 RNA 分解酵素である RNase III により断片化反応を行なった (第二章参照)。本研究では MiSeq 500 cycles reagent kit v2 (Illumina) (リード長: 250 bp) を用いてシーケンシングを行ったが、断片化 RNA の鎖長は本研究において重要な情報であるため、その電気泳動像を以下に示す (図 A.3)。

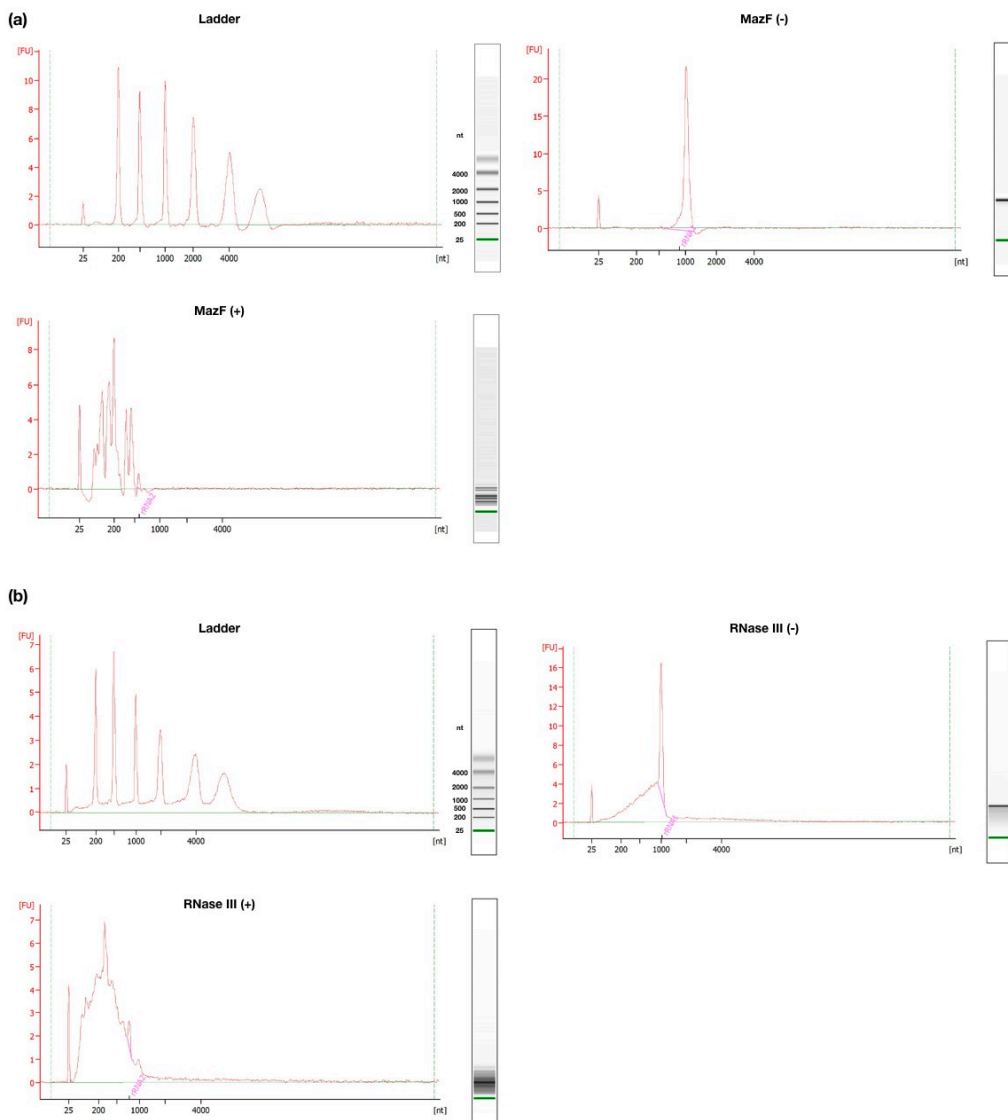


図 A.3 断片化後の RNA 長 (a) 2U の MazF による切断, (b) 2.5 U の RNase III による切断。コントロールとして酵素非添加系の電気泳動像を示す。

