

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15253

研究課題名(和文)細胞内Mg<sup>2+</sup>濃度とリボソームの相関関係解明と応用研究課題名(英文) Investigation of the relationship between intracellular Mg<sup>2+</sup> concentration and ribosomes

研究代表者

赤沼 元気 (Akanuma, Genki)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：30580063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞内のマグネシウムイオン(Mg<sup>2+</sup>)濃度変化に対してどのような影響を受けるのかを検証した。細胞内Mg<sup>2+</sup>濃度の増加に際しては、リボソームの翻訳活性低下が観察されたが、リボソームを新規合成する傾向も見られた。一方Mg<sup>2+</sup>濃度低下時には70Sリボソームが分解されることが分かった。今回の結果から、細胞の1/4のMg<sup>2+</sup>をキレートするリボソームが、Mg<sup>2+</sup>の貯蔵庫として機能する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リボソームはタンパク質を合成する複合体であり、マグネシウムイオン(Mg<sup>2+</sup>)は多様な酵素機能やリボソームの構造維持に必須な金属イオンである。どちらも全ての生物において生命活動維持に欠かせないものだが、細胞内における両者の関係について詳細に調査した例は無く、リボソームがMg<sup>2+</sup>の貯蔵庫として機能する可能性を示した本研究の成果は学術的に大きな意義を持つと言える。また、本研究で開発した細胞内Mg<sup>2+</sup>濃度を操作する技術は微生物の醗酵生産能を向上できる可能性も秘めており、応用面での発展も期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the influence of the change of intracellular Mg<sup>2+</sup> concentration on the ribosomes. Excess Mg<sup>2+</sup> reduced the cellular translational activity and induced the transcription of rRNA. When decreasing the intracellular Mg<sup>2+</sup> concentration, the amount of 70S ribosome was significantly decreased. These results suggest that the ribosomes which can chelate 25% of Mg<sup>2+</sup> in the cell are involved in the Mg<sup>2+</sup> homeostasis.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Ribosome Magnesium Bacillus subtilis

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リボソームはタンパク質合成(翻訳)を担う複合体であり、rRNA とリボソームタンパク質から構成される。バクテリアにおいては 30S と 50S のサブユニットが会合することで、翻訳活性を持つ 70S リボソームが形成される。リボソームの構造維持にはマグネシウムイオンが不可欠であり、rRNA とリボソームタンパク質の結合やサブユニット同士の会合にも  $Mg^{2+}$  が使われる。立体構造解析からは、リボソーム 1 分子につき少なくとも 170 原子もの  $Mg^{2+}$  が含まれていることが明らかにされており、対数増殖期では細胞内の 1/4 の  $Mg^{2+}$  をキレートする計算になる。さらに  $Mg^{2+}$  は翻訳因子や tRNA のリボソームへの結合にも関与することが分っており、リボソームの翻訳活性にも重要な役割を果たす。このように、リボソームと  $Mg^{2+}$  の関係については古くから研究が行われてきたが、そのほとんどが調製したリボソームを用いた *in vitro* の解析であり、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度とリボソームの関係について詳細に解析した例はこれまで無かった。

### 2. 研究の目的

リボソームはタンパク質を合成する複合体であり、マグネシウムイオンは多様な酵素機能やリボソームの構造維持に必須な金属イオンである。どちらも全ての生物において生命活動維持に欠かせないものだが、細胞内における両者の関係について詳細に調査した例は無い。その中で応募者は、リボソームと  $Mg^{2+}$  の細胞内濃度に相関性があることを発見した。そこで本研究では、細胞内の  $Mg^{2+}$  濃度変化に対してリボソームがどのような影響を受けるのかを明らかにするとともに、 $Mg^{2+}$  濃度の恒常性維持に関与する可能性を検証することを目的とした。その一方で、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度を人為的に制御することでリボソームの安定化を図り、微生物による有用物質生産能向上技術の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞内  $Mg^{2+}$  濃度変化によるリボソームへの影響を観察するため、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度を人為的に操作できる株を作製した。細胞内  $Mg^{2+}$  濃度を向上させるために、 $Mg^{2+}$  取り込みトランスポーターである MgtE を高発現させ、 $Mg^{2+}$  排出ポンプである YhdP を欠損した株を作製した。一方、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度を低下させるために、3 種の  $Mg^{2+}$  取り込みトランスポーター (MgtE, YfjQ, CitM) を多重欠損させた株を作製した。さらに、 $Mg^{2+}$  濃度変化の影響が細胞内リボソーム量の低下によって顕在化するかを検証するため、リボソーム量の少ない変異株 ( $\Delta rrn8$ ) に上記の遺伝子操作を施した株を作製した。これらの株を用いて、増殖速度、リボソーム複合体形成量、細胞内翻訳活性などをモニターした。

