

論文内容の要旨

論文題目 大腸菌 23S リボソーム RNA における保存領域の機能解析

氏名 平林直己

リボソームは多数のタンパク質と数種の RNA から構成された巨大なタンパク質-RNA 複合体であり、mRNA を鋳型としたタンパク質合成を司っている。最近の研究により、コドン解読機構やペプチド重合反応はリボソームに含まれる RNA 成分 (rRNA) がその中心的な役割を担っていることが次第に明らかとなってきた。また、rRNA は全体の二次構造や機能部位の塩基配列が種を越えて高度に保存されていることから、本研究では rRNA の機能配列に着目し、rRNA が担うタンパク合成反応のメカニズムの解析を行った。

ペプチド伸長反応においてリボソーム大サブユニット(50S)では P-site のペプチジル tRNA(pep-tRNA)と A-site のアミノアシル tRNA(aa-tRNA)との間でペプチド重合反応が行われ、23S rRNA に存在するペプチド転移反応活性中心がその反応を触媒する。小サブユニット(30S)は、デコーディングセンターと呼ばれる部位で mRNA 上のコドンと tRNA のアンチコドンの正確な対合を監視することで翻訳の精度を維持している。ペプチドの重合過程では aa-tRNA は EF-Tu、GTP と三者複合体を形成することでリボソームの A/T-site に運ばれる。そして 30S 中の 16S rRNA の暗号解読中心によってコドン-アンチコドン対合が厳密にモニターされ、そのシグナルが 50S に伝達し EF-Tu の GTP が加水分解される。GDP を結合した EF-Tu は、構造変化を引き起こし aa-tRNA から解離することで aa-tRNA の CCA 末端が 50S のペプチド転移活性中心にエントリーされる。したがって、暗号解読とそれに続くペプチド転移反応はリボソームの大、小サブユニットのダイナミックな連携によって維持されているが、この過程の詳細な分子機構は未だ解明されていない。

23S rRNA のドメイン IV に存在するヘリックス 69(H69)(position 1906-1924)は、進化的に高度に保存された領域である(図 1)。特に 7 塩基で構成されるループの配列は、原核生物の rRNA において、98%以上の保存性を保っている。リボソームの X 線結晶構造解析により、H69 は 50S

と 30S の会合面に位置し、サブユニット間の架橋部位(bridge B2a)の一つであることが判明している。また、翻訳反応の各ステップにおいて、H69 は A/T-site、A-site、P-site における tRNA と直接相互作用することが知られている。更に、EF-G、RF2、RF3、RRF などの種々の翻訳因子と相互作用することも知られ、H69 は翻訳反応の様々な局面においてリボソームの機能に重要な役割を担っていることが示唆されている。本研究では、H69 の保存配列の機能的重要性に着目し、当研究室で開発された新規機能配列選択法 [Systematic Selection of Functional Sequence by Enforced Replacement(SSER)法]を用い、ランダムな配列から H69 の機能配列と必須残基を特定した。また得られた H69 変異リボソームの機能解析により翻訳反応における H69 の役割について検討した。

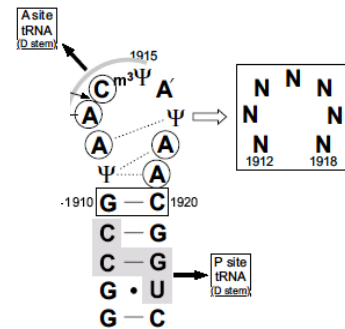


図1. H69の二次構造

A-site tRNAとP-site tRNAとの接触部位がある。
1912-1918の7塩基をランダム(N)にした。

[結果と考察]

SSER 法による H69 の機能配列の決定と表現型の解析

当研究室で開発された SSER 法は、遺伝学的な手法を用い、ある特定の遺伝子領域における機能配列を完全にランダムな配列より選択することを可能とする方法である。ランダムな配列からの選択であるため、他生物由来の配列や進化的に排除された機能配列をも選択することが可能である。SSER 法を rRNA の解析に適用するため、ゲノム上の7つの rRNA オペロン(rrn)をノックアウトした後、rrnB オペロンと sacB 遺伝子を持つプラスミド pRB101 で rRNA を供給した大腸菌株 (NT101) を用いた。そして、pRB101 と同一の複製基点と rrnB を持ち、異なる選択マーカーを有するプラスミド pRB102 をライブラリーの作成に用いて、pRB102 上の H69 のループ配列(1912-1918)に対して PCR を応用した方法で完全にランダムな配列(16,384 通り)に変換したプラスミドライブラリーを作成した。次に NT101 株を、得られたプラスミドライブラリーで形質転換を行った。この時点では pRB101 と pRB102 が一時的に共存する状態になるが、23S rRNA 上の変異は優性致死である場合が多いため、大部分の配列はこの過程で除かれると考えられる。一方で導入された H69 の配列が rRNA として機能するものであれば pRB101 を排除することができる。pRB101 にはショ糖感受性を示す sacB 遺伝子が搭載されており、ショ糖培地で選択することで機能配列を有する pRB102 を効率的に選択することができる。得られた大腸菌株は細胞内の全てのリボソームが H69 変異体で置換されているため、その後のリボソームの機能解析にも都合が良い。

