### 【学会発表】

(2024) 第 47 回 日本分子生物学会 [2024 年 11 月 27 日~29 日(福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)] [ポスター発表]

ベータプロテオバクテリア Comamonas testosteroniのリボソーム休眠因子(HPF)は 100S リボソームを形成出来ないが、70S リボソーム粒子を安定化する

○上田雅美、和田明、和田千惠子(吉田生物研究所・バイオ情報研究部門)

バクテリアは栄養の枯渇などのストレス条件下で生き残るために、いくつかの手段を持つ。その一つが、翻訳不活性な 70S 二量体、100S リボソームの形成であり、これによってバクテリアは「冬眠状態」に入る。  $\gamma$  プロテオバクテリアでは、100S リボソームの形成には ribosome modulation factor (RMF)と短い hibernation promoting factor (short HPF) が必要である(1)。他方大半の細菌は、long HPF のみによって 100S を形成する(2)。

バクテリアの進化の過程で、プロテオバクテリアの二つのグループ、 $\gamma$  と  $\beta$  の共通祖先が、 $\alpha$  プロテオバクテリアから分岐したとき long HPF の C 末端側半分を失って short HPF となり 100S リボソーム形成能を失って しまったと考えられる。さらにその後、 $\gamma$  が  $\beta$  と分岐したとき、 $\gamma$  が新しい 100S 形成因子 RMF の遺伝子を 獲得して、従来とは異なった機構で 100S リボソームを形成出来るようになったと推察される。このようにして 大部分のバクテリアが 100S を形成出来る中で、 $\beta$  プロテオバクテリアは 100S を形成出来ないグループとして 存在する。100S リボソームを形成出来ないバクテリアがいかにして劣悪な環境を耐え抜いてきたか、その生存 戦略は大変興味深い。

本研究で我々は、 $\beta$  プロテオバクテリアに属する Comamonas testosteroniの HPF の役割について調べた。C. testosteroni は、長さの異なる 2 つの HPF ホモログ(CtHPF-125 と CtHPF-119)遺伝子を持つ。CtHPF-125 は定常期に誘導されるのに対し、CtHPF-119 は、ここで用いた培養条件では発現しなかった。Short HPF と RMF、long HPF とは異なり、CtHPF-125 は予想通り 100S リボソームを形成出来なかった。Cthpf-125 遺伝子の欠失変異株を構築したところ、野生株に比べて約一日早くコロニー形成能が低下した。また、定常期の 70S リボソーム粒子は野生株よりも早く分解された。加えて、CtHPF-125 は in vitro でのタンパク質合成を阻害した。これらの結果は、CtHPF-125 はリボソームに結合して 70S リボソームを安定化し、100S リボソームを形成することなく翻訳を阻害し、長期生存をサポートすることを示唆する(3)。

- (1) Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1990) 87, 2657–2661. (2) Genes Cells (2013) 18, 554-574.
- (3) Genes Cells (2024) 8, 613-634. (DOI: 10.1111/gtc.13137)

# (2022) 第 45 回 日本分子生物学会 [2022 年 11 月 30 日~12 月 2 日 (幕張メッセ)]

[ポスター発表]

大腸菌リボソームの翻訳機能はリボソーム調製の際 L31 蛋白が外膜 protease7 と遭遇し切断されることにより低下する

○和田明、上田雅美、和田千恵子(吉田生物研究所・バイオ情報研究部門)

1970年にベルリンのグループがリボソーム蛋白を大腸菌で初めて同定定義したが、1986年に我々が開発したRFHR 法で分離すると L35、L36 の二つの 508 蛋白の見落としがあることが判りこれを追加して定義が完了した。それだけでなく 508 蛋白 L31 は当初同定された shortL31 とそれより大きい intactL31 の二つのスポットが見いだされ、後者は後日 L31 遺伝子 rpmE と一致した。short は intact より C 末が 7 アミノ酸短い。過去分子生物学研究に用いられてきた大腸菌株の殆どが short と intact 両方を持っていることから一説では shortL31 は生理的に意味のある翻訳後修飾の産物とも推測された。しかしわれわれが外膜蛋白 protease7 欠損株を調べた結果 shortL31 は全く存在せず、すべてが intactL31 であった。逆に言えば活性 protease7 を持つ大腸菌株では protease7 によって intactL31 が切断され shortL31 が生成することを意味する。つまり L31 は人為的産物であることが判

った。Protease7 は、生きた細胞ではリボソームと接触できないが、リボソームを調製する際、細胞膜を破砕すると両者は遭遇する。構造研究によれば L31 は、50S と 30S にまたがって結合する稀有な蛋白であり、70S 形成と翻訳活性に重要な役割を果たすことが明らかになったが、L31 が short 化するとこれらの機能が低下することが判った。分子生物学にとって大腸菌は最大の基準生物であり、今まで実施された翻訳測定は膨大な数に上るが、その大部分は傷物のリボソームで行われてきたことになる。従って翻訳測定は shortL31 を含まず intactL31 のみを含むリボソームによってやりなおさねばならない。

