

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658066

研究課題名(和文) 翻訳阻害剤による浸透圧耐性獲得機構の研究

研究課題名(英文) Mechanism of resistance to osmotic stress by translation inhibitors

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) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌細胞の塩耐性に対する様々な薬剤の効果を調べたところ、翻訳阻害剤であるクロラムフェニコール、カスガマイシン、テトラサイクリンの添加は細胞の塩耐性を上昇させることを明らかにした。qRT-PCRを用いて、膜関連のシグマ因子であるシグマEの一過的発現が早まることを明らかにした。

さらに、細胞の塩耐性は細胞内セカンドメッセジャーであるppGppを産生させるセリンヒドロキサメートによっても引き起こされることを明らかにした。最終的に、細胞の浸透圧(塩)耐性に至る経路には、ppGpp依存経路とppGpp非依存経路の2つの異なった経路があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Effects of various kinds of drugs on Escherichia coli cell were examined and we found inhibitors of protein synthesis such as chloramphenicol, kasgamycin or tetracycline increase resistance to osmotic (salt) stress. By using qRT-PCR, we also found that these protein synthesis inhibitors prematurely and transiently activate these membrane-related sigma factor, sigma E.

Resistance to osmotic (salt) stress is also provided by serine hydroxamate, which produces ppGpp. We finally found that there are two pathways for salt resistance, ppGpp-dependent and ppGpp-independent pathways.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：翻訳阻害剤 塩ストレス 浸透圧ストレス リボソーム 翻訳 シグマE ppGpp

1. 研究開始当初の背景

本研究は、以下に記す「ある種の翻訳阻害剤が細胞の塩耐性をもたらす」という予備的な研究結果を基礎とするものである。培地に高濃度の塩 (1.0 M NaCl) を加えると大腸菌の生育は停止するが、あらかじめ特定の翻訳阻害剤を加えて培養した大腸菌は高濃度の塩を加えても生育を続けた。

これまで、浸透圧 (塩濃度) の上昇に対する細胞応答は、EnvZ-OmpR の二成分系によるシグナル伝達、細胞内膜に結合している転写開始因子 (シグマ E) の細胞質への放出による活性化、カリウムイオンの急激な取り込みが続く細胞内オスモライト濃度の上昇などの経路により説明されてきた (次ページ図)。このような既知の浸透圧耐性システムの中で、転写制御や non-coding RNA による特定の mRNA の翻訳制御が関与することは知られていたが、一般的な翻訳における制御が関わるという報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究は、予備的な研究結果をもとにして「翻訳阻害剤による浸透圧抵抗性獲得」という概念を確立し、遺伝学的手法、生理学的手法ならびに生化学的手法を駆使してそのメカニズムを解明する。さらに、既知の浸透圧ストレス応答メカニズムとの関連性を明らかにすることを通して、新しい浸透圧耐性遺伝子発現のネットワークの全体像を明らかにする。また、翻訳阻害剤のターゲットとなっている翻訳装置 (リボソーム) に注目し、高浸透圧ストレス下におけるサブユニットの解離会合、翻訳能、翻訳阻害剤による阻害効果、リボソームタンパク質の組成を解析することを通して、この現象の原因を追究する。

3. 研究の方法

まず、浸透圧ショックに対する各種翻訳阻害剤の効果を調べる。浸透圧ショックの前後の遺伝子発現に顕著な差が出る遺伝子を探索し、その遺伝子発現の浸透圧ショック前後の時間的経過を解析する。特に、セカンドメッセンジャーやシグマ因子に着目する。次に、そこで明らかにされた遺伝子について、「翻訳阻害剤による細胞の浸透圧耐性獲得」に対する遺伝子破壊の影響を解析する。これにより、「翻訳阻害剤による細胞の浸透圧ストレス応答」のネットワークを明らかにし、「翻訳阻害剤による細胞の浸透圧耐性獲得」の原因を探る。

4. 研究成果

まず、細胞の塩耐性に対する様々な薬剤の効果調べた。翻訳阻害剤であるクロラムフェニコール、カスガマイシン、テトラサイクリンの添加は細胞の塩耐性を上昇させた。翻訳阻害剤でも、ストレプトマイシン、ネオマイシン、フシジン酸は効果がなかった。また、転写阻害剤や DNA 合成阻害剤も効果がなかつ

た。

次に、各種翻訳阻害剤存在下におけるシグマ E (膜結合型シグマ因子) の遺伝子発現について qRT-PCR を用いて調べた。まず、通常の状態 (翻訳阻害剤非存在下) においては、浸透圧ショック後数時間経過した後、シグマ E の一過的発現が見られた。シグマ E の一過的発現は塩濃度が高いほど、その開始が遅くなっていた。おもしろいことに、翻訳阻害剤存在下においては、シグマ E の一過的発現が早く始まるようになっていた。

細胞の浸透圧 (塩) 耐性がセリル tRNA 合成酵素の阻害剤であるセリンヒドロキサメートによっても引き起こされることを明らかにした。セリンヒドロキサメートは、細胞内のセカンドメッセンジャーである ppGpp を生産させることが知られており、本研究では、翻訳阻害剤による浸透圧 (塩) 耐性に対する ppGpp の効果を解析した。まず、ppGpp 合成酵素である RelA と SpoT を欠損した細胞を作製した。この ppGpp 非生産細胞では、セリンヒドロキサメートの効果はなくなったが、カスガマイシン等の翻訳阻害剤の効果は依然として見られた。これらの薬剤と ppGpp 欠損との相乗効果なども考慮し、最終的に細胞の浸透圧 (塩) 耐性に至る経路には、ppGpp 依存経路と ppGpp 非依存経路の 2 つの異なった経路があることを結論づけた。

