

論文の内容の要旨

論文題目

Identification and functional analyses of ribosomal RNA-modifying enzymes in *E. coli* (大腸菌における新規リボソーム RNA 修飾遺伝子の同定と機能解析)

氏名 木村 聡

I. 研究の背景と目的

リボソームは mRNA 上の遺伝情報を解読しタンパク質を合成する翻訳装置である。リボソームはリボソーム RNA (rRNA) とタンパク質からなる超分子複合体である。近年の X線結晶構造解析や生化学的な解析からリボソームの構造および基本的な機能が明らかにされつつあるが、その生合成過程および高い翻訳精度を維持する機構には未解明な部分が多く存在する。私は本研究において大腸菌 rRNA の転写後修飾に着目し、リボソームの生合成や翻訳精度における役割を探求した。

すべての生物ドメインにおいて rRNA は転写後にメチル化やシュードウリジル化に代表される様々な転写後修飾 (rRNA 修飾) を受けている。これらはリボソームの機能に重要な部位に集中して存在していることから、rRNA 修飾はリボソームの機能の微調整をおこなっていると考えられている。しかし、多くの rRNA 修飾の機能及び生合成は未解明である。そこで私は本研究で大腸菌における rRNA 修飾の生合成遺伝子を同定し、rRNA 修飾の機能を明らかにすることを目的とした。

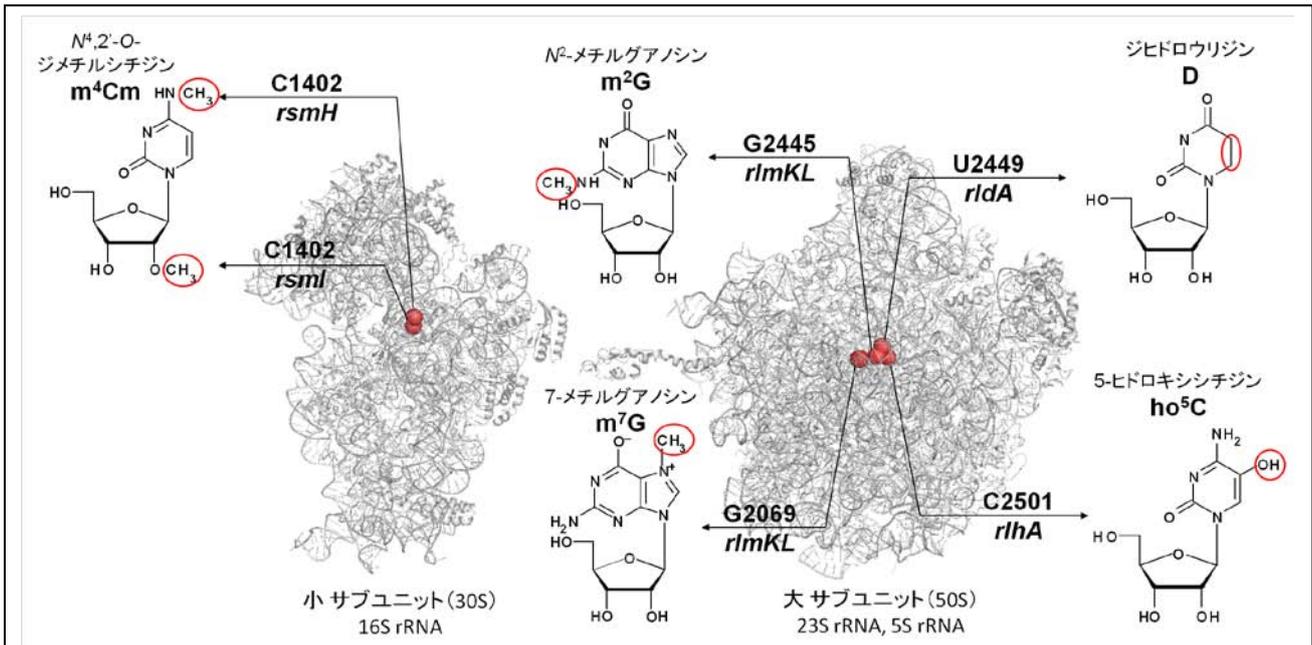


図1 本研究で同定した新規 rRNA 修飾遺伝子および、修飾塩基の化学構造。

II. リボヌクレオーム解析による修飾遺伝子の同定

rRNA 修飾遺伝子を同定するために、逆遺伝学的手法と液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS) による修飾塩基の解析系を組み合わせた方法であるリボヌクレオーム解析を駆使し、大腸菌における rRNA 修飾遺伝子を探索した。その結果、図1に示した5つの新規 rRNA 修飾遺伝子を同定した。

