㈱吉田生物研究所　バイオ情報研究部門　研究内容紹介　（2022.8.17）

和田明・和田千惠子・上田雅美

1. RFHR（radical-free and highly reducing）二次元電気泳動法の開発

RFHR 二次元電気泳動法は、和田明がリボソームの蛋白質を正確に定量するために開発した蛋白質分離方法で、今まで分離出来なかった小さい分子量や酸性から塩基性まで幅広い範囲の蛋白質を分離出来る。この方法を用いて、大腸菌リボソーム蛋白 L35, L36 を発見し、また完全長の L31 も見い出し、初めて大腸菌リボソーム全蛋白質の同定を完了させた。

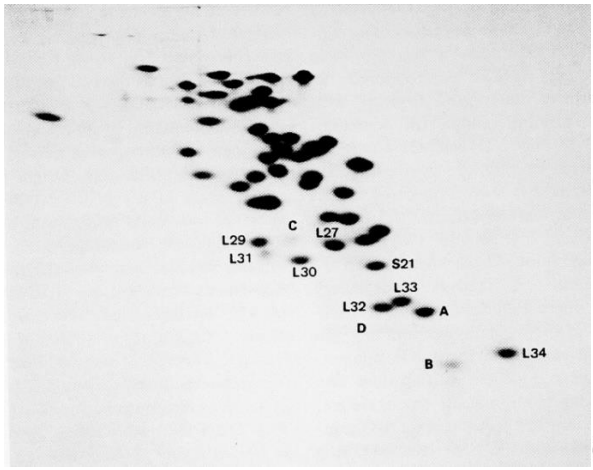
RFHR 二次元電気泳動法は従来使われてきた等電点二次元電気泳動法と異なり、蛋白質の等電点の制約がないため、これまで分離出来なかった塩基性の強い蛋白質や分子量の小さい蛋白質まで分離解析することが出来る。また、ゲルの環境を還元的に設定することによってシステインの架橋を防ぎ、かつゲル中のpHを一定に保つことによって等電点の分裂を防ぎ、1 蛋白質を 1 スポットにまとめることができた。この結果、蛋白質の細胞中の分子数を簡便に定量することが出来るようになった。

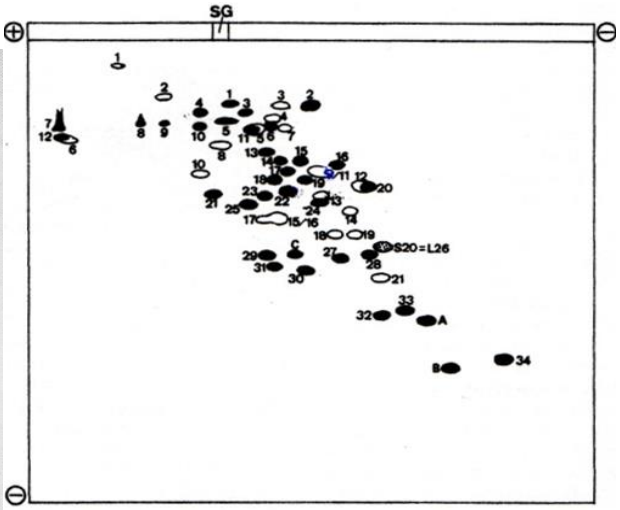
リボソームは、すべての生物の細胞に共通して存在する。細胞内の蛋白質を合成する工場のような役割をしている。54 種類の蛋白質と 3 種類の RNA によって構成されている、大小二つのサブユニットからなる巨大な顆粒である。我々は RFHR 法によって大腸菌のリボソーム蛋白を解析し、新たに L35, L36 を発見した。また完全長の intact L31 のスポットも見い出した。従来 L31 と誤って名付けられたスポットは、C 末端 8 アミノ酸が切断された短い L31(short L31)であった。これらの発見により、細菌のリボソーム蛋白の全ての同定が完了し、リボソームの全体像が初めて明らかとなった（図 1, 2, スポット A(L35), B(L36), C(intact L31)）。

