

学習・研究成果報告書

研究課題名:「異種発現を用いた細菌RNAシャペロンHfqの機能解析」

環境情報学部4年 中井瑞

背景

遺伝子の発現は、転写段階だけではなく転写産物のスプライシング、安定性、RNA編集、翻訳、翻訳後修飾や集合など、様々な段階で調節されている。転写後の段階で作用する調節を総称して「転写後制御機構」という。

近年、網羅的な遺伝子とタンパク質の発現解析の研究から、RNAの転写量とタンパク質の発現量が相関しないケースが多々報告されており、転写後の翻訳制御システムの重要性が注目されている。

今回の研究の対象として、原核生物、古細菌、真核生物が共通して有しているとされている、転写後制御機構に関わる主なタンパク質群であるSmタンパク質ファミリーと、特にその内の原核生物が持つ Hfq タンパク質 (以下 Hfq) に着目した。

Hfqはグラム陰性細菌を中心に既知の細菌に広く保存されているが、C末端のアミノ酸組成やRNAとの結合部位、果てにはRNAシャペロンとしての活性そのものが生物種により大きく異なる事が示唆されてきた。それらはHfqの自律的な分子進化の産物であるとする一方で、宿主である細菌の内外の環境による影響を受けている可能性を考慮する必要がある。どのHfqが細胞内でどのようなRNAとの相互作用を起こしているのかを調べる上で、Hfqそのものの物理化学的な性質の1つである等電点の観点からHfqの配列を生物種毎に比較する事で、Hfqがどこまで多様性を持つ分子であるか、と言う事に関して一部明らかにする事を目指した。更に、その結果により得られたいくつかの興味深い生物種の機能相補性を調べるべく大腸菌で異種発現を行った結果について報告する。

そもそもHfqタンパク質の機能的相補性に関する研究は約20年前から存在しており(表4-1)、主に新規Hfqを同定した際に大腸菌由来のHfqと置換する事で分子機能を検証する、又は既知Hfqを用いて病原性細菌の制御性RNAを検出する目的で行われる。Hfqの発現や活性の評価は、増殖試験、或いはSDS-PAGEやWestern Blottingを用いたHfqタンパク質の検出が共通して行われるが、大半の先行研究では上記に加えてSgrSやDsrA等、Hfqが発現を制御する事で知られるRNAの発現動態を同時に調査する事で、仮説を支持している。しかしそれらとは異なり、我々は結合するRNAを網羅的に調べ、タンパク質の構造と機能の関係性を解明する事を目指す。

そこで、Hfqの機能相補性の検証に向け、Hfqの細胞内機能に関して議論する。

材料と手法

スペースの関係上割愛する。

結果

大腸菌のHfq欠失株で見られる表現系のうち、代表的なものが増殖阻害である。それを受けて、大腸菌のHfq欠失株に大腸菌をはじめとしたいくつかの生物種のHfqを入れる事で、大腸菌の増殖がどう変化するのか観察した(図4-7)。

Dnodのサンプルで1mMのIPTGによる発現誘導をかけた結果を記載していないのは、サンプルの吸光度を測定する前の準備の際にサンプルが飛散し、サンプルの一部は無事ではあるものの当該サンプルの測定結果により波形が大きく乱れた事に由来する。

大腸菌由来のHfqは、一定以上の発現量では増殖阻害が起きるが、それ以外は基本的にHfqを欠失した場合に比べて増殖が活発になった。更に、一部誤差範囲ではあるが基本的にどの異種Hfqも、発現量に関わらずHfqを欠失した場合に比べてHfqが存在する場合に増殖が活発になった。特に、IPTGによる発現誘導をかけていないサンプルに関して基本的にどのHfqが存在する場合でも、コントロールベクターを入れたサンプルと比較して増殖が活発になった。

又、一部誤差範囲ではあるものの各サンプルのうち最も増殖が活発になったIPTGの濃度が異なる事、一部のサンプルにおいて大腸菌由来Hfqと比べて活発さの度合いに差が見られる事が分かった。

