

博士論文（要約）

The functional analysis of rRNA acetylation regulating  
eukaryotic ribosome biogenesis

（真核生物のリボソーム生合成を制御する  
rRNA アセチル化修飾の機能解析）

指導教官 鈴木勉 教授

東京大学大学院工学系研究科

化学生命工学専攻

鈴木研究室

37-117166 伊藤 理

## 【背景】

リボソームは、リボソーム RNA (rRNA) とリボソームタンパク質からなる超分子複合体であり、コドン解読を担う小サブユニット (SSU) と、ペプチド合成を担う大サブユニット (LSU) とが会合して機能する。リボソームの生合成は厳密に制御されており、rRNA の転写に始まり、rRNA プロセッシングや、リボソームタンパク質との会合などが協調して進行する。また真核生物では、核小体から細胞質への局在を移行させる。生合成には RNA ヘリケース、ATP 加水分解酵素、RNA 修飾酵素等の非リボソームタンパク質や、核小体低分子 RNA (snoRNA) といった多くの生合成因子が関与する。そのため、多くのエネルギー消費を必要とする過程である。

中でも rRNA の成熟 (プロセッシング) は複雑である。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の場合、40S SSU の活性中心を担う 18S rRNA (図 1) と、60S LSU の rRNA が、スペーサー領域を介して連結してコードされている。これらがまず 35S rRNA 前駆体 (pre-rRNA) として転写さ

れ、成熟 rRNA へとプロセスされる (図 2)。プロセッシングでは様々な転写後修飾が導入されるが、真核生物ではリボース環のメチル化 (2'-O-メチル化) とウリジンの異性化 (シュードウリジン化) が大半を占める。これらは共通の修飾酵素とそれぞれの修飾部位を認識する snoRNA によって導入されている。また snoRNA を介さない塩基修飾も存在する。rRNA 修飾はリボソームの機能に重要な領域に集中し、リボソームの生合成や翻訳に寄与していることが示唆されている。

出芽酵母においても、未報告の修飾は存在する。その 1 つ  $N^4$ -acetylcytidine ( $ac^4C$ ) が、出芽酵母の 18S rRNA の 3' 末端近傍に存在することが、当研究室の先行研究により見出されていた (図 1)。この修飾は、真核生物の 18S rRNA 中の存在は報告されていたが、機能や生合成については解析されてこなかった。本研究では  $ac^4C$  を解析し、rRNA 修飾が制御する生命現象の理解への貢献を目標とした。

## 【結果】

### 1. 18S rRNA 中の $ac^4C$ 修飾の検出

本研究では RNA 修飾の検出に LC/MS を用いた。出芽酵母の 18S rRNA を、G 特異的に切断する RNaseT1 で断片化して LC/MS で解析したところ、1769-1774 位を含む RNA 断片 UUUC $ac^4C$ Gp を検出した (図 3)。さらに MS/MS 解析から、修飾位置

