

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：94308

研究種目：基盤研究 C

研究期間：平成 22 年度 ～平成 24 年度

課題番号：22510210

研究課題名（和文）等電点無制限 RFHR・2D・PAGE による原核生物翻訳系蛋白質の包括的解析

研究課題名（英文）Proteomic analysis of bacterial translation by iso-electric point unlimited RFHR 2D PAGE

研究代表者

和田 明（WADA AKIRA）・株式会社吉田生物研究所・バイオ情報研究部門・部門長

研究者番号：80025387

研究成果の概要（和文）：本研究で等電点無制限 RFHR・2D・PAGE の分離能と定量性をさらに向上させ、バクテリアの翻訳系蛋白質の包括的解析に適用した。我々が発見した 100S リボソーム（70S の二量体）の形成に関わる蛋白質群に重点を置き、バクテリア 15 種について解析した結果、バクテリアには二つの異なった 100S リボソームが存在することがわかった。一つは遍在する longHPF によって形成され、他は γ グループのみに存在する RMF によって形成される。

研究成果の概要（英文）：Quantitative and separating ability of RFHR 2D PAGE was improved, and it was applied to proteomics of bacterial translation. In 15 bacterial strains proteins forming 100S ribosome(70S dimer) were determined. It is RMF homolog in proteobacteria γ group, and long HPF homolog in other bacteria. Therefore two distinct 100S ribosomes exist in bacteria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：翻訳、RFHR 法・プロテオミクス・リボソーム・100S リボソーム・源核生物

1. 研究開始当初の背景

現在プロテオミクスに適用される方法は蛋白質の定量に難点がある。質量分析はペプチドのシグナルから蛋白の同定はできるが、蛋白質を知ることができない。又、等電点二次元電気泳動法も 1 種の蛋白質が複数のスポットに分裂するため定量が極めて難しい。これに反して私が開発した RFHR 二次元電気泳動法はスポットが分裂しないため単一

のスポットに収斂し、そのデンシトメトリーによって蛋白質量を定量できる。さらに RFHR 法は等電点の制約を受けないため塩基性蛋白を含む全蛋白質に適用できるという特徴を持っている。これらの特徴を生かせば「蛋白質決定・等電点無制限プロテオミクス」が可能になる。

他方、最近 100S リボソーム形成に関わる蛋白質群の研究が注目され始めた。100S

は70Sの二量体で、「活性70S～待機100S相互変換」がバクテリアの翻訳を調節する主要な機構であることを我々は見出したが、最近2種類の100S形成蛋白質が存在するらしいことがわかってきた。一つは大腸菌のRMFであり、もうひとつは黄色ブドウ球菌のHPFである。このうちRMF遺伝子はプロテオバクテリアγグループに局在するが、HPF遺伝子はバクテリア全体に遍在する。その分布の状況から考えて100Sリボソームがバクテリア全体に存在する可能性が出てきた。この二つの100Sの形成機構と機能がどう違うのかを明らかにしなければならない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、先ずRFHR法の定量性と分離能を向上させることである。そのためには非常に種類の多い中性～弱酸性蛋白質を如何に効果的に分離するかが課題となった。第二の目的は、改良されたRFHR法をバクテリアの翻訳系蛋白質に適用し、100S形成における100Sリボソームと100S形成蛋白質の定量的関係を調べ、100S形成機構を確立することである。

3. 研究の方法

15種のバクテリアの培養は普通NBRCが指定する方法による。蛋白調製はわれわれが開発した方法による。蛋白質の定量は改良RFHR法が適用される。リボソームの定量は蔗糖密度勾配遠心と紫外線分光で行う。100Sを調製するには我々が開発したBeckman 45アングルローターによる蔗糖密度勾配遠心法を用いる。