(2) 細胞内  $Mg^{2+}$  濃度の増加によるリボソーム変異株の表現型抑制効果について検証するため、リボソームタンパク質 L1, L23, L36, S6 をそれぞれ欠損した株に、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度を向上させるための遺伝子操作を施した。作製した株について、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度、増殖速度、リボソーム複合体形成量、胞子形成能などを測定した。

(3) 細胞内  $Mg^{2+}$  濃度を高い状態に維持することでリボソームを安定化し、有用物質生産能を向上させることができるかを検証した。上記の方法で作製した株を用いて細胞内  $Mg^{2+}$  濃度を高い状態で維持し、定常期のリボソーム安定性が向上するかを評価するとともに、分泌型アミラーゼとプロテアーゼの活性を測定することで物質生産能を評価した。

(4) 細胞内  $Mg^{2+}$  を枯渇させると細胞増殖が停止するが、その条件下で増殖することが可能なサプレッサー変異株を 2 種単離した。これらのサプレッサー変異株の変異位置を同定するとともに、変異の効果を検証した。

### 4. 研究成果

(1) 細胞内  $Mg^{2+}$  濃度の増加を人為的に誘導するため、 $Mg^{2+}$  取り込みを担う MgtE の発現誘導を可能にし、 $Mg^{2+}$  の排出ポンプである YhdP を欠損させた。LB 培地に 50 mM  $MgSO_4$  を添加した培地で作製した株を培養し、MgtE の発現を誘導することで、野生株の 1.5 倍まで細胞内  $Mg^{2+}$  濃度を増加させることに成功した。いわゆるこのような  $Mg^{2+}$  過剰条件下では細胞増殖速度が低下し、Doubling time は通常の条件と比較して 2 倍になった。このときの 70S リボソーム複合体形成量をショ糖密度勾配超遠心法によってモニターしたが、 $Mg^{2+}$  濃度増加による影響は観察されなかった。70S リボソームの量的な変動は観察されなかったが、増殖速度が低下していたことから、細胞内翻訳活性の低下が予想された。そこで、*cat* 遺伝子 (クロラムフェニコール耐性遺伝子) mRNA の単位時間当たりの翻訳量をウエスタンブロッティングで測定し、翻訳活性を評価した。その結果、 $Mg^{2+}$  過剰条件下では細胞内翻訳活性が約 50% 低下することが分かった。さらに、*in vitro* の翻訳系で  $Mg^{2+}$  濃度増加がリボソームに与える影響を評価したところ、反応系に 30 mM  $Mg^{2+}$  を添加した場合、翻訳活性は 10 mM  $Mg^{2+}$  を含む反応系の 50% まで低下した。 $Mg^{2+}$  は翻訳に欠かせない金属元素だが、過剰に存在する条件では翻訳活性を抑制することが分かった。一方、 $Mg^{2+}$  過剰をリボソーム量の少ない変異株で誘導すると、これらの影響はより顕著に観察された。細胞内の 25% もの  $Mg^{2+}$  をキレートするリボソームの少ない状況では、遊離  $Mg^{2+}$  濃度が向上しやすいため、様々な影響が顕在化しやすいと考えられる。また、 $Mg^{2+}$  過剰誘導時には rRNA オペロンの転写量増加も認められており、細胞が多量の  $Mg^{2+}$  をキレートするためにリボソームを新規合成する機構の存在も示唆された。

