

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22240

研究課題名(和文)細菌リボソームRNAにコードされ生存危機ストレスにより翻訳される防御ポリペプチド

研究課題名(英文)Functional polypeptides encoded by bacterial ribosomal RNA in response to catastrophic stress

研究代表者

坂口 和靖 (Sakaguchi, Kazuyasu)

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：00315053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、抗生剤の重要性が医学的・社会的にますます大きくなっている。本研究では、ノンコーディングRNAとされている原核生物リボソームRNA(rRNA)が遺伝子情報を内在的にコードし、生存危機回避などの特殊な状況においてポリペプチドに翻訳されるという『r-Peptide』仮説の解明を目指し、rRNA配列由来のポリペプチド(r-peptide)の同定と機能について研究を実施した。バイオインフォマティクス解析より得られたr-peptideが特異的な抗-抗菌活性を有し、その作用機序モデルを示した。さらに、質量分析解析により、抗生物質存在下において酸化型r-peptideの発現が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、大腸菌の危機状態対応への進化の解明として大きな意味を持つばかりでなく、医療に対しても極めて重要な意義を持つ。本研究により、原核生物の危機回避メカニズムが解明され、この新規メカニズムに基づいた、全く新しいタイプの抗生物質の開発への展開も期待される。さらに、本研究は、タンパク質をコードしないノンコーディングRNAとされているrRNAが、特定の条件下で翻訳され機能性ポリペプチドを発現するという、生命科学・分子生物学のセントラルドグマの拡張も示すこととなった。

研究成果の概要(英文)：In recent years, antibiotics have become increasingly important in medicine and society. In this study, we investigated the identification and function of polypeptides derived from rRNA sequences (r-peptides) to elucidate the "r-Peptide" hypothesis that prokaryotic rRNA, which is supposed to be a non-protein-coding RNA, intrinsically encodes genetic information, and is translated into polypeptides under special circumstances such as when survival is threatened. The identification and function of rRNA-derived polypeptides (r-peptides) were studied to elucidate the "r-Peptide" hypothesis. Bioinformatics analysis showed that the r-peptides had specific anti-bacterial activity and provided a mechanistic model for their action. In addition, mass spectrometry analysis suggested the expression of oxidized form of the r-peptide in the presence of the antibiotics.

研究分野：生体分子化学

キーワード：ポリペプチド ストレス 翻訳 コーディング 抗菌活性 r-Peptide仮説

1. 研究開始当初の背景

抗生物質は細菌などの微生物に対する増殖抑制、あるいは殺菌作用を有しており、多くの感染症の治療に広く利用されている。抗生物質は多様な作用部位、作用機序を有しており、DNA の合成阻害、タンパク質合成阻害、細胞壁合成阻害などのメカニズムが知られている。細菌は抗生物質に対する耐性機構を有しており、酵素による分解・修飾、標的分子の変異、外膜変化による透過性減少、トランスポーターによる排出など様々な防御メカニズムが知られている。薬剤耐性菌の存在は抗生物質による感染症の治療を妨げ、院内感染など重大な健康被害を引き起こす要因となるため、医学的、社会的に大きな問題となっている。このため、新規な薬剤耐性機構の解明が強く求められている。

生命科学・分子生物学の『セントラルドグマ』において、生命現象を主として担うポリペプチド(タンパク質)は、遺伝情報を有する DNA から転写されたメッセンジャーRNA (mRNA) にコードされ、mRNA からの翻訳によって生合成される。タンパク質をコードしないノンコーディング RNA であるリボソーム RNA (rRNA) は、大腸菌 *E. coli* では 16S, 23S, 5S の 3 種が存在し、膨大な量が生合成されており、全 RNA のうち重量比で約 80%以上を占める。また、大腸菌が危機状態になったとき、rRNA の不安定化や分解などにより分子構造的な変化が起きることが知られている。