4. 研究成果

1. RFHR法の改良

塩基性蛋白中心の標準RFHR法とは異なり、二次元の全画面を中性～酸性蛋白の分離に用いる方法を開発した。先ず0次元泳動をpH10.6で行い、全ての中性～酸性蛋白を直接1次元ゲルに泳動濃縮させた。一次元泳動は標準法と逆に電極を上負、下正にして一次元の全長をpI8以下の蛋白質の分離に充てた。これで中性～酸性蛋白が使える二次元スペースが約3倍になり、詳細な解析ができるようになった。こうして中性～酸性蛋白に適した改良法と塩基性蛋白に適した標準法を合わせ運転することによって全蛋白が単一のスポットに収斂する二次元パターンが得られるようになった。この単一スポットをデンシトメトリーすれば各蛋白質の蛋白量が定量できる。

2. バクテリア100Sリボソーム形成機構の解析

上述したように、ゲノムデータベースから、RMFがプロテオバクテリアγグループのみに固有の蛋白遺伝子であり、逆にHPFがバクテリアにとって極めて保存性の高い蛋

白遺伝子であることがわかった。さらにγグループ以外の黄色ブドウ球菌が100Sを形成することも明らかになった。これらを踏まえて本研究では、γグループ以外のRMF遺伝子を持たないバクテリアで100Sがどのように形成されるかに重点を置きながら、バクテリアにおける100S形成を包括的に解明することを目指した。先ずγグループの6種 (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pectobacterium carotovorum*,) は例外なく大腸菌同様RMFによって100Sを形成した。他方その他の8株 (*Staphylococcus aureus*, 5 *Lactobacillus* species, *Thermus thermophilus* HB8, *Synechocystis* sp. PCC6803) は例外なく黄色ブドウ球菌同様HPF単独によって100Sを形成した。但しγグループのshort HPFに比べてその他のHPFホモログは約二倍の大きさのlong HPFであった。つまり殆どのバクテリアはlong HPFによって100S形成し、γグループに限ってRMFによって100S形成することがわかった。この二つの100Sの安定性は大きく異なり、RMF型100Sは約 10^{-8} Mで解離するが、long HPF型100Sは2桁以上低いKdをもつ。又RMF型100Sは定常期でのみ形成されるが、long HPF型100Sは増殖期に関係なく常に形成される。バクテリアの系統樹に照らし合わせると、本来long HPF型100Sがバクテリアの進化の早い時期に成立しており、ある時点でプロテオバクテリアαグループから、βとγの共通祖先が分岐した時HPF遺伝子が約2分の1に短縮し、それに伴いlong HPF型100S形成が不能になったと考えられる。しかしその後γがβと分岐した後、新たにRMF遺伝子を獲得して、全く性質の異なる100S形成能をもつにいたったと考えられる。なおRMFもlong HPFももたずHPFが短縮されたままのβグループのひとつ *Burkholderia multivorans* は予想通り100Sを形成できないことが判明した。以上本研究によってバクテリアにおける100Sリボソームの概要が初めて明らかになり、二つの異なる100Sリボソームが存在することが判った。

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5件)

1. Masami Ueta, Chieko Wada, Takashi Daifuku, Yoshihiko Sako, Yoshitaka Bessho, Aya Kitamura, Ryosuke L. Ohniwa, Kazuya Morikawa, Hideji Yoshida, Takayuki Kato, Tomoko Miyata, Keiichi Namba and Akira Wada

Conservation of two distinct types of 100S ribosome in bacteria
Genes to Cells 査読有 (2013) 18, in press.

2. Hideji Yoshida, Yasushi Maki, Shou Furuike, Akiko Sakai, Masami Ueta, Akira Wada.

YqjD is an inner membrane protein associated with stationary-phase ribosomes in *Escherichia coli*.
J Bacteriol. 2012 194 4178-83.
doi:10.1128/JB.00396-12.

3. A. OGATA, Akira WADA, Masami UETA, H. FUSHITANI, S. TANAKA, K. KIMURA, A. SAKAI, H. YOSHIDA, A. MIYAMOTO, Y. FUJITA and N. TANIGAWA

Proteomic Analysis Regarding Resistance to Anticancer Drugs Using a 5-Fluorouracil-Resistant Human Gastric Cancer Cell Line and The Radical-Free and Highly Reducing Method of Two-Dimensional Electrophoresis (PDF)
BULLETIN OF THE OSAKA MEDICAL COLLEGE 査読有 (2011) 57, 31-38

4. Kousei Kimura, Akira Wada Masami Ueta, Ogata A, Tanaka S, Sakai A, Yoshida H, Fushitani H, Miyamoto A, Fukushima M, Uchiumi T, Tanigawa N.

