

## 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 24 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22570005

研究課題名（和文）枯草菌孢子形成過程における二量体リボソームの形成と分解の制御機構

研究課題名（英文）Regulation in the dimerization of ribosome during sporulation in *Bacillus subtilis*

研究代表者

河村 富士夫 (KAWAMURA FUJIO)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：10126039

研究成果の概要（和文）：孢子形成期の初期に 70S リボソームが不活性化され、次に休眠促進因子 (Hibernation promoting factor, Hpf) によりダイマーリボソームが形成される。中期には rRNA が切断・分解され始め、孢子形成過程の進行につれ後期にはダイマーリボソームが分解され消失することを見出した。孢子形成開始期には、*hpf* の  $\sigma^H$  依存のプロモーターから、強く転写が誘導されていた。

研究成果の概要（英文）：We found that more than half of the 70S ribosome were inactivated and then dimerized by the hibernation promoting factor, Hpf (YvyD) in the early stage of sporulation. The rRNA of the dimer of 70S ribosome was attacked first and finally the dimer ribosome was degraded in the late stage of sporulation. The *hpf* gene is actively transcribed from the promoter which is recognized by  $\sigma^H$  at the onset of the sporulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：分子遺伝

### 1. 研究開始当初の背景

大腸菌では 1900 年代に和田博士らのグループにより大腸菌の定常期の細胞では 70S リボソームが二つ結合したダイマーリボソームが形成されることが報告されていたが、本研究課題を申請した頃に、我々は枯草菌における緊縮応答に ppGpp を合成する 3 種の酵素 RelA, YjbM, YwaC を欠失した変異体細胞で、YwaC を強制的に発現させた時にダイマ

ーリボソームが形成されることを見出したところであった。さらに、枯草菌の定常期と孢子形成期におけるダイマーリボソーム形成の検討を開始した。

### 2. 研究の目的

孢子形成期の細胞におけるリボソームの挙動を調べ、ダイマーの形成が認められれば、孢子形成を行わない定常期の細胞における

ダイマーリボソームと比較し、その生物学的意義を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 孢子形成(2XSG)培地で培養した菌体を継時的に集め、フレンチプレスで細胞を破壊後遠心で未破壊の細胞と細胞残渣を除き粗抽出液を得た。これらの抽出液の10-40%ショ糖密度勾配超遠心を行い、リボソームのプロファイルを解析した。

(2) リボソームタンパク質の確認量はRFHR 二次元電気泳動法により行った。

(3) 孢子形成率は孢子形成液体培地にOD<sub>600</sub>の吸光度(濁度)が約0.03になるように植菌して、37°Cで24時間振盪培養後の生菌数と形成された孢子数から求めた。

### 4. 研究成果

(1) 枯草菌の3種のppGpp合成酵素, RelA, YjbM, YwaC, を欠失した変異株でYwaCを発現させると、細胞の増殖が20分で停止し、70Sリボソームが2つ結合したダイマーリボソームが形成されることを発見した(論文④)。ダイマーリボソームの形成には、かつてYvyDと呼ばれていたHpf(Hibernation promoting factor, 休眠促進因子)が必須であった。この因子は、YwaCが誘導された後、孢子形成開始期に安定・活性化されるシグマ因子H,  $\sigma^H$ , により活発に転写が開始されることを明らかにした(図1, 論文④)。

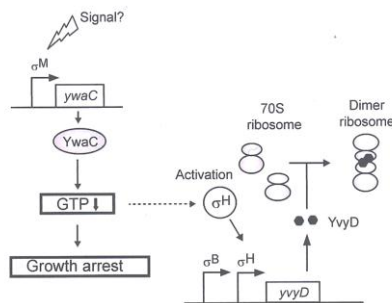


図1. ダイマーリボソーム形成のモデル

(2) 細胞の増殖及び孢子形成とリボソームの量との関係を知るために、本研究室では長年にわたり、枯草菌に存在する10コピーのrRNAオペロンのうち1コピーのみを持つ欠失変異株を構築してきた。その結果、1コピーのrRNAオペロンを持つ変異株では増殖速度が著しく遅延し、孢子形成が阻害されていた(論文⑤)。さらに、rRNAオペロンのコピー数効果を調べるために1~9コピーのrRNAオペロンを持つ変異株を構築し、それらの増殖速度と孢子形成を野生株のものと比較した(学会発表⑪, ⑳, ㉓)。図2に見られるように、rRNAオペロンが3コピー以上になれば細胞増殖のみならず孢子形成率も野生

