

Corynebacterium glutamicum における
RNase III の発現制御機構解析

澤 誠人

奈良先端科学技術大学院大学
先端科学技術研究科 バイオサイエンスプログラム
ストレス微生物科学講座
(高木 博史 教授)

令和4年5月27日提出

所属 (主指導教員)	ストレス微生物学研究室 (高木 博史 教授)		
氏名	澤 誠人	提出	令和 4年 5月 27日
題名	<i>Corynebacterium glutamicum</i> における RNase III の発現制御機構解析		
<p>【目的】 遺伝子発現は mRNA への転写と転写後の二段階で制御されており、特に転写後制御では mRNA の安定性制御により急激な環境変化に対応している例が知られている。転写後制御において重要な役割を担っているのが RNA 分解酵素の Ribonuclease (RNase) である。<i>Corynebacterium glutamicum</i> (コリネ型細菌) は mRNA 分解の引き金となる主要な RNase を 3 種類保有しており、その一つが RNase III である。RNase III は二本鎖 RNA を特異的に切断し、mRNA、rRNA、non-coding RNA の分解と成熟化に参与している。近年、small RNA や RNA 結合タンパク質等の研究から細菌における遺伝子発現にも転写制御だけでなく、転写後制御が重要な役割を担っていることが明らかになってきた。そこでコリネ型細菌における、転写後制御を担う RNase III の発現制御機構と RNase III の標的遺伝子について解析を行い、得られた知見を代謝制御へ応用することを目的とした。</p> <p>【方法と結果】 様々な RNase において、その発現は自身や他の RNase により mRNA の分解段階で制御されることが知られている。そこで、細菌における RNA 分解の引き金となる主要な RNase である RNase E/G の破壊株 ($\Delta rneG$) や RNase J の破壊株 (Δrnj) を作製し、RNase III をコードする <i>rnc</i> mRNA の発現量を qRT-PCR により解析することで、RNase III の発現量に及ぼす影響を検討した。その結果、野生株と比較して <i>rnc</i> mRNA の発現量が $\Delta rneG$ 株では約 1.8 倍、Δrnj 株では約 4.3 倍それぞれ増加した。この <i>rnc</i> mRNA の発現量増加が、RNase による分解が阻害された影響なのかを調べるため、RNA 合成を阻害する抗生物質リファンピシンを使用し細胞内に残存する RNA を解析した。その結果、<i>rnc</i> mRNA の半減期が野生株は約 0.56 分であるのに対し、$\Delta rneG$ 株は約 2.08 分、Δrnj 株では 2.42 分とそれぞれ増加し、安定性の増加が確認された。次に、$\Delta rneG$ 株と Δrnj 株による RNase III のタンパク質レベルでの発現量について抗 RNase III 抗体を用いたウエスタン・ブロットにより解析を行った。その結果、野生株と比較して $\Delta rneG$ 株と Δrnj 株では RNase III タンパク質の発現量の増加が確認された。以上の結果から、RNase E/G や RNase J が RNase III の発現量を制御していることが判明した。</p> <p>大腸菌では、RNase III 自身が <i>rnc</i> mRNA の 5' 非翻訳領域を分解することで自己発現制御が行われている。そこで、コリネ型細菌でも同様の制御が行われているか RNase III の機能欠損株 (<i>rnc</i> E138A) を作製し、<i>rnc</i> mRNA の発現量を解析した。まず、RNase III のターゲット遺伝子である <i>mraZ</i> mRNA の発現量を解析したところ <i>rnc</i> E138A 株では <i>rnc</i> 欠損株と同程度に増加したことから E138A 変異により RNase III の活性が低下していることを確認した。次に、野生株と <i>rnc</i> E138A 株で <i>rnc</i> mRNA の発現量を比較したところ、両株で発現量に差は見られなかった。また、野生株と <i>rnc</i> E138A 株で <i>rnc</i> mRNA の安定性についても解析を行ったが、有意</p>			

な差は現れなかった。以上の結果から、コリネ型細菌では RNase III による *rnc* mRNA の自己発現制御は行われていないと結論付けた。

RNase E/G や RNase J による RNase III の発現制御とは逆に、RNase III が RNase E/G や RNase J の発現を制御しているのか調べるため、野生株と Δrnc 株で *rneG* mRNA と *rnj* mRNA の発現量解析を行った。その結果、野生株と比較して Δrnc 株では両 mRNA の発現量に差は見られなかった。以上の結果から、コリネ型細菌において RNase III は RNase E/G や RNase J により制御を受けていることと、RNase III は RNase E/G や RNase J の発現を制御しないことが判明した。

次に、RNase III 過剰発現株の作製が可能なのかを検証した。RNase の過剰発現は増殖に必須な mRNA を過剰に分解し、増殖に悪影響を及ぼす可能性がある。*gapA* プロモーターを含む高発現ベクターを用いて RNase III の過剰発現株を作製し、培養したところ、生育に悪影響は見られなかった。qRT-PCR 解析を用いて *rnc* mRNA の発現量解析を行うと、野生株と比較して *rnc* mRNA の発現量が約 9.59 倍増加した。この結果から、コリネ型細菌では RNase III の過剰発現できることが判明した。

本研究によって、コリネ型細菌の RNase III の RNase E/G や RNase J による転写後制御の存在、自己発現制御が存在しないことを明らかにすることが出来た。これらの結果は、これまでに解析が進んでいる大腸菌や枯草菌とは異なるコリネ型細菌独自の制御機構である。さらに、コリネ型細菌においては RNase III の過剰発現が可能であるということも判明した。今後、RNase III の標的遺伝子の特定や切断点の認識機構を解明し、複数遺伝子の発現量を制御することで効率的な発酵生産への応用が期待される。

〈目次〉

第1章 序論.....	7
1-1 背景.....	7
1-2 細菌の転写後制御について.....	8
1-2-1 大腸菌の mRNA 分解機構.....	8
1-2-2 枯草菌の mRNA 分解機構.....	9
1-3 コリネ型細菌における RNase.....	10
1-4 RNase III.....	11
1-4-1 RNase III の分類.....	11
1-4-2 RNase III の構造.....	13
1-4-3 RNase III の標的遺伝子.....	15
1-5 本研究の目的.....	18
第2章 材料と方法.....	19
2-1 使用培地.....	19
2-2 DNA の基本操作.....	21
2-2-1 DNA の精製.....	21
2-2-2 遺伝子のクローニング時の PCR.....	21
2-2-3 制限酵素処理.....	21
2-2-4 Alkaline Phosphatase による DNA 末端脱リン酸化.....	22
2-2-5 電気泳動.....	22
2-2-6 アガロースゲルからの DNA の抽出.....	22
2-2-7 ライゲーション反応.....	22
2-2-8 <i>E. coli</i> のコンピテントセルの作製.....	22
2-2-9 <i>E. coli</i> の形質転換 (CaCl ₂ 法)	23
2-2-10 <i>E. coli</i> からのプラスミド DNA の抽出.....	23
2-2-11 プラスミドの脱メチル化.....	23
2-2-12 <i>C. glutamicum</i> のコンピテントセルの作製.....	23
2-2-13 <i>C. glutamicum</i> の形質転換.....	24
2-2-14 コロニーPCR.....	24
2-2-15 DNA シークエンス.....	24
2-2-16 <i>C. glutamicum</i> R 株の遺伝子変異株 (<i>rnc</i> D66A、 <i>rnc</i> E138A 株) の構築.....	25
2-3 qRT-PCR 法.....	26
2-4 リファンピシンチェイス法.....	27
2-5 RT-PCR (逆転写 PCR)	27

2-6	β - ガラクトシダーゼ活性測定.....	28
2-7	RNase III 抗体作製.....	39
2-8	ウエスタンブロッティング法.....	32
2-9	顕微鏡観察.....	36
2-10	5' RACE 法.....	36
2-11	本研究で使用したプライマー.....	40
2-12	本研究で使用した菌株.....	41
第3章	結果.....	42
3-1	RNase 遺伝子破壊による増殖速度への影響.....	42
3-2	Growth phase による RNase III の発現量の変化.....	
3-3	RNase E/G や RNase J による RNase III の発現制御.....	44
3-3-1	RNase E/G および RNase J の遺伝子破壊が <i>rnc</i> mRNA の発現量に及ぼす影響.....	44
3-3-2	RNase E/G および RNase J の遺伝子破壊が <i>rnc</i> mRNA の安定性に及ぼす影響.....	45
3-3-3	RNase 遺伝子破壊株における RNase III タンパク質の発現量.....	46
3-3-3-1	RNase III 抗体作製用 RNase III 高生産株の構築.....	46
3-3-3-2	RNase III の精製.....	47
3-3-3-3	RNase 破壊が RNase III タンパク質発現量に及ぼす影響...	48
3-3-4	RNase 破壊株が <i>cgR_1960 lacZ</i> 活性に及ぼす影響.....	49
3-3-5	5' RACE 法による <i>rnc</i> mRNA 切断点同定.....	50
3-4	RNase III 遺伝子破壊株による <i>rneG</i> , <i>rnj</i> 遺伝子発現への影響.....	56
3-5	RNase III による自己発現制御解析.....	57
3-5-1	RNase III 機能欠損株の構築.....	57
3-5-2	RNase III 機能欠損の確認.....	58
3-5-3	RNase III による自己発現制御解析.....	59
3-5-4	RNase III 破壊株及び機能欠損株による表現型の比較.....	60
3-6	コリネ型細菌における RNase III 高発現への影響.....	61
3-6-1	コリネ型細菌における RNase III 高発現株の構築.....	61
3-6-2	RNase III 高発現の確認.....	61
3-6-3	RNase III 高発現が増殖に及ぼす影響.....	62
3-6-4	RNase III 高発現株による RNase III 経時的発現量の確認.....	62
3-6-5	RNase III 高発現が RNase III のターゲット遺伝子の発現量に及ぼす影響.....	65
3-7	<i>rnc</i> オペロン.....	66
3-7-1	遺伝子クラスターのオペロン解析.....	68
3-7-2	RNase 破壊が <i>rnc</i> 周辺遺伝子の発現量に及ぼす影響.....	68
第4章	考察.....	70

第 5 章 謝辞.....	76
第 6 章 参考文献.....	77

第1章 序論

1-1 背景

近年、化石燃料資源依存型の社会構造を原因とする地球温暖化が、海水面の上昇や異常気象などの様々な環境問題を引き起こすことが明らかとなり、問題となっている。このような問題の対策として CO₂ 貯留技術開発や排出量に関する国際的な枠組み作りがなされている。しかしながら、第一に必要なことは、温暖化ガス排出をもたらす化石燃料資源依存型社会から、バイオマスを代表とする再生可能・資源循環型社会への移行、すなわち、バイオリファイナリー技術を用いた持続可能な社会を目指すことである (1)。持続可能な社会の実現には、微生物による発酵生産が、比較的安価な糖を原料として温和な条件下で物質を生産できることから大きく注目されている。公益財団法人地球環境産業技術研究機構 (RITE) では、持続可能な社会の実現に向け、優れた物質生産能力を持つ有用工業微生物、*Corynebacterium glutamicum* を基にした基盤技術を確立すべく研究開発を進めている。

C. glutamicum は一般的にコリネ型細菌と呼ばれ、ミコール酸含有放線菌属に属し、芽胞形成能を持たない、非運動性のグラム陽性菌である。*C. glutamicum* は、1950 年代に協和発酵工業の木下と鵜高らによってグルタミン酸を生産する菌として土壤中から分離された (2)。この発見が、その後のアミノ酸発酵における目覚ましい発展の契機となった。本菌を用いたグルタミン酸の発酵生産は 1957 年に始まり、2014 年には 220 万トン以上に達したと推定されている (3) 今日では、L-アミノ酸の発酵生産に留まらず、様々な化合物や原料、バイオ燃料の生産やタンパク質の生産へと幅広く利用され、汎用的な物質生産菌へとなりつつある。近年の幅広い利用をもたらした要因のひとつとして、発見当時に主流だったランダム変異と選別に基づく物質生産菌の育種法だけでなく、ゲノム育種法が試みられ始めたことが挙げられる。「ゲノム育種」とは、生産菌のゲノム解析から物質生産に有効な変異を特定し、野生株に導入する方法である。この方法によって、ランダム変異法では望ましくない変異が生産菌まで受け継いでしまうという問題を克服することができ、増殖・糖消費速度の増加による培養時間の半減、高温ストレスに対する耐性菌を生み出すことにも繋がった (4)。

また、全ゲノム配列解析により遺伝子の機能や遺伝子間の相互作用などの理解が一層深まり、遺伝子発現制御においては、高発現プロモーターや転写因子解析など転写制御解析が精力的に進められている。しかし、原核生物においても重要な制御機構として知られるようになった転写後段階での制御については、*C. glutamicum* においてはほとんど未解明の状態であった。

本研究では *C. glutamicum* の遺伝子発現制御の理解を目的として、RNA 分解酵素の一つである RNase III に着目して研究を行った。

1-2 細菌の転写後制御について

細菌における遺伝子発現制御は、転写開始段階だけでなく、転写産物である mRNA レベルにおいても様々な環境に適応するため複雑に制御されていることが知られている。(5)。RNA レベルでの制御には様々な機構が存在しており、代表的なものには以下の三つがある。一つ目はターゲット mRNA と結合し翻訳の阻害、または RNA 分解を誘導する small RNA (sRNA) による制御。二つ目は、mRNA の特定領域に代謝産物などの低分子化合物が特異的に結合することで、その領域の二次構造を変化させて、遺伝子の発現を制御するリボスイッチによる制御。そして、三つ目はターゲット mRNA を特異的に切断することで遺伝子発現を制御する Ribonuclease (RNase) による制御である。

その中でも、RNase による転写後制御は mRNA、rRNA、tRNA、ncRNA 等、全ての RNA の正常な機能維持に大きく貢献している。

1-2-1 大腸菌の mRNA 分解機構

mRNA の分解経路は普遍的なものではなく、たとえ同じ遺伝子から転写された mRNA であっても環境や条件が異なれば異なった分解経路をたどる場合がある (6)。大腸菌の mRNA 分解モデルでは、主に二つの分解経路に分けられるが、どちらも RNase E による最初の RNA 切断が引き金となる (図. 1-1)。場合によっては最初の切断が RNase E ではなく RNase G や RNase III などほかのエンド型 RNase の場合もある。大腸菌の主要な RNase である RNase E と RNase G は同じドメイン構造を持ち、アミノ酸配列の相同性も高いため、RNase E/G ファミリーと呼ばれている (7)。mRNA 分解の一つ目の経路は RNase E の 5'末端一リン酸依存的経路である。転写された新生 mRNA の 5'末端は三リン酸となっているため、まず、RNA ピロホスホヒドラーゼ (RppH) が mRNA の 5'末端を一リン酸にする。5'末端が一リン酸になったことを RNase E が認識しエンド型活性で mRNA を切断する。その後、3'→5'エキソ型 RNase である RNase II、RNase R または PNPase によって数塩基にまで分解される。最後はオリゴリボヌクレアーゼ (Orn) によりモノヌクレオチドにまで分解される。RNase E のエンド型活性で生じた切断産物はその 3'末端にポリ A ポリメラーゼ (PAP) によりポリ A テールが付加される場合がある。真核生物の場合と異なり、原核生物ではポリ A テールが付加されると、その部分を PNPase が認識し結合することにより mRNA が不安定化することが知られている (8)。これにより 3'→5'エキソ型活性による分解を受け、最後に Orn によってモノヌクレオチドまで分解される。二つ目の経路は RNase E が mRNA の 5'末端の一リン酸化状態に依存せずにエンド型活性により RNA 切断を行うものである。この切断方法はダイレクト・エントリーと呼ばれている。RNase E による切断後は、一つ目と同じ経路で分解されると考えられている。

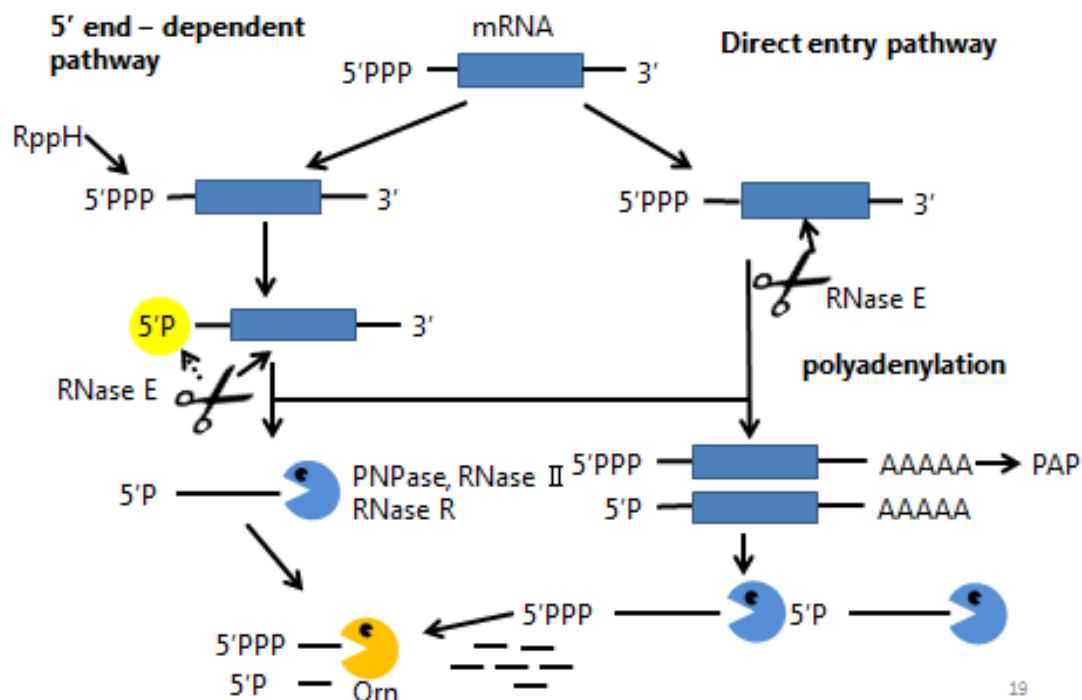


図. 1-1 大腸菌の mRNA 分解機構

mRNA の分解経路は 5'末端一リン酸経路とダイレクト・エントリー経路に分けられる。5'末端一リン酸経路では RppH が 5'末端の三リン酸を一リン酸にする。これを大腸菌では RNase E が認識して最初の切断を行う。その後、エキソ型 RNase による切断を受ける。ダイレクト・エントリー経路では 5'末端のリン酸化状態に依存せず RNase E が最初の切断を行う。

1-2-2 枯草菌の mRNA 分解機構

枯草菌は RNase E/G ファミリーの代わりに RNase J1 と RNase J2 という 2 種類の RNase J を保有している。また、枯草菌においては RNase J1 と RNase Y が mRNA 分解の主な役割を担っている (図. 1-2)。RNase Y はエンド型の RNase であるのに対し、RNase J はエンド型に加え 5'→3'エキソ型活性を保有していることが知られている (9)。このため、枯草菌の mRNA 分解経路は大腸菌のものとは異なっている。枯草菌の mRNA 分解経路は、RNase J1 または RNase Y によるエンド型切断と、RNase J1 の 5'→3'エキソ型分解による二種類の分解経路が考えられる。また、RNase J1 のエンド型切断は mRNA の 5'末端に依存しない場合があるため、合計三種類の分解経路が考えられる。RNase J1 の 5'→3'エキソ型活性および RNase Y のエンド型活性はともに、基質の RNA の 5'末端一リン酸に依存しているため、まず RppH が mRNA の 5'末端を一リン酸にする。RNase Y のエンド型活性で生じた下流の切断物もまた 5'末端が

一リン酸となるので、これは RNase J1 による 5'→3'エキソ型活性により数塩基まで分解されると考えられる。一方、RNase J1 または RNase Y によるエンド型切断で生じた上流産物は 3'→5'方向に、PNPase や RNase R といった 3'→5'エキソ型 RNase により数塩基まで分解される。最後はオリゴヌクレアーゼである NrnA または NrnB によりモノヌクレオチドまで分解される。

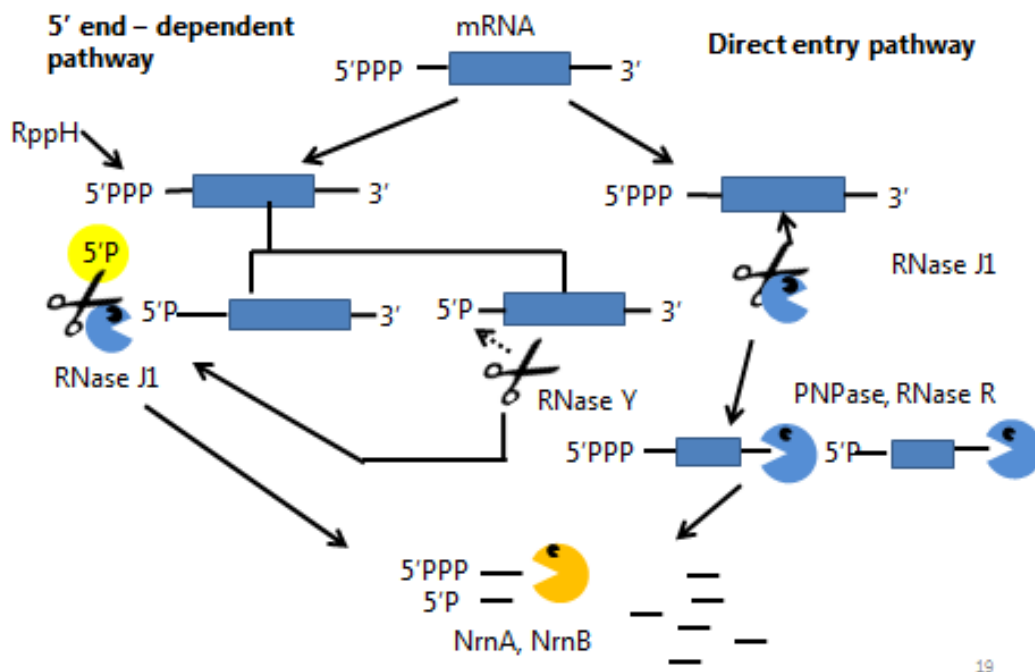


図. 1-2 枯草菌の mRNA 分解機構

5'末端一リン酸経路では RppH が 5'末端の三リン酸を一リン酸にする。これを枯草菌では RNase J1 または RNase Y が認識して最初の切断を行う。その後、エキソ型の切断を受ける。ダイレクト・エントリー経路では 5'末端のリン酸化状態に依存せず RNase J1 が最初の切断を行う。

1-3 コリネ型細菌における RNase

コリネ型細菌は大腸菌、枯草菌と異なり、RNase E/G ファミリー酵素と、RNase J をそれぞれ 1 つずつ保有している (10)。また、これら以外に RNase III を含め他の RNase も複数保有していることが分かっている (表. 1-1)。しかし、これらの RNase がどのような mRNA を標的とし、生体内でどのような役割を担っているのか未解明な部分が多い。これまでに我々及び東京工業大学のグループは RNase E/G、RNase J、RNase III の機能解析を行っており、これらの基質 RNA を同定してきた (10, 11, 12)。

表. 1-1 大腸菌、枯草菌、コリネ型細菌 (R 株) における RNase の分布

		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. glutamicum</i> R
Endoribonuclease	RNase III	<i>rnc</i>	<i>rncS</i>	<i>cgR_1959 (rnc)</i>
	RNase E/G	<i>rne, rng</i>	—	<i>cgR_2248 (rneG)</i>
	RNase Y	—	<i>rny</i>	—
	RNase J	—	<i>rnjA, RnjB</i>	<i>cgR_1799 (rnj)</i>
	mini III	—	<i>mrcC</i>	—
	RNase M5	—	<i>rnmV</i>	—
	YbeY	<i>ybeY</i>	<i>ybeY</i>	<i>cgR_2159</i>
	RNase P	<i>rnpAB</i>	<i>rnpAB</i>	<i>cgR_2988</i>
	RNase Z	<i>rnb</i>	<i>rnz</i>	<i>cgR_2416 (rnZ)</i>
	RNase H	<i>rnhA, rnhB</i>	<i>rnhB, rnhC</i>	<i>cgR_0410, cgR_1861</i>
	RNase I	<i>rna</i>	—	—
	RNase Bsn	—	<i>bsn</i>	—
5'→3'Exoribonuclease	RNase J	—	<i>rnjA, rnjB</i>	<i>cgR_1799 (rnj)</i>
3'→5'Exoribonuclease	PNPase	<i>pnp</i>	<i>pnpA</i>	<i>cgR_1804 (pnp)</i>
	RNase T	<i>rnt</i>	—	—
	RNase R	<i>rnr</i>	<i>rnr</i>	<i>cgR_2111</i>
	RNase II	<i>rnb</i>	—	<i>cgR_2111</i>
	RNase PH	<i>rph</i>	<i>rph</i>	<i>cgR_2414 (rph)</i>
	RNase D	<i>rnd</i>	—	<i>cgR_1730</i>
	Orn	<i>orn</i>	—	<i>cgR_2384</i>
	NrnA	—	<i>nrnA</i>	<i>cgR_1812</i>

KEGG の BLAST 検索 (https://www.genome.jp/tools-bin/search_sequence?prog=blast&db=cgt&seqid=aa)

を用いてコリネ型細菌が保有している RNase を調べた。

1-4 RNase III

1-4-1 RNase III の分類

RNase III は 1968 年に大腸菌から初めて二本鎖 RNA を特異的に切断する RNase として Robertson らが発見した (13, 14)。RNase III は細菌だけでなく、植物や動物等幅広く保有しているが、ドメイン構造がそれぞれ異なっている。これらを RNase III ファミリーと呼ぶ。RNase III ファミリーは細菌の RNase III と真核生物の Rnt1p、Drosha や Dicer (15, 16, 17, 18, 19)、などが存在するが、古細菌のゲノムから RNase III のホモログは発見されていない (20)。

RNase III ファミリーはポリペプチド構造に応じて 4 つのクラスで大別される (図. 1-4-1)。細菌の RNase III はクラス I に分類され、最も単純な構造であり、エンドヌク

