

令和 3 年 5 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14474

研究課題名（和文）昆虫リボソームが有するhidden breakの存在意義の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the significance of hidden break structure in insect ribosome

研究代表者

浜島 りな（HAMAJIMA, Rina）

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：20784408

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：リボソームの構造は生物種を超えて高く保存されているが、昆虫リボソームは、一般にhidden breakという特徴的な構造を有している。本研究では、hidden breakの分子レベルでの解析を目的として、出芽酵母を用いた実験系の構築を試みた。その結果、昆虫由来のhidden break領域を含むrRNA配列およびその近傍のリボソームタンパク質は、出芽酵母の生育速度を著しく低下させることが明らかとなり、出芽酵母におけるリボソームの生合成や安定性に負の影響を与える可能性が示された。以上より、hidden breakを有するリボソームの生合成には、昆虫特異的な因子や機構が必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

すべての生物において、タンパク質合成は生命維持に必要不可欠であり、それを担うリボソームは生物の存続において最も重要な分子装置であると言える。さまざまな環境に適応し、種類と数の面から地球上で最も繁栄している昆虫において、リボソームが特徴的な構造を保持していることは、この構造の獲得が繁栄の一因となった可能性を示している。したがって、hidden breakがもたらす構造変化が昆虫リボソームに与えた影響の解明は、昆虫の繁栄の要因に対して新たな知見をもたらす可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The ribosome structure is highly conserved from yeast to humans, while the insect ribosome generally has a characteristic structure, called hidden break. To elucidate the significance of hidden break, I tried to construct the experimental model using yeast. I found that the growing of yeast was significantly reduced by introducing the rRNA sequence with hidden break site and the ribosomal protein located near the hidden break site, both of which derived from insect, indicating that introduced rRNA sequence and ribosomal protein have a negative influence on ribosome synthesis or stability in yeast. These results suggest that insect-specific factor(s) or mechanism(s) may be needed for the synthesis of ribosome with hidden break.

研究分野：昆虫科学

キーワード：リボソーム 昆虫 hidden break

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の rRNA は、原核生物の rRNA には存在しない数十の rRNA 領域を有することが知られており、これらは、expansion segments (ES) と呼ばれている。ES はすべて活性中心以外の部分に存在するため、リボソームの基本的な機能には影響を与えないことが示唆されているが、様々な先行研究から、真核生物において、ES の獲得に伴う rRNA のわずかな構造変化がリボソームの生合成や翻訳過程の調節を可能にしたと考えられている。

昆虫のリボソームは、他の生物のリボソームと同様の基本構造を持つが、特徴的な“hidden break”と

いう構造を有することが知られている。hidden break は、図 1 に示したように、28S rRNA の ES19L 領域の一部の塩基の消失により、28S rRNA が二つに切断された状態で存在していることを示す。hidden break による rRNA の構造変化がほとんどの昆虫で保存されていること、上述のように rRNA の構造変化がリボソームに影響を与える可能性が高いことから、昆虫リボソームにおいて hidden break は重要な役割を果たしていることが予想されるが、その詳細は明らかにされていない。加えて、さまざまな環境に適応し、種類と数の面から地球上で最も繁栄している昆虫において、リボソームが特徴的な構造を保持していることは、この構造の獲得が繁栄の一因となった可能性を示している。したがって、hidden break がもたらす構造変化が昆虫リボソームに与えた影響の解明は、昆虫の繁栄の要因に対して新たな知見をもたらす可能性があると考えた。

hidden break は 1966 年に初めて報告され、その後、消失する塩基の位置や、さまざまな昆虫における存在が報告された。しかし、hidden break がどのようにして生じるのか、リボソームにどのような影響を与えるのかといった分子レベルでの解析は全く行われてこなかった。その原因として、rRNA をコードする DNA 領域がゲノム上に多数存在するため、変異の導入など一般的な遺伝子解析の手法の利用が困難であることが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では、昆虫リボソームが有する特徴的な構造である hidden break の分子レベルでの解析を行うことを目的として、真核生物のモデルである出芽酵母を用いた新規の実験系を構築することを旨とした。

