

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06350

研究課題名(和文)オルガネラ翻訳系の品質管理

研究課題名(英文)Quality control of the translation system in the organelle

研究代表者

阿保 達彦 (ABO, Tatsuhiko)

岡山大学・自然科学学域・教授

研究者番号：90303601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌のリボソームレスキュー因子ArfBのホモログをシロイヌナズナ、ゼニゴケ葉緑体に見出し、AtArfB、MpARFBと命名した。両者は大腸菌翻訳系でリボソームレスキュー活性を示し、また、植物細胞内では葉緑体に局在した。AtArfBを欠損するシロイヌナズナは葉のサイズが少し小さくなるものの、それ以外に特に顕著な表現型を示さなかったのに対し、MpARFBを欠損するゼニゴケが生殖器形成不全の表現型を示す予備的結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リボソームレスキューが健全な翻訳系維持に必須であることが最近示されている。オルガネラ、すなわち葉緑体やミトコンドリアの翻訳系は原核細胞の翻訳系に類似しており、そこに大腸菌のリボソームレスキュー因子ArfBのホモログが見出されたことは、リボソームレスキューが生物種を超えて重要な役割を果たすことを示唆する。さらに、本研究は、光合成の場である葉緑体の健全性の維持機構の解明を通して、CO<sub>2</sub>削減、持続的成長の維持に重要な役割を果たすものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：The homologs of Escherichia coli ribosome rescue factor ArfB were found in Arabidopsis thaliana and Marchantia polymorpha L. and named AtArfB and MpARFB, respectively. Both showed ribosome rescue activity in E. coli translation system and localized in chloroplast. Lack of AtArfB resulted in subtle reduction of the leaf size. Preliminary results suggested MpARFB is required for genital development.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：リボソームレスキュー 翻訳 オルガネラ

## 1. 研究開始当初の背景

翻訳終結には終止コドンが必要である。終止コドンを持たない mRNA が翻訳されるとリボソームは正常に翻訳を終結できず、不活性な複合体に取り込まれる、結果として翻訳系全体の活性が低下する。これを回避するのがリボソームレスキューシステムである。研究代表者はこれまでに大腸菌で働くリボソームレスキュー因子 *ArfA*, *ArfB* を発見・解析し、報告している。*ArfA* は正常の翻訳終結に働く翻訳終結因子 RF2 を不活性な複合体中に取り込まれたリボソームにリクルートし、翻訳を強制的に終結させることでレスキューする。*ArfB* は自身が RF2 や、もう一つの翻訳終結因子 RF1 のホモログであり、自身が終止コドン非依存的翻訳終結因子として不活性な複合体中に取り込まれたリボソームに作用し、翻訳を強制的に終結させることでレスキューする。いずれの因子の役割も、不活性な複合体中に取り込まれたリボソームをレスキューし、翻訳活性を高い状態に維持することである。

翻訳、特に原核生物型翻訳系における品質管理システムの重要性は、研究代表者らの研究によりリボソームレスキュー系が生命維持に必須であることが示されたことにより明確となった。また、原核細胞型とは多くの点で異なる真核細胞型翻訳系においても品質管理システムの重要性は示されていた。一方で、真核細胞内において独自の翻訳系を持つオルガネラ、すなわちミトコンドリアや葉緑体におけるリボソームレスキュー系については、ヒト・ミトコンドリアで大腸菌 *ArfB* ホモログである ICT1 が報告されたのみで研究はほとんど進んでいなかった。

## 2. 研究の目的

オルガネラでは、細胞呼吸や光合成に伴い発生する活性酸素などの反応性分子種が多く存在するため、ゲノム DNA や mRNA の損傷頻度が高いと考えられ、翻訳系の品質管理の重要性は変わらないどころか、その重要性は一層大きいものと考えられる。オルガネラの翻訳系は真核生物型の翻訳系よりも原核生物型の翻訳系に近いとされる。このことは、オルガネラの翻訳系が原核細胞型のリボソームレスキュー系を持つことを示唆する。

本研究では「オルガネラが翻訳系の品質管理を欠損した時、細胞や個体にどのような影響が出るのか」という問いを掲げ、オルガネラで機能する原核細胞型リボソームレスキュー因子の単離、解析を通して、オルガネラ、ひいては原核型翻訳系における翻訳系品質管理機構の普遍的な意義を追求した。

## 3. 研究の方法

本研究では特に葉緑体で機能するリボソームレスキュー系の解析を目指し、シロイヌナズナのゲノムから大腸菌のリボソームレスキュー因子の遺伝子、*ssrA*, *arfA*, *arfB* のホモログを探索した。その結果、大腸菌 *ArfB* のホモログをコードする遺伝子を見出し、クローン化した。

