立教大学学術推進特別重点資金（立教ＳＦＲ）
大学院生研究
２０１１年度研究成果報告書

研究科名	立教大学大学院　理学研究科　生命理学専攻		
研究代表者	在籍研究科・専攻・学年 理学研究科生命理学専攻 博士課程後期課程１年	氏　名 鈴木　祥太　印	
指導教員	所属･職名 理学部生命理学科・教授	氏　名 関根　靖彦　印	
自然・人文・社会の別	(自然)・人文・社会	**個人・共同の別**	(個人)・共同　名
研究課題名	枯草菌の胞子形成能を向上させる変異リボソームの機能解析		
研究組織	在籍研究科・専攻・学年	氏　名	
研究期間	2011　年度		
研究経費	500　千円		

研究の概要（200～300字で記入、図･グラフ等は使用しないこと。）

細胞内のおよそ80%を占めるリボソームは、タンパク質合成装置として知られているが、それ以外の機能を備えていても不思議ではないと考える。そこで、rRNAに着目し、当研究室で構築したrRNAオペロン多重欠失変異株を用いてrRNAの新規機能解析を試みることとした。大腸菌16S rRNAと枯草菌の16S rRNAの二次構造を比較すると、枯草菌のhelix9が15 nt長い。そこで、枯草菌の長いH9が翻訳活性および胞子形成期のリボソームの翻訳活性制御等の代謝に関与しているのではないかと考え、枯草菌helix9の機能解析を行った。

キーワード（研究内容をよく表しているものを３項目以内で記入。）

〔　枯草菌　〕〔　リボソーム　〕〔　16S rRNA　〕

研究成果の概要（図･グラフ等は使用しないこと。）

大腸菌 16S rRNA と枯草菌 16S rRNA の二次構造を比較すると両者は類似した構造を取るが、枯草菌 16S rRNA の 5’ 末端より 200 nt 下流にある helix9 が、大腸菌 heilx9 より 15 nt 長く、顕著に異なる。これまでの先行研究から、種により rRNA が大型化するにつれて対応するリボソームタンパク質も増えているという報告がされている（Kitahara K., *et al*., 2007）。そこで、枯草菌の長い helix9 が、枯草菌特有の胞子形成能や翻訳活性の制御などに関わる機能を有しているのではないかと考え、枯草菌 helix9（h9-B）へ大腸菌 helix9 と同じ配列に改変した h9-E（-15 nt）と、その配列を除去した h9-Δ（-28 nt）の 2 種の 16S rRNA 変異株を構築し、それらの生育速度や胞子形成などの性質を野生株と比較した。

リボソームの翻訳活性は h9-E 変異により上昇し、h9-Δ 変異により低下した。

h9-E および h9-Δ 変異を導入したリボソームの翻訳活性を明らかにするため、当研究室で構築した SD10 assay を用いて行うことにした。SD10 assay は、枯草菌の SD（Shine-Dargarno）配列認識の高さを利用し、rRNA オペロン(*rrn*)*O* 16S rRNA の 3’末端付近にある anti-SD 配列（CCTCC）と、染色体 DNA 上の別の領域に位置する目的遺伝子の SD 配列（GGAGG）を相互に入れ替え、anti-SD10 (GGAGG)-SD10 (CCUCC)とした。その結果、目的遺伝子を *rrnO* 由来のリボソームのみで翻訳できるため、リボソームの翻訳活性を目的遺伝子の発現量で測定することができる。また、生きるための必須遺伝子を翻訳するために、正常な SD 配列をもつ *rrn* も有している。

これまで当研究室では、目的遺伝子としてクロラムフェニコール耐性遺伝子を用いた株でリボソーム翻訳活性の測定を行ってきたが、ウェスタンブロット法でタンパク量を測定しなければならず多くの時間を要した。そこで、本研究ではより簡便に測定ができるよう、目的遺伝子を *lacZ*（β-ガラクトシダーゼ）遺伝子に変え、LacZ assay を用いて測定できる変異体を構築した。これらの株の *rrnO* 16S rRNA の helix9 に h9-E と h9-Δ 変異を導入し、*cat* 遺伝子および *lacZ* 遺伝子の発現量を測定した。