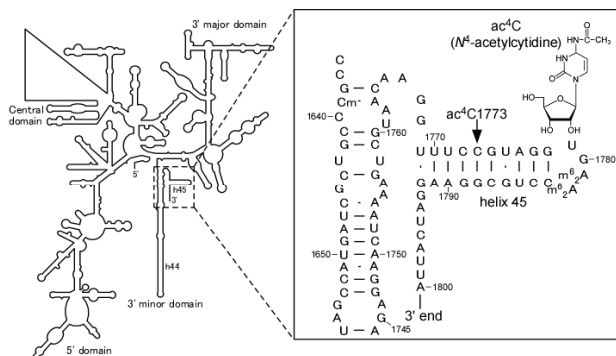


図 1 出芽酵母の 18S rRNA の二次構造

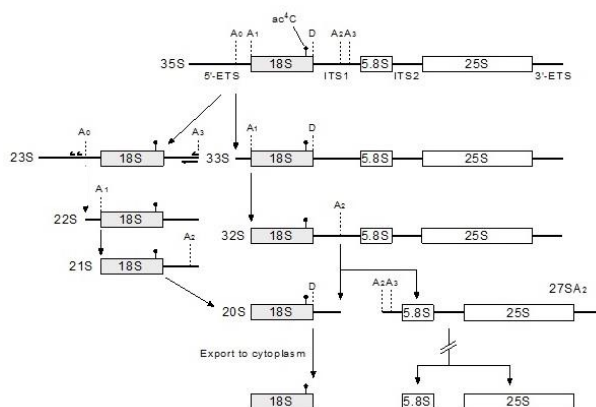


図 2 出芽酵母の rRNA プロセッシング

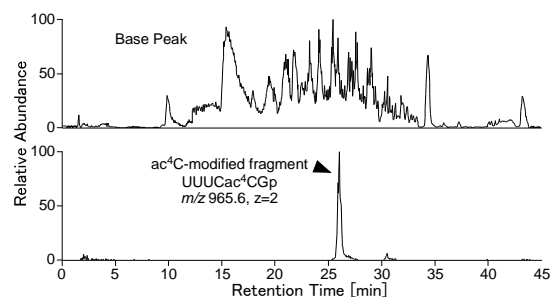


図 3 18S rRNA における  $ac^4C$  修飾の検出

が 1773 位の C であることを確認した。

## 2. *in vitro* 修飾再構成

当研究室の先行研究で、 $ac^4C$  修飾酵素の候補遺伝子 *RRA1*(ribosomal RNA cytidine acetyltransferase)が同定されていた。そこで、*Rra1p* の組換えタンパク質と、1773 位を含む転写 RNA 断片を用いて *in vitro* にて修飾再構成を試みた。アセチル CoA と ATP の存在下で反応させたところ、 $ac^4C$  修飾を検出できた (図 4)。タンパク質を基質とするアセチル化酵素と異なり、*Rra1p* は修飾形成に ATP も必要とするという特徴を持つことも判明した。

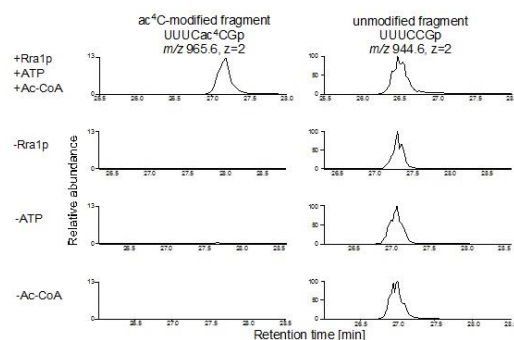


図 4 *Rra1p* による *in vitro*  $ac^4C$  修飾再構成

## 3. *Rra1p* の機能ドメインの解析

*Rra1p* は RNA ヘリケースとアセチルトランスフェラーズの 2 つのドメインを持つ。前者は ATP 加水分解エネルギーを用い、後者はアセチル CoA を基質として用いる。*RRA1* は必須遺伝子であるため温度感受性株 *rri1<sup>ts</sup>* を用い、保存性の高い残基を変異させた *RRA1* をプラスミドにて導入し、非許容条件下での相補性を評価した。いずれの変異体も *rri1<sup>ts</sup>* を相補できなかった (図 5 下) ため、両ドメインは生存に必要であることが判明した。

## 4. rRNA プロセッシングにおける *Rra1p* の機能解析

*Rra1p* がリボソーム生合成にどのように関与しているかを調べた。*rri1<sup>ts</sup>* にて *Rra1p* を枯渇させ、rRNA 前駆体をノザンブロッティングにより検出した結果、誘導直後から 18S rRNA の前駆体 23S pre-rRNA が蓄積し、逆に 20S pre-rRNA の減少が観測された (図 6)。最終的には 18S rRNA の供給が止まり、24 時間後には成熟 18S rRNA 及び 40S SSU がほとんど消失した。図 2 に示すように、23S pre-rRNA は、35S pre-rRNA が A0, A1, A2 部位と続く切断を受けず、A3 部位で切断された場合に生じる。従って *Rra1p* は、18S rRNA の生合成に不可欠な A0 部位切断に必須の制御因子であることが示唆された。

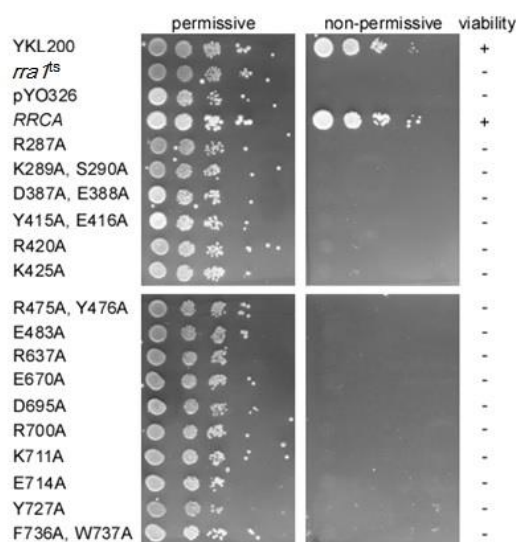


図 5 点変異 *Rra1p* による相補実験

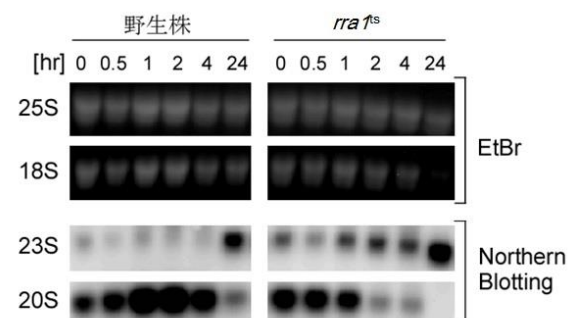


図 6 *Rra1p* 枯渇時の rRNA 前駆体

## 5. rRNA 前駆体における $ac^4C$ 修飾の解析

*rra1<sup>ts</sup>* 株で蓄積した 23S pre-rRNA における  $ac^4C$  修飾の有無を解析した。往復循環クロマトグラフィーによって単離し、LC/MS で解析したところ、23S pre-rRNA には  $ac^4C$  が一切形成されていなかった (図 7)。一方で、この株の 18S rRNA を解析すると、野生株と同様の効率で形成されていたことから、 $ac^4C$  修飾形成が A0 部位切断に必須であり、 $ac^4C$  を持たない 23S pre-rRNA は 18S rRNA へとプロセスされないことが示唆された。

