

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19063

研究課題名（和文）オペロンmRNA間の塩基対形成による新規連続代謝反応の実現と応用

研究課題名（英文）Novel continuous metabolic reactions through base-pairing interaction between operon mRNAs and its application

研究代表者

宮腰 昌利（Miyakoshi, Masatoshi）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：60755809

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：原核生物のオペロンmRNAは3'UTRからsmall RNA (sRNA) を生成する。本研究は、mRNAの3'UTRからプロセシングを経て生成するsRNAが通常のsRNAと同様に標的mRNAと塩基対形成するのか、もしくは3'UTRに制御配列を持つmRNA自体が標的mRNAと塩基対形成するかを検証する。mRNAの終止コドン直下流のRNase E切断サイトの変異により標的遺伝子の抑制が起きないことを明らかにした。したがって、3'UTRに制御配列を持つmRNAではなく、切り離されたsRNAが標的mRNAと塩基対形成することで転写後調節が起きることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、原核生物のオペロンmRNAの3'UTRに由来するsRNAが、標的遺伝子の転写後調節を行うためにはプロセシングを受けて切り離される必要があり、3'UTRがmRNAから切り離されない状態では標的遺伝子の抑制が起きないことを示した。原核生物の遺伝子発現制御において、転写によって生成する1mRNAがタンパク質を翻訳するだけでなく、同時にプロセシングを経て転写後調節機能を持つsRNAを生成することを明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：Prokaryotic operon mRNAs generate small RNAs (sRNAs) from their 3'UTRs. In this study, we examine whether sRNAs processed from the 3'UTR of mRNAs base-pair with target mRNAs, or whether mRNAs with regulatory sequences in the 3'UTR themselves base-pair with target mRNAs. We demonstrate that target repression does not occur when the RNase E cleavage site immediately downstream of the mRNA stop codon is mutated. This indicates that post-transcriptional regulation occurs by base-pairing with the target mRNA of the processed sRNA, not with the mRNA.

研究分野：応用微生物学

キーワード：転写後調節 small RNA 3'UTR オペロン 代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸菌・サルモネラにおいて mRNA の 3'UTR が塩基対形成によって他の RNA の安定性を制御することが見出され、mRNA の 3'UTR が新規の small RNA (sRNA) であることが明らかになってきた。TCA 回路酵素群をコードする *sucABCD* オペロンの *sucD* 3'UTR から生成する sRNA SdhX は、*ackA* をはじめとする複数の標的 mRNA の 5'UTR と塩基対形成し、発現を抑制することを明らかにした (Miyakoshi et al., 2019 Nucleic Acid Res.)。当初の予想に反して、発現の顕著な抑制は SdhX を人為的に過剰発現した場合に限り、TCA サイクル酵素群が高発現する酢酸を炭素源とする培養条件でも SdhX の発現量は変化せず、*ackA* の抑制も顕著ではないことに気づいた。このことから、*sucD* mRNA の 3'UTR と *ackA* mRNA の 5'UTR が塩基対形成することには、従来の sRNA の機能として考えられてきた発現「量」の調節以外に重要な役割があることが推察された。

### 2. 研究の目的

原核生物のオペロン mRNA は複数のタンパク質をポリシストロニックにコードするだけでなく、その 3'UTR から遺伝子発現制御能を持つ sRNA を生成する。単独の転写産物として発現する通常の sRNA は、多くの場合標的 mRNA の 5'UTR と塩基対形成して、翻訳阻害もしくは mRNA 分解を引き起こす。本研究は、mRNA の 3'UTR からプロセシングを経て生成する sRNA が通常の sRNA と同様に、実際に細胞内で標的 mRNA と塩基対形成するのか、もしくは 3'UTR に制御配列を持つ mRNA 自体が標的 mRNA と塩基対形成することが可能であるかを検証する。

### 3. 研究の方法

#### a. オペロンを超えた mRNA-mRNA 複合体の翻訳の検証

研究対象には塩基対を形成することが明らかになっている *sucD* mRNA と *ackA* mRNA のペア (Miyakoshi et al., 2019 Nucleic Acid Res.) と、*glnA* mRNA と *sucA* mRNA のペア (Miyakoshi et al., 2022 eLife) を用いた。大腸菌において *glnA* 3'UTR は約 200 塩基の sRNA、GlnZ を生成する。*glnA* は窒素飢餓条件で誘導されることが知られており、GlnZ も同様にグルタミンを窒素源として培養した際に顕著に誘導される。しかしながら、mRNA の終止コドン直下流の RNase E 切断サイトに塩基置換を導入したところ、*glnA* は窒素飢餓条件で誘導されるにも関わらず、GlnZ は発現しない。各種大腸菌株を各種培地で培養し、共焦点レーザー走査型顕微鏡、活性化確率的光学再構築顕微鏡 (dSTORM) を用いて RNA 局在を解析した。

