

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580131

研究課題名(和文)大腸菌16S rRNAメチル化酵素「RsmG」の反応促進因子の解明

研究課題名(英文)Biochemical and genetic analysis of the methylation-promoting factor for the RsmG methyltransferase

研究代表者

岡本 晋 (OKAMOTO, Susumu)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所食品バイオテクノロジー研究領域・上席研究員

研究者番号：80353986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：全ての真正細菌において見られる16S rRNAの7-メチルグアノシン修飾は、メチル化酵素RsmGによって触媒される。大腸菌においてはRsmGによるメチル化が未知の因子(タンパク質)により著しく促進をされることを見いだしている。本研究では、大腸菌のメチル化促進因子を遺伝生化学的手法により同定することを目指した。メチル化促進因子の精製を試みたが、精製過程における失活が著しく、電気泳動上で特定のバンドとして確認できるレベルの精製を達成することが困難であった。一方、遺伝学的手法により、RsmGと相互作用する因子の探索を行い、候補として機能不明の遺伝子であるtasを同定した。

研究成果の概要(英文)：Bacterial rRNAs have many modified nucleotides. Among them, a 7-methylguanosine (m7G) modification in 16S rRNA is highly conserved among eubacteria. This m7G modification is catalyzed by the RsmG methyltransferase. In *Escherichia coli*, the methylation reaction catalyzed by RsmG is significantly promoted by an unknown protein factor. Here, we conducted biochemical and genetic analyses of this methylation-promoting factor. We have identified the Tas protein as a candidate.

研究分野：微生物学

キーワード：RNA 塩基修飾 メチル化酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) リボゾーム攻撃性の抗生物質であるストレプトマイシンは、1943年の発見以来、抗結核薬として長年使用されてきた。しかしながら、耐性菌の蔓延により、近年はその有効性の低下が問題となっていた。

(2) ストレプトマイシン耐性には高レベル耐性および低レベル耐性の二種類が存在することが発見当初から知られていた。高レベル耐性は、リボゾーム蛋白質 S12 あるいは 16S リボゾーム RNA (rRNA) の変異によって付与されることが明らかにされていた。一方、低レベル耐性の原因 (変異) については 60 年来不明のままであった。

(3) 研究代表者らは、二次代謝産物 (抗生物質) を過剰生産する低レベルストレプトマイシン耐性放線菌変異株を分離すると共にその諸性質について解析を行ってきた。その過程において、以下に示す成果を挙げていた。

ゲノム解析により、低レベルストレプトマイシン耐性の原因となる変異を機能未知の遺伝子 *rsmG* に見いだすことに成功した。

本遺伝子は放線菌のみならず、真正細菌に普遍的に存在しており、その変異により大腸菌、枯草菌、さらには結核菌も低レベルストレプトマイシン耐性を獲得することを証明した。

臨床分離ストレプトマイシン耐性結核菌において多数の *rsmG* 変異を見だし、60 年来のミステリーであった低レベルストレプトマイシン耐性の謎を解明することに成功した。

rsmG 遺伝子は 16S rRNA の 7-メチルグアノシン (m^7G) 修飾を司るメチル化酵素をコードすること、さらには、*rsmG* 変異に起因する m^7G 修飾の消失により低レベルストレプトマイシン耐性が付与される事も明らかにした。

試験管内酵素反応において、精製 16S rRNA は大腸菌 RsmG の良い基質ではなく、30S サブユニット中の 16S rRNA を効率的にメチル化することを示した。

2. 研究の目的

16S リボゾーム RNA (rRNA) 分子中の 7-メチルグアノシン (m^7G) 修飾は、全ての真正細菌に存在し、その欠失は低レベルストレプトマイシン耐性の形質をもたらす。申請者らにより、 m^7G 修飾はメチル化酵素 RsmG によって触媒されることが明らかにされている。本メチル化酵素の生化学的性質に関し

