

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03464

研究課題名(和文)腸内細菌科におけるmRNAの3'末端を介したRNA制御ネットワークの解析

研究課題名(英文)RNA regulatory network via mRNA 3'UTR in Enterobacteriaceae

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：細菌においてmRNAは3'UTRからsmall RNA (sRNA)を生成し、従来型のsRNAと同様に遺伝子発現を調節する機能を持つ。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種類以上存在するが、未だ数例しかその機能は実証されていない。本研究では、グルタミン合成酵素遺伝子glnAの3'UTRからsRNA GlnZがRNase Eによるプロセッシングを経て発現し、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼの発現を抑制することが明らかになった。また、GlnZはRNase EによるプロセッシングによってmRNAから遊離して初めて機能を発揮することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌科細菌を代表するサルモネラや大腸菌において、3'UTRからsRNAを生成するmRNAを見出し、特にグルタミン合成酵素をコードするglnAから細菌種によって異なる塩基配列を持つsRNA GlnZが生成することを明らかにした。窒素飢餓条件下でグルタミン合成酵素が発現する際に、そのmRNA 3'UTRからsRNA GlnZが生成し、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼの発現を抑制することが明らかになった。また、GlnZはRNase EによるプロセッシングによってmRNAから遊離して初めて機能を発揮することが示された。2-オキソグルタル酸の代謝フローの切り替えに重要な転写後調節機構を発見した。

研究成果の概要(英文)：A bacterial mRNA produces a small RNA (sRNA) from its 3'UTR, which functions as a post-transcriptional regulator. A enterobacterial species such as *E. coli* and *Salmonella* contains at least 30 3'UTR-derived sRNAs. This study revealed that GlnZ sRNA is generated from the 3'UTR of glnA mRNA encoding glutamine synthetase via processing by RNase E and represses the expression of 2-oxoglutarate dehydrogenase. Moreover, the release of GlnZ from the glnA mRNA by RNase E is essential for the post-transcriptional regulation of sucA.

研究分野：細菌学

キーワード：small RNA 3'UTR

1. 研究開始当初の背景

病原性細菌は様々な環境で生育するために転写、転写後、翻訳後等の各段階で遺伝子発現を適切に制御する必要があり、その機構を理解することは細菌感染症の抑止に重要である。細菌における転写後調節を司る主要な因子である典型的な non-coding small RNA (sRNA) は、mRNA とは独立に転写され、多くの場合では標的 mRNA との塩基対形成を通して翻訳開始もしくは mRNA 安定性を調節し、結果的に遺伝子発現を負もしくは正に制御する。細菌では sRNA の結合部位は mRNA の 5' UTR (転写開始点から開始コドンまでの塩基配列) から CDS (コード領域) に分布し、3' UTR (終止コドンからターミネーターまでの塩基配列) が制御を受ける場となる例は稀である。多くの場合 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 シヤペロン Hfq を必要とする。

Hfq は Rho 因子非依存的に転写終了した sRNA のターミネーター配列 (ステムループ構造に続く 3' 末端の連続した U) に結合し、通常では sRNA を安定化するとともに、標的 mRNA とそれに特異的な相補配列 (シード配列) との塩基対形成を促進する。従って、Hfq は Rho 因子非依存的に転写終了した一部の mRNA の 3' 末端にも結合することが可能である。さらに mRNA に潜在的なシード配列が存在すれば、mRNA も典型的な Hfq 依存性 sRNA と同様の制御能を持つことが理論的に予想できる (Miyakoshi et al. 2015 Curr. Opin. Microbiol.). 我々は、Rho 因子非依存的に転写終了する mRNA の 3' UTR が実際に Hfq と結合して他の mRNA を制御することを明らかにし、新しいタイプの sRNA を提唱している。我々はこれまでに、グルタミン酸・アスパラギン酸 ABC トランスポーターをコードする *gltIJKL* オペロンの *gltI* 3' UTR から生成する SroC (Miyakoshi et al. 2015 EMBO J.), TCA 回路酵素群をコードする *sdhCDAB-sucABCD* オペロンの *sucD* 3' UTR から生成する SdhX (Miyakoshi et al., 2019 Nucleic Acids Res.) の機能を明らかにしてきた。このような sRNA は腸内細菌科で 30 種類以上存在すると想定されるが、多くの sRNA について機能解析されていなかった。

2. 研究の目的

本研究は mRNA の 3' UTR から派生する sRNA の機能を体系的に解析し、原核生物 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

(1) mRNA 3' UTR の *in silico* 解析による機能予測

サルモネラにおける CLIP-seq 解析の結果、Hfq は全 RNA の 776 か所に結合し、そのうち 126 ヶ所は sRNA、127 ヶ所は mRNA の 3' UTR に存在することが判明している (Holmqvist et al., 2016 EMBO J.). この 127 ヶ所の 3' UTR 配列を腸内細菌科ゲノムから取得し、比較解析によって潜在的シード配列を抽出した。次に、3' UTR の標的 mRNA を探索するため、公開されている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。

機能を持つことが予想された 3' UTR 由来 sRNA をそれぞれ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、ネズミチフス菌 SL1344 株で 10 分間一過的に発現させた。先進ゲノム解析研究推進プラットフォーム (PAGS) の支援によって RNA-seq 解析を行った。

(2) mRNA 3' UTR による遺伝子発現制御の実験的検証

予測された制御性 3' UTR と標的 mRNA が実際に塩基対を形成して遺伝子発現を制御するか検証するため、制御性 3' UTR とその標的 mRNA の GFP 翻訳融合体を発現するプラスミドを作成した。2 種のプラスミドで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。変動が検出された組合せについて、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、制御性 3' UTR 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。レポーター解析によって、制御性 3' UTR とその標的 mRNA が塩基対形成を介して転写後レベルで発現制御が起きていることが確認された遺伝子について、実際にタンパク質レベルでの発現変動が見られることをウェスタンブロットによって解析した。