### (2019)

第42回 日本分子生物学会 [2019年12月3日~6日(福岡国際会議場)]

### [口頭発表]

- バクテリアリボソームの二量体化による翻訳活性の調節
  - ○上田 雅美¹、和田 千惠子¹、吉田 秀司²、牧 泰史²、和田 明¹
  - (1吉田生物研究所・バイオ情報研究部門、2.大阪医大・物理)

細菌は対数増殖期から栄養の枯渇に伴って定常期に入る。定常期の細胞には種々の変化が見られるが、リボ ソームは 70S リボソームから翻訳活性のない 100S リボソーム (70S ダイマー) に移行する。100S は栄養条件 が好転すると直ちに翻訳活性を持つ 70S に解離する。このダイマー化したリボソーム顆粒 100S は、大腸菌で 我々によって発見され、 Hibernation ribosome と名付けられた(1)。リボソームのモノマーとダイマーの変換 による翻訳活性の調節はバクテリア全般に保存されている。大腸菌の 100S は、定常期特異的に発現するリボ ソーム結合蛋白質 RMF(ribosome modulation factor)と 100S 形成促進因子 HPF(hibernation promoting factor)によって形成される。その構造は 50S-30S-30S-50S の順に繋がっている(2)。100S 形成に必須の RMF 遺伝子は、大腸菌を含むガンマプロテオバクテリアにのみ存在する。それ以外の RMF 遺伝子を持たないバク テリアで 100S リボソームの存在を調べたところ、黄色ブドウ球菌など多くの種に存在することを発見した。 その形成因子は、大腸菌の 100S 形成促進因子である HPF のホモログであるが、 HPF の2倍の長さを持ち (long HPF)、単独で働くことを明らかにした(3,4)。すなわち、バクテリアの 100S リボソームにはその形成因 子によって、ガンマプロテオバクテリアの RMF+HPF 型と、それ以外に広く存在する long HPF 型の 2 つの タイプが存在する(4)。 2 つの 100S の相違点として、1. 形成因子が異なる。2. 100S 形成時期が、 long HPF 型は全ての増殖段階に存在するが、 RMF+HPF 型は定常期に限られる。3. long HPF 型 100S は、 RMF+ HPF型 100Sとは異なりはるかに安定である(4)。4. 最近の構造研究から、2種類の100Sの30S-30S間の結 合様式が全く異なることが明らかとなった。

- (1) Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1990)87,2657-2661. (2) Structure (2010)18,719-724.
- (3) Genes Cells (2010) 15,43-58. (4) Genes Cells (2013) 18,554-574.

### [ポスター発表]

### 最小の大腸菌リボソーム蛋白 L36 の機能解析

○和田 千惠子¹、上田 雅美¹、和田 明¹(¹.吉田生物研究所・バイオ情報研究部門)

大腸菌リボソーム蛋白は 1970 年に Kaltschmidt と Wittmann が開発した二次元電気泳動法によって、はじめて 30S の S1-S21,50S の L1-L34 が命名された(1)。しかしその後 1986 年に開発された RFHR 法(2)によって小さな塩基性蛋白 L35, L36 が新たに発見され、70S リボソーム蛋白遺伝子の全 54 種が最終的に定義された (1,3)。今回報告する L36 は分子量の最小のリボソーム蛋白であるが、バクテリア、ミトコンドリア、クロロプラストに広く保存されている。アーキア、真核細胞には存在しない。また亜鉛結合ドメインを持つ大腸菌リボソーム蛋白(L31, L36)の1つであり、それぞれパラログ遺伝子 ykgM, ykgO が存在するが、これらは亜鉛結合ドメインを持たない。この二つのパラログ遺伝子は同じ ykgM オペロンに含まれ、亜鉛結合ドメインを持

つ Zur リプレッサーによってその発現が抑制されている。我々はリプレッサー活性を失った zur 遺伝子変異株を分離したが、この株では ykgM と ykgO が恒常的に発現している。

L36 の機能を解析するにあたり、L36 遺伝子の欠失変異株と野生株との比較を行った。 $In\ vitro$  の翻訳活性が L36 欠失変異株では野生株より 30%減少し、L36 が翻訳機能に寄与することが明らかになった。さらに、L36 変異株の増殖は  $25^\circ$ C、 $37^\circ$ C、 $42^\circ$ Cにおいて、いずれも野生型株に比べて遅く、小さなコロニーを作ることからも L36 の翻訳機能への関与が示唆されている。こうした L36 欠失変異株で見られた翻訳活性の抑制や増殖阻害は L36 のパラログ ykgO の発現によって解消され、野生株同様の翻訳活性や増殖の回復を示したことにより YkgO は亜鉛結合ドメインは持たないが、L36 と同様翻訳機能に寄与することが明らかになった。

- (1) Kaltschmidt, E. and Wittmann, H.G. (1970) Anal. Biochem., 36, 401-412.
- (2) Wada, A. (1986) J. Biochem., 100, 1583-1594 and 1595-1605.
- (3) Wada, A. and Sako, T. (1987) J. Biochem., 101, 817-820.

