

# 博士論文

細胞内 AdoMet 濃度を感知する環境応答的な

後期リボソーム生合成の制御機構

Regulatory mechanism of late steps of ribosome assembly  
by sensing cellular AdoMet concentration

指導教員 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

37-167145

石黒 健介

# 目次

概論.....	4
1, 序論.....	5
1-1, <i>S</i> -adenosyl-methionine (AdoMet)の細胞内における機能.....	5
1-2, 細胞内 AdoMet 濃度低下の与える影響.....	6
1-3, 細胞内におけるリボソーム生合成機構とその制御.....	7
1-4, rRNA 修飾が果たす機能.....	8
1-5, 50S サブユニットの生合成後期過程.....	10
1-6, 図・表.....	12
2, 本論.....	19
2-1, 緒言.....	19
2-2, 実験手法.....	19
大腸菌株の用意.....	19
P1 transduction を用いた二重欠損株の作成.....	19
pBAD 発現系による過剰発現株の作成.....	21
pcp20 plasmid による抗生物質耐性カセットの除去.....	22
大腸菌の培養及び集菌.....	23
Plate での Growth 測定.....	24
菌体中のリボソーム抽出(lysozyme 抽出).....	24
SDG によるリボソーム分画.....	25
菌体中のリボソーム抽出(アルミナ抽出).....	25
Tricine SDS-PAGE を用いた L36 の解析.....	27
Western blotting.....	29
リコンビナントタンパク質の精製.....	31
Differential radial capillary action of ligand assay (DRaCALA).....	37
RlmE による <i>in vitro</i> メチル化反応.....	38
LC/MS を用いた rRNA 修飾率の解析.....	38
ヌクレオシド解析による tRNA 修飾の解析.....	39
2-3, 実験結果.....	40
$\Delta mtn$ 株では 45S 前駆体の蓄積が観察される.....	40
AdoMet 濃度の低下によって 45S 前駆体の蓄積が引き起こされている.....	41
RlmE の反応効率の低下が Um2552 修飾率の低下の原因である.....	41
細胞中の AdoMet の濃度低下は特定の rRNA 修飾の修飾率を低下させる.....	43
細胞中の AdoMet の濃度低下は特定の tRNA 修飾の修飾率を低下させる.....	43
<i>rlmE</i> の過剰発現によって $\Delta mtn$ の生育阻害が回復する.....	44
2-4, 実験考察.....	45
$\Delta mtn$ では特定の rRNA 修飾及び tRNA 修飾の修飾率が低下する.....	45

Um2552 修飾率の低下が 45S 前駆体の蓄積および $\Delta mtn$ の生育阻害の主因である.....	46
Um2552 修飾率の低下は AdoMet 濃度の低下により引き起こされる.....	47
細胞内 AdoMet 濃度を感知して Um2552 修飾によってリボソーム生合成を制御する機構が存在する .....	48
2-5, 図・表.....	49
3, 本研究の意義と今後の展望.....	68
3-1, AdoMet 依存的なリボソーム生合成後期過程制御機構の生理学的意義.....	68
3-2, 本機構にかかわるほかのアッセムブリー因子の探索.....	68
3-3, ほかの生物における考察.....	69
3-4, 図・表.....	71
4, 引用文献.....	73
5, 発表業績.....	81
6. 謝辞.....	82

# 概論

*S*-adenosylmethionine (AdoMet)は細胞内の主要なメチル基供与体であり、DNA、RNA、タンパク質などのメチル化や低分子代謝物の生合成を通じて様々な細胞内プロセスに関与する。AdoMet 濃度の変化はこれらのメチル化修飾率の変動を通じて細胞の増殖や分化に影響を与え、様々な疾患の原因になっていることが知られている。

リボソームはリボソーム RNA(rRNA)とリボソームタンパク質(r-protein)からなる超分子複合体であり、翻訳過程において、mRNA 上の遺伝情報をタンパク質へと変換する役割を担っている。リボソームの生合成にはアッセンブリー因子と総称される多様な酵素が関与し、細胞のおかれた生育環境に応答してリボソームの生合成を制御していると考えられている。細胞内におけるリボソームの濃度は細胞の様々なプロセスに影響を与えることが知られており、その制御機構の解明は生命活動の根幹に関わる極めて重要な研究対象である。しかし、リボソーム生合成過程がどのように制御されるかは依然としてよくわかっていない。

大腸菌におけるリボソーム大サブユニット (50S)の生合成後期過程には RNA Helicase (DbpA)、GTPase (ObgE, Der)、RNA メチル化修飾酵素(RlmE)などの様々なアッセンブリー因子が関与している。RlmE は AdoMet を基質とし、23S rRNA のペプチド転移反応活性中心(PTC)に位置する U2552 を 2'-*O*-メチル化(Um2552)修飾する。この *rlmE* を欠損した株( $\Delta$ *rlmE*)では 45S 前駆体と呼ばれる 50S サブユニットの中間体の蓄積が観察される。当研究室の先行研究(Arai et al., 2015)により、RlmE による Um2552 の形成が 45S 前駆体から 50S への成熟過程を促進する役割を持つことが明らかとなった。(1, 序論)

本研究では細胞内 AdoMet 濃度がリボソームの生合成を制御する可能性について検討し、その分子機構の詳細を解明することを目指した。その結果、細胞内 AdoMet 濃度の低下によって生育の悪化に加え 45S 前駆体の蓄積と、いくつかの rRNA,tRNA 修飾率の減少が確認された。さらに、このうち Um2552 修飾率の低下が 45S 前駆体の蓄積と生育の悪化の原因となっていることを突き止めた。これらの結果は、細胞内 AdoMet 濃度の変化が Um2552 修飾を介してリボソーム生合成と細胞の生育を制御していることを示唆している。(2, 本論)

最後に、本研究のまとめと今後の展望について述べた。(3, 総合考察)

# 1, 序論

## 1-1, *S*-adenosyl-methionine (AdoMet)の細胞内における機能

*S*-adenosyl-methionine (AdoMet)は Methionine (Met)と Adenosine から合成される細胞内小分子であり、細胞内において主要なメチル基供与体として働いている (Fontecave et al., 2004) (図 1-1)。

AdoMet はスルホニウム化合物であり、その C-S 結合は高い結合エネルギーを保持している。メチル化修飾酵素はこの結合エネルギーを利用することで、基質にメチル基を付与する。メチル基を供与した AdoMet は *S*-adenosyl-homocysteine (AdoHcy)とよばれる分子に代わり、AdoMet のリサイクル経路により再利用される (図 1-2)。

AdoMet を用いたメチル化としてまず、DNA およびヒストンタンパク質におけるメチル化修飾があげられる。DNA とヒストンにおけるメチル化修飾の形成はあらゆる遺伝子の発現に影響を与え、細胞レベルから個体レベルまでのあらゆる生命活動に対してエピジェネティックな変化を引き起こす。これらの AdoMet 依存的なメチル化はこのようなエピジェネティックな制御において重要な役割を担っている (Luo et al., 2015)。さらに、RNA も数多くの部位にメチル化修飾を受けることが知られている。

transfer RNA (tRNA)はそのコア領域やコドン認識部位に様々なメチル化修飾を受けることが知られており、それらは tRNA の構造安定化やコドン認識の最適化に重要な役割を果たしていると考えられている (El Yacoubi et al., 2012)。また、ribosomal RNA (rRNA)もペプチド転移反応活性中心(PTC)やサブユニット同士の相互作用領域に様々なメチル化修飾を受ける。特に真核生物においては sno RNA と呼ばれる non coding RNA によって数十から数百もの塩基に 2'-*O*-メチル化修飾が形成されることが知られている。これらの修飾はリボソームの翻訳活性及び正確性の制御、サブユニット間の相互作用の安定化、さらにリボソームの生合成などに寄与している (Sergiev et al., 2018)。さらに近年では、真核生物において転写後の mRNA が様々な部位に N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) をはじめとするメチル化修飾を受けることが明らかとなった。これらの修飾は個々の mRNA の安定性や翻訳効率に影響を与える。さらに、これらのメチル化修飾を除去する脱メチル化酵素の存在も明らかとなっており、環境にตอบสนองして時空間的にメチル化修飾率を変化させ遺伝子の発現や細胞の活動を制御するエピトランスクリプトームという概念が提唱されている (Harcourt et al., 2017)。さらに、AdoMet はクレアチンやアドレナリンのような重要な細胞内小分子の生合成にも用いられている (Fontecave et al., 2004)。

さらに AdoMet はメチル基以外にも様々な形で用いられている (Fontecave et al., 2004) (図 1-3)。アミノプロピル基を転移することでポリアミンの一種であるスペルミジンが合成される。スペルミジンは細胞内の転写、翻訳の効率を維持する機能があると考えられている (Casero et al., 2018)。また、tRNA および rRNA に存在する 3-(3-amino-3-carboxypropyl)uridine (acp<sup>3</sup>U)修飾の生合成にも AdoMet が用いられている。真核生物の rRNA に存在する 1-methyl-3-(3-amino-3-carboxypropyl)pseudouridine (m<sup>1</sup>acp<sup>3</sup>ψ)修飾は rRNA の成熟化に寄与することが明らかとなっている (Meyer et al., 2016)。さらに、様々な酵素の補因子として働く (Tong, 2005)ピオチンの硫黄原子の供与体や、コドン認識にかかわる tRNA 修飾の一つである Queuosine (Q)のリボース環の供与体としても AdoMet が用いられている。また、AdoMet の C-S 結合の一つがラジカル開裂することによって生じる 5'-deoxyadenosine radical (5'-dA ラジカル)は、radical AdoMet 酵素と呼ばれる酵素群により radical 供与体として様々な酵素反

応に用いられている(Bauerle et al., 2015) (図 1-2)。

以上のように、AdoMet はあらゆる細胞活動に關与する重要な代謝物であり、その生合成経路は生物全体に広く保存されている。大腸菌における AdoMet の代謝経路及びリサイクル経路を図 1-2 に示す。AdoMet は ATP と Met から S-adenosylmethionine synthase (MetK) によって合成される (図 1-2)。原核生物において *metK* は必須遺伝子である。合成された AdoMet はメチル化修飾酵素により AdoHcy に変換される。AdoHcy はメチル化修飾酵素の阻害剤として働きうる(Tehlivets et al., 2013)ため、AdoHcy は 5'-methylthio-adenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase (*mtn*) によって速やかに Adenine が切断され S-ribosylhomocysteine (SRH) となる。SRH はその後 S-ribosylhomocysteine lyase (*luxS*) によって Homocysteine (Hcy) に変換され、Tetrahydrofolic acid (THF) の合成経路からメチル基を受け取ることで Met へと再生される。また、AdoMet は細胞外から Met を取り込むことによっても供給される。さらに、バクテリアや植物においては、AdoMet は Hcy がアスパラギン酸から合成されることによっても供給される。また、*mtn* は AdoHcy 以外にも radical AdoMet 酵素によって生じる 5'-deoxyadenosine (5'-dA) や、スペルミジンの合成経路などで生じる S-methyl-5'-thioadenosine (MTA) の分解にも関与している。

ヒトをはじめとする真核生物では AdoMet の生合成経路はいくつか異なっている。まず、MetK にあたる MAT が複数個存在し、それぞれの役割や発現が異なる。ヒトなどの哺乳動物の場合、MAT1A は肝臓において発現し肝細胞における AdoMet の貯蔵を担う一方で、MAT2A、MAT2B はそのほかの細胞で発現し細胞中における AdoMet 濃度の安定化を担っている(Maldonado et al., 2018)。また、原核生物の場合と異なり、AdoHcy は S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) によって一段階でアデノシンと Hcy に分解される。また、ヒトをはじめとする哺乳動物においては Hcy をアスパラギンから合成する経路が存在せず、Met は必須アミノ酸となっている。

## 1-2, 細胞内 AdoMet 濃度低下の与える影響

これまで述べたように AdoMet は細胞内において重要な代謝物であり、その濃度変化は細胞活動全体に影響を与える。そのため、すべての生物において細胞中の AdoMet 濃度を一定に保とうとする機構が存在すると考えられている。もっともよく知られているのが原核生物における *metK* の AdoMet 依存的な発現制御機構である(Weissbach and Brot, 1991)。MetJ とよばれる DNA 結合タンパク質は細胞中の AdoMet 濃度に応じて *metK* の発現量を制御する。細胞中の AdoMet 濃度が高くなると MetJ が AdoMet と結合し、*metK* の promoter 領域に結合することで発現を抑制し、AdoMet の合成を抑える。一方、細胞中の AdoMet 濃度が低い時には MetJ は *metK* の promoter 領域には結合せず、*metK* が発現されて AdoMet 濃度を回復させる。さらに近年、ヒトにおいて MAT の発現量が mRNA 修飾によって制御されていることが示された(Pendleton et al., 2017; Shima et al., 2017)。メチル化修飾酵素 METTL16 が MAT の mRNA を AdoMet 濃度依存的に m<sup>6</sup>A 修飾する。AdoMet 濃度が高いときは m<sup>6</sup>A 修飾率が高くなり、それにより mRNA の分解が誘導され、MAT の発現量が低下し AdoMet 濃度を下げる。AdoMet 濃度が低下すると m<sup>6</sup>A 修飾率が低くなり、MAT の発現量が増え、AdoMet 濃度が回復する。

しかし、遺伝子の変異や栄養の不足によって細胞中の AdoMet 濃度が大きく低下すると、細胞は様々

な経路で低 AdoMet 環境に適応しようとする。特に、真核生物においては Met を自力で合成することができないため、Met の不足による AdoMet 濃度の低下は環境中でも比較的起こりやすい現象である。大腸菌では MetK のプロモーター領域に変異の入った AdoMet 不足株で細胞分裂時の中隔の形成に異常が生じることが明らかとなっている(Wang et al., 2005)。さらに、多能性幹細胞を Met の不足した培地で生育させることで細胞中の AdoMet 濃度が低下し、ヒストン及び DNA のメチル化修飾率が減少するとともに NANOG の発現量の低下や p53/p38 シグナルの活性化によって細胞の分化およびアポトーシスが誘導されることが明らかとなっている(Shiraki et al., 2014)。また、AdoMet 低下によっておこるヒストンメチル化修飾率の変化によって広範な遺伝子群の発現量に変化することが示唆されている(Mentch et al., 2015)。

また、ミトコンドリアへの AdoMet 輸送因子の変異が、ミトコンドリア内の AdoMet 濃度の低下とミトコンドリア疾患に関与していることも明らかとなっている(Kishita et al., 2015)。また、脳脊髄液および肝臓中での AdoMet 濃度の低下がそれぞれアルツハイマー病と肝硬変などの肝疾患に関係していることが示唆されており、実際に治療目的での AdoMet の投与が検討されている(Anstee and Day, 2012; Bottiglieri et al., 1990; Kharbanda, 2009)。しかし、これらの病変と AdoMet 濃度の低下とがどのような機構で結びつくのかについての詳細は明らかになっていない。

以上のように、細胞中の AdoMet 濃度の低下はヒストン及び DNA のメチル化を介して遺伝子の発現、細胞の分化、分裂に影響を与える。しかし、AdoMet 濃度の変化が多種多様な RNA のメチル化にどのような影響を与えるかについてはこれまでほとんど明らかになっていない。tRNA と rRNA に存在するメチル化修飾は翻訳効率やリボソーム生合成に大きな影響を与えるが、それらの修飾が AdoMet 変動時にどのように変化するかはこれまでほとんど調べられてこなかった。MAT 阻害剤 Cycloleucine を用いた初期の実験により細胞中の AdoMet 濃度低下によってヒト細胞中の rRNA メチル化修飾率が低下しリボソームの生合成が阻害されることが示唆されている(Caboche and Bachellerie, 1977; Swann, 1975; Wolf and Schlessinger, 1977)ものの、生合成のどの段階で阻害が起きているか、またどの rRNA 修飾がその原因となっているかについてはほとんど未解明のままであった。そのため本研究では AdoMet 濃度の低下が個々の tRNA, rRNA メチル化修飾率をどのように変動させるか、またそれらの修飾の変動が細胞の生育にどのような影響を与えるかを解明することを目指した。

### 1-3, 細胞内におけるリボソーム生合成機構とその制御

地球上に存在するすべての生物は自らの遺伝情報を DNA と呼ばれる核酸にコードしている。DNA にコードされた遺伝情報は転写及び翻訳の過程を経ることによりタンパク質へと変換され、細胞の維持、増殖に役立てられる。この DNA 複製、転写、翻訳の一連の流れをセントラルドグマと呼ぶ。

翻訳はタンパク質情報がコードされた mRNA を解読し、アミノ酸からタンパク質を合成する過程である。mRNA の暗号情報はコドンと呼ばれ、3 種類の連続した塩基によって 1 種類のアミノ酸が示されている。この過程に関与しているのが tRNA と rRNA である。tRNA は 75 塩基程度の長さの短い RNA で、L 字型の高次構造をとる。tRNA はアンチコドンと呼ばれる mRNA のコドンに対合する領域をもち、mRNA のコドンに対応したアミノ酸が 3'末端に結合することでアミノアシル tRNA と呼ばれる状態となる。この mRNA と tRNA を正しく組み合わせることでタンパク質を合成する装置が、リボソームと呼ば

れる rRNA とリボソーマルタンパク質(r-protein)の超分子複合体である(図 1-4)。リボソームは大小二つのサブユニットから成り、バクテリアは 50S サブユニット(大サブユニット)と 30S サブユニット(小サブユニット)から構成される 70S リボソームを持つ。50S サブユニットは 33 種類の r-protein(L1~L36)と 2 種類の rRNA(23S rRNA, 5S rRNA)から、30S サブユニットは 21 種類の r-protein (S1~S21)と 1 種類の rRNA (16S rRNA)により構成されている。

初期のリボソーム生合成研究は、活性のある各サブユニットが r-protein と rRNA から *in vitro* で再構築できることが示されたことにより、大きく進展した(Herold and Nierhaus, 1987; Mizushima and Nomura, 1970; Nierhaus, 1991)。しかし、*in vitro* での再構成実験は反応条件として高濃度のマグネシウム存在下における、高温・長時間のインキュベーションを必要としており、生体内の条件とは大きくかけ離れている。したがって、低温、短時間で進行するリボソームの生合成を理解するためには、生体内特有のプロセスに関して考察する必要がある。