1 : *cat* 遺伝子を目的遺伝子に用いた SD10 assay 測定結果

h9-B のリボソーム翻訳活性と比較すると、h9-E 変異を導入すると 1.2 倍に上昇し、h9-Δ 変異を導入すると 40%まで低下することが明らかになった。

2 : *lacZ* 遺伝子を目的遺伝子に用いた SD10 assay 測定結果

h9-B のリボソーム翻訳活性と比較すると、h9-E 変異を導入すると 1.2 倍に上昇し、h9-Δ 変異を導入したリボソームは 14%まで低下することが明らかになった。

測定 1.および 2.から、h9-E 変異を持ったリボソームの翻訳活性は 20%上昇し、h9-Δ 変異は両者の結果で値は異なるが翻訳活性が顕著に損なわれていることが明らかになった。

***rrn* 多重欠失変異株を用いた helix9 変異導入解析**

h9-E および h9-Δ 変異を導入したリボソームの翻訳活性が認められたので、次に *rrn* 多重欠失変異株へ h9-E および h9-Δ 変異の導入を行い、生育速度や胞子形成率などの性質を調べ野生株と比較した。

1 : Δ9 *rrnO*$^+$株を用いた解析

rrn オペロンを 1 コピーのみ有する Δ9 *rrnO*$^+$株へ h9-Δ 変異を導入したところ、形質転換体を得ることができなかった。一方、h9-E 変異を導入した Δ9 $rrnO_{h9\text{-}E}$ 株は単離することができたので、Δ9 $rrnO_{h9\text{-}E}$ 株の解析を行った。その結果、生育速度を測定したところ、親株の Δ9 *rrnO*$^+$株と同じ生育速度を示し、コロニー形成速度を観察しても顕著な差は見られなかった。また、対数増殖期におけるリボソームのプロファイルを 10-40%ショ糖密度勾配超遠心法にて測定したところ、Δ9 *rrnO*$^+$株と同様なプロファイルを示し、差は見られなかった。また、Δ9 *rrnO*$^+$株は胞子形成能が極めて低くなっているため胞子形成能への影響は調べることができなかった。

2 : Δ8 *rrnO*$^+$*rrnA*$^+$株を用いた解析

次に、Δ9 *rrnO*$^+$株よりも生育が良い、*rrn* オペロンを 2 コピー有する Δ8 *rrnO*$^+$*rrnA*$^+$株へ h9-E および h9-Δ 変異の導入を行って解析することとした。h9-E および h9-Δ 変異の導入を行った結果、h9-Δ 変異を導入した Δ8 $rrnO_{h9\text{-}\Delta}rrnA_{h9\text{-}\Delta}$ 株と h9-E 変異を導入した Δ8 $rrnO_{h9\text{-}E}rrnA_{h9\text{-}E}$ 株の両変異体を得ることができた。これらの変異体の生育速度を測定した結果、Δ8 $rrnO_{h9\text{-}E}rrnA_{h9\text{-}E}$ 株は Δ8 *rrnO*$^+$*rrnA*$^+$株（親株）と同等な値を示した一方、

研究成果の概要　つづき

Δ8 *rrnO*$_{h9-\Delta}$*rrnA*$_{h9-\Delta}$ 株の生育速度は顕著に遅く、Δ9 *rrnO*$^{+}$株と同様の速度を示した。また、対数増殖期におけるリボソームのプロファイルを調べたところ、Δ8 *rrnO*$_{h9-E}$*rrnA*$_{h9-E}$ 株には顕著な変化は見られなかったが、Δ8 *rrnO*$_{h9-\Delta}$*rrnA*$_{h9-\Delta}$ 株では 50S サブユニットが顕著に蓄積していることが明らかになった。そこで、リボソームタンパク質の構成に変化があるのではないかと考え、70S リボソームのリボソームタンパク質を RFHR 二次元ゲル電気泳動にて二次元展開を行ったが、各タンパク質のスポットに顕著な変化は見られなかった。