レアーゼドメイン (endoND) と二本鎖 RNA 結合ドメイン (dsRBD) で構成されている。クラス II に分類されるのは、ヒトやキイロシヨウジョウバエの Droscha タンパク質で、長い N 末端領域を含み、二つの endoND と一つの dsRBD を持つ。クラス III に分類されるのはヒトやキイロシヨウジョウバエが保有する Dicer であり、N 末端ヘリカーゼ/ATPase ドメイン、Domain of Unknown Function (DUF283)、Piwi Argonaute Zwiille (PAZ) ドメイン、および Droscha のような C 末端構造を持ち、二つの endoND と一つの dsRBD を保有している (21, 22)。最後に、クラス IV は枯草菌で唯一観測されている Mini-RNase III (Mini III) で、一つの endoND ドメインで構成されており、二本鎖 RNA は切断できず一本鎖 RNA を切断するとされていた。しかしながら、近年の二本鎖 RNA の切断試験から二本鎖 RNA も切断することが明らかとなってきた (23, 24)。このように、RNase III ファミリーには 4 つのクラスが存在するが、細菌の RNase III は構造が単純なことから、RNase III 活性のメカニズムの研究に広く用いられている。

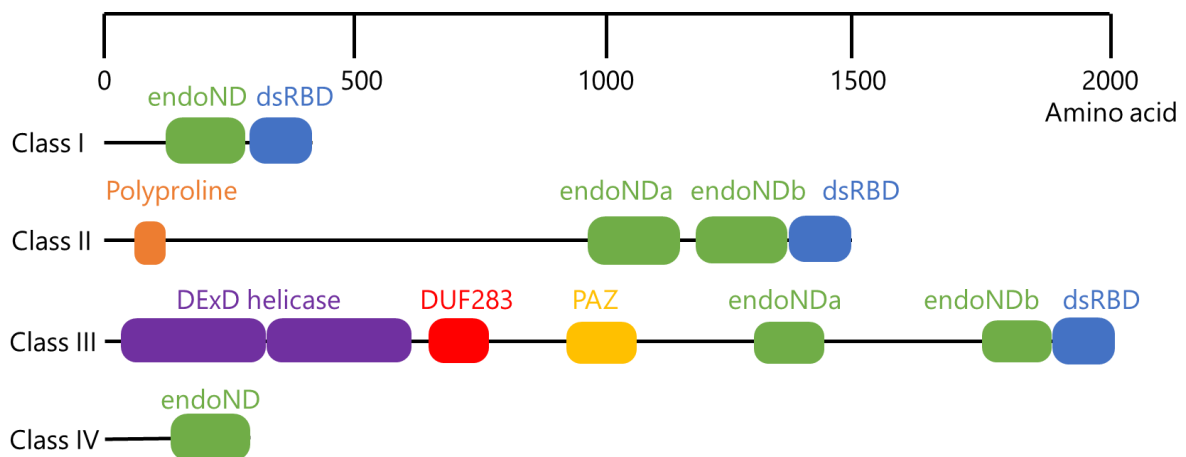


図. 1-4-1 RNase III の分類

各クラスの RNase III ドメイン構造とアミノ酸配列の長さを表した。

1-4-2 RNase III の構造

RNase III ファミリーのクラス I は細菌、バクテリオファージやいくつかの真菌等幅広く存在している (23, 25, 26)。大腸菌の RNase III はこのファミリーの代表的なモデルとして研究されている。RNase III は *rnc* 遺伝子によってコードされており、大腸菌の RNase III は 52 kDa のホモ二量体として活性を示している (27, 28) (図. 1-4-2-1)。細菌の RNase III ポリペプチド (~220aa) は、N 末端の endoND ドメイン (150aa) と C 末端 dsRBD で構成され、短い (~7aa) リンカーで接続されている (29, 30)。一方、枯草菌の RNase III は 28 kDa のタンパク質であり、*rncS* 遺伝子によりコードされている (31, 32, 33)。枯草菌ではクラス IV の Mini III のほかにクラス I の RNase III も保有しており、クラス I の RNase III は大腸菌と異なり生育するのに必須であることが判明している (34)。細菌の RNase III は各サブユニットが一つの RNA 鎖の加水分解に寄与するホモダイマーを形成している。RNase III の endoND は、二つの酸性アミノ酸のクラスターが保存されており、大腸菌では E41、D45、D114 および E117 の側鎖が Mg^{2+} イオンに配位している (35)。前方のクラスターには他の細菌にも高度に保存されている 9 アミノ酸残基 **NERLEFLGDS** が存在する (36) (図. 1-4-2-3)。dsRBD には、RNase III ファミリー全体で保存されている特徴的な $\alpha 1\text{-}\beta 1\text{-}\beta 2\text{-}\beta 3\text{-}\alpha 2$ の三次構造を持ち、基質認識に関与している (14)。

ヒトが保有する Drosha は 1374aa で 159 kDa のタンパク質であり、クラス I の RNase III と異なりホモ二量体を形成しない (37)。Drosha は補因子である DGCR8 と「マイクロプロセッサ」と呼ばれる複合体を形成する。この複合体は一つの Drosha タンパク質に二つの DGCR8 タンパク質からなるヘテロ三量体を構成している (38) (図. 1-4-2-2)。また、DGCR8 は Drosha と結合し安定化させるだけでなく標的 RNA の認識にも関わっている (38)。

幾つかの生物では二つもしくは複数の Dicer を保有しているが、ヒトは一種類だけ保有している (26, 39, 40)。ヒトが保有する Dicer は約 220 kDa で複数のドメインで構成されるタンパク質である (41)。Dicer のヘリカーゼドメインは欠損させると基質の分解速度が上昇し、DUF283 を欠損させると基質との結合力が上昇する (41)。加えて、DUF284 単体では二本鎖 RNA と結合せず一本鎖 RNA もしくは一本鎖 DNA と結合している (41, 42)。

Mini III は枯草菌をはじめファーミキューテス門に属する低 GC グラム陽性菌が保有している (28)。枯草菌の Mini III は *mrnC* 遺伝子にコードされており、144 aa で約 17.1 kDa である。また、Mini III は RNase III 同様ホモ二量体を形成し基質と結合することが判明している (28)。

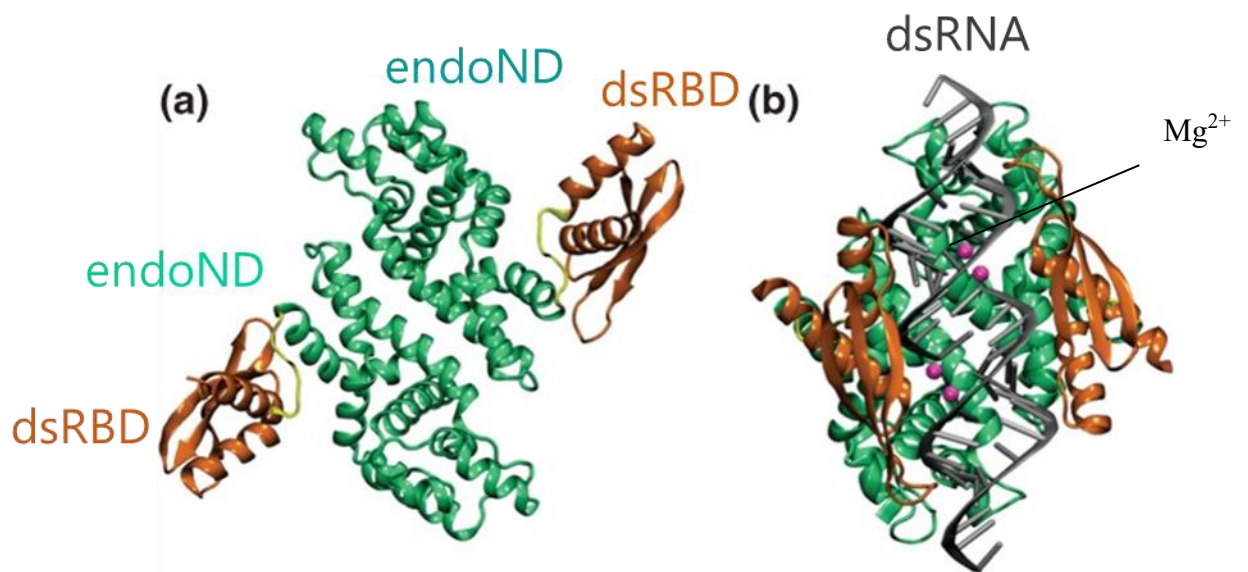


図. 1-4-2-1 大腸菌 RNase III の立体構造

RNase III は緑色の領域の dsRNA 切断を行う endoND と、橙色の領域である dsRNA と結合する dsRBD の二つのドメイン構造をとり、ホモ二量体を形成し dsRNA の切断を行う。切断活性部位には Mg^{2+} イオンを要求する (28)。

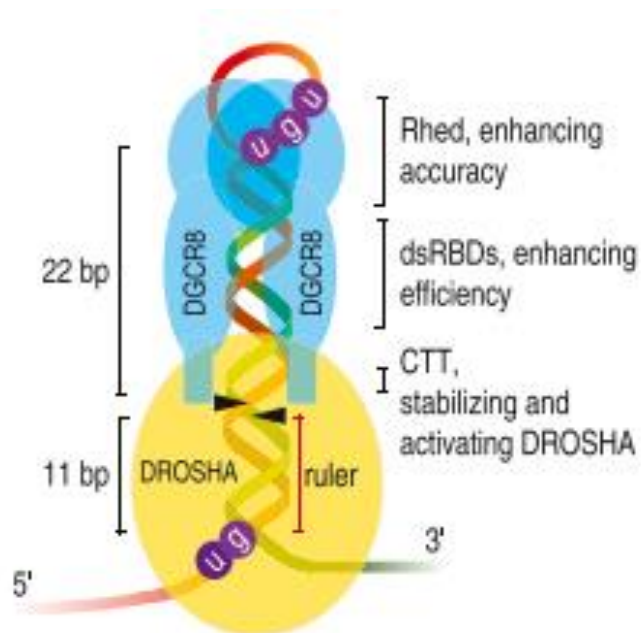


図. 1-4-2-2 マイクロプロセッサ (Drosha と DGCR8 複合体) の模式図

マイクロプロセッサは、1 つの Drosha 分子と DGCR8 ダイマーで構成される 364 kDa の複合体を形成する。Drosha は接続部に存在する UG モチーフと相互作用する。一方 DGCR8 は結合することにより Drosha の安定化、ステムループとの相互作用、および頂端 UGU モチーフの認識を行っている (38)

を RNase III 自身が切断し発現を負に制御する自己発現制御をすることが知られている (46)。大腸菌の *rnc* 遺伝子は、*rnc* の下流の 2 つの遺伝子 *era* (30S rRNA 成熟化 GTPase) と *recO* (DNA 修復タンパク質) とオペロンを構成している (47) (図. 1-4-3-1)。他にも RNase III の分解標的遺伝子である *rhoS* mRNA (転写因子をコードする) の 5'UTR を分解し、バイオフィーム形成を促進させることが知られている (48)。また、*adhE* mRNA の 5'UTR 領域の切断により、エタノール加水分解酵素の発現を正に制御していること (49) 3'→5'エキソ型 RNase の PNPase をコードする *pnp* mRNA を分解し、PNPase の発現の制御も行っていることが知られている (50, 51, 52, 53)。RNAseq 解析により、RNase III の標的遺伝子解析も行われており、標的遺伝子として脱水素酵素をコードすると推定される *aceEF*、H⁺共輸送体をコードする *proP*、*tnaAB* オペロン誘導タンパク質をコードする *tnaC* 等が新たに報告されている (54)。

枯草菌では、プロフェージ RNA を分解するために RNase III が必要ということが知られており、RNase III をコードする *rncS* 遺伝子を破壊すると増殖速度が減少する。また、RNase III と類似の Mini-III というエンド型の RNase は生育に必須でないことが判明している。(34, 35)。枯草菌における RNase III 遺伝子破壊 (Δrnc) が可能な菌株を用いて RNase III の標的遺伝子を解析した実験では、抗毒素タンパク質をコードする *txpA* mRNA や *yonT* mRNA を切断制御していることが判明した (55)。また、大腸菌の RNase III と枯草菌の RNase III のアミノ酸配列は 36% 相同であり、大腸菌と枯草菌の RNase III は同様の活性が存在することが予想された。そこで、*rnc* 遺伝子を欠損させた大腸菌に枯草菌の *rnc* 遺伝子を導入した株では、大腸菌の野生株と同様に 30s rRNA の分解が確認された (56)。

コリネ型細菌では RITE バイオ研究室における RNase III をコードする *rnc* 遺伝子破壊株のマイクロアレイ解析により、転写因子をコードする *mraZ*、細胞壁加水分解酵素をコードする *cgR_1596*、ATP 結合細胞分裂タンパク質 *ftsEX*、2-メチルイソクエン酸リアーゼをコードする *prpB2* 等の発現量の変化が観察された。このうち、*mraZ* mRNA は RNase III による分解の標的であるという実験結果を報告している (11)。大腸菌では、RNase III は静止期で発現が抑制され、さらに YmdB という RNase III の活性を阻害するタンパク質の存在が報告されているが (59)、コリネ型細菌は YmdB と相同な遺伝子は保有しておらず生育に伴う発現制御の報告もされていない。コリネ型細菌は RNase III をコードする *rnc* 周辺の遺伝子がクラスターを形成している (図. 1-4-3-2: 表. 1-2)。*rnc* の下流にはホルムアミドピリミジン DNA グリコシラーゼをコードする *cgR_1958* が存在し、近縁種である放線菌で広く保存されている (表. 1-3)。また、*rnc* の上流には核酸結合タンパク質をコードすると推定される *cgR_1960* が存在し、相同な遺伝子を保有している種が多く存在している (60)。

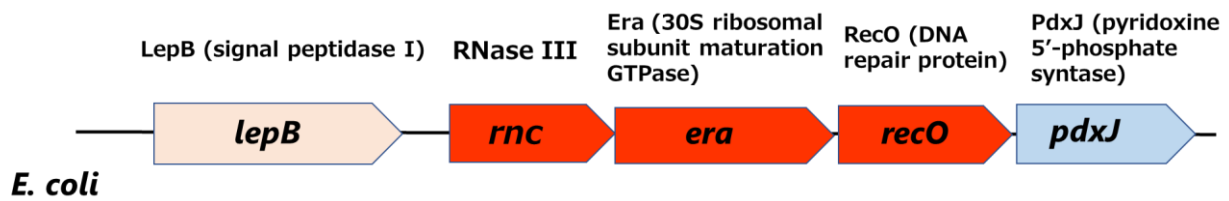


図. 1-4-3-1 大腸菌の *rnc* オペロン

オレンジ色で示させた *rnc*, *era*, *recO* がオペロンを構成している。



図. 1-4-3-2 *rnc* 周辺の遺伝子クラスター

表. 1-2 *rnc* 周辺の遺伝子クラスターのタンパク質機能

遺伝子名	タンパク質機能
<i>cgR_1956</i>	プロテアーゼ
<i>cgR_1957</i>	Co/Zn/Cd 排出システム構成要素
<i>cgR_1958</i>	ホルムアミドピリミジン DNA グリコシダーゼ
<i>rnc</i>	RNase III
<i>cgR_1960</i>	核酸結合タンパク
<i>cgR_1961</i>	細胞分裂開始タンパク

cgR_1956, *cgR_1957*, *cgR_1960*, *cgR_1961* のタンパク質機能は KEGG の BLAST 検索 (https://www.genome.jp/tools-bin/search_sequence?prog=blast&db=cgt&seqid=aa) を用いて調べた。

表. 1-3 *rnc* 遺伝子の下流に *cgR_1958* と相同な遺伝子を持つ近縁種

目	科	属 種	遺伝子名
<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	(<i>Actinomyces odontolyticus</i> ATCC17982)	ACTODO_RS07020
<i>Corynebacteriales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	NCgl1993
	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia mikamii</i> NBRC 108933	NMI01_RS22720
		<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	RHA1_RS31900
<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665	MLUT_RS15975
	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	<i>fpg</i>
<i>Micromonosporales</i>	<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029	MICAU_RS06830
<i>Propionibacteriales</i>	<i>Propinibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudereichii</i>	RM25_RS06730
<i>Pseudonocardiales</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	(<i>Amycolatopsis mediterranei</i> U32)	<i>algL</i>
<i>Streptomyetales</i>	<i>Streptomyetaceae</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	SCO5573

cgR_1958 と相同な遺伝子をもつ菌種の探索は KEGG の BLAST 検索 (https://www.genome.jp/tools-bin/search_sequence?prog=blast&db=cgt&seqid=aa) を用いて調べた。

1-5 本研究の目的

コリネ型細菌は、アミノ酸や有機酸等の生産に用いられる有用工業微生物である。物質生産のさらなる効率化を達成するには遺伝子発現を適切に制御することが必要である。従来の遺伝子の高発現化プロセスでは、高発現プロモーターを用いた高発現化が行われてきた。しかしながら、発現させる遺伝子によっては mRNA が分解されやすく想定より遺伝子の発現量が上昇しない場合がある。そこで、mRNA の安定化に重要な役割を担っている Ribonuclease (RNase) の制御機構を解明することにより mRNA の安定化等による、従来の技術との相乗効果により高効率に遺伝子を高発現化させることが期待される。

そこで本研究では、コリネ型細菌における転写後制御の解明を目的として、RNA 分解における主要な RNase の一つである RNase III について発現制御機構を解明する。

第2章 材料と方法

2-1 使用培地

下記の培地成分を混合した後、オートクレーブ 120°C、20 分で滅菌した。固形培地作製時には 1.5% (w/v) で Agar (和光) を加えた。また、以降 LB 培地から作製した固形培地を LB プレート、A 培地から作製した固形培地を A プレートと表記する。

LB 培地 (*E. coli* 用培地)

試薬	使用量
Bacto Trypton (DIFCO)	10 g
Yeast Extract (Becton, Dickinson company)	5 g
NaCl (ナカライ)	5 g
DDW	up to 1,000 mL

SOB 培地 (*E. coli* コンピテントセル作製用)

試薬	使用量
Bacto Trypton (DIFCO)	20 g
Yeast Extract (Becton, Dickinson company)	5 g
5M NaCl	2 mL
2M KCl	1.25 mL
DDW	up to 1,000 mL

オートクレーブ後、1M MgSO₄ · 7H₂O 10 mL、1M MgCl₂ · 6H₂O 10 mL を無菌状態で加えた。

BTM 培地 (*C. glutamicum* 用最少培地)

試薬	使用量
Urea (ナカライ)	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (ナカライ)	7 g
K ₂ HPO ₄ (和光)	0.5 g
KH ₂ PO ₄ (和光)	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O (和光)	0.5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O (和光)	6 mg
MnSO ₄ · 7H ₂ O (和光)	6 mg
Biotin (和光)	200 µg
Thiamine-HCl (和光)	200 µg
CaCl ₂ · 2H ₂ O (和光)	10 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O (和光)	1 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O (和光)	0.2 mg
NiCl ₂ · 6H ₂ O (和光)	0.02 mg
DDW	up to 1,000 mL

培養開始時に適宜炭素源を加えた。

A 培地 (*C. glutamicum* 用栄養培地)

試薬	使用量
Urea (ナカライ)	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (ナカライ)	7 g
K ₂ HPO ₄ (和光)	0.5 g
KH ₂ PO ₄ (和光)	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O (和光)	0.5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O (和光)	6 mg
MnSO ₄ · 7H ₂ O (和光)	6 mg
Biotin (和光)	200 µg
Thiamine-HCl (和光)	200 µg
Yeast extract (DIFCO)	1 g
DDW	up to 1,000 mL

培養開始時に適宜炭素源を加えた。

抗生物質

E. coli では Ampicillin (和光) 50 mg/L、Chloramphenicol (和光) 50 mg/L、Kanamycin (和光) 50 mg/L の濃度で培地に混合し、使用した。*C. glutamicum* では Chloramphenicol 5 mg/L、Kanamycin 50 mg/L の濃度で培地に混合し、使用した。

2-2 DNAの基本操作

2-2-1 DNAの精製

精製は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使って行った。プロトコールはマニュアルを参照した。DNAの精製は PCR 後、制限酵素処理後に行った。

2-2-2 遺伝子のクローニング時の PCR

C. glutamicum から遺伝子をクローニングする時は、TKs GflexTMDNA Polymerase (TaKaRa) を使って PCR を行った。

反応組成 (TKs GflexTMDNA Polymerase)

試薬	使用量
Buffer	25 μ L
100 μ M Forward Primer	0.2 μ M
100 μ M Reverse Primer	0.2 μ M
Polymerase	1 μ L
DDW	up to 50 μ L

反応サイクル

94°C 1分

↓

98°C 10秒→60°C 15秒→68°C 30秒 (増幅長 1 kbにつき 30秒) ×30サイクル

↓

4°C

2-2-3 制限酵素処理

各種制限酵素に最適なバッファーを用いて下記の反応液を調製した。各種制限酵素に最適な反応温度 (30°Cもしくは 37°C) で 1時間～一晩インキュベートさせた後、
1) DNAの精製に記述されるように精製し、電気泳動で確認した。

反応液組成

試薬	使用量
DNA	2 μ g
10×Buffer (TaKaRa)	5 μ L
制限酵素 (TaKaRa)	100 U
DDW	up to 50 μ L

ただし、DNA溶液の濃度により適宜反応液の体積を調整した。

2-2-4 Alkaline Phosphatase による DNA 末端脱リン酸化

3) 制限酵素処理時に上記の反応液へ Alkaline Phosphatase (BioLabs) 1 μ L 加えた。

2-2-5 電気泳動

サンプル DNA に 10×Loading Buffer (TaKaRa) を加えてアガロースゲルにアプライし、100V で電気泳動した。30 分後にゲルを取り出し、エチジウムブロマイドで 30 分間染色した。最後に UV 照射により DNA を発色させてバンドを確認した。電気泳動時及びゲル作成時には 1×TAE Buffer (下記のとおり) を使用した。

50×TAE Buffer

試薬	使用量
Tris (和光)	240 g
EDTA · 2Na	37 g
Acetic acid (和光)	57 mL
DDW	up to 1,000 mL

2-2-6 アガロースゲルからの DNA の抽出

Gel Extraction kit (QIAGEN) を使用した。プロトコールはマニュアルを参照した。

2-2-7 ライゲーション反応

ベクター DNA に対してインサート DNA がモル比で 1 : 2~5 になるように混合した後、反応系の 10 分の 1 量の 10×Buffer 及び T4 DNA Ligase (TaKaRa) を加えて 16°C で一晩静置した。反応終了後のサンプルは全量形質転換に使用された。

2-2-8 *E. coli* のコンピテントセルの作製

シングルコロニーを 10 mL LB 培地に 37°C で一晩培養した。前培養液の OD₆₀₀ を測定、OD₆₀₀=0.012 になるよう 250 mL SOB 培地に植菌、25°C で培養した。OD₆₀₀=0.55~0.60 になったらあらかじめ冷やした遠心チューブに移し 10 分間氷冷、遠心分離 (3,000×g、10 分、0°C) し上清を取り除いた。ペレット化した菌体に合計 84 mL になるよう TB Buffer を加え再懸濁、10 分間氷冷した。遠心分離 (3,000×g、10 分、0°C) し上清を取り除き、合計 16.7 mL になるよう TB Buffer を加え再懸濁、その後 1.25 mL の DMSO を少しずつ添加、10 分間氷冷した。110~120 μ L ずつ 1.5 mL エッペンチューブに分注し、-80°C 保存した。

TB Buffer

試薬	使用量
PIPES solution	20 mL
CaCl ₂ · 2H ₂ O (和光)	2.2 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	10.88 g
KCl (和光)	8.6 g
DDW	800 mL

9N KOH で pH6.7 に調整後、DDW で 1,000 mL に調整した。0.2 μm の孔径を有するフィルターを通して濾過滅菌し、50 mL ファルコンチューブに分注し、4°C で保存した。

2-2-9 *E.coli* の形質転換 (CaCl₂法)

氷上でコンピテントセルを溶解させ、プラスミド DNA を 1~20 μL (ライゲーション後のプラスミドを使用する場合は全液量使用した) 加え氷上で 30 分静置した。次に、42°C で 1 分熱処理し、氷上で 1 分間冷却した。その後、LB 培地を 1 mL 加え 37°C で 1 時間培養した。培養後、遠心分離 (14,500 rpm、1 分) を行い、上清 900 μL 捨てた。適当な抗生物質が添加された LB プレートに菌液 100 μL 塗布し、37°C で一晩培養した。

2-2-10 *E. coli* からのプラスミド DNA の抽出

Mini-prep spin column kit (QIAGEN) をマニュアル通りに使用した。スクリーニング等の大量の大腸菌からプラスミドを抽出する際は、プラスミド自動分離装置 PI-200 (クラボウ) を使用した。マニュアルに従って操作した。

2-2-11 プラスミドの脱メチル化

大腸菌からのプラスミド DNA 抽出後、脱メチル化用菌株 *E. coli* SCS110 へ形質転換 (CaCl₂) を行った。その後、適当な抗生物質を添加した LB 培地 10 mL に植菌し 37°C、200 rpm で一晩培養した。Mini-prep spin column kit (QIAGEN) をマニュアル通りに使用し、脱メチル化されたプラスミド DNA を抽出した。

2-2-12 *C. glutamicum* のコンピテントセルの作製

2%D-グルコース (以下 Glc) を加えた A 培地 10 mL に *C. glutamicum* を植菌し、33°C で一晩培養した前培養液の OD₆₀₀ を測定し、2% Glc を加えた A 培地に OD₆₀₀=0.05 になるよう植え継した。本培養液を 33°C で培養し OD₆₀₀=0.7~1.0 になるまで培養した。その後、15 mL ファルコンチューブに 5 mL の培養液を移し、遠心分離 (13,000 rpm、1 分、4°C) し上清を取り除き、1 mL の 15%グリセロール溶液を加え再懸濁させた。遠心分離 (13,000 rpm、1 分、4°C) し上清を取り除き再び 1 mL の 15%グリセロール溶液を加え再懸濁させた。この洗浄を 3 回繰り返した。洗浄後、ペレット化した菌体に 15%グリセロール溶液を 700 μL 加え、1.5 mL エッペンチューブに 80 μL ず

つ分注し、-80°C保存した。

2-2-13 *C. glutamicum* の形質転換

氷上で溶解させたコンピテントセルに脱メチル化されたプラスミド DNA を 1 μ L 混合した。混合液を 0.1 cm Gene Pulser (BIO-RAD) へ移し、パルス (1.95 kV, 20 μ F, 200 Ω) をかけた。終濃度 4% Glc を添加した A 培地 1 mL でパルスをかいた菌体を優しく懸濁し、1.5 mL エッペンチューブに戻した。その後、33°C で 3 時間静置した。遠心分離 (14,500 rpm、1 分) し上清 900 μ L 捨て、適当な抗生物質が添加された A プレートに 100 μ L 菌液を塗布し、33°C で一晩培養した。