3. 研究の方法

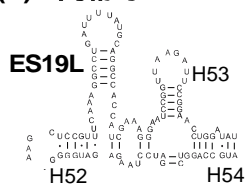
出芽酵母 NOY401 株 (温度依存的に RNA ポリメラーゼ I が機能欠損する株) と、RNA ポリメラーゼ II により rRNA を発現するプラスミドを用いて研究を行った (Nogi *et al.*, 1991)。プラスミド上の rRNA は、ガラクトース誘導性 GAL7 プロモーターの制御下に位置しているため、その発現は、出芽酵母の培地が通常のグルコース培地の場合は、グルコース抑制により抑制される。一方、ガラクトース培地に置き換えると、プラスミド由来 rRNA の発現が強く誘導される。したがって、NOY401 株に rRNA 発現プラスミドを導入し、その株を高温条件 (37°C) かつガラクトース培地において培養することで、プラスミド由来 rRNA のみを発現する出芽酵母株の作出が可能となる。そこで、NOY401 株を利用して、昆虫由来 ES19L 領域を持つ rRNA を発現する出芽酵母株の作出を試み、出芽酵母において、hidden break を持つ昆虫様リボソームを形成できるかどうかを調査した。

4. 研究成果

(1) 出芽酵母において欠損可能な ES19L 領域の同定

昆虫の ES19L 領域を持つ rRNA のみを発現する出芽酵母株を作出するため、はじめに、出芽酵母の rRNA において、欠損可能な ES19L 領域の同定を行った。先行研究において、ES19L 領域に 29 塩基の欠損をもつ rRNA のみを発現する出芽酵母 NOY504 株 (温度依存的に RNA ポリメラーゼ I が機能欠損する株) は、野生型 rRNA のみを発現する NOY504 株と同程度の生育速度を示すことが報告されていた (Ramesh and Woolford, 2016)。そこで、今回用いる NOY401 株においても、先行研究と同様の結果が得られるかどうかを確認した。出芽酵母 rRNA の ES19L 領域に 29, 24, 20, 8 塩基の欠損をそれぞれ持つ rRNA を発現するプラスミドを作出し (図 2)、NOY401 株にそれ

(A) 出芽酵母



(B) ヒト

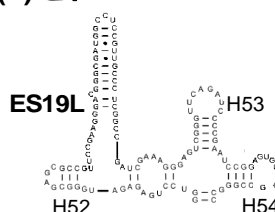
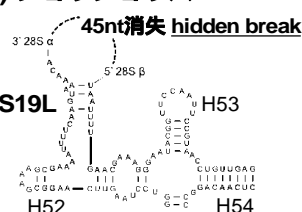


図1. rRNAのES19L領域の比較

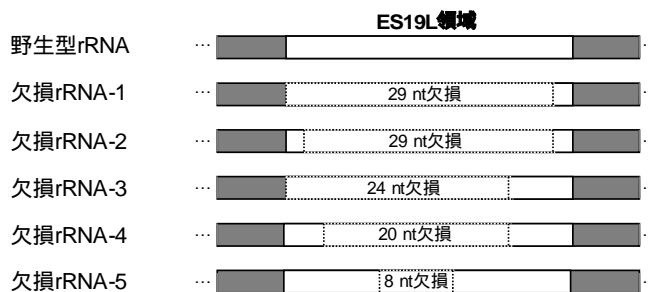
昆虫では、45 ntの欠失があるため、rRNAがα、βの二つに分かれている (hidden break)。Xie *et al.*, 2012およびAnger *et al.*, 2013を改変。Hはヘリックス構造を示している。