付録 3

第三章 3.2.3 項, 3.3.3 項において確率計算の考え方を適用し, UGG や AAU 配列含有数が多い遺伝子の抽出を行なった。各遺伝子における切断配列が含まれる確率を p , 各遺伝子の長さを L , その遺伝中に任意の三塩基が実際に含まれる数を K とすると, 任意の三塩基が K 回以上含まれる確率 P は次式で表される。

$$P = \sum_{i=K}^{L-2} p^i (1-p)^{L-2-i} \frac{(L-2)!}{i! (L-2-i)!}$$

全三塩基の組み合わせに関して P 値を計算し, それぞれの P 値をプロットした (図 A.4)。この結果, P 値は一概ではないこと, 低い P 値を示す三塩基の組み合わせを持つものが存在することが判明した。またこれら低い P 値を示す三塩基の組み合わせとコドン使用頻度の間には関連があるように見受けられ (表 A.3), コドン使用頻度が P 値に影響を及ぼす可能性が示唆された。

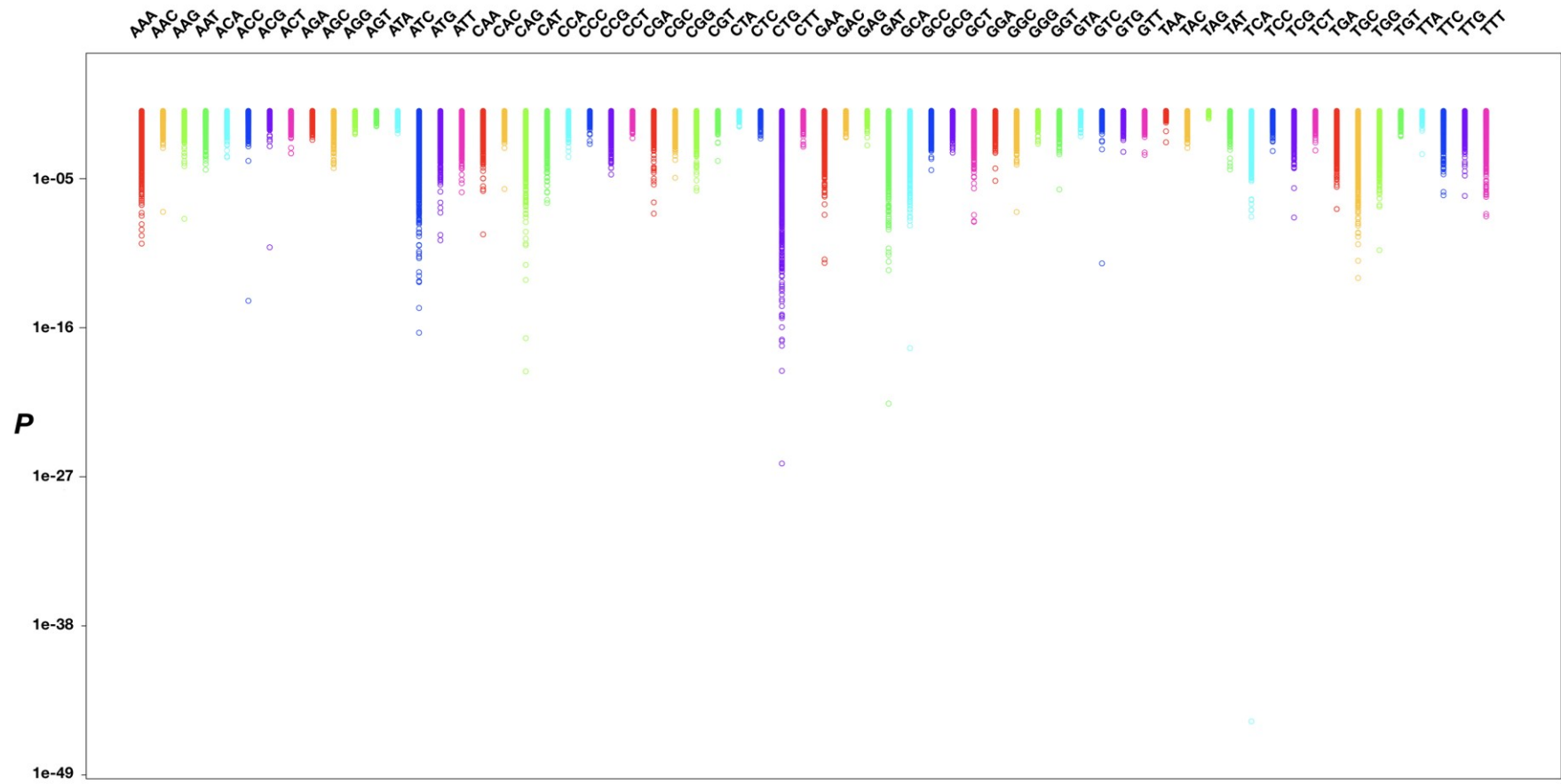


図 A.4 全 3 塩基の組み合わせにおける P 値 全遺伝子における 3 塩基含有数, 遺伝子の塩基組成, 遺伝子長を基に P 値を計算。

表 A.3 *N. europaea* のコドン使用頻度

Triplet	Frequency ^a	Triplet	Frequency ^a	Triplet	Frequency ^a	Triplet	Frequency ^a
UUU	19.7	UCU	7.0	UAU	16.8	UGU	4.8
UUC	19.4	UCC	11.5	UAC	11.5	UGC	4.9
UUA	7.5	UCA	9.3	UAA	1.0	UGA	1.6
UUG	18.0	UCG	9.1	UAG	0.4	UGG	13.3
CUU	11.1	CCU	9.5	CAU	15.8	CGU	16.7
CUC	14	CCC	10.2	CAC	9.2	CGC	18.1
CUA	2.9	CCA	7.5	CAA	13.3	CGA	5.7
CUG	52.9	CCG	18.4	CAG	29.8	CGG	12.7
AUU	22.4	ACU	10.3	AAU	21.2	AGU	10.4
AUC	33.3	ACC	20.8	AAC	14.4	AGC	12.5
AUA	8.1	ACA	11.7	AAA	25.7	AGA	6.3
AUG	23.9	ACG	11.8	AAG	15.3	AGG	4.3
GUU	14.6	GCU	18.5	GAU	38.6	GGU	22.2
GUC	18.7	GCC	28.8	GAC	14.7	GGC	22.1
GUA	13.9	GCA	27.0	GAA	40.5	GGA	15.4
GUG	19.9	GCG	18.0	GAG	19.5	GGG	11.9

^a 1000 コドンあたりの使用頻度

研究業績

論文

1. Miyamoto T, Yokota A, Tsuneda S, Noda N. AAU-Specific RNA Cleavage Mediated by MazF Toxin Endoribonuclease Conserved in *Nitrosomonas europaea*. *Toxins (Basel)*. 2016; 8(6). doi:10.3390/toxins8060174.