### (2018)

第5回 Ribosome Meeting [2018年9月13日~14日 (新潟大学)]

[口頭発表]

大腸菌リボソーム蛋白 L31 と L36 およびそれらのパラログ (YkgM, YkgO) の機能解析

- ○上田雅美¹、和田千惠子¹、別所義隆²3、和田明¹
- (<sup>1</sup>吉田生物研究所・バイオ情報研究部門、 <sup>2</sup>理研・SPring 8 センター、 <sup>3</sup>中央研究院・生化学研究所 )

前回のリボソームミィーティングで、リボソーム蛋白 L31 がリボソームサブユニットの会合、翻訳活性、100S リボソーム形成に関与することを報告したが、加えて L31 がリボソーム調製時に外膜蛋白 Protease 7 と遭遇して切断される結果、翻訳活性が約 40 %も減少することを示した(1)。この人為的損傷に気付かなかったために、過去に測定されてきた大腸菌の翻訳活性の大部分が不正確であったことが明らかになった。今回は、L31 と L36 およびそれらのパラログ(YkgM, YkgO)の機能について報告する。

バクテリアをはじめすべての生物の生命維持にとって、亜鉛イオンは重要である。この亜鉛欠乏時には亜鉛結合モチーフを持ったリボソーム蛋白質が亜鉛供給源として働くと考えられている。大腸菌では L31 と L36 が亜鉛結合蛋白質で、そのモチーフを持たないパラログ YkgM, YkgO が存在し、亜鉛欠乏時にはこれらパラログが発現誘導される。ykgM, ykgO 両遺伝子は ykgM オペロンに所属し、亜鉛存在下ではその発現は亜鉛結合リプレッサーZur によって抑制されている。

L31 遺伝子(rpmE)の欠失株は、その生育が野生株に比べて遅いが、この欠失株から野生株と同等の生育を示す変異株を4株得た。これらの変異は、すべて zur遺伝子内に見られ、点突然変異または IS の挿入であった。この rpmE 欠失 zur 変異株のリボソームでは、L31 蛋白が欠失し、L31 パラログ YkgM 蛋白が 1 コピー置き換わっており、これによってリボソームにおける L31 の機能は全て回復していた。

他方 L36 遺伝子(*rpmJ*) の欠失株は、野生株より小さいコロニーを形成した。翻訳活性は約 60 %に低下したが、L31 とは異なり、リボソームサブユニットの会合、100S リボソーム形成は正常であった。この生育欠損はプラズミドによる L36 遺伝子の発現によって回復した。また *rpmJ* 欠失 *zur* 欠失株のリボソームを調べたところ、L36 に代わってパラログ YkgO がリボソームに結合する事がわかった。

(1) Ueta et al. (2017) Genes Cells 22, 452-471.

第 41 回 日本分子生物学会 [2018 年 11 月 28 日~30 日 (パシフィコ横浜)]

[ポスター発表]

大腸菌リボソーム蛋白 L31 と L36 およびそれらのパラログ(YkgM, YkgO)の機能解析

○上田 雅美¹、和田 千惠子¹、別所 義隆 ²,³、和田 明¹

### (1吉田生物研究所・バイオ情報研究部門、2理研・Spring-8 センター、3中央研究院・生化学研究所)

最近我々は、リボソーム蛋白 L31 がリボソームサブユニットの会合、翻訳活性、100S リボソーム形成に関与することを報告したが、加えて L31 がリボソーム調製時に外膜蛋白 Protease 7 と遭遇して切断される結果、翻訳活性が約 40 %も減少することを示した(1)。この人為的損傷に気付かなかったために、過去に測定されてきた大腸菌の翻訳活性の大部分が不正確であったことが明らかになった。今回は、 L31 と L36 およびそれらのパラログ(YkgM, YkgO)の機能について報告する。

バクテリアをはじめすべての生物の生命維持にとって、亜鉛イオンは重要である。この亜鉛欠乏時には亜鉛結合モチーフを持ったリボソーム蛋白が亜鉛供給源として働くと考えられている。大腸菌では L31、 L36 が亜鉛結合蛋白質で、そのモチーフを持たないパラログ YkgM, YkgO が存在し、亜鉛欠乏時にはこれらパラログが発現誘導される。ykgM,ykgO両遺伝子はykgMオペロンに所属し、亜鉛存在下ではその発現は亜鉛結合リプレッサーZurによって抑制されている。

L31 遺伝子(rpmE)の欠失株は、その生育が野生株に比べて遅いが、この欠失株から野生株と同等の生育を示す変異株を 4 株得た。これらの変異は、すべて zur 遺伝子内に見られ、点突然変異または IS の挿入であった。この rpmE欠失 zur 変異株のリボソームでは、 L31 蛋白が欠失し、 L31 パラログ YkgM 蛋白が 1 コピー置き換わっており、これによってリボソームにおける L31 の機能は全て回復していた。

