

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380054

研究課題名(和文) RsgA/RbfAが関わるリボソームの新しい機能

研究課題名(英文) Novel function of ribosome involved in RsgA/RbfA

研究代表者

姫野 俵太 (Hyouta, Himeno)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：80208785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌RsgA欠損株の復帰変異株を遺伝学的かつ生化学的に解析することにより、GTPase活性を有するRsgAが「リボソーム生合成(成熟)の最終段階においてリボソーム小サブユニットからRbfAを追い出す」という機能があることを明らかにした。さらに、RimMを加えて3種類の因子のリボソーム成熟における働きを、生化学的あるいはクライオ電子顕微鏡を用いて構造生物学的に解析した。

一方、RsgAの欠損は細胞に浸透圧(塩)耐性をもたらすことを明らかにした。そして、浸透圧(塩)耐性は、RsgA以外のリボソーム成熟因子の欠損によってももたらされることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：From analyzing RsgA-deficient Escherichia coli strain and its revertant strains, we found a function of RsgA having a GTPase activity: RsgA dissociates RbfA from the small (30S) subunit during the last stage of ribosome maturation. In addition, the roles of three ribosome maturation factors including RsgA, RbfA and RimM in the ribosome maturation process have been investigated using biochemical and structural approaches.

We also found that RsgA deprivation provides resistance to osmotic (salt) stress with the cell. Resistance to osmotic (salt) stress is also provided by deprivation of other ribosome maturation factors.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：RsgA YjeQ RbfA リボソーム GTPase 浸透圧ストレス RimM

1. 研究開始当初の背景

我々は、微生物および植物に広く保存されている機能未知タンパク質 YjeQ の機能を探っていたところ、本タンパク質がリボソーム小サブユニットによって活性化される GTP 加水分解酵素であることを明らかにし、RsgA (ribosome small subunit-dependent GTPase A) と命名した (Himeno *et al.*, 2004)。なお、既知の翻訳で働く GTPase は全てリボソーム大サブユニット中の GTPase センターで活性化されることが知られているが、リボソーム小サブユニットで活性化される GTPase は RsgA が唯一のものである。この発見は、大サブユニット上にある既知の GTPase センター以外に、小サブユニット上にも未知の GTPase センターが存在することを示すものである。

RsgA を欠損させると、細胞は極めて生育速度が遅いという表現型を示し、細胞中では 70S リボソームのうちの大多数が翻訳休止状態と考えられる大小二つのサブユニットに解離する。リボソーム関連因子という点から、タンパク質生合成あるいは生体超分子リボソームの生合成との関わりが想定されているものの、本 GTPase がリボソーム上でどのような機能を果たしているのか、そしてそれが細胞にとってどのような意味があるのかといった問題は未解決のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、応募者の予備的な研究結果をもとにして、リボソームの生合成(成熟)の過程における RsgA と遺伝学的関連が示された RbfA の関係について、遺伝学および生化学的な解析に構造生物学的アプローチを加えてその分子メカニズムを詳しく解析する。さらに、遺伝学および生化学的な解析により RsgA あるいは RbfA とその他の成熟因子との関係を一一つ明らかにしていくことにより、リボソームの生合成(成熟)の過程の全容解明につなげる。一方、RsgA ノックアウト細胞の遺伝子発現解析や生理学的解析を行うことで、RsgA と細胞の浸透圧耐性との関係、ひいてはリボソーム生合成と細胞の浸透圧耐性との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

「RsgA が、リボソームの生合成(成熟)の過程の途中でリボソーム小サブユニット前駆体に結合した RbfA を成熟過程の最終段階においてリボソーム小サブユニットから解離させる」という応募者の発見を基礎として、本研究ではまず、リボソームの生合成(成熟)の過程における RsgA と RbfA の関係について、生化学的な解析に加えて構造生物学的アプローチにより、その分子メカニズムを詳しく解析する。同時に遺伝学および生化学的なアプローチを駆使することにより、RsgA/RbfA に関わる他の因子に研究対象を広げ、その働き

を調べる。一方、「RsgA ノックアウト細胞が高浸透圧に対して耐性を示す」という発見をもとにして、RsgA ノックアウト細胞の遺伝子発現解析や生理学的解析を行うことで、これまでに知られている細胞の浸透圧耐性のメカニズムに RsgA がどのように関わるかについて明らかにしていく。