2. Miyamoto T, Kato Y, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N. Characterization of MazF-Mediated Sequence-Specific RNA Cleavage in *Pseudomonas putida* Using Massive Parallel Sequencing. *PLoS One*. 2016; 11(2): e0149494. doi:10.1371/journal.pone.0149494.
3. Miyamoto T, Ota Y, Yokota A, Suyama T, Tsuneda S, Noda N. Characterization of a *Deinococcus radiodurans* MazF: A UACA-specific RNA endoribonuclease. *MicrobiologyOpen*. 2017. Epub 2017/07/05. doi: 10.1002/mbo3.501.
4. Furuta A, Tsubuki M, Endoh M, Miyamoto T, Tanaka J, Salam KA, et al. Identification of Hydroxyanthraquinones as Novel Inhibitors of Hepatitis C Virus NS3 Helicase. *Int J Mol Sci*. 2015;16(8):18439-53. doi: 10.3390/ijms160818439.

講演

1. Miyamoto T, Yokota A, Ota Y, Tsuneda S, Noda N. Characterization of a chromosomal toxin-antitoxin module conserved in *Nitrosomonas europaea*, How Dead Is Dead V, Vienna, Austria, September 2017
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
3. Miyamoto T, Yokota A, Tsuneda S, Noda N. Characterization of a sequence-specific cutter conserved in the *Nitrosomonas europaea* chromosome, The 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017), València, Spain, July 2017
4. Miyamoto T, 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