

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25252017

研究課題名(和文) 機能性RNAの微生物生産およびRNA発現菌の利用

研究課題名(英文) Microbial production of artificial and functional RNAs and the use of the RNA producing microorganism

研究代表者

菊池 洋 (KIKUCHI, Yo)

豊橋技術科学大学・研究推進アドミニストレーションセンター・特命教授

研究者番号：40273320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外に核酸を放出する海洋性細菌Rhodovulum sulfidophilumに任意の機能性RNAの塩基配列を組み込んだRNA発現プラスミドを導入し培地中に機能性RNAを生産させる技術開発を行った。以前、RNAアプタマー1種の生産に成功していたが、本研究では、まず、遺伝子発現の強い抑制が可能なshort hairpin RNAの生産に成功した。さらに本菌の安全性保証に重要な基礎研究も進め、本菌のクォーラムセンシングにかかる新型オートインデューサーの発見、遺伝子水平伝搬にかかわるgene transfer agentの発見、また、本菌のゲノムの全塩基配列の決定など多くの成果を上げることができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is the development of an extracellular functional RNA production system using the marine bacterium Rhodovulum sulfidophilum. We had already succeeded a production of an RNA aptamer. In the present study, first, we could show the extracellular production of short hairpin RNAs those are known as strong inhibitors of gene expression. We also proceeded to basic study of this bacterium which is important for the safety assurance of this bacterium in the RNA drugs production in future. We discovered that this bacterium has the quorum sensing system and that the bacterium produces a new type of auto-inducer in the system. We also discovered the gene transfer agent of this bacterium which was thought to be a natural agent for horizontal gene transfer. Also, the total genome sequence of this bacterium has been completed using the next generation sequencer.

研究分野：生化学、分子生物学、微生物学

キーワード：発酵 核酸 応用微生物学 RNA生産 RNAドラッグ 細胞外核酸 光合成細菌 機能性RNA

1. 研究開始当初の背景

本研究計画当初、線虫において発見された RNA interference (RNAi) 効果 [ある種の RNA により遺伝子発現が抑えられる効果; Fire, A. *et al. Nature* **391**, 806-811 (1998); (2006 年度ノーベル医学生理学賞受賞)] は、ヒトを含む高等生物にも存在することはすでによく知られており、すでに、このシステムを利用して遺伝子発現を効果的に抑えることができる 21 塩基対ほどの二重鎖 RNA (siRNA) が基礎研究用に開発されていた。このことから、RNA は、ウイルス病の克服や癌治療の特効薬として大いに期待されていた。さらに、siRNA のみならず、RNA アプタマーのような完全な人工 RNA も新しい核酸ドラッグとしてその潜在能力が期待されており、すでに加齢黄斑変性症治療薬など実用化されているものも市場に出てきていた [Ng, E.W. *et al. Nature Rev. Drug Discovery*, **5**: 123-132 (2006)]。しかし、創薬という点から、RNA はコストの面で大きな問題を抱えていた。RNA の調製法は、高価な合成試薬を用いる有機合成法が T7 ファージなどの RNA ポリメラーゼを用いる *in vitro* 転写法しかなく、RNA ドラッグの安価な製造法が求められていた。また、低コストの製造法の開発は、市場を形成するであろう RNA 医薬の製造に大きなインパクトを与えるばかりでなく、基礎研究の支援技術としても重要であることは想像に難くなかった。例えば、マイクロ RNA の機能解明の研究の中で、この機能性 RNA を安価に大量に得られれば、これらの基礎研究が大いに進展することが見込まれた。

2. 研究の目的

組換えタンパク質を大腸菌や酵母などで効率よく発現させるシステムは、現在十分に確立されているが、上記のように近年その重要性がますます顕著な RNA の製造手法に関しては、高価で手間のかかる試験管内転写法や有機合成法が主流で、タンパク質で行われて

いる微生物等を利用する *in vivo* 製造法は実用化されていなかった。本研究は、菌体外 (培養液中) に自身の RNA を放出する性質をもつ海洋性細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* (図 1) を用い、機能性 RNA を *in vivo* で培地中に生産させる方法を確立することを目的とした。さらに RNA を精製することなく抗ウイルス RNA アプタマー生産菌そのものを海水等に導入し魚類等への抗ウイルス効果が可能か否かの検討も目的とした。

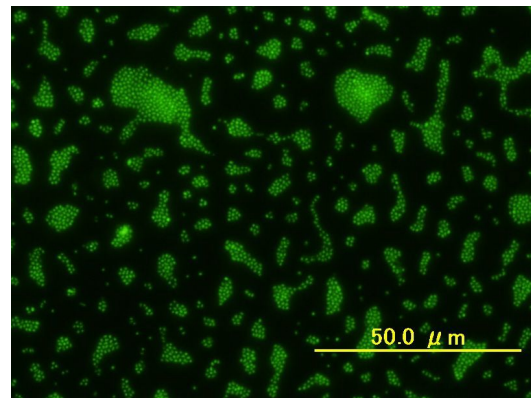


図 1. 海洋性細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* .