(3) 3' UTR が制御能を発揮するのにプロセッシングは必要なのか？

3' UTR はプロセッシングを経て mRNA から遊離して sRNA として機能すると考えられるが、本来の転写産物である mRNA 自体にも制御能を発揮するのに必要なシード配列と Hfq 結合配列が備わっており、3' UTR がプロセッシングされなくても標的 mRNA を制御することが可能である。この仮説を検証するため、制御性 mRNA の RNase E 開裂部位に変異を加え、標的 mRNA の翻訳量に変動が見られるかウェスタンブロットによって解析した。

4. 研究成果

(1) mRNA 3' UTR の *in silico* 解析による機能予測

CopraRNA および RNA-seq 解析の結果から、グルタミン合成酵素をコードする *glnA* の 3' UTR から転写後調節機能を持つ sRNA が生成することが予想された。サルモネラにおいて、*glnA* は宿主細胞への侵入や増殖に必須であることが知られている (Popp et al., 2015; Klose and Mekalanos, 1997; Aurass et al., 2018)。

ノーザンブロット解析により、サルモネラにおいて *glnA* 3' UTR から主に 2 種類の異なる長さの sRNA、GlnZ1 (185 nt) と GlnZ2 (50 nt) が生成することが示された。腸内細菌科細菌ゲノム配列から *glnA* 3' UTR の塩基配列を比較すると、*glnA* 終止コドンからターミネーター配列の塩基配列は大腸菌間で異なり、大きく 3 つに分類された。大腸菌 K12 株、O157 株、O111 株はそれぞれ 200 nt、85 nt、230 nt の GlnZ を生成することが示された。*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た。

(2) mRNA 3' UTR による遺伝子発現制御の実験的検証

CopraRNA および RNA-seq 解析の結果から、サルモネラ、大腸菌で共通する塩基配列 5'-UUGCCGUGGAAA-3' を用いて、GlnZ は 2-オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼをコードする *sucA* の 5' UTR と塩基対形成することが予想された。レポーター解析により、実際に GlnZ は *sucA* の発現を抑制することが示された。同様に、サルモネラ GlnZ はグルタミン ABC トランスポーターをコードする *glnP*、プリンヌクレオシドフォスホリラーゼをコードする *deoD* を制御し、大腸菌 GlnZ はピルビン酸デヒドロゲナーゼをコードする *aceE* を制御することが示された。ウェスタンブロット解析により、ネズミチフス菌 SL1344 株および大腸菌 BW25113 株の *glnZ* 破壊株はそれぞれの野生株と比較して、グルタミンを窒素源として培養した際に有意に高いレベルの SucA タンパク質を発現することが示された。以上から、窒素飢餓条件でグルタミン合成酵素が発現する際に、その mRNA 3' UTR から sRNA GlnZ が生成し、2-オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼの発現を抑制することが明らかになった。この転写後調節は、グルタミンおよびグルタミン酸の炭素骨格である 2-オキシグルタル酸を TCA 回路から窒素同化経路に代謝フローを切り替えるのに有効であると考えられる。

(3) 3' UTR が制御能を発揮するのにプロセッシングは必要なのか？

GlnZ は RNase E によって 2ヶ所の塩基配列でプロセッ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 はプロセッシングによって mRNA から遊離して初めて機能を発揮することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3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, Okayama Haruna, Lejars Maxence, Kanda Takeshi, Tanaka Yuki, Itaya Kaori, Okuno Miki, Itoh Takehiko, Iwai Noritaka, Wachi Masaaki	4. 巻 117
2. 論文標題 Mining RNA seq data reveals the massive regulon of GcvB small RNA and its physiological significance in maintaining amino acid homeostasis in Escherichia coli	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 160 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.14814	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 Kinoshita-Daitoku, R., Kiga, K., Miyakoshi, M. et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 A bacterial small RNA regulates the adaptation of Helicobacter pylori to the host environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22317-7	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, Ohtsubo Yoshiyuki, Nagata Yuji, Tsuda Masataka	4. 巻 11
2. 論文標題 Transcriptome Analysis of Zygotic Induction During Conjugative Transfer of Plasmid RP4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.01125	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮腰昌利
2. 発表標題 腸内細菌科細菌におけるmRNAから生成するsmall RNAによる転写後調節
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮腰昌利
2. 発表標題 大腸菌における3' UTRから生成するsmall RNAによる転写後調節－窒素飢餓応答とTCA回路分岐点の制御を例に－
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyakoshi Masatoshi, Asaki Lejars
2. 発表標題 Post-transcriptional regulation at the branch point between carbon and nitrogen metabolism by an NtrC-dependent small RNA in Salmonella
3. 学会等名 RNA & Microbes 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Maxence Lejars, Takeshi Kanda, Masatoshi Miyakoshi
2. 発表標題 Expanding the regulon of the master regulator small RNA GcvB in E. coli
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮腰 昌利、ルジャー朝紀
2. 発表標題 腸内細菌科細菌のグルタミン合成酵素遺伝子glnA mRNA の3'UTR による転写後調節
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮腰昌利、神田健
2. 発表標題 大腸菌のGcvB small RNAによるアミノ酸トランスポーターの転写後調節
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮腰昌利
2. 発表標題 ドイツ・ヴェルツブルクでの感染生物学研究
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮腰昌利
2. 発表標題 大腸菌とサルモネラのglnA 3'UTRによるSucAの転写後調節
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮腰昌利
2. 発表標題 細菌のmRNAに隠された遺伝子発現制御機能
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------