株に匹敵するほど回復していた。しかしながら、3-7コピーのrRNAオペロンを持つ細胞から形成された孢子の発芽後成長は、10コピーのrRNAオペロンを持つ野生株と比べて遅延が認められた。このことは、枯草菌の生活環を考えた時に、野生株が10コピーのrRNAオペロンを持つように進化上なつた一因と考えられる。

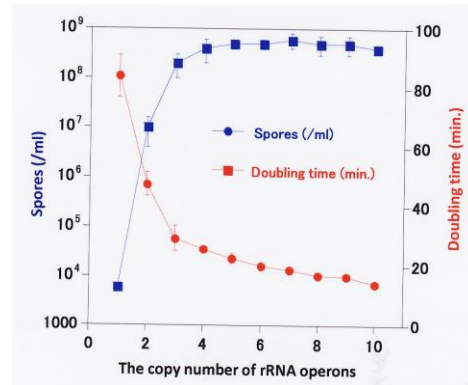


図2. 細胞の増殖速度と孢子形成率へのrRNAオペロンのコピー数効果

(3) 孢子形成過程の細胞から粗抽出液を調製し、10-40%ショ糖密度勾配超遠心によるリボソームのプロファイルより、孢子形成期の初期にダイマーリボソームが形成され、その後孢子形成の進行とともに分解され、後期には消滅することが判明した(図3, 学会発表⑱, ㉔, ㉓)。孢子形成期のダイマーリボソーム

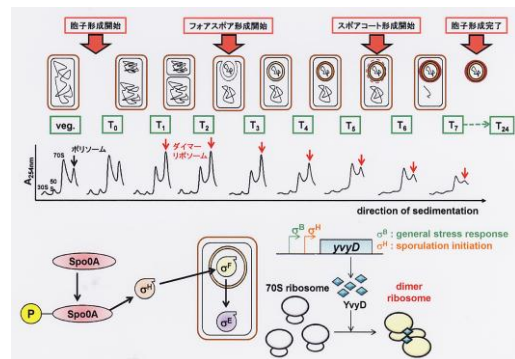


図3. 孢子形成期におけるリボソームのプロファイル

の分解は、孢子形成初期にrRNAが切断されることが引き金となっていることが示唆された(学会発表③, ⑨, ⑬, ㉔, ㉓)。

(4) 孢子形成を行わない培地でのダイマーリボソーム形成は、孢子形成期の細胞とは異なり、hpf(yvyD)遺伝子は $\sigma^H$ よりむしろ $\sigma^B$ の認識プロモーターからの活発な転写が起きていた(学会発表②, ⑱, ㉔, ㉔, ㉓)。

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 6 件)

- ① Genki Akanuma, Shota Suzuki, Koichi Yano, Hideaki Nanamiya, Yousuke Natori, Namba Eri, Kazuya Watanabe, Kazumi Tagami, Takuya Takeda, Yuka Izuka, Ako Kobayashi, Morio Ishizuka, Hirofumi Yoshikawa, and Fujio Kawamura. Single mutations introduced in the essential ribosomal protein L3 and S10 cause a sporulation defect in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 査読有, **59**, 2013, 106-117. <http://www.ammcb.info/JGAM/general.html>
- ② Yukinori Tanaka, Hideaki Nanamiya, Koichi Yano, Koji Kakugawa, Fujio Kawamura, and Kozo Ochi. rRNA (*rrn*) operon-engineered *Bacillus subtilis* as a feasible test organism for antibiotic discovery. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 査読有, **57**, 2013, 1948-1951. doi:10.1128/AAC.02604-12
- ③ Genki Akanuma, Hideaki Nanamiya, Yousuke Natori, Koichi Yano, Shota Suzuki, Shuya Omata, Morio Ishizuka, Yasuhiko Sekine, and Fujio Kawamura. Inactivation of ribosomal protein genes in *Bacillus subtilis* reveals importance of each ribosomal protein for cell proliferation and cell differentiation. *J. Bacteriol.*, 査読有, **194**, 2012, 6282-6291. doi:10.1128/JB.01544-12
- ④ Kazumi Tagami, Hideaki Nanamiya, Yuka Kazo, Marie Maehashi, Shota Suzuki, Eri Namba, Masahiro Hoshiya, Ryo Hanai, Yuzuru Tozawa, takuya Morimoto, Naotake Ogasawara, Yasushi Kageyama, Katsutoshi Ara, Katsuya Ozaki, Masaki Yoshida, Haruko Kuroiwa, Tsuneyoshi Kuroiwa, Yoshiaki Ohashi, and Fujio Kawamura. Expression of a small (p)ppGpp synthetase, YwaC, in the (p)ppGpp<sup>0</sup> mutant of *Bacillus subtilis* triggers YvyD-dependent dimerization of ribosome. *MicrobiologyOpen*, 査読済, **1**, 2012, 115-134. doi:10.1002/mbo3.16
- ⑤ Hideaki Nanamiya, Makiko Sato, Kenta Masuda, Mikiko Sato, Tetsuya Wada, Shota Suzuki, Yousuke Natori,

Masato Katano, Genki Akanuma, and Fujio Kawamura. *Bacillus subtilis* mutants harbouring a single copy of the rRNA operon exhibit severe defects in growth and sporulation.