Comparative proteomic analysis of the ribosomes in 5-fluorouracil resistance of a human colon cancer cell line using the radical-free and highly reducing method of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.
Int J Oncol. 査読有 (2010) 37, 1271-8.

5. Takayuki Kato, Hideji Yoshida, Tomoko Miyata, Yasushi Maki, Akira Wada, Keiichi Namba

Structure of the 100S ribosome in the hibernation stage revealed by electron cryomicroscopy.
Structure. 査読有 (2010) 9, 18719-24. doi: 10.1016/j.str.2010.02.017.

[学会発表] (計 25 件)

1. 上田雅美、和田千恵子、和田明
バクテリアには保存された二つのタイプの 100S リボソームが存在する
第二回リボソームミーティング 2013
03 28-29 東京農工大農学部

2. 吉田秀司、島田友裕、牧泰史、古池晶
上田雅美、和田千恵子、和田明、石浜明
100S リボソーム形成に対する cAMP-CRP

の関与
第二回リボソームミーティング 2013
03 28-29 東京農工大農学部

3. 牧泰史、武内力矢、道瀬ひとみ、上田雅美、和田明、古池晶、吉田秀司、中東憲治、森浩禎

大腸菌の栄養飢餓環境における遺伝子発現応答
第 35 回日本分子生物学会年会 2012
12 11~14 福岡国際会議場

4. 別所義隆、城地保昌、木村隆志、渋谷明美、木村彩、上田雅美、和田明、竹内昌治、坂口利文、仁田原翔太、玉腰雅忠、森屋利幸、大島泰郎、西野吉則

Spring-8/SACLA での生体試料イメージング手法の開発
第 35 回日本分子生物学会年会 2012
12 11~14 福岡国際会議場

5. 上田雅美、和田千恵子、加藤貴之、宮田知子、橋本哲男、吉田秀司、左子芳彦、大福高史、別所義隆、北村彩、大庭良介、森田一也、難波啓一、和田明

バクテリアには二つのタイプの 100S リボソームが存在する
第 35 回日本分子生物学会年会 2012
12 11~14 福岡国際会議場

6. 吉田秀司、島田友裕、牧泰史、古池晶、上田雅美、和田千恵子、和田明、石浜明
100S リボソーム形成遺伝子 *rmf* の cAMP-CRP による転写調節

第 35 回日本分子生物学会年会 2012
12 11~14 福岡国際会議場

7. 加藤貴之、上田雅美、宮田知子、吉田秀司、和田千恵子、和田明、難波啓一
飢餓のストレス条件下における細菌の生存戦略

第 35 回日本分子生物学会年会 2012
12 11~14 福岡国際会議場

8. 上田雅美、和田千恵子、加藤貴之、宮田知子、橋本哲男、吉田秀司、左子芳彦、大福高文、別所義隆、北村彩、大庭良介、森川一也、難波啓一、和田明

真正細菌における二つのタイプの 100S リボソームの比較
第 84 回日本遺伝学会大会 2012 09 24-26
九州大学医学部 100 年講堂

9. 上田雅美、和田千恵子、加藤貴之、宮田知子、橋本哲男、吉田秀司、左子芳彦、大福高文、別所義隆、北村彩、大庭良介、森川一也、

難波啓一、和田明
真正細菌には二つのタイプの100Sリボソームが存在する
第14回RNA学会年会 2012 07 18-20 東北大学 100周年記念会館

10. 吉田秀司、島田友裕、牧泰史、古池晶、上田雅美、和田千恵子、和田明、和田明、石浜明
100Sリボソーム形成遺伝子 *rmf* の転写制御
第14回RNA学会年会 2012 07 18-20 東北大学 100周年記念会館

