

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21266

研究課題名（和文）普遍的リボヌクレアーゼを介した新規バイオフィーム形成制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation mechanism of biofilm formation mediated by conserved ribonuclease

研究代表者

小川 哲弘（Ogawa, Tetsuhiro）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：40323480

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、大腸菌における新規バイオフィーム形成制御機構の解明を目的としている。これには生物に普遍的なリボヌクレアーゼが関与しており、このリボソームの活性により生じたシグナル因子が、バイオフィーム形成を抑制する。この場合、バイオフィーム形成時には、このリボヌクレアーゼの活性は阻害される必要がある。そこで、私は、このリボソームの活性制御の分子機構解明を行った。その結果、このリボヌクレアーゼは、停止中のリボソームと結合することで活性が阻害されることが分かった。本結果は、生化学的研究に加え、生物構造学的手法および一分子イメージング法からも示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオフィームは、ヒトには有害である。そのため、分子機構に関して、これまで多くの研究がなされてきたが、複雑かつ細菌種によっても異なっており、全容解明には道半ばである。今回、申請者は、リボヌクレアーゼという、無関係に思える因子の介在する分子機構に注目し、仮説の立証に成功した。本成果は、本分野の研究に新たな知見をもたらすものである。また、本機構には、新規シグナル因子が関与している。本研究では深く注目出来なかったが、このシグナル因子は真核生物ではストレス応答因子と考慮されているが、機能は不明である。この因子の機能解析に挑戦することで、生物学の新分野開拓が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate a novel regulatory mechanism for biofilm formation in *Escherichia coli*. It involves a ribonuclease, which is conserved among organisms, and the signaling factor generated by the activity of this ribonuclease inhibits biofilm formation. In this case, the activity of this ribonuclease must be inhibited during biofilm formation. Therefore, I have investigated the molecular mechanism of regulating this ribonuclease activity. The results showed that the activity of this ribonuclease is inhibited by binding to the ribosome that does not engage in translation. In addition to biochemical studies, these results could be demonstrated by biostructural and single-molecule imaging techniques.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リボソーム リボヌクレアーゼ バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

バイオフィームは、排水管の詰まりや医療機器の細菌汚染など、様々な社会的問題をもたらす。そこで、この形成機構を明らかにし、バイオフィームを排除しようとする試みがなされているが、未だ不明な点が多い。バイオフィーム形成の分子機構においては、個々の細菌に固有な経路も存在するが、多くの細菌において、cAMP や c-di-GMP ((3',5'-cyclic diguanylic acid) などの核酸に由来するセカンドメッセンジャーが、中心のかつ共通して利用されることが分かっている。

2. 研究の目的

最近、大腸菌において、普遍的リボヌクレアーゼである RNase T2 (大腸菌では RNase I と呼ばれることから、以降、RNase I と表記する) が、宿主 RNA を分解し、ここから生じる 2',3'スクレオチドモノリン酸 (2',3'-cNMPs) が、バイオフィーム形成を抑制する新規セカンドメッセンジャーとして機能することが報告された¹⁾。すなわち、RNase I の活性はバイオフィーム形成を阻害する。一方、バイオフィーム形成時には、RNase I の活性は抑制される必要があると考えられるが、そのメカニズムは不明であった。以前より、RNase I は、リボソームに結合することが分かっている。また、ストレスに曝されると、大腸菌はバイオフィームを形成するが、同時にリボソームが不活性化する²⁾。ここから、このリボソームの活性化・不活性化が、RNase I の活性調節に関わるとの仮説を立てた。そこで、本研究ではこれを実証し、このメカニズムのバクテリアでの普遍性を検証する。

3. 研究の方法

大腸菌は BW25113 株およびこれを親株とする各種破壊株 (Keio collection) を用いた。また、RNase I および各休眠因子の調製では、それぞれに His-tag を付加したものを大腸菌内で高発現させ、Ni-NTA カラムにて精製したものをを用いた。

