

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16635

研究課題名(和文) 遺伝子制御ネットワークの構築によるサルモネラ菌の薬剤耐性獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of drug-resistant mechanism in Salmonella infection by construction of gene regulatory network

研究代表者

川田 健太郎 (Kawata, Kentaro)

東京大学・アイソトープ総合センター・特任助教

研究者番号：50825007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：サルモネラ菌は抗菌薬投与にตอบสนองし、非増殖状態に移行することで抗菌薬耐性を高めることが知られている。本研究では、薬物にตอบสนองした遺伝子制御ネットワークに着目し、サルモネラ菌の抗菌薬負荷にตอบสนองした非増殖状態への移行メカニズムを明らかにすることを目的とした。遺伝子制御ネットワーク同定の一環として、特定の環境下に置かれた細胞内RNAの転写と分解を同時かつ網羅的に計測する手法を開発している。また同時に、細胞内RNAの安定性を制御する機能性RNA配列を探索する手法を開発している。これらの本研究成果は、既に論文として掲載済みである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、サルモネラ菌の薬剤耐性移行メカニズムを遺伝子制御ネットワークの観点から解明するものである。またその過程として、(1)細胞内RNAのダイナミクスを網羅的に解明するDyrec-seq、(2)細胞内RNAの安定性を人為的に制御する配列を探索するFate-seqを開発した。これらの研究成果は、感染症の予防や対策における意義を有するのはもちろんであるが、同時に他の細胞の状態変化原理の解明・制御に対しても重要な視点を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：It is reported that Salmonella shift to a nonproliferative state in response to antimicrobial drug administration to enhance antimicrobial resistance. In this research, we focused on the drug-responsive gene regulatory network to elucidate the mechanism of Salmonella transition to the nonproliferative state in response to antimicrobial drug. As part of the gene regulatory network analysis, we developed a method for simultaneous measurement of transcription and degradation of intracellular RNAs comprehensively under specific environmental conditions. At the same time, we developed a method to search for functional RNA sequences that regulate the stability of intracellular RNAs. These results have already been published.

研究分野：システムゲノム科学

キーワード：遺伝子制御ネットワーク 代謝標識 転写制御 RNA分解制御 RNAダイナミクス サルモネラ菌

1. 研究開始当初の背景

Salmonella 感染症は本邦における代表的な食中毒の一つである。また本菌の一種である *S. Typhi* の感染は腸チフスを引き起こし、その対策はいまだ公衆衛生上の大きな課題となっている (Shu-Kee et al., 2015)。臨床治療において、抗菌薬の投与は効果に乏しく、排菌を長期化させることで周囲への感染源となりうる (Neill et al., 1991)。そのため *Salmonella* 感染症治療では、輸液や解熱等の対症療法が中心であり、有効な根治療法はいまだ確立されていない。

細胞に侵入した *Salmonella* の一部は非増殖状態となる。非増殖状態 *Salmonella* では抗菌薬に対する感受性が低下し、長期の排菌を引き起こす原因となる。近年、抗菌薬投与により細胞内での非増殖状態 *Salmonella* の割合が増加することが明らかになった (Saliba et al., 2016)。これらの報告は *Salmonella* が抗菌薬負荷に応答して非増殖状態に移行することで、ゲノム変化を伴わずに抗菌薬に対する感受性を低下させる可能性を示唆している (図 1)。

Salmonella の感染に対し、宿主細胞は多くの遺伝子発現制御を介した免疫応答を行い、一方で感染 *Salmonella* は多様な遺伝子の発現を制御することで宿主の免疫応答を回避する。これらの遺伝子発現は、翻訳産物であるタンパク質の輸送を介して相互に影響を与えあう。言い換えると *Salmonella* の病原性は、宿主と *Salmonella* 遺伝子間を横断する遺伝子制御ネットワークのリモデリングによって制御される。さらに、抗菌薬負荷などの細胞内環境変化は宿主-*Salmonella* 間遺伝子制御ネットワークに摂動を与えて、その病原性に影響する。従って抗菌薬投与による宿主-*Salmonella* 遺伝子制御ネットワークの変化を明らかにし、非増殖状態への移行メカニズムをシステムとして解明することが重要な課題となる。