一方、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度を抑制した条件を作り出すため、枯草菌の主要な  $Mg^{2+}$  取り込みポンプ 3 種を欠損した株を作製した。この株は約 0.5 mM の  $Mg^{2+}$  を含むと考えられる通常の LB 培地では増殖することができず、LB 培地に 40 mM の  $Mg^{2+}$  を添加することで増殖可能となる。この株を  $Mg^{2+}$  を添加した培地で培養した後、通常の LB に培地を交換すると、一定量増加した後増殖が止まる。このときの細胞内  $Mg^{2+}$  濃度は野生株を LB 培地で培養した場合と比較して 60% まで低下していた。また、 $Mg^{2+}$  枯渇誘導後、野生株では 2.3 倍程度まで増殖したものの、リボソーム量の少ない変異株では 1.5 倍程度しか増殖できなかった。リボソーム量の少ない細胞では  $Mg^{2+}$  のストックが少ないため、早い段階で増殖不可能なレベルまで  $Mg^{2+}$  濃度が低下すると考えられる。さらに、 $Mg^{2+}$  の枯渇を誘導した際の 70S リボソーム複合体形成量を観察したところ、70S リボソームが 30S と 50S のサブユニットに乖離していたことに加え、40S 程度の新たなピークも観察された (図 1)。このピークには 50S を形成する 23S rRNA が多く含まれていたことから、50S が部分的に分解されたものであると予想された。1 分子に 170 原子の  $Mg^{2+}$  をキレートするリボソームが分解されると、細胞中には多量の遊離  $Mg^{2+}$  が放出されることになる。従ってこれらの結果は、リボソームが細胞内の遊離  $Mg^{2+}$  濃度の恒常性維持に関与する可能性を示唆するものである。

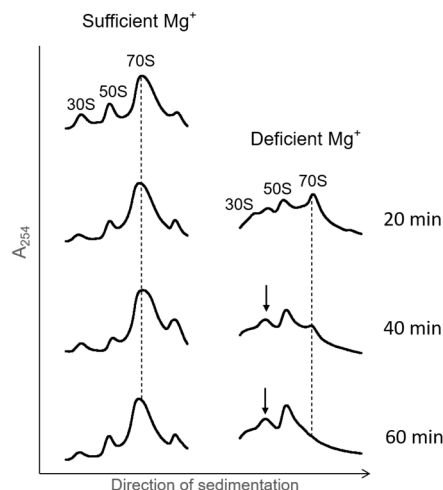


図 1.  $Mg^{2+}$  枯渇による 70S リボソーム量の減少

(2) 報告者らは、リボソームタンパク質 L34 欠損株で観察される 70S リボソーム形成量と増殖速度の低下が、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度の増加によって回復することを明らかにしていた。そこでこの現象が、70S リボソーム形成量の低下を示す他のリボソームタンパク質欠損株でも観察されるのかを検証するため、L1, L23, L36, S6 をそれぞれ欠損した株の  $Mg^{2+}$  濃度を向上させる株を作製した。これらの欠損株では 70S リボソーム量の低下に伴う細胞内  $Mg^{2+}$  濃度低下が観察されるが、MgtE の高発現と YhdP の欠損によって細胞内  $Mg^{2+}$  濃度の回復が認められた。このときのリボソームの状態を解析したところ、乖離していた 30S と 50S が会合し、70S 形成量が回復していた (図 2)。さらに、L1 欠損株と L23 欠損株に関しては、細胞内翻訳活性と増殖速度の回復も認められた。一方、L1 欠損株では孢子形成開始に必須な転写因子である Spo0A 量の低下により、孢子形成が困難となるが (孢子形成率 0.01% 以下)、 $Mg^{2+}$  濃度の向上により孢子形成率が 25% まで回復した。これらの結果から、リボソームタンパク質の種類によって効率は異なるものの、 $Mg^{2+}$  によって多くのリボソームタンパク質機能の一部が相補可能であることが明らかになった。

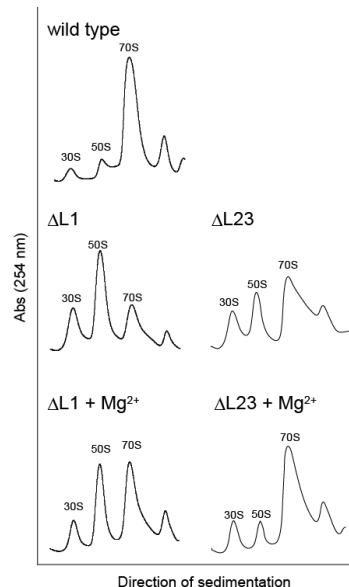


図 2.  $Mg^{2+}$  による 70S リボソーム形成能回復

(3) 枯草菌が生産する分泌型アミラーゼなどの発現量は、定常期初期から増加し、定常期後期 (24 時間以内) には低下する。一般的にバクテリアは定常期に入るとリボソーム量には減少傾向が見られ、細胞内翻訳活性は低下する。従って定常期の翻訳活性を維持することができれば、醗酵生産能を向上させることができると考えられる。これまでの結果から、 $Mg^{2+}$  濃度を適切に維持すればリボソームが安定化し、定常期の翻訳活性が維持できるのではないかと予想したが、少なくとも今回試みた条件では分泌型アミラーゼとプロテアーゼの生産量増加は認められなかった。