他方 L36 遺伝子(*rpmJ*) の欠失株は、野生株より小さいコロニーを形成した。翻訳活性は約60%に低下したが、L31とは異なり、リボソームサブユニットの会合、100S リボソーム形成は正常であった。この生育欠損は、プラズミドによる L36 遺伝子の発現によって回復した。また *rpmJ* 欠失 *zur* 欠失株のリボソームを調べたところ、L36 に代わってパラログ YkgO がリボソームに結合する事がわかった。

(1) Ueta et al.(2017) Genes Cells 22, 452-471.

### (2017)

第 89 回日本遺伝学会 [2017 年 9 月 13 日~16 日(岡山大学)]

### [口頭発表]

大腸菌リボソーム蛋白 L31 はリボソームサブユニット会合と翻訳機能に寄与し、

プロテアーゼ7で切断されると両機能は減少する

○上田 雅美¹、和田 千惠子¹、別所 義隆²³、和田 明¹

(<sup>1</sup>吉田生物研究所・バイオ情報研究部門、<sup>2</sup>理研・Spring-8 センター、<sup>3</sup>中央研究院・生化学研究所)

Ribosomal protein L31 in *Escherichia coli* contributes to ribosome subunit association and translation, whereas short L31 cleaved by protease 7 reduces both activities.

Ueta M<sup>1</sup>, Wada C<sup>1</sup>, Bessho Y<sup>2,3</sup> and Wada A<sup>1</sup>.

(¹Yoshida Biological Lab., ²RIKEN SPring-8 Center, ³Academia Sinica, Insti. Biol. Chem.)

我々は、大腸菌から調製したリボソームには、完全長 L31 と、C 末端アミノ酸 8 個が欠失した short L31 の 2 種類が存在し、この切断は、リボソーム調製の際に外膜蛋白の Protease 7 (ompT 産物)により人為的に生じることを明らかにした。

今回 L31 の機能を知るため、欠失変異株を用いた実験から、L31 が 50S,30S サブユニット会合に重要であり、この会合に C 末端8アミノ酸が関与すること示した。

更に、翻訳活性への影響を  $in\ vitro$  翻訳系で調べたところ、L31 欠失や short 化によって 4 割の活性低下が見られたことから、L31 およびその C 末端 8 アミノ酸は、翻訳活性に重要な役割を持つと考えられる。

#### 第 40 回 日本分子生物学会[2017 年 12 月 6 日~9 日(神戸ポートアイランド)]

### [ポスター発表]

大腸菌リボソーム蛋白 L31, L36 パラログは zur変異によって恒常的に発現する

○上田 雅美 1、和田 千惠子 1、別所 義隆 2,3、和田 明 1

(<sup>1</sup>吉田生物研究所・バイオ情報研究部門、<sup>2</sup>理研・SPring-8 センター、<sup>3</sup>中央研究院・生化学研究所)

バクテリアをはじめ生物において、亜鉛イオンは生命維持に関わる重要な蛋白質に結合して、細胞機能の制御を担っている。バクテリアのリボソーム蛋白には、亜鉛結合モチーフを持つものが存在し、亜鉛欠乏時はそのモチーフを持たないパラログが発現する。大腸菌では L31 と L36 が亜鉛結合蛋白質で、そのパラログ YkgM, YkgO が存在する。ykgM,ykgO 両遺伝子は同じオペロンに所属し、その発現は亜鉛結合 Zur リプレッサーによって亜鉛存在下では抑制されている。

大腸菌のL31 は、リボソームサブユニットの会合、翻訳活性、100S リボソーム形成に関与することを、最近我々は報告した(1)。L31 遺伝子(rpmE)の欠失株は、その生育が野生株にくらべ遅く、野生株より小さいコロニーを形成する。その中で、生育が早く、野生株と同じ大きさのコロニーを形成する変異株が 4 株得られた。これらの変異は、すべて zur 遺伝子の点突然変異または挿入変異であった。この rpmE 欠失 zur 変異株でリボソームを調べたところ、対数増殖期、定常期ともL31 パラログ YkgM が 1 コピー存在していた。

このL31の代わりにYkgMが入ったリボソームは、野生株に匹敵する翻訳活性を示した。すなわち、亜鉛欠乏時において、YkgMはL31の代わりにリボソームに結合して同等の働きが出来ると考えられる。

さらに今回、L36の機能、そのパラログYkgOの発現と機能についても報告する。

(1) Ueta et al. (2017) Genes Cells 22, 452-471.

