

## 論文内容の要旨

論文題目 転座反応に関与する 23S リボソーム RNA 保存領域の機能解析

氏名 薦田 多恵子

### [序論]

蛋白質合成装置であるリボソームは全ての生物に共通して存在する RNA・蛋白質超分子複合体である。原核生物のリボソームは、沈降係数が 50S と 30S の大小二つのサブユニットから構成されている。50S サブユニットは約 3000 塩基の 23S リボソーム RNA (rRNA)、120 塩基の 5S rRNA、30 種を超える蛋白質で構成され、30S サブユニットは約 1500 塩基の 16S rRNA と、20 種以上の蛋白質から成る。最近の X 線結晶構造解析から rRNA がリボソームの基本的な骨格とタンパク合成における主要な機能を果たしていることが明らかになりつつある。

蛋白質合成過程においてリボソームは、mRNA 上を下流に移動しながら遺伝情報を解読する。新しいペプチド結合をつくるペプチド転移反応後に、リボソームがコドン一つ分(3 塩基分) 3'方向へ移動する転座反応(translocation)が進行する。この反応は伸長因子 EF-G がリボソームの A サイトに結合し、GTP 加水分解のエネルギーを用いることで引き起こされる。A および P サイトに結合していた 2 つの tRNA は mRNA と共に、それぞれ P および E サイトへと移動する。EF-G はリボソームとの相互作用により GTP を加水分解し、コンフォメーションを大きく変化することが知られているが、この構造変化が転座反応の原動力であると考えられている。また、転座反応の際に 30S サブユニットは 50S サブユニットに対して大きく回転し(約 6 度)、歯止め装置様の動き(ratchet-like rotation)をする事が知られている。両サブユニット間の相互作用にはリボソーム RNA の保存領域が関わっていることが知られているが、これらの詳細な役割については不明な点が多く残されている。

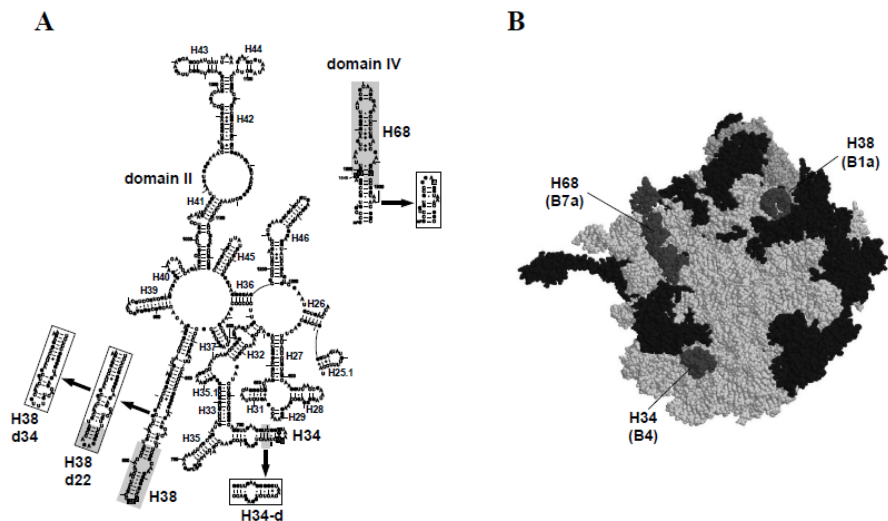
23S rRNA 上に  
あるヘリックス  
38 (H38、[図 1](#))は、  
原核生物、真核生  
物に広く保存さ  
れたヘリックス  
で、クリオ電子顕  
微鏡での解析に  
より、A サイト近  
傍に見られる突  
起状の構造を構  
成していること  
から、A site finger  
(ASF)と呼ばれて  
いる。ASF は翻訳  
の過程全体を通

して、A サイトの tRNA と直接相互作用している。また、30S サブユニットの蛋白質 S13 と相互作用して bridge B1a というサブユニット間の連結部位を構成している。bridge B1a は転座反応時の ratchet-like rotation においてその位置を大きく変え、転座反応後の状態で、ASF は S13 ではなく S19 蛋白質と bridge を形成することが知られている。これまでに、ASF の機能的な役割について解析された例はなく、本研究では翻訳過程における ASF の役割を解明することを目的とした。

[本論]