なお、シグマ E (膜結合型シグマ因子) の一過的活性化が通常より早期におこるとい現象は、ppGpp 依存経路と ppGpp 非依存経路のどちらで同じように起こることを明らかにした。

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 8 件)

Kurita, D., Muto, A., Himeno, H., *In vitro trans-translation assay.*, *Methods in Molecular Biology*, 査読有、Vol. 905, 2012, 311-325

DOI:10.1007/978-1-61779-949-5_20

Guo, Q., Goto, S., Chen, Y., Feng, B., Xu, Y., Muto, A., Himeno, H., Deng, H., Lei, J., Gao, N., Dissecting the in vivo assembly of the 30S ribosomal subunit reveals the role of RimM and general features of the assembly process. *Nucleic Acids Res.*, 査読有、Vol. 41, 2013, 2609-2620

DOI:10.1093/nar/gks1256

Goto, S., Muto, A., Himeno, H., GTPases involved in bacterial ribosome maturation., *J. Biochem.*, 査読有、Vol. 153, 2013, 403-414

DOI:10.1093/jb/mvt022

姫野依太、栗田大輔、武藤昱、2 つの機能を有する tmRNA による細菌の翻訳解消

システム、実験医学、査読無、Vol. 31, No. 7、2013、54-60

Hase, Y., Tarusawa, T., Muto, A., Himeno, H., Impairment of ribosome maturation or function confers salt resistance on *Escherichia coli* cells., *PLoS ONE*, 査読有、Vol. 8, 2013, e65747
DOI: 10.1371/journal.pone.0065747

Himeno, H., Kurita, D., Muto, A., Mechanism of *trans-translation* revealed by *in vitro* studies., 査読有、*Frontiers in Microbiology*, Vol. 5, 2014, 65
DOI: 10.3389/fmicb.2014.00065

Yang, Z., Guo, Q., Goto, S., Chen, Y., Li, N., Yan, K., Zhang, Y., Muto, A., Deng, H., Himeno, H., Lei, J., Gao, N., Structural insights into the assembly of the 30S ribosomal subunit *in vivo*: functional role of S5 and location of the 17S rRNA precursor sequence., *Protein & Cell*, Vol. 5, 2014, 394-407
DOI: 10.3389/fmicb.2014.00065

Himeno, H., Kurita, D., Muto, A., tmRNA-mediated *trans-translation* as the major ribosome rescue system in a bacterial cell., 査読有、*Frontiers in Genetics*, Vol. 5, 2014, 66
DOI: 10.3389/fgene.2014.00066

〔学会発表〕(計9件)

Goto, S., Muto, A., Himeno, H., Interplay of a GTPase and a ribosome-binding factor on the 30S subunit during a late stage of the bacterial ribosome biosynthesis., The 9th International Conference on Ribosome Synthesis, 2012年8月22-26, Banff

Takada, K., Kurita, D., Naoe, C., Yokogawa, T., Himeno, H., Takemoto, C., The first translocation in *trans-translation*., 第14回日本RNA学会年会, 2012年7月18-20, 仙台

加藤新、佐藤洋旭、高橋大輝、姫野依太、武藤あきら、牛田千里、線虫 SL1 トランススプライシングは生殖細胞でより活発?、第14回日本RNA学会年会, 2012年7月18-20, 仙台

樽澤武房、長谷要一、後藤史門、武藤あきら、姫野依太、リボソームを介した浸透圧耐性機構、第2回リボソームミーティング、2013年3月28-29、東京

栗田大輔、Mickey Miller、武藤あきら、Allen Buskirk、姫野依太、tmRNA/SmpB による停滞したリボソームの認識機構、第2回リボソームミーティング、2013年3月28-29、東京

後藤史門、武藤あきら、姫野依太、GTPase RsgA の機能と大腸菌リボソーム生合成の過程、第10回21世紀大腸菌研究会、2013年6月20-21、修善寺

後藤史門、長谷要一、菊地岳志、栗田大輔、武藤あきら、竹本千重、横山茂之、Sean R. Connell、Paola Fucini、姫野依太、RsgA(リボソーム小サブユニット依存GTP加水分解酵素)の機能およびリボソームとの相互作用、第15回日本RNA学会年会、2013年7月24-26、松山

Kurita, D., Miller, M.R., Muto, A., Buskirk, A.R., Himeno, H., Recognition of mRNA length on the ribosome by tmRNA and SmpB., Ribosomes Conference 2013, 2013年7月9-12, Napa Valley, California

姫野依太、栗田大輔、武藤あきら、tmRNA: non-coding RNA と coding RNA のハイブリッド、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6、神戸

〔図書〕(計2件)

姫野依太、弘前大学知の散歩道、弘前大学出版会、2013、9

姫野依太、栗田大輔、武藤あきら、生命分子を統合するRNA—その秘められた役割と制御機構、羊土社、2013、7

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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
<http://hirosaki-rna.org/himeno/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姫野依太 (Hyouta Himeno)
弘前大学・農学生命科学部・教授
研究者番号: 80208785

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

武藤あきら (Akira Muto)

弘前大学・農学生命科学部・研究員

研究者番号：80034635