

令和 6 年 10 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2020～2023

課題番号：19KK0406

研究課題名（和文）新規RNA-seq解析による腸内細菌科細菌のRNA制御ネットワークの解明

研究課題名（英文）Novel RNA-seq analysis reveals RNA regulatory networks in 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） 11,700,000円

渡航期間： 3ヶ月

研究成果の概要（和文）：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。これまでに細菌における転写後調節を司るsmall RNA（sRNA）と同様に、一部のmRNAの3'UTRが遺伝子発現を調節する機能を持つことが明らかになった。本研究では、サルモネラおよびコレラ菌においてmRNA 3'UTRの機能を解明することを目的とする。mRNA 3'UTRと塩基対形成するsRNA、mRNA、tRNAなどの転写産物のペアを新規RNA-seq法により網羅的に抽出し、機能を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸菌、サルモネラ、コレラ菌などの病原性グラム陰性細菌において、mRNA塩基配列から推測された複数の機能性3'UTRを同定した。特にグルタミン合成酵素をコードするglnAから大腸菌、サルモネラそれぞれ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、コレラ菌のsRNA GcvBと塩基対形成する複数のmRNA 3'UTRがGcvBの制御能を抑制するスポンジRNAとして機能することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In order to grow in various environments, bacteria appropriately regulate gene expression, and understanding the mechanism is important for preventing bacterial infections. It has been revealed that the 3'UTR of some mRNAs has the function of regulating gene expression, similar to small RNAs (sRNAs) that control post-transcriptional regulation in bacteria. In this study, we aimed to elucidate the function of mRNA 3'UTR in *Salmonella* and *Vibrio cholerae*. We comprehensively extracted pairs of transcripts, such as sRNA, mRNA, and tRNA, that form base pairs with mRNA 3'UTR using a new RNA-seq method and analyzed their functions.

研究分野：細菌学、分子生物学

キーワード：転写後調節 RNA-seq small RNA

### 1. 研究開始当初の背景

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。これまでに細菌における転写後調節を司る small RNA (sRNA)と同様に、一部の mRNA の 3'UTR が遺伝子発現を調節する機能を持つことが明らかになってきた。

本国際共同研究では、渡航先研究機関であるドイツ Helmholtz Institute for RNA-based Infection Research (HIRI) の Jörg Vogel 教授、Friedrich-Schiller-Universität Jena の Kai Papenfort 教授との共同研究を通して、RIL-seq 解析によって *in vivo* の RNA-RNA 相互作用を網羅的に解析し、その中から mRNA 3'UTR と塩基対形成する sRNA、mRNA、tRNA などの全ての転写産物のペアを抽出する。転写後調節因子として機能する mRNA 3'UTR とその標的 RNA の塩基対形成による制御ネットワークを解析し、生理学的に重要な mRNA 3'UTR の機能を明らかにする。

### 2. 研究の目的

本研究では、大腸菌、サルモネラなどの病原性グラム陰性細菌において、RIL-seq 解析によって *in vivo* の RNA-RNA 相互作用を解析し、その中から mRNA 3'UTR と塩基対形成する全ての RNA のペアを網羅する。mRNA 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 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

RNA シャペロン Hfq を介して塩基対形成した RNA ペアからライゲーション反応によってキメラ RNA を形成させ、網羅的に塩基配列を同定する RIL-seq (RNA interaction by ligation and sequencing) は、サルモネラについて Vogel グループによる解析 (Matera et al., 2022 Mol. Cell)、コレラ菌について Papenfort グループによる解析 (Huber et al., 2022 Nat. Commun.) が実施された。

予測された mRNA 3'UTR から派生する sRNA 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、mRNA 3'UTR から派生する sRNA 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する。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する。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、mRNA 3'UTR から派生する sRNA 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する。

スポンジ RNA の機能解析には、上記のレポーター解析に、さらにもう 1 種類のプラスミドを導入する。各種スポンジ RNA をアラビノース誘導発現すると GFP 蛍光強度が増加すると予想される。ベクターコントロールや塩基対形成領域変異体と比較して、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する。塩基対形成による制御を確認するため、予想された塩基対 (図 2) にそれぞれ変異を導入するとスポンジ効果が失われ、GcvB とスポンジ RNA 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検証する。