原核生物でのリボソーム生合成は rRNA の転写と協調して行われ、rRNA のフォールディングと r-protein の組み込みが段階的に進行する(Shajani et al., 2011)。生体中のリボソーム生合成は細胞の活動や増殖速度に比例して、非常に効率的に、かつ素早く進行する。この過程はアッセンブリー因子と総称される様々な酵素群と協調して進行する。これらの酵素群は GTPase, RNA helicase, chaperone などを含み、また一部の RNA 修飾酵素及び RNA 修飾がアッセンブリーに寄与することも明らかとなっている(表 1-3)。リボソームの生合成が大量のエネルギーを必要とすること、また細胞中のリボソームの量が細胞の翻訳や生育を決定する重要な因子であることから、リボソーム生合成は様々な段階で制御されていると考えられている(Strunk and Karbstein, 2009)。実際、原核生物においてはアミノ酸飢餓条件下で rRNA の転写量が抑制される緊縮応答という仕組みが知られている(Gaca et al., 2015; Hauryliuk et al., 2015)。アミノ酸飢餓条件下でアミノ酸をチャージしていない tRNA がリボソームに結合するとリボソームに結合した RelA により GTP から guanosine pentaphosphate もしくは tetraphosphate ((p)ppGpp)が合成される。(p)ppGpp は RNA polymerase に結合し、DksA とともに rRNA をはじめとする様々な遺伝子の転写を制御する(Zenkin and Yuzenkova, 2015)。しかし、このような転写段階における制御以外で、リボソーム生合成の後期段階に当たるアッセンブリー過程での制御機構はほとんど明らかとなっていない。

## 1-4, rRNA 修飾が果たす機能

rRNA はリボソーム生合成過程において様々な転写後修飾が導入されることが知られている。大腸菌には 16S rRNA に 12 か所、23S rRNA に 24 か所の合計 36 か所の rRNA 修飾が存在する(Shajani et al., 2011) (図 1-4,5,6)。これらの修飾のうちメチル化修飾は 24 か所存在し、それらの修飾の生合成は全て AdoMet を基質として行われている。これらの修飾を担う酵素は、大腸菌では 2449 位の dihydrouridine (D)を除いてすべて同定されている(表 1-1,2)。また、これらの rRNA 修飾は PTC やサブユニット同士の相互作用領域などリボソームの機能部位に集中して存在している(図 1-4)。このことは、これらの修飾が翻訳活性の調節やフレームシフトの抑制などリボソームの機能の微調整を行っていることを示唆している。

真核生物では修飾の大部分が 2'-O-メチル化かシュードウリジル化であり、出芽酵母では 113 か所、ヒトでは 230 か所近い修飾が同定されている(Krogh et al., 2016; Sloan et al., 2017; Taoka et al., 2018)。



真核生物の 2'-O-メチル化かシュードウリジル化は、ほとんどの場合 small nucleolar RNA (snoRNA) と呼ばれるガイド RNA によって修飾位置の特定が行われる (Sloan et al., 2017)。Box C/D と呼ばれる特異的な配列を有する C/D RNA は Fibrillarin というメチル化酵素との複合体を形成し、2'-O-メチル化修飾を導入する (Lin et al., 2011)。また、Box H/ACA と呼ばれる配列を有する H/ACA RNA は Cbf5 というシュードウリジル化酵素と複合体を形成し、シュードウリジンの形成を触媒する (Kiss et al., 2010; Li and Ye, 2006)。両者においてガイド RNA は修飾を導入する周辺配列と 2 本鎖を組むことにより目的塩基を特定している。一方、真核生物においても少数ではあるが修飾酵素によって導入される修飾も存在する。真核生物の rRNA 修飾もリボソームの機能部位に集中して存在するが、その修飾の位置は原核生物と比べ大きく異なる。しかし、一部の rRNA 修飾は真核生物と原核生物の両方で保存されている (Sloan et al., 2017; Taoka et al., 2018) (表 1-1,2)。このことは、これらの修飾が生物種をこえて重要な機能を持っていることを示唆している。これらの修飾の機能について以下に詳細を述べる。

16S rRNA の 1518、1519 位に存在する N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-dimethyladenosine (m<sup>6</sup><sub>2</sub>A1518,m<sup>6</sup><sub>2</sub>A1519) は 30S サブユニットの会合面および P-site の近傍に位置し、KsgA(RsmA) と呼ばれる修飾酵素によって導入される (Poldermans et al., 1979)。ksgA の欠損株では 16S rRNA の processing に異常がみられ、30S の前駆体の蓄積が引き起こされる (Connolly et al., 2008)。このことから、この修飾は 30S サブユニットの生合成のチェックポイントとして機能しているのではないかと考えられている。さらに、この修飾は開始コドンの選別精度の調節にも関与しているとも考えられている (O'Connor et al., 1997)。この修飾は真核生物や古細菌でも保存されており、ksgA の homolog である *dim1/DIMT1L* は出芽酵母やヒトにおいて必須遺伝子である (Lafontaine et al., 1994; Zorbas et al., 2015)。また、ksgA はヒトのミトコンドリアや植物の葉緑体においても保存されている (Seidel-Rogol et al., 2003; Tokuhisa et al., 1998)。これらの遺伝子の発現抑制株では rRNA の processing やリボソームの生合成に異常がみられる (Lafontaine et al., 1995; Metodiev et al., 2009) が、この生育異常が修飾の欠損によるものかそれとも酵素の欠損によるものかをはっきりしていない (Lafontaine et al., 1995; Zorbas et al., 2015)。

23S rRNA のサブユニット会合面に存在する 3 つのシュードウリジン (1911,1913,1917 位) は RluD によって導入される (Wrzesinski et al., 2000)。rluD を欠損した株では顕著な生育阻害と 50S サブユニットの中間体の蓄積および 70S リボソームの分解物の蓄積が観察される (Gutgsell et al., 2005)。さらに、これらのシュードウリジンは終止コドンの読み飛ばしを抑制することで翻訳終結にも関与していると考えられている (Ejby et al., 2007)。この位置のシュードウリジンは様々な生物種で保存されている (Sloan et al., 2017) が、この機能が他の生物種でも維持されているかは明らかとなっていない (O'Connor and Gregory, 2011)。

23S rRNA の 2552 位に存在する 2'-O-methyluridine (Um2552) は PTC に位置し、RlmE と呼ばれるメチル化修飾酵素によって導入される (Caldas et al., 2000)。RlmE を欠損した株では顕著な生育阻害とともに 50S サブユニットの中間体の蓄積が観察される (Bügl et al., 2000)。また、この修飾は翻訳の正確性にも関与していると考えられている (Widerak et al., 2005)。さらに、当研究室における近年の研究により、この修飾は 50S サブユニットの生合成後期過程を促進する機能があることが明らかとなった (Arai et al., 2015) (1-5 参照)。

また、Um2552 は酵母やヒトなど様々な真核生物の細胞質及びミトコンドリアで保存されている。RlmE の酵母での細胞質 homolog である *spb1* は 60S サブユニットの Gm2553 修飾 (酵母では Gm2922

に相当)を担っている(Lapeyre and Purushothaman, 2004)。Spb1は60Sサブユニットの生合成後期過程でGm2553修飾を導入し、その発現を抑制した株では、25S rRNAのプロセッシングの後期過程が阻害され、60Sサブユニットの存在量が減少する(Kressler et al., 1999; Lapeyre and Purushothaman, 2004)。興味深いことに、酵母においてUm2552修飾はsnoRNAであるsnR52によってリボソームの生合成初期段階で導入される(Bonnerot et al., 2003; Lapeyre and Purushothaman, 2004)。一方で、snR52を欠損させた場合にはUm2552修飾はSpb1によってリボソーム生合成後期過程で導入される(Lapeyre and Purushothaman, 2004)。一つの修飾が二つの方法によって導入される生理学的な理由は明らかとなっていない。ヒトでの細胞質 homolog であるFTSJ3はリボソームの生合成中間体と相互作用する(Morello et al., 2011)。しかし、この酵素が実際にリボソームのメチル化修飾を担っているかはこれまで明らかとなっていない。ヒトの28S rRNAのUm2552修飾及びGm2553修飾(ヒトではUm4468とGm4469に相当)の生合成機構は明らかとなっておらず、FTSJ3が担っていると推測されている(Sergiev et al., 2018)。

また、ミトコンドリアでの homolog であるmrm2/MRM2はRlmEと非常に似通った配列を持ち、ミトコンドリア大サブユニットのUm2552修飾(酵母のミトコンドリアリボソームではUm2819、ヒトのミトコンドリアリボソームではUm1369に相当)を担っている(Lee and Bogenhagen, 2014; Lee et al., 2013; Pintard et al., 2002a)。この修飾酵素の発現を抑制した株ではリボソーム大サブユニットの定常状態量が低下し、翻訳量が低下することによってミトコンドリア機能異常が引き起こされる(Pintard et al., 2002a; Rorbach et al., 2014)。また、MRM2に変異が入ることでUm2552修飾の修飾率が低下し、その結果ミトコンドリア脳筋症(MELAS)様の遺伝病が引き起こされることが明らかとなっている(Garone et al., 2017)。さらに、MRM2の発現が癌の浸潤と遊走を阻止する機能があるという報告もなされている(Lai et al., 2014)。

これらの修飾以外にもリボソーム修飾は抗生物質耐性などに関与していると考えられている(表 1-1,2)。しかし、多くの場合単独の修飾欠損は軽微な生育の異常しかもたらさない。一方で、出芽酵母において集中して存在する複数の修飾を同時に欠損させることで細胞の生育やリボソームの生合成、リボソームの機能に顕著な生育阻害が観察されるようになる例が報告されている(Baudin-Baillieu et al., 2009; Baxter-Roshek et al., 2007; King et al., 2003; Liang et al., 2007, 2009)。このことは、rRNA修飾がほかのrRNA修飾とともにredundantに機能していることを示している。

## 1-5, 50S サブユニットの生合成後期過程

大腸菌におけるリボソームの生合成後期過程では多くのアッセンブリー因子が関与する。特に、50Sサブユニットの生合成後期過程ではRNA helicase (DeaDとDbpA)、GTPase (ObgEやDer)、rRNAメチル化修飾酵素(RlmE)などの様々なアッセンブリー因子が関与する(表 1-3)。また、Chaperon (DnaK-DnaJ, GroEL-GroES)もアッセンブリーの後期に関与している。これらのアッセンブリー因子のうち非常に重要な役割を果たしているのがRlmEである。RlmEは23S rRNAのPTCに存在するHelix 92 (H92)のU2552を2'-O-メチル化修飾する酵素(Caldas et al., 2000)で、*rlmE*を欠損した株では低温感受的な顕著な生育阻害とともに、45S前駆体と呼ばれる50Sサブユニットの中間体の蓄積が観察される(Bügl et al., 2000)。この45S前駆体はマグネシウム濃度依存的に沈降係数を変化させ、Mg<sup>2+</sup>が10 mMの会合条件、つまり30Sと50Sが会合して70Sリボソームが形成されるような条件では50Sサブユニットと同程度

まで沈降係数が大きくなる。しかし、45S 前駆体は Central Protuberance (CP)をはじめとする 30S サブユニットとの会合面が形成されていないため、30S と会合して活性を持った 70S リボソームを形成することはできない(Arai et al., 2015) (図 1-7)。また、先行研究により PTC と CP に存在する rRNA の二次構造と r-protein の組み込みの安定性がマグネシウム依存的に変化することが明らかとなっている(Arai et al., 2015)。このマグネシウム依存的な構造変化が、45S 前駆体のマグネシウム依存的な沈降係数の変化をもたらしていると考えられている。

当研究室での先行研究により、50S サブユニット生合成後期過程が RlmE による Um2552 修飾の形成によって触媒されていることが明らかとなった(Arai et al., 2015) (図 1-8,9)。まず、2'-Oメチル化修飾が形成されることでUm2552のリボースのパッカリングがC2'-endoからC3'-endoへとかたむき、C2556とU1955とのbase tripleが安定化する。この効果によってH92とH71との相互作用が安定化され、H91を含む近傍のrRNAの二次構造の安定化が進む。これによりL36の取り込みが促され、周囲のrRNAのコンフォメーションを安定化させる。これらの構造変化によってほかのr-proteinの結合とPTCおよびCPのrRNAコンフォメーションの形成が促され、45S前駆体が50Sサブユニットへと成熟する(図 1-9)。このようにして、Um2552修飾の形成は45S前駆体から50Sサブユニットへの成熟において決定的な役割を担っている。

このような先行研究の結果をもとに、本研究では、このUm2552修飾の形成がリボソームの生合成後期過程を積極的に制御する機能を持つのではないかと考えた。そこで、RlmEの基質であるAdoMetに着目し、その細胞内濃度の変化がUm2552修飾率の変化を通じてリボソームの生合成及び生育に影響を与える可能性があるのではないかと考え研究を進めた。

1-6, 図・表

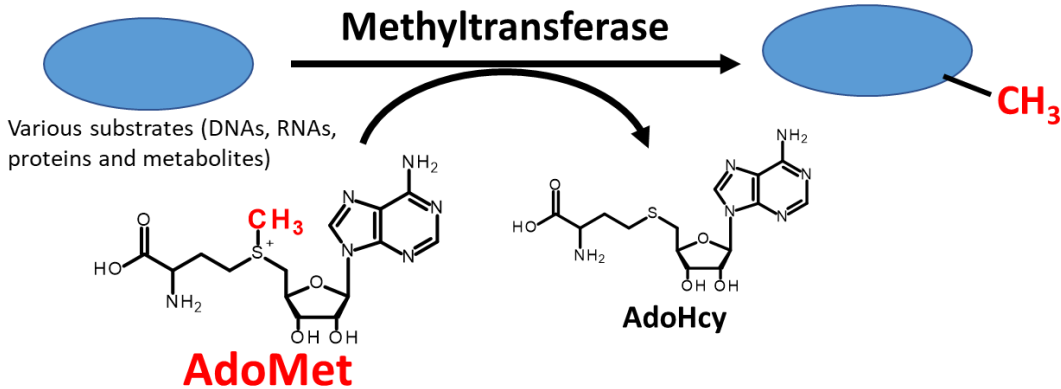


図 1-1, AdoMet を用いたメチル化修飾反応

メチル化修飾酵素は AdoMet のスルホニウム結合のエネルギーを利用してメチル基を転移させる。

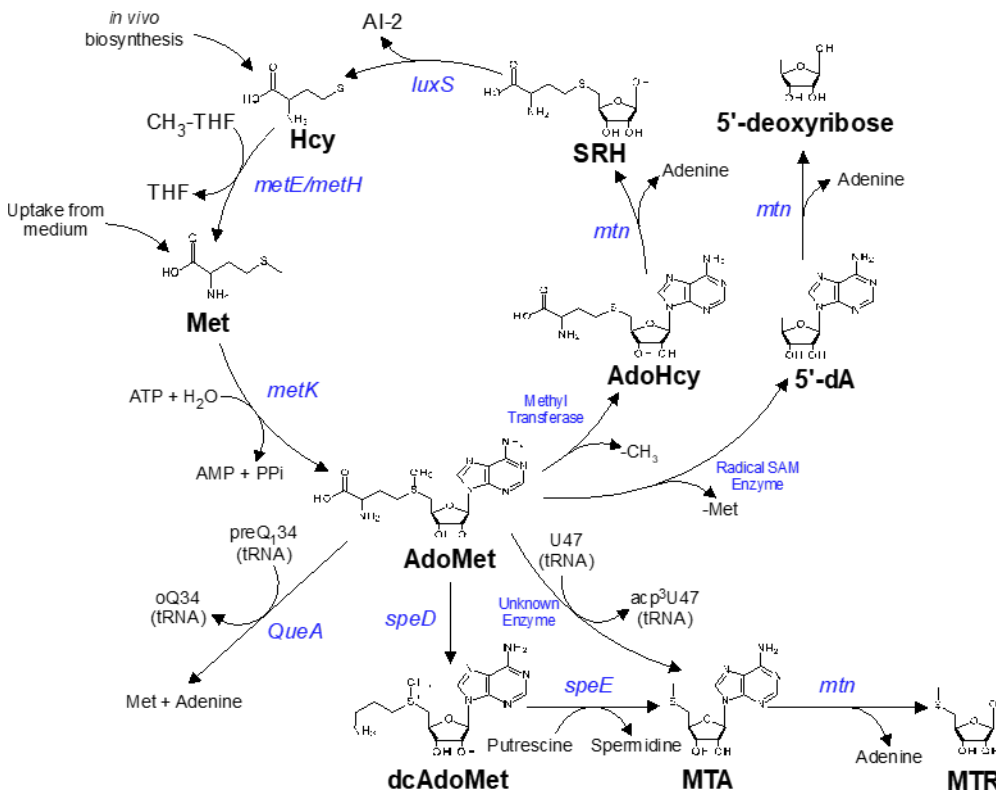


図 1-2, 原核生物における AdoMet 代謝経路

遺伝子は青文字で表記。各代謝物の正式名称は以下の通り。AdoMet: *S*-adenosylmethionine, AdoHcy: *S*-adenosylhomocysteine, SRH: *S*-ribosylhomocysteine, AI-2: autoinducer-2, Hcy: homocysteine, Met: methionine, THF: tetrahydrofolate, 5'-dA: 5'-deoxyadenosine, dcAdoMet: *S*-adenosyl 3-(methylthio) propylamine, MTA: *S*-methyl-5'-thioadenosine, MTR: *S*-methyl-5'-thio-D-ribose.