大腸菌をはじめとする原核生物は、真核生物と比較してゲノム上に非常に密に遺伝子を有し、生体機能を極めて効率良く維持している。このため、膨大に合成されている rRNA が、特殊な条件下で翻訳の反応場以外の機能を有することが強く推察される。また、大腸菌における翻訳には、真核生物のように mRNA 修飾が翻訳開始に必須ではなく、RNA 中の Shine-Dalgarno 配列に、リボソームが直接的に結合して翻訳が開始される。

以上より、ノンコーディング RNA とされている原核生物リボソーム RNA (rRNA) が遺伝子情報をコードする潜在的な Open Reading Frame (latent ORF) を有し、生存危機回避などの特殊な状況においてポリペプチドに翻訳され機能するという『r-Peptide』仮説を提唱している。

2. 研究の目的

本研究では、原核生物 rRNA が潜在的にコード情報を有し、生存危機回避などの特異な状況においてポリペプチドに翻訳されるという新規な『r-Peptide 仮説』に基づき、生存危機ストレスにより rRNA の latent ORF より翻訳されるポリペプチド (r-Peptide) を同定し、それらの危機防御における機能とその機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) ペプチド合成

すべてのペプチドは、Fmoc 固相合成法により化学合成した。HPLC で精製した後、MALDI-TOF MS により分子量を確認した。

(2) 抗菌活性

抗菌活性は、野生型大腸菌株 *E. coli* MG1655 を用いて、液体培地による濁度測定法により分析した。

(3) 形態変化解析

r-Peptide による大腸菌の形態変化は、顕微鏡観察により実施した。各種条件における大腸菌はアクリジンオレンジ染色後、蛍光顕微鏡によって得られた画像により分析した。

(4) 抗体作製

rabbit に抗原 Peptide を投与し、血清を得た。抗原 Peptide には r-Pep2 の 8 位 Ala 置換体を使用し、KLH conjugate により免疫した。得られた抗血清を、r-Pep2 の N 末端および C 末端フラグメントを結合したアフィニティカラムにより精製した。得られた精製抗体は、ELISA により特異性と親和性を測定した。

(5) 封入体の調製と質量分析解析

大腸菌の培養ペレットを、フレンチプレスおよびソニケーター超音波処理したサンプルからまず 4°C、2040 G、5 min で遠心し、上清と沈殿を得た。その後、上清を 4°C、9877 G、10 min で遠心し、上清とペレットを回収し、不溶性画分を封入体とした。得られたサンプルを

SDS-PAGE で分離後、銀染色を行った。

また、上記で得られた封入体をショットガン法により nLC-MS/MS を用いてプロテオーム解析を実施した。

4. 研究成果

(1) r-Peptide の活性解析

バイオインフォマティクス解析により大腸菌 MG1655 株の rRNA 配列から latent ORF を推定し、詳細かつ寛容な r-Peptide データベースを構築した。そのうちさらに選択した 4 種のペプチド r-Pep1~4 を化学合成した。

化学合成した r-Pep について、大腸菌に対する効果を解析した。その結果、r-Pep1 が抗菌活性を示すことが明らかとなった。さらに、r-Pep2 が、大腸菌に対するカナマイシンの抗菌活性を阻害する、抗-抗菌活性を有することを明らかとした (図 1)。