RFHR 二次元電気泳動法の開発・リボソーム蛋白 L35, L36, intact L31 の発見

図 1　70S リボソームのリボソーム蛋白の解析
スポット A（L35）、B（L36）、
C（intact L31）、L31（short L31）

図 2　白いスポット
（30S サブユニットのリボソーム蛋白）
黒いスポット
（50S サブユニットのリボソーム蛋白）





Analysis of *Escherichia coli* ribosomal proteins by an improved two- dimensional gel electrophoresis. I. Detection of four new proteins. (1986a) Wada, A. *J. Biochem.* 100(6), 1583–1594.

Analysis of *Escherichia coli* ribosomal proteins by an improved two- dimensional gel electrophoresis. II. Characterization of four new proteins. (1986b) Wada, A. *J. Biochem.* 100(6), 1595–1605.

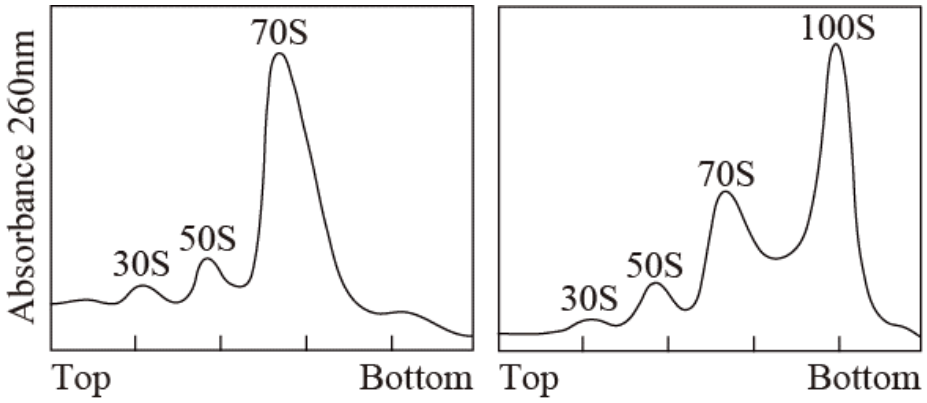
Primary structures of and genes for new ribosomal proteins A and B in *Escherichia coli* (1987). Wada, A. and Sako T. *J. Biochem.* 101-3 :817-820.

2. 「お休みリボソーム（Hibernating ribosome）100S」の発見

栄養が枯渇する定常期のリボソームを解析して、巨大な 100S リボソームを我々は発見した（図 3）。栄養の豊富な増殖期には 70 S リボソームが活発に蛋白合成を行うが、定常期に入ると 70S が減少、蛋白合成が鈍化し、替わって 100S が出現する。我々は 100S を「お休みリボソーム（Hibernating ribosome）」と名付けた。100S は 70 S リボソームの二量体である。バクテリアは飢餓のようなストレスに会うとリボソームが 70S から 100S に移行し、休眠状態に入ることによって自らの分解を防ぎ、安定な状態を保つと考えられる。環境が良くなると 100S が 70S に戻り、再び増殖をはじめる。100S リボソームは数少ない例外を除いてバクテリア全体に見られることを我々が明らかにした。即ち 100S 形成は、細菌が飢餓やいろいろのストレスに遭遇した場合に生き延びるための重要な生存戦略である。

