

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H02163

研究課題名(和文) 原核生物30Sリボソームの成熟プロセスの解明

研究課題名(英文) Maturation process of prokaryotic 30S ribosome

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに応募者が明らかにしてきた「RsgAとRbfAの関係」を足がかりとして、細菌のリボソーム30Sサブユニット生合成過程後期に必要なとされる4種類の成熟因子(RsgA、RbfA、RimM、Era)に焦点を当て、各因子の30Sサブユニット成熟に対する役割を解析していく。同時に、生合成中間体の構造解析を行うことによりその分子メカニズムを詳しく解析し、リボソームの生合成後期過程の全容解明につなげる。また、各成熟因子を欠損させた細胞に蓄積している30Sサブユニット生合成中間体から成熟した30Sサブユニットを *in vitro* で構築する系を確立し、新規抗生物質開発に向けての基礎とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リボソームは、重要な機能部位を多数持ち、また原核生物と真核生物でその構造が大きく異なることから、抗生物質開発の有力なターゲットとなってきた。現在、リボソームの成熟過程を標的とする次世代の抗生物質の開発に期待が集まっている。本研究の成果は、リボソームの生合成中間体を標的とする抗生物質の設計に向けての基礎となるものである。また、各段階の生合成中間体から成熟した30Sサブユニットを再構成することが可能となれば、新たな抗生物質スクリーニング系の開発のための基礎となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Based on the "relationship between RsgA and RbfA" that I have clarified so far, I focused four types of maturation factors (RsgA, RbfA, RimM, Era) required for the late stage of the bacterial ribosomal 30S subunit biosynthesis to analyze the role of each factor on 30S subunit maturation. In addition, by conducting structural analysis of biosynthetic intermediates, we analyzed the molecular mechanisms in detail, leading to better understanding of the maturation process of the ribosome. We will establish a system for *in vitro* assembly of the mature 30S subunits from 30S subunit biosynthetic intermediates accumulated in maturation factor-deficient cells, and use this as a basis for the development of novel antibiotics.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：リボソーム リボソーム成熟 リボソーム生合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) リボソームは、それぞれが分子量数百万の大小二つのサブユニットからなる巨大タンパク質・RNA 複合体である。ここでは、ペプチド転移反応中心、デコーディング領域、3カ所の tRNA 結合部位、GTPase センター等の多数の機能部位が巧妙に連携を取り合うことで、遺伝情報を解読しながらタンパク質を合成していく。リボソームの各サブユニットは、() rRNA 前駆体転写直後(あるいは転写中)に始まるドメイン(30S サブユニットでは、5'ドメイン、中央ドメイン、3'ドメイン)内におけるコアの形成、()長鎖 rRNA 前駆体への数十種類のリボソームタンパク質の逐次的結合、()rRNA の段階的なプロセッシング(切断)、()rRNA およびリボソームタンパク質の修飾、()段階的なフォールディングおよび構造変化、()ドメイン同士の相互作用による全体構造の形成、という工程を経て形成される。その過程において、原核生物では数十種類、真核生物では数百種類もの成熟因子が関わりとされているが、原核生物のリボソーム形成においては、各成熟因子がどの段階でどのような働きをすることで大小サブユニットの完成に至るのかといったことについてはほとんどわかっていなかった。

(2) これまでに RsgA と命名した GTPase が、大腸菌におけるリボソーム成熟の後期で働くこと、そして RsgA が RbfA と呼ばれるリボソーム成熟因子と共同して働くことなどを明らかにした。これにより、RsgA は原核生物のリボソーム成熟因子の働きを説明できる初めての因子となった。本研究では遺伝学・生化学的解析に加えて構造生物学的解析により、これまで明らかにしてきた「RsgA と RbfA の関係」を足がかりとして、そこから RbfA の働きを解明し、別の成熟因子である RimM や Era の働きの解明へと発展させることにより、30S サブユニット成熟の後期過程の全容を明らかにする。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、遺伝学・生化学的解析に加えて構造生物学的解析により、これまで明らかにしてきた「RsgA と RbfA の関係」を足がかりとして、そこから RbfA の働きを解明し、別の成熟因子である RimM や Era の働きの解明へと発展させることにより、リボソーム 30S サブユニット成熟の後期過程の全容を明らかにする。