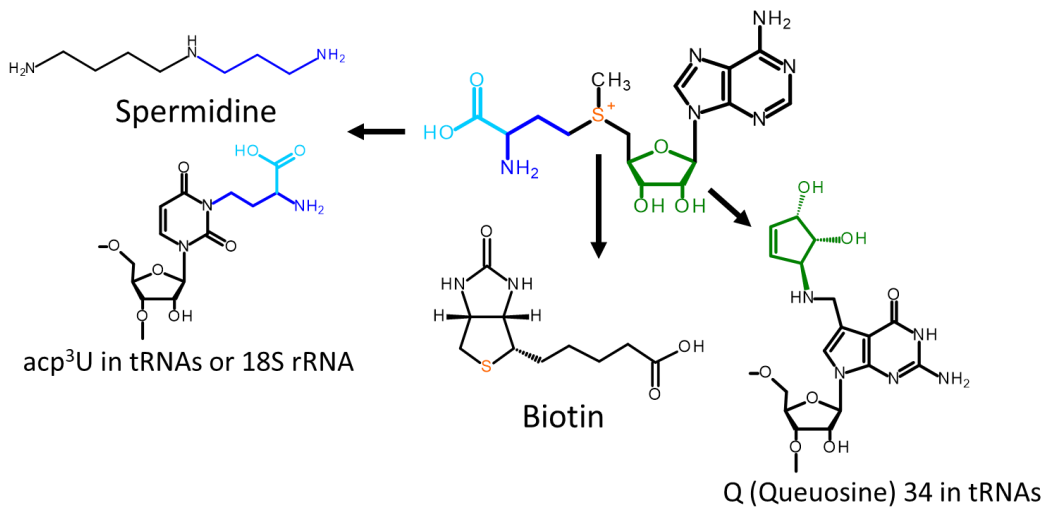


図 1-3, AdoMet を基質としたさまざまな細胞内小分子の合成

AdoMet はアミノプロピル基、硫黄、リボース環の供与体としても機能する。

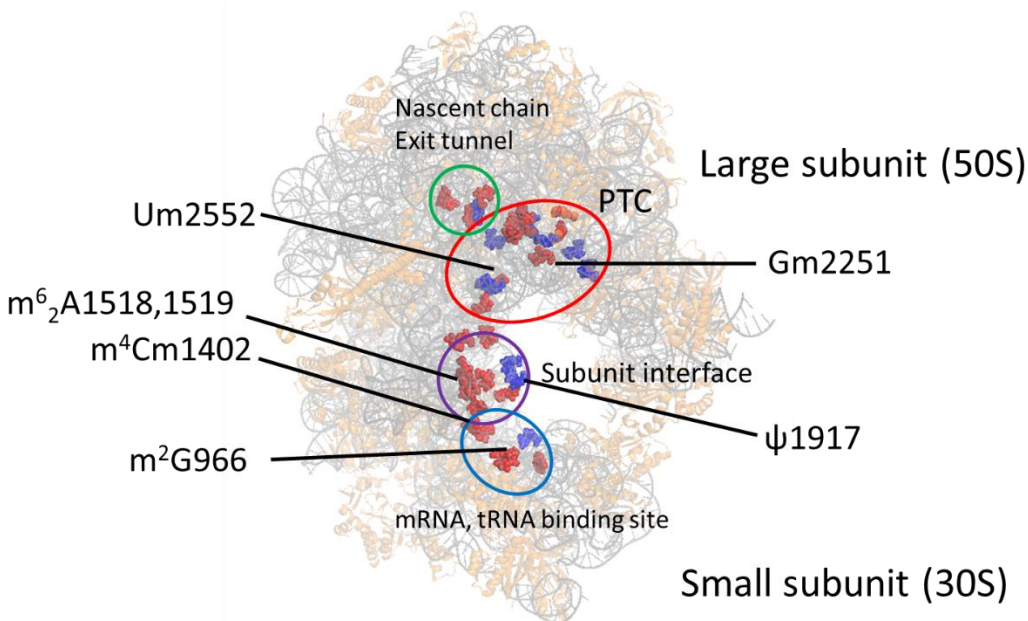


図 1-4 大腸菌のリボソームの構造と rRNA 修飾

リボソームの構造は 4Ybb.pdb のものを用いた。灰色は rRNA、オレンジは r-protein。メチル化修飾は赤、その他の修飾は青で示している。

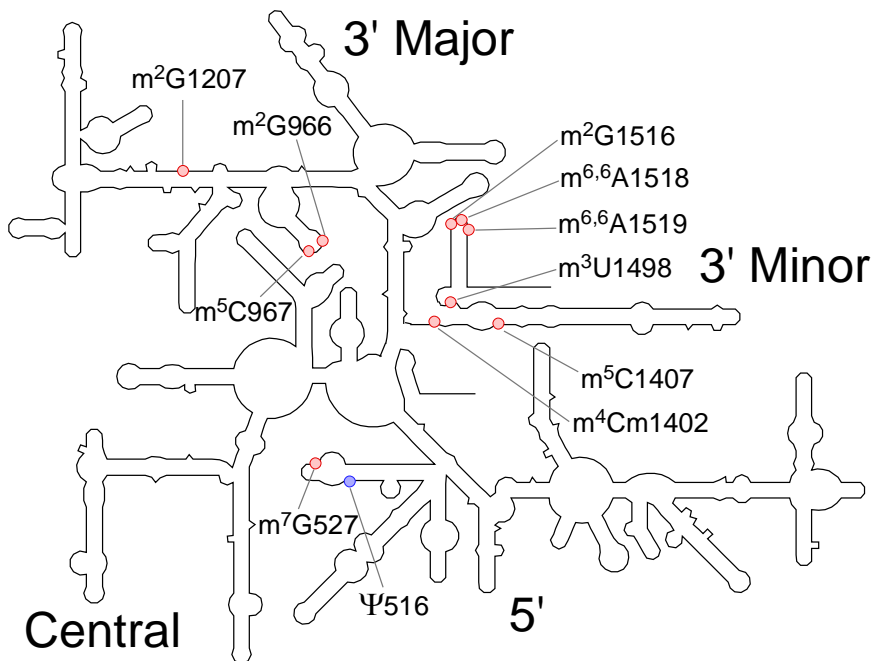


図 1-5, 16S rRNA に存在する rRNA 修飾一覧

16S rRNA の二次元構造上における修飾の位置を示した。赤丸はメチル化修飾、青丸はそれ以外の修飾を示す。

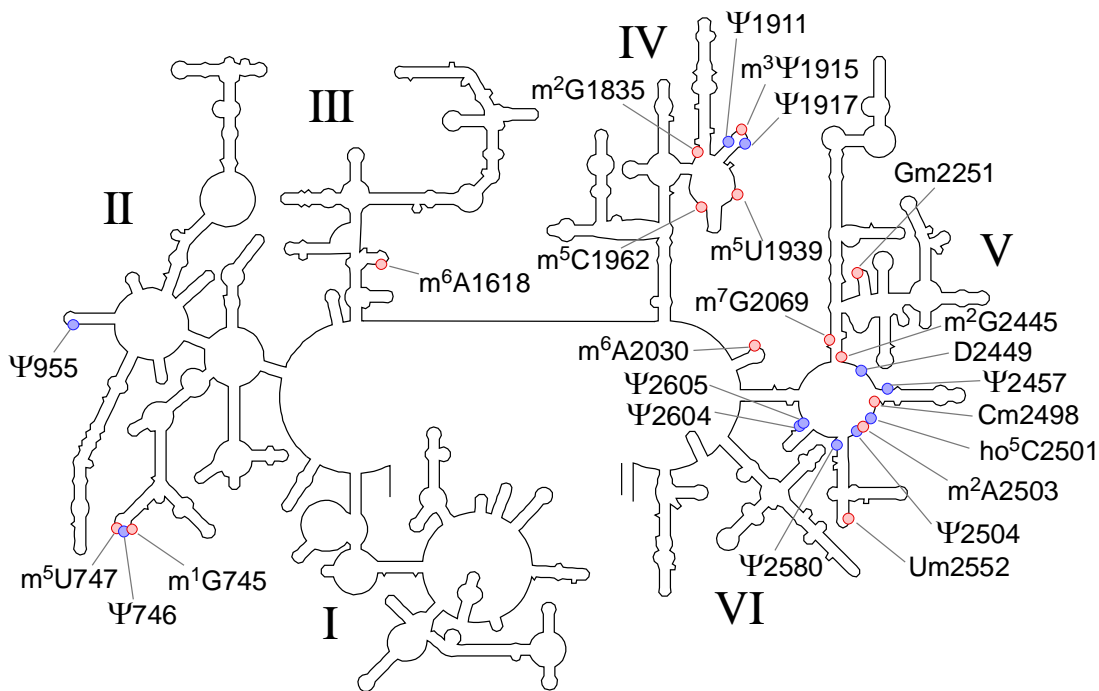


図 1-6, 23S rRNA に存在する rRNA 修飾一覧

23S rRNA の二次元構造上における修飾の位置を示した。赤丸はメチル化修飾、青丸はそれ以外の修飾を示す。

Modification	Enzyme	Function
Ψ516	RsuA	Unknown
m <sup>7</sup> G527	RsmG	Resistance to antibiotics
<b>m<sup>2</sup>G966</b>	RsmD	Fine tuning of translation initiation
m <sup>5</sup> C967	RsmB	Fine tuning of translation initiation
m <sup>2</sup> G1207	RsmC	Unknown
m <sup>4</sup> Cm1402	RsmH, RsmI	Fine tuning of translation initiation
m <sup>5</sup> C1407	RsmF	Fine tuning of translation initiation
m <sup>3</sup> U1498	RsmE	Fine tuning of translation initiation?
m <sup>2</sup> G1516	RsmJ	<i>ΔrsmJ</i> shows modest growth defect, but precise role is unknown
<b>m<sup>6</sup><sub>2</sub>A1518 1519</b>	RsmA	rRNA maturation, fine tuning of translation

表 1-1, 16S rRNA に存在する rRNA 修飾の機能

16S rRNA に存在する修飾についてその機能を示した。真核生物においても保存されている修飾は赤字で示した。

Modification	Enzyme	Function
m <sup>1</sup> G745	RlmA	Unknown
Ψ746	RluA	<i>ΔrluA</i> shows modest growth defect, but precise role is unknown
m <sup>5</sup> U747	RlmC	Unknown
Ψ955	RluC	Resistance to antibiotics
m <sup>6</sup> A1618	RlmF	<i>ΔrlmF</i> shows modest growth defect, but precise role is unknown
m <sup>2</sup> G1835	RlmG	<i>ΔrlmG</i> shows modest growth defect, but precise role is unknown
Ψ1911	RluD	Late steps of ribosome assembly, fidelity of translation termination
m <sup>3</sup> Ψ1915	RluD, RlmH	Late steps of ribosome assembly, fidelity of translation termination <i>ΔrlmH</i> shows growth defect, but precise role is unknown
<b>Ψ1917</b>	RluD	Late steps of ribosome assembly, fidelity of translation termination
m <sup>5</sup> U1939	RlmD	Late steps of ribosome assembly
m <sup>5</sup> C1962	RlmI	may be related with biofilm formation
m <sup>6</sup> A2030	RlmJ	Unknown
m <sup>7</sup> G2069	RlmKL	Late steps of ribosome assembly
<b>Gm2251</b>	RlmB	Unknown
m <sup>2</sup> G2445	RlmKL	Late steps of ribosome assembly
D2449	unknown	Unknown
<b>Ψ2457</b>	RluE	Unknown

Cm2498	RlmM	<i>ΔrlmM</i> shows modest growth defect, but precise role is unknown
ho <sup>5</sup> C2501	RlhA	Unknown
m <sup>2</sup> A2503	RlmN	Translation fidelity
Ψ2504	RluC	Resistance to antibiotics
<b>Um2552</b>	RlmE	Late steps of ribosome assembly
Ψ2580	RluC	Resistance to antibiotics
Ψ2604	RluF	Unknown
Ψ2605	RluB	Late steps of ribosome assembly or subunit interaction

表 1-2, 23S rRNA に存在する rRNA 修飾の機能

23S rRNA に存在する修飾についてその機能を示した。真核生物においても保存されている修飾は赤字で示した。

Enzyme	Enzyme type	Phenotype
DeaD	Helicase	Severe cold sensitive growth defect, 40S accumulation
<b>DbpA</b>	Helicase	No growth defect, but related with RlmE
SrmB	Helicase	Cold sensitive growth defect, 40S accumulation
RhlE	Helicase	No growth defect, but related with DeaD and SrmB
DnaK-DnaJ	Chaperone	Growth defect and assembly halt at high temperature
GroEL-GroES	Chaperone	Growth defect and assembly halt at high temperature
RluD	Modification enzyme	severe growth defect and accumulation of 39S precursor and 62S particle (breakdown product of 70S)
<b>RlmE</b>	Modification enzyme	Severe cold sensitive growth defect, 45S accumulation
<b>ObgE</b>	GTPase	Essential gene, 45S accumulation
<b>Der</b>	GTPase	Essential gene, related with RlmE

表 1-3, 50S サブユニットの生合成にかかわるアッセンブリー因子

大腸菌において 50S サブユニットの生合成に関与するアッセンブリー因子を示した。45S 前駆体から 50S サブユニットへの成熟過程に関与するものについて赤字で示した。



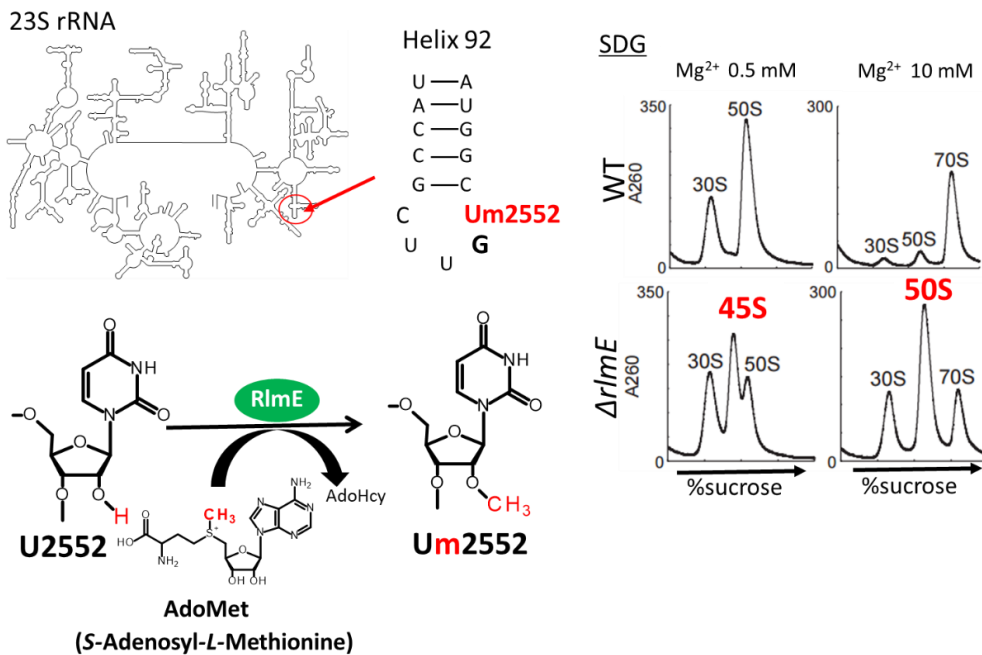


図 1-7, RlmE の修飾部位と欠損株でみられる 45S 前駆体の蓄積

RlmE は AdoMet を基質として U2552 を 2'-O-メチル化修飾する酵素である。U2552 は PTC に位置している。この酵素を欠損した株では 45S 前駆体と呼ばれる 50S の前駆体が蓄積する。45S 前駆体はマグネシウム濃度の低い解離条件では 30S と 50S の間に蓄積し、マグネシウム濃度の高い会合条件では沈降係数が増加し、50S サブユニットと同じ位置に蓄積する。しかし、会合条件でも 30S サブユニットと会合することはできない。

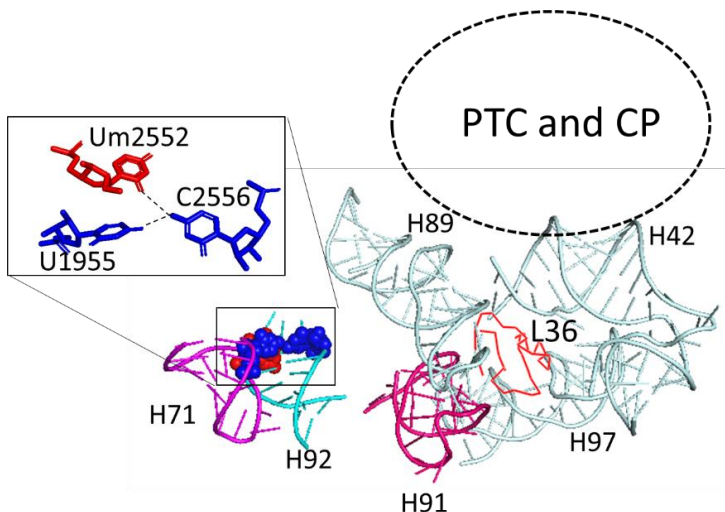


図 1-8, Um2552 とその周辺の構造

Um2552 とその周辺のリボソームの構造を示した。リボソームの構造は 4Ybb.pdb のものを用いた。Um2552 は H92 の C2556 及び U1955 と base triple を形成している。これにより H92 と H71 の相互作用が安定化される。また、L36 の結合は H91 や H97 などの周辺の rRNA のコンフォメーションを安定化させている。H89 や H42 の周囲には、45S 前駆体で形成が完了していない PTC や CP の構造が存在する。

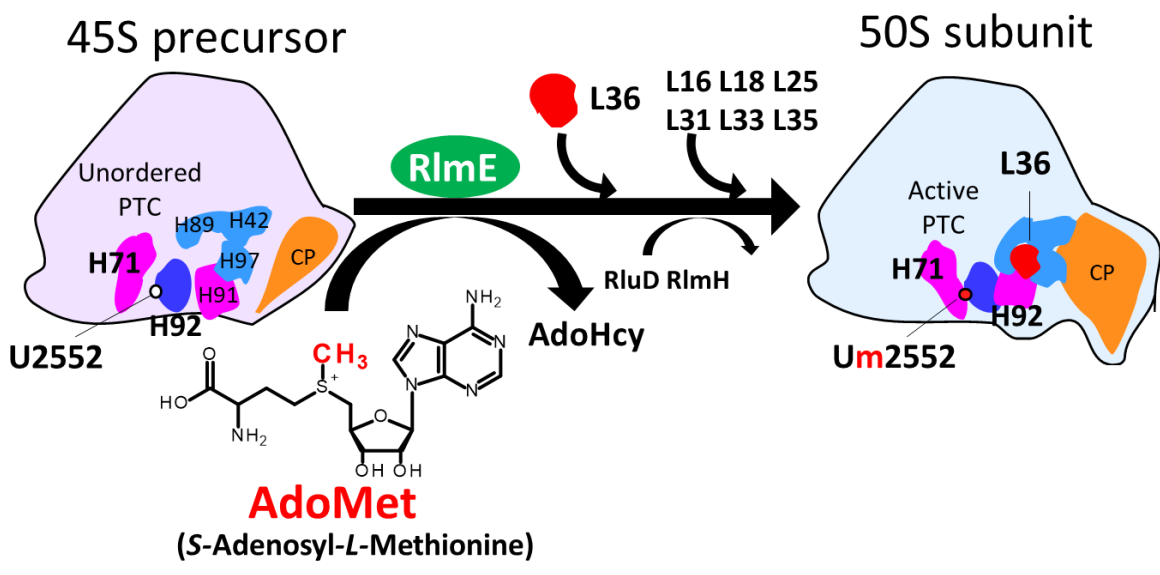


図 1-9, 大腸菌における 50S サブユニット生合成後期過程

45S 前駆体では PTC と CP の構造形成が完了していない。Um2552 が形成されると、H92 と H71 の相互作用が安定化され、それによって H91 のコンフォメーションが変化する。それによって L36 の組み込みが促され、H97 などの周辺の rRNA のコンフォメーションが安定化する。これらの構造変化によって PTC や CP の rRNA コンフォメーションの形成とそのほかの r-protein の組み込みが促され、45S 前駆体から 50S サブユニットへの成熟が完了する。

## 2, 本論

### 2-1, 緒言

本章では、rRNA メチル化修飾酵素 RlmE を介した 50S 生合成後期過程の制御機構について示す。大腸菌において細胞内での AdoMet 濃度低下が与える影響を解析するため、本研究では AdoHcy を代謝する遺伝子である *mtn* 遺伝子に着目した(図 1-2)。先行研究において、この遺伝子を欠損した株( $\Delta mtn$ )で AdoMet 濃度が野生株(WT)と比べて 1/3 程度にまで減少することが知られている(WT:300  $\mu$ M,  $\Delta mtn$ :100  $\mu$ M)(Halliday et al., 2010)。LB 培地における生育とリボソームの構成を調べると  $\Delta mtn$  株は低温感受的な生育阻害を示すとともに、45S 前駆体の蓄積が観察された。さらに、この株での 45S 前駆体の蓄積が細胞中の AdoMet 濃度の低下によって引き起こされていることも判明した。