(C) ショウジョウバエ



それぞれの rRNA 発現プラスミドを導入した。まず、作出した株について、通常温度条件 (25°C) かつガラクトース培地において培養し、野生型 rRNA を発現するプラスミドを導入した株と生育速度に差がないことを確認した。その後、作出した株を、高温条件 (37°C) かつガラクトース培地において培養し、プラ

図2. 出芽酵母rRNAにおけるES19L領域の欠損可能配列の決定



スミド由来野生型 rRNA のみを発現する株と生育速度を比較した。その結果、欠損 rRNA-1、欠損 rRNA-2、欠損 rRNA-3 のみをそれぞれ発現する株は生育がほとんど観察されなかった。一方、欠損 rRNA-4、欠損 rRNA-5 のみをそれぞれ発現する株は、野生型 rRNA のみを発現する株と比較して生育速度は遅いものの、生育することが示された。これらの結果から、今回の実験条件では、先行研究とは異なり、rRNA の ES19L 領域の 29 塩基欠損は、出芽酵母の生育に負の影響を与えること、20 塩基以下の欠損であれば、野生型 rRNA のみを発現するものと比較して生育速度は遅くなるものの、生育に負の影響を与えないことが明らかになった。また、通常温度条件 (25°C) かつガラクトース培地での培養では、株間で生育速度に差異が認められなかったことから、内在性の野生型 rRNA の存在下では、これらの欠損 rRNA が与える生育への負の影響は小さいことが示唆された。

(2) 昆虫由来 ES19L 領域を持つ rRNA を発現する出芽酵母株の作出

(1)で同定した 2 つの欠損可能な ES19L 領域 (欠損 rRNA-4、欠損 rRNA-5 において欠損されている領域) に、hidden break によって消失する配列を含むキイロショウジョウバエの ES19L 領域を導入した rRNA を発現するプラスミドをそれぞれ作出し、NOY401 株にそれぞれの rRNA 発現プラスミドを導入した。まず、作出した株について、通常温度条件 (25°C) かつガラクトース培地において培養し、野生型 rRNA を発現するプラスミドを導入した株と生育速度に差がないことを確認した。その後、作出した株を、高温条件 (37°C) かつガラクトース培地において培養し、プラスミド由来野生型 rRNA のみ、欠損 rRNA-4 のみ、欠損 rRNA-5 のみを発現する株と生育速度を比較した。その結果、キイロショウジョウバエの ES19L 領域を導入した rRNA のみを発現する株の生育は、全く観察されなかった。これらの結果から、hidden break によって消失する配列を含むキイロショウジョウバエの ES19L 領域は、出芽酵母の生育に負の影響を与えることが明らかとなった。また、(1)での結果と同様に、通常温度条件 (25°C) かつガラクトース培地での培養では、野生型 rRNA を発現するプラスミドを導入した株と比較して生育速度に差異が認められなかったことから、内在性の野生型 rRNA の存在下では、キイロショウジョウバエの ES19L 領域が与える生育への負の影響は小さいことが示唆された。先行研究において、マウス由来の ES19L 配列を持つ rRNA を発現する出芽酵母株が生存可能であることが報告されていたため (Musters *et al.*, 1991)、キイロショウジョウバエ由来 ES19L 配列により生育が阻害される可能性は低いと予想していたが、今回の結果から、hidden break を含む昆虫由来 ES19L 領域は、出芽酵母におけるリボソームの生合成や安定性等に負の影響を与えることが示唆された。

