

審査の結果の要旨

氏名 木村 聡

↑

本研究は、大腸菌における rRNA の転写後修飾を担う遺伝子の同定およびその機能の解明をおこなったものであり、本研究を通じて得られた知見に基づき、生物がリボソームの生合成および機能をどのように最適化しているかについての原理を探求したものである。

これまで、リボソームの機能と構造を主に担っている rRNA には多くの転写後修飾が導入されていることが明らかとなっていた。そしてこれらの rRNA 修飾はリボソームの機能部位に集中していることからその機能の微調整を行っていることが示唆されている。大腸菌においていくつかの修飾に関しては解析が進められ、それらが翻訳精度の維持やリボソームの効率的な生合成、抗生物質に対する耐性の獲得などに寄与していることが明らかとなってきた。しかし、多くの修飾においてその正確な機能は把握されていないのが現状であった。その主な要因の一つとして個々の rRNA 修飾を導入する酵素を担う遺伝子

(rRNA 修飾遺伝子) が同定されていなかったことが挙げられる。本研究を始めた当初は大腸菌における rRNA 修飾遺伝子は 34 種類のうち約半分が未同定であった。これらの酵素遺伝子を同定し、その遺伝子を欠損した株の表現型を解析することおよび、その遺伝子がコードする rRNA 修飾酵素の特性を解析することは、rRNA 修飾の機能を明らかにするうえで必須である。そこで、提出者は大腸菌における rRNA 修飾遺伝子の網羅的探索を行うことで rRNA 修飾遺伝子を同定し、同定した遺伝子がコードする酵素タンパク質の機能解析および、その遺伝子を欠損させた株の表現型の解析を行うことで、大腸菌における rRNA 修飾の機能およびその意義を探求した。

本論第一章で、提出者は RNA の質量分析法と逆遺伝学的な遺伝子同定法を組み合わせたゲノムワイドな rRNA 修飾遺伝子探索法を確立し、大腸菌のすべての遺伝子のうち約 40% にあたる 2000 遺伝子分の解析を行った。その結果 5 つの新規 rRNA 修飾遺伝子を同定することに成功した。そこで提出者は以下において新しく同定した rRNA 修飾遺伝子の機能解析を行った。

本論第二章で、提出者は二種類のメチル化修飾を異なる位置に導入する新しいタイプのメチル化酵素 RlmKL の機能解析を行った。解析の結果、RlmKL は二つの別々の修飾反応を担うメチル化酵素 RlmK, RlmL が融合してできたタンパク質であり、RlmK が融合することにより RlmL の修飾形成活性が促進されることを見出した。さらに RlmKL が基質 RNA の二本鎖構造を一本鎖にほどく RNA ヘリケースのような働きをすることにより協調的な修飾形成を行っていることが示唆された。また遺伝学的解析より、RlmKL は生体内におい

て DeaD という DEAD-box RNA ヘリケースとともにリボソーム大サブユニットの組みあがりを促進しており、その活性にはメチル化の形成は必要ではないことが示唆された。以上の結果は RlmKL が基質 rRNA の二次構造に作用し、RNA ヘリケースのように二本鎖 RNA をほどくことによりリボソーム大サブユニットの組みあがりに貢献していることを示唆している。これまでに rRNA 修飾を担う酵素が RNA ヘリケースのような活性を有しているという知見は報告されていないことから、提出者の結果は rRNA 修飾酵素の作用メカニズムの新たな可能性を示した点で意義深いと考えられる。

本論第三章で提出者はリボソームのペプチジル tRNA 結合部位 (P-site) に存在する修飾塩基 $N^4,2'-O$ -ジメチルシチジン ($m^4Cm1402$) の機能について解析した。この修飾塩基には二つのメチル基が付加されているが、提出者は MraW (RsmH), YraL (RsmI) という二つのメチル化酵素がそれぞれ N^4 位のメチル化と $2'-O$ 位のメチル化を担っていることを明らかとした。さらに提出者は翻訳精度および翻訳開始精度を評価するルシフェラーゼを用いたレポーター系を構築し、 $m^4Cm1402$ のそれぞれの修飾欠損が翻訳精度および翻訳開始精度を調節していることを明らかにした。さらに P-site はメチル化修飾が集中している箇所であるが、提出者は P-site の 4 つのメチル化修飾 $m^4Cm1402$, m^2G966 , m^5C967 の形成を担う遺伝子 *rsmH*, *rsmI*, *rsmD*, *rsmB* を同時に欠損させると増殖速度が著しく低下することを見出した。この結果は P-site における複数の rRNA 修飾が冗長的に働くことにより、リボソームの正確な機能を担保していることを示唆している。

以上の解析結果により提出者は rRNA 修飾の二つの機能的側面を示した。すなわち、rRNA に導入された修飾がリボソームの機能の調節に寄与している面、および rRNA 修飾を導入する修飾酵素それ自体が組みあがり途中の rRNA に作用することにより効率的なリボソームの生合成に寄与する面の二つである。この事実から提出者は生物が塩基に導入されたメチル基などの修飾官能基、もしくは修飾酵素それ自体をその用途に応じて用いるように進化してきたのではないかと推察し、結論としている。

以上の研究成果は、論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。