*Microbiology*, 査読有, **156**, 2010, 2944-2952.

doi:10.1099/mic.0.035295-0

- ⑥ Hideaki Nanamiya, and Fujio Kawamura. Towards an elucidation of the roles of the ribosome during different growth phases in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, **74**, 2010, 451-461. doi:10.1271/bbb.90859

[学会発表] (計 35 件)

- ① 鈴木祥太, 孢子形成欠損を示す枯草菌 S10リボソームタンパク質遺伝子, *rpsJ*, 変異体の単離と解析, 日本農芸化学会, 2013年度大会, 2013年3月26日, 東北大学.
- ② 田上和美, 枯草菌の緊縮応答時, 定常期, 孢子形成期の三期におけるダイマーリボソーム, 日本農芸化学会, 2013年度大会, 2013年3月26日, 東北大学.
- ③ 渡辺和哉, 枯草菌の孢子形成期において EndoAがrRNAの分解に関与する, 日本農芸化学会, 2013年度大会, 2013年3月26日, 東北大学.
- ④ 矢野晃一, 枯草菌において *rrn* オペロンのコピー数が prophage2 に与える影響の解析, 第7回日本ゲノム微生物学会年, 2013年3月9日, 長浜バイオ大学.
- ⑤ 田上和美, 枯草菌のダイマーリボソームにおける YvyD の活性部位解析, 第7回日本ゲノム微生物学会年, 2013年3月9日, 長浜バイオ大学.
- ⑥ 難波恵理, 枯草菌における異種微生物 16S rRNA 遺伝子導入株の作製と解析, 第7回日本ゲノム微生物学会年, 2013年3月9日, 長浜バイオ大学.
- ⑦ 鈴木祥太, 孢子形成部分欠損を示す枯草菌 S10リボソームタンパク質遺伝子変異体およびそのサプレッサーの単離と解析, 日本遺伝学会第84回大会, 2012年9月24日, 九州大学.
- ⑧ 矢野晃一, 枯草菌 rRNA 機能の分子遺伝学的解析, 日本遺伝学会第84回大会, 2012年9月24日, 九州大学.
- ⑨ 渡辺和哉, 枯草菌の孢子形成初期における rRNA の分解に関する解析, 日本遺伝学会第84回大会, 2012年9月24日, 九州大学.
- ⑩ 鈴木祥太, リボソームタンパク質変異による孢子形成欠損株の解析, 日本遺伝学会第84回大会, 2012年9月24日, 九州大