III. 23S rRNA の H74 に存在する 2つのメチル化修飾を行う酵素 RlmKL の機能解析

大腸菌 23S rRNA のペプチジル転移反応活性中心の近傍に存在するヘリックス 74 (H74) の 2069 位および 2445 位には 2つの修飾塩基 7-メチルグアノシン (m^7G2069), N^2 -メチルグアノシン (m^2G2445) が存在する。 m^2G2445 のメチル化酵素 RlmL として YcbY が同定されていたが、私は *ycbY* が m^7G2069 のメチル化酵素 RlmK の機能も担っていることを突き止め、*rlmKL* と命名した。ひとつのタンパク質が異なる二種類の修飾形成をになっている例は *rlmKL* が初めてであったため、詳細な機能解析を行った。

(1) RlmKL は二つのメチル化酵素ドメインから構成される融合タンパク質である

NCBI の Cluster of orthologous groups (COG) によると RlmKL は二つのメチル化酵素がつながってできた融合タンパク質であることが推測された。そこで *rlmKL* 欠損株への RlmKL 変異体の相補実験を行ったところ、RlmKL に存在する二つのメチル化酵素ドメインのうち、N 末側ドメイン(NTD) が m^2G2445 の、C 末側ドメイン(CTD)が m^7G2069 の修飾反応を担っていることをつきとめた。そこで NTD を RlmL, CTD を RlmK と定義した。

(2) m^2G2445 の形成において RlmK (CTD)は RlmL (NTD)と協調的に機能する

In vitro における RlmKL, RlmL (NTD), RlmK (CTD)それぞれの m^2G2445 , m^7G2069 修飾反応の活性を比較したところ RlmKL は RlmL (NTD)と比べて m^2G2445 形成の触媒活性が高いことが判明した。さらに RlmL (NTD)による m^2G2445 形成能は、RlmK (CTD)を添加することで向上することがわかり、RlmL (NTD)の 8 倍量の RlmK (CTD)を添加すると RlmKL と同等の活性が得られた。一方、 m^7G2069 の形成能に関しては、RlmKL と RlmK (CTD)で有意な差が観測されなかった。この結果は RlmL (NTD)が RlmK (CTD)と協調的に機能することで m^2G2445 の形成を触媒していることを示している。

(3) RlmKL は Unwinding 活性を有する

RlmL の基質認識機構を検討した結果、RlmL は H74 のほどけた構造を好んで認識することが示唆された。RlmK (CTD)は m^2G2445 の形成において協調的に働くことを考え合わせると、RlmK (CTD)が H74 の二本鎖構造をほどくことで RlmL (NTD)にとって好ましい基質を与えている可能性が考えられた。そこで実際に RlmKL が H74 の二本鎖構造をほどく活性が見られるかを検討したところ、RlmKL の添加により H74 がほどかれる速度が促進されることが判明した。この結果は RlmKL が H74 をほどくことにより、RlmL (NTD)にとって好ましい基質を生じているという仮説を強く支持している。

(4) *rlmKL* は 50S サブユニットのアッセンブリーに寄与している

rlmKL とシンセティックな生育阻害を示すような遺伝子を探索したところ、リボソームの生合成に関与する RNA ヘリケース *deaD* の欠損株において *rlmKL* との二重欠損によるシンセティックな生育阻害が観測された。さらにショ糖密度勾配超遠心法によりリボソームサブユニットのプロファイルを観測した結果、*rlmKL*, *deaD* の二重欠損株では 50S サブユニットの定常状態量の減少、およびアッセンブリー中間体とみられるフラクションの蓄積が見られた。この結果は、*rlmKL* が *deaD* と協調的に効率的なりボソームのアッセンブリーに寄与していることを示している。