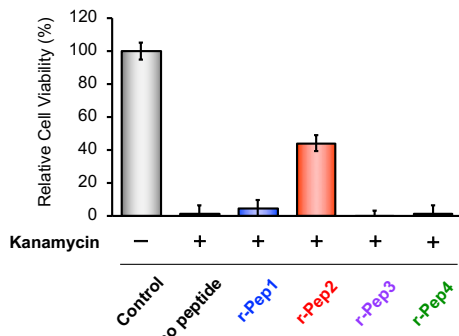


図 1 r-Pep2 の抗-抗菌活性

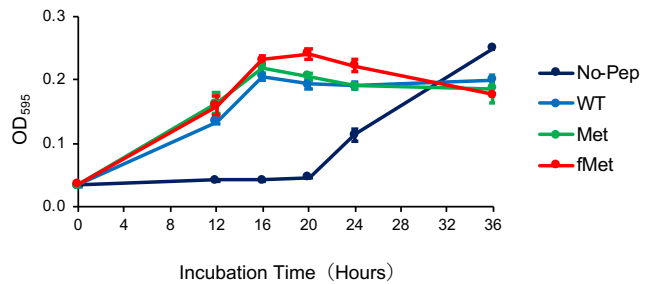


図 2 r-Pep2 活性における fMet の効果

(2) 抗カナマイシン活性における r-Pep2 の構造活性相関

r-Pep2 による大腸菌の抗カナマイシン活性に N 末端のホルミル Met 残基は重要でないことを明らかとした (図 2)。また、Ala-Scanning 解析によって、9 位 Trp、11 位 Arg、14 位 His が活性に重要であることを明らかとした (図 3)。

さらに、プラスミドベクターを用いて r-Pep2 を内部発現させた大腸菌をカナマイシン添加条件で培養した結果、内部発現した r-Pep2 も外部から添加した r-Pep2 と同様の抗カナマイシン活性を有することを明らかとした (図 4)。

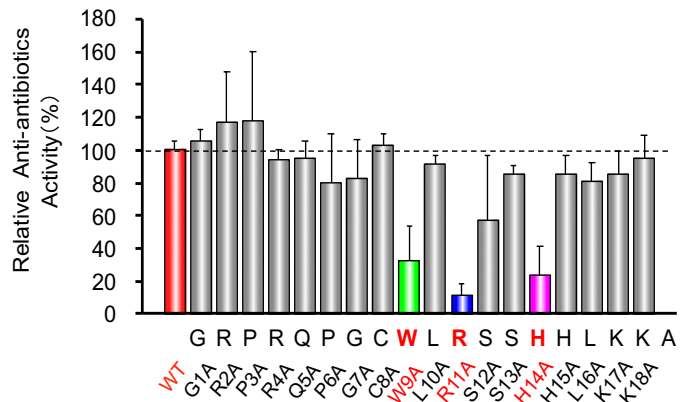


図 3 r-Pep2 の Ala-scanning

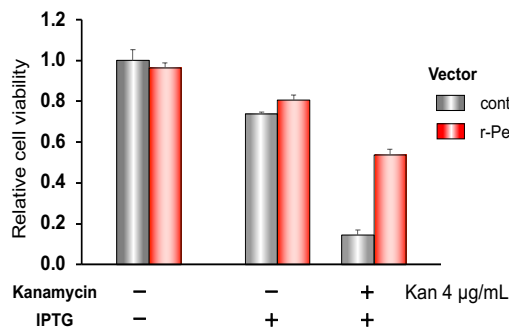


図 4 内部発現 r-Pep2 の活性

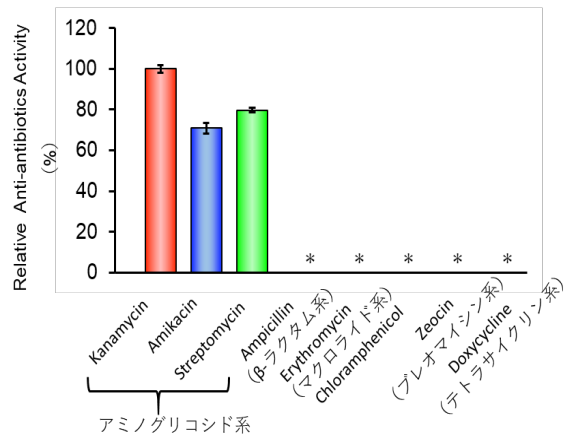


図 5 r-Pep2 の抗生物質に対する特異性

さらに興味深いことに、抗-抗菌活性がアミノグリコシド系に極めて特異的であり、 β -ラクタム系やマクロライド系など、他の作用機序を有する抗生物質に対しては作用しないことを明らかとした (図5)。