リボソームレスキュー活性を持たない大腸菌は生育できないが、その細胞内でリボソームレスキュー活性を持つ因子を発現させると生育可能になる。これを利用し、クローン化したシロイヌナズナの *ArfB* (*AtArfB*) の *in vivo* におけるリボソームレスキュー活性を調べた。また、His タグを付加する形でクローン化し、大腸菌細胞内で発現させた *AtArfB* を、His タグのアフィニティを利用して精製した。大腸菌由来の *in vitro* 翻訳系で終止コドンを持たない mRNA を翻訳させると、翻訳が正常に終結せず、反応系にペプチジル tRNA が検出される。この反応系にリボソームレスキュー活性を持つ因子を加えるとリボソームがレスキューされるためペプチジル tRNA はペプチドと tRNA に加水分解される。この系を利用し *AtArfB* の *in vitro* におけるリボソームレスキュー活性を調べた。

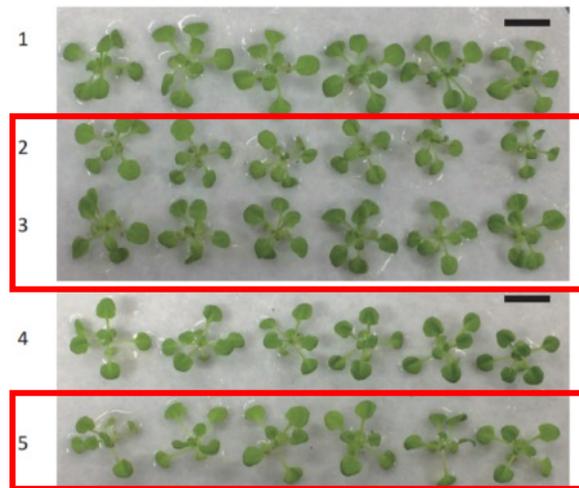
*AtArfB* の N 末端には大腸菌 *ArfB* には存在しない領域が存在し、葉緑体への移行シグナルとして機能すると予想された。そこで、この領域に GFP を融合させた融合タンパク質を植物細胞内で発現させ、蛍光を追跡することで細胞内局在を調べた。さらには *AtArfB* を発現しない植物体を作成し、さまざまなストレス下での生育を観察した。

ゼニゴケのゲノムから *AtArfB* のホモログをコードする遺伝子を探索、クローン化した。得られた遺伝子から発現するゼニゴケの *AtArfB* ホモログを *MpARFB* と命名し、*AtArfB* に関して行った解析、すなわち、大腸菌翻訳系における *in vivo* および *in vitro* リボソームレスキュー活性、N 末端領域が細胞内局在に及ぼす影響、*MpARFB* を生産しないゼニゴケの表現型を解析した。

## 4. 研究成果

シロイヌナズナゲノムから、大腸菌リボソームレスキュー因子のホモログを検索したところ、*ssrA*, *arfA* と有意な相同性を示す遺伝子が見出されなかったのに対し、*arfB* ホモログ遺伝子が複数得られた。その中でも大腸菌 *ArfB* との相同性が特に高く、後述のようにリボソームレスキュー活性を明確に示すタンパク質をコードする遺伝子を選択し、詳細に解析することとした。*AtArfB* (*Arabidopsis thaliana* *ArfB*) と名付けた。シロイヌナズナ *ArfB* は大腸菌 *ArfB* のリボ

ソームレスキュー機能の発揮に必須とされる構造的特徴、すなわち、ペプチジル tRNA の加水分解に必須なグリシン・グリシン・グルタミンのアミノ酸残基の並び (GGQ モチーフ)、C 末端の定まった構造をとらないと予想される領域を備えていた。AtArfB をコードする遺伝子をクローン化し、リボソームレスキュー機能を欠損する大腸菌細胞内にて発現させたところ、その細胞の生育を可能にしたことから、リボソームレスキュー活性を有することが示された。大腸菌 ArfB においてリボソームレスキュー機能の発揮に必須であることが示された構造的特徴である GGQ モチーフや C 末端の非構造領域を改変するとリボソームレスキュー活性を示さなかったことから、AtArfB は大腸菌 ArfB と同様の機構でリボソームをレスキューすることが示された。また、精製した AtArfB は大腸菌由来の *in vitro* 翻訳系でもリボソームレスキュー活性を示した。さらに、AtArfB は葉緑体移行シグナルとして機能する配列を N 末端に持ち、実際に葉緑体に局在することが蛍光タンパク質を指標とした解析で示された。これらの結果から AtArfB は葉緑体翻訳系で機能するリボソームレスキュー因子であると結論した。葉緑体移行シグナルとして機能する配列を削除すると、大腸菌内での発現量が飛躍的に亢進することも示された。興味深いことに、GGQ モチーフを破壊した AtArfB は N 末端の葉緑体移行シグナルとして機能する配列の有無に関わらずリボソームレスキュー活性を示さなかったのに対し、C 末端の非構造領域に変異を導入した場合、N 末端を削除するとリボソームレスキュー活性を示した。これらのことから、GGQ モチーフはリボソームレスキュー活性に必須であるのに対し、C 末端の非構造領域はリボソームレスキュー活性を低下させるものの、その影響は AtArfB 発現量の増加によりある程度カバーできることが明らかとなった。AtArfB を発現しないシロイヌナズナ植物体を作成し、乾燥、高温、強光、翻訳阻害剤などさまざまなストレス下で生育を観察したが、芽生え時において葉のサイズがやや小さくなる (右図 : Nagao *et al.*, 2020 より引用) 以外に目立った表現型は観察されなかった。