(3) 昆虫のリボソームタンパク質 L23a を発現する出芽酵母株の作出

ES19L の近傍に存在するリボソームタンパク質 (RPL23a, 出芽酵母ホモログは RPL25) には昆虫特異的な配列が存在し、昆虫の RPL23a は、他の生物と比べ 1.5-2 倍の大きさとなっている。また、結晶構造解析によって、RPL23a に存在する昆虫特異的な配列は、hidden break に隣接するように存在していることが示されている (Anger *et al.*, 2013)。これらのことから、昆虫の RPL23a が hidden break の生成もしくは安定性に関与することが予想された。そこで、キイロショウジョウバエ RPL23a を発現する出芽酵母株の作出を試みた。まず、キイロショウジョウバエの ES19L 領域を持つ rRNA のみを発現する出芽酵母株において、キイロショウジョウバエ RPL23a を発現させ、生育速度への影響を調査した。その結果、キイロショウジョウバエ RPL23a 存在下においても、この株の生育は回復しないことが明らかとなった。次に、キイロショウジョウバエ RPL23a のみを発現する出芽酵母株の作出を試みた。この株は、先行研究で生育可能なことが報告されていたが (Ross *et al.*, 2007)、今回の実験条件では作出することができなかった。これらの結果から、今回用いた実験条件では、キイロショウジョウバエ RPL23a は、出芽酵母において機能的でないことが示唆された。

(1)から(3)に示した結果より、昆虫由来の hidden break 領域を含む rRNA 配列およびその近傍のリボソームタンパク質 RPL23a は、今回の実験条件において、出芽酵母の生育速度を著しく低下させることが明らかとなり、出芽酵母におけるリボソームの生合成や安定性に負の影響を与える可能性が示された。これらのことから、hidden break を有するリボソームの生合成には、昆虫特異的な因子や機構が必要であることが示唆された。今後は、使用する出芽酵母株の変更な

どの実験条件の再検討や、他の昆虫由来の ES19L 領域や RPL23a を用いた実験、他の rRNA の ES 領域の解析等を進めることによって、昆虫リボソームにおける hidden break の存在意義を明らかにすることができると思う。

<引用文献>

Anger, A. M., Armache, J. P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D. N., Beckmann, R. (2013). Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome. *Nature*, **497**(7447), 80-85.

Musters, W., Concalves, P. M., Boon, K., Raue, H. A., van Heerikhuizen, H., Planta, R. J. (1991). The conserved GTPase center and variable region V9 from *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA can be replaced by their equivalents from other prokaryotes or eukaryotes without detectable loss of ribosomal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**(4), 1469-1473.

Nogi, Y., Yano, R., Nomura, M. (1991). Synthesis of large rRNAs by RNA polymerase II in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**(9), 3962-3966.

Ramesh, M., Woolford, J. L. (2016). Eukaryote-specific rRNA expansion segments function in ribosome biogenesis. *RNA*, **22**(8), 1153-1162.

Ross, C. L., Patel, R. R., Mendelson, T. C., Ware, V. C. (2007). Functional conservation between structurally diverse ribosomal proteins from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*: fly L23a can substitute for yeast L25 in ribosome assembly and function. *Nucleic Acids Research*, **35**(13), 4503-4514.

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 0件）

1. 著者名 Hamajima Rina, Ota Ayaka, Makino Shizuka, Millado Justine Bennette H., Kobayashi Michihiro, Ikeda Motoko	4. 巻 276
2. 論文標題 Identification of the minimal AcMNPV P143 protein region responsible for triggering apoptosis and rRNA degradation of Bombyx mori cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 197832 ~ 197832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2019.197832	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 Hamajima Rina, Saito Aya, Makino Shizuka, Kobayashi Michihiro, Ikeda Motoko	4. 巻 258
2. 論文標題 Antiviral immune responses of Bombyx mori cells during abortive infection with Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 28 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2018.09.014	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 -

〔学会発表〕 計27件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浜島りな, 酒井朗恵, 藤井耕太郎, 北島真, 大野睦人
2. 発表標題 機能不全リボソーム品質管理機構25S NRDにおけるプロテアソーム標的因子の探索
3. 学会等名 第5回Ribosome Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浜島りな, 酒井朗恵, 藤井耕太郎, 北島真, 大野睦人
2. 発表標題 機能不全25S rRNA分解機構におけるプロテアソーム標的因子の探索
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------