さらに、AdoMet 濃度の低下が rRNA 修飾及び tRNA 修飾に与える影響を調べるため、LC/MS を用いて各修飾の修飾率を解析した。すると、rRNA、tRNA の特定の修飾の修飾率のみが特異的に減少していることが分かった。さらに、これらの修飾率の低下がリボソームの生合成及び細胞の生育にどのような影響を与えているかを解析したところ、Um2552 以外の修飾では修飾を回復させても生育の回復はみられなかったのに対し、Um2552 修飾を回復させた株では有意な生育の回復と 45S 前駆体の蓄積の解消がみられた。以上の結果から、50S サブユニットの後期生合成過程において、RlmE が細胞内 AdoMet 濃度を敏感に感知することで、45S 前駆体における Um2552 の修飾率を調節し、50S サブユニットの形成を制御する機構の存在が示唆された。

### 2-2, 実験手法

#### 大腸菌株の用意

野生株として Keio Collection の親株である BW25113 を、各遺伝子の欠損株として Keio Collection のものを使用した(Baba et al., 2006)。これらの欠損株は Kanamycin (Kn)耐性を持つ。また、*dbpA* 欠損株 (JW1337) は Keio collection の株の生育に異常が見られたため、荒井大河氏から Kn 耐性または chloramphenicol (Cm)耐性を持つ株それぞれをいただいた。また、*rlmE* および *mtn* の Cm 耐性株は先行研究に基づき作成した(Datsenko and Wanner, 2000)。各種二重欠損株は P1 transduction により作成した。

各種過剰発現株は pBAD vector に目的遺伝子をのせ、それを transformation することにより作成した。plasmid の作成のため表 2-1 に示された primer を用いた。

#### P1 transduction を用いた二重欠損株の作成

$\Delta mtn\Delta rlmE$  などの二重欠損株を作成するため、P1 transduction と呼ばれる方法を用いた。

##### (1)実験原理

バクテリオファージは大腸菌などの細菌に感染するウイルスである。バクテリオファージの

中には、感染後、すぐに細菌を殺すのではなく、大腸菌のゲノム DNA に自らのゲノムを組み込ませ、大腸菌の中で安定的に存在することのできるものがある。このようなファージを temperate phage(溶原性ファージ)といい、このような現象を溶原化という。通常の生育条件下では溶原性ファージは大腸菌の中で安定して存在するが、特定の刺激を与えることでファージゲノムは大腸菌ゲノムから離脱して増幅し、必要な要素を転写翻訳してファージ粒子を形成し、最終的に大腸菌を殺して外部へ離脱する。この現象を溶菌と呼ぶ。

以上のファージの性質を応用したのが phage transduction である。溶原性ファージに抗生物質耐性遺伝子を組み込ませ、それをほかの株の遺伝子に取り込ませることによって多重耐性株を作成することができる。P1 phage の場合、大腸菌ゲノムから取り込んだ遺伝子配列は、ほかの株に移す時ゲノム上の同じ位置に移そうとする。そのため、特定の遺伝子を抗生物質耐性マーカーで置換した株からファージにゲノムの一部を取り込ませ、別の株に感染させると、そのうちの一部の株は目的の遺伝子欠損を持った株となる。これを抗生物質マーカーでセレクションにかけることによって、目的の欠損株のみを選択的に得ることができる。

## (2)実験手法

まず、目的の遺伝子をターゲットとした抗生物質カセットを持つ P1 phage を作成する。目的の欠損を持つ株を LB 培地で 10ml 前培養し、O/N で full growth まで培養する。今回は  $\Delta rlmE(Cm::R)$  とする。培養した菌体に対して 1M  $CaCl_2$  を 100 $\mu$ l、P1 phage を 50 $\mu$ l 加えたら 37°C で 15min 振とうする。その後、新しいファルコンに 10ml LB TOP と 1M  $CaCl_2$  100 $\mu$ l を加え、40°C 程度まで冷ましたら菌体培地を 6ml 加え、軽く混合し、固まらないうちに LB plate(Cm)に 8ml のせる。LB TOP が固まったら 37°C で O/N 静置する。以上の操作により、一部のファージが  $\Delta rlmE(Cm::R)$  カセットを持つようになる。O/N 静置した Plate から LB TOP をかき出し、15ml ファルコンに集め、LB 培地(5mM  $CaCl_2$ )を加え、軽くボルテックスし、1ml クロロホルムを上から滴下後 7400rpm 4°C で 10min 遠心する。プレート断片が入らないように気を付けながら上清を新しいチューブに移し、1ml クロロホルムを上から滴下し 7400rpm 4°C で 10min 遠心する。最後に上清を新しいチューブに移し、1ml クロロホルムを上から滴下し 4°C で保存する。以上の操作により、菌体や菌体の残骸を除去する。ここまでの一連の操作をもう一度繰り返すことで、ファージ群で  $\Delta rlmE(Cm::R)$  カセットを持つものの割合を上げる。

挿入断片の受け手側となる株を 2ml LB 培地で O/N で前培養する。今回は  $\Delta mtn(Kn::R)$  とする。15ml の LB 培地に、0.5~1%前培養液を加え、37°C で振とう培養する。その後、OD~0.5 で 5000rpm 5min で集菌し、1ml LB 培地(10mM  $CaCl_2$ )で再懸濁する。ここに挿入断片を持ったファージを 50 $\mu$ l 加え、37°C で 15min 振とうする。これにより、受け手側の大腸菌に挿入断片が組み込まれる。その後 on ice で 15min 静置し、40% Sodium Citrate 400 $\mu$ l を加えたら 1.5ml チューブに移して 12000rpm 1min で集菌する。上清をピペットで完全に取り除き、EHA 培地を 700 $\mu$ l 加え、12000rpm で 1min 遠心し、上清をデカンテーションで捨てる。もう一度 EHA 培地を 700 $\mu$ l 加え、12000rpm で遠心し 1min 遠心して上清をデカンテーションで捨てる。以上の操作で培地中に含まれる余分なファージを除去し、ファージによる溶菌が起こることを防ぐ。その後 EHA 培地 500 $\mu$ l で再懸濁し、37°C で 1hr 振とうし、EHA Plate(Kn,Cm)に全量をまく。これにより、目的断片が組み込まれた菌

のみをセレクションする。その後、single colony isolation を二回行い、コロニーを選別する。

#### LB TOP

20mM	Hepes-KOH (pH7.6)
500mM	KCl
5mM	MgCl <sub>2</sub>
7mM	β-Me

#### EHA 培地

1.3%	tryptone
0.8%	NaCl
0.15%	glucose
1%	Sodium Citrate

### pBAD 発現系による過剰発現株の作成

*dbpA* や *rlmE* などの過剰発現株を作成するため、pBAD 発現系を用いた。

#### (1)実験原理

pBAD vector は L-arabinose により発現が誘導され、逆にグルコースによって発現が抑制される pBAD promoter により目的タンパク質の発現を調節することのできるベクターである。このベクターを用いることによって大腸菌内における目的タンパク質の過剰発現の影響を、細かく濃度を区切って分析することができる。また、このベクターは pET28a などの発現用のベクターに比べ比較的安定に菌体内に存在することができるため、toxic であったり、ほかの生物由来であったりするタンパク質を発現させたときの生育に与える影響を分析することができる。

#### (2)実験手法

まず、目的の遺伝子を組み込んだ pBAD vector を作成する。この操作は、制限酵素サイトなど一部を除いてリコンビナントタンパク質の精製の項で述べる pET28a vector の作成と同様である。次に、vector の受け手側の菌体についてコンピテントセルを作成する。受け手側の菌体を 2ml LB 培地で前培養 O/N したのち、25mlSOB 培地に 1/100vol 加える。その後、37°C 130rpm で培養し、OD~0.5 で 4500rpm 4°Cで 20min 遠心し、上清をピペットマンで完全に捨てる。7.5ml の冷やした CCMB でピペッティングにより穏やかに再懸濁した後、on ice で 20min 静置する。その後 4500rpm 4°Cで 20min 遠心し、上清を捨てる。1ml CCMB で穏やかに再懸濁後、速やかに 1.5ml エッペンに 100µl ずつ分注後液体窒素で凍結させ、-80°Cで保存する。

その後の transformation の操作も基本的にはリコンビナントタンパク質の精製の項で述べた pET28a vector の作成と同様である。ただし、pBAD vector は Ampicilin 耐性遺伝子を持っていることに留意する。

### CCMB

80mM	CaCl <sub>2</sub>
20mM	MnCl <sub>2</sub>
10mM	MgCl <sub>2</sub>
10mM	KOAc
10%	glycerol

### SOB 培地

0.5%	yeast extract
2%	tryptone
10mM	NaCl
2.5mM	KCl
20mM	MgSO <sub>4</sub>

実際に作るときは 28g Difco SOB medium(BD)を 1L milliQ に加え、オートクレーブすることにより作成した。

## pcp20 plasmid による抗生物質耐性カセットの除去

三重欠損株等を作成するために、pcp20 plasmid による抗生物質耐性カセットの除去を行った。

### (1)実験原理

pcp20 plasmid は FLP recombinase をコードしている plasmid である。菌体に transformation することで FLP recombinase が発現し、FRT サイトに挟まれた遺伝子を除去する。Keio collection などの株では欠損株の作成に FLP を用いているため、抗生物質耐性遺伝子の両端に FRP が存在している。そのため、この plasmid を用いることで抗生物質耐性遺伝子を除去することができる。また、この plasmid は複製起点が高温感受的なため、42°Cで培養することによって plasmid を完全に除去することができる。この plasmid を用いて抗生物質耐性を除去する際は、その株が FLP recombinase で作成されたものであることを確認する。

### (2)実験手法

まず、目的の株に対して pcp20 plasmid を transformation する。Pcp20 は Ampicilin 耐性を持つため、LB plate (Amp)にまき、30°C O/N incubate する。このとき、37°Cに plate を置くと plasmid が除去され菌体が全く生えなくなってしまうため注意する。Incubate 後の plate からコロニーをいくつかつつき、菌体の希釈系列を作って LB plate にスポットする。この Plate を 42°Cで O/N incubate して pcp20 plasmid を除去する。その後、Incubate 後の plate からコロニーをいくつかつつき、菌体の希釈系列を作って LB plate、LB plate (Amp)、LB plate (Kn(除去した抗生物質耐性遺伝子にあたるもの))の 3 種類の LB plate にスポットする。37°Cで O/N incubate したのち、LB plate で生えているが、抗生物質入りの Plate では生えていない株が目的の株となる。この株に P1 transduction 等で欠損を導入することで、多重欠損株を作成できる。

## 大腸菌の培養及び集菌

LB 培地は以下のような成分を milliQ にとかし、オートクレーブで滅菌して作成した。

### LB 培地

1%	Tryptone
0.5%	Yeast Extract
1%	NaCl

また、M9 培地は以下のようにして作成した。

### 5X M9 Salt

64g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
15g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2.5g	NaCl
5g	NH <sub>4</sub> Cl

これらを 1L の milliQ に溶かし、オートクレーブまたはフィルター滅菌する。

### M9 培地 1L

0.8%	12.5mM CaCl <sub>2</sub> (f.c 100µM)
0.2%	1M MgSO <sub>4</sub> (f.c 2mM)
20%	5X M9 salt
2%	20% Glucose (f.c 0.4%) もしくは 10% glycerol を 4% (f.c 0.4%)

オートクレーブした milliQ 770mL に対して上のような比率で各試薬を加える。ただし、CaCl<sub>2</sub> と MgSO<sub>4</sub> は高濃度で混合すると沈殿が生じる可能性があるため、CaCl<sub>2</sub> の添加後は一度よく混合してから MgSO<sub>4</sub> を添加する。また、アミノ酸を加える場合は 400µg/ml のアミノ酸 mix(Cys-, Met-)を作成したうえで 1/10 量を M9 培地作成時に添加する。Methionine を加える場合は 8mg/ml のメチオニンを作成し、1/200 量を M9 培地作成時に添加する。

プレートを作成するときは、以上の培地に対して終濃度で 1.5%の Agar を溶かし、丸底プレート等に固めた。ただし、M9、抗生物質、アミノ酸等は混ぜた状態でオートクレーブすると構造が壊れたり沈殿したりするので、あらかじめフィルター滅菌等で滅菌したものをオートクレーブした Agar 溶液に後から添加していく。

抗生物質は Kanamycin(Kan)、Ampicillin(Amp)、chloramphenicol(Cm)を用いた。特に記載のない場合終濃度が Kan は 50µg/ml、Amp は 100µg/ml、Cm は 20µg/ml となるように培地に添加する。

基本的な培養条件は以下の通り。2~10ml 程度の LB 培地に抗生物質を添加し 37°C Overnight (O/N) で振とう培養し、full growth まで生育させる。本培養液に対して前培養液を 0.5%~1%加え、130rpm で振とう培養する。菌体の生育を見る必要がある場合は生育速度に合わせて 30min~2 hr おきに培地の OD600 を測定する。菌体回収は基本的に mid log phase にあたる OD600~0.5 の菌体を回収する。これ

は細胞の活動及びリボソーム生合成が mid log phase において最も活発であるためである。ただし、必要がある場合は late log phase (OD600~1.0)や stationary phase (OD600~3.0)の菌体も回収した。回収した菌体は 5000G で 10 min 遠心し、上清を捨て、液体窒素で冷凍し-80℃で保存した。

### Plate での Growth 測定

野生株と変異体の生育を簡便に比較するため、プレートでの生育比較実験を行った。まず、2mL 程度の抗生物質を添加した LB 培地で各菌体を 37℃ Overnight (O/N)で振とう培養し、full growth まで生育させる。その後 OD600 を測定して各菌体について培養液の希釈系列を作り、Plate に対して 5 $\mu$ L 添加して乾かす。その後一定の温度でプレートを置き、培養してコロニー形成の速度を図ることで生育を比較する。M9 培地に添加する場合は全培養液中の余分な栄養分を取り除くため回収した前培養液を少なくとも 2 回 autoclave 済みの milliQ で洗浄する。

### 菌体中のリボソーム抽出(lysozyme 抽出)

細菌は通常分厚い細胞壁をもっており、これを破壊しなければ内部の成分を解析することができない。こうした場合、凍結融解法と lysozyme による細胞壁処理を組み合わせることで、比較的簡便にリボソームを含む細胞内液を抽出することができる。ただし、lysozyme はマグネシウム濃度が高いと活性が低下するため、会合条件(Mg<sup>2+</sup>=10mM)のサンプルでは回収率が大きく落ちる。この場合、アルミナを使ったリボソーム抽出も検討する。

#### (1) 実験原理

Lysozyme は細菌の細胞壁の硬いペプチドグリカン層を分解する酵素である。大腸菌をはじめとするグラム陰性菌ではペプチドグリカン層の外側にリポ多糖で構成された外膜があるため、lysozyme のみでは完全に細胞壁を破壊することはできない。しかし、lysozyme 処理後の細胞は非常にろい構造となっており、この細胞に凍結と融解を繰り返すことで外膜を破碎し、細胞内液を抽出することができる。

#### (2) 実験手法

まず、目的の菌体を培養、回収する。LB 培地で培養した菌体の場合、OD~0.5 で 25mL 程度を目安とする。回収した菌体を RBS Buffer 1mL で再懸濁し、50mg/ml lysozyme 30 $\mu$ L を加え転倒攪拌後 30min 氷上で反応させる。その後菌体を液体窒素で凍結し、氷水上で 1.5~2hr 程度静置し、融解させる。この凍結と融解の操作を 3~5 回繰り返したのち、15000rpm 4℃で 20min 遠心し、上清を回収する。リボソーム及び核酸夾雑物の濃度は Genespec を用いて 260nm の吸光度によって測定する。

#### RBS Buffer(解離条件)

20mM	Hepes-KOH (pH7.6)
0.5mM	Mg(OAc) <sub>2</sub>
200mM	NH <sub>4</sub> Cl
6mM	2-メルカプトエタノール( $\beta$ -Me)

会合条件では Mg(OAc)<sub>2</sub> を 10mM、NH<sub>4</sub>Cl を 100mM とする。



## SDG によるリボソーム分画

シヨ糖密度勾配法(Sucrose density gradient(SDG))という方法を用いて lysate 中から各リボソーム粒子を分画する。

### (1) 実験原理

リボソーム粒子は各粒子間での分子量や密度の差が小さいので、通常の遠心によるペレットダウンでは分画が困難である。密度勾配遠心法はこうした粒子を比重ごとに細かく分画するのにもちいられる。シヨ糖などの連続的な密度勾配を遠心チューブ中に作成しておき、その上に全体量の数%程度のサンプルを重層して遠心する。遠心中サンプルはその大きさや密度に従い沈降するが、最終的に周囲の比重とみずからの比重が等しくなる位置でとまる。このときバンドができる位置は成分の形や分子量にはよらず、比重のみによる。このような方法は平衡遠心法と呼ばれる。

### (2) 実験手法

まず、BIOCOMP の Gradient mate を用いてシヨ糖の密度勾配を作製する。チューブは SETON の polyclear centrifuge tubes (14×89mm(SW-41 用)または 25×89mm(SW-28 用)、エスケーバイオから購入)を用いる。Gradient mate 付属の道具を用いて centrifuge tubes に線を引き、Gradient mate 上に載せる。Gradient mate を 水平化したのち、チューブ内に 10%(w/v) sucrose 入りの RBS Buffer を線の位置まで入れる。その後シリンジと付属の針を用いて 40%(w/v) sucrose 入りの RBS Buffer をチューブの底からゆっくりと注入する。この際用いる RBS Buffer は載せるサンプルと同じ組成とする。40%(w/v) sucrose 入りの RBS Buffer が真ん中の線まで達したら針を取り出し、付属のキャップで泡が残らないようにふたをする。Gradient mate で条件を設定して Gradient を作成し、終了したら 4℃部屋で 30min 以上冷やしておく。Gradient 条件は SW-41 用の場合は Time 1:46、Angle 80°、SPEED17、"END of RUN"である。また、SW-28 用の場合は Time 2:50、Angle 50°、SPEED25 で一度回転させた後、Time 0:36、Angle 75°、SPEED22、"END of RUN"で完了する。論文等で別の条件が指定されている場合はそちらに従う。

30min 低温室で静置した密度勾配に対してサンプルをロードする。ロード量は SW-41 用の場合は RNA 200 $\mu$ g 分、SW-28 用の場合は RNA 600 $\mu$ g 分である。また、ロードする液量が SW-41 用の場合は 300 $\mu$ l、SW-28 用の場合は 1ml を超えないようにする。サンプルを載せた密度勾配をスイングローター(Beckman の SW-41 または SW-28)にセットし、ローターを超遠心機(Beckmann Optima L-90K)に入れる。遠心条件は SW-41 の場合、37000rpm、5hr、4℃、SW-28 の場合、20000rpm、14hr、4℃となる。