バイオフィーム形成能の定量評価は、一般的に用いられているクリスタルバイオレット法により行った。

一分子イメージング法は以下の通り行った。まず、mRNA 上のオープンリーディングフレームの 5'末端に、翻訳停止配列を挿入した。これにより、翻訳は一過的に停止する。これに加えて、この翻訳停止配列顆粒に、短鎖ペプチド抗体 (ナノボディ) の抗原をコードする配列を連続的に配置した。抗原がリボソームにより翻訳されると、蛍光標識したナノボディがこれに結合して蛍光輝点を発するようになり、翻訳が進行していることが分かる。また、mRNA の 3'末端に相補的な蛍光標識オリゴヌクレオチドを添加し、これが mRNA と結合することで、mRNA を可視化した。精製した RNase I に対しても蛍光標識を行った。

4. 研究成果

(1) 不活性型リボソームが RNase I 活性を阻害することの *in vivo* での検証

大腸菌リボソームの不活性化にかかわる遺伝子の変異株を各種作製した。得られた変異株において不活性型リボソームが蓄積することを、スクロース密度勾配遠心法により確認した。これら変異株をアミノ酸飢餓培地で培養することでバイオフィームを形成させた後、これを定量した。その結果、これら変異株は、野生株に比べて有意に高いバイオフィーム形成能を示した。次に、これら不活性型リボソーム蓄積株において、プラスミドより RNase I を高発現させた。その結果、これらの株で観察されていた高バイオフィーム形成能が低下した。これより、不活性型リボソームが RNase I の活性を阻害することで、バイオフィーム形成能が向上することが示唆された。

(2) 細胞から調製した不活性型リボソームにおける RNase I との結合性・活性阻害能の評価

上記の各変位株において、C 末端に FLAG タグを付加した RNase I を発現させた。野生株および不活性型リボソーム蓄積株より、それぞれリボソームを粗抽出した後、結合した RNase I 量を、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより評価した。その結果、RNase I は不活性型リボソームに多く結合する様子が観察された。

次に、野生株および変異株より、活性型および不活性型リボソームを調製した。また、RNase I を大腸菌にて発現させ、精製した。この精製 RNase I を、活性型あるいは不活性型リボソームと作用させた後、RNA 分解活性を測定した。その結果、不活性型リボソームと作用させた際に、RNase I の RNA 分解活性がより強く阻害された。

(3) 試験管内で調製した不活性型リボソームにおける RNase I との活性阻害能の評価

大腸菌リボソームの不活性化に関わる因子である RMF、HPF を、His タグを付加した形で大腸菌にて高発現させた後、Ni-NTA カラムを用いて個々に精製した。これら精製 RMF、HPF を 70S リボソームに作用させることで、*in vitro* で不活性型リボソーム(100S リボソーム)を調製した。正しく 100S リボソームが形成されていることを、スクロース密度勾配遠心法を用いて確認した。

ここで調製した 100S リボソームを RNase I に作用させた後、リボソームと結合しなかった遊離の RNA 分解活性を *in vitro* で測定した。その結果、細胞から調製したリボソームを用いて行った際と同様、100S リボソームを作用させた際に、70S リボソームより強い RNase I 阻害活性を示した。また、70S リボソームであっても、ある程度 RNase I に対する阻害能を示すが、翻訳中の 70S リボソームでは、RNase I の活性をほとんど阻害しなかった。このことから、RNase I を効率よく阻害出来るリボソームは、翻訳に従事していない分子であることが示唆された。

(4) RNase I が高バイオフィーム形成能を示すことの細胞生物学的解析

公的データベースに登録されていたマイクロアレイ解析の結果から、RNase I 欠損株では、鞭毛および線毛合成が亢進することが示唆された。そこで、RNase I と鞭毛構成因子の遺伝子、あるいは RNase I と線毛構成因子の遺伝子破壊株をそれぞれ作製した。このうち、これら二重破壊株は、RNase I 単独欠損株と比較して、低いバイオフィーム形成能を示した。このことから、RNase I 欠損株における高バイオフィーム形成能には、鞭毛および線毛が関与することが示唆された。また、RNase I 欠損株では、野生株に比べて運動性が向上することが、顕微鏡観察から示された。