16,384 通りのバリエーションの中から野生株と同じ配列を持ったものを含め 13 種類の機能配列がこの方法によって得られた (Table.1)。A1912 と U1917 は全ての変異体に共通に存在したことから、これらの塩基は他の塩基に置換することができず、リボソームの機能に必要不可欠であ

Variant #	Sequence (1912-1918)	doubling time (min)	RGR (%)
1(WT)	A A C U A U A	50.1 ± 2.6	
2	A A G U A U A	47.3 ± 0.6	106
3	A A C C A U A	45.2 ± 1.3	111
4	A A C A A U A	114.9 ± 0.4	44
5	A A C U C U A	57.1 ± 1.1	88
6	A A C U A U G	54.5 ± 2.3	92
7	A G A U A U A	47.2 ± 2.3	106
8	A A C C C U A	53.8 ± 1.8	93
9	A A C A A U G	81.1 ± 0.2	62
10	A A A C U U A	44.5 ± 1.6	113
11	A A A A C U A	69.8 ± 3.2	72
12	A G A A C U A	73.8 ± 0.9	68
13	A A G C G U G	46.5 ± 2.5	108
consensus	A R V H N U R		
B-scan	A N N H N U R		

Table. 1 SSER法により得られたH69 (1912-1918) の機能配列

ることが示された。1918位は野生型のA以外にGが選択されたが、G1918は真核生物のrRNAに保存されている残基であり、この変異体は生育速度の低下も観測されなかった。このことから、原核生物と真核生物で異なるこの位置の塩基は機能的差異によるものではないことも明らかになった。更に、得られた結果を検証するため、H69ループ配列の各部位における塩基を他の3種類の塩基に置換し、SSER法によって機能選択を行う、Bscan法を行った。その結果、新たに7つの変異体を得た。以上の結果からH69ループ配列の機能配列はANNHNURであることが判明した。進化的な保存性が高いにも関わらず、他の塩基に置換可能である部位と置換不可能である部位が明確となり、H69の機能における残基ごとの重要性を浮き彫りにすることができた。さらにH69ループの配列数の増減や、ステムの長さを短くする変異を試みたが、いずれも変異体を得ることはできなかったことから、H69のループの塩基数とステムの長さは機能に重要であることも判明した。また各変異体の生育速度を測定した(Table.1)ところ、clone.4(U1915A)とclone.9(U1915A, A1918G)は非常に生育速度が遅かったのに対し、clone.6(A1918G)は生育速度の低下が観測されなかった。この結果から、生育速度の低下はA1915に起因すると考えることができる。一方でA1915をもつ別の変異体(clone.11と12)は生育速度が回復していることから、これらの変異体が持つC1914AやA1916Cなどの変異がA1915の変異を相補していると考えられる。

サブユニット間の会合におけるH69変異の影響

生育の阻害は変異リボソームの機能低下によるものと考えられるが、H69はサブユニット間の架橋部位のひとつであることから、clone 9, 11, 12についてサブユニットの会合状態をショ糖密度勾配遠心法(sucrose-density gradient centrifugation)により検討した(図2)。Clone 4については生育が悪く解析は行えなかった。6 mMマグネシウム(Mg)の条件下で、野生株では全体の約70%の50Sが70Sに取り込まれていたが、それぞれの変異体においては野生株と比べると明らかに70Sの割合が低下していた。Mg濃度を変化させたところ、clone 12は高濃度Mgの条件下でサブユニットの会合が顕著に回復したが、clone9では依然60%の50Sが解離した状態であった。この結果からH69の保存配列はリボソームのサブユニットの会合に大きく影響することが明確となった。特に1915位がサブユニットの会合に重要な働きを担っていることも明らかとなった。

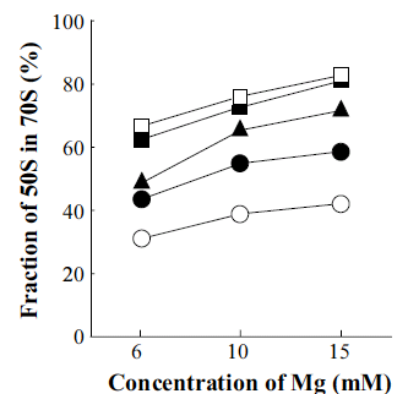


図2 サブユニット間の会合状態

□WT ■ clone13 ▲ clone12 ● clone11 ○ clone9

H69は翻訳の正確性に重要な役割を持つ

H69はtRNAと直接相互作用していることが知られているためH69の変異が翻訳精度にどの程度影響するのかを検証した(図3)。H69変異体に+1フレームシフト、-1フレームシフト、UAGリードスルー、UGAリードスルーの活性を評価するlacZリポーター遺伝子を含むプラスミドをそれぞれ導入し、β-ガラクトシダーゼの発現量からH69変異リボソームの翻訳精度を定量した。その結果、clone 4と9でフレームシフトとリードスルーの顕著な上

