

立教大学学術推進特別重点資金（立教 S F R）
 大学院生研究
 2013年度研究成果報告書

研究科名	立教大学大学院		理学研究科	生命理学 専攻
研究代表者	在籍研究科・専攻・学年		氏名	
	理学研究科・生命理学専攻 ・後期3年		田上 和美 印	
指導教員	所属・職名		氏名	
	理学部・教授		花井 亮 印	
自然・人文 ・社会の別	自然・人文・社会	個人・共同の別	個人・共同	名
研究課題名	枯草菌におけるリボソームの二量体化機構の解明			
研究組織	在籍研究科・専攻・学年		氏名	
	理学研究科・生命理学専攻・後期3年		田上 和美	
研究期間	2013 年度			
研究経費	(支出金額) 487千円 / (採択金額) 500千円			

研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

リボソームはタンパク質合成装置であり、その活性はさまざまな制御を受けていることが近年明らかになってきた。グラム陰性菌においては、定常期にリボソームが二量体(ダイマー)化して不活性化することで、増殖停止期(定常期)での細胞の生存戦略としていと考えられている。申請者はグラム陽性細菌である枯草菌においても、孢子形成期においてダイマーリボソームを形成していることを初めて見出した。しかし、ダイマー形成の分子機構は明らかになっていない。そこで、枯草菌の生活環におけるダイマー形成の生物学的意義を理解するために、枯草菌のダイマーリボソーム形成因子の動態の解析、およびリボソームの不活性化機構の解明を行った。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入)

[枯草菌] [リボソーム] []

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

申請者はこれまでの研究において、枯草菌の定常期および孢子形成期の細胞内において、リボソームが二量体(ダイマー)化すること、さらにこのダイマーリボソームには YvyD タンパク質が必須であることを見出した。ダイマーリボソームは翻訳活性を持たず、その形成は定常期での生存戦略であると考えられている。しかし、孢子形成期や発芽期等におけるダイマーリボソームの生理学的意義は明らかとなっていない。そこで、その意義を解明するためには、ダイマーリボソーム形成の開始機構を解明することが重要であると考え、YvyD の動態とリボソームの不活化機構について解析を行った。

【1. YvyD タンパク質の安定性の解析】

YvyD タンパク質の安定化の制御がダイマー形成に重要であると考えられるため、対数増殖期とダイマーリボソーム形成期それぞれにおける YvyD の動態を解析した。

1-1. YvyD はダイマーリボソームに結合しないと分解される

枯草菌を培養し、対数増殖期とダイマーリボソーム形成期の各生育時期に達したところでクロラムフェニコールとリファンピシンの抗生物質を添加することで細胞内の転写と翻訳を停止させた。その後、経時的に細胞を集め、得られた細胞より抽出した細胞粗抽出液を用いて抗 YvyD 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。なお、この時、野生株では対数増殖期に *yvyD* が発現されない為、強力なリボソーム RNA オペロンのプロモーターを *yvyD* 遺伝子上流に融合させた変異株を用いて人為的に *yvyD* 遺伝子を強発現させた。その結果、対数増殖期の細胞では YvyD タンパク質は急速に消失していくが、ダイマーリボソーム形成期の細胞内では顕著な消失は見られなかった。以上の結果より、YvyD はダイマーリボソームには安定して結合しているが、ダイマーリボソームが形成しない条件下では発現しても直ちに分解されていることが示唆された。

1-2. YvyD のアミノ酸リン酸化が安定性に関与している

YvyD の N 末端側から 6 番目のアルギニンがリン酸化を受ける (Alexander K. W. Elsholz *et al.*, 2012) ということが報告されていることより、このリン酸化が YvyD のダイマーリボソーム形成に関与しているのではないかと予想した。先行研究により、この 6 番目のアルギニンをアラニンに置換したところ、野生株に比べてダイマーリボソームの形成量が少なく、また、早期に減少することが明らかになっている。そこで、アミノ酸改変株を用い、YvyD タンパク質レベルの測定、およびダイマーリボソーム形成能の測定を行った。