(5) 翻訳伸長中のリボソームと RNase I との結合性の評価

これまでの成果から、不活性型リボソーム (100S リボソーム) が RNase I と直接相互作用し、活性を阻害するという、本研究における仮説の妥当性が示されてきた。そこで、これらをより詳細に解析するために、以下の実験を行った。以前と同様、活性型リボソーム (70S リボソーム) に対し、休眠因子を作用させることで、試験管内で不活性型リボソームを調製した。そして、調製した不活性型リボソームによる RNase I の活性阻害の程度を評価した。その結果、活性型リボソームと比較して、不活性型リボソームが RNase I の活性をより強く阻害することを再度確認した。次に、活性型および不活性型リボソームを試験管内翻訳系に添加し、翻訳反応を開始させた。その後、RNase I を加え、両リボソームと RNase I との結合能を比較した。その結果、RNase I は、翻訳反応を行っているリボソームに対して結合しづらいことが分かった。また、mRNA 無添加の試験管内翻訳系、すなわちペプチド伸長が起こらない系に対して活性型リボソーム、および RNase I を添加すると、両リボソームは同程度に RNase I と結合した。以上のことから、RNase I は、ペプチド伸長を行っていないリボソームに対して、高い結合能を持つことが分かった。

(6) クライオ電子顕微鏡を用いたリボソームと RNase I の複合体構造の決定

RNase I がリボソームのいずれの部位と結合するかを明らかにするために、クライオ電子顕微鏡観察により、RNase I とリボソームとの複合体構造を決定した(大阪大学との共同研究)。その結果、RNase I は 30S リボソームサブユニットの特異的部位に結合することが示され、また、そのユニークな結合様式を明らかにすることが出来た。

(7) 一分子イメージングを用いたリボソームと RNase I との相互作用の解析

RNase I が翻訳伸長中のリボソームと結合しないことをより詳細に解析するために、一分子イメージングによる、リボソームと RNase I との相互作用の測定を行った。mRNA には、リボソームを停止させる配列を挿入した。この停止は一過的であり、一定時間が経過すると、リボソームが翻訳を開始する。これにより、試験管内で「翻訳停止リボソーム」と「翻訳中リボソーム」の両方を観察することが出来る。これを用いて測定した結果、リボソームが翻訳停止配列上に存在する際に RNase I がリボソームに結合し、翻訳が開始されると RNase I がリボソームから離れる様子が一分子レベルで観察された。

(8) RNase I による RNA 分解における *trans-translation* の関与の評価

mRNA が途中で切断などを受けることで停止コドンを失うと、リボソームは mRNA に結合した状態で立ち往生する。この状態を解消するためのシステムとして、*trans-translation* が存在する。このシステムにより、リボソームは各サブユニットに解離し、mRNA 上から離れるが、クライオ電子顕微鏡、および生化学的実験から、RNase I は *trans-translation* により解離した各サブユニット内の rRNA を分解することが示唆された。