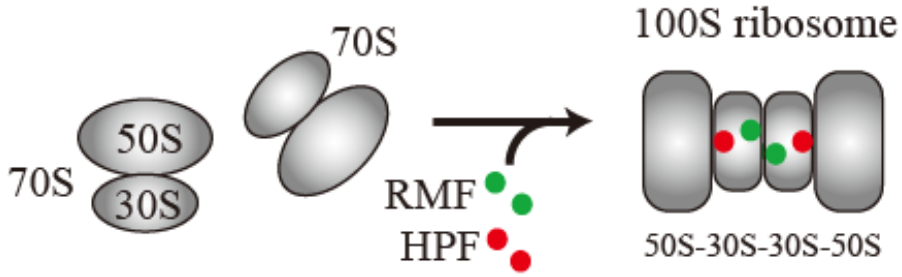
図 3　　大腸菌リボソームのショ糖密度勾配遠心のパターン

【対数増殖期】　　【定常期】



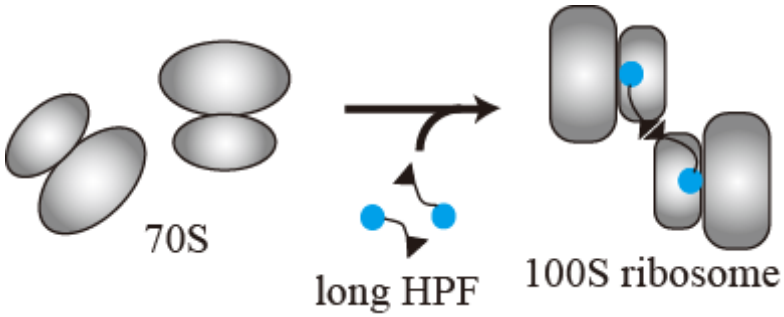
リボソームは細胞の中で蛋白質を合成する構造体であり、バクテリアにおいては、30S サブユニットと 50S サブユニットが結合した 70S リボソームとして機能する。1990 年、我々は大腸菌定常期の菌体からリボソームを調製した際、70S リボソームよりさらに大きな 100S リボソームが存在することを発見したが、RFHR 二次元電気泳動法によりリボソームに結合した蛋白を解析して、定常期特異的に出現するリボソーム結合蛋白質 RMF（Ribosome modulation factor）が 100S リボソーム形成因子であること、さらに HPF(Hibernation promoting factor)が 100S リボソーム形成促進因子であることを明らかにした。大腸菌を含むガンマプロテオバクテリアの多くの細菌は RMF/HPF によって 100S リボソームを形成する（図 4）。

図 4　ガンマプロテオバクテリアにおける RMF/HPF による 100S 形成



RMF 遺伝子はガンマプロテオバクテリアにしか存在しない。ではガンマ以外のバクテリアは 100S リボソームを形成できないのか。2010 年、我々は RMF 遺伝子を持たない黄色ブドウ球菌で 100S リボソームを発見した。その形成因子は、大腸菌の HPF の二倍の長さを持つ HPF ホモログ(long HPF)であった。さらに、乳酸菌、高度好熱菌でも、long HPF による 100S リボソーム形成を発見した。ガンマプロテオバクテリア、ベータプロテオバクテリア以外のほとんどの細菌は、long HPF を持っており、100S リボソームを形成できる。つまりバクテリアは、数少ない例外を除いてことごとく 100S リボソームを形成することが明らかになった（図 5)。

図 5　ガンマ、およびベータプロテオバクテリア以外の細菌における
long HPF による 100S リボソーム形成



このように 100S リボソームには、100S 形成因子として RMF/HPF による場合と、long HPF による場合の異なる二つのタイプが存在することが判った。何故、細菌は 100S リボソームを形成するのか。その理由を考察すると、栄養飢餓のようなストレス条件のもとでは、RMF や long HPF がリボソームに結合することによって、蛋白質合成活性を抑えて無駄な蛋白質を作らないようにすることと、他方 100S リボソーム形成によって、リボソームが分解されるのを保護し、ストレス解消時には 70S リボソームに解離して、リボソームを新たに合成することなく蛋白質合成を開始することが出来ることであろう。こうして細菌はストレス条件下、生き延びることが出来ると考えられる。

Structure and probable genetic location of a “ribosome modulation factor” associated with 100S ribosomes in stationary-phase *Escherichia coli* cells. (1990) Wada, A., Yamazaki, Y., Fujita, N. & Ishihama, A. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 2657–2661.

Formation of 100S ribosomes in *Staphylococcus aureus* by the hibernation promoting factor homolog *Sa*HPF. (2010) Ueta, M., Wada, C. & Wada, A. *Genes Cells* 15, 43–58.