### 4. 研究成果

mRNA 3'UTR から派生する sRNA はサルモネラにおいて 30 種類以上存在することが明らかとなった。サルモネラにおいてグルタミン合成酵素遺伝子 *glnA* は病原性発現に重要であることが知られている。サルモネラでは *glnA* mRNA の 3'UTR は RNase E によって 2 種類の sRNA GlnZ1 と GlnZ2 をプロセシングすることを明らかにした。GlnZ の標的 mRNA をサルモネラにおける RNA-seq 解析の結果を利用して探索した (Matera et al., 2022 Mol. Cell)。GFP 翻訳融合体の蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダーを用いて定量解析し、*sucA* をはじめとする複数の標的 mRNA が実際に転写後調節を受けることを実証した (Miyakoshi et al., 2022 eLife)。

GcvB は大腸菌、サルモネラで 50 以上のアミノ酸生合成・輸送遺伝子を制御する sRNA であり、腸内細菌科のみならずピブリオ科など プロテオバクテリアに広く保存されている。コレラ菌において、RIL-seq 法により塩基対形成する sRNA とその標的 RNA が網羅的に同定された (Huber et al., 2022 Nat. Commun.)。レポーター解析によって、GcvB によってコレラ菌の 26 遺伝子が負に制御されることを明らかにした。これらの標的遺伝子は主にアミノ酸生合成・輸送遺伝子であった。さらに、GcvB はコレラ菌の転写制御因子をコードする *aphA* を抑制しており、間接的にクオラムセンシングの制御に関与すると考えられる。また、GcvB は少なくとも 4 種類の sRNA と塩基対形成しており、そのうち 2 種類は GcvB による標的遺伝子の抑制を阻害するスポンジ RNA として機能することを明らかにした (Ochi et al. 論文投稿準備中)。

1. Matera G, Altuvia Y, Gerovac M, El Mouali Y, Margalit H, Vogel J. Global RNA interactome of *Salmonella* discovers a 5' UTR sponge for the MicF small RNA that connects membrane permeability to transport capacity. *Mol Cell*. 2022 Feb 3;82(3):629-644.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2021.12.030. PMID: 35063132.
2. Huber M, Lippegas A, Melamed S, Siemers M, Wucher BR, Hoyos M, Nadell C, Storz G, Papenfort K. An RNA sponge controls quorum sensing dynamics and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Nat Commun*. 2022 Dec 8;13(1):7585. doi: 10.1038/s41467-022-35261-x. PMID: 36482060.

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	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 ~ 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 -

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

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Masatoshi Miyakoshi
2. 発表標題 Diverse regulatory networks of GcvB small RNA associated with the glycine cleavage system
3. 学会等名 Gordon Research Conference 2023 Mechanisms of Microbial Transcription（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masatoshi Miyakoshi
2. 発表標題 Connecting small RNA regulatory networks with sponge RNAs
3. 学会等名 7th Meeting on Regulating with RNA in Bacteria and Archaea（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masatoshi Miyakoshi
2. 発表標題 Glutamine synthetase mRNA processes a small RNA from its 3' UTR to regulate 2-oxoglutarate dehydrogenase in Salmonella and E. coli
3. 学会等名 EMBO Workshop BacNet22 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 越智郁、宮腰昌利
2. 発表標題 コレラ菌RIL-seq解析から明らかになるGcvB small RNAの制御ネットワーク
3. 学会等名 第17回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 越智郁、宮腰昌利
2. 発表標題 GcvB small RNAの大腸菌とコレラ菌の比較解析
3. 学会等名 第17回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2023年

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

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	フォーゲル ヨーク  (Vogel Joerg)	ヘルムホルツ研究所・RNA-based Infection Research・Professor	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	パーペンフォルト カイ  (Papenfort Kai)	イエナ大学・Institute of Microbiology・Professor	

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		
ドイツ	Helmholtz Institute	Friedrich Schiller University of Jena	