(5) まとめ

以上の結果から考えられる RlmKL のメチル化反応機構のモデルを以下に示す (図 2)。(i) RlmK (CTD)が 23S rRNA に結合し m^7G2069 を形成する。この際に H74 の二次構造をほどき RlmL にとって望ましい基質が形成される。(ii) RlmL (NTD)が m^2G2445 を導入する。(iii) RlmKL が離れる。(iv) H74 が再び形成される。RlmKL がアッセンブリー因子である *DeaD* と協調的に働いていることを考え併せると、このような基質の構造を変化させメチル化反応を行うことはリボソームのアッセンブリーにおいて重要な役割を果たしているのではないかと推察される。

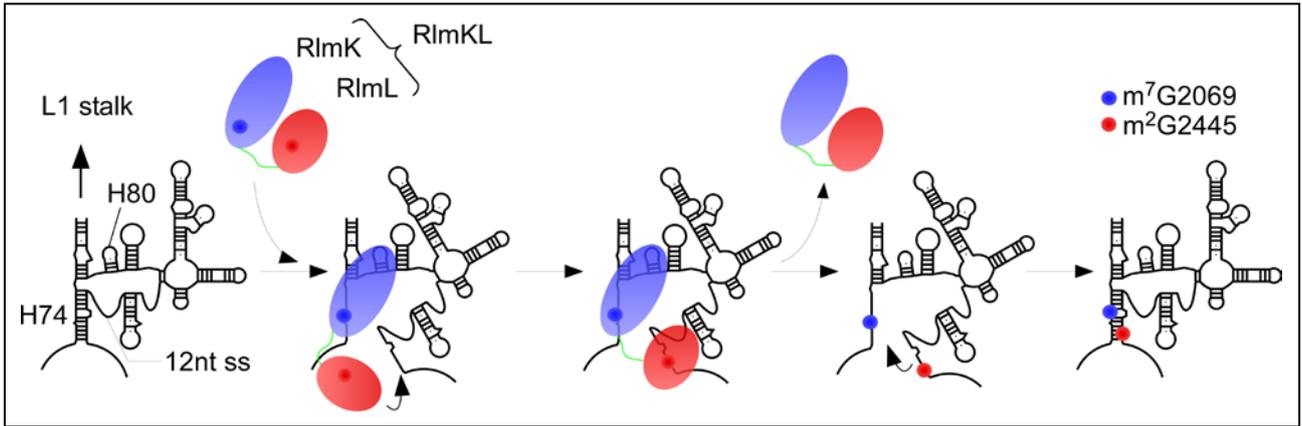


図 2 RlmKL のメチル化反応機構の模式図

IV. $m^4Cm1402$ の修飾遺伝子 *rsmH*, *rsmI* の同定および機能解析

16S rRNA の P 部位における mRNA 結合部位には二つのメチル基がシチジンに付加された $N^4, 2'-O$ -ジメチルシチジンが存在する ($m^4Cm1402$)。リボヌクレオーム解析により $m^4Cm1402$ の形成を担う遺伝子として私は *mraW*, *yraL* を同定した。修飾ヌクレオシドの解析から *mraW* が N^4 位のメチル化を、*yraL* がリボースの $2'-O$ 位のメチル化を担っていることが明らかとなり、*mraW* を *rsmH*, *yraL* を *rsmI* と命名した。

(1) $m^4Cm1402$ の修飾は P-site の機能の微調節を行っている

$m^4Cm1402$ は P-site における mRNA の結合部位に存在している。そこで $m^4Cm1402$ の修飾がこれら P-site の機能に影響を与えるかを調べるために、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーター系を構築し、non-AUG コドンからの翻訳開始効率、フレームシフト効率、および終止コドンの読み飛ばしの効率の測定を行った。その結果、*rsmI* の欠損株においてフレームシフト効率および終止コドンの読み飛ばしの増加、*rsmH* の欠損株において AUU コドンでの翻訳開始の上昇を観測した(図 3)。以上の結果は $m^4Cm1402$ が P-site の機能の微調節に寄与していることを示している。