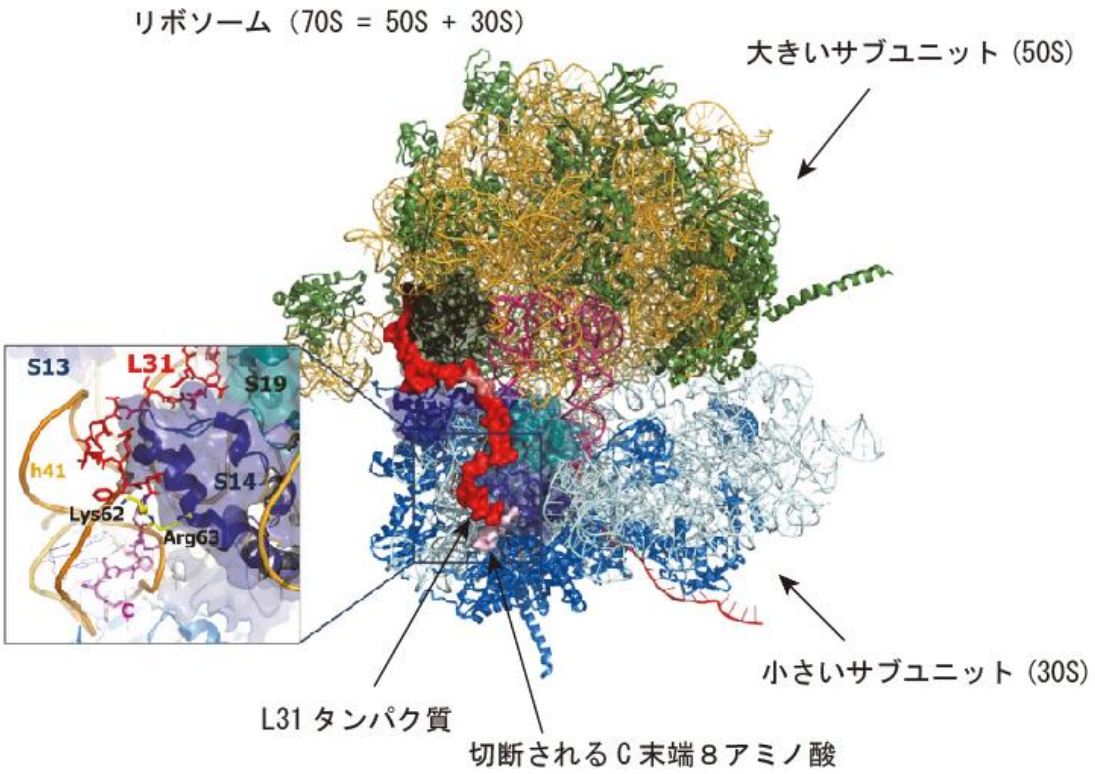
Conservation of two distinct types of 100S ribosome in bacteria. (2013) Ueta, M., Wada, C., Daifuku, T., Sako, Y., Bessho, Y., Kitamura, A., Ohniwa, R.L., Morikawa, K., Yoshida, H., Kato, T., Miyata, T., Namba, K. & Wada, A. *Genes Cells* 18, 554–574.

３．最近我々が明らかにしたのは、分子生物学が、モデル生物として大腸菌を選んだことによって起こった「悲劇」である。

リボソーム蛋白 L31 は 70S リボソームの 50S サブユニットと 30S サブユニットを結ぶ「かすがい」の役割を持ち、翻訳活性に重要な役割を担っている。ところが最近、L31 が、リボソームを調製するために細胞を破砕する際、生きた細胞中では遭遇しない細胞外膜プロテアーゼ 7 と遭遇し、C 末端 8 アミノ酸を切断され、翻訳活性が著しく落ちることを我々は見出した。学界はこれに気付かず、長い間この傷物のリボソームを使い膨大な研究結果を報告してきたのである。図 1，図 2 の L31 が short L31、スポット C が intact L31。この切断点は大腸菌など少数のバクテリアに限られていて、大部分のバクテリアでは切断が起こらない。