(2) まず成熟因子の欠損によるリボソーム成熟阻害からの復帰突然変異の解析により、各成熟因子と遺伝的に相互作用する因子及び変異を探索し、それを新たな足がかりとする。また、各因子が成熟過程のどの段階の 30S サブユニット中間体に働きかけるのか、という点を明らかにする。

(3) RsgA の GTP 加水分解活性は成熟した 30S サブユニットで最も活性化されることから、成熟過程の最終段階で働くものと考えられる。本研究では、もう 1 種類の G タンパク質である Era に着目し、最も GTP 加水分解活性が活性化される 30S サブユニット中間体を特定することで、Era が働くステップを明らかにする。また、GTP 加水分解がもたらす Era 自身および 30S サブユニット生合成中間体の構造変化に与える影響も明らかにする。

(4) 本研究で着目した成熟因子は、その欠損がいずれも 17S RNA (16S rRNA の前駆体)の蓄積をもたらすが、17S RNA から 16S rRNA への過程(プロセッシング最終段階)はブラックボックスとなっている。本研究では、16S rRNA へのプロセッシング最終段階における各因子の役割、それに関連した rRNA の二次構造の変化などを明らかにする。

(5) これらを総合して 30S サブユニット成熟過程の全体像に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌ゲノムにある各種リボソーム成熟因子の遺伝子を破壊する。また、P1 トランスダクションを用いて、これらの遺伝子欠損を組み合わせた二重破壊株を作製する。

(2) 各種リボソーム成熟因子の欠損細胞から精製した 30S サブユニット生合成中間体に含まれる 21 種類のリボソームタンパク質の組成を解析する。それにより、リボソームタンパク質が集合する順序および各成熟因子が働く順序を明らかにする。

(3) クライオ電子顕微鏡を用いて、各 30S サブユニット生合成中間体の構造を解析する。現在までに、RbfA の遺伝子破壊株および RimM の遺伝子破壊株からの中間体の構造解析に成功している。本研究では、それ以外の成熟因子遺伝子破壊株から調製した中間体の構造解析を行う。

(4) 各成熟段階にある 30S サブユニット前駆体と各種成熟因子との複合体のクライオ電子顕

微鏡解析を行う。平行して、Fe(II)-BABE を用いた部位特異的ラジカルプロービング法により 30S サブユニット中間体と成熟因子との相互作用の解析を行う。

(5) GTP 加水分解活性をもつ Era について、30S サブユニットの成熟度の違いによる GTP 加水分解の活性化の割合を解析する。最も GTP 加水分解が活性化される 30S サブユニット中間体を特定することで、Era が働くステップを明らかにする。

(6) 蛍光相関分光法 (FCS)、蛍光偏光解消法、バイオレイヤー干渉法等により、各成熟段階にある 30S サブユニット前駆体と各成熟因子の結合 (解離定数) を解析する。あるいは、放射標識した各 30S サブユニット前駆体からの解離速度を、フィルター結合を指標に解析する。

4 . 研究成果

(1) リボソーム成熟因子の遺伝子欠損株から 30S リボソーム生合成中間体を精製する方法の改良を行なった。これにより、より純度の高い 30S リボソーム生合成中間体を精製することが可能になった。

(2) Era の GTP 加水分解活性がリボソーム 30S サブユニットによって活性化されるという新たな知見が得られた。成熟した 30S サブユニットによっては GTP 加水分解活性の活性化は起こらなかったが、未成熟の 30S サブユニット前駆体によって大きく活性化された。これは、以前、我々が明らかにした RsgA の GTP 加水分解活性の活性化、すなわち「RsgA の GTP 加水分解活性は成熟した 30S サブユニットによって活性化されるが、未成熟の 30S サブユニット前駆体によっては活性化されない」こととは逆であった。この実験結果は、RsgA が 30S サブユニットの成熟過程の最終段階で働くのに対して、Era はそれよりも早い段階で働くことを示している。

また、未成熟のリボソーム 30S サブユニットによる Era の GTP 加水分解活性の活性化は、もう一つのリボソーム成熟因子 RbfA によって阻害されることを明らかにした。

(3) バイオレイヤー干渉法等により 30S サブユニット生合成中間体と各種成熟因子の相互作用解析を行うために、分子間相互作用解析システム BLITZ を導入した。また、蛍光標識可能な RsgA および Era を作製した。これらを用いて 30S サブユニット生合成中間体と各種成熟因子の相互作用解析を行なった。