2-2-14 コロニーPCR

コロニーPCR では KAPATaq Exrta (日本ジェネティクス) を使用した。

反応組成

試薬	使用量
5×Taq Buffer	10 μ L
25 mM MgCl ₂	3.5 μ L
10 mM dNTPs	1.5 μ L
100 μ M Forward Primer	0.25 μ L
100 μ M Reverse Primer	0.25 μ L
Polymerase	0.25 μ L
DDW	up to 50 μ L

反応サイクル

94°C 1分

↓

94°C 15秒→55°C 15秒→72°C 1分 (増幅長 1 kb につき 1分) ×30 サイクル

↓

72°C 1分

↓

4°C

2-2-15 DNA シークエンス

DNA シークエンス用配列は Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて PCR で増幅させた。DNA はプロトコールに従って適切な濃度に希釈した。PCR 産物は Big Dye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystems) を用いてプロトコールに従い精製し、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で解析した。シーケンスデータは Genetyx program (Genetyx

Corporation) で分析した。

反応組成

試薬	使用量
Sample DNA	2 μ L
5×Sequence Buffer	2 μ L
1 μ M Primer	2 μ L
Big Dye X terminator v3.1	0.4 μ L
DDW	up to 10 μ L

反応サイクル

96°C 1分

↓

96 10秒→50°C 5秒→60°C 4分×35サイクル

↓

4°C

2-2-16 *C. glutamicum* R株の遺伝子変異株 (*rnc* D66A、*rnc* E138A株) の構築

1) 相同組換え用ベクター作製

sacB を保有する相同組換え用ベクター-LKS2-4 に RNase III をコードする *rnc* 遺伝子を保有する DAN 断片をライゲーションした。*E. coli* HST02 に形質転換し、*E. coli* からのプラスミド DNA の抽出を行った。シーケンス解析を行い目的の遺伝子が挿入されていることを確認した後、インバース PCR を行い目的の位置に変異を加えた。インバース PCR 後電気泳動で目的のバンドを確認し、DNA 精製を行った。次に *E. coli* HST02 に形質転換を行い、*E. coli* からのプラスミド DNA の抽出を行った。シーケンス解析を行い目的の遺伝子に変異が導入されていることを確認した後、プラスミド DNA の脱メチル化を行った。

2) *C. glutamicum* R株の形質転換 (1回組換え体の作製)

C. glutamicum R株のコンピテントセルに脱メチル化された相同組換え用ベクターをエレクトロポレーション法により形質転換し、カナマイシンが添加された A プレートに塗布し、33°Cで一晩培養した。得られたコロニーを終濃度 2% Glc を添加した A 培地 10 mL (カナマイシンを含む) に植菌し、33°C、200 rpmで一晩振盪培養した。

3) *C. glutamicum* R株の形質転換 (2回組換え体の作製)

培養液 1 mL を 1.5 mL エッペンチューブに移して遠心分離 (14,500 rpm、1分) し、上清を捨てた。A 培地 500 μ L で再懸濁して遠心分離 (14,500 rpm、1分) し、上清を

捨てる操作を 3 回繰り返して洗菌した。洗菌後、終濃度 10%スクロースを含む A 培地 500 μL で再懸濁し、スクロースが添加された A プレートに菌液 50 μL 塗布した。その後、33°Cで一晩培養した。

4) 2 回組換え菌株のセレクション

一晩培養し得られたコロニーを、A プレートとカナマイシンが添加された A プレートに植菌し、33°Cで一晩培養した。A プレートのみにて生えてきたコロニーについて *rnc* 遺伝子のシーケンスし、目的の変異が導入されているのを確認した。

2-3 qRT-PCR 法

1) 培養及び菌体回収

2% (w/v) Glc を含む 10 mL A 培地にて、菌体を一晩培養し前培養とした。本培養には 2% (w/v) Glc を含む 10 mL A 培地に $\text{OD}_{600}=0.2$ になるよう植菌し、33°Cで好気培養を行った。全 RNA の回収には RNA protect Bacteria Reagent (QIAGEN) を 400 μL に、等量の培養液を加え懸濁した。5 分間室温で静置した後、遠心分離 (14,500 rpm、20°C、1 分) を行い、ペレットを -20°Cで保存した。

2) RNA 抽出

C. glutamicum からのトータル RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使い操作はマニュアルに従った。また、抽出後の各 RNA の濃度は NanoDrop One (Thermo Scientific) によって算出した。

3) qRT-PCR

定量 RT-PCR は、Applied Biosystems 7500 Fast real-time PCR system を使用した。実験時の反応系は下記のとおり。

qRT-PCR 反応組成

試薬	使用量
FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Diagnostics)	10 μL
100 μM Forward Primer	2 μL
100 μM Reverse Primer	2 μL
RNase inhibitor	0.1 μL
Reverse transcriptase	0.1 μL
10 ng μL^{-1} RNA sample	4 μL
RNase free water	up to 20 μL

16S rRNA の発現レベルを内在性コントロールとした。

反応サイクル

50°C 30分

↓

95°C 10分

↓

95°C 15秒→60°C 30秒×40サイクル

↓

95°C 15秒

↓

60°C 1分

↓

95°C 15秒

↓

60°C 15秒

2-4 リファンピシンチェイス法

培養及び菌体回収

2% (w/v) Glc を含む 10 mL A 培地にて、菌体を一晚培養した。本培養には 2% (w/v) Glc を含む 100 mL A 培地に OD₆₀₀=0.2 になるよう植菌した。培養 4 時間後のサンプルにリファンピシンを 200 µg/mL 添加し、0, 2, 4, 8, 16 min の間隔で菌体を回収し RNA protect Bacteria Reagent 溶液と懸濁した。5 分間室温で静置した後、遠心分離 (14,500 rpm、1 分、20°C) 行い、ペレットを -20°C で保存した。

2-5 RT-PCR (逆転写 PCR)

cDNA 合成

トータル RNA から cDNA 合成は Super ScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を使用して行った。

プライマーのアニーリング反応

試薬	使用量
Total RNA	5 µg
Random hexamers (50 ng/µL)	1 µL
dNTP Mix	1 µL
DEPC-treated water	up to 10 µL

65°Cで5分反応させた後、室温と氷上でそれぞれ5分間静置する。アニーリングサンプルに下記の逆転写反応液を10 µL添加した。

逆転写反応液

試薬	使用量
10×RT buffer	2 µL
MgCl ₂	4 µL
DTT	2 µL
RNaseOUT	1 µL
Super Script TM III RT	1 µL

穏やかに攪拌した後、25°Cで15分間の前保温、50°Cで50分間の逆転写反応、85°Cで5分間の酵素の不活化を順に行った。得られた溶液をRT-PCRにおけるcDNA sampleとして使用した。

2-6 β - ガラクトシダーゼ活性測定

1) β - ガラクトシダーゼ活性測定用試薬作製。

Z-Buffer stock solution

試薬	使用量
Na ₂ HPO ₄ (和光)	4.27 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O (和光)	3.11 g
KCl (和光特級)	0.375 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O (和光)	0.125 g
DDW	up to 500 mL

調製後、pHを測定し、pH6.9-7.1の間であることを確認した。フィルター滅菌後、4°Cで保存した。

Z-Buffer

試薬	使用量
Z-Buffer stock solution	50 mL
β -mercaptoethanol (和光)	0.14 mL

毎回使用時に調製した。

ONPG (4 mg/ml)

試薬	使用量
<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (thermo fisher)	20 mg
DDW	5 mL

毎回使用時に調製した。

2) 培養および菌体回収

2% Glc を含む 10 mL A 培地にて、菌体を一晚培養した。前培養液の OD₆₀₀ を測定し、新しい 2% Glc を含む 10 mL A 培地に OD₆₀₀=0.2 になるよう植菌した。培養 4 時間後 OD₆₀₀ を測定し培養液を回収した。その後、遠心分離 (14,500 rpm、1 分、20°C) を行い、ペレットを -20°C で保存した。

3) 透過細胞調整

Z-Buffer 150 mL でペレット化した菌体を再懸濁させ、懸濁液にトルエンを 5 μ L 添加し、30 秒間激しく混和させた。その後、37°C で 40 分間インキュベートした。

4) β -ガラクトシダーゼ活性測定

β -ガラクトシダーゼ活性測定は分光光度計 BECKMAN DO800 (BECKMAN COULTER) を使用し測定した。解析は DU800 Spectrophotometer (BECKMAN COULTER) を使用した。

2-7 RNase III 抗体作製

1) RNase III 高発現株の作製

タンパク質高発現用ベクターである pET15b に RNase III をコードする *rnc* 遺伝子をクローニングした。次に、タンパク質高発現用菌株である *E. coli* BL21 に RNase III 高発現ベクターを形質転換した。アンピシリンが添加された LB プレートからシングルコロニーを取り、LB 培地 10 mL (アンピシリンを含む) に植菌し、37°C、200 rpm で一晚振盪培養した。同時に *rnc* 遺伝子が入っていない空ベクターを持つ *E. coli* BL21 株も 37°C、200 rpm で一晚振盪培養をした。

2) タンパク質発現誘導

前培養液の OD₆₀₀ を測定し、LB 培地 10 mL (アンピシリンを含む) に OD₆₀₀ が 0.05 になるように植菌し、37°C、200 rpm で振盪培養し OD が 0.4~0.6 になるまで培養した。100 mM イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG、(TaKaRa)) を調整し、培養液に 100 μL 添加した。IPTG 添加後は 30°C (RNase III の過剰発現は mRNA の過剰切断を誘導し、生育に悪影響を及ぼす可能性があるため、少し低い温度で培養した。)、200 rpm で一晩振盪培養した。この時、コントロールとして IPTG を添加していない培養液も用意した。その後、50 mL チューブで菌液を全量回収し、遠心分離 (5,000×g、15 分、4°C) して上清を捨て、菌体を-80°C 保存した。

3) タンパク質発現量の確認

-80°C 保存したサンプルを STE Buffer 500 μL で再懸濁し、細胞破碎を行った。遠心分離 (14,500 rpm、1 分、4°C) し上清を 1.5 mL エッペンチューブに回収した。タンパク質濃度測定を行い、空ベクター、IPTG 非誘導、IPTG 誘導の三種類のタンパク質を 10 μg、1 μg に合わせた。サンプルを熱変性させ、電気泳動 (200V、30 分) した。泳動後、ゲルを取出しタッパーに移し、水で洗浄 (5 分、3 回) した。ゲルをクマシーブリリアントブルー (CBB、(BIO-RAD)) に浸し染色 (45 分) した。その後、水で洗浄 (5 分、2 回、30 分、1 回) し、LAS3000 で撮影した。IPTG を添加したサンプルで RNase III の分子量である 27 kDa 付近にバンドが濃く現れているのを確認した。

4) RNase III 抽出用本培養

RNase III の過剰発現が確認された菌株を用いて、LB 培地 10 mL (アンピシリンを含む) で前培養した。前培養の OD 測定後、LB 培地 500 mL (アンピシリンを含む) に OD₆₀₀ が 0.05 になるよう植菌し、37°C、180 rpm で振盪培養した。OD₆₀₀ が 0.4~0.6 になった時、100 mM IPTG を 5 mL 加えた。IPTG 添加後は 30°C、180 rpm で一晩振盪培養した。培養液を遠心チューブに移し、遠心分離 (5,000×g、10 分、4°C) した。上清を捨て、STE Buffer 10 mL で再懸濁し、50 mL チューブに移した。その後、遠心分離 (5,000×g、10 分、4°C) し上清を捨て、サンプルを-80°C 保存した。

5) RNase III 精製

-80°C 保存したサンプルに STE Buffer 10 mL 加え再懸濁し、細胞破碎をした。遠心分離 (14,500 rpm、3 分、4°C) し上清を 15 mL チューブに移した。もう一度、遠心分離 (13,000 rpm、10 分、4°C) し上清を 15 mL チューブに移した。Ni-NTA Agarose (QIAGEN) を 500 μL、1.5 mL エッペンチューブに移した。遠心分離 (6,000 rpm、1 分) し上清を捨てた。STE Buffer 1 mL 加えピペッティングでよく懸濁させ、遠心分離 (6,000 rpm、1 分) し上清を捨て Ni-NTA を洗浄した。この洗浄操作をもう一度繰り返す。

返した。洗浄した Ni-NTA にタンパク質溶液 1 mL 加え、ペッピングでよく懸濁させ 20 分転倒混和した。遠心分離 (6,000 rpm、1 分、4°C) し上清を捨て、もう一度タンパク質溶液を 1 mL 加え、ピペッピングで懸濁させ 20 分転倒混和させた。この操作をタンパク質溶液が無くなるまで繰り返した。以降、Ni-NTA Fast Start Kit (6) (QIAGEN) を用いて精製した。遠心分離 (6,000 rpm、1 分、4°C) し上清を捨てた。Denaturing Wash Buffer を 600 μ L 加え、ピペッピングでよく懸濁させ、遠心分離 (6,000 rpm、1 分、4°C) し上清を捨てた。この操作を 3 回繰り返した。Denaturing Elution Buffer を 200 μ L 加え、ピペッピングでよく懸濁させ 5 分静置し、遠心分離 (6,000 rpm、1 分、4°C) して上清を 1.5 mL エッペンチューブに回収した。この操作をもう一度繰り返した。

6) 高分子の回収

Amicon Ultra 10 KDa 15 mL (Millipore) にサンプル 400 μ L と STE Buffer 4 mL 加え、遠心分離 (7,000 \times g、10 分) し Buffer 交換した。ろ液を捨てもう一度同じ操作をした。カラム内に残った溶液を 1.5 mL チューブに回収し、-20°C 保存した。

7) RNase III 回収の確認

10 mg/mL ウシ血清アルブミン (BSA) (Wako) 溶液を作製し、標準液とした。標準液の濃度は 1 mg/mL、0.5 mg/mL、0.2 mg/mL、0.1 mg/mL の 4 通り作製した。標準液とサンプルを Sample Buffer と混ぜ、熱変性させ、電気泳動 (200V、30 分) した。その後、CBB 染色し、ゲルを撮影した。

8) RNase III の精製

RNase III ポリクローナル抗体の作製を発注するために RNase III タンパク質を大量に生産した。LB 培地 3 L (アンピシリンを含む) 培地で OD₆₀₀ を 0.05 に合わせ、37°C、180 rpm で本培養した。OD₆₀₀ が 0.4~0.6 になったタイミングで 100 mM IPTG を 30 mL 添加した。IPTG 添加後 30°C、180 rpm で一晩培養し上記と同様に精製した。タンパク質濃度を 1 mg 以上回収できたことを確認し、コスモ・バイオ社に RNase III ポリクローナル抗体の作製を依頼した。

2-8 ウェスタンブロッティング法

1) ウェスタンブロッティング用試薬作製

STE Buffer

試薬	使用量
NaCl (和光)	0.588 g
1 M Tris-HCl (pH8.0) (Invitrogen)	1 mL
0.5 M EDTA (Invitrogen)	0.2 mL
DDW	up to 100 mL

Laemmli Sample Buffer

試薬	使用量
Tris HCl pH6.8(Invitrogen)	0.378 g
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (和光)	1 g
Glycerol (和光)	5 mL
Bromophenol Blue (BPB) (和光)	1 mg
DDW	up to 10 mL

使用時は β -mercaptoethanol (和光) を 5%になるよう添加した。

10×共用 Buffer

試薬	使用量
Tris Base (和光)	30.3 g
Glycine (和光)	144.2 g
SDS (和光)	1 g
DDW	up to 1000 mL

泳動 Buffer

試薬	使用量
10×共用 Buffer	30 mL
10% SDS	3 mL
DDW	up to 300 mL

転写 Buffer

試薬	使用量
10×共用 Buffer	50 mL
Methanol (和光)	10 mL
DDW	up to 100 mL

10×PBS Buffer

試薬	使用量
NaCl (和光)	80 g
KCl (和光)	2 g
Na ₂ HPO ₄ (和光)	14.4 g
NaH ₂ PO ₄ (和光)	2.4 g
DDW	1000 mL

TBS Buffer

試薬	使用量
10×PBS Buffer	100 mL
Tween 20 (Sigma)	1 mL
DDW	up to 1000 mL

一次抗体液

試薬	使用量
Blocking One (Nacalai)	1 mL
TBS	9 mL
一次抗体	1 μL

一次抗体は条件に合わせ 1~5 μL 添加する量を適宜変えた。

二次抗体液

試薬	使用量
Blocking One (Nacalai)	1 mL
TBS	9 mL
二次抗体	1 μL

二次抗体は条件に合わせ 1~5 μL 添加する量を適宜変えた。

2) 培養および菌体回収

2% Glc を含む 10 mL A 培地にて、菌体を一晚培養した。前培養液の OD₆₀₀ を測定し、新しい 2% Glc を含む 10 mL A 培地に OD₆₀₀=0.2 になるよう植菌した。培養 4 時間後 OD₆₀₀ を測定し培養液を回収した。その後、遠心分離 (14,500 rpm、1 分、4°C) を行い、ペレットを -20°C で保存した。

3) タンパク質抽出

ペレット化した菌体に STE Buffer を 350 μL 加え再懸濁。2 mL スクリューキャップマイクロチューブ (ザルスタット) に 0.1 mm dia Zirconia / silica (Bio Spec) を加えサンプルを移した。その後、サンプルを氷冷し、MULTI-BEADS SHOCKER (YASUI KIKAI) で細胞破碎した。細胞破碎後、遠心分離 (14,500 rpm、1 分、4°C) を 2 回を行い、タンパク質を精製し -20°C で保存した。

細胞破碎条件

Speed Meter	2,500 rpm
On Time	30 sec
Off Time	30 sec
Cycle	30 Times
Temperature	4°C

3) タンパク質濃度測定

精製したタンパク質 2 μl に DDW を 18 μL 加え 10 倍希釈した。その後、5 倍希釈した Dye reagent (Bio-Rad) を 1 mL 加え、転倒混和し 5 分静置し、吸光度 595 nm 測定を行った。得られた数値を下記の数式を用いてタンパク質濃度を算出した。

タンパク質濃度 (mg/mL) = OD_{595 nm} × 0.14 × タンパク質溶液の希釈倍率

4) タンパク質調整

PCR チューブにタンパク質の量が 20 μg になるようにサンプルを移し、milliQ 水で 20 μL に調整した。タンパク質量を調整したサンプルに、Laemmli Sample Buffer (5% β-mercaptoethanol) を 5 μL ずつ分注した。その後、サーマルサイクラーを用いて下記の条件でタンパク質を変性させた。

変性条件

100°C 10分

↓

4°C

5) 電気泳動

電気泳動ゲルは Mini PROTEN TGX Gels (BIO-RAD) を使用し、泳動 Buffer を調整した。サンプルを 10 μ L ずつ加え、電気泳動 (200V、30分) した。

6) 転写

タッパーに Immobilon-P Transfer Membranes (Merck Millipore) とメタノールを加え振盪した。転写 Buffer を調整し、タンパーにゲル、メンブレン、Extra thick blot paper Filter paper (BIO-RAD) を加え転写 Buffer で振盪した。その後、TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD) を用いて転写 (150 mA、1時間) した。タッパーにメンブレンを移し、Blocking One を加え、30分~1時間振盪しブロッキングした。

7) 一次抗体反応

15 mL チューブに一次抗体液を作製し、転倒混和した。ハイブリ・バック (コスモ・バイオ) を適当なサイズに切り取り、メンブレンを一次抗体でパックした。その後、4°Cで一晩振盪させた。メンブレンをパックから取り出し、TBS Buffer で洗淨 (10分、3回) した。

8) 二次抗体反応

15 mL チューブに二次抗体液を作製し、転倒混和した。ハイブリ・バックを適当なサイズに切り取り、メンブレンを二次抗体液でパックした。その後、常温で1時間振盪させた。メンブレンをパックから取り出し、TBS Buffer で洗淨 (10分、2回、15分、1回) した。

9) 検出

2 mL チューブに Chemi-Lumi-One L (nacalai) の Solution A : 1 mL と Solution B : 1 mL 加え転倒混和した。メンブレンを OHP シート (オーバーヘッドプロジェクターシート) の上に置き、Solution 混合液を加え空気が入らないよう OHP シートを被せた。撮影は LAS3000 (富士フイルム) を使用した。

2-9 顕微鏡観察

顕微鏡観察は、100倍微分干渉コンストラクト対物レンズと適切なフィルターセット (Chroma Technology) 及び photometric cool snap HQ カメラ (Nikon) を備えた Olympus AX70 顕微鏡を使用した。画像は metamorph5.0 (Universal Imaging) および Adobe Photoshop8.0 で処理した。*C. glutamicum* の菌体を終濃度 2% の Glc が添加された A 培地で、33°C、200 rpm で一晩振盪培養した。その後、A 培地で菌体を 50 倍希釈し観察した。

2-10 5' RACE 法

1) 培養及び菌体回収

2% (w/v) Glc を含む 10 mL A 培地にて、菌体を一晩培養した。本培養には 2% (w/v) Glc を含む 10 mL A 培地に OD₆₀₀=0.2 になるよう植菌し、33°C で好気培養を行った。全 RNA の回収には RNA protect Bacteria Reagent (QIAGEN) を 400 µL に、等量の培養液を加え懸濁した。5 分間室温で静置した後、遠心分離 (14,500 rpm、20°C、1 分) 行い、ペレットを -20°C で保存した。

2) RNA 抽出

C. glutamicum からトータル RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使い操作はマニュアルに従った。また、抽出後の各 RNA の濃度は NanoDrop One (Thermo Scientific) によって算出した。

3) cDNA 合成

トータル RNA から cDNA 合成は Super ScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を使用して行った。

プライマーのアニーリング反応

試薬	使用量
Total RNA	5 µg
Random hexamers (50 ng/µL)	1 µL
dNTP Mix	1 µL
DEPC-treated water	up to 10 µL

65°C で 5 分反応させた後、室温と氷上でそれぞれ 5 分間静置する。アニーリングサンプルに下記の逆転写反応液を 10 µL 添加した。

逆転写反応液

試薬	使用量
10×RT buffer	2 μL
MgCl ₂	4 μL
DTT	2 μL
RNaseOUT	1 μL
Super Script™ III RT	1 μL

穏やかに攪拌した後、25°Cで15分間の前保温、50°Cで50分間の逆転写反応、85°Cで5分間の酵素の不活化を順に行った。

4) cDNA 精製

精製は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使って行った。プロトコールはマニュアルを参照した。

5) 5' RACE PCR

5' RACE PCR は SMARTer® RACE 5'/3' Kit (Takara) を使って行った。

Master Mix

試薬	使用量
PCR Grand H ₂ O	15.5 μL
2× SeqAmp Buffer	25 μL
SeqAmp DNA polymerase	1 μL
Total Volume	41.5 μL

5' RACE PCR Reactions

試薬	使用量
cDNA	2.5 μL
10× UPM	5 μL
Primer	1 μL
Master Mix	41.5 μL
Total Volume	50 μL

ネガティブコントロール用には、10× UPM と Primer の代わりに H₂O を使用した。

PCR 条件

94°C 30 秒→72°C 3 分×5 サイクル

↓

94°C 30 秒→70°C 30 分→72°C 3 分×5 サイクル

↓

94°C 30 秒→68°C 30 秒→72°C 3 分×20 サイクル

↓

4°C

PCR 後にアガロース電気泳動を行い、DNA 断片の増幅を確認した。DNA 断片の増幅が確認されなかった時、cDNA の代わりに H₂O で 50 倍希釈した PCR 産物を用いてもう一度 5' RACE PCR を行った。

6) DNA の精製

精製は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使って行った。

7) ライゲーション

5' RACE 解析のクローニングには pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) を使用した。

ライゲーション反応

試薬	使用量
2× Rapid Ligation Buffer	5 μL
pGEM®-Teasy Vector	1 μL
PCR product	3 μL
T4 DNA Ligase	1 μL
Total Volume	10 μL

16°C で一晩静置した。

8) *E.coli* の形質転換

氷上でコンピテントセルを溶解させ、プラスミド DNA を 10 μL 加え氷上で 30 分静置した。次に、42°C で 1 分熱処理し、氷上で 1 分間冷却した。その後、LB 培地を 1 mL 加え 37°C で 1 時間半培養した。培養後、遠心分離 (14,500 rpm、1 分) を行い、上清 900 μL 捨てた。アンピシリンが添加された LB プレート (LA プレート) に X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside) 溶液 (20 mg/mL) を 50 μL、IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 溶液 (100 mM) を 25 μL 塗布した。プレートを乾燥させた後、菌液 100 μL 塗布し、37°C で一晩培養した。

8) プラスミド抽出

プラスミド自動分離装置 PI-200 (クラボウ) 用の 8 連チューブに LB 培地 2.5 mL 加えアンピシリン (5 mg/mL) を 25 μ L 添加した。LA プレート上の白色のコロニーを植菌し 37°C、185 rpm で一晩培養した。翌日、プラスミド自動分離装置 PI-200 (クラボウ) を使用しプラスミド抽出を行った。

9) シーケンス解析

DNA シーケンス用配列は Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて PCR で増幅させた。DNA はプロトコールに従って適切な濃度に希釈した。PCR 産物は Big Dye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystems) を用いてプロトコールに従い精製し、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で解析した。シーケンスデータは Genetyx program (Genetyx Corporation) で分析した。シーケンスで解析した総数の内 10%以上の存在が確認された末端をランダムな末端ではなく特異的な 5'末端とみなした。

反応組成

試薬	使用量
Sample DNA	3 μ L
5×Sequence Buffer	2 μ L
1 μ M Primer	2 μ L
Big Dye X terminator v3.1	0.4 μ L
DDW	up to 10 μ L

