

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06190

研究課題名(和文) 通性嫌気性細菌の中心代謝経路を制御するmRNAクロストーク

研究課題名(英文) mRNA crosstalk regulates central metabolic pathway in facultative anaerobic bacteria

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) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：通性嫌気性細菌のTCA回路酵素群をコードするsdhCDAB-sucABCD オペロンmRNAの3' UTRから新しいタイプの機能性RNA SdhXが生成し、酢酸キナーゼをコードするackA mRNAの翻訳開始領域と塩基対形成して翻訳を抑制することを明らかにした。加えて、SdhXはサルモネラでは嫌気性フマラーゼをコードするfumBと機能未知遺伝子yfbVを、大腸菌ではギ酸デヒドロゲナーゼをコードするfdoGとカタラーゼをコードするkatGを特異的に制御することも示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、オペロンmRNAは同じ代謝経路の酵素タンパク質をコードするだけでなく、その3' UTRから機能性RNAを生成し、他の代謝経路の遺伝子発現を転写後レベルで制御することを明らかにした。したがって、セントラルドグマにおいて単に遺伝情報の仲介役と考えられていたmRNAに新しい機能を見出し、1961年にJacobとMonodによって提唱されたオペロン説の概念を拡張することができた。

研究成果の概要(英文)：mRNA encoded proteins in the same metabolic pathway but also produces a regulatory RNA. This study revealed that the TCA cycle operon mRNA of facultative aerobic bacteria, sdhCDAB-sucABCD, processes SdhX small RNA from its 3'UTR to post-transcriptionally regulate the ackA mRNA encoding acetate kinase via direct base-pairing mechanism. In addition, SdhX specifically regulates anaerobic fumarase gene fumB and unknown gene yfbV in Salmonella, while it regulates formate dehydrogenase gene fdoG and catalase gene katG in E. coli.

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：転写後調節 大腸菌 サルモネラ TCAサイクル small RNA Hfq

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原核生物において転写後調節を司る主要な因子である non-coding small RNA (sRNA) は mRNA とは独立に転写され、多くの場合では mRNA への *trans* の塩基対形成を通して翻訳開始と mRNA 安定性の二つのレベルで遺伝子発現を負もしくは正に制御する (図 1A)。このとき、sRNA と標的 mRNA の相補配列は不完全で短いため、塩基対形成を促進する RNA シャペロン Hfq が必要である。原核生物では sRNA の結合部位は mRNA の 5' UTR から CDS に分布し、真核生物の場合とは異なり、3' UTR が制御を受ける場となる例は稀である。

Hfq 依存性 sRNA は Rho 因子非依存的に転写終結し、RNA ターミネーター配列の 3' 末端の連続した U は Hfq 結合配列として機能する。それ以外の領域には標的 mRNA への特異性を決定する任意の相補配列が位置する。従って、上記の条件を満たせば mRNA の 3' UTR が典型的な Hfq 依存性 sRNA と同様に mRNA を *trans* に制御することが理論的に可能である。

2. 研究の目的

mRNA の 3' UTR から派生する sRNA は少なくとも大腸菌やサルモネラにおいて 30 種類以上存在する。通性嫌気性細菌に広く保存されている *sdhCDAB-sucABCD* オペロンは TCA 回路の 3 段階の変換を触媒する酵素群をコードし、約 10,000 塩基の mRNA として転写されが、その 3' UTR から生成する RybD (SdhX と命名) は高い保存性と中心的な代謝遺伝子に局在することから特に興味深い Hfq 結合性 sRNA である。本研究は、SdhX の標的 mRNA を同定し、mRNA の 3' UTR を介した制御ネットワークを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

SdhX の発現様式

サルモネラ SL1344 株を LB 培地もしくは MOPS 培地で浸透培養した。MOPS 培地には炭素源として 0.2% グルコースもしくは 40 mM 酢酸ナトリウムを加えた。各生育期において菌体を回収し、ウェスタンブロット解析およびノーザンブロット解析に供した。