## (2016)

第4回 Ribosome Meeting [2016年9月17日~18日 (大阪医科大学)]

[口頭発表]

大腸菌の翻訳活性はリボソーム蛋白 L31 の欠損によって 40%低下する

○上田雅美¹、和田千惠子¹、別所義隆²3、和田明¹

(1吉田生物研究所・バイオ情報研究部門、2理研・Spring-8 センター、3中央研究院・生化学研究所)

大腸菌のリボソーム蛋白 L31 は、その N 末端が 50S サブユニットの中央突起に結合し、C 末端は 30S サブユニットのヘッド部位にまで伸び、50S と 30S を繋ぐクランプのような構造をとっている(1)。我々は既に、大腸菌野生株から調製したリボソームには、完全長 L31 と、C 末端アミノ酸 8 個が欠失した short L31 の 2 種類が存在することを見出した(2)。またこの切断が ompT 欠失変異株では見られないことから、リボソーム調製の際に外膜蛋白の Protease 7 (ompT 産物)により人工的に生じることがわかった(3)。

前回、野生型株、rpmE(L31)欠失変異株、ompT欠失変異株のリボソームを用いて、蔗糖密度勾配遠心でリボソームプロフィールを、RFHR 2D・PAGE で蛋白質を解析し、L31 が 50S, 30S サブユニット会合および 70S の安定性に関与することを示した。また、Protease 7 によって切断される C 末端 8 アミノ酸がこの機能に重要であることも明らかにした。

今回、L31の欠失や short 化による翻訳活性への影響を、in vitro 翻訳系で調べた。L31が欠失したり short 化したリボソームで、40%の活性低下が見られた。このことから、L31 およびその C 末端 8 アミノ酸は、翻訳活性に重要な役割を持つことが明らかになった。今まで測定されてきた大腸菌リボソームの活性は、Protease 7 による L31の short 化により、多くの場合、本来の翻訳活性よりも低い値しか測定出来ていなかったと考えられる。

- (1) Fischer, N. et al. (2015) Nature 520,567-570.
- (2) Wada, A.(1986) J. Biochem. 100, 1595-1605.
- (3) Wada, A.(1998) Genes Cells 3,203-208.

第 39 回 日本分子生物学会 [2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日 (パシフィコ横浜)] 「ポスター発表]

大腸菌リボソームの翻訳活性は従来の測定値より 40%高い ~L31 蛋白損傷の影響を排除する~

○上田雅美1、和田千惠子1、別所義隆23、和田明1

(1吉田生物研究所・バイオ情報研究部門、2理研・Spring-8 センター、3中央研究院・生化学研究所)

大腸菌のリボソーム蛋白 L31 は、その N 末端が 50S サブユニットの中央突起に結合し、 C 末端は 30S サブユニットのヘッド部位にまで伸びており、50S,30S を繋ぐクランプのような構造をとっている(1)。我々は既に、大腸菌から調製したリボソームには、完全長 L31 と、 C 末端アミノ酸 8 個が欠失した short L31 の 2 種類が存在することを見出した(2)。またこの切断は、ompT欠失変異株を用いた実験から、リボソーム調製の際に外膜蛋白の Protease 7 (ompT産物)により人工的に生じることも明らかにした(3)。

L31 の機能を知るため、野生型株、rpmE欠失変異株、ompT欠失変異株のリボソームを用いて、蔗糖密度勾配遠心法でリボソームプロフィールを、RFHR二次元電気泳動法で蛋白質を解析した。完全長 L31 のみを含む ompT欠失変異株のリボソームは、70S が大部分で遊離 50S, 30S がほとんど検出されなかった。他方、野生型株では、L31 と short L31 の両方を含み、70S に加え遊離 50S, 30S が見られた。更に L31 欠失変異株のリボソームでは、50S, 30S の多いリボソームプロフィールを示した。この傾向は蔗糖密度勾配遠心中の Mg 濃度を 6 mM に下げるとより顕著となり、 L31 が欠失したリボソームではほとんどがサブユニットに解離した。以上の結果は、 L31 が 70S の安定化と 50S, 30S サブユニット会合に重要であり、この会合に C 末端 8 アミノ酸が関与することを示唆している。

更に、L31 欠失や short 化による翻訳活性への影響を、in vitro 翻訳系を用いて調べた。L31 が欠失したリボソーム又はL31 が short 化したリボソームで 4 割の活性低下が見られた。このことから、L31 およびその C末端8アミノ酸は、翻訳活性に重要な役割を持つと推測出来る。今まで測定されてきた大腸菌リボソームは、この Protease 7 によるL31 の short 化を放置してきたため、ほとんどの場合、本来の翻訳活性よりも低い値しか測定出来ていなかったと考えられる。

- (1) Fischer, N. et al. (2015) Nature 520, 567-570.
- (2) Wada, A. (1986) *J. Biochem.* 100, 1595-1605.
- (3) Wada, A. (1998) Genes Cells 3, 203-208.