反応サイクル

96°C 1分

↓

96 10秒→50°C 5秒→60°C 4分×35サイクル

↓

4°C

2-11 本研究で使用したプライマー

Table. 2-1 使用したプライマー

Primer name	Sequence	Use
cgR_1956 F	CTCGAGTCACCCCGACAAA	qRT-PCR, RT-PCR
cgR_1956 R	TTGCGCATCCAAAATGCA	qRT-PCR, RT-PCR
cgR_1957 F	TGCACCTGCTGCTTTTGCT	qRT-PCR, RT-PCR
cgR_1957 R	TGCGGTGCGGAAAACC	qRT-PCR, RT-PCR
cgR_1958 F	ACGCACCTTCGGTTATTGGT	qRT-PCR, RT-PCR
cgR_1958 R	CGCGTTCGGGTACTCCAT	qRT-PCR, RT-PCR
cgR_1959 F	CGCCAGCACGGTTTTGA	qRT-PCR, RT-PCR
cgR_1959 R	GGCAAACAGGCGCAAAAT	qRT-PCR, RT-PCR
cgR_1960 F	GCGAACTCACCCCAACCA	qRT-PCR, RT-PCR
cgR_1960 R	GGATCGGCAGCAAAAACCT	qRT-PCR, RT-PCR
cgR_1961 F	GCGCCCAGGCTGAATCT	qRT-PCR, RT-PCR
cgR_1961 R	CGGCGATACGCATCATTG	qRT-PCR, RT-PCR
rRNA-F	TCGATGCAACGCGAAGAAC	qRT-PCR
rRNA-R	GAACCGACCACAAGGGAAAAC	qRT-PCR
cgR_1799 mj F	GACAATCGGGATGTTGCGC	qRT-PCR
cgR_1799 mj F-2	CGTCGACGGTGTACCA	qRT-PCR
cgR_1799 mj R	ATCCACGACGTCCACGAC	qRT-PCR
cgR_1799 mj R-2	CTGAACGGTTGGGCGCTC	qRT-PCR
mraZ-F	AGACCACAGTCTCGCGGTTT	qRT-PCR
mraZ-R	CCTTGCGAGCCCTTGCT	qRT-PCR
cgR_2248 meG F	ACGATCACCCAGGTCTGG	qRT-PCR
cgR_2248 meG F-2	GAAGCGCTGTCCCAGAAAG	qRT-PCR
cgR_2248 meG R	GCAGCTTCCATGCTTGGA	qRT-PCR
cgR_2248 meG R-2	GTTGCCACCACCCTTGC	qRT-PCR
Nde 1 rnc-F	GGGCATATGGTGAGCAGGAAAAAGAATCG	RNase III 高発現株
Nde 1 rnc-R2	GGGCATATGTCAGGCACGGGACTCC	RNase III 高発現株
Δ rnc-D66A_Fw	AGTTCCTCGGCGCCGCGTC	RNase III 機能欠損株
Δ rnc-D66A_Rv	CCCAAGACGGCGGCGCCGAG	RNase III 機能欠損株
Δ rnc-E138A_Fw	CGGACACCACAGCGGCGTTG	RNase III 機能欠損株
Δ rnc-E138A_Rv	CCCAACAACGCCGCTGTGGT	RNase III 機能欠損株
LKS2-4 mcs_F	TAAGTTGGGTAACGCCAGGG	シーケンス解析
LKS2-4 mcs_R	ACTCATTAGGCACCCAGGC	シーケンス解析
5 RACE-rnc_Rv1	TCAGGCACGGGACTCCCAGGCTTT	5'RACE 解析

5 RACE-rnc_Rv2	CCTGCTCGGCCAGCTTCTTGTTTCGG	5'RACE 解析
5 RACE-rnc_Rv3	CTACTGCATCGAATGCTTCATTGA	5'RACE 解析
5 RACE-rnc_Rv4	ACTGCGACCTTCGGTGAGCAATTC	5'RACE 解析
5 RACE-rnc_Rv5	GAGTGCATCTACCCCGGTGAGGCG	5'RACE 解析
5 RACE-rnc_Rv6	GGAATCCTTACTGCGACCTTCGGTG	5'RACE 解析

2-12 本研究で使用した菌株

Table. 2-2 使用した菌株

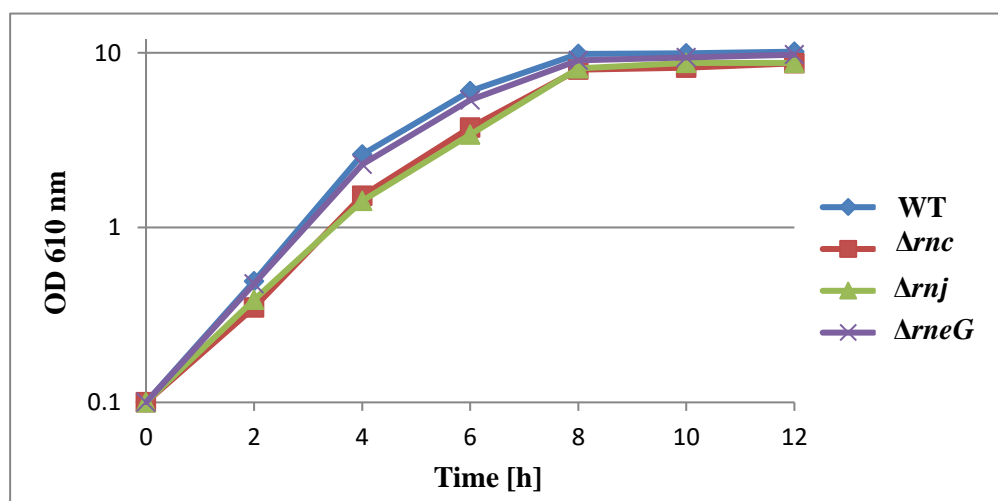
Strain	Genotype of Description	Reference or Source
<i>E. coli</i>		
	F' [<i>traD36</i> , <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>]/Δ (<i>lac</i> – <i>proAB</i>)	
HST02	<i>recA</i> , <i>endA</i> , <i>gyr96</i> , <i>thi</i> , <i>e14</i> ⁻ (<i>mcrA</i> ⁻), <i>supE44</i> , <i>relA</i> , Δ <i>deoR</i> , Δ(<i>mrr</i> - <i>hasRMS</i> - <i>mcrBC</i>) 遺伝子クローニング用	TaKaRa
SCS110	<i>tsx</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>supE44</i> Δ (<i>lac</i> - <i>proAB</i>) [F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^{qZ} Δ <i>M15</i>] プラスミドの脱メチル化	TaKaRa
BL21	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (<i>rB</i> ⁻ <i>mB</i> ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> タンパク質発現用	TaKaRa
<i>C. glutamicum</i>		
R	wild type strain JCM18229	(60)
Δ <i>rnc</i>	wild type strain as R but Δ <i>rnc</i>	(61)
Δ <i>rneG</i>	wild type strain as R but Δ <i>rneG</i>	(61)
Δ <i>rnj</i>	wild type strain as R but Δ <i>rnj</i>	This laboratory
<i>rnc</i> D66A	wild type strain as R but <i>rnc</i> D66A	This study
<i>rnc</i> E138A	wild type strain as R but <i>rnc</i> E138A	This study
Plasmids		
pCRA725	Km ^r ; suicide vector containing the <i>Bacillus subtilis</i> <i>sacB</i> gene	(62)
pCRC101	For insertion of promoter- <i>lacZ</i> translational fusion cassette to PAZ8-6, derived from pCRA725	(63)
pPitL-1960	pCRB101 with <i>cgR_1960</i>	This laboratory
LKS2-4	<i>P_{tac}</i> promoter, Km, <i>sacB</i> , <i>sacR</i> , マーカーレス破壊用	This laboratory
Lgap10	<i>P_{gapA}</i> promoter, Km, 遺伝子過剰発現用	This laboratory
pGEM®-T	<i>lac</i> promoter, Amp, 5'RACE 解析・TA クローニング用	Promega

第3章 結果

本研究では、RNA分解における主要なRNaseの一つであるRNase IIIについての発現制御機構を解明する目的で以下の項目を検討した。一つ目の項目は、RNase IIIの発現が細菌のmRNA分解で主要な役割を果たしているRNase JまたはRNase E/Gによって制御されるか検討した。次に、RNase IIIがRNase E/GやRNase Jを制御しているか調べ、相互制御が存在するのかが検討した。最後に、多くのRNaseで自己制御機構の存在が知られており、大腸菌などでもRNase IIIの自己制御が報告されていることから、コリネ型細菌においても自己発現制御が存在するかが検討を行った。

3-1 RNase 遺伝子破壊による増殖速度への影響

コリネ型細菌ではRNase IIIをコードする*rnc*遺伝子が破壊可能であることが示されているが(11)、RNase IIIが細胞分裂やrRNAの成熟に関わることから増殖に影響が出る可能性がある。そこで、*rnc*遺伝子破壊株の菌体増殖を検討した。同時に主要なRNaseであるRNase JやRNase E/Gの遺伝子破壊の影響も検討した。培養は、2%グルコース(Glc)を含む100 mL A培地にOD = 0.1になるよう植菌し、33°Cの好気的条件下で行い、2時間ごとにOD_{610 nm}を測定した。その結果、*rnc*遺伝子破壊により生育速度の減少が観察され、これは Δrnj 株と同程度であった(図. 3-1)。*rneG*破壊株では*rnj*や*rnc*破壊程度の増殖への影響は観察されなかった。



WT : 野生株、 Δrnc : RNase III 破壊株、 Δrnj : RNase J 破壊株、 $\Delta rneG$: RNase E/G 破壊株

図. 3-1 RNase 破壊による増殖への影響

WT、 Δrnc 、 Δrnj 、 $\Delta rneG$ 、の増殖曲線を示した。3回同条件で解析を行い、その平均値を示した。

3-2 Growth phase による RNase III の発現量の変化

大腸菌では RNase III は静止期でタンパク質レベルでの発現量が減少するという報告がなされている (48)。そこで、コリネ型細菌の RNase III も経時的に発現量に変化するのかを解析した。培養は、2% Glc を含む 100 mL A 培地に OD=0.1 になるよう植菌し、サンプルを 2 時間ごとに回収した。回収した RNA を用いて qRT-PCR により各時間における RNase III の発現量の変化を観測した。その結果、RNase III の発現量は、培養 2 時間の対数増殖初期と比較して培養 10-12 時間の定常期には 40% 程度 mRNA 発現量が減少し、コリネ型細菌でも大腸菌と同程度の減少が見られる結果となった (図. 3-2-1)。この結果から、大腸菌と同様にコリネ型細菌でも RNase III の発現が厳密に制御されている可能性が示された。次に、タンパク質レベルでも RNase III の蓄積量が減少するのを確認するため、ウエスタンブロット解析を行った (図. 3-2-2)。その結果、4 時間目よりも 12 時間目の方がタンパク質としての蓄積量は増加していることが判明した。このことから、大腸菌と異なりコリネ型細菌では静止期においても RNase III タンパク質は安定的に存在していることが判明した。

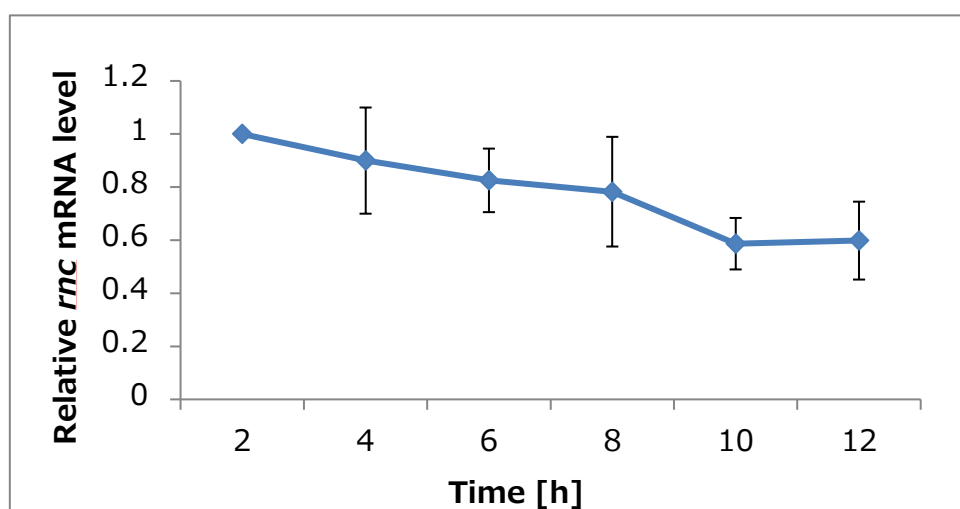


図. 3-2-1 Growth phase による RNase III の発現量の変化

培養 2 時間ごとの *rnc* mRNA の発現量 (培養 2 時間に対する比) を示した。同様の試験を 3 回行い、標準誤差をエラーバーで示した。

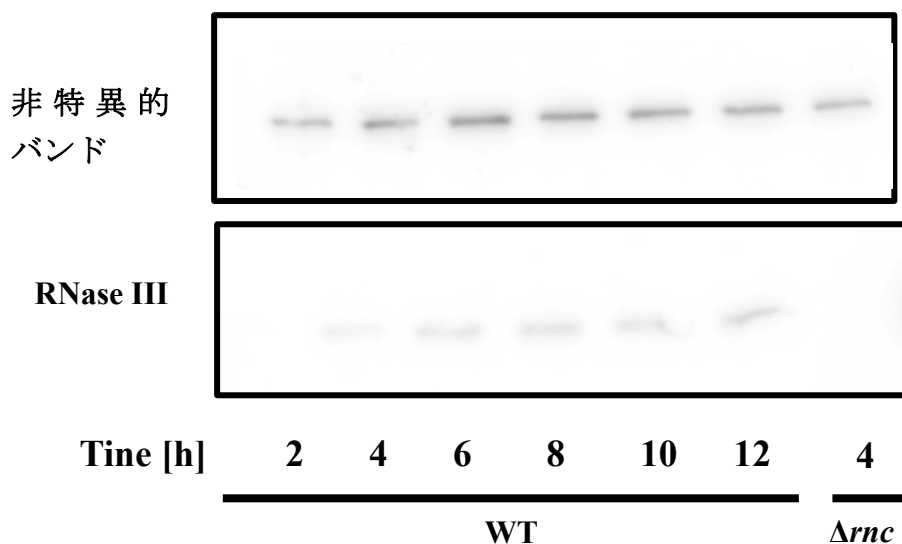


図. 3-2-2 RNase III 抗体を用いたウエスタンブロット解析

野生株および *rnc* 遺伝子破壊株における RNase III タンパク質の発現量を示した。増殖試験と同様に培養初期 OD_{610} は 0.2 に合わせた。各サンプルのタンパク質の量は 10 mg に合わせた。タンパク質の量が等しいことを表すため非特異的バンドをコントロールとして用いた。

3-3 RNase E/G や RNase J による RNase III の発現制御

3-3-1 RNase E/G および RNase J の遺伝子破壊が *rnc* mRNA の発現量に及ぼす影響

RNase の発現は、自身や他の RNase により mRNA の分解段階で制御されることが知られている (40)。我々の研究室では RNase E/G と RNase J が互いに発現を制御することを見出した。しかしながら、RNase III についての制御はまだ判明していない。そこで、細菌における主要な RNA 分解酵素である RNase E/G や RNase J の遺伝子破壊が RNase III の発現量にどのような影響を及ぼすのか、*rnc* mRNA 発現量を qRT-PCR により解析した。

培養は、2% Glc を含む 10 mL A 培地に $OD_{610} = 0.2$ になるよう植菌し、培養 4 時間後の対数期の初期段階で RNA を回収した。解析の結果、野生株と比較して *rnc* mRNA の発現量が $\Delta rneG$ 株では約 1.8 倍の増加、 Δrnj 株では約 4.3 倍の増加が観測さ

れた。(図. 3-3-1) このことからそれぞれの RNase により *rnc* mRNA 発現が制御されている可能性が考えられた。

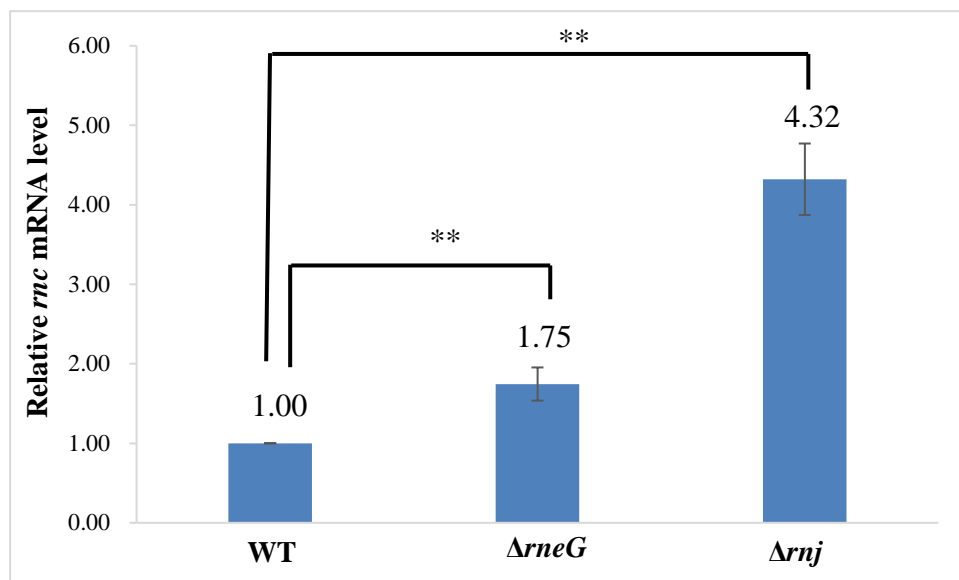


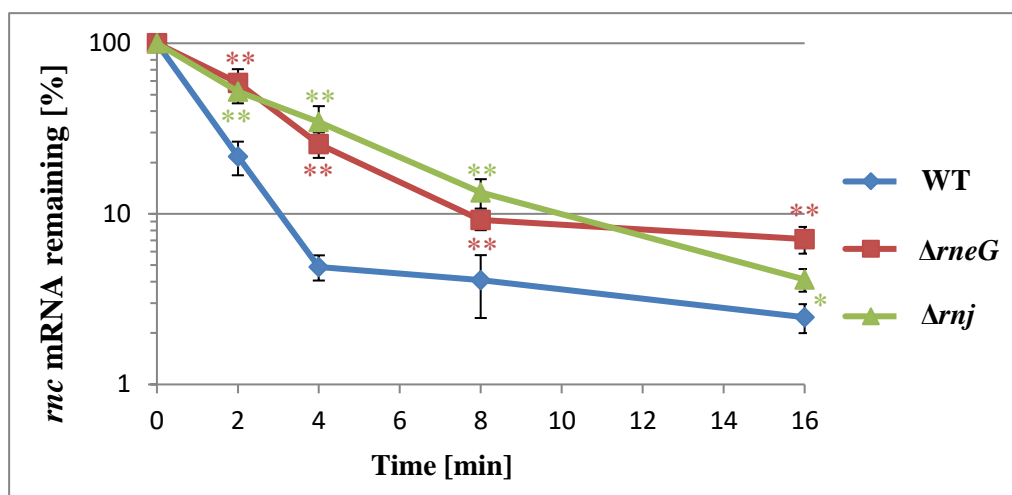
図. 3-3-1 RNase 破壊による *rnc* mRNA 発現量の増加

WT、 $\Delta rneG$ 株および Δrnj 株の *rnc* mRNA の発現量を示した。同様の試験を 4 回行い、標準誤差をエラーバーで示した。統計解析での有意性は t 検定を用いた。

** $p < 0.05$

3-3-2 RNase E/G および RNase J の遺伝子破壊株が *rnc* mRNA の安定性に及ぼす影響

RNase 破壊による *rnc* mRNA の発現量増加が、RNase による分解が影響しているのか WT : 野生株、 Δrnj : RNase J 破壊株、 $\Delta rneG$: RNase E/G 破壊株 RNA の安定性を解析した。リファンピシンは新規 RNA 合成を阻害する抗生物質であり、これを使用することにより細胞内に残存する RNA を解析することが可能となる。培養は、2% Glc を含む 100 mL A 培地に $OD_{610} = 0.2$ になるよう植菌しておこない、培養 4 時間後の対数期の初期段階にリファンピシンを添加し、0 分から 16 分まで経時的に菌体を回収した。その後、RNA を精製し、qRT-PCR 解析した。その結果、*rnc* mRNA の半減期が野生株の約 0.56 ± 0.09 分に対し、 $\Delta rneG$ 株は約 2.08 ± 0.28 分、 Δrnj 株では 2.42 ± 0.41 分と増加し、安定性が増加していた (図. 3-3-2)。この結果から、RNase E/G や RNase J が *rnc* mRNA の分解に関与していることが示された。



WT : 野生株、 Δrnj : RNase J 破壊株、 $\Delta rneG$: RNase E/G 破壊株

図. 3-3-2 RNase 破壊による *rnc* mRNA 安定性の向上

青線は WT、赤線は $\Delta rneG$ 株、緑線は Δrnj 株の細胞内 *rnc* mRNA の残存率を示す。同様の試験を 5 回行い、標準誤差をエラーバーで示した。統計解析で有意性は t 検定を用いた。WT に対して $\Delta rneG$ 株を比較したものを赤色 (*)、WT に対して Δrnj 株を比較したものを緑色 (*) で示した。* $p < 0.1$, ** $p < 0.05$

3-3-3 RNase 遺伝子破壊株における RNase III タンパク質の発現量

3-3-3-1 RNase III 抗体作製用 RNase III 高発現株の構築

mRNA で観察された RNase 遺伝子破壊の効果がタンパク質レベルでも見られるのか解析を行った。まず、RNase III タンパク質の発現量を解析するため RNase III 抗体を作製した。初めに、RNase III 高生産株を構築するため、IPTG 誘導プロモーターを持つタンパク質高発現用ベクター pET15b に、RNase III をコードする遺伝子 *rnc* をクローニングした。次に、このベクターをプロテアーゼ遺伝子が欠損した大腸菌である *E. coli* BL21 株に形質転換した。RNase III タンパク質の高発現が出来ているのかを確かめるため、LB 培地 10 mL (アンピシリンを含む) に、*rnc* 遺伝子が挿入されていない空ベクターを持つ *E. coli* BL21 pET15b と、IPTG の非添加条件で培養した *E. coli* BL21 pET15b *rnc*、IPTG の添加条件で培養した *E. coli* BL21 pET15b *rnc* のタンパク質を抽出し、SDS-PAGE を行い、CBB 染色によるタンパク質発現量比較を行った。

その結果、IPTG の添加条件で培養した *E. coli* BL21 pET15b *rnc* 株で、RNase III タンパク質の質量 27 KDa 付近にタンパク質が高発現しているのが確認された (図. 3-3-3-1)。

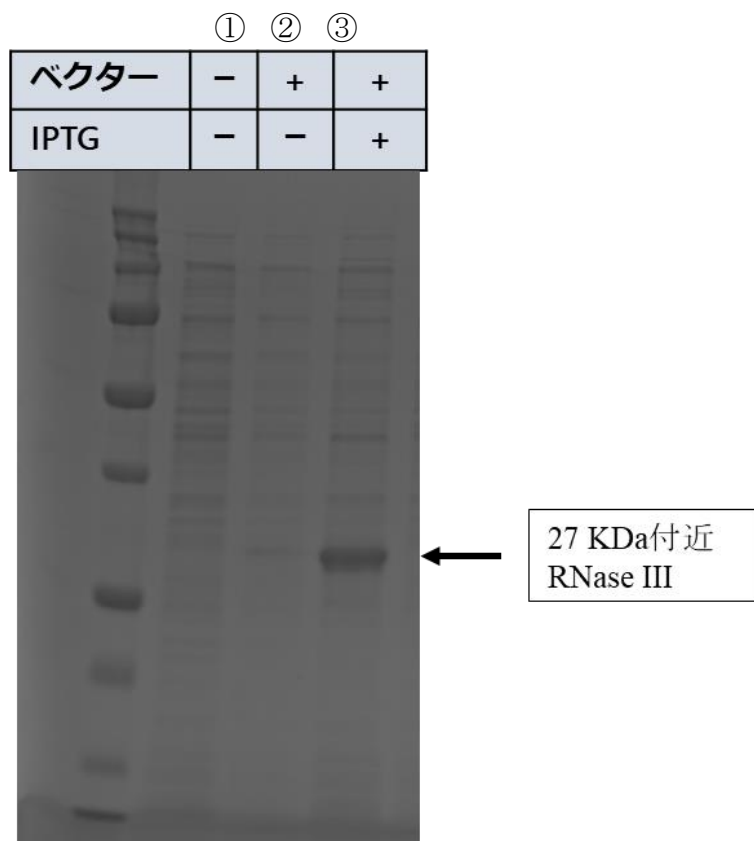


図. 3-3-3-1 RNase III 発現誘導の確認

分子量マーカにはプレシジョン Plus プロテインブルースタANDARD (BIO-RAD) を使用した。左のレーンから、①RNase III 非発現誘導株で IPTG 非添加培養、②RNase III 発現誘導株で IPTG 非添加培養、③RNase III 発現誘導株で IPTG 添加培養。

3-3-3-2 RNase III の精製

次に、RNase III を高濃度で精製するため、*E.coli* BL21 pET15b *rnc* を LB 培地 3 L (アンピシリンを含む) で培養した。IPTG を培地に添加しタンパク質発現を誘導させ、タンパク質を抽出した。Ni-NTA Agarose で RNase III を精製し、Amicon Ultra 10 KDa 15 mL を用いて Buffer 交換と濃縮を行った。その後、SDS-PAGE、CBB 染色によるタンパク質の検出を行った (図. 3-3-3-2)。