我々は RFHR 二次元電気泳動法を用いて、大腸菌のリボソーム蛋白 L31(intact L31)がリボソーム調製中に、人工的に外膜蛋白質であるプロテアーゼ 7 (OmpT)によって、C 末端の 8 アミノ酸が切断されることを発見したが、この C 末端 8 アミノ酸が削られた L31(short L31)を持つリボソームは、蛋白質の合成能が 40%も低下していた。また、細菌のリボソームは二つの大小の亜粒子（30S サブユニット＋50S サブユニット）が結合し、70S リボソームとなって蛋白質を合成する。クライオ電子顕微鏡構造研究によれば、L31 はこの二つの亜粒子を繋ぐ役割を持っていることが明らかになった（図 6)。すなわち、L31 が損傷すると、二つの亜粒子の結合が弱くなり、さらには解離することにより、蛋白質の合成能力が低下すると考えられる。大腸菌は古くからモデル生物として、生命科学の研究に使われてきた。また、多くのリボソーム研究も大腸菌を用いて行われてきた。しかし、L31 の損傷による蛋白質合成能の低下や、サブユニット粒子会合能の低下に気付かずに進められてきた。したがってプロテアーゼ 7 を欠失させた系で、損傷のない L31 を持つ、本来の蛋白合成能を発揮出来るリボソームで、改めて蛋白質合成のシステムを見直す必要がある。これによって分子生物学の教科書の蛋白質合成（翻訳）に関する記述の書き直しが必要になるかもしれない。

図 6　大腸菌 70S リボソームにおける L31 の結合部位
50S リボソーム蛋白（緑色）、30S リボソーム蛋白（青色）、
23S, 5S rRNAs（金色）、16S rRNA (灰色)、mRNA（あずき色）、tRNA（赤紫色）
L31（赤色）、L31 の切断される C 末端 8 アミノ酸（ピンク色）



Ribosomal protein L31 in *Escherichia coli* contributes to ribosome subunit association and translation, whereas short L31 cleaved by protease 7 reduces both activities. (2017) Ueta, M., Wada, C., Bessho, Y., Maeda, M. & Wada, A. *Genes Cells.* 22(5):452-471.

