

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770206

研究課題名（和文） 休眠段階におけるリボソームのタンパク質合成抑制機構の解明

研究課題名（英文） The regulation mechanism of protein biosynthesis on ribosome in the hibernation stage

研究代表者

加藤 貴之（KATO TAKAYUKI）

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：20423155

研究成果の概要（和文）：細菌の飢餓的ストレス下におけるリボソーム合成抑制のメカニズムを明らかにするために、低温電子顕微鏡により 100S リボソームの構造解析を行った。大腸菌では 30S が互いの mRNA の入り口を塞ぐように結合し、黄色ブドウ球菌では、出口を塞ぐような位置で結合していることが明らかとなった。また、大腸菌と類似の HPF を持つ *Ervinia* では大腸菌の、黄色ブドウ球菌と類似の HPF を持つ乳酸菌では黄色ブドウ球菌の 100S と同様の構造をしており、その結合様式は HPF に依存することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To understand the regulation mechanism of protein biosynthesis under the starvation stress, structural analysis of 100S ribosomes was carried out by cryo-EM. In the case of *E. coli*, 30S subunit inserted to the entrance for mRNA. On the other hand, in the case of *Staphylococcus Aureus*, the exit site for mRNA was covered each 30S. And we confirmed the binding mode of *Ervinia* which has *E. coli* type HPF and *Lactobacillus* which has *Staphylococcus* type HPF by cryoEM. So we demonstrated that two types of HPF produces two different types of binding mode of 100S ribosome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：100S リボソーム、飢餓的ストレス、低温電子顕微鏡、単粒子解析

1. 研究開始当初の背景

生物は様々な環境変化に対するストレス応答機構を備えているが、最も身近なストレスである飢餓状態ですら、その応答のメカニズムは解明されていない。この飢餓的ストレスは細菌であっても例外ではなく、実験室で培養しているような栄養過剰な状態は自然界ではほとんど存在せず、飢餓的ストレスを受けている状態こそが自然な状態を反映しているといえる。

大腸菌などの細菌は、飢餓的ストレス下に置かれると、70S リボソームの 2 量体である 100S リボソームを形成し、タンパク質の合

成を抑制することが知られている。しかし、その結合様式やタンパク質合成抑制のメカニズムはこれまで明らかにされていなかったが、2010 年に我々が低温電子顕微鏡による構造解析によって初めて明らかにした。その後、予備実験として行った黄色ブドウ球菌由来 100S リボソームの観察により、2 量体の結合様式が大腸菌の時と全く異なっていることが示唆された。これは、大腸菌、黄色ブドウ球菌の 100S リボソームが、どちらも 70S リボソームの 2 量体で形成され、タンパク質の合成を抑制しているという点で同じであるにも関わらず、70S リボソーム同士

結合に関与するタンパク質が異なっていることや、タンパク質合成抑制のメカニズムが両者で全く異なっている可能性を示唆している。

2. 研究の目的

グラム陰性菌、陽性菌共に、飢餓的ストレスに曝されると、70S リボソームが2量体化した100S リボソームを形成し、タンパク質の合成を抑制するが、その構造は大きく異なっている。本研究は双方の100S リボソームの構造解析を行い、100S リボソーム形成によるタンパク質合成抑制機構を解明し、両者の構造の違いを利用した新規抗生物質開発の為の基礎情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 黄色ブドウ球菌 100S リボソームの構造解析

黄色ブドウ球菌の100S リボソームを単離、精製し、構造解析に必要な多くの画像を撮影した。その画像データを用いて分子量約22 kDaの100S リボソーム誘導因子であるHPFが可視化できる15Å分解能での構造解析を行い、HPFの結合位置の同定と、黄色ブドウ球菌70S リボソームの二量体化によるタンパク質合成抑制メカニズムを明らかにした。また、我々が最近明らかにした大腸菌100S リボソームの構造との比較によって、そのメカニズムの違いを検討した。

(2) 100S リボソーム誘導タンパク質によるリボソームの構造変化の解析

大腸菌（グラム陰性）および、黄色ブドウ球菌（グラム陽性）それぞれの100S リボソームにおける2つの70S リボソームの結合様式は大きく異なっており、その違いは100S リボソーム誘導タンパク質RMA (Ribosome modulation factor) および、HPF (Hibernation promoting factor) の違いによるものと想定された。そこで、大腸菌と同じタイプのRMA/HPFを持つ細菌としてErviniaを、黄色ブドウ球菌と同じタイプのRMA/HPFをもつ細菌として乳酸菌を用いて、その結合様式を低温電子顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 100S リボソーム形成におけるタンパク質合成抑制メカニズム

ストレス応答時の100S リボソーム形成とタンパク質合成抑制のメカニズムを明らかにするために、それぞれのリボソームを単離精製し、低温電子顕微鏡を用いた構造解析を行った。大腸菌（グラム陰性）の100S リボソームはお互いの30S のもっとも突き出たS2タンパク質が、相手側のS3、S4、S5