超遠心後の密度勾配を BIOCOMP の Piston Gradient Fractionator を用いて解析する。リボソーム及び核酸夾雑物の位置は 260nm の吸光度によって測定する。

## 菌体中のリボソーム抽出(アルミナ抽出)

会合条件(Mg<sup>2+</sup>=10mM)のサンプルを回収する場合や、大量の菌体からリボソームを回収する場合、lysozyme をもちいてリボソームを抽出するのは困難である。また、変異体の中には細胞壁の構造が変化していると考えられるものもあり、こうした場合も lysozyme をもちいた方法は使いづらい。このようなときは、アルミナ(Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)を用いて菌体を破碎し、リボソームを抽出することができる。また、この方法の場合より精製度の高いリボソーム抽出物を得ることができる。

## (1)実験原理

アルミナにより細胞壁を破碎し、細胞内液を抽出する。抽出した細胞内液を遠心にかけて、リボソーム画分をえる。このとき、適当な速度で遠心することで、リボソームに比べ分子量の小さいタンパク質や tRNA などを除去することができる。

## (2)実験手法

まず、目的の菌体を培養、回収する。得られたペレットを菌体量にたいして 2~3 倍量のアルミナと乳鉢を用いて白いペレット状になるまでよくすりつぶして混ぜ、あらかじめ冷やしておいた RBS Buffer A で再懸濁する。再懸濁溶液を 7000rpm 4°C で 30min 遠心し、細胞壁などの分子量の大きなデブリを落とし、上清を回収する。

次に超遠心機を用いてリボソーム画分を回収する。ローターは Beckman 70Ti を用いる。溶液を 25ml 程度に調整してチューブに泡が残らないように入れ、ローターにセットし、19500rpm, 4°C で 45min 超遠心する。この操作により、先の遠心で落ちなかった分子量の大きいデブリを除く。上清を回収し、DNase(RQ1 DNase (RNase Free)(Promega))を 70U 分加える。これにより、ゲノム DNA 断片がコンタミすることを防ぐ。そして 35000rpm, 4°C で 4hr 超遠心し、リボソームをペレットダウンさせる。上清を除いた後、得られたペレットを RBS Buffer B で数回共洗いしたのち、リボソームの量に合わせて RBS buffer B を 300 $\mu$ l~1ml 程度添加する。RBS Buffer を加えたのち氷上で 1hr~2hr 程度振とうして再懸濁し、6000rpm, 4°C で 15min 遠心して不溶性部分を取り除く。上清が Crude ribosome である。リボソームの濃度は Genespec を用いて 260nm の吸光度によって測定する。

### RBS Buffer A

20mM	Hepes-KOH (pH7.6)
10mM	Mg(OAc) <sub>2</sub>
30mM	NH <sub>4</sub> Cl
6mM	2-メルカプトエタノール( $\beta$ -Me)

### RBS Buffer B

20mM	Hepes-KOH (pH7.6)
0.5mM	Mg(OAc) <sub>2</sub>
200mM	NH <sub>4</sub> Cl
6mM	2-メルカプトエタノール( $\beta$ -Me)

会合条件では Mg(OAc)<sub>2</sub> を 10mM、NH<sub>4</sub>Cl を 200mM とする。

リボソームプロファイルを観察する場合は、この後前述した条件に従い SDG でリボソームを分画する。rRNA 修飾率の網羅的な解析や Tricine SDS PAGE で用いるリボソーム粒子を精製する場合は、以下のような条件で分画を行った。まず GRADIENT MATE(BIO COMP)を用いて 10%-50% sucrose gradient を作成する。密度勾配用チューブに 10%(w/v)sucrose 入り RBS Buffer B と 50%(w/v) sucrose 入り RBS Buffer B を重層させ、Time 4:55、Angle 50°、SPEED30、"END of RUN"で Gradient を作成した。その後、Crude ribosome を 1200 $\mu$ g 分(30OD)だけ 10%-50% sucrose gradient にロードし、

Beckman SW-28 を用いて 25000rpm,4°C で 15hr 超遠心する。得られた試料を BIOCAMP の Piston Gradient Fractionator を用いて分画する。この際、SPEED 0.2、DIST 0.8、NUMB 90 のように設定することで、分画の回収が容易になる。96 穴プレートに分画を回収し、それぞれの分画 20 $\mu$ l を milliQ180 $\mu$ l と 96 穴 UV 透過プレート上で混ぜ、260nm での吸光度を測定することで各リボソーム粒子のピークを決定する。各リボソーム粒子の分画を回収し、1vol の RBS Buffer C を加えて Mg 濃度及び NH<sub>4</sub> 濃度を調節する。その後 RBS Buffer D で液量を調節し、Beckman 70Ti を用いて 40000rpm,4°C で 24hr 超遠心することで各リボソーム粒子をペレットダウンする。得られたペレットを Crude ribosome の場合と同様に RBS Buffer E で共洗い、再懸濁する。液量は 300 $\mu$ l 程度とする。1.5ml エッペンに移して 6000rpm,4°C で 15min 遠心して上清を回収し、-80°C で保存する。得られたリボソーム粒子の濃度は 260nm での吸光度を測定することで決定した。

#### RBS Buffer C

20mM	Hepes-KOH (pH7.6)
19.5mM	Mg(OAc) <sub>2</sub>
0mM	NH <sub>4</sub> Cl
6mM	2-メルカプトエタノール( $\beta$ -Me)

会合条件では Mg(OAc)<sub>2</sub> を 10mM とする。

#### RBS Buffer D

20mM	Hepes-KOH (pH7.6)
10mM	Mg(OAc) <sub>2</sub>
100mM	NH <sub>4</sub> Cl
6mM	2-メルカプトエタノール( $\beta$ -Me)

#### RBS Buffer E

20mM	Hepes-KOH (pH7.6)
0.5mM	Mg(OAc) <sub>2</sub>
100mM	NH <sub>4</sub> Cl
6mM	2-メルカプトエタノール( $\beta$ -Me)

会合条件では Mg(OAc)<sub>2</sub> を 10mM、NH<sub>4</sub>Cl を 200mM とする。

### **Tricine SDS-PAGE を用いた L36 の解析**

リボソーム中に存在するタンパク質の定量として、SDS-PAGE による分画と、MASS を用いた定量法が一般に用いられる。しかし、L36 は分子量が 3kDa 程度と小さく SDS-PAGE による分画ができず、MASS による解析でも特異的な断片を検出することができない。そこで、Tricine SDS-PAGE という分子量の小さいタンパク質を分画できる方法を用いて L36 の存在量を解析した。

#### **(1)実験原理**

一般的な SDS-PAGE で用いられる Glycine はゲル中で比較的ゆっくりと泳動する。そのため、分

分子量の小さいタンパク質は Glycine の泳動が律速となって互いに分離できない。一方、Tricine は Glycine に比べ速い速度で泳動されるため、分子量の小さいタンパク質でも互いに分離するだけの余地ができる。これによって、Tricine SDS-PAGE では 1kDa 程度のタンパク質まで分離することができる(Schägger and von Jagow, 1987)。

## (2)実験手法

まず、各サブユニットからタンパク質をアセトン沈殿で抽出する(Barritault et al., 1976)。分画した各リボソーム粒子 40 $\mu$ g を RBS Buffer E で 200 $\mu$ l に調整し、1/10vol の 1M Mg(OAc)<sub>2</sub>を加える(f.c 100mM)。その後、440 $\mu$ l の AcOH を加え(f.c 66%)、ローレーターを用いて 4 $^{\circ}$ C で 45min 攪拌する。その後、10000g,4 $^{\circ}$ C,30min 遠心し、上清を回収して 5mL エッペンに移す。3.3ml(5vol)の氷冷アセトンを加え、ボルテックス後-30 $^{\circ}$ C で O/N 静置する。その後 10000g,4 $^{\circ}$ C,30min 遠心し、上清をピペットマンで完全にのぞき、デシケーターで 30min 乾燥後、30min 風乾する。ペレットを 250mM Tris-HCl (pH6.8)で 3 倍希釈した SDS-PAGE 用 loading solution 10 $\mu$ l で再懸濁する。この際、アセトンが十分に除けていないとサンプルが黄色に変色してしまう。Load する直前にサンプルは 40 $^{\circ}$ C で 30min ボイルする。

ゲル作成は先行研究のものにしたがう(Schägger, 2006)。まず、以下の組成の Buffer を作成する。

### 10X Anode Buffer

2 M                    Tris  
                          HCl (pH8.9 になるまで加える)

### 10X Cathode Buffer

1 M                    Tris  
1 M                    Tricine  
1%                    SDS  
pH はおよそ 8.33 になる

### Gel Buffer

3 M                    Tris  
0.3 %                SDS  
                          HCl (pH8.45 になるまで加える)

### Acrylamide stock solution (49.5% T, 6% C) 100mL

46.5g                acrylamide  
3g                    bisacrylamide  
milliQ で 100mL に調整

つづいて、16 $\times$ 16 $\times$ 0.1cm のゲル板に下から順に separating gel、約 1cm の spacer gel、約 1cm の stacking gel を作成した。各ゲルの組成は以下の通りである。

#### Separating gel (18%T)

6.7mL	Gel Buffer (1/3 vol)
7.3mL	Acrylamide stock solution
7.2g	Urea (f.c 6mM)
milliQ で 20mL に調整	
35μL	40% APS
12μL	TEMED

#### Spacer gel (10%T)

3.3mL	Gel Buffer (1/3 vol)
2mL	Acrylamide stock solution
milliQ で 10mL に調整	
15μL	40% APS
7μL	TEMED

#### Stacking gel (4%T)

2.5mL	Gel Buffer (1/4 vol)
0.8mL	Acrylamide stock solution
milliQ で 10mL に調整	
35μL	40% APS
16μL	TEMED

サンプルを 1/3 量ロードし、Stacking gel 中では 30V (1hr~1.5hr)、その後は 90V で 15 時間泳動する。泳動後のゲルは SYPRO Ruby (Molecular Probes) を使用してメーカーのプロトコルに従って染色し、結果は FLA7000 (Fujifilm) で結果を確認した。

### **Western blotting**

様々な生育条件下における RlmE の発現量を調べるため、Western blotting により菌体中の RlmE 量を測定した。

#### **(1) 実験原理**

Western blotting は抗体を用いて抗原となるタンパク質を検出・定量する方法である。今回の実験では菌体中から total protein を抽出し、bradford assay で濃度を測定した後同じ量を SDS-PAGE で電気泳動し、分子量に従って分離する。その後ブロティングマシン(Transblot SD)を用いてゲル中のタンパク質を Western blotting に用いるメンブレンに転写し、抗原抗体反応により標識のついた抗体を目的タンパク質に結合させて検出する。今回は、内在の遺伝子の C 末端側に SPA tag が付加された SPA 株(Dharmacon)を用いて実験を進める(Zeghouf et al., 2004)。この株は内在の遺伝子が発現すると C 末端側に SPA tag が付加された形で発現される。この SPA tag には flag tag が含まれて

いるため、flag 抗体を用いることによって検出することができる。

## (2)実験手法

DbpA-SPA 株を 37°C で 2ml 前培養 O/N する。その後、LB 培地 25ml に対して前培養液を 1/200vol 加え、130rpm で、各温度で培養する。OD600 が 0.5 に達したら 5mL 菌体を回収し、遠心して培地を除いた後、液体窒素で凍らせて -80°C で保存した。

5ml 培地分の菌体ペレットを Lysis Buffer 200 $\mu$ l で再懸濁する。その後、intensity 3、pulse 5sec、duty 20% で 3min sonication にかけて、菌体を破碎する。菌体抽出液のうち 5 $\mu$ l を Bradford 測定用に移した後、残りの液に 100 $\mu$ l の 3X SDS loading solution を加え、よく混合する。この操作により、菌体中に含まれる酵素を失活させ、DbpA が分解されるのを防ぐ。その後 95°C で 5min 熱し、液体窒素で凍らせて -80°C で保存した。

Bradford 測定の結果に従い、各サンプル 5 $\mu$ g タンパク質分のサンプルを 2 枚の 10%SDS PAGE に流す。そのうち 1 枚は CBB 染色し、すべてのサンプルでタンパク質の量がそろっているか確認する。もう一枚は Western blotting により DbpA-SPA を検出する。Western blotting に用いる Amersham Hybond-P (GE health care) 1 枚とろ紙 8 枚をブロッキングするゲルと同じ大きさに切断する。メンブレンは 100%メタノールに 30 秒ほど浸したのち、Anode buffer に浸して 30 分間浸透する。ろ紙は 4 枚を Anode buffer に浸し、残り 4 枚を Cathode buffer に浸しておく。

ゲルの電気泳動終了後、ブロッキングマシン(Transblot SD)の Anode 側に Anode Buffer をわずかにたらし、Anode buffer に浸したろ紙 4 枚を重ね、さらにメンブレン、ゲル、Cathode Buffer に浸したろ紙 4 枚の順に重ねる。ラップを上から重ねてローラー等を用いて空気を抜いた後ブロッキングマシンを組み立て、メンブレンの面積(cm<sup>2</sup>)あたり 1.5 mA の電流を 45 分間流し、メンブレンにタンパク質を転写させる。次に、ブロッキングしたメンブレンを 1X Ez Blocking Buffer 50ml に浸し 30min 振とうしてブロッキングする。

Can Get Signal Sol II で 6000 倍希釈した抗体 aut: DDDDK-HRP とメンブレンをパックに入れてとじ、37°C で 1 時間抗原抗体反応させた。その後 TBST Buffer で 3 回すすいだのち、3 回 10min 振とうして洗浄し、余分な抗体を除去する。検出試薬(pierce western blotting substrate plus)を 2mL 程度加え、室温で 3 分間静置し、Image Quant LAS-4000mini (GE health care)で化学発光を撮影した。

### Lysis Buffer

20mM	Hepes-KOH(pH7.6)
100mM	KCl
200 $\mu$ M	PMSF
6mM	2-メルカプトエタノール( $\beta$ -Me)

### 3X loading solution

113mM	Tris-HCl(pH6.8)
14.3%	Glycerol
0.184mg/ml	BPB
36g/L	SDS

### 10X Tris/CAPS Buffer

600mM	Tris
400mM	CAPS

### Anode Buffer

10%	10X Tris/CAPS Buffer
15%	メタノール
75%	MilliQ

### Cathode Buffer

10%	10X Tris/CAPS Buffer
0.1%	SDS
89.9%	MilliQ

### 10X TBS Buffer

250mM	Tris-HCl(pH7.5)
1.5M	NaCl
27mM	KCl

### TBST Buffer

10%	10X TBS Buffer
0.2%	Tween20

### 1X Ez Blocking Buffer

20%	5X Ez Blocking Buffer
80%	TBST Buffer

## リコンビナントタンパク質の精製

*in vitro* 酵素反応で用いるタンパク質は大腸菌を宿主とした発現系で大量発現し、精製した。Plasmid 発現用の菌体として DH5 $\alpha$  を、タンパク質発現用の菌体として BL21(DE3)を用いた。また、発現用プラスミドとしては pET28a を用いた。タンパク質の発現は Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)により行い、発現したタンパク質は His-tag カラムを用いて AKTApurifier で精製したのち、MonoQ カ

ラムを用いて核酸の除去を試みた。RlmE、DbpA、YxiN はこの方法で精製し、Upf1 は当研究室の岡田俊平博士よりいただいた。

## (1)実験原理

宿主として大腸菌を、タンパク質発現用のプラスミドとして pET28a を用いる。プラスミドはバクテリア細胞内においてゲノム以外に独立して存在し、子細胞に受け継がれることのできる環状 DNA である。プラスミドは transformation によって容易に外部から菌体内に取り込ませることができる。その際、抗生物質耐性遺伝子をプラスミド上にコードしておくことで、プラスミドを取り込んだ菌体をセレクションすることができる。また、マルチクローニングサイトと呼ばれる制限酵素切断配列が集まった部位があり、任意の制限酵素を用いて目的遺伝子をクローニングすることができる。pET28a はカナマイシン耐性遺伝子をコードしており、今回、制限酵素は NdeI と XhoI を主に用いた。この部分に遺伝子を組み込むことにより、N 末端にトロロンビン認識配列(Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser)と His6-tag 配列のついたタンパク質をコードすることができる。トロロンビンを用いることで His-tag を除くこともできるため、得られたタンパク質の活性が his-tag の影響で落ちていた場合はトロロンビンを用いて除去することができる。また、上流には T7 promoter が存在しており、T7 polymerase によって転写発現されるようになっている。

宿主の大腸菌は DH5α および BL21(DE3)を用いる。DH5α は形質転換効率が高く、またプラスミドの切断や変異が起りにくくなっており、安定してプラスミドを増やすことができる。BL21(DE3)はゲノム上にラクトースオペロン制御下の T7 polymerase がコードされており、IPTG 添加により T7 polymerase を発現し、プラスミド上にコードされた遺伝子を転写、発現することができる。別の生物のタンパク質などでは、レアコドンを補うことのできる resetta 株などを用いる。

タンパク質の精製は AKTA purifier を用いて His-tag 精製によりおこなう His trap column はニッケルを固定化することのできるカラムで、これを His-tag 精製に用いる。His-tag 配列はニッケルイオンをキレートするため、His-tag 配列のついたタンパク質は担体に結合し、ほかのタンパク質は洗い落とされる。その後、イミダゾールを添加することで、イミダゾールがタンパク質を置換し、担体から外すことで His-tag 配列のついたタンパク質を高い純度で回収することができる。

また、精製後のタンパク質に結合する核酸を除去するため、MonoQ による精製も行った。これは陰イオン交換クロマトグラフィーの原理を用いたカラムで、カラム上の四級アミノ基により負に帯電した分子を結合する。これにより、タンパク質に比べ強く負に帯電している核酸を分離、除去することができる。

## (2)実験手法

### ① 目的遺伝子配列を含むプラスミドの作成

まず、目的遺伝子の insert を Template DNA から PCR 法で増幅させる。Template は大腸菌の遺伝子の場合は *E. coli* genome、枯草菌の遺伝子の場合は *B. subtilis* genome を用いた。これらはいずれも荒井大河博士からいただいた。反応溶液および PCR サイクルは下のようにする。遺伝子配列の長さに従い伸長サイクルの長さは調整する。



### 反応条件

10X KOD-plus Buffer	5 $\mu$ l
2mM dNTPs	5 $\mu$ l
25mM MgSO <sub>4</sub>	2 $\mu$ l
DMSO	5 $\mu$ l
Template	3 $\mu$ l (100ng 程度)
10 $\mu$ M each Primer	1.25 $\mu$ l $\times$ 2
<u>milliQ</u>	<u>26.5<math>\mu</math>l</u>
total	50 $\mu$ l

### PCR cycle

1. 94 $^{\circ}$ C      2min
  2. 94 $^{\circ}$ C      30sec
  3. 57.5 $^{\circ}$ C    30sec
  4. 68 $^{\circ}$ C      20sec
- 2~4 のサイクルを 30 回繰り返す