4. 研究成果

まず、大腸菌 RsgA 欠損株の復帰変異株を遺伝学的かつ生化学的に解析することにより、「RsgA が生合成途中のリボソーム小サブユニットから RbfA を追い出す」という機能があることを明らかにした。そして、RsgA の GTP 加水分解活性の活性化を指標に解析することにより、RsgA はリボソーム単独よりもリボソーム/RbfA 複合体をターゲットとすることを明らかにした。RsgA は未成熟のリボソームより成熟したリボソームを好むことから、リボソーム生合成の最終段階で働くものと考えられた。

次に、もう 1 種類のリボソーム成熟因子と考えられる RimM との関わりについて研究を行った。RimM 欠損株は RsgA 欠損株と同様に 16S rRNA の前駆体と考えられる 17S RNA を蓄積していた。また、RimM 欠損株における 30S サブユニット前駆体は RsgA 欠損株における 30S サブユニット前駆体よりも、リボソームタンパク質の種類が少なかった。以上より、30S サブユニット成熟過程において、RimM は RsgA よりも前の段階で働くことが示唆された。クライオ電子顕微鏡を用いた解析により、RsgA および RbfA は 30S サブユニットの body に結合するのに対して、RimM は head に結合することを明らかにした。

また、RsgA および RbfA を同時に欠損させた細胞に蓄積する 30S サブユニット前駆体の構造についてクライオ電子顕微鏡を用いて解析した。高塩濃度および低塩濃度のもとで精製してきたサンプルを解析したところ、30S サブユニット生合成(成熟)過程における 2 つの異なったステージを反映していると考えられる構造を得ることに成功した。また、30S サブユニット生合成(成熟)過程における 17S RNA の構造変化および 17S RNA から 16S rRNA へのプロセッシングに関わるリボソームタンパク質 S5 の役割を示唆する像も得られた。

一方、すでに我々は RsgA 欠損株が高濃度の塩に対して抵抗性を示すことを明らかにしていたが、今回 RbfA 欠損株をはじめとする他のリボソーム生合成関連因子の欠損株も同じように塩耐性を示すことを明らかにした。この結果は、「リボソーム生合成の異常は細胞の塩耐性(浸透圧耐性)をもたらす」という一般的命題を提唱することとなった。また、このリボソーム異常をもたらす塩耐性には細胞内のストレス応答に関わるセカン

ドメッセンジャーである ppGpp を必要としないことを明らかにした。

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8件)

Kurita, D., Muto, A., Himeno, H., *In vitro trans-translation assay.*, *Methods in Molecular Biology*, 査読有、Vol. 905, 2012, 311-325

DOI:10.1007/978-1-61779-949-5_20

Guo, Q., Goto, S., Chen, Y., Feng, B., Xu, Y., Muto, A., Himeno, H., Deng, H., Lei, J., Gao, N., Dissecting the in vivo assembly of the 30S ribosomal subunit reveals the role of RimM and general features of the assembly process. *Nucleic Acids Res.*, 査読有、Vol. 41, 2013, 2609-2620

DOI:10.1093/nar/gks1256

Goto, S., Muto, A., Himeno, H., GTPases involved in bacterial ribosome maturation., *J. Biochem.*, 査読有、Vol. 153, 2013, 403-414

DOI:10.1093/jb/mvt022

姫野 俵太、栗田大輔、武藤 昱、2つの機能を有する tmRNA による細菌の翻訳解消システム、*実験医学*、査読無、Vol. 31, No. 7, 2013, 54-60

Hase, Y., Tarusawa, T., Muto, A., Himeno, H., Impairment of ribosome maturation or function confers salt resistance on *Escherichia coli* cells., *PLoS ONE*, 査読有、Vol. 8, 2013, e65747

DOI: 10.1371/journal.pone.0065747

Himeno, H., Kurita, D., Muto, A., Mechanism of *trans-translation* revealed by *in vitro* studies., 査読有、*Frontiers in Microbiology*, Vol. 5, 2014, 65

DOI: 10.3389/fmicb.2014.00065

Yang, Z., Guo, Q., Goto, S., Chen, Y., Li, N., Yan, K., Zhang, Y., Muto, A., Deng, H., Himeno, H., Lei, J., Gao, N., Structural insights into the assembly of the 30S ribosomal subunit *in vivo*: functional role of S5 and location of the 17S rRNA precursor sequence., *Protein & Cell*, Vol. 5, 2014, 394-407

DOI: 10.3389/fmicb.2014.00065

Himeno, H., Kurita, D., Muto, A., tmRNA-mediated *trans-translation* as the major ribosome rescue system in a bacterial cell., 査読有、*Frontiers in Genetics*, Vol. 5, 2014, 66