SdhX の標的遺伝子の予測と制御解析

標的遺伝子を塩基配列予測プログラム Copra RNA を使用して、潜在的シード配列と相補的かつ保存性の高い塩基配列を腸内細菌科ゲノムから抽出した。予測された標的 mRNA が実際に塩基対を形成して制御されるか検証するため、その標的 mRNA の GFP 翻訳融合体を発現するプラスミドを作成した。SdhX を構成的に発現するプラスミドとともに同一大腸菌株を形質転換し、ベクターコントロールと比較して GFP 蛍光強度が増減することを蛍光マイクロプレートリーダーで定量解析した。変動が検出された標的 mRNA について、予想された塩基対にそれぞれ変異を導入すると制御能が失われ、SdhX とその標的 mRNA 両方に相補的変異を導入すると制御能が回復することを確認した。

生理学的条件における AckA の制御解析

AckA に C 末端 FLAG タグ付加するサルモネラ SL1344 株変異株を作成し、0.2% グルコースもしくは 40 mM 酢酸ナトリウムを炭素源とする MOPS 培地で浸透培養した。ウェスタンブロット解析によって AckA の発現を検出した。

SdhX レギュロンのサルモネラと大腸菌の比較解析

標的 mRNA の GFP 翻訳融合体を発現するプラスミドを作成し、各種点変異を導入した。

4. 研究成果

SdhX の発現様式

サルモネラにおいて、SdhX は RNase E によるプロセッシングを経て約 90 塩基の SdhX1 と約 40 塩基の SdhX2 として発現することをノーザンブロット解析で明らかにした。SdhX は TCA

回路の各酵素と同様に、好気培養の対数増殖期に多く発現することが観察された。

RNase E 温度感受性株では非許容温度において SdhX1 および SdhX2 の発現が観察されなかった。このことから、SdhX1、SdhX2 は *sdhCDAB-sucABCD* オペロン mRNA から RNase E によるプロセッシングを受けて発現することが明らかになった。また、RNase E の 5' 末端リン酸認識部位特異的変異株では SdhX2 の発現が観察されなかったことから、SdhX2 は SdhX1 からの段階的なプロセッシングによって生成することが示唆された。

SdhX の標的遺伝子の予測と制御解析

標的 mRNA 探索プログラム CopraRNA により、SdhX は酢酸キナーゼをコードする *ackA*、嫌気性フマラーゼをコードする *fumB* の翻訳開始領域とそれぞれ塩基対形成することが予想された。SdhX1 を過剰発現させたところ、AckA、FumB の GFP 翻訳融合体の発現抑制が確認され、発現量は少ないながらも SdhX2 のみでも抑制可能であった。また、SdhX 標的配列の一塩基置換により抑制能は無効となり、*ackA*、*fumB* に相補的塩基置換を導入すると抑制能が回復した。このことから、SdhX は塩基対形成により *ackA*、*fumB* を制御する能力を持つことが示された。FumB と AckA はともに嫌気呼吸における重要な酵素であることから、SdhX による転写後調節は通性嫌気性細菌の速やかな環境適応に寄与していると推測される。

生理学的条件における AckA の制御解析

AckA が生理学的条件において実際に SdhX によって制御されるかを検証するため、SdhX 破壊株、点変異株を作成した。グルコースを炭素源として生育した菌体では、有意な AckA の発現変動は見られなかった。一方、酢酸を炭素源として生育した菌体では、SdhX 破壊株および点変異株と比較して、野生株で有意な AckA の発現抑制が検出された。このことから、SdhX は酢酸を炭素源とする培養条件で AckA を実際に抑制することが示された。この結果は、米国 NIH の Susan Gottesman 博士の研究グループが独立して行った研究結果と一致した (de Mets et al., 2019)。

SdhX レギュロンのサルモネラと大腸菌の比較解析

サルモネラ SdhX によって発現抑制が見られた *fumB* の塩基対形成領域は、大腸菌 *fumB* では点変異が存在した。この点変異をサルモネラ *fumB* の GFP 翻訳融合体に導入したところ、SdhX による発現抑制が阻害された。一方で、大腸菌 *fumB* の GFP 翻訳融合体に点変異を導入したところ、SdhX による発現抑制が確認された。