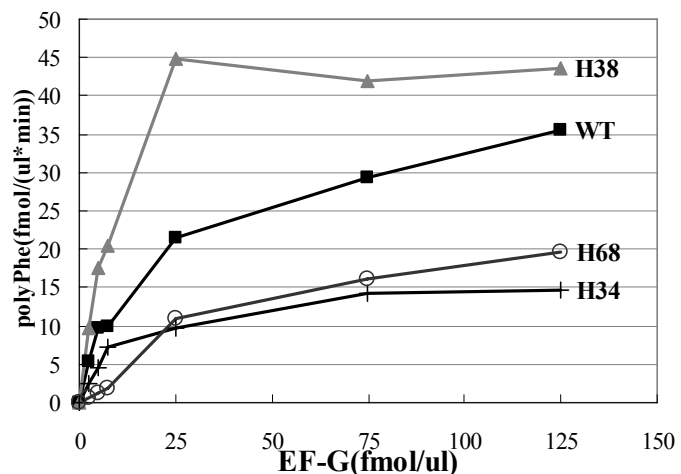
## 1. ASF 短縮化リボソーム

ASF の翻訳過程における役割を明らかにするために、大腸菌を用いて、この ASF の長さを段階的に短縮化した変異型リボソームを構築した。この際に、大腸菌ゲノムにコードされた7つの全リボソーム RNA オペロンを欠失した大腸菌株 NT101 を用いた。NT101 はプラスミド pRB101 にコードされたリボソーム RNA オペロンによって救済されており、このプラスミドを、ASF 短縮化変異を導入した別のプラスミドと入れ替えることで、ASF 短縮化リボソームのみを有する大腸菌株を作成した。ASF 短縮化リボソームを持つ大腸菌株は正常な生育速度を示したが、 $\beta$  ガラクトシダーゼをリポーターとして用いた翻訳精度の測定を行った結果、野生型(WT)と比較して+1 フレームシフトの頻度が上がって



**図 1 A.** 23S rRNA ドメイン II の二次構造。今回作成した短縮化リボソームの配列を四角内に示す。**B.** 大腸菌リボソーム 50S サブユニットの三次構造。濃いグレー、今回短縮化した部位；明るいグレー、23S rRNA；黒、リボソーム蛋白質。

effect of EF-G conc. on translation rate



**図 2** 各種の bridge を短縮化したリボソームを用いたポリウリジン依存ポリフェニルアラニン合成の速度を EF-G 濃度に対してプロットしたもの。

いることが判明した。

ASF は bridge B1a を形成することから、この株から精製した ASF 短縮化リボソームのサブユニット会合能を測定したところ、WT と同等であることがわかり、ASF が形成する bridge B1a はサブユニット間の会合にはさほど重要ではないことが明らかとなった。また、ポリウリジン依存ポリフェ

ニルアラニン合成系を用いて試験管内蛋白質合成活性を測定したところ、予想に反し、低 EF-G 濃度下において WT と比較して高い翻訳活性を有する事が明らかになった(図 2)。この結果とは対照的に、他のサブユニット連結部位である bridge B4 を構成するヘリックス 34 (H34)、bridge B7a を構成するヘリックス 68 (H68)をそれぞれ短縮化した変異型リボソームでは WT に比べサブユニット間会合能が低下し、翻訳活性も低下していた。したがって、ASF 短縮化リボソームの高い翻訳活性はサブユニット間の bridge を欠損させることによって生じた現象ではなく、ASF の構造が失われる事によって引き起こされたと考えられることができる。長さの異なる ASF 短縮化リボソームを作成し翻訳活性の比較を行ったところ、22 塩基短縮した変異型リボソームでの活性が安定して高かったが、34 塩基短縮したリボソームでも同様の結果が観測された。

また、リボソームによる EF-G の GTPase 活性化反応を比較したところ、ASF を短縮化したリボソームでは WT と比較して GTPase の高い活性化が引き起こされることが判明した。この結果は、ASF の短縮によって EF-G が活性化され、低 EF-G 濃度において高い翻訳活性を持つという結果をうまく説明することができる。さらに、ASF 短縮化リボソームを用いて、シングルラウンドの転座反応の解析を行ったところ、ASF 短縮化リボソームは、WT より高い転座反応活性を持つ事が示された(図 3)。

以上の結果から、リボソームが本来有している転座反応の能力は通常 WT において観察されるよりも速く、ASF は、転座反応を負に制御する働きを担うことを示唆している。ASF は転座反応をコントロールすることによって結果的に +1 フレームシフトを抑え、翻訳精度が維持されていると考えられることができる。

## 2. h33 欠損リボソーム

30S サブユニットのヘリックス 33(h33, 30S は小文字 h を用いる)は立体構造上で nose (あるいは beak)と呼ばれる部分を構成している(図 4)。NT101 株を用いた当研究室のこれまでの研究で、h33 を欠損してもリボソームの活性は保たれていることが知られていた。クリオ電子顕