SYBR Green I による染色。フロックの形成が見える

3. 研究の方法

1) short hairpin RNA (shRNA) の生産

R. sulfidophilum を用いる人工 RNA の細胞外生産がいかなる RNA でも生産できることを示すために、最も困難かと思われた shRNA を設計しその鋳型となる合成 DNA を RNA 発現用改良型プラスミドに組み込み発現を観察した。方法はこれまでの研究 [Suzuki, H. *et al. J. Biosci. Bioeng.* **112**, 458-461 (2011)] と同様に行った。

2) アシルホモセリンラクトン (AHL) の同定

R. sulfidophilum のクォラムセンシングのオートインデューサーである AHL の同定は、TLC および精密質量分析 (LC/MS/MS 解析) 法で行った。

3) ゲノム解析および網羅的遺伝子発現解析

シーケンシングは 454GS FLX+ (Roche) および MiSeq (Illumina) を用いた。ライブラリ調製には、それぞれの推奨キットを用いた。配列に関してはフィニッシングとアノテーションを行い DDBJ に登録した (accession number AP014800 to AP014803)。

4) Gene Transfer Agent (GTA) 画分の調製と電

子顕微鏡観察

GTA 画分の調製は Humphrey の方法 [Humphrey, S.B. *et al.*: *J. Bacteriol.* **179**, 323-329 (1997)] に従った。GTA 画分を 2% ホスフォタンゲステン酸 (pH 7.0) でネガティブ染色し、透過型顕微鏡 JEM-1200EX (80 kV) で観察した。

4. 研究成果

1) short hairpin RNA (shRNA) の生産

本研究の開始前までに *R. sulfidophilum* をホストとして RNA アプタマーの細胞外生産が確認され [Suzuki, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 786-793 (2010)]、RNA 発現用プロモーターの改良 [Suzuki, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.* **112**, 458-461 (2011)] もなされていたが、本研究において、いかなる RNA の生産も可能であることを示すために、機能性 RNA として強い遺伝子発現抑制能をもつ short hairpin RNA (shRNA) の生産も試み成功した (下記 5. 主な発表論文等の、以下、引用は「5 - 」の様に示す)。shRNA は、siRNA よりも遺伝子発現抑制能が高く、将来的に RNA 医薬として期待されている。2 種の shRNA の生産に成功したが、その一種について図 2 に示す。shRNA はヘアピン型の二次構造をもつため転写終結が起こってしまうのではないかと懸念されたが、RNA アプタマーの場合と遜色ない収量 (細胞外へ 200 ng/L) で得られた。最も厳しいと思われた shRNA が生産されたことから、本研究で開発された *R. sulfidophilum* を用いる RNA 生産系は、いかなる RNA をも生産できるものと考えられる。

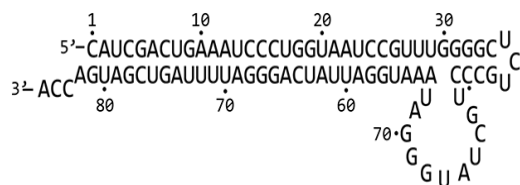


図 2. *R. sulfidophilum* により生産された shRNA (5 - より)