研究期間途中で、大腸菌における Hfq 依存的 RNA-RNA 相互作用を網羅的に解読したリソースが公開された。このデータを解析した結果、大腸菌 SdhX はギ酸デヒドロゲナーゼをコードする *fdoG* とカタラーゼをコードする *katG* とそれぞれ塩基対形成することが予想された。大腸菌 SdhX を過剰発現させたところ、FdoG、KatG の GFP 翻訳融合体の発現抑制が確認された。また、SdhX 標的配列の一塩基置換により抑制能は無効となり、*fdoG*、*katG* に相補的塩基置換を導入すると抑制能が回復した。このことから、SdhX は塩基対形成により *fdoG*、*katG* を制御する能力を持つことが示された。

<引用文献>

De Mets F, Van Melderen L, Gottesman S. Regulation of acetate metabolism and coordination with the TCA cycle via a processed small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(3):1043-1052.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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, Matera Gianluca, Maki Kanako, Sone Yasuhiro, Vogel Joerg | 4. 巻 47 |
| 2. 論文標題 Functional expansion of a TCA cycle operon mRNA by a 3' end-derived small RNA | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acids Research | 6. 最初と最後の頁 2075 ~ 2088 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gky1243 | 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 宮腰昌利 | 4. 巻 74 |
| 2. 論文標題 細菌におけるRNAによる転写後調節 | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー | 6. 最初と最後の頁 482-487 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| 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12件（うち招待講演 4件/うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮腰昌利 |
| 2. 発表標題 腸内細菌科細菌の中心炭素代謝オペロンmRNAの制御カスケード |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮腰昌利 |
| 2. 発表標題 原核生物のオペロンmRNAの3'末端由来sRNAによる機能拡張 |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 宮腰昌利 |
| 2. 発表標題 大腸菌の中心代謝経路を制御するmRNAクロストーク |
| 3. 学会等名 第8回合成生物学シンポジウム(招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masatoshi Miyakoshi, Kanako Maki, Yasuhiro Sone, Joerg Vogel |
| 2. 発表標題 A conserved 3' UTR-derived small RNA from the sdh-suc operon regulates different sets of genes in Salmonella and E. coli |
| 3. 学会等名 ASM Microbe 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masatoshi Miyakoshi, Kanako Maki, Yasuhiro Sone, Joerg Vogel |
| 2. 発表標題 A conserved 3' UTR-derived small RNA from the sdh-suc operon regulates different sets of genes in Salmonella and E. coli |
| 3. 学会等名 5th Meeting of Regulating with RNA in Bacteria and Archaea (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 宮腰昌利 |
| 2. 発表標題 原核生物におけるsmall RNA機能解析の方法論 |
| 3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会(招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 宮腰昌利 |
| 2. 発表標題 中心代謝経路を制御するmRNAクロストーク |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 宮腰昌利 |
| 2. 発表標題 mRNAの3'末端から生成する機能性RNA |
| 3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮腰昌利、曾根泰裕 |
| 2. 発表標題 大腸菌特異的なsucD mRNA 3' UTRとkatG mRNA 5' UTRの塩基対形成 |
| 3. 学会等名 第12回日本ゲノム微生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮腰昌利 |
| 2. 発表標題 Crosstalk among bacterial mRNAs in trans controls central metabolic pathways |
| 3. 学会等名 RNA2016（国際学会） |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 宮腰昌利 |
| 2. 発表標題 腸内細菌の中心代謝を制御するmRNAクロストーク |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2017年度大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮腰昌利、横佳和子 |
| 2. 発表標題 腸内細菌科における嫌気性フマラーゼ遺伝子fumBの転写後調節 |
| 3. 学会等名 第11回日本ゲノム微生物学会年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Miyakoshi Masatoshi | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 Springer Nature | 5. 総ページ数 19 |
| 3. 書名 DNA traffic in the environment | |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|