11. 和田明 特別講演
RFHR 2D PAGE によるリボソームの研究
第1回リボソームミーティング 2012 03 15-16

12. 吉田秀司、加藤貴之、宮田知子、牧泰史、古池晶、上田雅美、和田明、難波啓一
Translational hibernation stage への移行機構解明
第1回リボソームミーティング 2012 03 15-16

13. 上田雅美、和田千恵子、加藤貴之、宮田知子、難波啓一、和田明
Eubacteria における二つのタイプの100Sリボソーム形成
第1回リボソームミーティング 2012 03 15-16

14. 牧泰史、道瀬ひとみ、竹内力矢、上田雅美、和田明、古池晶、吉田秀司、中東憲治、森浩禎
遺伝子破壊株を用いた大腸菌の栄養ストレス応答の解析
第34回日本分子生物学会年会 2011 12 13-16

15. Ueta Masami, Chieko Wada, Takayuki Kato, Tomoko Miyata, Takashi Daifuku, Yoshihiko Sako, Namba Keiichi, Akira Wada
Two mechanisms for 100S ribosome formation in eubacteria
第34回日本分子生物学会年会 2011 12 13-16

16. 吉田秀司、牧泰史、古池晶、境晶子、上田雅美、和田明
内臓およびリボソームに結合する大腸菌タンパク質 YqjD の特性
第34回日本分子生物学会年会 2011 12 13-16

17. 上田雅美、和田千恵子、加藤貴之、宮田

知子、大福高史、左子芳彦、和田明
Eubacteria における二つのタイプの100Sリボソーム形成
第83回日本遺伝学会 2011 09 20-23 京都大学農学部農学研究科
〔図書〕(計 件)

18. Masami Ueta, Chieko Wada, Akira Wada
Two types of 100S ribosome formation in eubacteria
The 16th Annual Meeting of the RNA Society
2011 06 14-18 Kyoto International Conference Center

19. Hideji Yoshida, Takayuki Kato, Yasushi Maki, Shu Furuike, Masami Ueta, Akira Wada and Keiichi Namba
Structure of 100S ribosome in the hibernation
the 16th Annual Meeting of the RNA Society
2011 06 14-18 Kyoto International Conference Center

20. 吉田秀司、加藤貴之、宮田知子、牧泰史、古池晶、上田雅美、和田明、難波啓一
100Sリボソームの構造 r とその特徴
第33回日本分子生物学会年会 2010 12 07-12 神戸ポートアイランド

21. 上田雅美、和田千恵子、和田明
3種のグラム陽性細菌が100Sリボソームを形成する
第33回日本分子生物学会年会 2010 12 07-12 神戸ポートアイランド

22. 牧泰史、道瀬ひとみ、竹内力矢、上田雅美、和田明、古池晶、吉田秀司、中東憲治、森浩禎
大腸菌の栄養環境応答のトランスクリプトーム
第33回日本分子生物学会年会 2010 12 07-12 神戸ポートアイランド

23. 上田雅美、和田千恵子、和田明
グラム陽性細菌における HPF (hibernation promoting factor) ホモログによる100Sリボソーム形成
第82回日本遺伝学会大会 2010 09 20-23 北海道大学高等教育機能開発総合センター

24. 吉田秀司、加藤貴之、宮田知子、牧泰史、古池晶、上田雅美、和田明、難波啓一
Cryo-EM により明らかにされた100Sリボソームの特徴
第12回日本RNA学会年会 2010 07 27-29 一ツ橋記念講堂

25. 上田雅美、和田千恵子、吉田秀司、和田明

グラム陽性細菌における HPF(hibernation promoting factor)ホモログによる100Sリボソーム形成

第12回日本RNA学会年会 2010 07 27-29
一ツ橋記念講堂

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0 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0 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

株式会社吉田生物研究所のホームページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 明 (WADA AKIRA)

株式会社吉田生物研究所 (バイオ情報研究部門) 部門長

研究者番号：80025387

(2) 研究分担者

上田雅美 (UETA MASAMI)

株式会社吉田生物研究所 (バイオ情報研究部門) 研究員

研究者番号：30512511

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：