2) *Rhodovulum sulfidophilum* の基礎微生物学的研究

本菌を用いる RNA 生産系の構築の上で、生産上の安全性の確認は重要な課題である。本菌の生理学的性質と全ゲノムの解析を行い成果を得ることができた。

2)-1 本菌のクォーラムセンシングおよび細胞外核酸生産機構にかかる研究

報告者らは先に *R. sulfidophilum* がクォーラムセンシング機構を保持していることを明らかにしている [Suzuki, H., *et al.*: *Applied Microbiol. Biotech.* **84**, 349-356 (2009)]。本研究で、本菌の生産するオートインデューサーであるアシルホモセリンラクトン (AHL) の同定を試みた。従来 AHL 検知株を用いた AHL 検出手法では本菌の AHL 生産を確認することができなかったが、培養液の AHL を TLC によって粗精製する工程を組み込んだ改良型 AHL 検出方法を考案することによって、本菌が長鎖アシル鎖を持つ AHL を生産することが確かめられた (5 -)。微生物が細胞外に生産する AHL のアシル鎖長は C₁₈ が最長であるとされていたが、本菌の AHL を精密質量分析 (LC/MS/MS 解析) したところ、本菌はアシル鎖長が C₂₀ である新規な AHL であることが明らかとなった (投稿準備中)。さらに、本菌の菌体外 RNA 高生産株の取得と菌体外核酸高生産化に関わる遺伝子の同定を目指し、紫外線突然変異を利用した菌体外核酸高生産株の取得を試みた。紫外線照射後、RNA ポリメラーゼβサブユニットへの変異によって生じるリファンピシン耐性化を指標に変異株のスクリーニングを行った結果、菌体外 RNA 生産量が約 1.7 倍増産する変異株を見出すことに成功した (投稿準備中)。

2)-2 本菌のゲノム解析

本研究の RNA 生産に用いている菌は *R.*

sulfidophilum DSM 1374 株である。一方、同種ではあるが、細胞外核酸量やフロック形成能の異なる *R. sulfidophilum* DSM 2351 株も存在する。これら二種を比較することで細胞外核酸の生成機構等の解明にアプローチできるものと考え、二種の全ゲノムの解析を行い、完全なゲノム構造を明らかにした。DSM 2351 株については発表し(5 -)、DSM 1374 株については投稿準備中である。DSM 1374 株については、Masuda らがドラフトゲノムを2013年に発表しているが〔Masuda, S. et al: *Genome Announc.* 1, e00577-13 (2013)〕、レプリコンが環状につながっていないコンティグの情報にとどまっており、完全なゲノム構造は明らかではなかった。報告者らは DSM 1374 株についても完全なゲノム構造を本研究において明らかにすることができた。DSM 2351 株は、4,454,432 bp の環状ゲノムをもち、プラスミドを3個保持していた。DSM 1374 株は、4,130,470 bp の環状ゲノムをもち、プラスミド2個を保持していた。また、この二種の株における網羅的遺伝子発現解析も行いデータを得ている。この2株間には表現型に相違があり、フロック形成能および細胞外核酸生産量は DSM 2351 株が DSM 1374 株に比べ大である。一方、DSM 1374 株では、人為的形質転換(接合伝達やヒートショックによるプラスミドの導入)が可能であるが、DSM 2351 株では現在のところ、これらの方法で形質転換させることができない。本研究により完全なゲノム構造がわかったので、今後これら2株のゲノム構造および発現の詳細な比較、解析を行い表現型との対応から細胞外核酸の生成メカニズムの解明といった基礎的研究と共に、細胞外核酸の大量発現菌の育種といった応用にも資する解析ができるものと期待される。現在、詳細な解析、比較を実行中である。

2)-3 Gene Transfer Agent (GTA) の発見

本菌の細胞外 DNA を解析中にアガロースゲル電気泳動で 4.5 kb の長さの DNA バンドが見出されたことから、本菌が Gene Transfer Agent (GTA) を生産する可能性が推測された。GTA は、バクテリオファージ様の形をしている粒子であるが、多くの点でファージとは異なっており、遺伝子の効率的水平伝搬を行う役割をもっているものと考えられている。本研究で、本菌が GTA 様粒子を生産していることが明らかになった(5 -)。この粒子は、本菌ゲノム由来の 4.5 kb の長さの DNA を粒子内に保持し、透過型電子顕微鏡観察により、直径 40 nm の頭部と 60 nm の長さの尾部をもつ粒子であることが明らかになった(図3)。また、前項で報告しているゲノム解析により GTA の構造遺伝子クラスターも発見することができた(図4)。この構造遺伝子クラスターはゲノム上にあり、各遺伝子の位置と翻訳されるアミノ酸配列は、近縁種である *Rhodobacter capsulatus* の GTA に非常によく似ていた。アミノ酸配列のホモロジーは、51.4% ~ 73.7%であった。ただし *R. capsulatus* の GTA 遺伝子クラスターにある 15 個の ORF のうち、1 番目の Open Reading Frame が *R. sulfidophilum* では欠けていた(図4)。