その結果、約 12 mg の RNase III を回収することが出来た。抗体作製はコスモ・バイオ社に委託した。

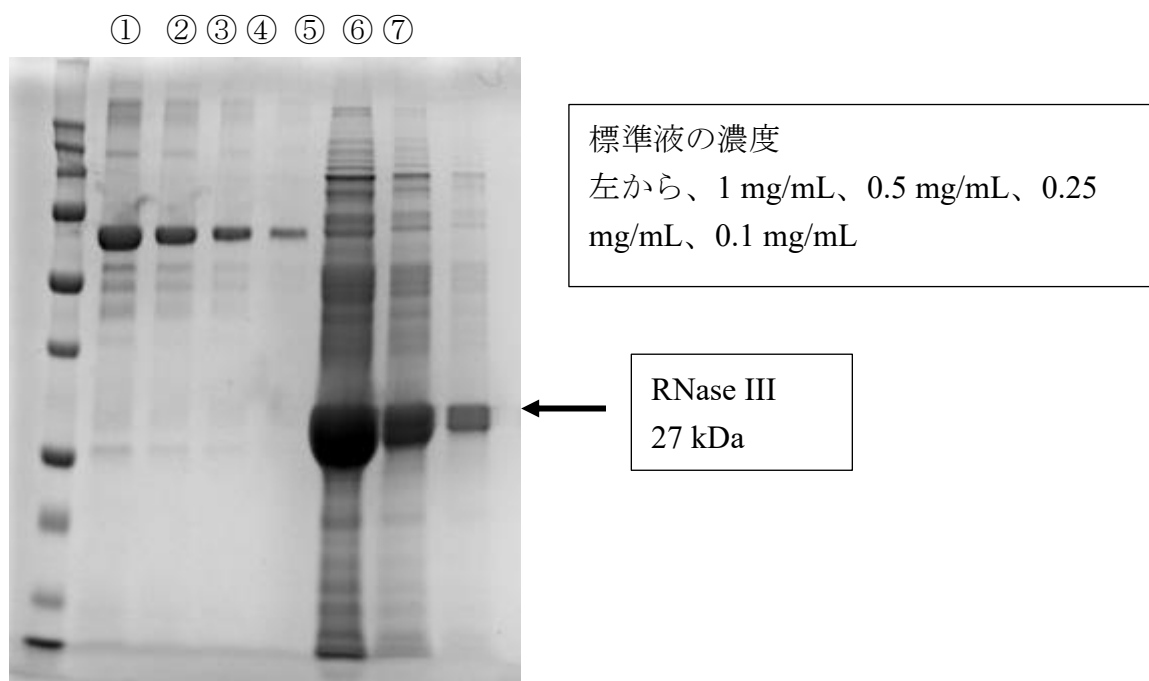


図. 3-3-3-2 RNase III タンパク質の精製量

分子量マーカにはプレシジョン Plus プロテインブースタンド (BIO-RAD) を使用した。①～④は標準液 (① : 1 mg/mL、② : 0.5 mg/mL、③ : 0.25 mg/mL、④ : 0.1 mg/mL)。⑤～⑦は精製した RNase III タンパク質溶液 (⑤ : 原液、⑥ : 5 倍希釈液、⑦ : 10 倍希釈液)。

3-3-3-3 RNase 破壊が RNase III タンパク質発現量に及ぼす影響

$\Delta rneG$ 株や Δrnj 株による *rnc* mRNA の発現量や安定性増加がタンパク質発現量にも影響しているのかどうかを解析するため、RNase III ポリクローナル抗体を用いて、ウエスタン・ブロット解析を行った。野生株、 $\Delta rneG$ 株、 Δrnj 株、ネガティブコントロールとして Δrnc 株を用いて、培養条件は、2% Glc を含む A 培地 10 mL に OD=0.2 になるよう植菌し、培養4時間後の対数期の初期段階で菌体を回収した。タンパク質抽出を行った。タンパク質量は各サンプル 10 mg に合わせた。

解析した結果、野生株と比較して $\Delta rneG$ 株や Δrnj 株で RNase III タンパク質の増加が確認された (図. 3-2-3-3)。このことから、mRNA の発現量増加がタンパク質レベルでの発現量増加に寄与することが判明した。

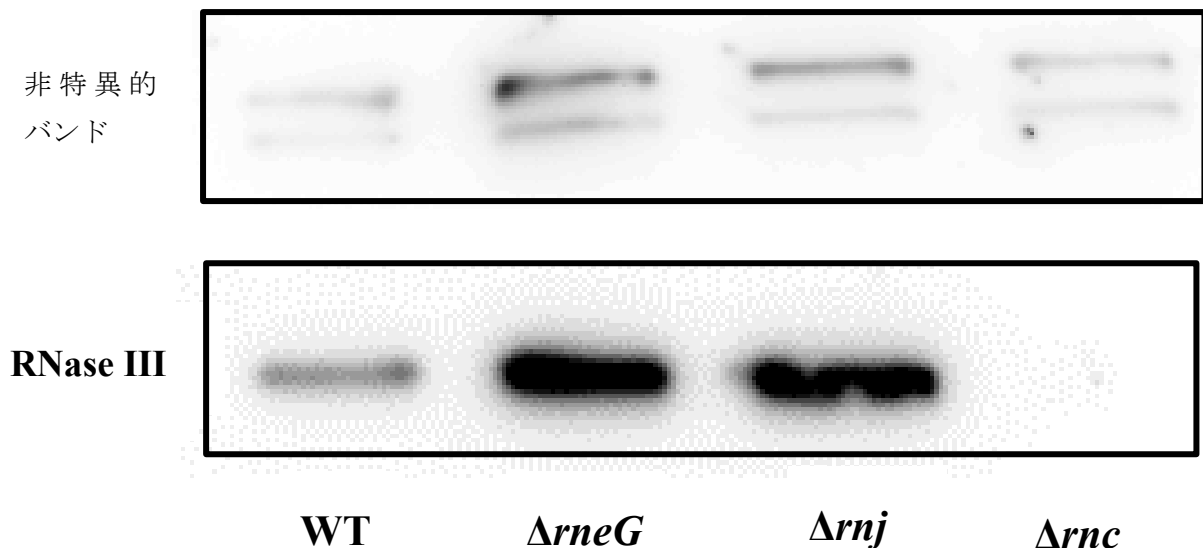


図. 3-3-3-3 RNase破壊によるRNase IIIタンパク質の発現量の増加
 一次抗体はRNase III抗体（コスモ・バイオ）、二次抗体はECL™ Anti mouse IgG（GE Healthcare）を使用した。発色はChemi-Lumi-One L（nacalai）を使用し、撮影はLAS3000（富士フイルム）を使用した。各サンプルのタンパク質が等しい量であることを示すため非特異的バンドをコントロールとして用いた。

3-3-4 RNase破壊株が *cgR_1960 lacZ* 活性に及ぼす影響

大腸菌ではRNase IIIは *rnc* mRNA の 5' UTR を切断し発現を負に制御する自己発現制御をすることが知られているが（40）、コリネ型細菌でも同様の制御が行われているか調べた。また、RNase JやRNase E/Gの標的が *rnc* 上流に存在するのか調べることにした。今回用いたプラスミドは、*rnc* の上流にある遺伝子 *cgR_1960* の上流域から *rnc* 遺伝子内部 15 bp までを含む配列を *lacZ* レポーターに翻訳融合させたもので、β-ガラクトシダーゼ活性を測定した（図. 3-3-4-1）。その結果、β-ガラクトシダーゼ活性が検出されたことから *rnc* 上流域にプロモーターの存在を確認できた。また、β-ガラクトシダーゼ活性は野生株と比較し Δrnj 株では約 3.7 倍増加した（図.3-3-4-2）。しかし、 $\Delta rneG$ 株と Δrnc 株では活性値が野生株と比べ大きな変化が見られなかった。

このことから、RNase Jの標的が *rnc* 上流域に存在することが示唆された。また、コリネ型細菌では大腸菌と異なりRNase IIIによる *rnc* mRNA の自己発現制御は少なくとも *rnc* 上流では行われていないことが判明した。

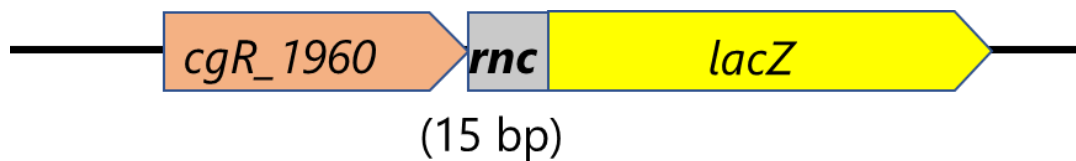


図. 3-3-4-1 ガラクトシダーゼ活性に用いたプラスミド
rnc の翻訳開始点から 15bp を *lacZ* レポーターに結合させ、相同組換えによりゲノムに挿入した株でガラクトシダーゼ活性を測定した。

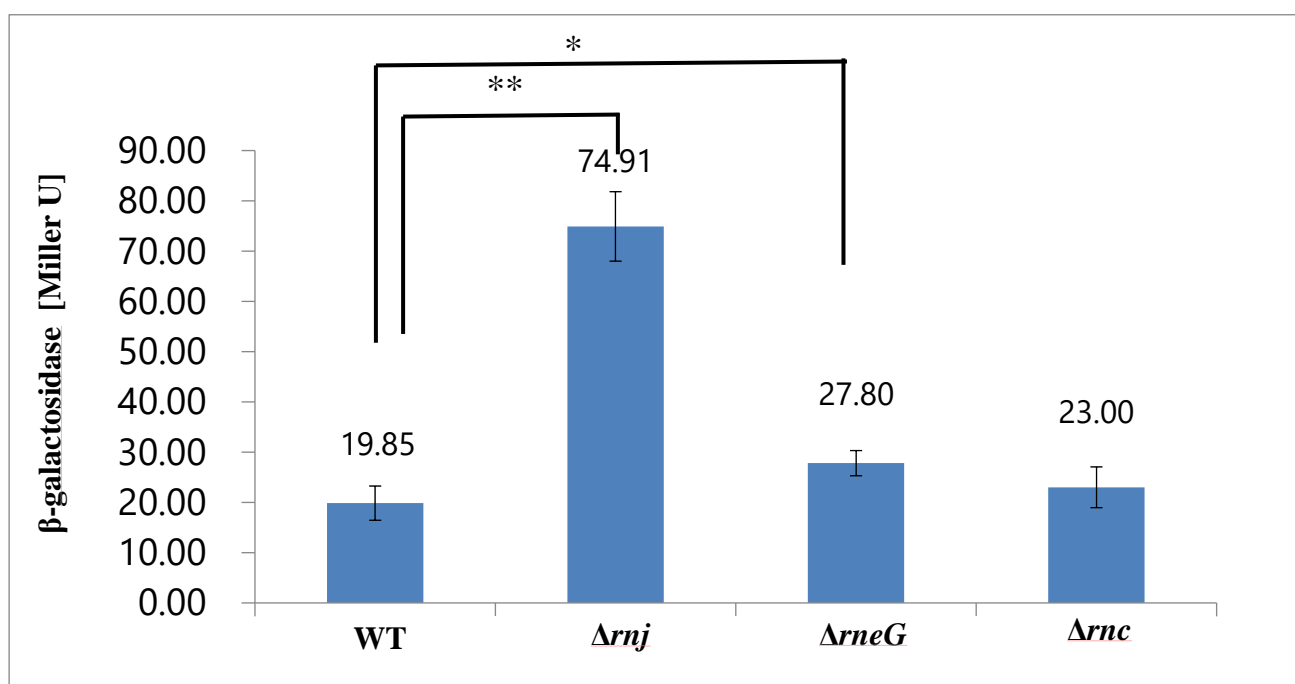


図.3-3-4-2 RNase 破壊が β -ガラクトシダーゼ活性に及ぼす影響

β -ガラクトシダーゼ活性の数値を示した。同様の試験を 3 回行い、標準誤差をエラーバーで示した。統計解析での有意性は t 検定を用いた。

* $p < 0.5$, ** $p < 0.05$

3-3-5 5'RACE 法による *rnc* mRNA 切断点同定

Δrnj 株や $\Delta rneG$ 株では *rnc* mRNA の発現量や安定性の増加が観測されたことから RNase J や RNase E/G が *rnc* mRNA を切断していることが示唆された。そこで、*rnc* mRNA の切断点を同定するため 5'RACE 解析を行った。5'RACE 法では、菌体から

Total RNA を抽出し、Random hexamer を用いて逆転写し cDNA を合成する。その後、特定の位置を認識するプライマーを用いて PCR を行うことで目的とする cDNA の末端を解析することが出来る (図. 3-3-5-1)。シーケンスの結果から、野生株と RNase 破壊株を比較して、野生株では存在している mRNA の断片が RNase 破壊株で存在していない箇所が、その RNase により切断されている位置と推測することが出来る。逆に RNase 破壊株で新たに 5'末端が出現した場合には、5'末端出現箇所からプライマーの位置までの間で、その RNase によって切断されると推測される。今回は各サンプルについて最低 30 コロニーからシーケンス解析を行い 10%以上の頻度で出現した末端を特異的に生じた末端として、分析した。

rnc ORF の C 末端側のプライマーを用いた解析の結果から、*rnc* 遺伝子の翻訳開始点から 654 番目のピークが、野生株と Δrnj 株では解析した回数の内、約 10%存在していたが、 $\Delta rneG$ 株では 2~3%ほどしか観測されなかった (図. 3-3-5-2)。この結果から、*rnc* mRNA の翻訳開始点から 654 番目の配列で RNase E/G が切断に参与していると示唆された。翻訳開始点から 654 番目付近の RNA 二次構造を解析したところ、RNase E/G による切断点付近が AU リッチな配列であることが判明した。

また、*rnc* ORF の N 末端側にプライマーを設計し解析した結果、野生株で翻訳開始点から 4 番目にピークが生じているが、 $\Delta rneG$ 株のピークは 2~3%ほどしか観測されず、 Δrnj 株では検出されなかった。以上の結果から、*rnc* mRNA の翻訳開始点から 4 番目の塩基を RNase E/G や RNase J が切断していると推測される (図. 3-3-5-3)。ガラクトシダーゼ活性試験では、野生株と比較して $\Delta rneG$ 株の活性値は約 1.3 倍しか増加しておらず、*rnc* mRNA の上流部分の分解に参与していないと推測したが、5' RACE 解析の結果から RNase E/G も *rnc* mRNA の上流部分の分解に参与していることが示唆された。次に、*rnc* 遺伝子の中流にプライマーを設計し解析した。その結果、野生株で観測され、 $\Delta rneG$ 株と Δrnj 株で減少しているピークが観測されなかった (図. 3-3-5-4)。このことから、*rnc* mRNA の中流は RNase E/G や RNase J による切断が行われていないことが予想される。

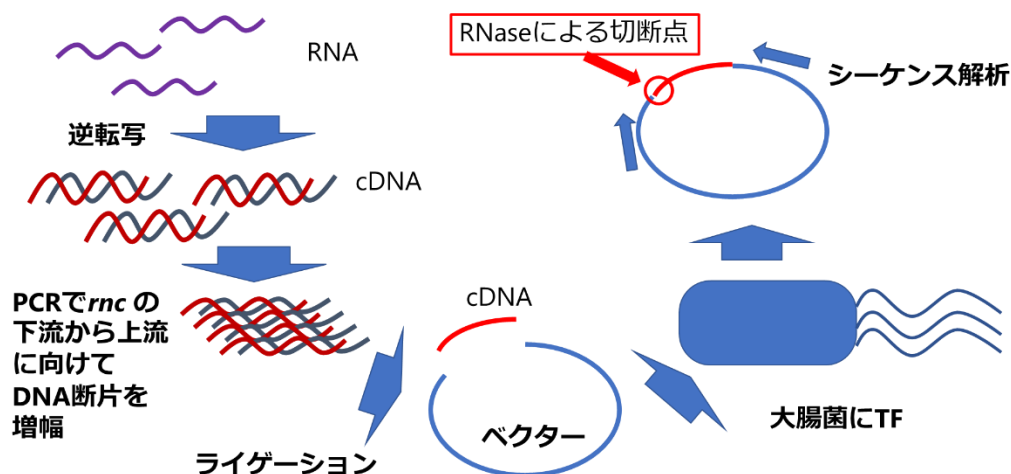


図. 3-3-5-1 5'RACE 法の手順

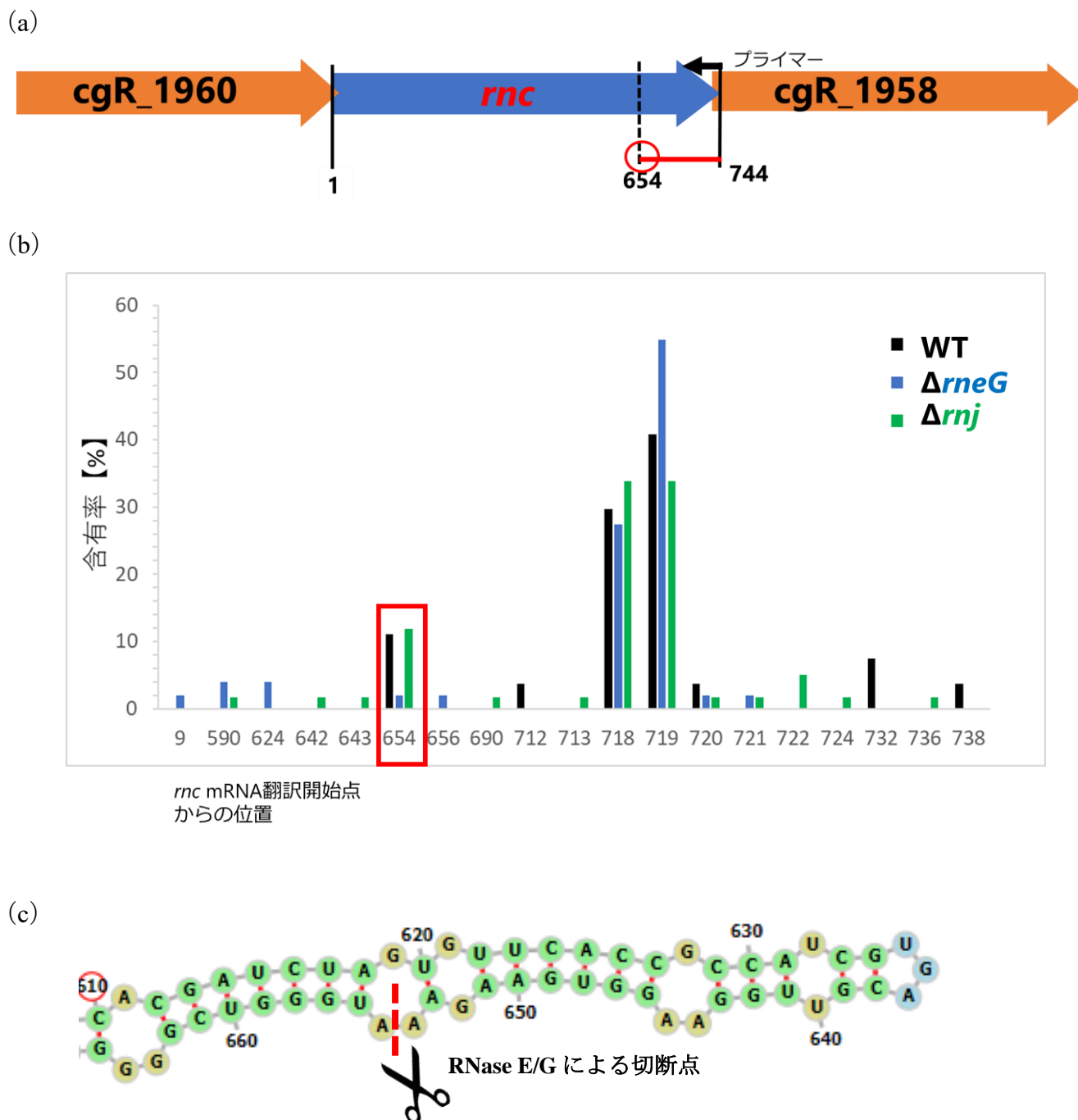


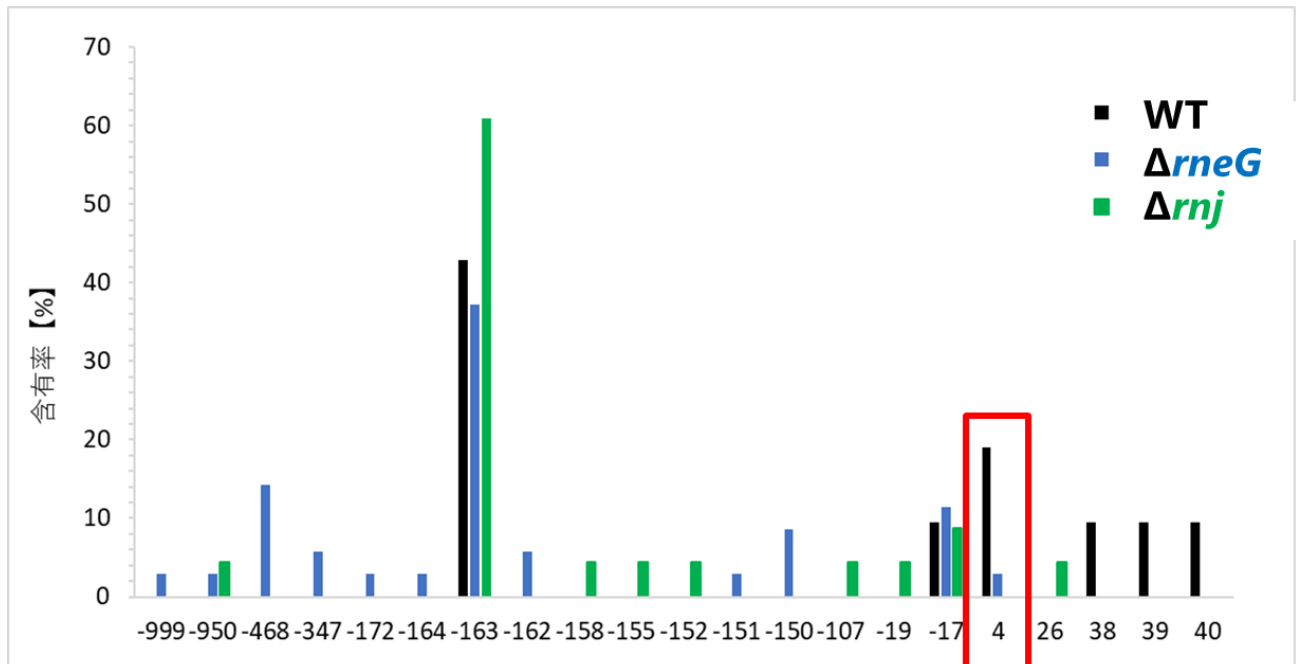
図. 3-3-5-2 *rnc* 遺伝子の下流からの 5'RACE 解析

(a) 5'RACE 解析に用いたプライマーの位置。(b) シーケンス解析結果。横軸は *rnc* mRNA の翻訳開始点からの位置。縦軸は解析回数のうちシーケンスの末端として現れた割合。(c) mRNA の二次構造予測 (ViennaRNA Web Service: <http://rna.tbi.univie.ac.at/forna/>) と RNase E/G による切断位置。

(a)



(b)



rnc mRNA翻訳開始点
からの位置

(c)

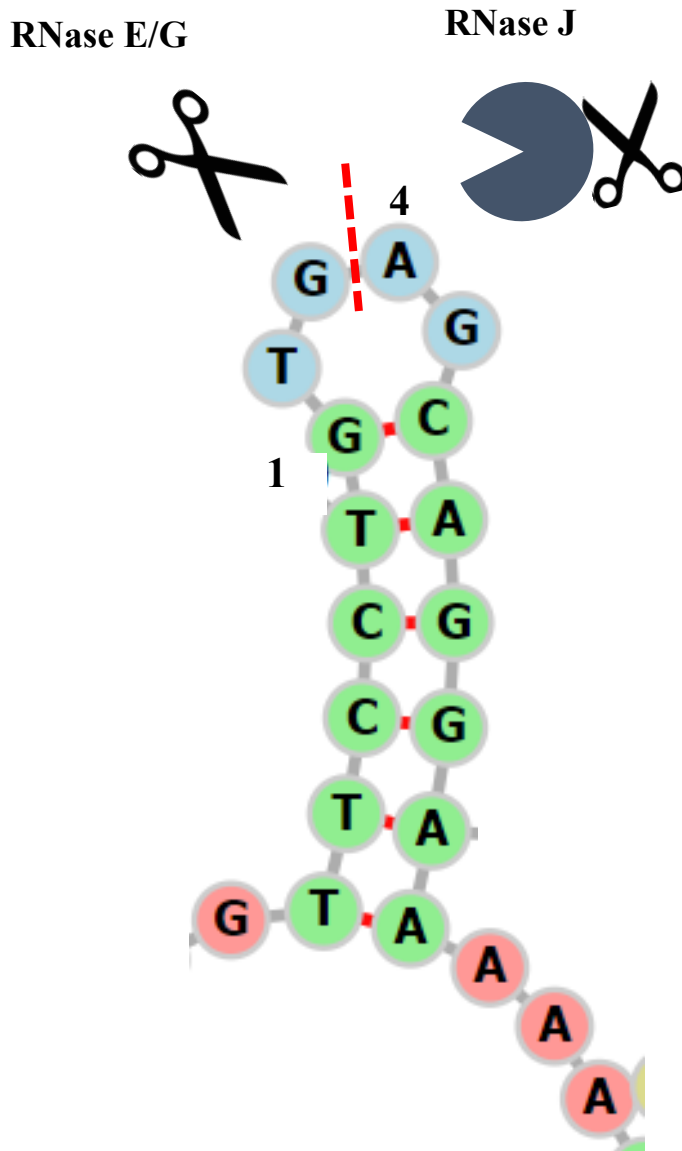


図. 3-3-5-3 *rnc* 遺伝子上流からの 5'RACE 解析

(a) 5'RACE 解析に用いたプライマーの位置。(b) シーケンス解析結果。横軸は *rnc* mRNA の翻訳開始点からの位置。縦軸は解析回数のうちシーケンスの末端として現れた割合。(c) mRNA の二次構造予測 (ViennaRNA Web Service: <http://rna.tbi.univie.ac.at/forna/>) と RNase E/G と RNase J による切断位置。