(3) r-Pep2 による大腸菌形態変化

カナマイシンおよび r-Pep2 添加時の大腸菌の形態変化を顕微鏡観察により解析した。その結果、カナマイシン存在下において r-Pep2 の添加により、大腸菌の菌長が伸長することが明らかとなった (図6)。さらに、separation stage の増加が観察された (図7)。

(4) r-Pep2 による封入体形成

興味深いことに、カナマイシン存在下において r-Pep2 が大腸菌の封入体形成を促進することが明らかとなった (図8)。封入体の個数によって大腸菌を分類し、それぞれの割合を定量した結果、カナマイシン存在下において r-Pep2 添加により、片側に封入体を有する大腸菌が 70%以上も観察された。

(5) r-Pep2 依存性封入体の解析

カナマイシン存在下で r-Pep2 依存的に形成される封入体の構成成分を解析するため、封入体を精製し、銀染色を実施した。その結果、各条件において特有のバンドが検出された (図10)。封入体の構成タンパク質の候補としてシャペロンタンパク質が nLC-MS/MS 解析により検出された。

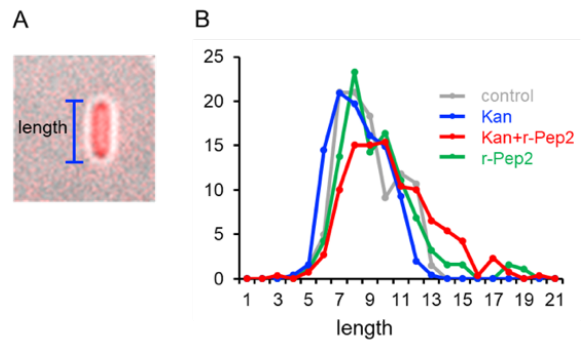


図6 r-Pep2 による菌長の変化

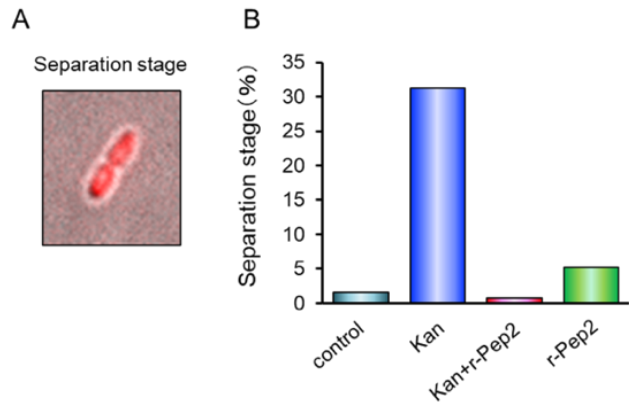


図7 r-Pep2 の separation stage への効果

さらに、蛍光性アクリドン r-Pep2 アナログをデザインし合成した。この蛍光性アナログを大腸菌に投与した結果、大腸菌内に取り込まれ、封入体に局在することが示された (図9)。