ては、大腸菌 (代表者らのグループ) および好熱菌 *Thermus thermophilus* (米国ブラウン大学のグループ) の酵素を用いて検討されている。その中で、好熱菌の酵素はリボゾームから精製したフリーの RNA を基質とすることが報告されている。一方、我々は、大腸菌の酵素が 30S サブユニットを基質とし、フリーの RNA をメチル化できないことを見いだしている。さらには、大腸菌の粗リボゾーム画分に RsmG によるメチル化反応を促進する因子を確認している (未発表)。このメチル化促進因子を精製・同定することにより、両微生物における RsmG 作用機作の違いを解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) メチル化促進因子の精製を試みた。精製の出発材料としては、大腸菌 *rsmG* 破壊株由来の粗リボゾームより調製した、1M 塩化アンモニウム洗浄画分を用いた。そこから、各種クロマトグラフィーによりメチル化促進因子の精製を行う事とした。アッセイ系としては、精製 (His)₆-RsmG、洗浄リボゾームおよび [*methyl*-³H]S-adenosylmethionine を用いる方法により行った。具体的には、測定サンプルを含む反応液にてメチル化反応を行った後、TCA 不溶画分 (RNA) への ³H-メチル基の取り込みを液体シンチレーションカウンターにより測定した。また、ラベル化合物を使用しないメチル化アッセイ系として methyltransferase assay kit (ケイマン・ケミカル社) を用いた。

(2) *rsmG* 遺伝子と遺伝学的に相互作用する因子を同定するために、大腸菌 two-hybrid system (アジレント社) および Synthetic sick assay による解析を実施した。

4. 研究成果

(1) *rsmG* 遺伝子は、これまでにゲノム解析が行われた全ての真正細菌、さらには、マイコプラズマにも見いだされている。また、そのゲノム上の位置も複製開始点近傍の保存性の高い領域に共通している。このような高い共通性にもかかわらず、大腸菌の RsmG はリボ 30S サブユニット中の 16S rRNA を、一方、好熱菌 *T. thermophilus* の RsmG はフリーの 16S rRNA を基質とする。この性質の違いが生じる構造的基盤を明らかにするための第一歩として、各種細菌の RsmG 蛋白質のアミノ酸配列を比較した (図 1)。

その結果、メチル基供与体である S-アデノシルメチオニン (SAM) との結合に關与する機能領域は高度に保存されているものの、それ以外の領域ではそれほど保存性が高くないことが確認された。この保存性の低い領域が基質特異性の違いに關与するものと推測された。

```

BACSU 1 MNIEEFTSGAEKGISLSPR-----QEQFELVYDMVEMSEKINLTSITEKKK
THETH 1 MFGKHPGEGSERGRALLLEGGKALGLDLKPLEAFSLYALQASGKVNLTALGGEBE
ECOLI 1 -MLNKLSSLKDAIGISLTDH-----QKMLIAVYVNHKHWKAYLTSVDPNPE
HAEIN 1 -HKAKLVLLACAKIKESDQ-----QKQILNIVNKHKWKAKLTSVDPNPE
STRCO 1 MSEAALPPVPEARDVFGD-----RYGLARRARALAEAGVKGKGLGPEVVR
MYCTU 1 -----MSPPEPAASAIKFG-----RLGLARRARALAEAGVKGKGLGPEVVR
MYCPN 1 -----MNSKLLKQVYVQVQTAQNFSLTGLKTEGG

          SAM-binding motif
BACSU 50 VYLRKPFYDSTAA-FVDFNQVNTICDVGAGGPFSLIKCFPHH-VTIVDSINRQKIT
THETH 51 VYVHGFSTLRLPLWGGIPIKIDGAGGPFSLIKCFPHH-VTIVDSINRQKIT
ECOLI 49 MLVNRHLDLSDVVA-PDLQ--DPRFDVGGGGLGPGFLALNRSKQ-FVLDLSTGKRIS
HAEIN 49 MLVNRHLDLSDVVS-PDLQ--DPRFDVGGGGLGPGFLALNRSKQ-FVLDLSTGKRIS
STRCO 50 LWNRHRLNCAMLS-EVVE--VYVDFVGGGAGLPGFLALNRSKQ-ITLDELRLRTHN
MYCTU 44 LWNRHRLNCAMLS-EVVE--VYVDFVGGGAGLPGFLALNRSKQ-ITLDELRLRTHN
MYCPN 31 IYEHVQIIEEFPNEIDSYDHKKVAIDGSGGPGCVYTKLLFQIKTLDDIDGKRKQVN

BACSU 108 FFERKLEADQENITTFCHDRAETFGQRKDVRESYDITAVARAVRVSISELCLPLVKKNG
THETH 119 FVERALEVDGKRGARALWRAVFLAREAGHREYDRAVARAVAPCVISELCLPLVKKNG
ECOLI 104 FERQVQHDGKRIEYVQSVEEP-FSEPPFDG--VTSRAVANDHVSCHDIPGSGG
HAEIN 104 FERRARERLQVYTVVLSVVEE-QPDEPFDG--VTSRAVANDHVSCHDIPGSGG
STRCO 106 FFEVVELLDHHTVVRGRASE--VMGLPPVHVVTARAVADRDRAATWGIPLRPPYG
MYCTU 100 SFRREMYVDG-VAVETVRGRASE--WVQDQLGSSAAVSAVALDQKTRKSMPLRPPYG
MYCPN 91 RGRVYASGSETPQALCAIDR-----HTEQVTLCSGSGGSIETVNAFALDLKKNV

BACSU 168 LPVYALTAASAEENAGKATTTGSELENTHSFKLFIEESDRNEMVVKIKNTPKPKYPR
THETH 179 AAVYMLGPRVREDAALPPALERRGRLGGLALQPLSGEARHLVLEKAAATPPAYPR
ECOLI 160 RPYALKGQMPDEEALLPEYQVESVVKLQVPAIDGERHLVVIKANKE-----
HAEIN 160 YPYALKGYDEEENELMKYTIQVIELSPFELIGERHLVLR-----
STRCO 163 EMLALGCTGSEKAKATALEKIGRQTSILHWGGVGVPLSTVVRVVEGESPGQVRFPA
MYCTU 158 RMLALGGERAHDVREHRRVMIASGVDRVNTCGANYLRPPATVVFARGK-----QIA
MYCPN 145 IYFHIGSLDQLEFEDSEQDKQFKLFFKFFHGRKQQLIAMKNV

BACSU 228 KPGTGNKSPIEG-----
THETH 239 RFGVPERFPLC-----
ECOLI -----
HAEIN -----
STRCO 223 AKRAKAARTGTRRRRG
MYCTU 213 RGRVYASGSETPQALCAIDR-----
MYCPN -----