増幅した insert は Fast Gene Plasmid mini kit を用いて精製(QIA quick)し、5 $\mu$ l 程度をアガロースゲルに流して増幅されていることを確認した。

増幅させた insert と vector を制限酵素で処理する。vector は 1 種類のタンパク質について 100fmol 程度、insert は 1500fmol 程度用意する。Vector はすべて pET28a を用いた。反応条件は下の通り。

### 反応条件(vector)

Vector	100fmol
Buffer H	10 $\mu$ l
Nde1	4 $\mu$ l
Xho1	4 $\mu$ l
<u>milliQ</u>	<u>up to 100<math>\mu</math>l</u>
total	100 $\mu$ l

### 反応条件(insert)

Insert	1500fmol
Buffer H	5 $\mu$ l
Nde1	2 $\mu$ l
Xho1	2 $\mu$ l
<u>milliQ</u>	<u>up to 50<math>\mu</math>l</u>
total	50 $\mu$ l

↓37°C O/N

反応後のサンプルは QIA quick で精製する。

Insert と vector を 15:1(基本は 750fmol:50fmol)の割合になるように混ぜ、dry up して水分を飛ばす。その後 2.5 $\mu$ l の milliQ に溶かし、等量の 1 液を加え、16°C で 30min 静置する。このサンプルを DH5 $\alpha$  株 50 $\mu$ l に全量加えたのち氷上で 20min 置いた後 42°C で 45sec 処理し、また氷上に 2min 置く。全量を 500 $\mu$ l SOC 培地に入れ、37°C で 30min 振とうした後、全量を LB plate(Kan 50)にまき、37°C で O/N 培養する。

プレートからコロニーを複数個つつき、LB 2mL(Kan50)で培養する。培養した菌体から miniprep でプラスミド vector を回収する。まず菌体を遠心して集菌し、100 $\mu$ l P1buffer(QIAGEN)で再懸濁する。その後 100 $\mu$ l P2buffer(QIAGEN)を加え数回転倒攪拌し、5min 室温において置く。140 $\mu$ l P3buffer(QIAGEN)を加えたのち数回転倒攪拌して 15000rpm 10min 遠心し、上清を回収する。300 $\mu$ l の Buffer PB を加えボルテックスし、マルチスクリーン(Merck millipore)を用いて精製する。制限酵素処理によって insert の塩基長を確認後、fasmac に依頼して配列確認を行った。

### ② 大量発現

精製したプラスミドを BL21(DE3)株に対して transformation する。プラスミド 50ng 程度を BL21(DE3)株 50 $\mu$ l に加えたのち氷上で 10min 置いた後 42°C で 45sec 処理し、また氷上に 2min 置く。全量を 500 $\mu$ l SOC 培地に入れ、37°C で 30min 振とうした後、200 $\mu$ l を LB plate(Kan 50)にまき、37°C で O/N 培養する。

プレートからコロニーをつつき、LB 2mL(Kan50)で O/N 前培養する。発現条件の検討は 37°C 及び 18°C で、IPTG 濃度を終濃度 1mM ないし 0.1mM になるようにして検討した。各 LB3ml(Kan50)に対し前培養液を 1/100vol 程度加え、OD~0.5 になるまで 37°C で振とう培養する。その後 IPTG を加え、37°C の場合は 4 時間、18°C の場合は O/N 振とう培養する。菌体を回収後、Lysis Buffer 200 $\mu$ l で再懸濁し、intensity 3 pulse 5s duty 20% で 5 分間 sonication をし、8000G 4°C で遠心して上清およびペレットを回収する。ペレットは Lysis Buffer 200 $\mu$ l で再懸濁する。上清及びペレットを 10 $\mu$ l 程度 SDS-PAGE で流し、タンパク質が発現していること、可溶性画分に存在していることを確認する。RlmE の場合は 37°C、4hr 培養、DbpA の場合は 22°C、O/N 培養の条件で発現、可溶化がうまくいった。

発現条件等で得られた条件で大量培養する。プレートからコロニーをつつき、LB 10mL(Kan50)で O/N 前培養する。LB 1L(Kan50)に対し前培養液を 1/100vol 程度加え、OD~0.5

になるまで 37°C で振とう培養する。その後 IPTG を加え、37°C の場合は 4 時間、18°C の場合は O/N 振とう培養する。集菌後の菌体は液体窒素で凍らせた後 -80°C で保存した。

③ AKTA 精製(His-trap 精製)

集菌後の菌体(500ml 培養液相当分)を Lysis Buffer 10ml で再懸濁し、intensity 3 pulse 10s duty 20% で 15 分間 sonication をし、8000G 4°C で遠心して上清を回収する。さらに Beckman 70Ti を用いて 45000rpm 4°C で 1hr 超遠心し、上清を回収した。

AKTA purifier を用いて His-trap HP column(His-tag column)とイミダゾールグラジエントによって His6-tag 付 DbpA を精製する。まず AKTA A Buffer によって AKTA purifier 内の流路系を置換し、His-tag column を取り付ける。His-tag column に細胞抽出液を上から流し、His-tag のついたタンパク質のみをトラップする。その後、イミダゾールの入っている AKTA B Buffer を濃度勾配をつけて流すことで、目的タンパク質を単離する。タンパク質の溶出位置は SDS-PAGE を用いて確認した。その後、MonoQ にかける場合は MonoQ A Buffer で、そのまま保存する場合は Stock Buffer を用いて 3.5K MWCO Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes (Thermo Scientific)で一晩透析にかけてイミダゾールを除く。この際、必ず 1 回は Buffer を新しいものに入れ替える。タンパク質濃度は Bradford 法で測定し、タンパク質溶液は 10 本程度に子分注して液体窒素で凍らせたあと -80°C で保存した。

Lysis Buffer

20mM	Hepes-KOH(pH7.6)
500mM	KCl
1mM	PMSF
6mM	2-メルカプトエタノール( $\beta$ -Me)

AKTA A Buffer

20mM	Hepes-KOH(pH7.6)
500mM	KCl
6mM	2-メルカプトエタノール( $\beta$ -Me)

AKTA B Buffer

20mM	Hepes-KOH(pH7.6)
500mM	KCl
500mM	Imidazole
6mM	2-メルカプトエタノール( $\beta$ -Me)

### Stock Buffer

20mM	Hepes-KOH(pH7.6)
500mM	KCl
6mM	2-メルカプトエタノール( $\beta$ -Me)
10%	グリセロール

KClの濃度はタンパク質の種類によって変化させた。DeaDの場合には塩濃度が高くないと不安定なため、KCl=500mMのままだが、塩濃度が低くても安定なタンパク質はKCl濃度を下げてもよい。

#### ④ AKTA 精製(MonoQ 精製)

His tran 精製後のタンパク質を MonoQ A buffer で透析し、塩濃度を下げる。この際、急激に塩濃度を下げるとタンパク質が析出しやすくなるため、場合によっては1度中間の塩濃度 (KCl:250mM など) で透析したうえで、再度 MonoQ A buffer で透析する。MonoQ を使う際は、MonoQ A buffer の塩濃度で目的のタンパク質が完全に析出してしまうか事前に確認する。もし、50mMKCl で難しい場合は、A Buffer の塩濃度を 100mM 程度まで上げてうまく分離できるときがある。また、タンパク質の等電点を確認し、Buffer の pH でタンパク質が府に帯電していることを確認する。(タンパク質の pI が Buffer の pH よりも小さい) もし、等電点が大きい場合は、MonoS を用いることを検討する。基本的な Buffer 条件は MonoQ の時と同様になる。

AKTA purifier を用いて MonoQ column と KCl グラジエントによって目的タンパク質を精製する。まず MonoQ A Buffer によって AKTA purifier 内の流路系を置換し、MonoQ column を取り付ける。MonoQ column にタンパク質溶液を上から流し、タンパク質及び核酸をトラップする。この時、FT には等電点の大きいタンパク質が出てくる。念のためこの FT も回収する。その後、塩濃度の高い MonoQ B Buffer を濃度勾配をつけて流すことで、タンパク質を等電点に従って分画する。核酸はタンパク質と比較して非常に遅い位置に出てくる。目的タンパク質の溶出位置は SDS-PAGE を用いて確認した。その後、Stock Buffer を用いて 3.5K MWCO Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes (Thermo Scientific)で一晩透析にかけてイミダゾールを除いた。この際、2hr 程度透析後、透析 Buffer を新しいものに取り換え、その後 O/N で再び透析にかける。タンパク質濃度は Bradford 法で測定し、タンパク質溶液は 10 本程度に子分注して液体窒素で凍らせたあと -80°C で保存した。

### MonoQ A Buffer

20 mM	Hepes-KOH (pH7.6)
50 mM	KCl
6 mM	2-メルカプトエタノール( $\beta$ -Me)

### MonoQ B Buffer

20 mM	Hepes-KOH (pH7.6)
1 M	KCl
6 mM	2-メルカプトエタノール( $\beta$ -Me)

### Differential radial capillary action of ligand assay (DRaCALA)

RlmE と AdoMet との Kd を測定するため、DRaCALA と呼ばれる実験を行った(Roelofs et al., 2011)。

#### (1)実験原理

ニトロセルロースメンブレンは、タンパク質を吸着する一方で、ATP や SAM といった小分子は膜内を浸透することができる。これを利用したのが DRaCALA 法である。この方法は、タンパク質と小分子で複合体を形成させた後、少量の溶液をメンブレン膜に滴下し、浸透させる。このとき、タンパク質及びタンパク質と複合体を形成している小分子は膜内を浸透することができず中央にとどまるが、単独で存在している小分子は膜内を浸透し外部に広がっていく。このときの中心部と外円部の小分子量を測定することで、タンパク質と小分子の解離定数を算出することができる。この実験の弱点として、小分子側の濃度を低く保ったうえで、タンパク質側の濃度を振っていくという点が挙げられる。この特徴から、タンパク質溶液は十分高濃度で精製する必要がある。このため、DbpA は反応条件では高濃度で不安定であるため測定できなかった。Kd 値 $\sim$ 250 $\mu$ M 程度の弱い相互作用の場合、十分な分析を行うのは困難だと考えられる。

#### (2)実験手法

AdoMet を検出するため、放射線標識した AdoMet (S-[methyl- $^{14}$ C]- AdoMet, Perkin elmer)を用いる。下のような反応条件で 10min 程度 r.t に置く。その後、5 $\mu$ l を Hybond-ECL メンブレン上に滴下し、15min $\sim$ 20min 程度自然乾燥するのを待つ。その後、プレートに O/N で現像し、FLA で解析する。

#### 反応条件

10X 反応 Buffer	1 $\mu$ l
2X Protein	5 $\mu$ l
5 $\mu$ M $^{14}$ C-AdoMet	1 $\mu$ l
<u>milliQ</u>	<u>up to 10<math>\mu</math>l</u>
total	10 $\mu$ l

↓r.t 5min

#### 10X 反応 Buffer

500mM	Hepes-KOH (pH7.6)
500mM	KCl
50mM	MgCl <sub>2</sub>
1mM	DTT

## RlmE による *in vitro* メチル化反応

RlmE の AdoMet に対する  $K_m$  を測定するため、*in vitro* メチル化反応を AdoMet 濃度を変えて行った。

### 反応条件

10X 反応 Buffer	2 $\mu$ l
10X RlmE	2 $\mu$ l (f.c 1 $\mu$ M)
10X AdoMet	2 $\mu$ l
基質リボソーム	10pmol
<u>milliQ</u>	<u>up to 20<math>\mu</math>l</u>
total	20 $\mu$ l

↓r.t 2hr

### 10X 反応 Buffer

500mM	Hepes-KOH (pH7.6)
500mM	KCl
50mM	MgCl <sub>2</sub>
1mM	DTT

反応後のサンプルから Trizol LS で rRNA を抽出し、以下の LC/MS を用いた rRNA 修飾率の解析と同様にして Um2552 修飾率の解析を LC/MS で行う。

リコンビナントタンパク質として回収した RlmE の吸光度を測定すると、260nm 付近に吸光がみられた。これは、RlmE に結合した AdoMet であると推測される。MonoQ 精製により RlmE から AdoMet を除去することを試みたが、うまくいかなかった。その結果、*in vitro* 反応において AdoMet-の条件でも 10%程度修飾が入ってしまった。この結果が与える影響をさらに詳しく調べるため、AdoMet=3mM の条件で Time course 実験を行った(図 2-13)。その結果、10min 以内に 10%程度修飾が入り、その後 120min かけて緩やかに修飾率が上昇していくことが分かった。この結果は、RlmE に結合した AdoMet を用いた修飾反応が 10min 程度の短い時間で完結する一方で、溶液中の AdoMet に依存した修飾反応は長い時間をかけてゆっくりと進行することを示唆している。そこで、AdoMet-を background とすることで、溶液中の AdoMet に依存した RlmE の修飾反応速度を計算し、RlmE の AdoMet に対する  $K_m$  を算出できるのではないかと考え研究を進めた。

## LC/MS を用いた rRNA 修飾率の解析

tRNA などと比べ rRNA は非常に長いため、RNase で切断し RNA 修飾を解析しようとするすると未修飾断片がほかの位置の断片と同じ配列となり、修飾率の計算ができなくなってしまう。そこで、先行研究 (Andersen and Douthwaite, 2006)を参考に DNA oligomer を用いて目的の修飾付近の rRNA を単離し、LC/MS を用いて修飾率を測定した。

## (1)実験原理

目的の rRNA 修飾の前後 25 塩基程度と相補鎖を組む DNA oligomer を設計し、rRNA とハイブリダイズさせる。その後温和な条件で RNase を反応させ、DNA と duplex を形成している部分以外を断片化し、ゲル切り出しにより目的修飾を含む DNA-RNA duplex のみを精製する。

## (2)実験手法

Trizol LS 等でリボソームから抽出した rRNA 20pmol を、200pmol の DNA oligomer および 20 $\mu$ L の 10X annealing Buffer (500mM Hepes-KOH, 1M KCl)と混合し、合計量が 200 $\mu$ L となるよう milliQ で調整する。オートサンプラーを用いて 90 $^{\circ}$ C で 5min インキュベート後-1 $^{\circ}$ C/min で 60min かけて徐冷し、その後 RNase T1 を 50 unit, RNase A を 50 $\mu$ g 加え、on ice で 1hr 反応させる。反応後の溶液に対し中性フェノール/クロロホルム(pH7.9)処理およびエタノール沈殿を行い、RNA および RNA-DNA duplex を回収する。

回収したサンプル全量を 15% Urea PAGE で 250V 1hr 泳動し、SYBR Gold で染色し DNA-RNA duplex のバンドを切り出し回収する。回収したゲル細片を 1.5mL エッペン内でゲルミキサーを用いてすりつぶし、Elution Buffer (1mM EDTA-NaOH(pH8.0), 0.1% SDS, 400mM NaOAc(pH5.2))を 400 $\mu$ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 5hr 振とうする。その後ウルトラフリーを用いてゲル片を取り除き、エタノール沈殿により精製する。

回収したサンプルのうち 1pmol 量に RNase T1 を 10 unit、50mM NH<sub>4</sub>OAc(pH5.2) 4 $\mu$ L を加え、milliQ で合計 10 $\mu$ L になるように調整し、37 $^{\circ}$ C で 1hr 反応させる。RNase A で反応させる場合は RNase A を 10ng、50mM NH<sub>4</sub>OAc(pH7.0) 4 $\mu$ L を加える。その後 100mM TEAA を 10 $\mu$ L(1vol)加え、全量 ORBITRAP で測定する。LC/MS の条件は先行研究(Suzuki et al., 2007)をもとにした。

DNA oligomer は表 2-2 にあるものを用いた。

## ヌクレオシド解析による tRNA 修飾の解析

WT と  $\Delta mtn$  での tRNA 修飾率の変化をヌクレオシド解析によって測定する。

## (1)実験原理

Total RNA を菌体からフェノールで抽出し、tRNA 画分を 15% Native PAGE で切り出し精製する。精製した tRNA 画分を、RNase P1、Phosphodiesterase I (PDase)、bacterial alkaline phosphatase (BAP kinase)で完全に断片化する。これを MASS で測定することによって修飾塩基の量を見積もることができる。ただし、この方法では同じ修飾塩基が複数の位置に存在した場合、どの修飾部位の修飾率が変化したかまでは判別することができない。また、その修飾が存在する tRNA の定常状態量が変化したという可能性も排除することができない。

## (2)実験手法

Trizol LS 等で菌体から抽出した total RNA 5 $\mu$ g を 15% Native PAGE にロードし、tRNA に当たるバンドを切り出し精製する。精製した tRNA 画分を 3段階の反応で完全に断片化する。まず、tRNA 画分(1 $\mu$ g) に 0.1 unit の RNase P1 を加え、37 $^{\circ}$ C、60min incubate する。その後、1M ammonium bicarbonate (pH 8.2)と PDase を 1 $\mu$ l ずつ加え、また 37 $^{\circ}$ C、60min incubate する。最後に BAP を

1 $\mu$ l 加え、37°C、60min incubate する。切断後のヌクレオシドを真空乾燥機で完全に dry up した後 90% acetonitrile に溶かし、Q Exactive で cHILIC カラムを用いて測定した。LC/MS の条件は先行研究(Sakaguchi et al., 2015)をもとにした。また、この条件では分離しない m1G と Gm については CAPCELL CORE ADME column (Osaka soda)を用いて解析した。LC/MS の条件は先行研究(Suzuki et al., 2007)をもとにした。

## 2-3, 実験結果

### $\Delta mtn$ 株では 45S 前駆体の蓄積が観察される

本研究では、細胞中の AdoMet 濃度低下の影響を調べるため、先行研究(Halliday et al., 2010)において AdoMet 濃度の顕著な減少 (WT:300  $\mu$ M,  $\Delta mtn$ : 100  $\mu$ M) が観察されている  $\Delta mtn$  株を用いた。この株の生育を LB plate で調べると図 2-1 のように顕著な生育阻害が観察された。さらに、この生育の変化を各温度において液体 LB 培地で培養し log phase における倍加時間 (doubling time) を測定すると、特に低温条件下において顕著な生育阻害を示すことが明らかとなった(図 2-2)。この生育阻害が、遺伝子欠損の際にほかの遺伝子の発現に影響を与えたことによる極性効果 (polar effect) ではないことを示すため、pBAD\_plasmid に *mtn* 遺伝子をクローニングし、欠損株中で過剰発現することによって生育が回復するかを解析した。その結果、図 2-3 に示すように、*mtn* を相補することによって *mtn* 欠損株でみられていた生育阻害が完全に回復した。この結果は、*mtn* の欠損が、生育の悪化の直接的な原因であることを示している。