4. RFHR 二次元電気泳動法はプロテオーム解析に有効である。

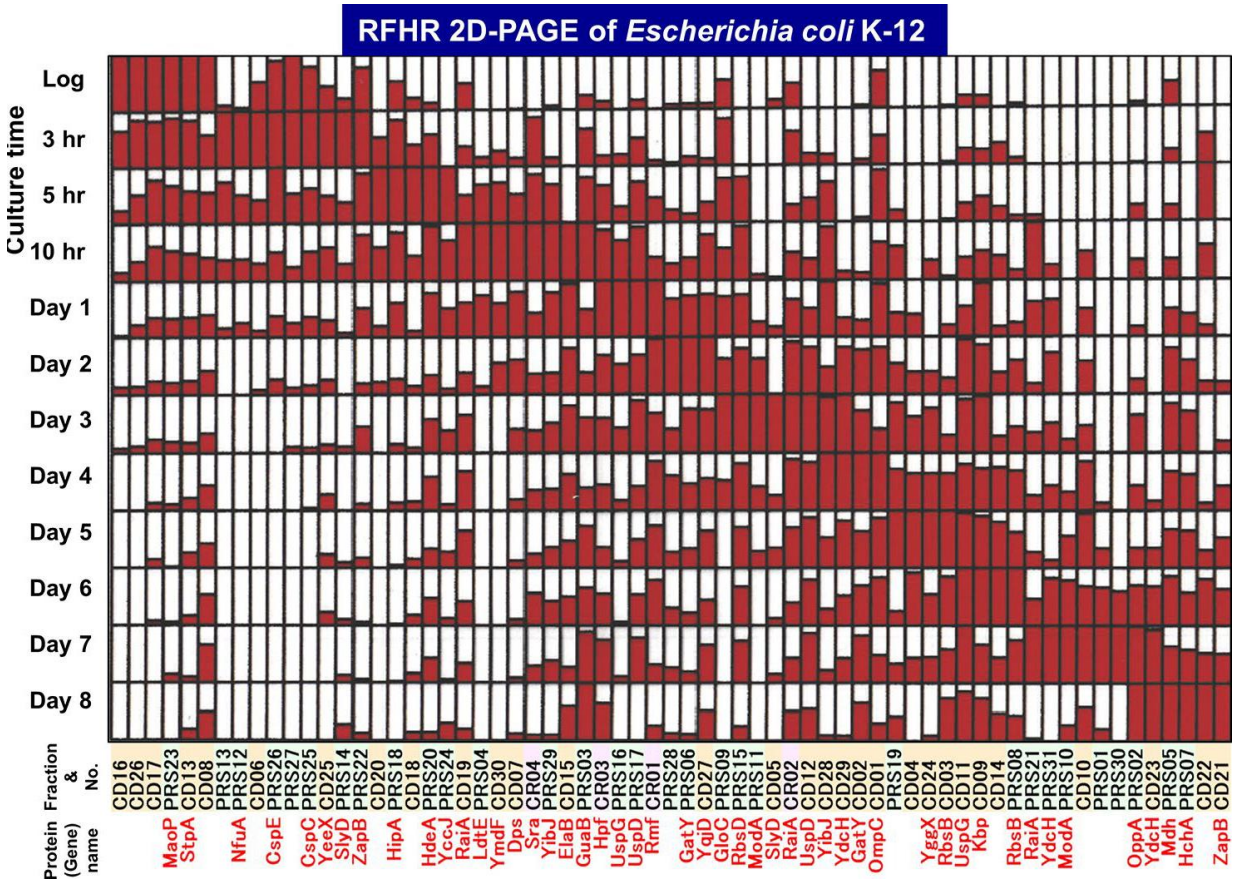
プロテオーム解析とはすべての蛋白質の発現を網羅的に調べる実験手法のこと。RFHR 二次元電気泳動法は再現性、定量化、蛋白質の高分離能、蛋白質の分子量や等電点値（pI 値）の限界がない等の利点がある。バクテリアの増殖、多細胞生物の発生の過程、がん化した細胞と正常細胞の比較、昆虫の変態（卵ー幼虫ーさなぎ、成虫）等々の広範なプロテオーム解析に適用出来る。

生物は、DNA の情報に基づき、環境の変化に対応しながら、必要な蛋白質を合成しつつ生きている。我々の研究室では、RFHR 二次元電気泳動法を用いて生物の細胞から抽出した蛋白質を分離・解析し、生物の営みを蛋白質の発現から解明しようしている。

RFHR 二次元電気泳動法を用いて大腸菌のすべての蛋白質の発現を調べると、その二次元ゲル上に

常時 1000 種類以上の蛋白のスポットが確認できるが、その蛋白の顔ぶれは時々刻々変化し、新たに発現・消失するものを生み出しながら経過していくことが明らかになった。図 7 は、大腸菌の生育を培養開始から時間を追ったときに発現量が変化する蛋白質を、RFHR 二次元電気泳動法で調べたものである。縦軸が培養時間、横軸が変化した蛋白質（赤い棒が各時点での発現量）を示している。栄養が枯渇した定常期（10 hr 以降)では、ほとんど細胞分裂は出来なくなるが、そのような定常期においても新しい 65 種類の蛋白質が変化することがわかった。即ち大腸菌は蛋白質の顔ぶれを時々刻々変化させながら、定常期の長い期間を生き延びていくことを示している。

図 7　大腸菌の生育に従って発現量が変化する蛋白質 65 種



Coordinated Regulation of Rsd and RMF for Simultaneous Hibernation of Transcription Apparatus and Translation Machinery in Stationary-Phase *Escherichia coli*. (2019) Yoshida, H., Wada, A., Shimada, T., Maki, Y. & Ishihama, A. *Front Genet.* 10:1153.