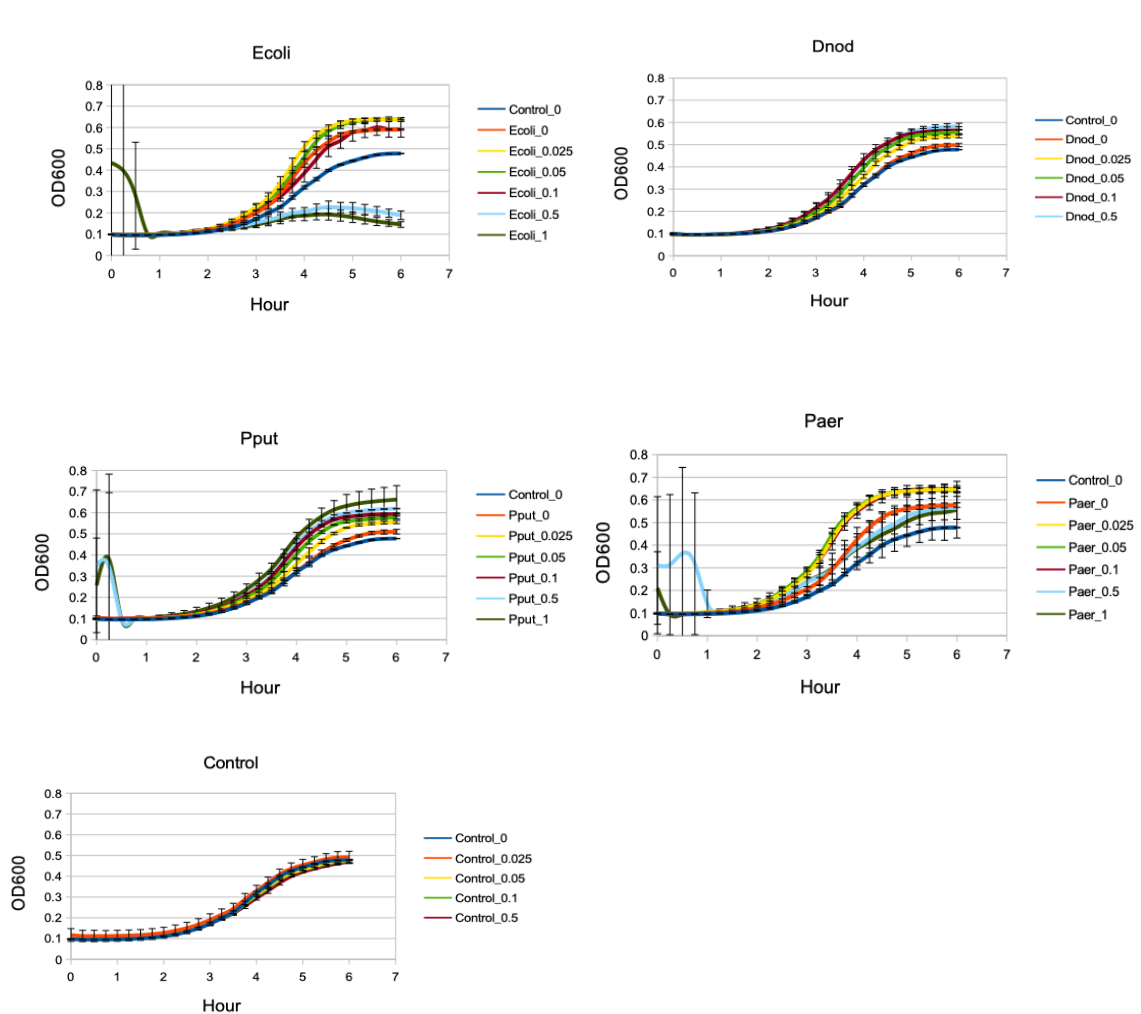


図4-7. 異種 Hfqと IPTG による増殖回復

Hfq 欠失株に上記の生物種の Hfq を凡例に記載されている数字(mM)に従い、発現を誘導させた。Dnod の 1 mM で誘導したサンプルに関しては、実験手技の誤りで波形が大きく乱れた為グラフに用いなかった。尚、全サンプル n=3 で行った。

考察

Hfq が発現量を自己制御する事に関して生理学的意義が明らかになっているのに反して詳細な分子機構が明らかになっていない。それと同時に、大腸菌の過剰発現や欠失が Hfq の生存に影響する事が知られており、3.3. で見られたように Hfq を欠失した場合に比べて Hfq が存在するが IPTG での誘導がかけられていない場合の方が大腸菌の増殖が活発になった事に関しては、何らかの形で Hfq の発現が促進された結果だと考えた。又、異種 Hfq が発現量に関わらずコントロールベクターを導入したサンプルに比べ、発現量を問わず増殖が活発になった件に関しては、本来増殖阻害の遠因となるとされていた大腸菌由来 Hfq に存在する N 末端の機能部位、或いは C 末端側の結合部位に存在する残基の毒性の影響を、Hfq が発現を制御するとされる遺伝子に関連する RNA やタンパク質が受けない為だと考える。これらの詳細に関して、結合 RNA とのシミュレーションやシーケンシング、ドメイン交換等を行う事で明らかにしていきたい。

謝辞

本研究は、教育奨励基金「学習・研究奨励金」による支援を受けて行われた。