が形成するポケットにはまり込むようにして結合していた。S3、S4、S5によって形成されるポケットはmRNAの入り口であり、これは100S リボソーム形成によってmRNAがリボソームに入っていくのを抑制することでタンパク質合成を抑制していることが明らかとなった。一方、黄色ブドウ球菌（グラム陽性）の場合、お互いの30Sを介して結合している点では大腸菌と同じだが、S2は結合に関与しておらず、互いのmRNAの出口を塞ぐような位置で結合していることが明らかとなった(図1)。この結果は、大腸菌の場合、mRNAがリボソーム中に入るのを抑制することで、黄色ブドウ球菌の場合、mRNAがリボソームから出るのを抑制することで、タンパク質合成を制御していると考えられる。

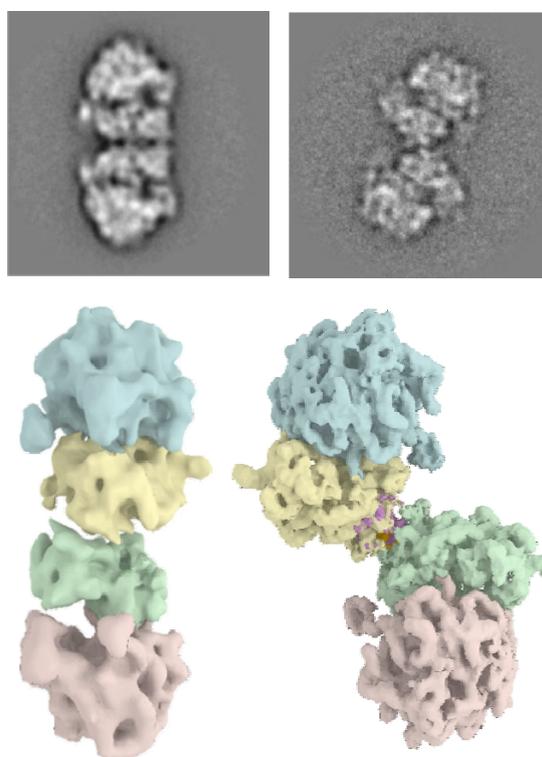


図1. 大腸菌（左）および黄色ブドウ球菌（右）由来100S リボソームの電子顕微鏡写真（上）と立体構造（下）

また、分解能の高い黄色ブドウ球菌の100S リボソームの構造解析では、100S リボソーム誘導因子のHPFの可視化に成功した(図2)。その結合位置は、100S リボソームを70S リボソームに乖離させるタンパク質であり、HPFのパラログでもあるYfiAの結合位置とよく一致していた。また近年、大腸菌のRMAとHPFの70S リボソーム中での結合位置結の解析が、X線結晶構造解析でなされており、そのHPFの結合位置も、今回明らかになったHPFの結合位置と非常によ

く一致し、また、RMFの結合位置にも別の密度を確認することができた。

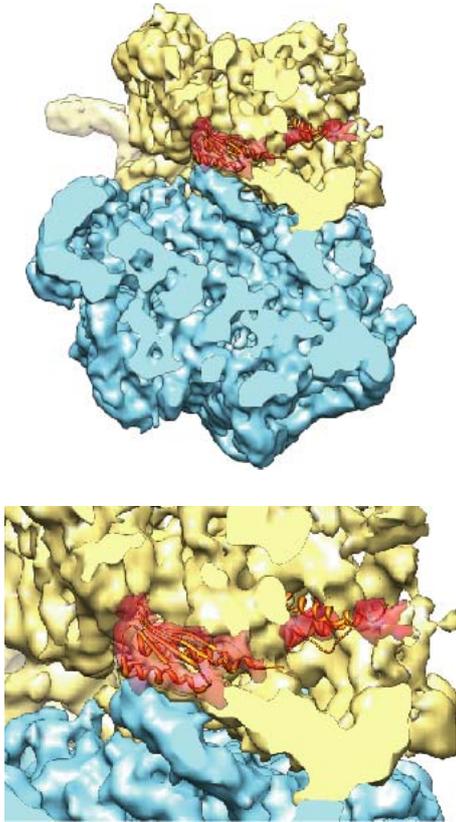


図 2. リボソーム中における HPF の結合位置 (上) と、その拡大 (下)
HPF:赤色、30S:黄色、50S:水色

(2) 100S リボソーム誘導因子の違いによる 100S リボソームの構造の違い

大腸菌および黄色ブドウ球菌由来 100S リボソームは、どちらも 70S リボソームの 2 量体でできているにもかかわらず、その結合様式は著しく異なっていた。100S リボソームの形成には RMF、HPF という 2 つの因子が関わっていることが知られているが、黄色ブドウ球菌には RMF が存在せず、その代わり HPF の大きさが大腸菌の HPF の約 2 倍の分子量 (それぞれ 22 kDa と 11 kDa) を持ち、その C 末側に大腸菌の HPF と相同配列を持っている。この両者の違いを他の細菌で調べてみると、大腸菌が属する proteobacteria の γ グループのみが大腸菌と同じ RMF と小さい HPF の組み合わせを持っており、それ以外のほぼすべての細菌が黄色ブドウ球菌と同じ大きな HPF を持つことが分かった。そのため、2 種類の菌体の 100S リボソームの結合様式の違いは、100S リボソーム形成因子である RMF と HPF の組み合わせの違いによるものと仮説を立てた。そこで大腸菌と同じ RMF/HPF の組み合わせである *Ervinia*、黄色ブドウ球菌と類似の HPF を持つ乳酸菌を用いて同様の実験を行