遺伝子伝搬能力についてはまだ確定できていないが、この粒子の生産が細胞外核酸の生産に関与している可能性がある。

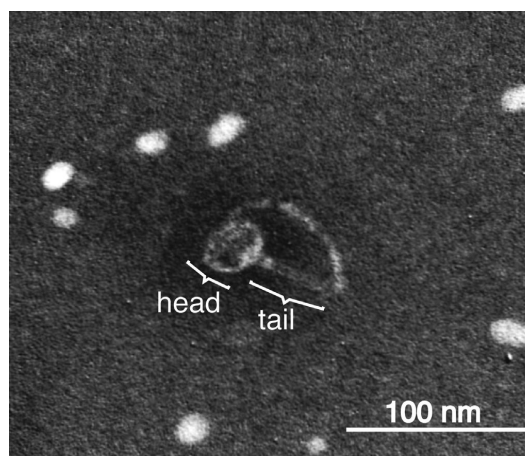


図3. *R. sulfidophilum* が生産する GTA 様粒子の透過型電子顕微鏡写真(5 - より)

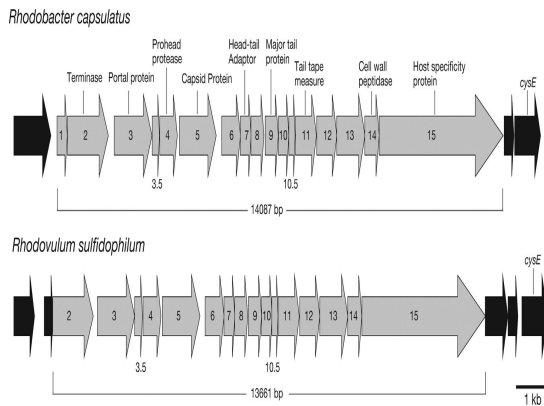


図 4 *Rhodobacter capsulatus* および *R. sulfidophilum* の GTA 遺伝子クラスター。矢印は open reading frame 黒い矢印は GTA とは無関係と思われる ORF (5' - より)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Nagao, N., Hirose, Y., Misawa, N., Ohtsubo, Y., Umekage, S., and Kikuchi, Y.: Complete genome sequence of *Rhodovulum sulfidophilum* DSM 2351, an extracellular nucleic acids producing bacterium. *Genome Announcements* 2015 3: e00388-15 (2015) 査読有

Nagao, N., Yamamoto, J., Komatsu, H., Suzuki, H., Hirose, Y., Umekage, S., Ohyama, T., and Kikuchi, Y.: The gene transfer agent-like particle of the marine phototrophic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *Biochemistry and Biophysics Reports* 4, 369-374 (2015) 査読有

Hirose, Y., Katayama, M., Ohtsubo, Y., Misawa, N., Iioka, E., Suda, W., Oshima, K., Hanaoka, M., Tanaka, K., Eki, T., Ikeuchi, M., Kikuchi, Y., Ishida, M. and Hattori, M.: Complete genome sequence of cyanobacterium *Geminocystis* sp. NIES-3708, which performs type II complementary chromatic acclimation. *Genome Announcements* 2015 3: e00357-15 (2015) 査読有

Hirose, Y., Katayama, M., Ohtsubo, Y., Misawa, N., Iioka, E., Suda, W., Oshima, K., Hanaoka, M., Tanaka, K., Eki, T., Ikeuchi, M., Kikuchi, Y., Ishida, M. and Hattori, M.: Complete genome sequence of cyanobacterium *Geminocystis* sp. NIES-3709 that harbors phycoerythrin-rich phycobilisome. *Genome Announcements* 2015 3: e00385-15 (2015) 査読有

Terada, T., Kikuchi, Y., and Umekage, S.:

Improved bioassay for detecting autoinducer of *Rhodovulum sulfidophilum*. *AIP Conference Proceedings* 1649, 67-70 (2015) 査読有

Kakimoto, Y., Fujimura, A., Fujita, S., Kikuchi, Y., and Umekage, S.: Abnormal rapid non-linear RNA production induced by T7 RNA polymerase in the absence of an exogenous DNA template. *AIP Conference Proceedings* 1649, 113-115 (2015) 査読有
Kakimoto, Y., Fujimura, A., Sakamoto, T., Kikuchi, Y., and Umekage, S.: Evidence for RNA template-directed elongation. *AIP Conference Proceedings* 1649, 116-120 (2015) 査読有