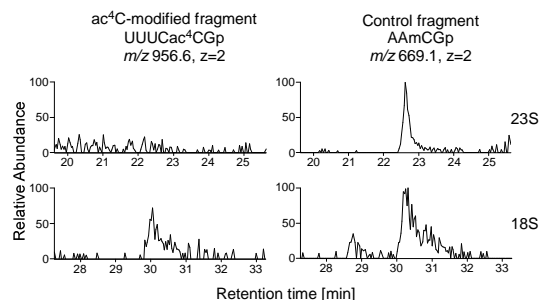


図 7 *rra1<sup>ts</sup>* に蓄積した 23S pre-rRNA には  $ac^4C$  修飾が形成されていない

## 6. 核内アセチル CoA の濃度と rRNA プロセッシング

$ac^4C$  修飾がリボソームの生合成に必須であることの生理学的な意義を探究するため、アセチル化の基質、アセチル CoA に注目した。アセチル CoA はエネルギー生産の中核を担うが、出芽酵母の場合、ミトコンドリア産生アセチル CoA を細胞質に汲み出せず、核内アセチル CoA は合成酵素 Acs2p によってのみ供給される。これを温度感受性株 *acs2<sup>ts</sup>* にて機能欠損させ、核内アセチル CoA を急激に枯渇させると、ヒストンアセチル化の減少とグローバルな転写抑制につながる事が報告されていた。この時、rRNA 前駆体のアセチル化も抑制されていると考え、18S rRNA のプロセッシングの経過を観察した。結果、23S pre-rRNA の蓄積、及び 20S pre-rRNA の減少が観測された (図 8)。核内アセチル CoA の枯渇によって、新たに転写された rRNA の  $ac^4C$  修飾効率が低下し、結果として rRNA プロセッシングが阻害されたと解釈できる。

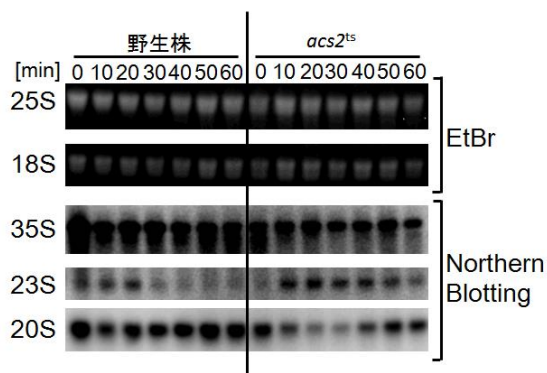


図 8 Acs2p 機能欠損時の rRNA 前駆体

### 【考察】

本研究で私は、Rra1p がアセチル CoA と ATP を基質に 18S rRNA の 1773 位をアセチル化する酵素であることを証明した。また、 $ac^4C$  修飾は 18S rRNA 前駆体の A0 切断に必須であることを示した。RRA1 が必須遺伝子であることから、 $ac^4C$  は 40S SSU 生合成に必須の修飾であると考えられる。rRNA 修飾の大半を占める 2'-O-メチル修飾及びシュードウリジンは必須ではなく、単独で欠損させてもほとんど表現型に現れないことから、本研究の知見は、単一の rRNA 修飾がリボソーム生合成において必須である初めての例である。

核内アセチル CoA の濃度を減少させた際の 18S rRNA のプロセッシングを観測すると、23S pre-rRNA の蓄積、及び 20S pre-rRNA の減少が見られた。これは、栄養ストレス環境で、核内アセチル CoA が枯渇すると 18S rRNA プロセッシングが抑制され、40S SSU 生合成が阻害されることを示唆している。リボソ

ームの生合成と翻訳は多くのエネルギーを消費する過程であり、栄養飢餓状態でリボソーム生合成を抑制することは生理学的に意味がある。特に 40S SSU は翻訳開始段階を担うため、より直接的に翻訳量を制御することができると考えられる。アセチル CoA が枯渇に伴い ac<sup>4</sup>C 修飾量を下げることによって 18S rRNA の供給を制御することは、栄養飢餓時にいち早く翻訳を止め、さらに環境改善に応じて翻訳を速やかに再開させるのに有効であると考えられる。

#### 【発表状況】

Ito S, Akamatsu Y, Noma A, Kimura S, Miyauchi K, Ikeuchi Y, Suzuki T, and Suzuki T. (2014) A single acetylation of 18S rRNA is essential for biogenesis of the small ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem PMID: 25086048.