シロイヌナズナにおいて AtArfB 欠損の明確な表現型が見出せなかったことから、他の植物の ArfB を解析することとし、対象としてゼニゴケを選択した。ゼニゴケゲノムの解析から、AtArfB のホモログの存在を見出し、MpARFB (*Marchantia polymorpha* ArfB) と名付けた。MpARFB は AtArfB 同様、大腸菌 ArfB のリボソームレスキュー機能の発揮に必須とされる構造的特徴、すなわち GGQ モチーフや C 末端の非構造領域を備え、それらの特徴に依存してリボソームレスキュー活性を示すことが大腸菌を用いた *in vivo*, *in vitro* アッセイで示された。また、蛍光タンパク質を指標にした解析から、MpARFB が N 末端配列依存的に葉緑体に局在することが明らかとなり、AtArfB 同様、MpARFB でも N 末端の配列が葉緑体移行シグナルとして機能することを示した。CRISPR-Cas9 システムにより MpARFB を欠損するゼニゴケを作成した。得られたゼニゴケ MpARFB 欠損株は、乾燥、高温、強光、翻訳阻害剤などさまざまなストレス下でも明確な表現型を示さなかった。これはシロイヌナズナ AtArfB の解析の際と同じ結果であった。一方で、ゼニゴケ MpARFB 欠損株が生殖器形成不全の表現型を示す予備の結果を得た。貧栄養培地上で遠赤色光照射により生殖器形成を誘導したところ、ゼニゴケ MpARFB 欠損株は雌株とともに野生株に比べて有意に小さい生殖器を形成し、しかもその個数も少なかった (下図)。これについては野生型、および変異型 MpARFB による相補解析を進め、さらに葉緑体翻訳系の品質管理と生殖器形成との間にどのような関係があるのか、現在解析を進めている。



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 0件 / うちオープンアクセス 2件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nagao Michiaki, Tsuchiya Fumina, Motohashi Reiko, Abo Tatsuhiko   | 4. 巻<br>95              |
| 2. 論文標題<br>Ribosome rescue activity of an Arabidopsis thaliana ArfB homolog | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Genes & Genetic Systems   | 6. 最初と最後の頁<br>119 ~ 131 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1266/ggs.20-00007                            | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Kurita Daisuke, Abo Tatsuhiko, Himeno Hyouta                                  | 4. 巻<br>295                 |
| 2. 論文標題<br>Molecular determinants of release factor 2 for ArfA-mediated ribosome rescue | 5. 発行年<br>2020年             |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biological Chemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>13326 ~ 13337 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1074/jbc.RA120.014664                                    | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|                               |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名<br>牧野愛子、小山巧、本瀬宏康、阿保達彦 |
| 2. 発表標題<br>ゼニゴケのリボソームレスキュー因子  |
| 3. 学会等名<br>日本遺伝学会第93会大会（東京）   |
| 4. 発表年<br>2021年               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>徳下貴一、中尾日向子、橋本亜由己、阿保達彦             |
| 2. 発表標題<br>大腸菌ArfAの機能発現に必須なアミノ酸残基の探索         |
| 3. 学会等名<br>日本遺伝学会第92会大会（熊本市・熊本大学）（冊子体のみでの実施） |
| 4. 発表年<br>2020年                              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>徳下貴一, 阿保達彦                        |
| 2. 発表標題<br>大腸菌ArfAのリボソームレスキュー活性に及ぼすRF2の多型の影響 |
| 3. 学会等名<br>日本遺伝学会第91会大会                      |
| 4. 発表年<br>2019年                              |

|                                 |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名<br>永尾通草、土屋文奈、本橋令子、阿保達彦  |
| 2. 発表標題<br>葉緑体に局在するリボソームレスキュー因子 |
| 3. 学会等名<br>第5回リボソームミーティング       |
| 4. 発表年<br>2018年                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>永尾通草、土屋文奈、本橋令子、小澤真一郎、黒田洋詩、高橋裕一郎、阿保達彦 |
| 2. 発表標題<br>葉緑体のリボソームレスキュー因子                     |
| 3. 学会等名<br>日本遺伝学会第90回大会                         |
| 4. 発表年<br>2018年                                 |

|                               |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名<br>牧野愛子、小山巧、本瀬宏康、阿保達彦 |
| 2. 発表標題<br>ゼニゴケのArfBホモログ      |
| 3. 学会等名<br>日本遺伝学会第94会大会（札幌）   |
| 4. 発表年<br>2022年               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>関冬弥、安田しおり、阿保達彦                   |
| 2. 発表標題<br>大腸菌リボソームレスキュー因子ArfBによるArfA発現促進機構 |
| 3. 学会等名<br>日本遺伝学会第94会大会（札幌）                 |
| 4. 発表年<br>2022年                             |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|---------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 本橋 令子<br><br>(Motohashi Reiko)  |                       |    |
| 研究協力者 | 本瀬 宏康<br><br>(Motosse Hiroyasu) |                       |    |

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 |
|---------|---------|