(2015)

第3回 Ribosome Meeting [2015 年3月 17 日~18 日(ANA ホリデイ・イン リゾート 宮崎)] 「口頭発表]

大腸菌リボソーム蛋白 L31 は 50S・30S サブユニット会合に重要な役割を持つ

○上田雅美¹、和田千惠子¹、別所義隆²³、和田明¹

(1吉田生物研究所・バイオ情報研究部門、2理研・Spring-8 センター、3中央研究院・物理研究所)

大腸菌のリボソーム蛋白 L31 は L5, L18, L25 と 5S rRNA とともに複合体を形成し、50S サブユニットの中央突起に位置している。その機能における知見は少ない。

大腸菌 W3110 のリボソームには、L31 が 70 アミノ酸からなるもの(L31)と、C 末端アミノ酸 8 個が欠失した 62 アミノ酸からなるもの(short L31)の 2 種類が存在する(1)。ompT欠失変異株のリボソームでは short L31 は 観察されなかった事から、この C 末 8 アミノ酸の切断は、リボソーム調製の際に外膜蛋白の Protease VII (ompT 産物)によって人工的に生じたものであると考えられる(2)。

今回、L31 の機能を知るため、野生型株、rpmE 欠失変異株、ompT 欠失変異株からリボソームを調製し、蔗糖密度勾配遠心法でリボソームプロフィールを、RFHR 二次元電気泳動法で蛋白質を解析した。ompT 欠失変異株のリボソームは、完全長 L31 のみを含み、70S が大部分で遊離 30S, 50S がほとんど検出されなかった。また、

蔗糖密度勾配遠心中の Mg 濃度を 15~mM から 5~mM に下げても、リボソームプロフィールはほとんど変化しなかった。他方、野生型株では、L31 と short L31 の両方を含み、70S に加え遊離 30S, 50S が見られた。5~mM Mg 濃度では、70S は減少しサブユニットが増加した。更に L31 欠失変異株のリボソームを調べたところ、30S, 50S の多いリボソームプロフィールを示し、5~mM Mg 濃度では 70S はほとんど維持されず、サブユニットに解離した。以上の結果は、L31 が 30S, 50S サブユニット会合に重要であり、この会合に C 末端 8 アミノ酸が関与することを示唆している。

L31 にはパラログ (YkgM) が存在するが、これが L31 の代わりに入ったリボソームでは、低濃度  $Mg^{2+}$ においても 70S が安定に存在した。YkgM には Protease VII による切断部位がないことから、完全長 YkgM が存在することが高いサブユニット会合能を示していると推測出来る。今回、100S リボソーム形成および翻訳活性への影響も調べた。それらの結果も合わせて報告する。

- (1) Wada, A. (1986) J. Biochem. 100, 1595-1605.
- (2) Wada, A. (1998) Genes Cells 3, 203-208.

## 第38回 日本分子生物学会 [2015年12月1日~4日(神戸ポートアイランド)]

[ポスター発表]

大腸菌リボソーム蛋白 L31 の機能解析(II)

○上田雅美¹、和田千惠子¹、別所義隆²3、和田明¹

(1吉田生物研究所・バイオ情報研究部門、2理研・Spring-8 センター、3中央研究院・物理研究所)

大腸菌リボソーム蛋白 L31 は、50S サブユニットの中央突起に位置している。我々は既に、大腸菌から調製したリボソームには、完全長 L31 と、C 末端アミノ酸 8 個が欠失した short L31 の 2 種類が存在することを見出した(1)。この切断は、ompT欠失変異株を用いた実験等から、リボソーム調製の際に外膜蛋白の Protease VII (ompT 産物)により人為的に生じたものである(2)。

更に、L31 のみを含むリボソームと、L31 と short L31 が混在するリボソームの翻訳活性を比較した。L31 の short 化によって、Poly(U)-Phe 系、MS2-Leu 系ともに 2 割の活性の低下が見られた。これは、L31 の short 化が翻訳伸長活性を阻害することを示している。

L31 にはパラログ YkgM が存在するが、これが L31 の代わりに入ったリボソームでは、6 mM  $Mg^{2+}$ においても 70S が安定に存在することから、YkgM も、サブユニット会合に L31 と同様の役割を持つと考えられる。大 腸菌定常期に形成される 100S リボソームは、L31 あるいは YkgM を持つ株では 6 mM  $Mg^{2+}$ でも安定だったが、その両方を失った株では安定な 100S が形成されなかった。L31 あるいは YkgM が 70S を安定化することは、100S 形成にも重要であることが明らかとなった。

- (1) Wada, A. (1986) J. Biochem. 100, 1595-1605.
- (2) Wada, A. (1998) Genes Cells 3, 203-208

### 第89回日本遺伝学会 [2014年9月17日~19日(長浜バイオ大学)]

「口頭発表]

### 大腸菌 rpoS 欠失変異株における 100S Ribosome の形成阻害の機構

○和田 千惠子、上田 雅美、和田 明 (吉田生物研究所・バイオ情報研究部門)

# 第 37 回 日本分子生物学会年会 [2014年 11月 25日~27日 (パシフィコ横浜)]

「ポスター発表]