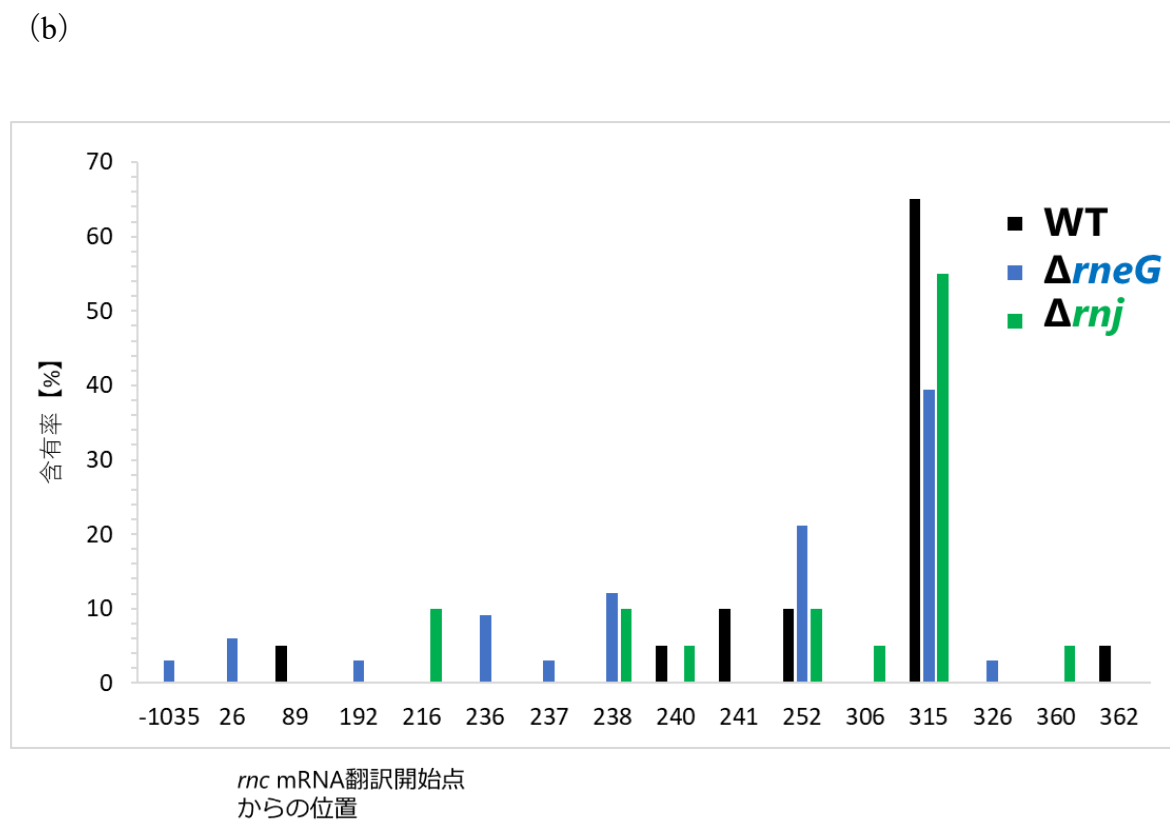
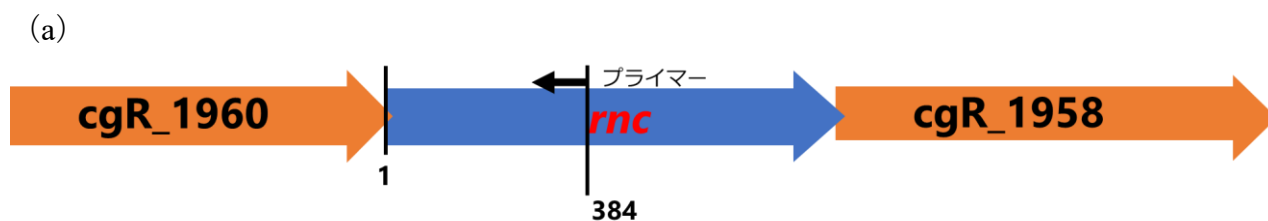


図. 3-3-5-4 *rnc* 遺伝子の中流からの 5'RACE 解析

(a) 5'RACE 解析に用いたプライマーの位置。(b) シーケンス解析結果。横軸は *rnc* mRNA の翻訳開始点からの位置。縦軸は解析回数のうちシーケンスの末端として現れた割合。

3-4 RNase III 遺伝子破壊株による *rneG* や *rnj* 遺伝子発現量への影響

これまでの結果から、RNase III の発現が RNase E/G や RNase J により制御されていることを明らかにしたが、逆に RNase III が RNase E/G や RNase J の発現制御を行っているのか調べるため、 Δrnc 株を用いて RNase J をコードする *rnj* mRNA と RNase E/G をコードする *rneG* mRNA の発現量を qRT-PCR により解析した。コントロールとして野生株を用いた。培養条件は、2% Glc を含む 10 mL A 培地に $OD_{610} = 0.2$ になるよう植菌し、培養 4 時間後の対数期の初期段階で菌体を回収した。

その結果、野生株と比較して Δrnc 株では、*rnj* mRNA や *rneG* mRNA の発現量増加は観測されなかった (図. 3-4)。このことから、コリネ型細菌において RNase III は RNase E/G や RNase J の発現量を制御していないと考えられる。

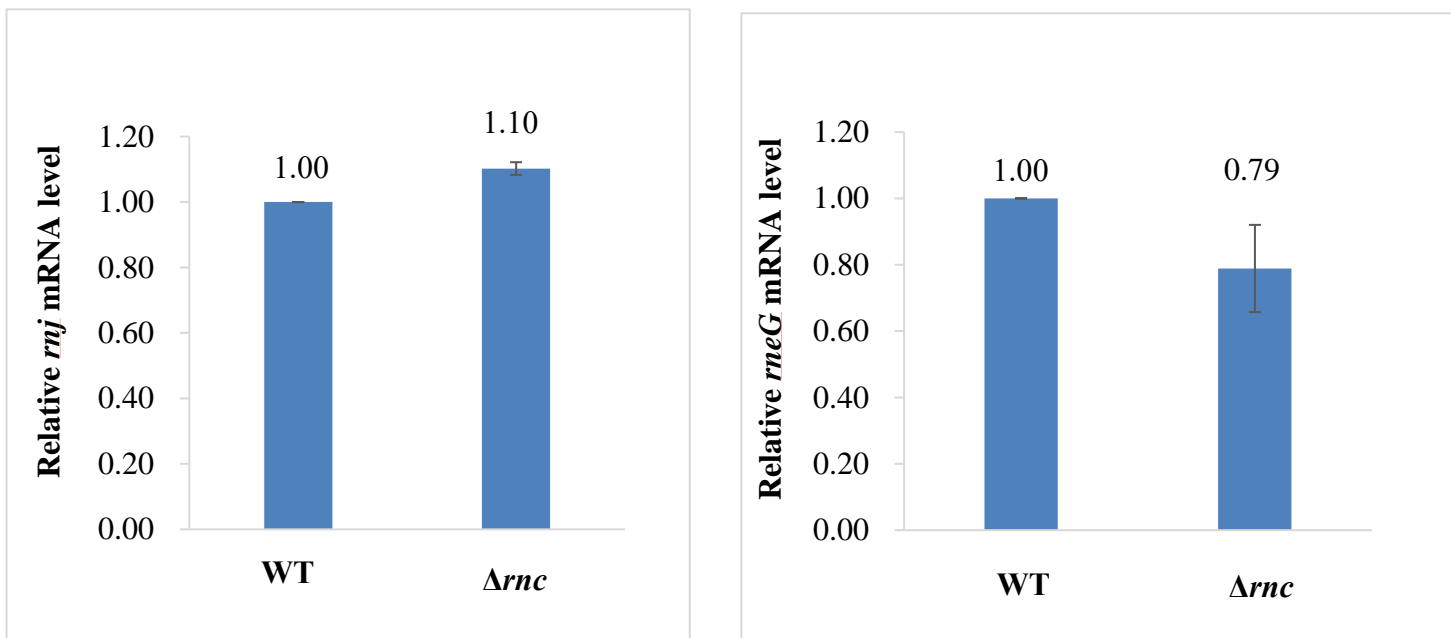


図. 3-4 RNase III 破壊による *rnj* mRNA および *rneG* mRNA の発現量への影響

WT (野生株) および Δrnc 株における *rnj* mRNA および *rneG* mRNA の発現量を示した。同様の試験を 3 回行い、標準誤差をエラーバーで示した。

3-5 RNase III による自己発現制御解析

我々の研究室ではコリネ型細菌の RNase E/G や RNase J が自己発現制御を行うことが見出している。しかしながら、RNase III が自己発現制御を行っているかは未だ判明していない。Δ*rnc* 株による LacZ レポーターを用いた β-ガラクトシダーゼ活性試験を行ったが、*rnc* mRNA の 5' 領域に着目した解析だったため *rnc* mRNA の ORF 内部を RNase III が認識して切断しているのかどうかは判明していない (図. 3-3-4-2)。また、*rnc* 遺伝子欠損株を用いると *rnc* mRNA の全長が転写されないため *rnc* mRNA を RNase III が切断しているのか解析を行うことが出来ない。そこで、アミノ酸 1 塩基置換による、RNase III の機能欠損株を構築し、*rnc* mRNA の自己制御が存在するのかを解析することにした。

3-5-1 RNase III 機能欠損株の構築

黄色ブドウ球菌において RNase III の機能欠損株を構築した論文が発表されている (64)。この論文では、RNase III のアミノ酸配列で 63 番目のアスパラギン酸と 135 番目のグルタミン酸が mRNA の切断に関与していることが判明し、これらのアミノ酸をアラニンに置換すると mRNA 結合活性は有するが、RNase 活性が欠損することが報告された。この論文を参考に、コリネ型細菌において、黄色ブドウ球菌のアミノ酸配列と相同な位置のアスパラギン酸とグルタミン酸をアラニンに置換し、機能欠損株の構築を目指した (図. 3-5-1)。

```
黄色ブドウ球菌: MTELGFTYQNIDLYQQAFSHSSFINDFNMRRLDHNERLEFLGDAVLELTV 70
                  ...|| . |. || |..|.|| |. .| | .| ||||| |||||.|.|
コリネ型細菌:  LDHLGVDIQR-DLLVLALHTRSFANENGM--LPNNERLEFLGDAVLGLSV 73
                  |
                  121 TGGRTRP SLISDVFEAFIGALYLDQGLDIVWKFAEKVIFPHVEQNELLGV 170
                  |..||. |...|. ||..||.. ..|..... ... ..|.
                  124 TEGRSKDSILADTTEALLGAI FRQHG FETARDVILRLFAYKIDNASARGI 173
                  |
                  E138A
```

PLOS Genet 8(6): e1002782. doi:10.1371/journal.pgen.1002782

図. 3-5-1 黄色ブドウ球菌とコリネ型細菌の RNase III アミノ酸配列の比較

黄色ブドウ球菌とコリネ型細菌の RNase III アミノ酸配列を GENETYX Ver. 10 を用いて解析した結果、相同性は 37%であった。

3-5-2 RNase III 機能欠損の確認

RNase III の機能欠損の有無を確認するため、構築した 2 種類の株、*rnc* D66A 株と *rnc* E138A 株を用いて、RNase III のターゲット遺伝子として転写因子をコードする *mraZ* mRNA の発現量を qRT-PCR により解析した。コントロールとして野生株と、 Δrnc 株を用いた。培養条件は、2% Glc を含む 10 mL A 培地に $OD_{610} = 0.2$ になるよう植菌し、培養 4 時間後の対数期の初期段階で RNA を回収した。

その結果、*rnc* E138A 株で Δrnc 株と同様に *mraZ* mRNA の発現量増加が観測された。しかしながら、*rnc* D66A 株では *mraZ* mRNA の発現量の増加は確認されなかった (図. 3-5-2)。このことから、*rnc* E138A 株では RNase III の mRNA 分解機能が欠損していると結論付けた。

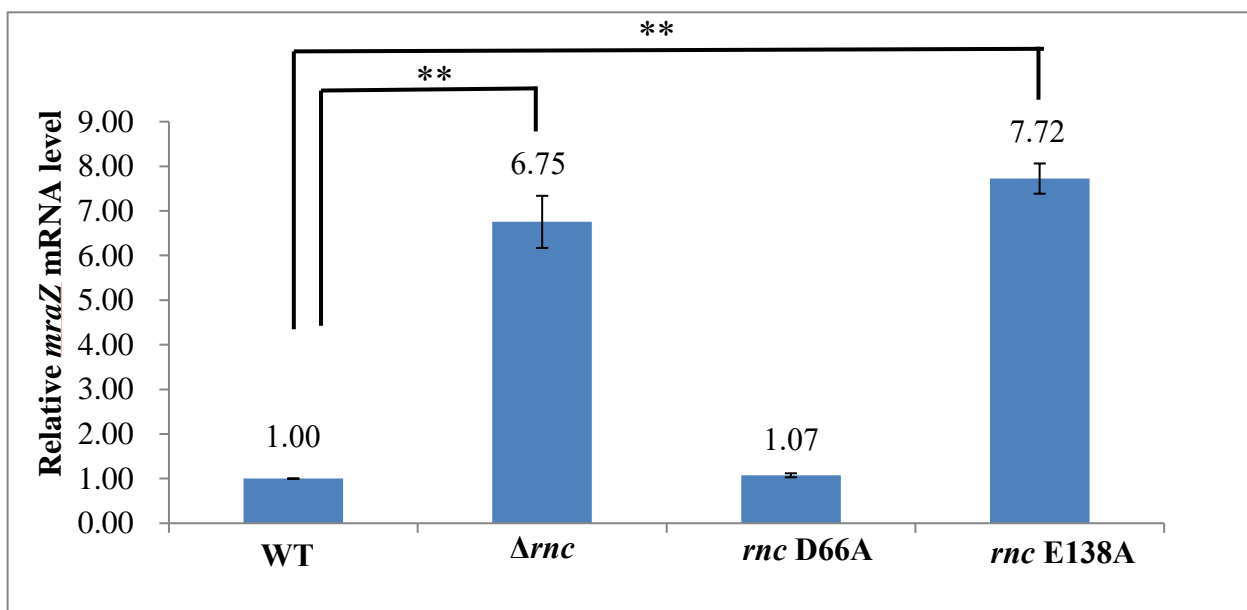


図. 3-5-2 RNase III 変異株による *mraZ* mRNA 発現量の比較

WT (野生株)、 Δrnc 株、*rnc* D66A 株および *rnc* E138A 株における *mraZ* mRNA の発現量を示した。同様の試験を 3 回行い、標準誤差をエラーバーで示した。

統計解析での有意性は t 検定を用いた。*** $p < 0.05$

3-5-3 RNase III による自己発現制御解析

次に、構築した RNase III 機能欠損株を用いて、*rnc* mRNA の発現量を qRT-PCR により解析した。コントロールとして野生株と Δrnc 株を用いた。培養条件は、2% Glc を含む 10 mL A 培地に $OD_{610} = 0.2$ になるよう植菌し、培養 4 時間後の対数期の初期段階で菌体を回収した。

その結果、野生株と比較して *rnc* E138A 株で *rnc* mRNA の発現量に差は現れなかった (図. 3-5-3)。このことから、コリネ型細菌では RNase III による自己発現制御は行われていないと考えられる。

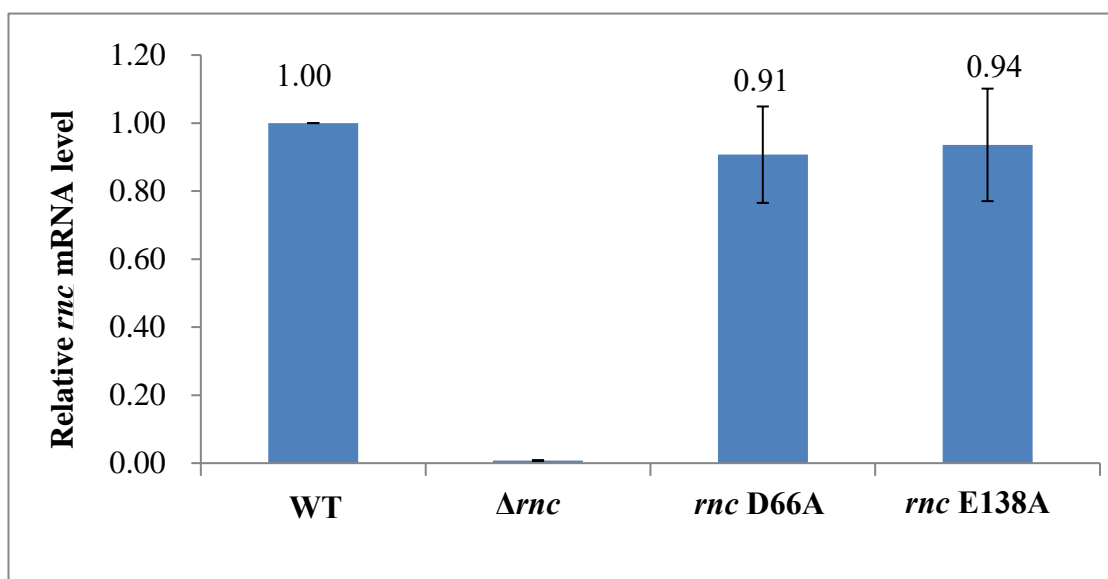


図. 3-5-3 RNase III 機能欠損株による *rnc* mRNA 発現量の比較

WT (野生株)、 Δrnc 株、*rnc* D66A 株および *rnc* E138A 株における *rnc* mRNA の発現量を示した。同様の試験を 3 回行い、標準誤差をエラーバーで示した。

3-5-4 RNase III 破壊株及び機能欠損株による表現型の比較

我々の研究室で行われた先行研究で、RNase III は細胞分裂に関する遺伝子の制御を行っており、RNase III 破壊株では細胞が伸長するという表現型を示すことが報告されている (11)。そこで、RNase III 機能欠損株である *rnc* E138A 株でも同様に細胞が伸長するののかを確かめた。また、RNase E/G 破壊株と RNase J 破壊株についても同時に観察を行った。菌体は、2% Glc を含む 10 mL A 培地で一晩培養し、A 培地で 50 倍希釈をして観察した。

その結果、WT (野生株) の細胞の長さが約 1~2 μm であるのに対し、 Δrnc 株では 2~3 μm であった。*rnc* E138A 株を観察したところ Δrnc 株と同程度の細胞長であり、野生株と比較して伸長していた。一方、*rnc* D66A 株、 $\Delta rneG$ 株、 Δrnj 株では細胞伸長は観察されなかった (図. 3-4-4)。

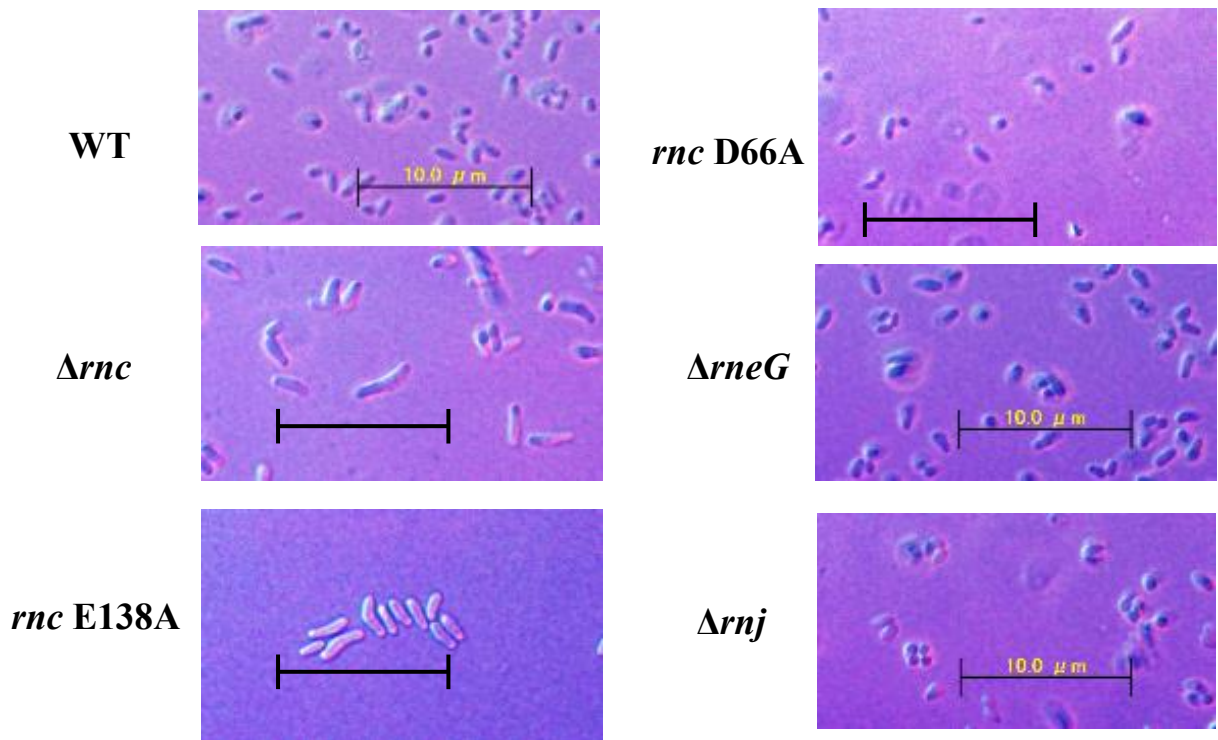


図. 3-5-4 RNase 破壊株および機能欠損株による表現型の比較

顕微鏡観察は、100 倍微分干渉コンストラクト対物レンズと適切なフィルターセット (Chroma Technology) 及び photometric cool snap HQ カメラ (Nikon) を備えた Olympus AX70 顕微鏡を使用した。画像は metamorph5.0 (Universal Imaging) および Adobe Photoshop8.0 で処理した。

3-6 コリネ型細菌における RNase III 高発現の解析

3-6-1 コリネ型細菌における RNase III 高発現株の構築

微生物による物質生産を効率的に行うには目的の産物以外の合成を抑制することが重要となる。しかしながら、遺伝子破壊を行うと増殖速度が減少するなど影響が現れることから、これらの遺伝子を任意のタイミングで抑制する技術が求められている。そこで、高発現プロモーターを用いて RNase III を高発現させ、ターゲット遺伝子の発現抑制が可能であるのか検討した。また、RNase III の高発現化によって増殖に悪影響を及ぼさないか検討を行った。

RNase III 高発現のため *rnc* 遺伝子を *gapA* プロモーターの下流に連結し、コリネ型細菌を形質転換した。

3-6-2 RNase III 高発現の確認

構築した RNase III 高発現株を用いて *rnc* mRNA の発現量を qRT-PCR 解析した。その結果、野生株とネガティブコントロールの空ベクターと比較して、*rnc* 高発現株では約 9.59 倍 *rnc* mRNA の発現量が増加していることが判明し、高発現が確認された (図. 3-5-2)。

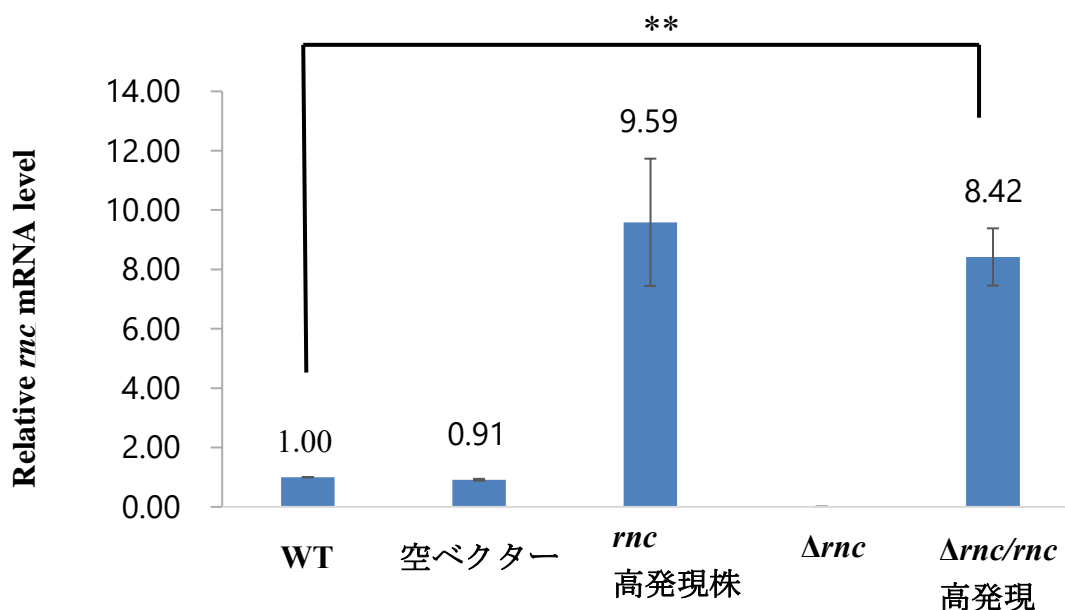


図. 3-6-2 qRT-PCR 解析による *rnc* mRNA 発現量の解析

野生株、コントロール用空ベクター株、*rnc* 過剰発現株、*rnc* 遺伝子破壊株および *rnc* 遺伝子破壊株に *rnc* 遺伝子を高発現させた株における *rnc* mRNA の発現量を示し

た。同様の試験を3回行い、標準誤差をエラーバーで示した。統計解析での有意性はt検定を用いた。** $p < 0.05$

3-6-3 RNase III 高発現が増殖に及ぼす影響

次に、コリネ型細菌における RNase III の高発現化が増殖に影響を及ぼすのかを確認するため、RNase III 高発現株を用いて増殖速度を解析した。その結果、野生株やコントロール株と比較して増殖速度に影響は確認されなかった (図. 3-5-3)。このことから、コリネ型細菌では RNase III の高発現を行っても増殖に必要な mRNA が過剰に切断されている可能性は低いことが示唆された。

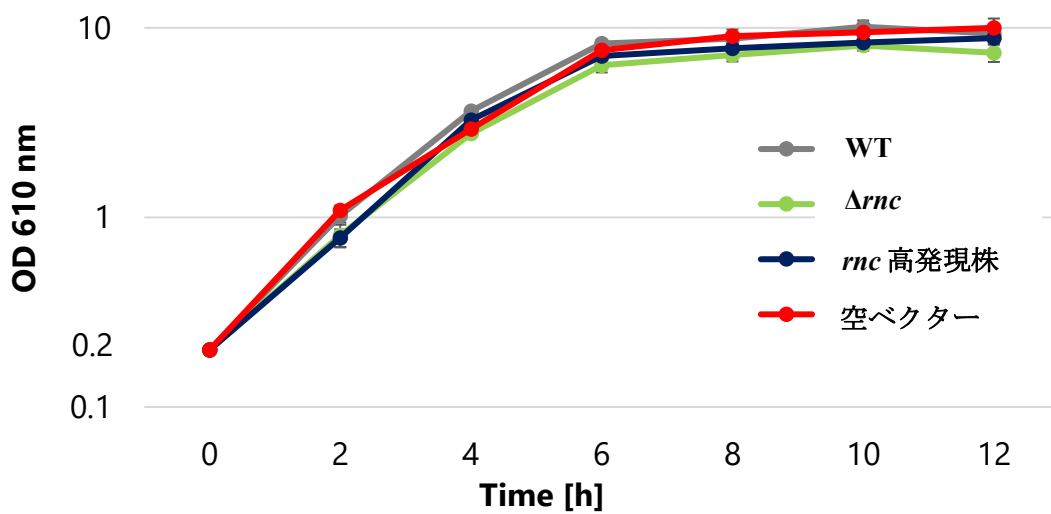


図. 3-6-3 RNase III 高発現が増殖速度に及ぼす影響

野生株、コントロール用空ベクター株、*rnc* 過剰発現株および *rnc* 遺伝子破壊株における増殖曲線を示した。培養初期 OD₆₁₀ は 0.2 に合わせた。同様の試験を3回行い、標準誤差をエラーバーで示した。