(4) 前述の通り、 $Mg^{2+}$  の枯渇を誘導できる 3 重欠損株は  $Mg^{2+}$  を添加しない LB 培地では増殖できない。しかし  $Mg^{2+}$  枯渇条件下で 10 時間程度液体培養を続けると、この条件下でも増殖可能なサプレッサー変異株が出現する。このようなサプレッサー変異株を 2 種単離し、次世代シーケンサーで変異位置を同定した結果、 $F_0F_1$  ATP 合成酵素の c サブユニットをコードする *atpE* と、ペプチドグリカン合成に関与する *dltB* にそれぞれ変異が同定された。 $F_0F_1$  ATP 合成酵素の活性は反転膜を調製することで比較的簡単に測定することができるため、*atpE* 変異が同定されたサプレッサー変異株を優先的に解析した。*atpE* の変異は細胞膜上の  $F_0F_1$  含有量には影響を及ぼさなかったが、 $F_0F_1$  のプロトン輸送活性はほぼ完全に失われていた。 $F_0F_1$  のプロトン輸送活性が低下した変異株では、一定の条件下で細胞の膜電位が低下することが知られている。現在 *atpE* 変異株と *dltB* 変異株の細胞膜の電位状態について調査中であり、今後の解析によって細胞内の  $Mg^{2+}$  恒常性を維持する新たな機構の解明が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Akanuma Genki, Yamazaki Kotaro, Yagishi Yuma, Iizuka Yuka, Ishizuka Morio, Kawamura Fujio, Kato-Yamada Yasuyuki	4. 巻 200
2. 論文標題 Magnesium Suppresses Defects in the Formation of 70S Ribosomes as Well as in Sporulation Caused by Lack of Several Individual Ribosomal Proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00212-00218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00212-18	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 -
1. 著者名 Akanuma Genki, Tagana Tomoaki, Sawada Maho, Suzuki Shota, Shimada Tomohiro, Tanaka Kan, Kawamura Fujio, Kato-Yamada Yasuyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 C-terminal regulatory domain of the subunit of FoF1 ATP synthase enhances the ATP-dependent H <sup>+</sup> pumping that is involved in the maintenance of cellular membrane potential in <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MicrobiologyOpen	6. 最初と最後の頁 e815 ~ e815
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mbo3.815	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 -
1. 著者名 Nguyen HTM, Akanuma G, Hoa TTM, Nakai Y, Kimura K, Yamamoto K, Inaoka T.	4. 巻 86
2. 論文標題 Ribosome Reconstruction During Recovery From High-Hydrostatic-Pressure-Induced Injury in <i>Bacillus Subtilis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01640-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.01640-19.	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 -
1. 著者名 Takada H, Roghanian M, Murina V, Dzhygyr I, Murayama R, Akanuma G, Atkinson GC, Garcia-Pino A, Haurlyuk V.	4. 巻 11
2. 論文標題 The C-Terminal RRM/ACT Domain Is Crucial for Fine-Tuning the Activation of 'Long' RelA-SpoT Homolog Enzymes by Ribosomal Complexes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.00277	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤沼元気、並木晃、河村富士夫、山田康之
2. 発表標題 リボソームを介したMg <sup>2+</sup> 濃度変化への適応
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤沼元気、河村富士夫、渡辺智、渡辺正樹、大川典哉、吉川博文、千葉櫻拓、朝井計、山田康之
2. 発表標題 リボソームタンパク質S14置換による枯草菌キメラリボソームの作製と解析
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 赤沼元気、並木晃、山崎晃太郎、矢岸勇真、河村富士夫、山田康之
2. 発表標題 リボソームと細胞内Mg <sup>2+</sup> 濃度の相関性
3. 学会等名 日本農芸化学会 2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤沼元気、河村富士夫、渡辺智、渡辺正樹、大川典哉、朝井計、千葉櫻拓、吉川博文、山田康之
2. 発表標題 リボソームタンパク質S14 の進化と30S サブユニットの多様化
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----