

## 論文の内容の要旨

論文題目 系統的挿入変異による rRNA の機能解析とリボソームの人工翻訳制御

氏名 横山 武司

リボソームは、RNA とタンパク質からなる超分子複合体であり、メッセンジャーRNA(mRNA) にコードされた遺伝情報を、タンパク質を構成するアミノ酸の配列へと変換する、タンパク質合成装置としての役割を担っている。原核生物リボソームに関しては、X線結晶構造解析によって、原始レベルでの精密な立体構造が解かれ、リボソームの構造機能相関の研究が大きく進展している。リボソームの構造解析がもたらした最も特筆すべき成果は、リボソームの中心骨格が、RNA 成分によって占められているという事実である。遺伝情報の解読とペプチド転移反応を含むリボソームが担う翻訳過程の重要な素過程は、この RNA コア領域を中心に、全体の構造をダイナミックに変化させ、分子機構を巧みに調節し実現されていることから、リボソームは構造的かつ機能発現においても RNA を中心としたマシナリーであると言える。

原核生物におけるリボソーム RNA(rRNAs)の二次構造は、進化的に非常に高度に保存されていることが知られている。このことは、リボソームが担うタンパク合成の素過程がすべての生物において共通の原理で触媒されていることを意味している。真核生物における rRNA では、コア領域の幾つかの特定の部位で、RNA の伸長や挿入が観察されて、これらは **Expansion segment (ES)**と呼ばれている。これらの ES は真核生物 rRNA が原核生物型 rRNA から進化する過程において挿入変異を繰り返して獲得したものと考えられる。このように、現在までの所、系統学的な rRNA の二次構造の比較から、ES と rRNA コア領域の構造上の関係性について推測する事は可能であった。しかしながら、実際に原核生物の rRNA が挿入変異に対して、どの程度の寛容性を示すのかを、実験的に検証する研究はほとんどなされていなかった。そこで、私は本研究において、大腸菌 rRNA を題材に、系統的に挿入変異を導入し、生体内で機能するリボソームを選択する手法を開発し、真核生物 rRNA における ES 獲得の実験的な検証と *in vivo*でのリボソームの機能解析を試みた。

本研究で新たに開発した手法ではTn5トランスポゾンを用いて、rRNA遺伝子上のランダムな部位にヘリックス構造を有する短いRNA断片を導入する。この結果得られたランダムな挿入変異を有するライブラリーから、機能するrRNAのみを、ゲノム上の全rRNAオペロンを欠失した株によって選択するシステムである。この手法は、完全にランダムな挿入変異を有するライブラリーからの選択のため、研究者の恣意を排除し、完全に中立的に機能性挿入変異を取得することができる。また、選択された大腸菌のクローンは、挿入断片有するrRNAのみで生存している事になる為、生育速度や翻訳精度の測定などにより、挿入変異リボソームの活性及び機能を細胞内で

評価する事が出来る。

その結果、16S rRNA上に16箇所、23S rRNA上に35箇所、計51箇所の挿入変異部位を明らかにした。これだけ、多くの部位に挿入変異導入が可能である事は、全くの予想外の結果であった。同時に、大腸菌rRNAは挿入変異に対して寛容であることが判明した。また、これらの変異体について生育速度を測定したところ、一部のクローンを除いて、大半のものは野生型に対してほとんど遜色のない生長速度を示した。したがって、挿入変異を有したリボソームは、リボソームの機能をほぼ完全に保持している一方で、それ以外の部位に挿入断片が飛び込んだ変異体は、リボソームの機能を完全に失った事を示唆している。遺伝子間領域に高頻度に見出された挿入変異の見積りから、ランダムな挿入変異を有するプラスミドライブラリーには約5塩基に一箇所の挿入変異を有していたことが予測されることから、本研究で得られた変異体は網羅性の高い機能選択によって取得されたものであると考えることができる。生育速度の悪い変異体については、ショ糖密度勾配遠心分離法を用いて、リボソームのプロファイルを測定した所、サブユニット間のアソシエーション効率の低下が確認された。

次に、rRNA 上において実際に挿入変異が得られた箇所の解析を行った。大腸菌リボソームの3次元構造上に、挿入可能部位を表示したところ、それらはリボソームの外面部および辺隣部に存在し、さらにリボソームタンパク質を避けるように位置することが判明した。また、真核生物の代表例として酵母 rRNA の二次構造上に挿入変異部位を表示したところ、ES が存在する部位と非常に良い相関関係が見られる事が判明した。特に、この特徴は小サブユニット rRNA(16S と 18S)で顕著にみられ、長い ES が存在する部位には、挿入変異可能部位が密集する傾向があることも明らかとなった。この事実は、リボソームは本質的な機能を維持しつつ、rRNA が潜在的に保持している挿入変異に寛容な箇所を中心に RNA 断片の挿入を繰り返す事で、進化の過程で ES を獲得し、リボソームが原核生物タイプから、真核生物タイプへと変化していった事を示唆している。現在までの所、ES の機能について詳しくわかっていないが、真核生物特有の翻訳制御機構に関わっている可能性が高いと考えられる。本研究では、進化の過程で生じたと考えられる原核生物型から真核生物型への rRNA アーキテクチャーの変化を大腸菌を用いたモデル実験により、実験的に検証した初めての例である。