3-6-4 RNase III 高発現株における RNase III の経時的発現量の変化

次に、RNase III 高発現株では RNase III の高発現が恒常的になられるか確認するため、*rnc* mRNA の発現量を経時的に解析した (図. 3-5-4-1)。その結果、野生株と比較して RNase III 高発現株の *rnc* mRNA の発現量は、対数増殖期の初期 (2 h) では約 9.6 倍、対数増殖期中期 (4 h) から後期 (6 h) にかけて約 32~38 倍増加していることが判明した。また、定常期 (10~12 h) においても *rnc* mRNA の発現量は野生株より 10 倍以上高くなっていることが判明した。

次に、RNase III 高発現株では、タンパク質レベルでも RNase III が高発現しているか確かめるため、RNase III ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った (図. 3-6-4-2)。その結果、野生株と比較して RNase III 高発現株では、対数増殖期の初期 (2 h) の段階で RNase III タンパク質の発現量が顕著に増加していることが判明した。また、定常期 (10 h 以降) では、*rnc* mRNA の発現量は対数増殖期の初期段階に近い値を示していたが、タンパク質レベルでは対数増殖期の後期 (6 h) から高発現の状態が維持されていることが判明した。このことから、RNase III の高発現株では、野生株と比較して菌体内の RNase III の量が大幅に増加していることが示された。

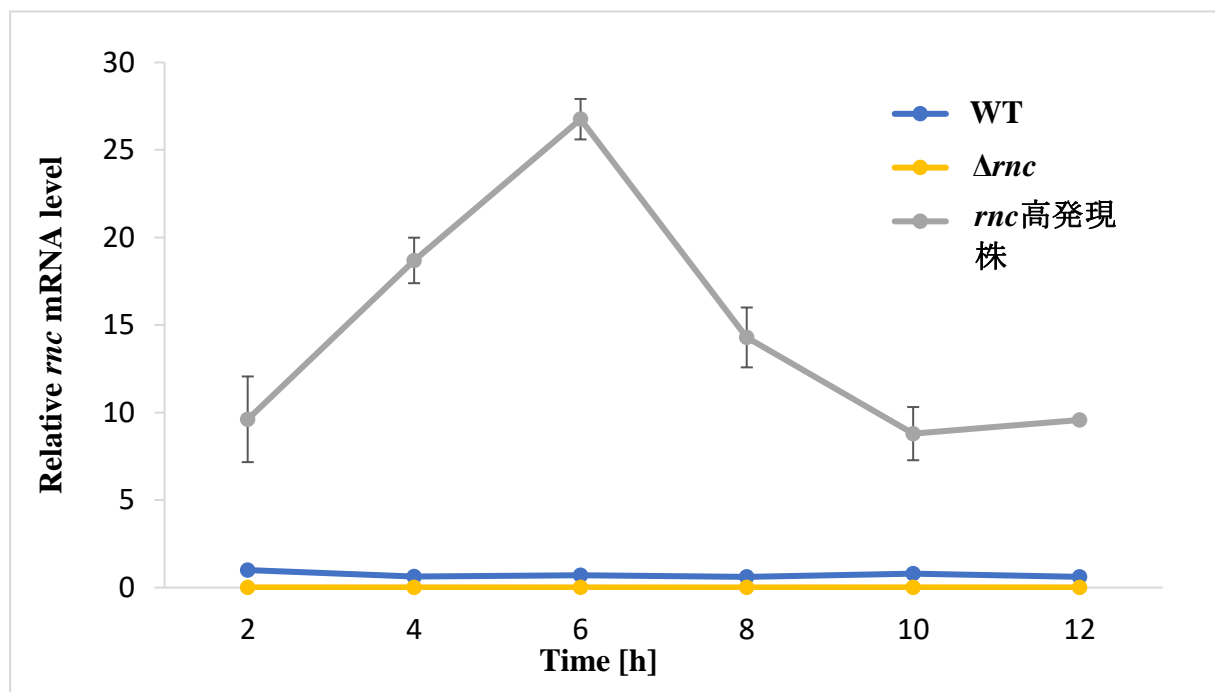


図. 3-6-4-1 *rnc* mRNA の発現量の経時的解析

野生株、*rnc* 遺伝子破壊株および *rnc* 過剰発現株における *rnc* mRNA の発現量を示した。増殖試験と同様に培養初期 OD₆₁₀ は 0.2 に合わせた。同様の試験を 3 回行い、標準誤差をエラーバーで示した。

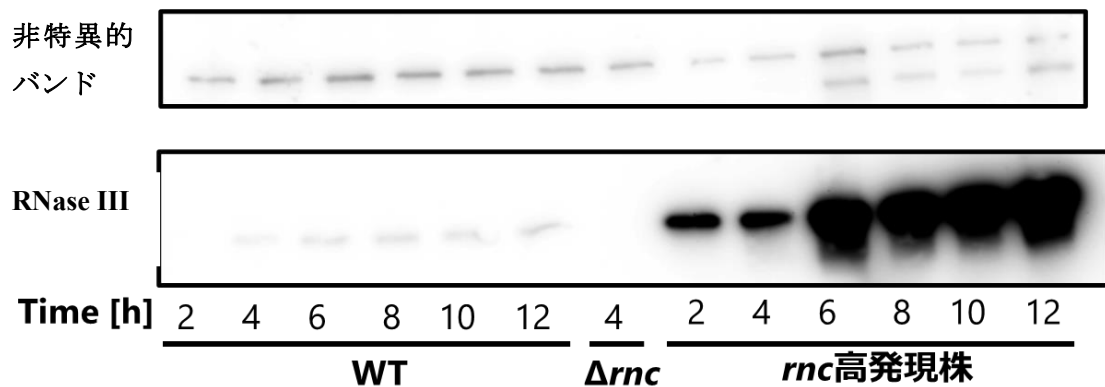


図. 3-6-4-2 RNase III 抗体を用いたウエスタンブロット解析

野生株、*rnc* 遺伝子破壊株および *rnc* 高発現株における RNase III タンパク質の発現量を示した。増殖試験と同様に培養初期 OD_{610} は 0.2 に合わせた。各サンプルのタンパク質の量は 10 mg に合わせた。タンパク質の量が等しいことを表すため非特異的バンドをコントロールとして用いた。

3-6-5 RNase III 高発現が RNase III のターゲット遺伝子の発現量に及ぼす影響

次に、RNase III 高発現株を用いて RNase III のターゲット遺伝子の発現量への影響を解析した。RNase III のターゲット遺伝子である *mraZ* mRNA の発現量を qRT-PCR 解析した (図. 3-6-5)。その結果、RNase III 高発現株では野生株と比較して、*mraZ* mRNA の発現量は約 0.81 倍の発現量であった。この結果から、RNase III の過剰発現が RNase III のターゲット遺伝子の発現量の抑制につながっていないことが示唆された。

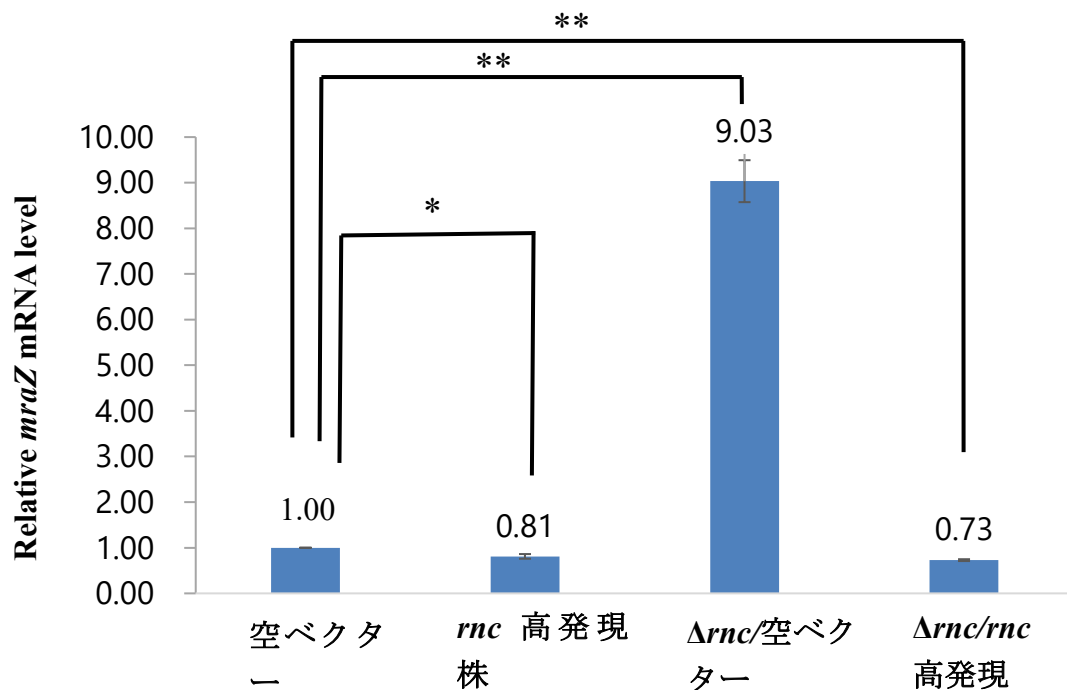


図. 3-6-5 qRT-PCR 解析による *mraZ* mRNA の発現量解析

野生株、コントロール用空ベクター株、*rnc* 過剰発現株、*rnc* 遺伝子破壊株および *rnc* 遺伝子破壊株に *rnc* を過剰発現させた株における *mraZ* mRNA の発現量を示した。同様の試験を 3 回行い、標準誤差をエラーバーで示した。統計解析での有意性は t 検定を用いた。* $p < 0.1$, ** $p < 0.05$

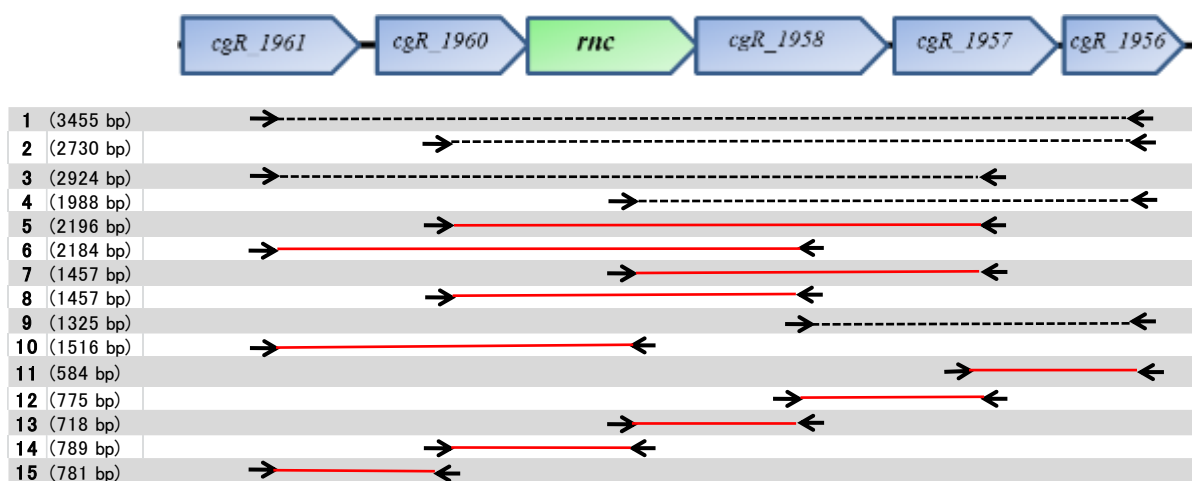
3-7 *rnc* オペロン

3-7-1 遺伝子クラスターのおペロン解析

rnc 周辺の遺伝子はクラスターを形成しており、*cgR_1960* と *rnc* はコード領域が 4 bp 重複し、*rnc* と *cgR_1958* はコード領域が 8 bp 重複している。このことから *rnc* 周辺の遺伝子はオペロンを構成していると考えられる。*rnc* 周辺の遺伝子クラスターがオペロンとして構成されているのかを確認するため、mRNA を抽出し、RT-PCR を行った。その結果、*cgR_1960* から *cgR_1957* と *cgR_1961* から *cgR_1958* までのプライマーを用いた時に PCR 産物を確認できた (図. 3-7-1)。このことから *cgR_1960* から *cgR_1958* はオペロンを構成していると考えられる。また、*cgR_1961* から *cgR_1956* までの各 2 遺伝子間の PCR 産物を確認することができたが、*cgR_1961* から *cgR_1956* までの PCR 産物を確認することができなかった。

cgR_1961 から *cgR_1956* の遺伝子もオペロンを構成しているが遺伝子間が長いため今回の条件では PCR で増幅が観察されなかった可能性や *cgR_1957*-*cgR_1956* は *cgR_1961*-*cgR_1957* オペロンとは別の転写単位として転写されている可能性もあり更なる解析が必要である。

(a)



(b)

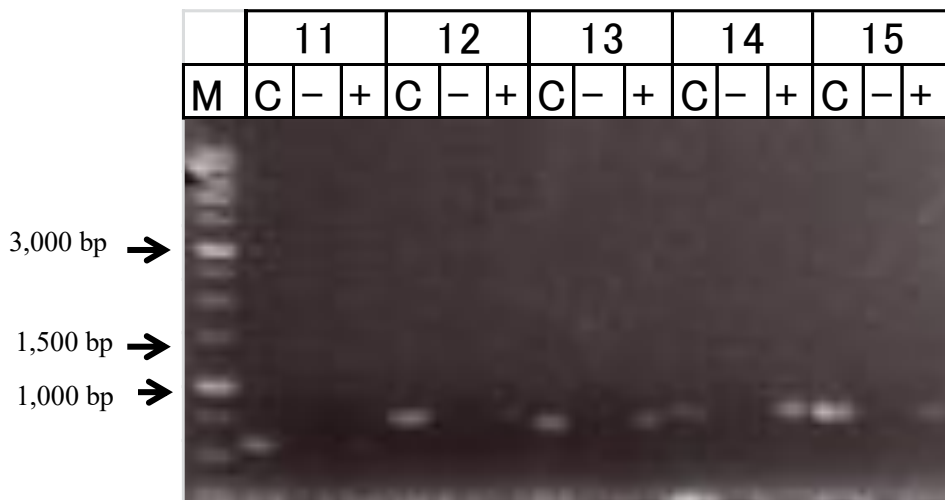
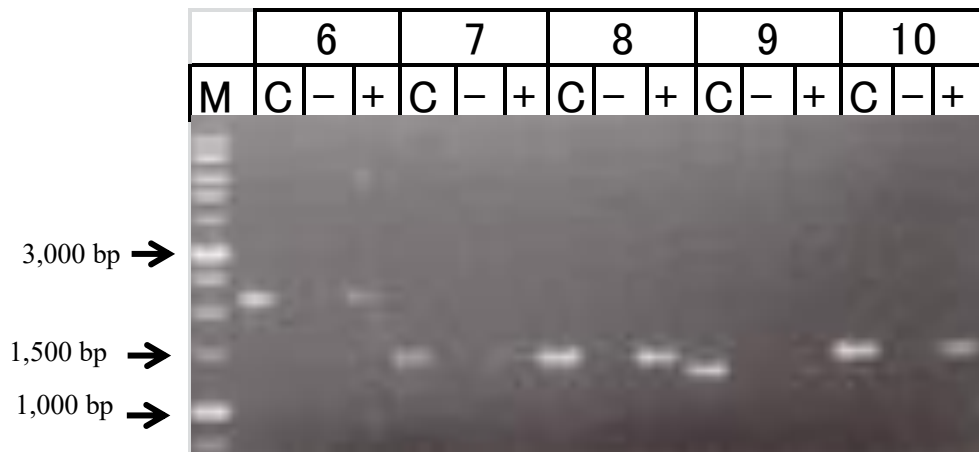
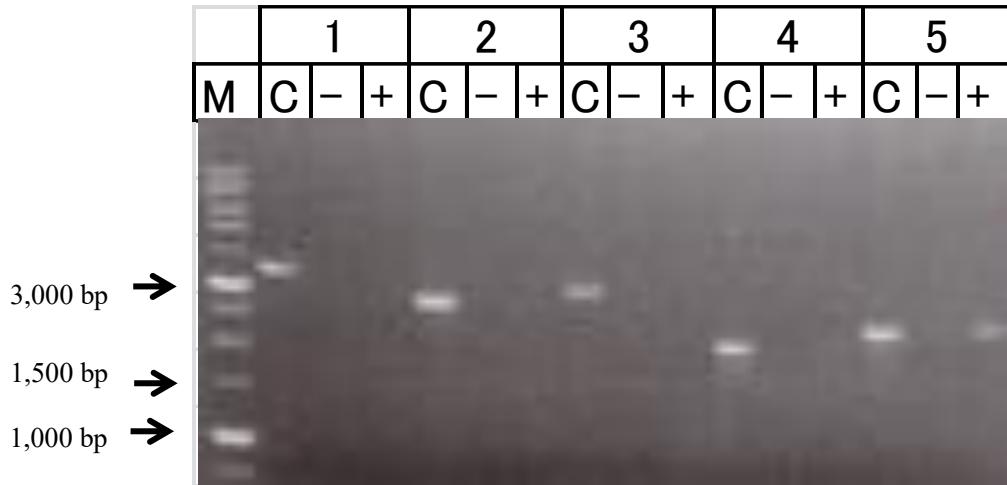


図. 3-7-1 遺伝子クラスターの RT-PCR によるオペロン解析

(a) RT-PCR に使用したプライマーの位置と予想される PCR 産物の断片長。矢印と矢印の間が点線で表示されているものはバンドが確認できなかった箇所。赤色の線で表示されているのがバンドを確認できた箇所。

(b) PCR 産物の電気泳動写真。C : 鋳型 DNA にコリネ型細菌完全長ゲノムを使用した PCR 産物。- : コリネ型細菌から回収した RNA を鋳型に使用した PCR 産物。+ : コリネ型細菌から回収した RNA をもとに cDNA を作製し、鋳型に使用した PCR 産物。

3-7-2 RNase 破壊が *rnc* 周辺遺伝子の発現量に及ぼす影響

rnc は周辺の遺伝子とオペロンとして発現していることを確認したため (図. 3-6-2-1)、*rnc* と同様に *rnc* 周辺の遺伝子クラスターも RNase E/G や RNase J により制御されているかどうかを調べた。その結果、*cgR_1956* の発現量が $\Delta rneG$ 株では約 3.33 倍、 Δrnj 株では約 6.28 倍に増加した。それ以外の遺伝子の発現量は Δrnj 株で 2 倍程度、 $\Delta rneG$ 株では *cgR_1957*, *cgR_1958* が 2 倍程度上昇した (図. 3-6-2-2)。このことから、RNase E/G や RNase J は、*rnc* や *cgR_1956* を特に積極的に分解していることが判明した。この結果から、*cgR_1956* が RNase による制御を受けやすいのではないかと予想し、RNase III の機能欠損株を用いて *cgR_1956* の発現量を解析した。その結果、*rnc* E138A 株でも発現量が約 2.5 倍と増加していることが判明した。



図. 3-7-2-1 *rnc* 周辺の遺伝子クラスター

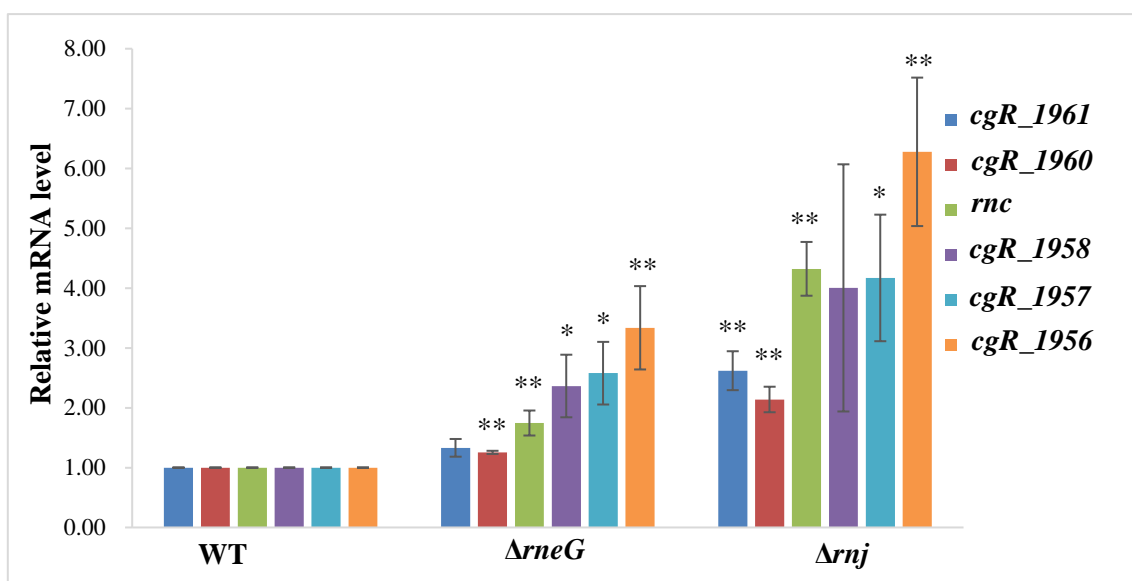


図. 3-7-2-2 RNase 破壊による *rnc* 周辺の遺伝子クラスターの発現量への影響
 WT (野生株)、 $\Delta rneG$ 株および Δrnj 株による *rnc* 遺伝子クラスターの発現量を比較した。同様の試験を 4 回行い、標準誤差をエラーバーで示した。統計解析での有意性は t 検定を用いた。* $p < 0.1$ 、** $p < 0.05$

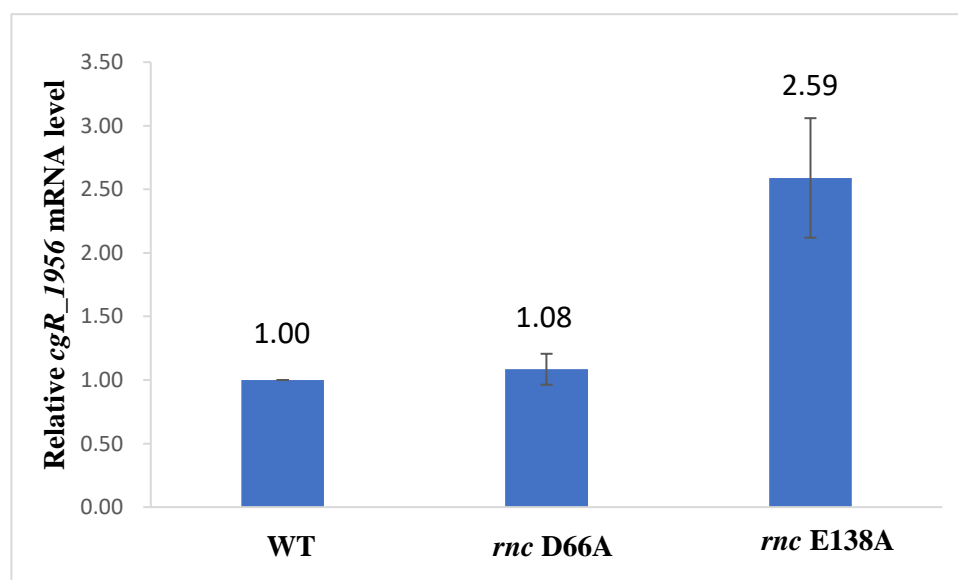


図. 3-7-2-3 RNase III 機能欠損株における *cgR_1956* の発現量の比較
 WT (野生株)、*rnc* D66A および *rnc* E138A による *cgR_1956* の発現量を比較した。同様の試験を 2 回行い、標準誤差をエラーバーで示した。

第4章 考察

本研究では、コリネ型細菌における RNase III の発現制御について転写後制御に着目して解析を行った。転写後制御機構を解明する目的で主に以下の項目を検討した。初めに、RNase E/G または RNase J が RNase III の発現制御に関与しているか。二つ目は、逆に RNase III は RNase E/G や RNase J の発現制御を行っているのか。最後に RNase III の発現は自身の mRNA 分解段階で自己発現制御を行っているのかである。検討の結果、RNase E/G、RNase J は RNase III を mRNA の分解段階で制御していることを明らかにした。それに対して、RNase III の遺伝子破壊株は RNase E/G、RNase J の発現レベルに影響を及ぼさず、発現制御に関与しないことが示された。また、RNase III の変異株を用いた解析から、コリネ型細菌の RNase III は自己制御を行っていないことが判明し、大腸菌や枯草菌とは異なる機構で発現制御されていることが明らかとなった。RNase III が RNase E/G や RNase J から制御を受けているのは、大腸菌等で見られる自己発現制御が存在しないためではないかと考えられる。自己発現制御が存在していると自身の発現量が増加した際、自身をコードする mRNA の分解が進むことで発現量を調節することが出来る。一方、自己発現制御が存在しない場合、発現量を調節するために他のタンパク質による制御が必要となる。そこで、細菌の mRNA 分解で主要な役割を担っている RNase E/G や RNase J が RNase III の発現制御に関与しているのではないかと考えられる。今回発見された、RNase E/G や RNase J 両者による制御は他の菌種では存在が知られず、新規な制御機構である。さらに RNase E/G や RNase J の活性、発現制御が RNase III の制御を通じて *mraZ* などの RNase III の標的を間接的に制御するという分解制御ネットワークが存在するという可能性も考えられる (図 4-1)。例えば RNase J は低温環境下で発現が一時的に増加することが報告されている (65)。低温ストレスなどで *mraZ* や *cgR_1596* など細胞複製に関する遺伝子や rRNA の成熟等を RNase III の発現制御に関して間接的に調節している可能性が考えられる。今後は実際にそのような制御が存在するのか低温環境ストレス等で *mraZ* 等の発現を *rnj*、*rneG* 破壊株を用いて解析する必要がある。環境の変化に適合するため遺伝子の必要量に合わせ RNase E/G や RNase J により RNase III が発現制御を受けているのではないかと予想される。