ったところ、予想通り *Ervinia* では大腸菌と、乳酸菌では黄色ブドウ球菌と同様の結合をしていることが明らかとなり、この仮説が正しいことが証明された (図 3)。

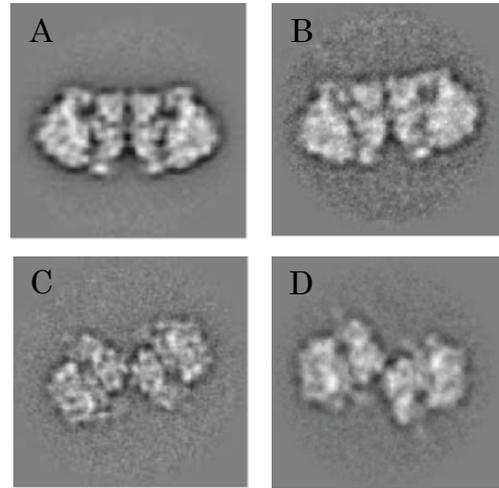


図 3. 異なる HPF によって形成される 100S リボソームの結合様式の違い
(A)大腸菌、(B)大腸菌型 HPF を持つ *Ervinia*、(C)黄色ブドウ球菌、(D)黄色ブドウ球菌型 HPF を持つ乳酸菌

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]

- ①Ruan, J., Kato, T., Santini, C.-L., Miyata, T., Kawamoto, A., Zhang, W.-J., Bernadac, A., Wu, L.-F. & Namba, K. Architecture of a flagellar apparatus in the fast-swimming magnetotactic bacterium MO-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 109, 20643-20648, 2012. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1215274109.

[学会発表] (計 31 件)

- ①Kato, T., Ueta, M., Miyata, T., Wada, C., Yoshida, H., Wada, A. & Namba, K. Structural analysis of 100S ribosomes in two different types of bacteria. Nagoya Symposium -Frontiers in Structural Physiology-. 2013.1.22-24. Nagoya University (愛知県・名古屋市)
- ②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. 飢餓的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. 2012.12.13. 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県・福岡市)
- ③Kato, T., Ueta, M., Miyata, T., Yoshida, H.,

Wada, A., Namba, K. 飢餓的ストレス下での 100S リボソーム形成による細菌の生存戦略. Survival strategy of bacteria under the starvation stress by 100S ribosome formation. 第 50 回日本生物物理学会年会. 2012.9.24. 名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

④ Kato, T. Structural analysis of flagella motor by cryoEM. Joint Seminar Centre for BioImaging Sciences – Structural biology division of Japan EM. 2012.1.12. National University of Singapore (Singapore)

⑤ 加藤貴之. 飢餓的ストレス下における細胞の生存戦略. 平成 23 年度生理学研究所研究会「電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用」, 2011.11.30-12.1. 岡崎統合バイオサイエンスセンター (愛知県・岡崎市)

⑥ Kato, T., Ueta, M., Miyata, T., Yoshida, H., Maki, Y., Furuike, S., Sakai, A., Wada, A., Namba, K. 飢餓的ストレス下における細菌の生存戦略 (The survival strategy in bacteria under the starvation stress). 日本生物物理学会第 49 回年会. 2011.9.18. 兵庫県立大学・姫路書写キャンパス (兵庫県・姫路市)

⑦ 加藤貴之, Ruan Juanfang, 川本晃大, 松尾里紗, 宮田真人, 難波啓一. 低温電子顕微鏡を用いた電子線トモグラフィーによる生体超分子の立体構造解析. The structural analysis of macromolecule by electron cryotomography. 日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会. 2011.5.16. 福岡国際会議場他 (福岡県・福岡市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/02>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 貴之 (KATO TAKAYUKI)
大阪大学・生命機能研究科・助教
研究者番号：20423155

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

宮田 知子 (MIYATA TOMOKO)
大阪大学・生命機能研究科・特任助教
研究者番号：30423156

吉田 秀司 (YOSHIDA HIDEJI)
大阪医科大学・基礎医学・准教授
研究者番号：60288735

上田 雅美 (UETA MASAMI)
吉田生物研究所・研究員
研究者番号：30512511

和田 明 (WADA AKIRA)
吉田生物研究所・室長
研究者番号：80025387