(4) 「Era の GTP 加水分解活性が未成熟のリボソーム 30S サブユニットによって活性化される」反応についての反応速度論解析を行った。具体的にはリボソームおよびその前駆体存在下における Era の GTP 加水分解活性の kinetic parameter (Km および kcat) を求めた。

(5) RNaseH を用いることにより 17S RNA から 16S rRNA への変換を *in vitro* で行わせることに成功した。これにより、Era の GTP 加水分解活性と 17S RNA のプロセッシングとの関係を調べることが可能になった。

17S RNA から 16S rRNA への変換を促進する酵素の候補遺伝子の一つである YbeY の欠損株を作製した。「Era の GTP 加水分解活性が未成熟のリボソーム 30S サブユニットによって活性化される」という知見に着目し、YbeY の欠損株から調製した 30S サブユニット生合成中間体が Era の GTP 加水分解活性に与える影響を調べた。その結果、YbeY の欠損株から調製した 30S サブユニット生合成中間体は、他の成熟因子の欠損株から調製した 30S サブユニット生合成中間体とは異なり、Era の GTP 加水分解活性を活性化しないことが明らかになった。この結果は、YbeY の欠損株から調製した 30S サブユニット生合成中間体が特殊な 30S サブユニット生合成中間体であることを示しており、30S サブユニット成熟過程を知る上での鍵となることを示唆するものとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Akira Muto, Simon Goto, Daisuke Kurita, Chisato Ushida, Hyota Himeno	4. 巻 169
2. 論文標題 Involvement of GcvB small RNA in intrinsic resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in <i>Escherichia coli</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 485-489
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa122	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 Takehiro Chiba, Shin-Ya Kihara, Manami Sato, Kou Xingkui, Simon Goto, Takuma Suzumura, Gota Kawai, Hyouta Himeno, Chisato Ushida	4. 巻 557
2. 論文標題 Identification of a short form of a <i>Caenorhabditis elegans</i> Y RNA homolog Cel7 RNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 104-109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.143.	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 Daisuke Kurita, Hyouta Himeno	4. 巻 10
2. 論文標題 Bacterial Ribosome Rescue Systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 372-372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms10020372	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 -
1. 著者名 Kurita Daisuke, Abo Tatsuhiko, Himeno Hyouta	4. 巻 295
2. 論文標題 Molecular determinants of release factor 2 for ArfA-mediated ribosome rescue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13326 ~ 13337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.014664	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 Hoshino Soichiro, Kanemura Ryohei, Kurita Daisuke, Soutome Yukihiro, Himeno Hyouta, Takaine Masak, Watanabe Masakatsu, Nameki Nobukazu	4. 巻 4
2. 論文標題 A stalled-ribosome rescue factor Pth3 is required for mitochondrial translation against antibiotics in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01835-6	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 -

1. 著者名 Muto, A., Goto, S., Kurita, D., Ushida, C., Soma, A., Himeno, H.	4. 巻 171
2. 論文標題 A leaderless mRNA including tRNA-like sequence encodes a small peptide that regulates the expression of GcvB small RNA in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 459-465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac007	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7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 栗田大輔・Ma C・Gao N・姫野依太
2. 発表標題 翻訳停滞解消システムにおけるArfA/RF2/リボソーム複合体の構造解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurita, D., Ma, C., Gao, N., Himeno, H.
2. 発表標題 Structural basis of alternative ribosome rescue by ArfA and RF2.
3. 学会等名 24th Annual Meeting of the RNA Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Himeno, H., Muto, A., Kurita, D.
2. 発表標題 Ribosome rescue systems in bacteriaRibosome rescue systems in bacteria
3. 学会等名 Phages, Virus, Bacteria & Hosts (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗田大輔・Ma Chengying・Gao Ning・姫野依太
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡によるリボソーム/ArfA/RF2翻訳停滞複合体の構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 東北・北海道合同支部大会 第153回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗田大輔・Ma Chengying・Gao Ning・姫野依太
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡によるリボソーム・ArfA・RF2複合体の構造解析
3. 学会等名 第5回リボソームミーティング
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haque, M.F., Himeno, H
2. 発表標題 cAMP causes growth arrest on E. coli under stress conditions
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第88回例会・シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白山春斗、石井亮太、姫野依太
2. 発表標題 リボソーム小サブユニット生合成におけるYbeZの役割
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 姫野依太	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 10
3. 書名 mRNAの制御機構の解明と治療薬・ワクチンへの活用	

〔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
---------	---------