#### b. AlphaFold2 による複合体予測解析

3'UTR に制御配列を持つ mRNA 自体が標的 mRNA と塩基対形成することが可能であれば、塩基対形成する mRNA 分子間をリボソームが連続して翻訳する可能性が想定された。異なる遺伝子座から翻訳されるタンパク質が複合体を形成することが可能であるかを検証するため、AlphaFold2 による複合体予測解析を行った。

### 4. 研究成果

#### a. オペロンを超えた mRNA-mRNA 複合体の翻訳の検証

大腸菌の 3'UTR プロセシングに必須のエンドリボヌクレアーゼである RNase E の野生株もしくは温度感受株を比較したところ、プロセシングの阻害によって制御性 3'UTR と標的 5'UTR の共同在性が減少する傾向にあることが示された。しかしながら、制御性 3'UTR の標的 5'UTR との塩基対形成に必須の塩基を置換しても共同在性に変化が見られなかった。したがって、本研究の方法では RNA の局在が定量的に解析できない可能性が示唆された。

mRNA の 3'UTR からのプロセシングが制御性 3'UTR 由来 sRNA による標的遺伝子の制御に必須であるかを検証するため、mRNA の終止コドン直下流の RNase E 切断サイトに塩基置換を導入した。GlnZ は RNase E によって 2 ヶ所の塩基配列でプロセシングされることが塩基変異解析によって明らかになった。GlnZ を sRNA として発現しないが、3'UTR には *sucA* と塩基対形成する配列を含む変異型 *glnA* mRNA を作成し、アラビノース誘導性プロモーターから転写するプラスミドを構築した。変異型 *glnA* mRNA は野生型と同等のグルタミン合成酵素を発現するにも関わらず、2-オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼの発現抑制が見られなかった。したがって、GlnZ はプロセシングによって mRNA から遊離して初めて機能を発揮することが示された。

以上から、mRNA 3'UTR 由来 sRNA が標的遺伝子の転写後調節を行うためにはプロセシングが必須であり、3'UTR が mRNA から切り離されない状態では標的遺伝子の抑制が起きないことを当初計画していた実験手法とは異なる戦略で明らかにすることができた。本研究成果の一部は 2022 年 11 月に eLife に発表した。

#### b. AlphaFold2 による複合体予測解析

異なる遺伝子座から翻訳されるタンパク質が複合体を形成することが可能であるかを検証するため、AlphaFold2 による複合体予測解析を行った。ポリシストロニックにコードされる同一オペロンの遺伝子産物は既知のタンパク質構造と合致する複合体が予測されたが、異なるオペロンの遺伝子産物はヘテロ複合体を形成しないことが予測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyakoshi Masatoshi, Morita Teppei, Kobayashi Asaki, Berger Anna, Takahashi Hiroki, Gotoh Yasuhiro, Hayashi Tetsuya, Tanaka Kan	4. 巻 11
2. 論文標題 Glutamine synthetase mRNA releases sRNA from its 3' UTR to regulate carbon/nitrogen metabolic balance in Enterobacteriaceae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e82411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.82411	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 該当する

1. 著者名 Miyakoshi Masatoshi	4. 巻 77
2. 論文標題 Multilayered regulation of amino acid metabolism in Escherichia coli	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Current Opinion in Microbiology	6. 最初と最後の頁 102406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mib.2023.102406	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 ルジャー 朝紀、竹下 典男、宮腰 昌利
2. 発表標題 Exploring the cellular localization and processing of the 3'-UTR derived GlnZ sRNA by super-resolution imaging in Escherichia coli
3. 学会等名 第18回大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ルジャー 朝紀、竹下 典男、宮腰 昌利
2. 発表標題 Insights into the processing of the GlnZ small RNA from its parental glnA mRNA using super-resolution imaging in E. coli
3. 学会等名 第16回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Lejars A., Takeshita N., Miyakoshi M.
2. 発表標題 Exploring GcvB sRNA cellular localization and RNA target repartition by super-resolution imaging in Escherichia coli.
3. 学会等名 RNA & Microbes 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------