Arai, N., Nishimura, E., Kikuchi, Y., and Ohshima, T.: Functional analyses of carnivorous plant-specific amino acid residues in S-like ribonucleases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 465, 108-112 (2015) 査読有

Nagao, N., Suzuki, H., Numano, R., Umekage, S., and Kikuchi, Y.: Short hairpin RNAs of designed sequences can be extracellularly produced by the marine bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 60, 222-226 (2014) 査読有

Yamashita, S., Uehara, T., Matsuo, M., Kikuchi, Y., and Numano, R.: *Melanopsin* resets circadian rhythms in cells by inducing clock gene *period1*. *AIP Conference Proceedings* 1585, 40-44 (2014) 査読有

[学会発表](計 30 件)

長尾信義、広瀬侑、梅影創、菊池洋：紅色光合成細菌における細胞外核酸減少株のゲノムおよびトランスクリプトーム解析、第 7 回日本光合成学会年会、2016.5.27 東京

Kakimoto Y., Fujimura A., Kikuchi Y. and Umekage S.: Emergence of RNA self-replication cycle through RNA template-directed RNA polymerisation by DNA dependent RNA polymerase, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015.12.15 Honolulu, USA

Umekage S. and Kikuchi Y.: Agarose binding RNA aptamer. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015.12.15 Honolulu, USA

梅影創、菊池洋：RNA の凝集化が引き起こす RNA 安定化による RNA ワールド仮説の補強、第 38 回日本分子生物学会年会 (BMB 2015) 2015.12.01 神戸

Nagao, N., Hirose, Y., Umekage, S., and Kikuchi, Y.: RNA-seq analysis revealed expression profiles of the marine phototrophic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* 2015.10.22 Tahara, Aichi

Kurogi, H., Kikuchi, Y., and Umekage, S.: Fast and convenient evaluation of 5'-monophosphorylation of RNA transcript by using Phos-tag containing acrylamide gel electrophoresis 2015.10.22 Tahara, Aichi
Kakimoto, Y., Fujinuma, A., Kikuchi, Y., and Umekage, S.: RNA template-directed RNA polymerization by T7 RNA polymerase 2015.10.22 Tahara, Aichi
黒木 大海、菊池 洋、梅影 創: 環状 RNA と直鎖状 RNA を分離する方法、第 17 回日本 RNA 学会年会 2015.07.15 札幌
Umekage, S., Noda, A., and Kikuchi, Y.: Enhanced floc forming mutants of *Rhodovulum sulfidophilum* obtained by UV mutagenesis, FEMS2015 (6th Congress of European Microbiologists) 2015.06.10 Maastricht, The Netherland
長尾信義、米川千夏、梅影 創、菊池 洋: *Rhodovulum sulfidophilum* T7 RNA ポリメラーゼ発現株を用いた細胞外 RNA 生産系、日本農芸化学会 2015 年度大会 2015.03.26 岡山

〔図書〕(計 1 件)

菊池 洋: RNA プロセッシング。「ベーシックマスター分子生物学 改訂 2 版」東中川徹、大山隆、清水光弘 編、pp. 191-213、オーム社 (2013)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: 偽環状二重鎖ポリヌクレオチドと、それを用いた遺伝子発現阻害剤
発明者: 梅影創、菊池洋
権利者: 国立大学法人豊橋技術科学大学
種類: 特願
番号: 2016-028988
出願年月日: 2016 年 2 月 3 日
国内外の別: 国内

名称: RNA 分子にヌクレアーゼ耐性能を付与する方法、ヌクレアーゼ耐性能を有するキメラ RNA 分子
発明者: 梅影創、藤田隼輔、藤沼輝、菊池洋
権利者: 国立大学法人豊橋技術科学大学
種類: 特願
番号: 2013-256425
出願年月日: 2013 年 12 月 11 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tut.ac.jp/20131207.html>

<https://waseda.pure.elsevier.com/ja/persons/yo-ki-kuchi>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 洋 (KIKUCHI YO)
豊橋技術科学大学・研究推進アドミニストレーションセンター・特命教授
研究者番号: 40273320

(2) 研究分担者

梅影 創 (UMEKAGE SO)
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・講師
研究者番号: 30419436

(3) 研究分担者

大山 隆 (OHYAMA TAKASHI)
早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授
研究者番号: 60268513

(4) 研究分担者

青木 宙 (AOKI TAKASHI)
早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・招聘研究員
研究者番号: 00051805