```

図1 各種細菌由来 RsmG 蛋白質のアミノ酸配列の比較

SAM 結合モチーフは赤い四角で囲った。
 BACSU, *Bacillus subtilis* 168; THETH, *Thermus thermophilus* HB27; ECOLI, *Escherichia coli* W3110; HAEIN, *Haemophilus influenzae* Rd; STRCO, *Streptomyces coelicolor* A3(2); MYCTU, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; MYCPN, *Mycoplasma pneumoniae* M129

(2) メチル化促進因子の精製を試みた。精製の出発材料としては、RsmG 蛋白質自身の混入を防ぐために、*rsmG* 破壊株由来の粗リボゾーム画分を用いることとした。

粗リボゾーム画分からのメチル化促進因子の抽出に適した条件について検討したところ、1M 塩化アンモニウムによる洗浄が最的であることが分かった。続いて、硫酸（硫酸アンモニウム）沈殿による粗分画を検討した。硫酸濃度 0-45% および 45-80% の条件で分画を行い、各画分のメチル化促進活性を測定した（図2）

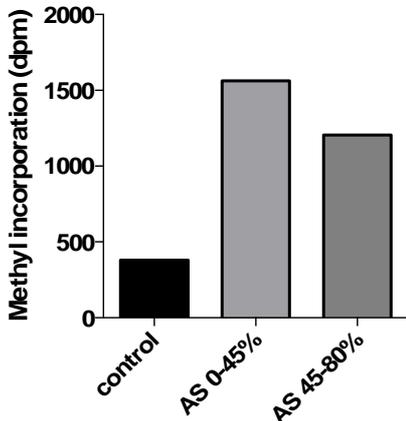


図2 硫酸沈殿によるメチル化促進因子の粗分画

分画した蛋白質は透析後、一定量を反応液に添加した。コントロールは RsmG 蛋白質のみ

を含む反応である。AS, 硫酸アンモニウム

メチル化促進因子は硫酸濃度 0-45% および 45-80% の両画分にまたがって分画された。分画の条件をさらに検討したが、大きな改善が見られなかったことから、80%飽和濃度の硫酸で処理した画分を次の精製ステップに用いることにした。