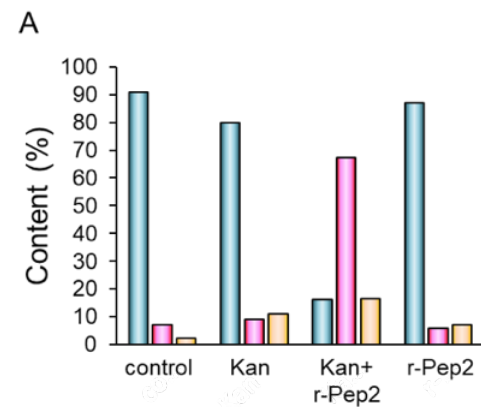


図8 r-Pep2 による封入体形成

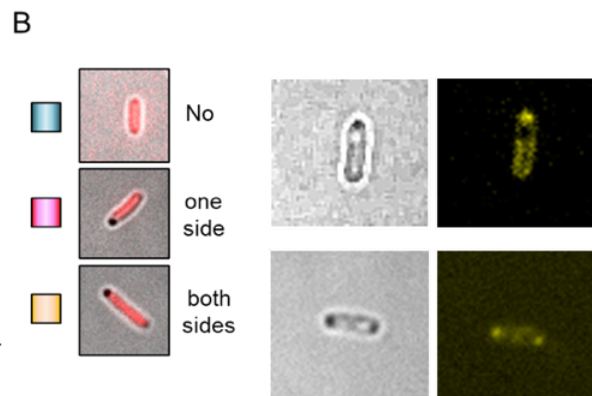


図9 蛍光性 r-Pep2 の局在

(6)内在性 r-Pep2 の同定

rabbit ポリクローナル r-Pep2 抗体を作製し、r-Pep2 のペプチドフラグメントを用いたアフィニティ精製により、r-Pep2 の N 末端あるいは C 末端をそれぞれと極めて特異的に結合する抗体を調製した。

カナマイシン存在下で培養した大腸菌 lysate を用いて r-Pep2 抗体による pull-down assay を実施し、nLC-MS/MS により解析した。その結果、ホルミル Met が付加し、酸化修飾された r-Pep2 に相当するペプチドフラグメントが検出された。

さらに、*in vitro* で酸化処理を行なった r-Pep2 を用いて、抗カナマイシン活性を解析した結果、酸化型 r-Pep2 が抗カナマイシン活性を維持することを明らかとした (図 11)。

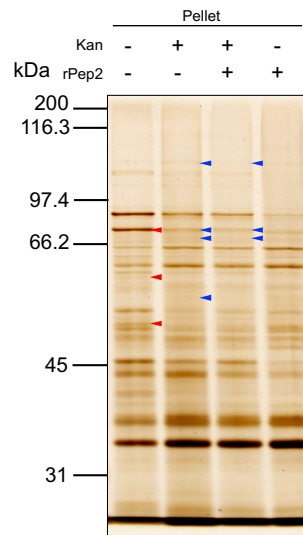


図 10 大腸菌封入体

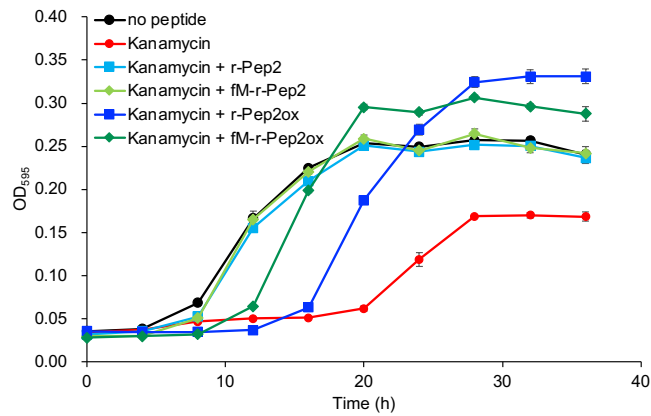


図 11 酸化型 r-Pep2 の活性

以上の本研究の結果より、r-Peptide が極めて興味ある機能を持ち、抗生物質などの危機ストレスにより、大腸菌内で発現する可能性が示唆された。

本研究の成果は、大腸菌の危機状態対応への進化の解明として大きな意味を持つばかりでなく、医療に対しても極めて重要な意義を持つ。本研究により、原核生物の危機回避メカニズムが解明され、この新規メカニズムに基づいた、全く新しいタイプの抗生物質の開発へと展開も期待される。