さらに、*mtn* 欠損が細胞中のリボソーム生合成に影響を与えるか解析するため、22°C で培養した菌体からリボソームを抽出し、SDG 法によりリボソーム分画を観察した(図 2-4)。まず、Mg<sup>2+</sup>:0.5 mM の条件 (解離条件) では、WT においては解離した 30S、50S サブユニットが観察される。このとき、 $\Delta rlmE$  では 30S と 50S の間に 45S 前駆体の蓄積がみられ、50S サブユニットの蓄積量が減少する。興味深いことに、解離条件において  $\Delta mtn$  でも同様に 45S 前駆体と沈降係数が近いリボソーム粒子の蓄積 (45S 粒子) が観察された。さらにこの粒子のマグネシウム依存的な密度変化を解析するため、Mg<sup>2+</sup>:10 mM の条件 (会合条件) においても解析を行った。会合条件では WT では 30S と 50S の大半が会合し、70S リボソームが形成される。この条件で、 $\Delta rlmE$  で蓄積する 45S 前駆体は沈降係数を変化させ、50S に近い沈降係数を持つようになるが、30S と会合することはできない。 $\Delta mtn$  でみられる 45S 粒子も、会合条件下において沈降係数を変化させ、50S に近い位置に蓄積した。この結果は、 $\Delta mtn$  でみられる 45S 粒子が 45S 前駆体と性質が近いものであることを示している。

さらに、この前駆体の蓄積が培養温度によってどのように変化するかを調べるため、様々な培養温度で SDG を解析した(図 2-5)。この結果、温度が低下するにつれて 45S 粒子の蓄積量が増加していくことが判明した。このことは、 $\Delta mtn$  が低温感受的な生育阻害を示すことと一致している。さらに、各リボソーム粒子について 260nm の核酸吸光からそれぞれの粒子の相対量を比較すると、30S サブユニットが温度によらずほぼ一定であるのに対し、45S 粒子が低温で増加するにしたがい 50S サブユニットが減少していくことが分かった。この時の 30S:(45S+50S) の比率は常に 1:2 程度である。これは、各粒子の



rRNA の分子量の比率とほぼ一致している。以上の結果は細胞中において 45S 粒子が安定的に存在し、45S と 50S を合わせた分子数が 30S とほぼ同程度であることを示している。

この 45S 粒子の性質についてさらに詳細に調べるため、45S 粒子に含まれる r-protein L36 の量を Tricine SDS PAGE で測定した(図 2-6)。L36 は 50S の生合成後期過程において Um2552 修飾の形成によって組み込まれる r-protein であり(図 1-9)、45S 前駆体では欠損している。L36 は大腸菌では最も小さな r-protein であり、Tricine SDS PAGE による解析では最も下のバンドとして見られることが先行研究(Arai et al., 2015)において明らかとなっている。WT の 50S と  $\Delta rlmE$  の 45S、50S を見ると、45S 前駆体で L36 のバンドがみられないことが分かる(図 2-6)。このとき  $\Delta mtn$  の 45S、50S を見ると、 $\Delta mtn$  においても 45S 粒子で L36 のバンドがなくなっていた。このことから、 $\Delta mtn$  で蓄積する 45S 粒子は L36 が組み込まれる前の段階のものであることが分かる。

さらに、この 45S 粒子の Um2552 の修飾率を LC/MS を用いて解析した。解析は先行研究(Andersen and Douthwaite, 2006)にしたがい、Oligomer 保護によって目的の修飾周辺の rRNA を単離し、T1 で切断して LC/MS により修飾断片と未修飾断片の比率を測定して修飾率を計算した。この結果、 $\Delta mtn$  では 45S 粒子において Um2552 の修飾率が顕著に減少し、50S サブユニットでは WT と同程度にまで回復することが分かった(図 2-7)。この結果は  $mtn$  の欠損により Um2552 の修飾率が減少し、45S 粒子の蓄積が引き起こされたことを示唆している。また、以上の結果から  $\Delta mtn$  でみられる 45S 粒子は 45S 前駆体と同じ粒子であると推測される。以下、 $\Delta mtn$  でみられる 45S 粒子についても 45S 前駆体と呼称する。

### AdoMet 濃度の低下によって 45S 前駆体の蓄積が引き起こされている

$mtn$  の欠損は AdoMet 濃度の低下とともに、AdoHcy の蓄積なども引き起こす(WT:1  $\mu$ M,  $\Delta mtn$ : 30  $\mu$ M)(Halliday et al., 2010)。そこで、 $\Delta mtn$  でみられる生育阻害と 45S 前駆体の蓄積が AdoMet 濃度の低下を原因として引き起こされているかを解析した。図 1-3 に示したように、細胞内の AdoMet 濃度は Recycle 経路、Hcy の de novo 合成経路、Met の培地中からの取り込みの 3 つの経路に依存している。 $\Delta mtn$  では Recycle 経路が働かないため、使用した AdoMet を再生することができず、細胞中の AdoMet 濃度が減少すると考えられる。このため、 $\Delta mtn$  では細胞中の AdoMet 濃度は培地に含まれる Met の濃度の影響を強く受けると推測される。LB 培地中では Met の濃度を調節することができないため、M9 最小培地を用いて、Met の有無による生育の変化を調べた(図 2-8)。その結果、Met を含まない M9 培地中では  $\Delta mtn$  は顕著な生育阻害を見せた一方、Met を添加した培地中では WT と同程度まで生育が回復した。また、各培地で育てた  $\Delta mtn$  のリボソームプロファイルを調べると、Met を含まない培地で育てたときには 45S 前駆体の蓄積が観察される一方、Met を添加した培地では 45S 前駆体の蓄積が解消した(図 2-9)。さらに Met を含まない培地で蓄積した 45S 前駆体について、Um2552 修飾率を解析すると、50S サブユニットに比べ顕著に修飾率が低下していることが分かった(図 2-10)。これらの結果は、 $\Delta mtn$  でみられる生育阻害と 45S 前駆体の蓄積が細胞中の AdoMet 濃度の低下による Um2552 修飾率の低下で引き起こされていることを示唆している。

### RlmE の反応効率の低下が Um2552 修飾率の低下の原因である

次に、Um2552 修飾率の低下が RlmE の発現量の低下によるものなのか、RlmE の修飾活性の変化に

よるものなのかを調べるため、細胞中の AdoMet 濃度の低下や、温度の変化が RlmE の発現量に与える影響を Western blotting を用いて解析した(図 2-11)。その結果、RlmE は温度変化によらず発現量がほぼ一定であることが分かった。先行研究において RlmE は heat shock protein とされている(Richmond et al., 1999)が、今回の実験では低温培養条件でも十分な発現量が維持されていることが示唆される。さらに、低温条件下における RlmE の発現量を WT と  $\Delta mtn$  で比較すると、WT に比べ  $\Delta mtn$  で RlmE の発現量が顕著に増加していることが分かった(図 2-11)。このことは、RlmE の発現量の低下が  $\Delta mtn$  でみられる 45S 前駆体の蓄積の原因ではないことを示唆している。 $\Delta mtn$  で RlmE の発現量が増大した理由については、考察で詳細を述べる。

そこで、Um2552 修飾率の低下の原因は、AdoMet 濃度の低下によって RlmE の修飾活性が低下したためではないかと考えた。しかし、先行研究(Bügl et al., 2000)では、RlmE は *in vitro* において 45S 前駆体ではなく 50S サブユニットを基質とするとされ、さらにこのときの RlmE の AdoMet に対する Km 値は  $3.7\mu\text{M}$  となっている(Hager et al., 2002)。この値は細胞内の AdoMet 濃度(WT:  $300\mu\text{M}$ ,  $\Delta mtn$ :  $100\mu\text{M}$ )(Halliday et al., 2010)と比較して非常に小さく、RlmE の修飾活性が細胞中の AdoMet 濃度の変化による影響を受けると考えることはできない。しかし、近年の研究成果(Arai et al., 2015)は RlmE が細胞中において実際には 45S 前駆体を基質としていることを示唆している。そこで、45S 前駆体を基質とした場合と 50S サブユニットを基質とした場合とで AdoMet に対する Km 値が異なる値をとるのではないかと考え、研究を進めた。まず、先行研究の結果が本当に正しいのかを検証するため、Dracala 実験により RlmE と AdoMet との親和性を解析した(図 2-12)。その結果、RlmE と AdoMet との Kd 値は  $6.1\mu\text{M}$  となり、先行研究での Km 値  $3.7\mu\text{M}$  とほぼ同じ値となった(Hager et al., 2002)。次に、45S 前駆体および 50S サブユニットを基質としたときの RlmE の AdoMet に対する Km 値を測定した(図 2-14)。50S サブユニットを基質としたときの AdoMet に対する Km 値は  $4.5 \pm 1.7\mu\text{M}$  となり、先行研究で得られている結果と一致した。一方、45S 前駆体を基質としたときは、RlmE が修飾活性を発揮するためにはるかに高い AdoMet 濃度が必要となることが分かった。このときの Km 値はおおよそ  $180\mu\text{M}$  となり、細胞中の AdoMet 濃度の範囲に含まれた。このことは、細胞中の AdoMet 濃度の変化によって、RlmE の 45S 前駆体に対する Um2552 修飾活性が大きく変動しうることを示している。また、先行研究(Bügl et al., 2000)の反応系では AdoMet 濃度が  $50\mu\text{M}$  であり、この Km 値と比較してかなり小さい。このため、先行研究では 45S 前駆体を基質とした RlmE のメチル化修飾活性をうまく測定できなかったのではないかと考えている。

また、 $\Delta mtn$  で蓄積する AdoHcy が与える影響を解析するため、Dracala 実験により RlmE と AdoMet との結合が AdoHcy の添加によってどの程度阻害されるかを解析した(図 2-15)。その結果、 $\Delta mtn$  で蓄積する AdoHcy ( $30\mu\text{M}$ )より高濃度の AdoHcy( $100\mu\text{M}$ )を添加した場合でも、AdoMet から解離する RlmE は 30%程度にとどまることが分かった。また、この反応系中の RlmE と AdoMet の濃度はそれぞれ  $10\mu\text{M}$ 、 $0.5\mu\text{M}$  であり、実際の細胞内 AdoMet 濃度(WT:  $300\mu\text{M}$ ,  $\Delta mtn$ :  $100\mu\text{M}$ )(Halliday et al., 2010)と比較するとかなり小さい。このことから、 $\Delta mtn$  で蓄積する程度の AdoHcy 濃度 ( $30\mu\text{M}$ )であれば、細胞内の RlmE と AdoMet との結合にほとんど影響を与えないと考えられる。以上の結果は、AdoHcy の蓄積ではなく AdoMet 濃度の低下が RlmE の修飾反応効率の低下をもたらし、結果 Um2552 修飾の修飾率を減少させたことを示唆している。

### 細胞中の AdoMet の濃度低下は特定の rRNA 修飾の修飾率を低下させる

細胞中の AdoMet 濃度の低下がリボソーム生合成に与える影響をさらに解析するため、Um2552 以外の rRNA 修飾率の変動を網羅的に解析した。大腸菌には 16S rRNA に 12 か所、23S rRNA に 24 か所の合計 36 か所の rRNA 修飾が存在する (Shajani et al., 2011) (図 1-5,6)。これらの修飾のうちメチル化修飾は 24 か所存在し、それらの修飾の生合成は全て AdoMet を基質として行われている。そのため、細胞中の AdoMet 濃度の低下はこれらの修飾の修飾率を低下させる可能性がある。そこで、Um2552 修飾を測定した時と同様に、Oligomer 保護を用いて目的修飾付近の rRNA 断片を単離し、RNase T1 もしくは A で断片化して LC/MS によって修飾率を計算した。使用した Oligomer は表 2-2 の通りである。

解析の結果は表 2-3,4 のようになった。意外なことに、細胞中の AdoMet 濃度が低下した  $\Delta mtn$  においても多くの rRNA メチル化修飾は修飾率が変動しなかった。その一方で、Um2552 を含む特定の修飾では修飾率が顕著に減少した。まず、16S rRNA では  $m^5C1407$  と  $m^3U1498$  の修飾率が顕著に減少した (表 2-3, 図 2-16)。また、23S rRNA では  $m^5U747$ 、 $m^3\psi1915$ 、 $m^5U1939$ 、Um2552 の 4 つの rRNA 修飾の修飾率が減少した (表 2-4, 図 2-17)。23S rRNA で修飾率が低下した 4 つの rRNA 修飾のうち、 $m^5U747$  以外の 3 つの rRNA 修飾では 45S 前駆体で減少した修飾率が 50S サブユニットでは回復した (表 2-4, 図 2-17)。このうち、 $m^3\psi1915$  は *in vitro* において 70S を基質として入れられる修飾である (Ero et al., 2008) ことが知られており、 $\Delta rlmE$  で蓄積する 45S 前駆体でも修飾率が大きく減少することが知られている (Arai et al., 2015)。また、 $m^5U1939$  もわずかに 45S 前駆体で修飾率が減少しているが、この修飾も 50S サブユニットの生合成後期過程で導入されることが知られている (Popova and Williamson, 2014)。このため、これら 2 つの修飾の修飾率の減少は AdoMet 濃度低下によるものではなく、45S 前駆体の段階では修飾がまだ導入されないことによると考えられる。

さらに、16S rRNA の  $m^5C1407$  と  $m^3U1498$  と 23S rRNA の  $m^5U747$  の修飾率低下が AdoMet 濃度低下によるものであるか、それとも 45S 前駆体の蓄積など別の要因によるものであるかを調べるため、 $\Delta rlmE$  で蓄積する 45S 前駆体でこれらの修飾の修飾率が変化するかを解析した (図 2-18)。その結果、 $\Delta rlmE$  では 16S rRNA の  $m^5C1407$  と 23S rRNA の  $m^5U747$  の修飾率は WT と同程度であったのに対し、16S rRNA の  $m^3U1498$  の修飾率は  $\Delta mtn$  と同様に大きく減少していた。さらに、 $\Delta mtn$  に各修飾の修飾遺伝子を過剰発現すると 16S rRNA の  $m^5C1407$  と 23S rRNA の  $m^5U747$  の修飾率は WT と同程度にまで回復するのにに対し、16S rRNA の  $m^3U1498$  の修飾率は回復しなかった (図 2-19)。この結果は、16S rRNA の  $m^5C1407$  と 23S rRNA の  $m^5U747$  の修飾率低下が AdoMet 濃度低下によるものである一方、16S rRNA の  $m^3U1498$  の修飾率が 45S 前駆体の蓄積による 70S サブユニットの不足など別の要因によるものであることを示唆している。

以上をまとめると、16S rRNA の  $m^5C1407$  と 23S rRNA の  $m^5U747$ 、そして Um2552 の 3 つの修飾が AdoMet 濃度低下を原因として修飾率が減少したと考えられる。

### 細胞中の AdoMet の濃度低下は特定の tRNA 修飾の修飾率を低下させる

さらに、細胞内の AdoMet 濃度低下が翻訳に与える影響を解析するため、tRNA 修飾の修飾率が AdoMet 濃度低下でどのような影響を受けるのかを解析した。大腸菌の tRNA にはあわせて 32 種類の tRNA 修飾が存在することが知られており、このうち 16 種類が AdoMet を基質としたメチル化修飾である (Dumelin et al., 2012; El Yacoubi et al., 2012; Miyauchi et al., 2013)。これらの修飾率の解析をヌクレ

オシド解析で解析した。その結果、**図 2-20** に示すように、28 種類の tRNA 修飾と 2 種類の tRNA 修飾前駆体について各株での相対量を解析することに成功した。これらの修飾の相対量は、目的修飾断片と未修飾断片との比率から計算した。例えば、Cm 修飾の場合は C との相対量を計算する。これを WT の場合を 1 として、 $\Delta mtn$  での相対量を計算したのが **図 2-20** である。このように、多くの tRNA 修飾では修飾率の変動は見られないものの、いくつかのメチル化修飾、7-methylguanosine ( $m^7G$ ), 2'-O-methylguanosine (Gm),  $m^5U$ , 5-methylaminomethyluridine ( $mnm^5U$ ), and 2-methylthio- $N^6$ -isopentenyladenosine ( $ms^2i^6A$ )は  $\Delta mtn$  で修飾率が顕著に減少することが分かった。さらに、 $ms^2i^6A$  の場合は、前駆体に当たる  $i^6A$  の蓄積も観察された(**図 2-20,21**)。これは、 $i^6A$  へのメチルチオ基付与を触媒する (Esberg et al., 1999) MiaB の反応が細胞中の AdoMet 濃度低下の影響を顕著に受けたことを示している (**図 2-23**)。また、メチル化修飾以外でも queuosine (Q) とその前駆体である epoxyqueuosine (oQ) の蓄積と、さらにその前駆体に当たる 7-aminomethyl-7-deazaguanosine (preQ1) の蓄積が観察された (**図 2-20,22**)。これは preQ1 から oQ を合成する際に QueE が AdoMet を基質としていることによるものと考えられる (**図 2-24**)。これらの修飾の修飾率の変動については後で考察する。

### ***rlmE* の過剰発現によって $\Delta mtn$ の生育阻害が回復する**

ここまでの研究で、 $\Delta mtn$  でいくつかの rRNA 修飾及び tRNA 修飾の修飾率が顕著に減少することが判明した。そこで、これらの修飾の修飾率を回復させることで 45S 前駆体の蓄積及び生育の阻害が回復するかどうかを検証した。rRNA 修飾では 16S rRNA の  $m^5C1407$ (*rsmF*)と 23S rRNA の  $m^5U747$ (*rlmC*)、Um2552(*rlmE*)、tRNA 修飾では Q(*queA*)と  $ms^2i^6A$ (*miaB*)についてそれぞれの修飾の修飾酵素を plasmid により過剰発現させ、生育とリボソーム組成を解析した。この結果、すべての修飾酵素で修飾の回復が確認された。そのときの各株の生育を Doubling time で解析すると、**図 2-25** のように *rlmE* を過剰発現した場合でのみ生育の有意な回復が確認された。さらに、これらの株のリボソーム組成を解析すると、*rlmE* を過剰発現させたときに 45S 前駆体の蓄積が完全に解消され、すべて 50S に変換されていることが判明した (**図 2-26**)。そして、この  $\Delta mtn + rlmE$  株の 50S サブユニットについて Um2552 修飾率を調べると、WT と同じくほぼ 100%であることが分かった (**図 2-27**)。これらの結果は、*rlmE* の過剰発現が  $\Delta mtn$  で蓄積した 45S 前駆体に Um2552 修飾を導入して 50S サブユニットへと成熟させ、その結果生育が回復したことを示している。

さらに、この生育の回復及び 45S 前駆体の蓄積の解消が Um2552 修飾の導入によるものであることを示すため、*rlmE* の active site mutant である (Hager et al., 2002) *rlmE\_K38A* 変異体を過剰発現した時に同様に 45S 前駆体の蓄積の解消及び生育の回復がみられるかを解析した (**図 2-28**)。その結果、この変異体を過剰発現した株では生育の回復はみられず、むしろ dominant negative 的に悪化した。この変異体は WT では dominant negative 的に作用せず、生育に影響を与えない (Hager et al., 2002) ため、この生育の悪化は AdoMet 濃度低下時に特異的なものであると考えられる。さらに、この時のリボソーム組成を解析すると、45S 前駆体の蓄積量は  $\Delta mtn$  と比べほとんど変化しなかった (**図 2-29**)。以上の結果から、*rlmE* の過剰発現による  $\Delta mtn$  の生育の回復及び 45S 前駆体の蓄積の解消は Um2552 修飾率の回復によるものであると考えられる。