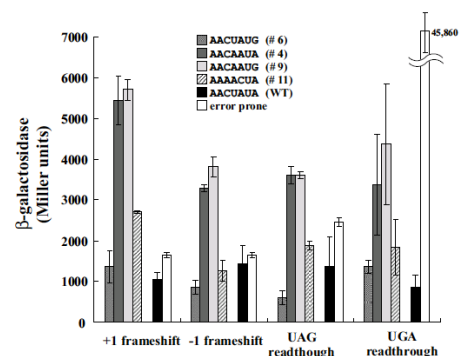


図3 H69変異体の翻訳精度

昇が観測された。Clone 11 では+1 フレームシフト、UGA リードスルーの活性が確認された。それに対して clone.6 では野生株と比べて大きな活性の差は見られなかった。この結果から、A1915 の変異は翻訳の正確性に影響を及ぼすと考えられる。

H69 のタンパク質合成と tRNA の結合に与える影響

次に A1915 の変異を持つ clone.9, 11 について poly(U)-programmed polyphenylalanine syntthesis による翻訳活性を測定した。その結果、それぞれの変異体で野生株に比べて明らかに低い反応速度を示した。また、aa-tRNA の濃度依存的なペプチド合成量の測定では野生株と比べ clone.9 では約3分の1の合成能力しか持たないことが明らかになった。しかし、EF-G の濃度別の測定では野生株と変異体で大きな差が見られなかったことから、この変異体は高い濃度の aa-tRNA を必要とすることが明らかになった。さらに tRNA と変異体リボソームの親和性を non-enzymatic P- and A-site binding により検証した。tRNA の P-site への結合は野生株と変異体で顕著な差は見られなかったが、A-site への結合は著しくそれぞれの変異体で低下していた。このことから H69 は tRNA との結合に影響することが示唆された。

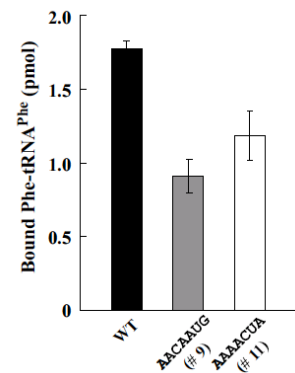


図5 H69変異体のA-siteへの結合

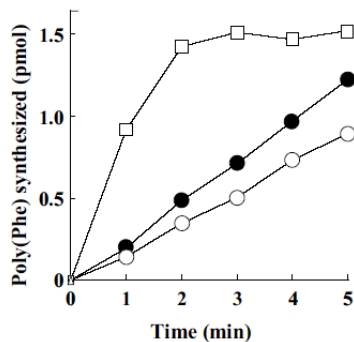


図4 H69変異体翻訳活性 □WT ●clone11 ○clone9

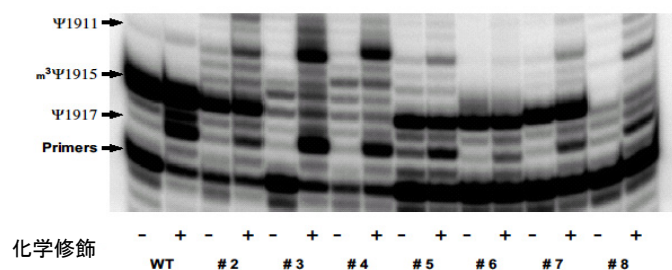


図6 primer extension法による修飾部位の検証

H69 変異体の修飾部位の検証

変異を導入した H69 のループ部位は m³ψ 1915 と ψ 1917 に修飾部位を持つ。大腸菌ではこの部位の修飾酵素遺伝子 *rluD* を持たない株は 50S サブユニットの形成が悪く、生合成に重要であることが知られている。このことから修飾が H69 変異体に存在するかを primer extension 法を用い検証した。その結果、1915 の部位に U を持つ変異体 clone2,5,6,7 で m³ψ もしくは m³U が確認された。そして ψ 特異的な化学修飾を行った変異体に対して検証したところ、保存部位 U1917 はすべての変異体で ψ に修飾されていた。

結論

H69 は種を超えて非常に高く保存された領域であるが SSER 法により機能配列を決定した結果 16,384 通りのバリエーションの中から 13 の機能配列を持つ変異体を得た。A1912 と U1917 はリボソームの機能を維持する上で必要不可欠であり、A1915 の変異を持つ変異体はサブユニットの会合状態が悪く、tRNA の結合や翻訳活性の低下を引き起こし、結果として生育速度や翻訳活性に影響を及ぼすことが明らかになった。このことから H69 はデコーディングにおいて A-site への tRNA の結合を調節することにより翻訳精度のコントロールに重要な役割を担っていると考えられる。