図 3.ルシフェラーゼを用いたレポーター系による開始コドン選別精度、翻訳精度の測定。それぞれ Wild-type の値によって標準化を行った。

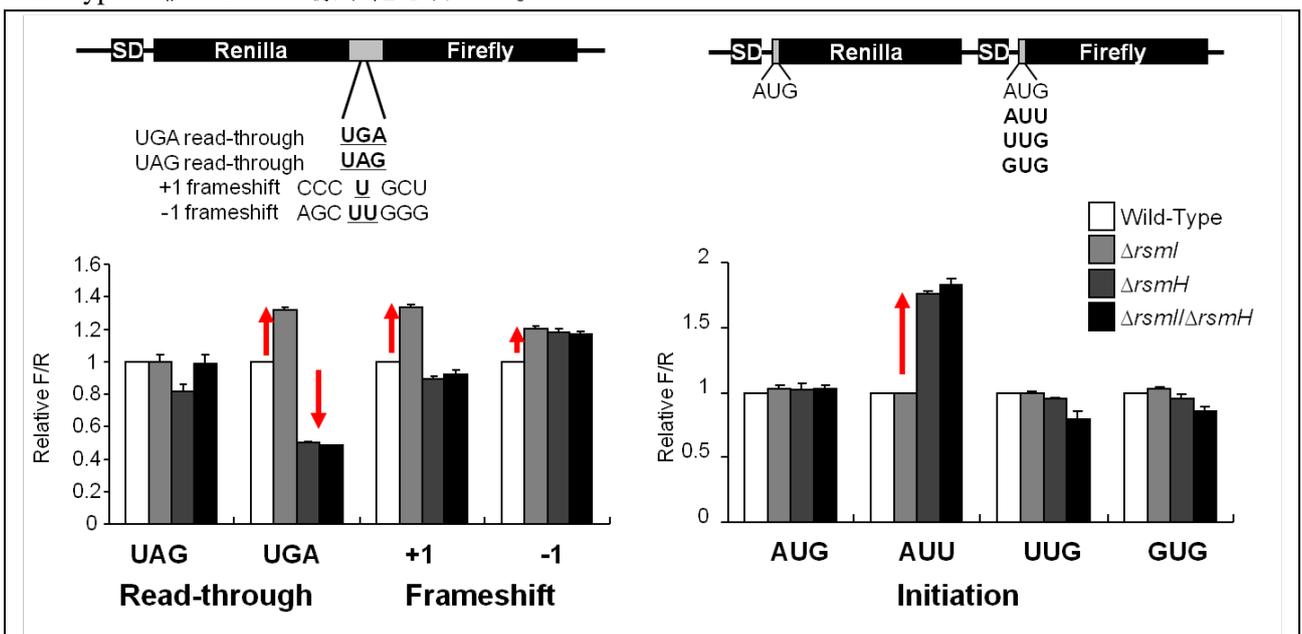


図 3 ルシフェラーゼを用いたレポーター系による翻訳精度および翻訳開始精度の測定

(2) P-site の 4 つの修飾の欠損は深刻な増殖阻害を引き起こす

rsmH, *rsmI* の欠損株では比較的穏やかな生育阻害のみ観測されていた。そこで $m^4Cm1402$ と synthetic な増殖阻害が見られる遺伝子を探索したところ、30S リボソームの立体構造上近傍に存在する二つの修飾塩基 m^2G966 , m^5C967 の形成を担う遺伝子 *rsmD*, *rsmB* を見出した。これらと *rsmH*, *rsmI* を同時に欠損させた四重欠損株において、増殖速度の顕著な減少が観察された。さらにこの株にそれぞれの遺伝子を単独で相補するといずれの場合でも増殖の回復が観測された。この結果は 4 つの P-site の rRNA 修飾が細胞の増殖において冗長的に機能していることを示している。

V 結論

本研究では、(i) 大腸菌において新規の rRNA 修飾遺伝子を 5 つ同定した。そのうち RlmKL, RsmH, RsmI において詳細な機能解析を行い (ii) RlmKL は rRNA の構造変化を引き起こして協調的にメチル化を行いリボソームの効率的なアッセムブリーに寄与していること、(iii) RsmH, RsmI は翻訳開始反応の精度維持に寄与していること、を明らかとした。以上を総じて、本研究は rRNA 修飾の生合成と機能の一端を明らかとし、リボソームの生合成および翻訳能を調節する機構の理解に大きく貢献した。