2. 研究の目的

抗菌薬投与時の *Salmonella* の非増殖状態への移行が、どのように宿主-*Salmonella* 間の遺伝子制御ネットワークにより制御されるかという点が、本研究課題の学術的「問い」に相当する。上記の問いに答えるため本研究課題では、抗菌薬投与による *Salmonella* の非増殖状態への移行メカニズムを解明し、効果的な多剤併用療法を設計することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、共同研究により開発された *Salmonella* および宿主細胞における遺伝子発現を同時計測する「Dual Microarray」を用いて抗菌薬負荷の有無における遺伝子制御ネットワークを構築・比較することで、*Salmonella* が抗菌薬負荷に応答して非増殖状態に移行する際の遺伝子制御ネットワーク同定を予定した。さらに、これらのネットワークのハブとなる分子を同定し低分子化合物による阻害を行うことで、*Salmonella* の非増殖状態への移行を阻害することを予定した。

具体的には初めに Dual Microarray を用いて *Salmonella* 感染細胞の網羅的な遺伝子発現を同時計測する。ここでは宿主細胞として、生体内の持続感染宿主である骨髄由来マクロファージ (M) を用い、増殖性および非増殖性 *Salmonella* 含有 M をから Dual Microarray を用いて遺伝子発現プロファイルを取得する。次に取得した遺伝子発現プロファイルから発現変動遺伝子を同定し、M -*Salmonella* 遺伝子制御ネットワークを構築する。非増殖性

および増殖性 *Salmonella* 含有 M の遺伝子制御ネットワークを比較し、非増殖性 *Salmonella* 含有 M に特異的なネットワークを同定する。最後に非増殖性 *Salmonella* 含有 M に特異的なネットワークからハブとなる分子を同定し、RNA 干渉 (RNAi) によるノックダウン実験を行う。これにより薬剤標的分子を絞り込み、薬剤応答データベースから標的分子の阻害薬を探索することで多剤併用療法の候補薬剤を決定する。