コリネ型細菌では、大腸菌では構築できなかった RNase III の高発現株の作製が、可能であった。これについてはコリネ型細菌の RNase III はターゲット遺伝子の発現量に大きな差が現れなかったからではないかと考えられる。実際、空ベクターを導入した野生株と RNase III の高発現株による *mraZ* mRNA の発現量の比較では、野生株と比較して約 0.8 倍の発現量となった (図. 3-6-5)。このことから、野生株で発現する RNase III の量でも *mraZ* mRNA は迅速に分解されており、RNase III の発現量を増加させても *mraZ* mRNA の安定性に大きな影響を与えなかったと予測される。高発現化した RNase III が RNA 分解活性を有しているかについて解析するため、 Δrnc 株

に *rnc* 高発現ベクターを導入した相補実験を行ったところ、 Δrnc 株の *mraZ* mRNA の発現量は約 9.0 倍に増加しているのに対し Δrnc 株に *rnc* 高発現ベクターを導入した株では約 0.73 倍と *mraZ* mRNA の発現量が減少した (図. 3-6-5) ことから、高発現させた RNase III は RNA 分解活性を有していることが確認された。先行研究で行われたマイクロアレイ解析については発現量に差が現れた遺伝子では RNase III を高発現化させた影響が現れなかったが、これらの mRNA は RNase III で分解されやすい可能性がある。それ以外 RNase III への親和性が低く分解されにくい遺伝子では影響が現れている可能性も考えられる。今後は、RNase III の高発現株を用いてマイクロアレイ解析等による遺伝子発現量の網羅的解析を行い、アミノ酸合成など発酵生産に關与する遺伝子の発現量に影響が現れるか解析する必要がある。

$\Delta rneG$ 株と Δrnj 株を用いた解析結果を比較すると (図. 3-3-1) qRT-PCR による *rnc* mRNA の解析では Δrnj 株でより多い発現量が観察されていたのに対して、ウエスタンブロッティング法によるタンパク質発現量解析ではほぼ変わらない発現量となっていた。このような結果を生じた原因の一つとして mRNA とタンパク質の検出方法の違いによる影響が考えられる。qRT-PCR 解析では 5'末端から分解途中の mRNA も全て検出されているため、5' exo 活性を持つ RNase J については分解途中の産物も含めて定量してしまう。これに対し、ウエスタンブロッティング法では 5'末端が削がれた mRNA は翻訳されないためタンパク質産物として検出されず、その差が結果に表れている可能性が考えられる。

RNase E/G や RNase J 遺伝子破壊株 (Δrnc 株、 $\Delta rneG$ 株、 Δrnj 株) を用いて増殖への影響を検討したところ、野生株と比較して、 Δrnc 株と Δrnj 株で増殖速度は減少したものの生育が観察された (図. 3-1)。RNase III は大腸菌で破壊可能であるが増殖速度が減少し、枯草菌はプロフェージ RNA を分解するために RNase III が必要となるが破壊は可能である (29, 39)。コリネ型細菌においても増殖速度の低下が観察されたことから。各増殖期の発現量の変化を経時的に観察したところ、静止期に入る段階で大腸菌と同程度の *rnc* mRNA 発現量の減少が見られた (図. 3-5-4)。しかしながらタンパク質レベルでの発現量は減少しておらず対数期よりも定常期にかけてタンパク質蓄積量は増加した (図. 3-2-2)。このことは、mRNA は定常期でプロモーター活性が低下するがタンパク質は安定なので一定レベルが維持されることを示していると考えられる。定常期は細胞複製やリボソームの必要量は減少すると考えられるのでこの結果はやや予想外であった。今後、定常期における RNase III の役割、活性制御が存在するかなど研究を進める必要がある。

RNase E/G と RNase J による *rnc* mRNA の分解機構を解明するため、5'RACE 法を用いて *rnc* mRNA の切断点同定を行った。RNase E/G の切断点を解析したところ翻訳開始点から 4 番目と 654 番目で観測された。RNA 二次構造予測からこれらの領域は一本鎖領域と予測される。次に、RNase J の切断点では RNase E/G と同じ位置である 4 番目で観測されが、RNase J はエキソ型の活性も有しているため、エキソ型で分解されているものについては特定のピークとならないため検出は困難である。RNase

E/Gファミリー酵素はAUリッチな配列を認識し切断していることが報告されており、654番目の配列はAUリッチな領域であるため、この領域を特異的に認識していることが予想される(66)。また、4番目の配列では $\Delta rneG$ 株と Δrnj 株の両方で検出されなかったことからRNase E/GとRNase Jが個別でこの配列を認識し切断しているのではなく、互いが切断の補助をしていることが予想される。個別で切断をしているのであれば $\Delta rneG$ 株ではRNase Jが切断した断片が観測されると考えられるからである。4番目付近の配列はAUリッチな領域ではなかったため、RNase Jによる rnc mRNAの上流部分の切断がRNase E/Gの切断を誘導しているのではないかと予想される。最後に3つの株で共通して出現した末端では、RNase E/GやRNase J以外のRNaseにより切断を受けている、もしくはこれらの配列がプロモーターであることも予想されるため、この末端を含むDNA配列をレポーター遺伝子と翻訳融合させプロモーター活性が存在するのかを検証する必要がある。

β ガラクトシダーゼ活性試験では、野生株と比較して $\Delta rneG$ 株の活性値は約1.3倍しか増加しておらず、 rnc mRNAの上流部分の分解に影響は少ないと推測したが、5'RACE解析の結果からRNase E/Gも rnc mRNAの上流部分の分解に関与していることが判明した。しかしながら、上流の5'末端はRNase E/Gの標的ではあるがRNase Jと協調することで切断していると予想されるため、RNase E/G単体で切断される割合がそれほど多くない可能性がある。

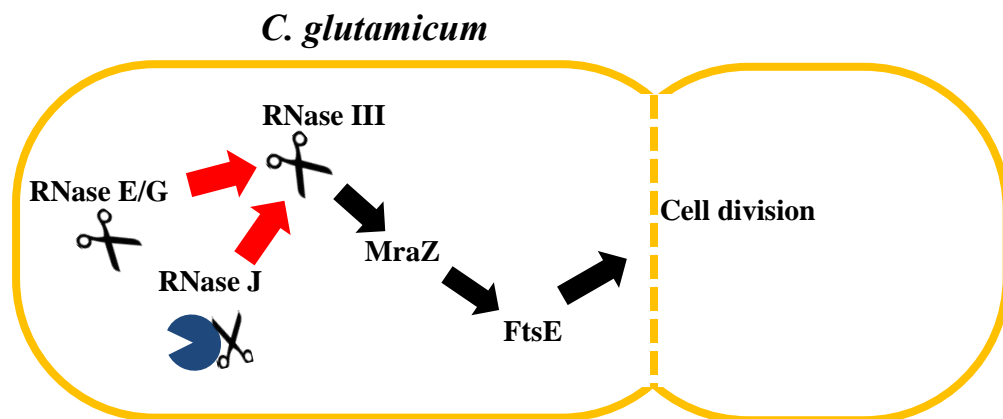


図. 4-1 コリネ型細菌におけるRNase IIIのmRNA分解制御関係図

赤色の矢印が今回の研究で明らかとなった制御である。FtsEが細胞の長さを制御しており、それを転写因子であるMraZが制御している。また、MraZの発現はRNase IIIにより制御されており、RNase IIIはRNase E/GやRNase Jにより制御されている。

① 標的 mRNA と相補的な small RNA を発現



② 二本鎖 RNA の形成



③ RNase III による切断

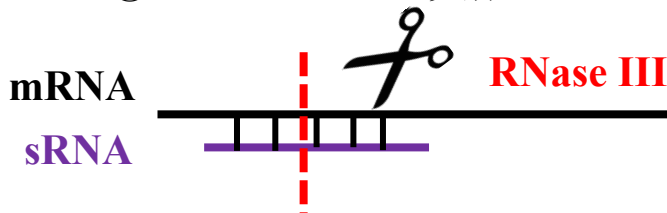


図. 4-2 small RNA を用いた RNase III による遺伝子発現抑制方法

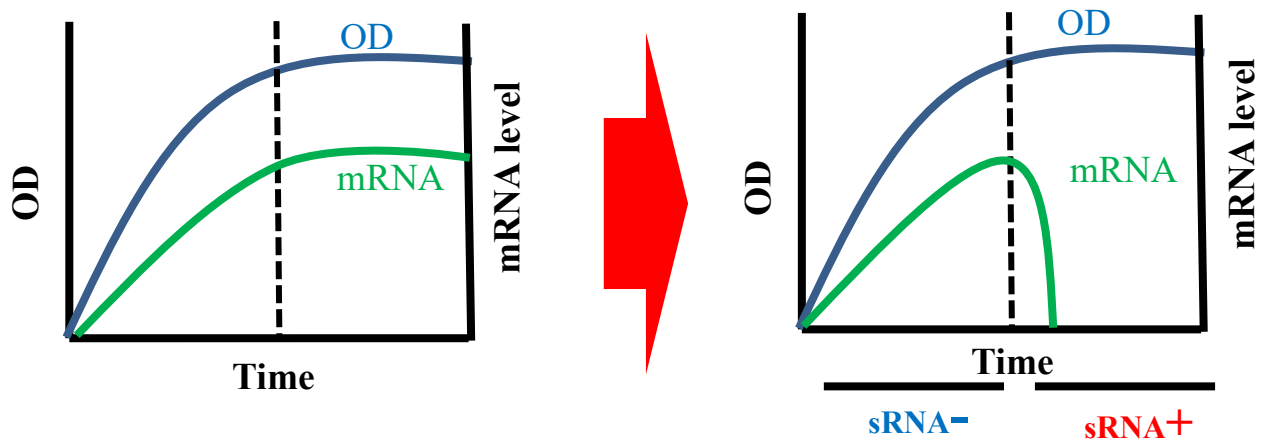
初めに、標的となる mRNA と相補的な small RNA を任意のタイミングで発現させる。この時 RNase III による切断が誘導できる配列にすることが必要となる。次に、菌体内で標的 mRNA と small RNA で二本鎖 RNA が形成される。最後に、RNase III が標的 mRNA の二本鎖を認識し切断を行う。

RNase 破壊による *rnc* 周辺の遺伝子クラスターの発現量への影響を解析したところ、*cgR_1956* の発現量が $\Delta rneG$ 株では約 3.33 倍増加し、 Δrnj 株では約 6.28 倍増加した。また、*rnc* E138A における *cgR_1956* の発現量について解析した結果、野生株と比較して発現量が約 2.5 倍増加した。以上の結果から *cgR_1956* は主要な RNase の 3 つから制御を受けていることが判明した。*cgR_1956* はプロテアーゼをコードしていると予想されるので、RNase 活性が低下し標的の mRNA が上昇した際に *cgR_1956* の発現

量を上昇させ、標的のタンパク質分解を促進することで発現を調節しているのではないかと予想される。

今後の展開として、遺伝子発現制御技術における RNase III を用いた人為的転写後制御方法の確立を目指している。この方法のメリットとしては RNase III が二本鎖 RNA を認識することから相補的 small RNA を誘導することで特定の mRNA 分解を促進することが可能となる点である (図. 4-2)。例えば、発酵生産時において、アミノ酸は菌体増殖に必要であり、これらの生合成経路を遮断してしまうと培養時にアミノ酸を添加する必要があり製造コストが増加する。加えて、増殖が終わる定常期においてもアミノ酸の合成は行われており、これにより収率の減少が問題となっている。その問題を解決するために、定常期にアミノ酸合成を抑制するため、転写抑制因子を用いた遺伝子発現の抑制が試みられた。しかしながら、転写抑制因子を発現させてもそれまで転写された mRNA を基に翻訳が進みタンパク質が発現する。そこで、標的 mRNA と相補的な small RNA を定常期に誘導発現させることで、二本鎖 RNA を形成させ RNase III による分解を行うことで発酵生産に不要な遺伝子の発現抑制をより強固に行うことが出来るようになる (図. 4-3)。しかしながらこの方法の問題点として、コリネ型細菌における RNase III の切断認識配列が決定されていないことが挙げられる。先行研究では、 Δrnc 株を用いたマイクロアレイ解析による RNase III のターゲット遺伝子の解析が行われたが、RNase III が直接切断に関与している遺伝子だけでなく、転写因子を介して間接的に制御している遺伝子もターゲット遺伝子の候補に含まれていることが考えられ、実際に直接切断されることが確認されたのは *mraZ* mRNA のみである。RNase III により直接切断される標的の探索方法として今回作製した RNase III 分解活性変異株を用いて免疫沈降を行い、結合した RNA を RNA-Seq 解析することで RNase III と結合し直接分解に関与している標的 RNA を同定する。この方法では標的 mRNA は判明するが認識配列は解明できないため、RACE 法や *in vitro* での解析を行い、切断点を決定する。

今後、RNase の認識配列の解析を進め、転写制御による高発現技術と組み合わせることにより、より有用な物質生産菌の構築が出来るのではないかと期待される。



増殖時には必要だが、定常期において不要な遺伝子の発現を抑制することで収率を増加

図. 4-3 small RNA を用いた RNase III の応用方法

アミノ酸など増殖時には必要となるが定常期以降は不要となり収率低下を引き起こす物質が存在する。定常期に標的となる mRNA と相補的な small RNA を誘導発現させることで二本鎖 RNA を形成し、RNase III による標的 mRNA の分解を行う。

第5章 謝辞

本研究を行うに当たり、数々の御指導ならびに、数々の御助言を賜りました
公益財団法人地球環境産業技術研究機構 バイオ研究グループ
乾 将行 グループリーダー
に厚く感謝申し上げます。

本研究を行うに当たり、直接的なご指導、御助言を賜りました
公益財団法人地球環境産業技術研究機構 バイオ研究グループ
田中 裕也 主任研究員
に深く感謝申し上げます。

本研究を行うに当たり、格別の御配慮を頂きました主指導教員である
奈良先端科学技術大学院大学 先端科学研究科 バイオサイエンス領域
ストレス微生物科学講座 高木 博史 教授
に心より御礼申し上げます。

本研究を行うに当たり、御指導、御助言を賜りました
奈良先端科学技術大学院大学 先端科学研究科 バイオサイエンス領域
環境微生物学講座 吉田 昭介 特任准教授
に心より御礼申し上げます。

研究遂行に当たり、配慮ならびに、指導をして頂きました
公益財団法人地球環境産業技術研究機構
バイオ研究グループの皆様
に心より御礼申し上げます。

第6章 参考文献

1. 横山益造. (2008). 「バイオリファイナリー技術の工業最前線：自動車用バイオ燃料の技術開発（第1章 バイオリファイナリー基本コンセプト）」,シーエムシー出版, pp. 3-20.
2. Kinoshita S, Udaka S, Shimono M. 1957. Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. J Gen Appl Microbiol. **3**:3-1957.
3. Andrea M, Abigail K, Karin K, Melanie B. 2015. Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* via mixed-acid fermentation. Appl Environ Microbiol. **81**:7496-7508.
4. 池田正人. 2006. アミノ酸発酵を変革するゲノムからのアプローチ. 信州大学農学部紀要 42:1-7.
5. Arraiano CM, Andrade JM, Domingues S, Guinote IB, Malecki M, Matos RG, Moreira RN, Pobre V, Reis FP, Saramago M, Silva IJ, Viegas SC. 2010. The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. FEMS Microbiol Rev. **34**:883-923.
6. 前田智也, 和知正明. 2015. 細菌における RNase を介した代謝制御：産業微生物コリネ型細菌を例に. Kagaku to Seibutsu **53**:99-106.
7. McDowall KJ, Hernandez RG, Lin-Chao S, Cohen SN. 1993. The *ams-1* and *rne-3071* temperature-sensitive mutations in the *ams* gene are in close proximity to each other and cause substitutions within a domain that resembles a product of the *Escherichia coli mre* locus. J Bacteriol. **175**:4245-4249.
8. Kushner SK. 2004. mRNA decay in prokaryotes and eukaryotes: different approaches to a similar problem. IUBMB Life. **56**:585-594.
9. Mathy N, Benard L, Pellegrini O, Daou R, Wen T, Condon C. 2007. 5'-to-3' exonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. Cell. **129**:681-692.

10. Maeda T, Wachi M. 2012. 3' Untranslated region-dependent degradation of the *aceA* mRNA, encoding the glyoxylate cycle enzyme isocitrate, by RNase E/G in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol.* **78**:8753-8761.
11. Maeda T, Tanaka Y, Takemoto N, Hamamoto N, Inui M. 2016. RNase III mediated cleavage of the coding region of *mraZ* mRNA is required for efficient cell division in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol.* **99**:1149-1166.
12. Takemoto N, Tanaka Y, Inui M. 2015. Rho and RNase play a central role in FMN riboswitch regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Nucleic Acids Res.* **43**:520-9.
13. Arraiano CM, Andrade JM, Domingues S, Guinote IB, Malecki M, Matos RG, Moreira RN, Pobre V, Reis FP, Saramago M, Silva IJ, Viegas SC. 2010. The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiol Rev.* **34**:883–923.
14. Robertson HD, Webster RE, Zinder ND. 1968. Purification and properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **243**:82–91.
15. Blaszczyk J, Tropea JE, Bubunenko M, Routzahn KM, Waugh DS, Court DL, Ji X. 2001. Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure.* **9**:1225–1236.
16. Conrad C, Rauhut R. 2002. Ribonuclease III: new sense from nuisance. *Int J Biochem Cell Biol.* **34**:116–129.
17. Nicholson AW. 2003. The ribonuclease superfamily: forms and functions in RNA maturation, decay, and gene silencing. In *RNAi: a guide to gene silencing*. Hannon, G.J. (ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 149–174.
18. Ji X. 2006. Structural basis for non-catalytic and catalytic activities of ribonuclease III. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **62**:933– 940.
19. Condon C, Putzer H. 2002. The phylogenetic distribution of bacterial ribonucleases. *Nucleic Acids Res.* **30**:5339-5349.
20. MacRae IJ, Doudna JA. 2007. Ribonuclease revisited: structural insights into

- ribonuclease III family enzymes. *Curr Opin Struc Biol.* **17**:138–145.
21. Yang J, Suzuki M, McCarty DR. 2016. Essential role of conserved DUF177A protein in plastid 23S rRNA accumulation and plant embryogenesis. *J Exp Bot.* **67**:5447-5460.
 22. Redko Y, Bechhofer DH, Condon C 2008. Mini-III, an unusual member of the RNase III family of enzymes, catalyses 23S ribosomal RNA maturation in *B. subtilis*. *Mol Microbiol.* **68**:1086-106.
 23. Główny, D, Pianka D, Sulej AA, Kozłowski ŁP., Czarnecka J, Chojnowski G, Skowronek KJ, Bujnicki JM. 2015. Sequence-specific cleavage of dsRNA by Mini-III RNase. *Nucleic Acids Res.* **43**:2864–2873.
 24. Lamontagne B, Larose B, Boulanger J, Elela SA. 2001. The RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. *Curr Issues Mol Biol.* **3**:71-78.
 25. One M, Kuwano M. 1979. A conditional lethal mutation in an *Escherichia coli* strain with a longer chemical lifetime of messenger RNA. *J Mol Biol.* **129**:343-357.
 26. Ma E, MacRae IJ, Kirsch JF, Doudna JA. 2008. Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *J Mol Biol.* **380**:237–243.
 27. Li H, Nicholson AW. 1996. Defining the enzyme binding domain of a ribonuclease III processing signal. Ethylation interference and hydroxyl radical footprinting using catalytically inactive RNase III mutants. *EMBO J.* **15**:1421–1433.
 28. Li H, Chelladurai BS, Zhang K, Nicholson AW. 1993. Ribonuclease III cleavage of a bacteriophage T7 processing signal. Divalent cation specificity, and specific anion effects. *Nucleic Acids Res.* **21**:1919-1925.
 29. Nicholson AW. 2014. Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage. *WIREs RNA.* **5**:31-48.
 30. Court DL, Gan J, Liang Y, Shaw GX, Tropea J E, Costantino N, Waugh DS, Ji X. 2013. RNase III: genetics and function; structure and mechanism. *Annu Rev Genet.* **47**: 405–431.

31. Even S, Pellegrini O, Zig L, Labas V, Vinh J, Brechemmier-Baey D, Putzer H. 2005. Ribonucleases J1 and J2: two novel endoribonucleases in *B. subtilis* with functional homology to *E. coli* RNase E. *Nucleic Acids Res.* **33**:2141-2152.
32. Mtra S, Bechhofer DH. 1994. Substrate specificity of an RNase III-like activity from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.* **269**:31450-31456.
33. Herskovitz MA, Bechhofer DH. 2000 Endoribonuclease RNase III is essential in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* **38**:1027-1033.
34. Condon C. 2003. RNA processing and degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **67**:157-174.
35. Blaszczyk J, Tropea JE, Bubunenko M, Routzahn KM, Waugh DS, Court DL, Ji X. 2001. Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure.* **9**:1225–1236.
36. Kwon SC, Nguyen TA, Choi Y, Jo MH, Hohng S, Kim VN, Woo J. 2015. Structure of Human DRISHA. *Cell.* **164**:81-90.
37. Nguyen TA, Jo MH, Choi Y, Park J, Kwon SC, Hohng S, Kim VN, Woo J. 2015. Functional anatomy of the Human Microprocessor. *Cell.* **161**:1374-1387.
38. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. 2001 Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* **409**:363–366.
39. Taylor DW, Ma E, Shigematsu H, Cianfrocco MA, Noland CL, Nagayama K, Nogales E, Doudna JA, Wang H. 2013. Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol.* **20**:662-670.
40. Svobodova E, Kubikova J, Svoboda P. 2016. Production of small RNAs by mammalian Dicer. *Eur J Physiol.* **468**:1089-1102.
41. Kurzynska-Kokorniak A, Pokornowska M, Koralewska N, Hoffmann W, Bienkowska-Szewczyk K, Figlerowicz M. 2016. Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain *in vitro*. *Sci rep.* **6**:23989.

42. Krainer A. 1997. Eukaryotic mRNA processing. New York: IRL Press.
43. Filippov V, Solovyev V, Filippova M, Gill SS. 2000. A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene*. **245**:213–221.
44. Sun W, Li G, Nicholson AW. 2004. Mutational analysis of the nuclease domain of *Escherichia coli* ribonuclease III. Identification of conserved acidic residues that are important for catalytic function in vitro. *Biochemistry*. **43**:13054–13062.
45. Frazier AD, Champney WS. 2012. Impairment of ribosomal subunit synthesis in aminoglycoside-treated ribonuclease mutants of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*. **194**:1033-1041.
46. Court DL, Gan J, Liang YH, Shaw GX, Tropea JE, Costantino N, Waugh DS, Ji X. 2013. RNase III: genetics and function; structure and mechanism. *Annu Rev Genet*. **47**:405-431.
47. Nicholson AW. 1999. Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev*. **23**:371-390.
48. Matsunaga J, Simons EL, Simons RW. 1996. RNase III autoregulation: structure and function of *rncO*, the posttranscriptional “operator”. *RNA*. **2**:1228-1240.
49. Takiff HE, Chen S, Court DL. 1989. Genetic analysis of the *rnc* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **171**:2581-90.
50. Battesti A, Majdalani N, Gottesman S. 2011. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*. **65**:189–213.
51. Aristarkhov A, Mikulskis A, Belasco JG, Lin EC. 1996. Translation of the *adhE* transcript to produce ethanol dehydrogenase requires RNase III cleavage in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **178**:4327-4332.
52. Regnier P, Portir C. 1986. Initiation, attenuation and RNase III processing of

transcripts from the *Escherichia coli* operon encoding ribosomal protein S15 and polynucleotide phosphorylase. *J Mol Biol.* **187**:23-32.

53. Regnier P, Grunberg-Manago M. 1990. RNase III cleavages in non-coding leaders of *Escherichia coli* transcripts control mRNA stability and genetic expression. *Biochimic.* **72**:825-834.
54. Robert-Le Meur M, Portier C. 1992. *E. coli* polynucleotide phosphorylase expression is autoregulated through an RNase III-dependent mechanism. *EMBO J.* **11**: 2633-2641.
55. Jarrige AC, Mathy N, Porter C. 2001. PNPase autocontrols its expression by degrading a double-stranded structure in the *pnp* mRNA leader. *EMBO.* **20**: 6845-6855.
56. Gordon GC, Cameron JC, Pflieger BF. 2017. RNA sequencing identifies new RNase III cleavage sites in *Escherichia coli* and reveals increased regulation of mRNA. *mBio.* **8**:e00128-17.
57. Durand S, Gilet L, Condon C. 2012. The Essential of *B. subtilis* RNase III is to silence foregin toxin genes. *Plos Genet.* **8**:e1003181.
58. Wang W, Bechhofer DH. 1997. *Bacillus subtilis* RNase III gene: cloning, function of the gene in *Escherichia coli*, and Construction of *Bacillus subtilis* Strains with Altered *rnc* Loci. *J Bacteriol.* **179**:7379-7385.
59. Kim KS, Manasherob R, Cohen SN. 2008. YmdB: a stress-responsive ribonuclease-binding regulator of *E. coli* RNase III activity. *Genes Dev.* **22**:3497-3508.
60. Yukawa H, Omumasaba CA, Nonaka H, Kos P, Okai N, Suzuki N, Suda M, Tsuge Y, Watanabe J, Ikeda Y, Vertes AA, Inui M. 2007. Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. *Microbiology.* **153**:1042-1058.
61. Maeda T, Tanaka Y, Wachi M, Inui M. 2017. Polynucleotide phosphorylase,

RNase E/G, and YbeY are involved in the Maturation of 4.5S RNA in *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol. **199**:798-816.

62. Inui M, Kawaguchi H, Murakami S, Vertes AA, Yukawa H. 2004. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen- deprivation conditions. J Mol Biotechnol. **8**:243-254.
63. Kubota T, Tanaka Y, Takemoto N, Watanabe A, Hiraga K, Inui M, Yukawa H. 2014. Chorismate-dependent transcriptional regulation of quinate/shikimate utilization genes by LysR-type transcriptional regulator QsuR in *Corynebacterium glutamicum*: carbon flow control at metabolic branch point. Mol Microbiol. **92**:356-368.
64. Lioliou E, Sharma MC, Caldelari I, Helfer A-C, Fechter P, Vandenesch F, Vogel J, Romby P. 2012. Global regulatory functions of the *Staphylococcus aureus* endoribonuclease III in gene expression. Plos Genet. **8**:e1002782.
65. Tanaka Y, Hamamoto N, Sawa M., Inui M. 2022. Regulation of ribonuclease J expression in *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol. **204**:e0005322.
66. Mackie GA. 2013. RNase E: At the interface of bacterial RNA processing and decay. Nat Rev Microbiol. **11**: 45-57.