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 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kamada Rui, Kudoh Fuki, Ito Shogo, Tani Itsumi, Janairo Jose Isagani B., Omichinski James G., Sakaguchi Kazuyasu	4. 巻 215
2. 論文標題 Metal-dependent Ser/Thr protein phosphatase PPM family: Evolution, structures, diseases and inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 107622 ~ 107622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pharmthera.2020.107622	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 該当する
1. 著者名 Nakagawa Natsumi, Sakaguchi Shuya, Nomura Takao, Kamada Rui, Omichinski James G., Sakaguchi Kazuyasu	4. 巻 521
2. 論文標題 The tetramerization domain of the tree shrew p53 protein displays unique thermostability despite sharing high sequence identity with the human p53 protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 681 ~ 686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.10.130	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 該当する
1. 著者名 Tani Itsumi, Ito Shogo, Shirahata Yukiko, Matsuyama Yutaka, Omichinski James G., Shimohigashi Yasuyuki, Kamada Rui, Sakaguchi Kazuyasu	4. 巻 581
2. 論文標題 Role of active site arginine residues in substrate recognition by PPM1A	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.10.001	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 該当する
1. 著者名 Milosevic Jelena, Treis Diana, Fransson Susanne, Gallo-Oller Gabriel, Sveinbjornsson Baldur, Eissler Nina, Tanino Keiji, Sakaguchi Kazuyasu, Martinsson Tommy, Wickstrom Malin, Kogner Per, Johnsen John Inge	4. 巻 13
2. 論文標題 PPM1D Is a Therapeutic Target in Childhood Neural Tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 6042 ~ 6042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13236042	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14件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Junya Imaizumi, Yuma Omata, Natsumi Nakagawa, Rui Kamada, and Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 ANALYSIS OF MECHANISM FOR NOVEL ANTI-ANTIBIOTIC PEPTIDE r-PEP2 AGAINST ESCHERICHIA COLI
3. 学会等名 第57回 日本ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Anti-antibiotic Peptide derived from putative ORF in E.coli rRNA
3. 学会等名 The 18th Akabori Conference Japanese German Symposium on Peptide Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今泉潤也、中野志保、峯健太。 中川夏美、鎌田瑠、坂口和靖
2. 発表標題 大腸菌における抗-抗生物質活性ペプチドr-Pep2の作用機構
3. 学会等名 化学系学協会北海道支部2020年冬季研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Itsumi Tani, Shogo Ito, Yui Oikawa, Rui Kamada, Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Effect of Phosphorylation of Nucleolar Protein Nucleophosmin on Nucleolar Formation
3. 学会等名 35th Anniversary Symposium of The Protein Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂口周弥、中川夏美、鎌田瑠泉、James G. Omichinski、坂口和靖
2. 発表標題 脊椎動物における癌抑制タンパク質p53とp53ファミリーの四量体構造の進化
3. 学会等名 第58回日本生化学会北海道支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小俣悠馬、今泉潤也、伊達正広、鎌田瑠泉、坂口和靖
2. 発表標題 新規抗-抗生物質活性ペプチドr-Pep2の大腸菌における作用機構
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2021年夏季研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 布川優奈、坂口周弥、碓井拓哉、鎌田瑠泉、坂口和靖
2. 発表標題 コイルドコイルを介したペプチドの多量体化による生理活性増強効果
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2021年夏季研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鎌田瑠泉
2. 発表標題 好中球セブセットの分極化におけるSer/Thrホスファターゼ PPM1Dの機能解明
3. 学会等名 第7回北海道大学部局横断シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuma Omata, Junya Imaizumi, Rui Kamada, Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Anti-antibiotic activity of r-Pep2 derived from putative ORF sequence in E.coli rRNA
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Natsumi Nakagawa, Shuya Sakaguchi, Junya Wada, Rui Kamada, Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Prmt5 methylates tumor suppressor protein p53 to regulate the stability of tetramer
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuna Nunokawa, Shuya Sakaguchi, Rui Kamada, Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Analysis of oligomerized bioactive peptides for eukaryotic and prokaryotic cells
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鎌田瑠泉
2. 発表標題 Ser/Thr ホスファターゼPPM1D による好中球サブタイプの多様性制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小俣悠馬、今泉潤也、伊達正広、鎌田瑠泉、坂口和靖
2. 発表標題 新規機能性ペプチド r-Pep2の大腸菌における抗-抗生物質活性機構
3. 学会等名 化学系学協会北海道支部2022年冬季研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鎌田瑠泉
2. 発表標題 がんおよび免疫制御関連タンパク質の構造と機能に関する化学的研究
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会（招待講演）
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	鎌田 瑠泉 (Kamada Rui) (40750881)	北海道大学・理学研究院・准教授 (10101)	

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