1-2-1. ウエスタンブロット解析による細胞内 YvyD レベルの解析

6 番目のアルギニンをアラニンに置換した改変株では、野生株に比べて YvyD の合成量が少なく、また早期に消失していた。さらに、野生株では YvyD はリボソーム画分にのみ存在するのに対し、改変株ではリボソーム画分以外からも検出された。

1-2-2. ショ糖密度勾配超遠心によるダイマーリボソーム形成能の解析

近傍である N 末端側から 2、3、4、5、7、8、9、10 番目のアミノ酸についても同様にアラニンに置換したアミノ酸改変株を形質転換法にて構築し、これらの改変株を用いて、ダイマーリボソーム形成能を測定した。その結果、N 末端側から 5 番目と 6 番目を改変した変異株ではダイマーリボソームの形成量が著しく低下していた。

以上の結果より、YvyD の 5 番目もしくは 6 番目のアミノ酸がリン酸化されることで YvyD タンパク質が安定化し、ダイマーリボソームに結合している可能性が示唆された。

研究成果の概要 つづき**【2. リボソーム不活性化機構の解明】**

大腸菌におけるダイマーリボソーム形成は、まず遷移期に合成された RMF が 70S リボソームに結合し 90S リボソームを形成することでリボソームを不活性化させ、それに HPF (YvyD の homologous protein) が結合することで 100S (ダイマー) リボソームになることが知られている (Wada A. *et al.*, 1990)。しかし、枯草菌では RMF や 90S リボソームは見出されておらず、大腸菌とは別の不活性化機構を有しているものと予想される。そこで、枯草菌におけるリボソームの不活性化因子の同定を試みた。

2-1. 翻訳活性の低下したリボソームが多く合成される変異株の構築

ダイマーリボソームを形成することの出来ない不活性なりボソームを単離するために、ダイマーリボソーム形成因子である *yvyD* 遺伝子と rRNA の分解酵素の一つと考えられる *ndoA* 遺伝子の二重欠失株を形質転換法により構築した。

2-2. プロテオーム解析によるリボソーム不活性化因子の同定

2-1 で構築した *yvyD ndoA* 二重欠失株を用いて不活性状態の 70S リボソームが多いと予想される孢子形成期初期 ($T_{0.5}$) の細胞からリボソームタンパク質を精製し、RFHR 二次元電気泳動にて展開した。その結果、野生株の対数増殖期やダイマーリボソーム形成期のリボソームと比較しても新たなスポットは見られず、不活性化因子の候補となるタンパク質を同定することはできなかった。

以上の結果より、枯草菌には大腸菌の RMF のような不活性化因子は存在せず、別の機構で活性化状態にあるリボソームがダイマーを形成するようになることが示唆された。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

① 雑誌論文

Akanuma G, Suzuki S, Yano K, Nanamiya H, Natori Y, Namba E, Watanabe K, **Tagami K**, Takeda T, Iizuka Y, Kobayashi A, Ishizuka M, Yoshikawa H, Kawamura F.

Single mutations introduced in the essential ribosomal proteins L3 and S10 cause a sporulation defect in *Bacillus subtilis*.

J Gen Appl Microbiol. 2013;59:105-17.

Yano K, Wada T, Suzuki S, **Tagami K**, Matsumoto T, Shiwa Y, Ishige T, Kawaguchi Y, Masuda K, Akanuma G, Nanamiya H, Niki H, Yoshikawa H, Kawamura F.

Multiple rRNA operons are essential for efficient cell growth and sporulation as well as outgrowth in *Bacillus subtilis*.

Microbiology. 2013;159:2225-36.

Suzuki S, Tanigawa O, Akanuma G, Nanamiya H, Kawamura F, **Tagami K**, Nomura N, Kawabata T, Sekine Y.

Enhanced expression of *Bacillus subtilis yaaA* can restore both the growth and sporulation defects caused by mutation of *rplB*, encoding ribosomal protein L2.

Microbiology (2014, in press)

④ 学会発表

○ 田上和美、前橋真利江、渡辺和哉、河村富士夫、花井亮

枯草菌の2つの生活環におけるダイマーリボソームの運命

(第8回日本ゲノム微生物学会年会 2014.3.7-9 東京農業大学 世田谷キャンパス)