さらに、胞子形成能を測定した結果、Δ8 *rrnO*$_{h9-\Delta}$*rrnA*$_{h9-\Delta}$ 株は胞子形成が認められなかったが、Δ8 *rrnO*$_{h9-E}$*rrnA*$_{h9-E}$ 株の胞子形成率は Δ8 *rrnO*$^{+}$*rrnA*$^{+}$株（親株）と比べて、わずかに高い胞子形成率を示した。そこで、Δ8 *rrnO*$_{h9-E}$*rrnA*$_{h9-E}$ 株の胞子形成率がわずかに高くなったことが、胞子形成初期に起こる、胞子形成開始シグナル伝達の活性の違いによるのではないかと考えた。そこで、胞子形成開始に必須なリン酸化 Spo0A（Spo0A~P）を、負に制御している、Spo0E タンパク質を欠失させることで、Spo0A~P を安定化させ、耐熱性胞子の出現時期の測定を行うことにした。その結果、*spo0E* 遺伝子を欠失した Δ8 *rrnO*$^{+}$*rrnA*$^{+}$株および Δ8 *rrnO*$_{h9-E}$*rrnA*$_{h9-E}$ 株の両株で耐熱性胞子の出現時期が顕著に早くなることが明らかになった。しかし、両変異株において耐熱性胞子の出現時期ならびに胞子数に顕著な差は見られなくなった。よって、胞子形成開始シグナル伝達の最終的に安定化される Spo0A~P の量が律速段階であり、わずかに Δ8 *rrnO*$_{h9-E}$*rrnA*$_{h9-E}$ の胞子形成数が多いのは Spo0A~P の安定化が Δ8 *rrnO*$^{+}$*rrnA*$^{+}$株よりも良いことによる可能性が示唆された。

研究発表（研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。）

①雑誌論文（著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ）
②図書（著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数）
③シンポジウム・公開講演会等の開催（会名、開催日、開催場所）
④その他（学会発表、研究報告書の印刷等）

① 雑誌論文

共著論文

Tagami K, Nanamiya H, Kazo Y, Maehashi M, **Suzuki Shota**, *et al.*, *MicrobiologyOpen*. Expression of a small (p)ppGpp synthetase, YwaC, in the (p)ppGpp^0 mutant of *Bacillus subtilis* triggers YvyD-dependent dimerization of ribosome. (2012) doi: 10.1002/mbo3.16

④ 学会発表

国際会議発表

『16th International Conference on Bacilli』2011 年 6 月　Montecatini Terme

・"Isolation and characterization of mutants deleting the 16S rRNA helix 9 in *Bacillus subtilis*." **Shota Suzuki,** Eri Namba, Yasuhiko Sekine and Fujio Kawamura.

・"Isolation and characterization of the rRNA mutants in *Bacillus subtilis*." Eri Numba, **Shota Suzuki** and Fujio Kawamura.

・"Analysis of the degradation of ribosome during spore development in *Bacillus subtilis*." Kazuya Watanabe, Marie Maehashi, **Shota Suzuki** and Fujio Kawamura.

国内発表

『第 6 回ゲノム微生物学会年会』　2012 年 3 月　立教大学

・「枯草菌 16S rRNA 変異株構築及び機能解析」
鈴木　祥太、矢野　晃一、関根　靖彦、河村　富士夫

『日本遺伝学会 第 83 回大会』　2011 年 9 月　京都大学

・「rRNA オペロン多重欠失変異株を用いた枯草菌 16S rRNA helix 9 の機能解析」 ○鈴木 祥太、難波　恵理、武田　拓也、矢野　晃一、関根　靖彦、河村　富士夫

『平成 23 年度（2011 年度）グラム陽性菌ゲノム機能会議』 2011 年 8 月 福山

・「枯草菌における *rrn* オペロンのコピー数の評価とその応用例」○矢野　晃一、和田　哲也、川口　康弘、加増　祐佳、前橋　真利江、鈴木　祥太、星屋　将太、渡辺　和哉、難波　恵理、武田　拓也、田上　和美、河村　富士夫

・「枯草菌 16S rRNA helix 9 の *rrn* オペロン多重欠失変異株を用いた機能解析」○鈴木　祥太、難波　恵理、武田　拓也、矢野　晃一、河村　富士夫

・「枯草菌定常期におけるリボソーム二量体化と *yvyD* 遺伝子の転写制御」○加増　祐佳、中村　有飛、星屋　将太、田上　和美、鈴木　祥太、矢野　晃一、河村　富士夫

『日本農芸化学会 2011 年度大会』 2011 年 3 月 京都女子大学

・「枯草菌を用いた 16S rRNA の Helix 9 とリボソーム翻訳機能の解析」 ○鈴木 祥太、和田 哲也、河村 富士夫
・「枯草菌の細胞増殖と分化における rRNA オペロンコピー数効果の研究」 ○和田 哲也、鈴木 祥太、河村 富士夫