

平成 28 年度 研究経過報告書

研究者名

加藤 明宣

研究課題名

dsRNA 依存的な新規リボゾームプロファイリング法の開発と tail-to-tail 遺伝子相互作用によるフィードバック調節機構の包括的解析

研究目的・内容

細菌ゲノムでは、整然・密な ” オペロン群 ” の傍で、逆向きに隣接した tail-to-tail (→ ←) 遺伝子配座領域も頻繁に認められる。これは単に、遺伝子のオペロン整列化と細菌ゲノムの小型効率化の副産物なのか。本研究において、dsRNA 依存的リボゾームプロファイリング (RP) 法を開発し、堅牢な病原性・薬剤耐性調節を示すサルモネラ菌ゲノムでの tail-to-tail 遺伝子相互作用を包括的に解析することで、新規な転写翻訳・微調節機構の解明を目指す。

研究の経過

これまでに、採択者は tail-to-tail (→ ←) 遺伝子配座領域におけるオペロンの 3' 端にコードされるタンパク質のみが、反対向き遺伝子の転写依存的に抑制される現象の一例を見出した。そこにリボゾームの停止とそれを回避するレスキュー機構が重要な役割を担っている証拠が増えつつある。本研究計画において、ストッパーモデル『細菌の共役した転写翻訳過程で、リボゾーム一時停止の際に現れる、2 本鎖 RNA (dsRNA) 形成が tail-to-tail 遺伝子相互作用を引き起こす』-の普遍性について、開発途上の dsRNA 依存的リボゾームプロファイリング (RP) 法により包括的に解析することを試みた。

従来 RP 法を改良し、dsRNA-モノソーム複合体を濃縮する工程を加えた dsRNA 依存的 RP 法の開発を行なった。サルモネラ菌からポリソームを抽出し、これを MNase I にて部分消化するための条件検討を行い、次に、dsRNA-モノソームを回収するためのバッファー条件とそれに続くリボゾームフットプリントを得るための MNase I による完全消化条件についても最適化した。得られたリボゾームフットプリントを cDNA 化、インデックス化し、次世代シーケンサーにてそれぞれのサンプルにつき 4 Gb 程度のリード数を取得、BOWTIE にてリードをサルモネラ菌ゲノム上にマッピングした。

開発中の手法での初めてのプレップであり、サンプルの質がまだ不十分であったため、ゲノムにマッピングされたリードの割合は極めて低い状況であることが判明した。しかし本手法では特定の分子種のみを濃縮しているゆえ、検出されやすい tail-to-tail 遺伝子配座領域を特定するには十分なデータ量であった。最もカウント数が多いペア遺伝子 (→ ←) グループは、同一の代謝経路に関わることが見出され、dsRNA 依存的なリボゾーム停止とその代謝産物との関連性が示唆された。さらに、dsRNA 形成を促す下流側遺伝子もある特徴を有することが判明した。

一方で、本手法にて解析しようとした上記遺伝子で得られたカウント数はまだ少なく、よ

り包括的な解析の実現のために、技術的にデータ密度を向上させる必要がある。

本研究と関連した今後の研究計画

今回、dsRNA-RP 法にて最も dsRNA 依存的にリボゾーム停止を引き起こすトップペア遺伝子群が検出された。よって、それらの遺伝子ペアをモデルとしタンパク質発現を個別にウェスタンで解析し、下流遺伝子発現に依存したタンパク質レベルの低下や、翻訳停止により現れる新生鎖断片を確認する。更には、Toe プリンティング法で、in vitro において翻訳停止に関わるエレメントを特定することで、詳細な分子機構を解析する。

また、本研究における dsRNA-RP 法の開発が、dsRNA 形成に依存した tail-to-tail 遺伝子相互作用を検出する新規の手法として正しく進展していることを示した。今後も、この dsRNA-RP 法の検出感度を高めることで、より包括的な解析が実現できる。更に、従来型 RP 法がそうであるように、dsRNA-RP 法もある種の抗生物質の効き方を調べる為の強力な手法となる可能性が高く、抗菌剤開発にも役立つ。

成果の発表

発表機関名	種類（著書・雑誌・口頭）	発表年月日(予定を含む)
東京農業大学生物資源ゲノム解析センター	ニュースレター	平成 29 年 3 月
J Gen Appl Microbiol.	学術論文	平成 28 年 9 月 23 日
J Gen Appl Microbiol.	学術論文	平成 28 年 11 月 8 日
J Gen Appl Microbiol.	学術論文	in press

(平成 29 年 3 月 31 日現在)