- 学.
- ⑪ Yano kouichi, Analysis of copy number effect of the *rrn* operon in *Bacillus subtilis*. The 12th Asian Conference on Transcription. 2012年7月7日, Seogwipo KAL Hotel, Korea
  - ⑫ Namba Eri, Construction of 16S rRNA mutants carrying altered RNase sites that are active during spore development. The 12th Asian Conference on Transcription. 2012年7月7日 Seogwipo KAL Hotel, Korea
  - ⑬ Watanabe Kazuya, Analysis of rRNA degradation during spore development in *Bacillus subtilis*. The 12th Asian Conference on Transcription, 2012年7月7日, Seogwipo KAL Hotel, Korea
  - ⑭ Suzuki Shota, Expression of the *Bacillus subtilis* YaaA protein suppresses a mutation of the *rplB* gene, encoding the L2 ribosomal protein. The 12th Asian Conference on Transcription, 2012年7月7日, Seogwipo KAL Hotel, Korea
  - ⑮ 矢野晃一, 枯草菌の孢子形成過程に与える *rrn* オペロンコピー数の影響の解析, 日本農芸化学会2012年度大会, 2012年3月25日, 京都女子大学.
  - ⑯ 難波恵理, 枯草菌の孢子形成期に特異的な翻訳機能を変化させる16SrRNA変異株の探索, 第6回日本ゲノム微生物学会年会, 2012年3月11日, 立教大学.
  - ⑰ 鈴木将太, 枯草菌ppGpp合成酵素YjbMの機能解析, 第6回日本ゲノム微生物学会年会, 2012年3月11日, 立教大学.
  - ⑱ 加増祐佳, 枯草菌定常期におけるダイマーリボソーム形成機構及び *yvyD* 遺伝子の機能解析, 第6回日本ゲノム微生物学会年会, 2012年3月11日, 立教大学.
  - ⑲ 前橋真利江, 枯草菌rRNAの分解制御に関する研究, 第6回日本ゲノム微生物学会年会, 2012年3月11日, 立教大学.
  - ⑳ 矢野晃一, 枯草菌の孢子形成過程に与える *rrn* オペロンコピー数の影響の解析, 第6回日本ゲノム微生物学会年会, 2012年3月11日, 立教大学.
  - ㉑ 渡辺和哉, 枯草菌の孢子形成期におけるrRNAの分解に関する研究, 日本遺伝学会第83回大会, 2011年9月20日, 京都大学.
  - ㉒ 田上和美, 枯草菌(p)ppGpp合成酵素YwaC誘導時におけるリボソーム二量体化機構の解析, 日本遺伝学会第83回大会, 2011年9月20日, 京都大学.
  - ㉓ 鈴木祥太, 枯草菌の孢子形成期に特異的な翻訳機能を変化させる16SrRNA変異株の探索, 日本遺伝学会第83回大会, 2011年9月20日, 京都大学.
  - ㉔ 星屋将太, 枯草菌ppGpp合成酵素YjbMの機能解析, 日本遺伝学会第83回大会, 2011年9月20日, 京都大学.
  - ㉕ 加増祐佳, 枯草菌定常期におけるダイマーリボソーム形成機構及び *yvyD* 遺伝子の機能解析, 日本遺伝学会第83回大会, 2011年9月20日, 京都大学.
  - ㉖ 前橋真利江, 枯草菌rRNAの分解制御に関する研究, 日本遺伝学会第83回大会, 2011年9月20日, 京都大学.
  - ㉗ 矢野晃一, 枯草菌の孢子形成過程に与える *rrn* オペロンコピー数の影響の解析, 日本遺伝学会第83回大会, 2011年9月20日, 京都大学.
  - ㉘ Yuka Kazo, Analysis of dimerization of 70S ribosome, and *yvyD* gene during stationary phase in *Bacillus subtilis*. 6<sup>th</sup> International Conference on Gram-Positive Microorganisms, 2011年6月19日, Montecatini Terme, Tuscany, Italy.
  - ㉙ Eri Namba, Isolation and characterization of the rRNA mutants in *Bacillus subtilis*. 6<sup>th</sup> International Conference on Gram-Positive Microorganisms, 2011年6月19日, Montecatini Terme, Tuscany, Italy.
  - ㉚ Kazumi Tagami, Functional analysis of a novel ppGpp synthetase, YwaC, and regulatory mechanism for the dimerization of ribosome, in *Bacillus subtilis*. 6<sup>th</sup> International Conference on Gram-Positive Microorganisms, 2011年6月19日, Montecatini Terme, Tuscany, Italy.
  - ㉛ Shota Suzuki, Isolation and characterization of mutants deleting the 16S rRNA helix 9 in *Bacillus subtilis*. 6<sup>th</sup> International Conference on Gram-Positive Microorganisms, 2011年6月19日, Montecatini Terme, Tuscany, Italy.
  - ㉜ Kazuya Watanabe, Analysis of the degradation of ribosome during spore development in *Bacillus subtilis*. 6<sup>th</sup> International Conference on Gram-Positive Microorganisms, 2011年6月19日, Montecatini Terme, Tuscany, Italy.
  - ㉝ Marie Maehashi, Dimerization of ribosomes during sporulation in *Bacillus subtilis*, The 11<sup>th</sup> Asian and Oceanian on Transcription, 2010年7月2日, 今帰仁コミュニティセンター (Nakajin Community Center).

- ③④ Yuka Kazo, Function of *yvyD* gene during stationary phase in *Bacillus subtilis*, The 11<sup>th</sup> Asian and Oceanian on Transcription, 2010年7月2日, 今帰仁コミュニティセンター(Nakajin Community Center).
- ③⑤ Tetsuya Wada, Assessment of the copy number of rRNA operons required for normal growth and sporulation in *Bacillus subtilis*. The 11<sup>th</sup> Asian and Oceanian on Transcription, 2010年7月2日, 今帰仁コミュニティセンター (Nakajin Community Center).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 富士夫 (KAWAMURA FUJIO)  
立教大学・理学部・教授  
研究者番号：10126039