<引用文献>

- 1) Benjamin M Fontaine, Kevin S Martin, Jennifer M Garcia-Rodriguez, Claire Jung, Laura Briggs, Jessica E Southwell, Xin Jia, Emily E Weinert. *Biochem J* (2018) **475** 1491-1506.
- 2) Thomas Prossliner, Kristoffer Skovbo Winther, Michael Askvad Sørensen, Kenn Gerdes. *Annu Rev Genet* (2018) **52** 21-348.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Minami Atsushi, Nishi Kohei, Yamada Rikusui, Jinnai Gai, Shima Hikari, Oishi Sakiko, Akagawa Hirofumi, Aono Toshihiro, Hidaka Makoto, Masaki Haruhiko, Kuzuyama Tomohisa, Noda Yoichi, Ogawa Tetsuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 RNase T2-involved selective autophagy of ribosomes induced by starvation in yeast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.07.14.548783	査読の有無 無
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 Ikeda Tomoki, Ogawa Tetsuhiro, Aono Toshihiro	4. 巻 174
2. 論文標題 Dethiobiotin uptake and utilization by bacteria possessing bioYB operon	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Research in Microbiology	6. 最初と最後の頁 104131 ~ 104131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.resmic.2023.104131	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17件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 浅井健宏, 南篤, 栃内亮太, 水流功春, 関口茉莉恵, 藤井渉, 葛山智久, 久和茂, 小川哲弘, 角田茂
2. 発表標題 非古典的翻訳開始機構不全マウスが示す心臓ストレス応答の分子機構解析
3. 学会等名 第21回 東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Minami, Takehito Tanzawa, Zhuohao Yang, Takashi Funatsu, Takayuki Kato, Tomohisa Kuzuyama, Hideji Yoshida, Tetsuhiro Ogawa
2. 発表標題 Regulation mechanism of translation through the interaction of RNase T2 with ribosome
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南 篤, 中島 満幸, 浅井 健宏, 水流 功春, 葛山 智久, 角田 茂, 小川 哲弘
2. 発表標題 定着性向上型大腸菌のマウスへの投与による腸内細菌叢変化の解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南 篤, 丹澤 豪人, 楊 倬皓, 船津 高志, 加藤 貴之, 葛山 智久, 吉田 秀司, 小川 哲弘
2. 発表標題 リボソームの休眠を介した新規rRNA分解制御機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南 篤, 山田 陸翠, 西 晃平, 葛山 智久, 小川 哲弘
2. 発表標題 構造予測を用いた出芽酵母RNase T2のC末端伸長領域の機能解析
3. 学会等名 第8回デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浅井健宏、南篤、中島満幸、水流巧春、田川陽一、葛山智久、久和茂、小川哲弘、角田茂
2. 発表標題 固相面に高い付着性を示す大腸菌変異株におけるマウス腸管内定着性の評価
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南 篤、日高真誠、葛山智久、小川哲弘
2. 発表標題 新規セカンドメッセンジャーを介したバイオフィルム形成制御機構の解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南 篤、日高真誠、葛山智久、小川哲弘
2. 発表標題 リボソームの休眠化を介した新規バイオフィルム形成制御機構の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南 篤, 日高 真誠, 葛山 智久, 小川 哲弘
2. 発表標題 普遍的リボスクレアーゼRNase T2のリボソームによる活性制御機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南 篤, 日高 真誠, 葛山 智久, 小川 哲弘
2. 発表標題 普遍的リボスクレアーゼRNase T2の大腸菌における活性制御機構の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南 篤, 日高 真誠, 葛山 智久, 小川 哲弘
2. 発表標題 普遍的リボヌクレアーゼを介した新規バイオフィルム形成制御機構に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南 篤, 丹澤 豪人, 楊 倬皓, 船津 高志, 加藤 貴之, 葛山 智久, 吉田 秀司, 小川 哲弘
2. 発表標題 Regulation mechanism of trans-translation mediated by RNase I and tmRNA
3. 学会等名 第24回日本RNA学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsushi Minami, Kohei Nishi, Rikusui Yamada, Gai Jinnai, Hikari Shima, Sakiko Ohishi, Hirofumi Akagawa, Toshihiro Aono, Tomohisa Kuzuyama, Yoichi Noda, Tetsuhiro Ogawa
2. 発表標題 Relationship between domain and function of the yeast RNase T2, Rny1p, which mediates rRNA degradation upon starvation
3. 学会等名 EMBL Conference Protein synthesis and translational control (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsushi Minami, Makoto Hidaka, Tomohisa Kuzuyama, Yoh-ichi Tagawa, Shigeru Kakuta, Tetsuhiro Ogawa
2. 発表標題 Study on the mechanism and its application of biofilm formation regulated by the conserved ribonuclease, RNase T2, in Escherichia coli.
3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of Living Systems Design Research
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南 篤, 日高真誠, 葛山智久, 小川哲弘
2. 発表標題 普遍的リボヌクレアーゼによる大腸菌バイオフィーム形成制御機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南 篤, 葛山智久, 小川哲弘
2. 発表標題 リボヌクレアーゼとリボソームの相互作用によるRNA分解活性と翻訳の制御機構
3. 学会等名 第62回生物物理若手の会夏の学校
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南 篤, 日高 真誠, 葛山 智久, 小川 哲弘
2. 発表標題 普遍的リボヌクレアーゼを介した新規バイオフィーム形成に関する研究
3. 学会等名 第20回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020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
研究協力者	南 篤 (Minami Atsushi)	東京大学・大学院農学生命科学研究科 (12601)	

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