4 . 研究成果

本研究では宿主-*Salmonella* 間の遺伝子制御ネットワーク構築にあたり、当初の計画を変更して次世代シーケンサ (NGS) を用いたトランスクリプトーム解析を用いた。またこれに先駆けて、細胞内 RNA の転写と分解を同時かつ網羅的に計測する手法「Dyrec-seq」を開発した。本手法では細胞内 RNA を核酸アナログの一種である 4-チオウリジン (4sU) および 5-プロモウリジン (BrU) で標識し、これらの標識 RNA の時間変動を NGS を用いて計測することで、各 RNA のダイナミクスを推定する。遺伝子制御ネットワークにおいて、上流遺伝子の発現量は、より正確には下流遺伝子の転写速度や RNA 分解速度を制御するため、本手法の開発により、より実際性の高い遺伝子制御ネットワーク構築が可能となる。本成果は、既に論文として *Genome research* 誌に掲載済みである (Kawata et al., 2020, *Genome research*)。また同研究において、特定の条件下では 4sU 単独標識により細胞内 RNA の転写と分解を同時に推定することが可能であるとの知見を得た。現在これを拡張し、4sU による単独標識を施した細胞から RNA のダイナミクスを推定する新規手法を開発しており、論文投稿準備中である。また遺伝子制御ネットワークの解析と共に、これらを人為的に制御する手法についても並行した開発を進めている。上記の通り、遺伝子制御ネットワークにおいて上流遺伝子は、下流遺伝子の転写と RNA 分解を制御する。したがって、細胞内 RNA の安定性を制御する機能性 RNA 配列を探索し、これらを細胞内 RNA に組み込むことで、人為的に遺伝子制御ネットワークの詳細な制御が可能になる。本研究成果は、既に論文として *BBRC* 誌に掲載済みである (Kawata et al., 2020, *BBRC*)。現在、これらの手法を細胞の状態変化に応用する解析に取り組んでおり、サルモネラ菌感染細胞における遺伝子制御ネットワークの同定へと繋げることを予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shirahama Shintaro, Onoguchi-Mizutani Rena, Kawata Kentaro, Taniue Kenzui, Miki Atsuko, Kato Akihisa, Kawaguchi Yasushi, Tanaka Rie, Kaburaki Toshikatsu, Kawashima Hidetoshi, Urade Yoshihiro, Aihara Makoto, Akimitsu Nobuyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Long noncoding RNA U90926 is crucial for herpes simplex virus type 1 proliferation in murine retinal photoreceptor cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19406 ~ 19406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76450-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hoshino Daisuke, Kawata Kentaro, Kunida Katsuyuki, Hatano Atsushi, Yugi Katsuyuki, Wada Takumi, Fujii Masashi, Sano Takanori, Ito Yuki, Furuichi Yasuro, Manabe Yasuko, Suzuki Yutaka, Fujii Nobuharu L., Soga Tomoyoshi, Kuroda Shinya	4. 巻 23
2. 論文標題 Trans-omic Analysis Reveals ROS-Dependent Pentose Phosphate Pathway Activation after High-Frequency Electrical Stimulation in C2C12 Myotubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101558 ~ 101558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101558	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawata Kentaro, Wakida Hiroyasu, Yamada Toshimichi, Taniue Kenzui, Han Han, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Akimitsu Nobuyoshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Metabolic labeling of RNA using multiple ribonucleoside analogs enables the simultaneous evaluation of RNA synthesis and degradation rates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genome Research	6. 最初と最後の頁 1481 ~ 1491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gr.264408.120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sun Xiaoning, Kawata Kentaro, Miki Atsuko, Wada Youichiro, Nagahama Masami, Takaya Akiko, Akimitsu Nobuyoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Exploration of <i>Salmonella</i> effector mutant strains on MTR4 and RRP6 degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioScience Trends	6. 最初と最後の頁 255 ~ 262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/bst.2020.03085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wakida Hiroyasu, Kawata Kentaro, Yamaji Yuta, Hattori Emi, Tsuchiya Takaho, Wada Youichiro, Ozaki Haruka, Akimitsu Nobuyoshi	4. 巻 527
2. 論文標題 Stability of RNA sequences derived from the coronavirus genome in human cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 993 ~ 999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kentaro Kawata and Nobuyoshi Akimitsu
2. 発表標題 Development of a system for simultaneous measurement of RNA synthesis and degradation rates using modified nucleic acids
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川田 健太郎, 脇田 寛泰, 鈴木 穰, 秋光 信佳
2. 発表標題 修飾核酸を用いた転写およびRNA 分解の同時測定手法の開発
3. 学会等名 第19回 東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川田 健太郎, 脇田 寛泰, 関 真秀, 鈴木 穰, 秋光 信佳
2. 発表標題 修飾核酸を用いた転写およびRNA分解の同時測定手法の開発
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kentaro Kawata, Hiroyasu Wakida, Masahide Seki, Yutaka Suzuki, Nobuyoshi Akimitsu
2. 発表標題 Development of simultaneous measurement system for transcription and RNA degradation rates using modified nucleic acids
3. 学会等名 EMBO EMBL symposia Multiomics to Mechanisms - Challenges in Data Integration (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kentaro Kawata, Hiroyasu Wakida, Yutaka Suzuki, Nobuyoshi Akimitsu
2. 発表標題 Development of simultaneous measurement system for transcription and RNA degradation rates using modified nucleic acid
3. 学会等名 The 20th International Conference on Systems Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 入江 浩之、椛島 健治	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 139
3. 書名 実験医学2021年2月号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------