硫酸分画に続いて各種クロマトグラムによる精製を検討した。試した担体は、陰イオン交換 (Q)、陽イオン交換 (S) およびヘパリン (H) である。硫酸分画後のサンプルを透析によりバッファー交換を行った後、各種クロマトグラムに供した。蛋白質の溶出は 1M 塩化ナトリウムを含むバッファーにより行った。非吸着画分および吸着画分を回収し、メチル化促進活性を測定した（図3）

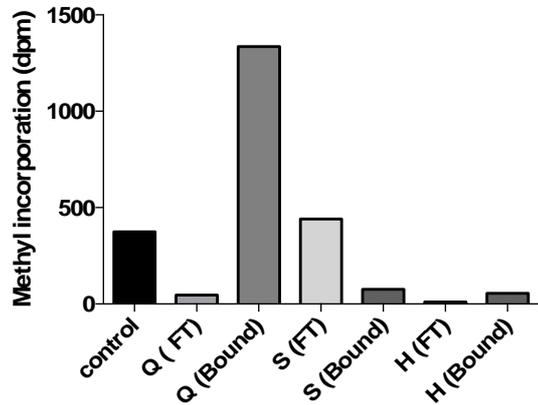


図3 各種クロマトグラムによるメチル化促進因子の精製

硫酸分画後のサンプルを透析によるバッファー交換後、各種クロマトグラムに供した。FT, 非吸着画分、Bound, 吸着画分

陰イオン交換体を用いたクロマトでは吸着画分に明確な活性が認められた。一方、陽イオン交換体およびヘパリンでは非吸着画分、吸着画分のどちらも活性は見られなかった。この結果を受け、硫酸分画の後には陰イオン交換体による精製を行うことにした。常法に従い、塩化ナトリウムの濃度勾配による溶出を試みた。その結果、溶出画分にメチル化促進活性は認められるものの、著しい活性の低下が観察された。

上記の結果を受け、メチル化促進因子の安定化を検討した。バッファー組成、陰イオン交換クロマトの条件等、種々の検討を行ったが、クロマト後の活性の低下を劇的に改善する方策は見出せなかった。

(3) これまでに述べたように、メチル化促進因子の精製を試みたが、精製過程における

失活が著しく、電気泳動上で特定のバンドとして確認できるレベルの精製を達成することが困難であった。そこで、遺伝学的手法により、RsmG と相互作用する因子の探索を行うこととした。

大腸菌 Two-hybrid system により、RsmG と物理的に相互作用する因子の探索を行った。本アッセイ系では、bait として λ cI レプレッサーと RsmG の融合蛋白質を用い、ターゲットは RNA ポリメラーゼ α サブユニットとの融合蛋白質として発現させ両者の相互作用を His3 遺伝子発現の活性化、すなわちヒスチジン要求性の相補で評価する。ランダムに切断した大腸菌ゲノムをターゲット発現プラスミドに挿入したライブラリーを複製し、bait プラスミドと共にレポーター株に導入、ヒスチジン非要求性となるクローンをスクリーニングした。

約 5 万株を調べたが、条件を満たす株は見出せなかった。

上記とは別に、*rsmG* 欠損変異合わせることにより著しい生育阻害を示す変異の探索を試みた。具体的には、染色体上の *rsmG* を欠失させた株にインタクトな *rsmG* 遺伝子を持つプラスミドを持たせて遺伝子機能を相補させておき、そこにトラスポゾンによりランダムな変異を導入した。得られたトラスポゾンライブラリーの中から、プラスミドを失いにくい株を探索した。

その結果、機能不明の遺伝子である *tas* が候補として同定された。現在、発現タンパク質を用いて *Tas* のメチル化促進活性について検討を行っている。

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1件)

李謙一、楠本正博、関塚剛史、黒田誠、内田郁夫、岩田剛敏、岡本晋、矢部希見子、稲岡隆史、秋庭正人、Extensive amplification of GI-VII-6, a multidrug resistance genomic island of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, increases resistance to extended-spectrum cephalosporins、Frontiers in microbiology、査読有、2015
DOI: 10.3389/fmicb.2015.00078

[学会発表](計1件)

岡本晋、*Escherichia coli* acid resistance: Regulation by a tRNA modification、2013 年度天然資源の開

発利用に関する日米会議 (UJNR) 食品・農業部会、2013 年 12 月 9 日、つくば国際会議場(つくば市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 晋 (OKAMOTO, Susumu)
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所食品バイオテクノロジー研究領域・上席研究員
研究者番号：80353986