# 大腸菌リボソーム蛋白 L31 は50 S·30 Sサブユニット会合に重要な役割を持つ

○上田雅美 1、和田千惠子 1、別所義隆 2,3、和田明 1

(1吉田生物研究所・バイオ情報研究部門、2理研・Spring-8 センター、3中央研究院・物理研究所)

#### (2013)

# 第 2 回 Ribosome Meeting [2013 年 3 月 28 日~29 日 (東京農工大学農学部)]

[口頭発表]

バクテリアには保存された二つのタイプの1005リボソームが存在する

○上田雅美、和田千惠子、和田明

(吉田生物研究所・バイオ情報研究部門)

## 第36回 日本分子生物学会年会 [2013年12月3日~6日(神戸ポートアイランド)]

[ポスター発表]

バクテリアに存在する2種類の100Sリボソームの特徴

○上田雅美、和田千惠子、和田明

(吉田生物研究所・バイオ情報研究部門)

### (2012)

#### 第 1 回 Ribosome Meeting [2012 年 3 月 15 日~16 日(広島大学)]

#### [特別講演]

#### RFHR 2D PAGE によるリボソームの研究

和田明(吉田生物研究所)

### [口頭発表]

### Eubacteria における二つのタイプの 100S リボソーム形成

○上田雅美<sup>1</sup>、和田千惠子<sup>1</sup>、加藤貴之<sup>2</sup>、宮田知子<sup>2</sup>、難波啓一<sup>2</sup>、和田明<sup>1</sup>

(1 吉田生物研、2 阪大・生命機能研)

### 第 14 回 日本RNA学会年会「2012 年 7 月 18 日~20 日(東北大学)]

### 「口頭発表]

# 真正細菌には二つのタイプの 100S リボソームが存在する

○上田雅美<sup>1</sup>、和田千惠子<sup>1</sup>、加藤貴之<sup>2</sup>、宮田知子<sup>2</sup>、橋本哲夫<sup>3</sup>、吉田秀司<sup>4</sup>、左子芳彦<sup>5</sup>、大福高史<sup>5</sup>、別所義隆<sup>6</sup>、北村彩<sup>6</sup>、大庭良介<sup>7</sup>、森川一也<sup>7</sup>、難波啓一<sup>2</sup>、和田明<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>吉田生物研・バイオ情報、<sup>2</sup>阪大・生命機能、<sup>3</sup>筑波大・生命環境科学、<sup>4</sup>大阪医大・物理、 <sup>5</sup>京大・院農、<sup>6</sup>理研・SPring-8、<sup>7</sup>筑波大・医学医療系)

# 第84回日本遺伝学会[2012年9月24日~26日(九州大学医学部)]

# [口頭発表]

## 真正細菌における二つのタイプの 100S リボソームの比較

○上田雅美<sup>1</sup>、和田千惠子<sup>1</sup>、加藤貴之<sup>2</sup>、宮田知子<sup>2</sup>、橋本哲夫<sup>3</sup>、吉田秀司<sup>4</sup>、左子芳彦<sup>5</sup>、大福高史<sup>5</sup>、別所義隆<sup>6</sup>、北村彩<sup>6</sup>、大庭良介<sup>7</sup>、森川一也<sup>7</sup>、難波啓一<sup>2</sup>、和田明<sup>1</sup>(<sup>1</sup>吉田生物研・バイオ情報、<sup>2</sup>阪大・生命機能、<sup>3</sup>筑波大・生命環境科学、<sup>4</sup>大阪医大・物理、<sup>5</sup>京大・院農、<sup>6</sup>理研・SPring-8、<sup>7</sup>筑波大・医学医療系)

# 第 35 回 日本分子生物学会年会[2012 年 12 月 11 日〜14 日(福岡国際会議場、マリンメッセ福岡)] [ポスター発表]

### 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

○上田雅美<sup>1</sup>、和田千惠子<sup>1</sup>、加藤貴之<sup>2</sup>、宮田知子<sup>2</sup>、橋本哲夫<sup>3</sup>、吉田秀司<sup>4</sup>、左子芳彦<sup>5</sup>、大福高史<sup>5</sup>、別所義隆<sup>6</sup>、北村彩<sup>6</sup>、大庭良介<sup>7</sup>、森川一也<sup>7</sup>、難波啓一<sup>2</sup>、和田明<sup>1</sup>(<sup>1</sup>吉田生物研・バイオ情報、<sup>2</sup>阪大・生命機能、<sup>3</sup>筑波大・生命環境科学、<sup>4</sup>大阪医大・物理、<sup>5</sup>京大・院農、<sup>6</sup>理研・SPring-8、<sup>7</sup>筑波大・医学医療系)

### (2011)

The 16th Annual Meeting of the RNA Society

The RNA Society of Japan 13th Annual Meeting [2011 年 6 月 14 日~18 日(京都国際会館)] [ポスター発表]

# Two types of 100S ribosome formation in eubacteria

○Masami Ueta<sup>1,2</sup>, Chieko Wada<sup>1</sup>, and Akira Wada<sup>1</sup> (¹Yoshida Biological Lab., ²Dept. Phys., Osaka Med. Coll.)