後半では、rRNA に対する系統的な挿入変異の研究成果を元に、その応用研究として、高機能化リボソームの開発を行った。これまで、試験管内人工進化法によって特定のリガンドに結合する RNA アプタマー配列が多数報告されている。これらの人工的に取得された RNA アプタマーを mRNA の上流に導入する事で、人工的にリボスイッチを創生したり、アプタマーをリボザイムと連結し、リガンド結合依存的に、リボザイムの活性を制御する研究なども行われている。そこで我々は、細胞内で、巨大なリボザイムであるリボソームの活性を、リガンド結合依存的に制御する、全く新しい概念に基づく人工翻訳制御系の開発を目指した。具体的には、アルカロイドの一種であるテオフィリンに結合するアプタマーを 16S rRNA に導入し、大腸菌の細胞外からテオフィリンを添加する事で、細胞内のリボソームを人工的に制御する試みである。

まず、挿入変異が可能な部位の内、16S rRNA のヘリックス 26 の先端を選び、テオフィリン

アダマーを導入した。次に、このリボソームを内在の翻訳系と直交化させるために、アンチSD配列を改変し、ゲノム由来の遺伝子を翻訳しないようにした。レポーターとして、改変したアンチSD配列に相補的に結合するSD配列を有する、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子を用いた。このシステムを利用する事で、細胞溶解液を用いたクロラムフェニコールのアセチル化効率の測定や、大腸菌のクロラムフェニコール耐性を指標として、導入されたリボソームの活性をモニタリングする事が出来る。テオフィリンを培地に添加し大腸菌を培養し、菌体の溶解液を用いてCATアッセイを行った。クロラムフェニコールのアセチル化効率がテオフィリンの添加濃度依存的に上昇する現象が観察された。

では、実際にリボソームに導入されたアダマーは、テオフィリン結合能を有しているのだろうか？そこで、生化学的な手法を用いてアダマードメインの構造解析を行った。まず、大腸菌株NT101を利用して、均一なアロステリックリボソームを精製した。テオフィリン存在、非存在下、カフェイン存在下でIn-lineプロービング(高濃度Mg<sup>2+</sup>イオン存在下においてRNAを加水分解する手法)を行い、切断パターンをプライマー伸長法で観察したところ、テオフィリン非存在下では、アダマードメインの著しい切断が見られたものの、テオフィリン存在下では、テオフィリン濃度依存的に切断されなくなっていく様子が観測できた。カフェイン存在下では、濃度に関係なく、アダマードメインが切断されていた。この事は、つまり、テオフィリンがアダマードメインに結合し、構造変化を引き起こす事で、濃度依存的にRNAの切断を防いでいる事を示している。以上の結果により、リガンド結合によるアダマードメインの構造変化が、リボソームの翻訳活性を制御している事が証明された。

翻訳過程は4つの連続したステップによって成り立っており(開始過程、伸長過程、終止過程、リボソーム再生過程)、それぞれの段階は多くのタンパク質因子によって精密に制御されている。そこで、アダマーの構造変化が、果たしてどの段階を制御しているのかを解明する事に焦点をあてて研究を進めた。まず、テオフィリン存在下、非存在下で大腸菌を培養し、得られた菌体の溶解液をショ糖密度勾配遠心分離法(SDG)にて分画し、ポリソーム画分、70S画分、30S画分、最も軽いフリーの画分に分離した。続いて、それぞれの画分からRNAを抽出し、CAT mRNAを特異的に検出するプライマーを用いて、定量的逆転写PCR法を用いてCAT mRNA量を測定した。この実験の結果、テオフィリン存在下において、70S画分と、ポリソーム画分で、CAT mRNA量の特異的な上昇が観察された。一方、30S画分ではCAT mRNAの量がむしろ減少する現象が観測された。以上の結果を元に、私は、アロステリックリボソームは、30S開始複合体の形成後に、70S開始複合体への形成過程を制御していると考えている。さらに、近年幾つかのグループによる構造解析によって、翻訳の開始過程で、SD-アンチSDの相補的結合によって形成されるSDヘリックスが、16S rRNAのヘリックス26と直接相互作用している事が明らかにされた。SDヘリックスは、開始過程においてヘリックス26に触れながら、リロケーションし70S開始複合体を形成する事が示唆されており、私が考える翻訳制御のモデルと一致している。現在は、SDヘリックスの改変による、翻訳制御活性の変化を解明する事で、より詳細な分子機構を明らかにしようとしている。