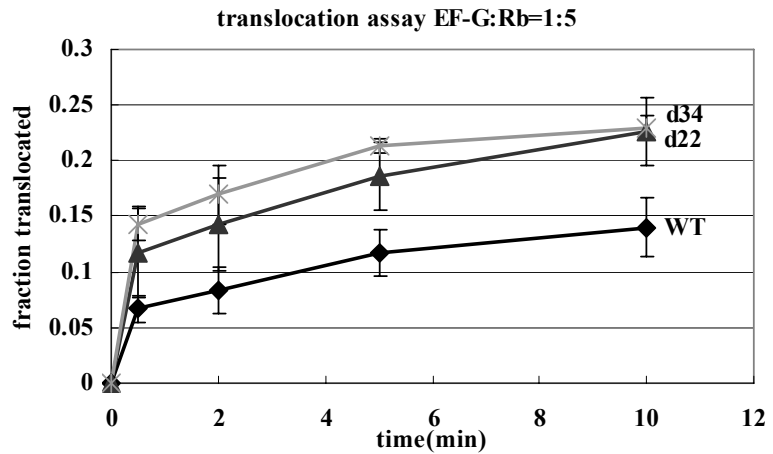


図 3 EF-G:リボソーム=1:5 におけるシングルラウンドの転座反応の経時変化。

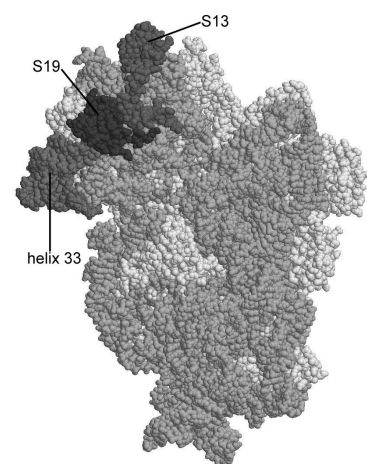


図 4 大腸菌 30S サブユニットの三次構造。欠損したヘリックス 33 と、bridge B1a を構成する蛋白質 S13、S19 を示す。

微鏡を用い、h33 を欠損させたり  
 リボソームの立体構造を解析した  
 [Dr. R. Agrawal (New York State  
 University, Department of Health)と  
 の共同研究]ところ、h33 の欠損に  
 より、30S サブユニットの head 部  
 分が後退し、ASF との相互作用部  
 位である bridge B1a が外れている  
 ことが判明した。そこで、h33 欠  
 損リボソームの翻訳活性を調べ  
 たところ、ASF 短縮化リボソーム  
 と、同様に翻訳活性の上昇が観測  
 された(図 5)。この結果は、ASF  
 短縮化リボソームの解析から示  
 された bridge B1a の翻訳における役割を、より明確にするものであると考えている。

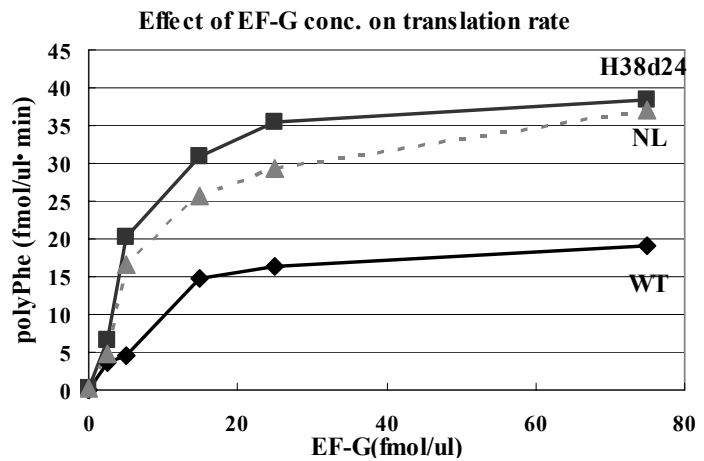


図5 EF-G濃度に対するポリウリジン依存ポリフェニ  
 ルアラニン合成速度。h33 欠損リボソームでは、H38  
 短縮化リボソームと同様の傾向が見られた。

### 【結論】

以上の解析から、翻訳過程における ASF の役割は、転座反応の進行を負に制御する  
 ための減衰器(attenuator)である事が明らかとなった。転座反応を制御することにより、  
 フレームシフトを抑制し結果的に翻訳精度の維持に寄与していると考えられる。また、  
 h33 欠損リボソームの解析から、ASF が形成する bridge B1a が転座反応の制御  
 に特に重要であることが判明した。リボソームが本来持っている転座反応の活性は通常  
 WT において観察されるよりも速く、ASF(と bridge B1a)は、生体内において正しい  
 読み枠を維持し、翻訳精度を保つために獲得した機能ドメインであると考えられる。