# 第83回日本遺伝学会[2011年9月20日~22日(京都大学農学部・農学研究科)] 「口頭発表]

### Eubacteria における二つのタイプの 100S リボソーム形成

○上田雅美<sup>1</sup>、和田千惠子<sup>1</sup>、加藤貴之<sup>2</sup>、宮田知子<sup>2</sup>、大福高史<sup>3</sup>、左子芳彦<sup>3</sup>、難波啓一<sup>2</sup>、和田明<sup>1</sup> (<sup>1</sup>吉田生物研究所、<sup>2</sup>阪大・生命機能研究科、<sup>3</sup>京大・農学研究科応用生物化学専攻)

# 第 34 回 日本分子生物学会年会[2011 年 12 月 13 日~16 日(パシフィコ横浜)]

### 「ポスター発表]

### Eubacteria における二つのタイプの 100S リボソーム形成

〇上田雅美  $^{1}$ 、和田千惠子  $^{1}$ 、加藤貴之  $^{2}$ 、宮田知子  $^{2}$ 、大福高史  $^{3}$ 、左子芳彦  $^{3}$ 、難波啓一  $^{2}$ 、和田明  $^{1}$  ( $^{1}$  吉田生物研、 $^{2}$  阪大・生命機能研、 $^{3}$  京大・農学研究科・応用生物化学)

#### (2010)

Ribosomes 2010 [2010. 5/3-5/7 (Orvieto, Italy)]

### 「ポスター発表〕

# Formation of 100S ribosomes by HPF (hibernation promoting factor) homolog in gram positive bacteria

OMasami Ueta<sup>1,2</sup>, Chieko Wada<sup>1,3</sup>, Hideji Yoshida<sup>2</sup>, Yasushi Maki<sup>2</sup> and Akira Wada<sup>1</sup>

# 第 12 回 日本 RNA 学会年会 [2010 年 7 月 27 日~29 日 (東京 学術総合センター)]

## [ポスター発表]

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

○上田雅美1,2、和田千惠子1,3、吉田秀司2、和田明1

(1吉田生物研究所、2大阪医大・物理、3京大・生命科学、)

# 第82回日本遺伝学会[2010年9月20日~22日(北海道大学)]

# [口頭発表]

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

○上田雅美1,2、和田千惠子1,3、和田明1

(1吉田生物研究所、2大阪医大・物理、3京大・生命科学、)

### BMB 2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会年会)

[2010年12月7日~10日 神戸ポートアイランド]

[ポスター発表]

3種のグラム陽性細菌 Lactobacillus が 100S リボソームを形成する

○上田雅美1,2、和田千惠子1、和田明1

(1吉田生物研究所、2大阪医大・物理)

### (2009)

### 第 11 回 日本 RNA 学会年会 [2009 年 7 月 27 日~29 日 (新潟市 朱鷺メッセ)]

### [ポスター発表]

増殖段階に依存する Staphylococcus aureus リボソームの構造変化 -100S リボソームの形成-

○上田雅美1,2、和田千惠子1,3、吉田秀司2、牧泰史2、和田明1

(1吉田生物研究所、2大阪医大・物理、3京大・生命科学)

### 第32回 日本分子生物学会年会 [2009年12月9日~12日 (パシフィコ横浜)]

[ポスター発表]

Staphylococcus aureus における HPF (hibernation promoting factor)ホモログ SaHPF による 100S リボソーム形成

〇上田雅美 <sup>1,2</sup>、和田千惠子 <sup>1,3</sup>、吉田秀司 <sup>2</sup>、牧泰史 <sup>2</sup>、和田明 <sup>1</sup>

(1吉田生物研究所、2大阪医大・物理、3京大・生命科学、)

### (2008)

第 10 回 日本 RNA 学会年会[2008 年 7 月 23 日~25 日(札幌コンベンションセンター)] 「ポスター発表]

バクテリア蛋白合成における HPF (Hibernation promoting factor)の機能解析

○上田雅美 1,3、吉田秀司 1、牧泰史 1、和田千惠子 2,3、和田明 1,3

(1 大阪医大・物理、2 京大・生命科学、3 吉田生物研究所)

BMB 2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会) [2008 年 12 月 9 日~12 日 (神戸国際会議場)]

# [ポスター発表]

バクテリアの翻訳活性におけるリボソーム結合蛋白質 HPF (Hibernation promoting factor) の機能 〇上田雅美  $^{1,2}$ 、吉田秀司  $^2$ 、牧泰史  $^2$ 、和田千惠子  $^{1,3}$ 、和田明  $^{1,2}$  ( $^1$ 吉田生物研究所、 $^2$ 大阪医大・物理、 $^3$ 京大・生命科学、)