DOI: 10.3389/fgene.2014.00066

[学会発表](計16件)

Goto, S., Muto, A., Himeno, H., A GTPase dissociates a ribosome binding factor from the 30S subunit during a late stage of the bacterial ribosome biosynthesis., RNA2011 (The 16th Annual Meeting of the RNA Society), 2011年6月, Kyoto

Kurita, D., Hattori, Y., Muto, A., Himeno, H., Molecular mechanism of the early stages of *trans-translation* by tmRNA/SmpB., RNA2011 (The 16th Annual Meeting of the RNA Society), 2011年6月, Kyoto

Tarusawa, T., Hase Y., Goto, S., Muto, A., Himeno, H., Molecular mechanism of the early stages of *trans-translation* by tmRNA/SmpB, RNA2011 (The 16th Annual Meeting of the RNA Society), 2011年6月, Kyoto

Himeno, H., Kurita, D., Muto, A., Molecular mechanism of *trans-translation* mediated by tmRNA/SmpB, IUMS2011 (Internal Union of Microbiological Society 2011 Congress), 2011年9月, Sapporo

樽澤武房、長谷要一、武藤あきら、姫野 俵太、大腸菌におけるリボソーム関連因子欠損株による塩ストレス耐性の獲得、第5回日本ゲノム微生物学会若手の会、2011年9月、御殿場

後藤史門、武藤あきら、姫野 俵太、第34回日本分子生物学会、2011年12月、横浜

後藤史門、長谷要一、樽澤武房、菊地岳志、武藤あきら、姫野 俵太、大腸菌リボソーム小サブユニット依存GTP加水分解酵素RsgAの機能、第1回リボソームミーティング、2012年3月、広島

Goto, S., Muto, A., Himeno, H., Interplay of a GTPase and a ribosome-binding factor on the 30S subunit during a late stage of the bacterial ribosome biosynthesis., The 9th International Conference on Ribosome Synthesis, 2012年8月22-26, Banff

Takada, K., Kurita, D., Naoe, C., Yokogawa, T., Himeno, H., Takemoto, C., The first translocation in *trans-translation*., 第14回日本RNA学会年会、2012年7月18-20, 仙台

加藤新、佐藤洋旭、高橋大輝、姫野 俵太、武藤あきら、牛田千里、線虫 SL1 トランススプライシングは生殖細胞でより活発?、第14回日本RNA学会年会、2012年7月18-20, 仙台

樽澤武房、長谷要一、後藤史門、武藤あきら、姫野 俵太、リボソームを介した浸透圧耐性機構、第2回リボソームミーティング、2013年3月28-29、東京

栗田大輔、Mickey Miller、武藤あきら、Allen Buskirk、姫野 俵太、tmRNA/SmpB による停滞したリボソームの認識機構、第2回リ

ボソームミーティング、2013年3月28-29、東京

後藤史門、武藤あきら、姫野依太、GTPase RsgA の機能と大腸菌リボソーム生合成の過程、第10回21世紀大腸菌研究会、2013年6月20-21、修善寺

後藤史門、長谷要一、菊地岳志、栗田大輔、武藤昱、竹本千重、横山茂之、Sean R. Connell、Paola Fucini、姫野依太、RsgA(リボソーム小サブユニット依存GTP加水分解酵素)の機能およびリボソームとの相互作用、第15回日本RNA学会年会、2013年7月24-26、松山

Kurita, D., Miller, M.R., Muto, A., Buskirk, A.R., Himeno, H., Recognition of mRNA length on the ribosome by tmRNA and SmpB., Ribosomes Conference 2013, 2013年7月9-12, Napa Valley, California

姫野依太、栗田大輔、武藤昱、tmRNA: non-coding RNA と coding RNA のハイブリッド、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6、神戸

〔図書〕(計3件)

Himeno, H., Kurita, D. & Muto, A., *Advances in Genetics Research* - Vol. 6, Nova Science Publishers Inc, 2011, 43

姫野依太、弘前大学知の散歩道、弘前大学出版会、2013、9

姫野依太、栗田大輔、武藤昱、生命分子を統合するRNA—その秘められた役割と制御機構、羊土社、2013、7

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://hirosaki-rna.org/himeno/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姫野依太 (Hyouta Himeno)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：80208785

(2) 研究分担者

武藤あきら (Akira Muto)

弘前大学・農学生命科学部・研究員

研究者番号：80034635

(3) 連携研究者

竹本千重 (Chie Takemoto)

独立行政法人理化学研究所・生命分子システム基盤研究領域・上級研究員

研究者番号：40306527