さらに、*mtn* と *rlmE* との遺伝的相互作用を詳細に解析するため、両遺伝子の二重欠損株を作成し、生育及びリボソーム組成を解析した。この結果、二重欠損株においては単独欠損株に比べてさらに生育

が悪化し、45S 前駆体の蓄積量も増加した(図 2-30,31)。しかし、二重欠損株で蓄積する 45S 前駆体の蓄積量は  $\Delta rlmE$  単独欠損株と同程度であった(図 2-31)。このことも、AdoMet 濃度低下時の 45S 前駆体の蓄積は Um2552 修飾率の低下を原因としていることを示唆している。

また、50S 生合成後期過程において Um2552 と同様に重要な役割を果たす L36(*rpmJ*)を過剰発現させることで  $\Delta mtn$  の生育が回復するかを調べた。先に述べたように L36 は Um2552 をトリガーとした 50S サブユニットの生合成で重要な役割を担っており、L36 を欠損した株でも 45S 前駆体の蓄積が観察される(Arai et al., 2015) (図 1-8,9)。また、*rlmE* と *rpmJ* の二重欠損株では顕著な生育の悪化が観察される(Arai et al., 2015)。 $\Delta mtn$  で *rpmJ* を過剰発現した株および *mtn* と *rpmJ* の二重欠損株を作成し、生育とリボソーム組成を調べたところ、いずれの株においても生育の変化や 45S 蓄積量の変化は観察されなかった(図 2-32,33)。この結果は、*mtn* 欠損株で起きる生育阻害が、L36 の欠損を原因としたものではないことを示唆している。L36 のリボソームへの組み込みが Um2552 修飾の形成をトリガーとして引き起こされることを踏まえると、*mtn* 欠損株の 45S 前駆体が L36 を欠損しているのは Um2552 修飾率が低下したことによる副次的な効果であることが示唆される。

## 2-4, 実験考察

### $\Delta mtn$ では特定の rRNA 修飾及び tRNA 修飾の修飾率が低下する

AdoMet は様々な細胞内プロセスに関与する重要な細胞内小分子(Fontecave et al., 2004)であり、その細胞内濃度の低下は様々な疾患にかかわっている(Anstee and Day, 2012; Bottiglieri et al., 1990; Kishita et al., 2015)。本研究では、細胞中の AdoMet 濃度低下の影響を解析するため、先行研究(Halliday et al., 2010)において AdoMet 濃度の顕著な減少 (WT:300  $\mu$ M,  $\Delta mtn$ : 100  $\mu$ M) が観察されている  $\Delta mtn$  株を用いた。この株では顕著な低温感受的な生育阻害とともに、リボソーム生合成の異常と 45S 前駆体の蓄積が観察される。AdoMet が細胞中のメチル化修飾の基質として用いられていることから、本研究ではこのリボソーム生合成の異常が rRNA 修飾の修飾率の低下により引き起こされているのではないかと考えた。

結果、16S rRNA の  $m^5C1407$  と 23S rRNA の  $m^5U747$ 、そして Um2552 の 3 つの修飾が AdoMet 濃度低下を原因として修飾率が減少した。このうち、 $m^5C1407$  は 16S rRNA の Helix44 に位置し、50S サブユニットとの相互作用もしくは P-site に対する開始 tRNA の結合認識に関与していると推測されている。また、この修飾の修飾酵素である *rsmF* を欠損した株ではやや弱い生育阻害が観察される(Andersen and Douthwaite, 2006)。また、同じく Helix44 に位置する  $m^3U1498$  も  $\Delta mtn$  で修飾率が減少したが、この修飾の修飾率低下は AdoMet 濃度の低下によるものではなく 45S 前駆体の蓄積により引き起こされたものであると推測される。この修飾の修飾酵素である *rsmE* を欠損した株は WT との共培養実験で競争に負けることが知られている(Basturea and Deutscher, 2007)。これらの 2 つの修飾率低下は、 $\Delta mtn$  欠損株においてリボソームの会合能や翻訳活性に影響を与えている可能性がある。また、23S rRNA の  $m^5U747$  は、新生ペプチドトンネルに位置し、新生鎖の形成に何らかの影響を与えている可能性がある。しかし、この修飾の修飾酵素である *rlmC* を欠損した株では顕著な生育阻害はみられず、その役割は不明

なままである(Madsen et al., 2003)。一方、Um2552 はリボソーム生合成後期過程に関与しており、欠損した株では顕著な生育阻害がみられる(Arai et al., 2015)。そのため、この修飾の修飾率の低下が  $\Delta mtn$  の生育阻害及び 45S 前駆体の蓄積の主因であると考えられた。

さらに、AdoMet 濃度の低下が翻訳全体に与える影響を調べるため、tRNA 修飾についても  $\Delta mtn$  で修飾率が減少しているか網羅的な解析を進めた。その結果、 $m^5U$ ,  $mnm^5U$ ,  $ms^2i^6A$ , Gm, and  $m^7G$ , Q の相対的な存在量が減少していることが判明した。ただし、これらの修飾のうち  $m^5U$ ,  $mnm^5U$ , Gm, and  $m^7G$  は前駆体の蓄積を観察できていないわけではないため、修飾率の減少ではなく修飾が存在する tRNA の相対量の変化によって引き起こされている可能性があることに留意する必要がある。 $m^5U$ , Gm,  $m^7G$  はそれぞれ tRNA の 54 位、18 位、46 位に位置しており、tRNA のコア領域に位置している。これらの修飾を欠損した株では弱い生育阻害がみられる(Bjork and Neidhardt, 1975; De Bie et al., 2003; Urbonavicius et al., 2002)ことが知られており、これらの修飾の存在は tRNA の安定性に寄与している可能性がある。また、 $mnm^5U$  は tRNA の wobble position に位置しており、コドン認識に関与していることが推測される。この修飾を欠損した株では WT との共培養実験で競争に負けることが知られている(Moukadiri et al., 2014)。 $ms^2i^6A$  は tRNA の 37 位に位置する修飾で、radical AdoMet 修飾酵素である MiaB によって導入される修飾である(Pierrel et al., 2002)。Radical AdoMet 修飾酵素は AdoMet から生成される 5'-dA radical を反応に必要とする(Kimura and Suzuki, 2015)ため、AdoMet 濃度の低下は MiaB による 5'-dA radical の形成に影響を与えている可能性がある。この修飾は tRNA の 37 位に位置し、翻訳中のコドン読み枠の安定化とフレームシフトの抑止に寄与していると考えられている(Jenner et al., 2010; Urbonavicius et al., 2001)。また、 $\Delta mtn$  では Q 及びその前駆体である oQ の相対量の減少も確認された。Q は 34 位に位置する修飾であり、コドンの正しい認識に寄与していると推測されている。preQ1 から oQ を生合成する酵素である QueA は AdoMet のリボース環を転移する酵素(Slany et al., 1993)であり、この反応は細胞中の AdoMet 濃度に敏感に影響を受けることが示唆されている(Okada et al., 1977)。実際、*in vitro* における反応でも QueA による反応の AdoMet に対する  $K_m$  は  $98\mu M$  で、細胞中の AdoMet 濃度に近い値となる(Van Lanen and Iwata-Reuyl, 2003)。

### Um2552 修飾率の低下が 45S 前駆体の蓄積および $\Delta mtn$ の生育阻害の主因である

$\Delta mtn$  で修飾率の顕著な低下が確認された tRNA 修飾及び rRNA 修飾について、その修飾酵素を過剰発現することでそれらの修飾の修飾率を回復させ、生育を回復させることができるかを調べた。rRNA については 16S rRNA の  $m^5C1407(rsmF)$  と 23S rRNA の  $m^5U747(rlmC)$ 、Um2552( $rlmE$ )を、tRNA については前駆体の蓄積が確認されている  $ms^2i^6A(miaB)$  と Q( $queA$ )について過剰発現株を作成した。これらの株の生育を調べると、 $rlmE$  以外の株では生育が回復せず、45S 前駆体の蓄積が解消しなかった一方、 $rlmE$  を過剰発現させた株では 45S 前駆体の蓄積の完全な解消と生育の有意な回復が確認された。さらに、 $rlmE$  と  $mtn$  の二重欠損株の 45S 前駆体の蓄積量は  $rlmE$  の単独欠損株と比べ大きな違いはみられなかった。また、 $rlmE$  の active site mutant を過剰発現させた株では 45S 前駆体の蓄積の解消は確認されなかった。これらの結果は、 $mtn$  欠損株で観察される 45S 前駆体の蓄積が Um2552 修飾率の低下を唯一の原因としていることを示している。そして、AdoMet は細胞内の様々なプロセスに影響を与えるが、 $rlmE$  の過剰発現のみで  $\Delta mtn$  の生育が一部回復したという事実は、Um2552 修飾によるリボソームの生合成過程の制御が、細胞の生育に直接影響を与える主要な経路の一つであることを示唆している。一方

で、RlmE の過剰発現のみでは、 $\Delta mtn$  株の生育を完全に回復させることはできなかった。これは、AdoMet 濃度の低下が DNA のメチル化やポリアミンなどの細胞内代謝物の生合成にも使われていることによると考えられる。今後、リボソーム生合成過程以外の細胞内プロセスが AdoMet 低下時の生育阻害にどの程度寄与しているか、また、これらの細胞内プロセスとリボソーム生合成過程との関係についても解明を進めていきたい。

さらに、Um2552 修飾の形成によって 45S 前駆体への組み込みが誘導される L36(*rpmJ*)について、過剰発現により  $\Delta mtn$  の生育を回復させることができるかを解析した。その結果、*rpmJ* の過剰発現では  $\Delta mtn$  の生育は回復せず、また *mtn* と *rpmJ* の二重欠損株でも生育の悪化は確認されなかった。この結果は、L36 が 45S 前駆体に組み込まれないことが  $\Delta mtn$  での 45S 前駆体の蓄積の主因ではないことを示している。L36 は Um2552 によって誘導される 45S 前駆体の成熟によって受動的に組み込まれ、周囲の rRNA 二次構造の形成を促す役割を持つと推測される。

### Um2552 修飾率の低下は AdoMet 濃度の低下により引き起こされる

$\Delta mtn$  株においては AdoMet 濃度の低下だけでなく、より直接的な影響として AdoHcy の蓄積が起こる(Halliday et al., 2010)。AdoHcy の蓄積も様々なメチル化修飾酵素の活性の低下(Parveen and Cornell, 2011)や細胞の生育の悪化(Xiao et al., 2015)、疾患(Murín et al., 2017)に関与していることから、 $\Delta mtn$  でみられる生育阻害も AdoHcy の蓄積によって引き起こされている可能性がある。そこで、 $\Delta mtn$  の生育が培地中の Met の添加によって回復するかを解析した。培地中に Met が添加された場合、MetK による反応によって細胞中の AdoMet 濃度は回復するものの、細胞中の AdoHcy 濃度は変化しないことが予想される。 $\Delta mtn$  の生育が培地中の Met の量に依存して大きく変化することから、 $\Delta mtn$  でみられる生育阻害の多くは AdoMet 濃度の低下か、AdoMet と AdoHcy の比率の変化によって引き起こされていると考えられる。

さらに、Um2552 の修飾率の低下及び 45S 前駆体の蓄積が AdoMet 濃度の低下によって引き起こされているかを解析した。すると、 $\Delta mtn$  でみられる 45S 前駆体の蓄積および Um2552 修飾率の低下も、培地中への Met の添加によって回復することが分かった。さらに、Um2552 修飾率の低下が *rlmE* の発現量の低下により引き起こされているかを調べたが、*rlmE* の発現量は温度によって変化せず、 $\Delta mtn$  では発現量がむしろ増大していることが分かった。 $\Delta mtn$  で *rlmE* の発現量が増大した原因としては AdoMet 濃度低下に応答して *rlmE* を過剰に発現することで 50S の成熟速度を維持しようとしたという可能性がある。これらの結果は、AdoMet 濃度の低下により引き起こされる Um2552 修飾率の低下の原因が、*rlmE* の発現量の低下ではないことを示している。

そこで、細胞内の AdoMet 濃度の低下により RlmE のメチル化活性が低下し、それによって Um2552 修飾率が低下したのではないかと考えた。しかし、RlmE の AdoMet に対する結合定数  $K_d$  及び 50S サブユニットを基質としたときの  $K_m$  は約  $6\mu\text{M}$  で、細胞内の AdoMet 濃度と比較してはるかに小さい。また、AdoHcy の蓄積が RlmE と AdoMet との結合に大きな影響を与えることもなかった。しかし、RlmE の細胞内の基質である 45S 前駆体を基質として AdoMet 濃度に対するメチル化修飾反応の効率の変化を解析すると、50S サブユニットを基質とした場合と比べ修飾反応にはるかに高い AdoMet 濃度が必要となることが分かった。また、45S 前駆体を基質としたときの AdoMet に対する RlmE の  $K_m$  値はおおよそ  $180\mu\text{M}$  であり、細胞中の AdoMet 濃度の範囲内に含まれる。これらの結果は細胞内の AdoMet 濃度の

変化に応答して 45S 前駆体を基質とした RlmE のメチル化修飾活性が敏感に制御され、その結果 45S 前駆体から 50S サブユニットへの成熟が制御されていることを示唆している。一方、45S 前駆体を基質としたときに RlmE のメチル化修飾活性に高い AdoMet 濃度を必要とする理由は現時点では未解明である。今後、Cryo-EM などを用いて 45S 前駆体の構造や、RlmE が結合した時に 45S 前駆体に引き起こされる構造的な変化を解析することで、この理由を解明したいと考えている。

#### 細胞内 AdoMet 濃度を感知して Um2552 修飾によってリボソーム生合成を制御する機構が存在する

以上の結果から、50S サブユニットの生合成後期過程において、RlmE が細胞内 AdoMet 濃度を敏感に感知することで、45S 前駆体における Um2552 の修飾率を調節し、50S サブユニットの形成を制御する機構の存在が示唆された(図 2-34,35)。AdoMet は生体における中心的な代謝物であり、細胞のおかれた栄養状態などで変動することが知られている。細胞内の AdoMet 濃度が十分に高いとき(図 2-34)は、RlmE により 45S 前駆体に Um2552 修飾が素早く導入され、50S の生合成後期過程が円滑に進むと考えられる。その結果、細胞中のリボソーム濃度が高く維持され、効率の良い翻訳と細胞の増殖が可能となる。一方、AdoMet 濃度が低下する(図 2-35)と、RlmE による Um2552 修飾率が低下し、45S 前駆体が蓄積する。その結果、成熟したリボソーム濃度が低下し、翻訳量の減少と細胞の生育が抑制される。細胞内に蓄積した 45S 前駆体は安定に存在することがわかっており、AdoMet 濃度が回復すると速やかに 50S サブユニットへと変換され、細胞増殖の迅速な回復に寄与すると考えられる。このしくみは、細胞内の AdoMet 濃度に応じてリボソームの生合成を制御する新しい調節機構の存在を示唆している。AdoMet は細胞内の様々なプロセスに影響を与えるが、*rlmE* の過剰発現のみで  $\Delta mtn$  の生育が一部回復したという事実は、細胞内 AdoMet によるリボソームの生合成過程の制御が、細胞の生育に直接影響を与える主要なイベントであることを示唆している。

今後、AdoMet の低下をもたらすような生育条件を探索することにより、この AdoMet 濃度依存的なリボソーム生合成制御機構の生理学的な意義を解明することができると考えられる。また、AdoMet 濃度によって変動するほかの rRNA 修飾や tRNA 修飾の機能を詳細に解明することで、AdoMet 低下時に翻訳過程全体がどのような制御を受けているかを解明できると期待される。



## 2-5, 図・表

Primers	Sequences
pBAD_mtn_Fw	tacgtacgctcgagcaaaatcgcatcattggtg
pBAD_mtn_Rv	tacgtacgctgcagttagccatgtgcaagtttctg
pBAD_rlmE_Fw	tacgtacgctcgagcacaggtaagaagcgttctgcc
pBAD_rlmE_Rv	tacgtacgctgcagttagggtttacgcccgtc
pBAD_rlmC_Fw	tacgtacgctcgagccagtgcgcactttacgacgc
pBAD_rlmC_Rv	tacgtacgctgcagttattgcttaccagcagcgt
pBAD_rsmE_Fw	tacgtacgctcgagccgtatccccgcattatca
pBAD_rsmE_Rv	tacgtacgctgcagttagcccaaatcgccaaatcg
pBAD_rsmF_Fw	tacgtacgctcgagcgcccaacacaccgtttatft
pBAD_rsmF_Rv	tacgtacgctgcagtcaggcgttaccggtaaaaag
pBAD_queA_Fw	tacgtacgctcgagccgcgttaccgatttctcctt
pBAD_queA_Rv	tacgtacgctgcagttactccccgacgcctcatt
pBAD_miaB_Fw	tacgtacgctcgagccacaaaaactccatattaa
pBAD_miaB_Rv	tacgtacgctgcagttacggctgataataaccac
pBAD_obgE_Fw	tacgtacgctcgagcaagtttgttgatgaagcatcgattct
pBAD_obgE_Rv	tacgtacgctgcagttaacgcttgaatgaactcaacgc
pBAD_der_Fw	tacgtacgctcgagcgtacctgtggtcgcgttg
pBAD_der_Rv	tacgtacgctgcagttatttattttcttgatgtgcttcatcagacg
idnT_pPCR_Fw	tcccgtttaatggctactgg
idnT_pPCR_Rv	acggcgttaatggctaacac
rlmE_pPCR_Fw	tctttaaaccgggaat
rlmE_pPCR_Rv	tccagcagtgctttcatcac

表 2-1, 使用した primer

Plasmid の作成等に用いた primer の配列。

Oligomers	Modifications	Sequences
16S_509-560	527	ttccgattaacgcttgccacctccgtattaccgcggtctggcacggagtt
16S_951-1006	966,967	cttccgtggatgtcaagaccagtaaggttcttcgcttgcatcgaattaaaccac
16S_1184-1234	1207	gcacgtgtgtagccctggctgaagggccatgatgacttgacgtcatccc
16S_1382-1435	1402,1407	cttcttttgcaaccactcccatgggtgtgacggcggtgtgtacaagccccggg
16S_1486-1536	1498,1516,1518,1519	ggtgatccaaccgcaggttccctacggttaccttgttacgacttccccc
23S_725-778	745,747	ccccagccacaagtcacccgtaatttttaacattagtcggttcggtcctcc
23S_1595-1646	1618	gcgcttggtattctctacctgaccacctgtgctggtttgggtacgatttg
23S_1813-1863	1835	ccccataattaacctccggcaccggcgagcgtcacaccgtatacgtcc
23S_1899-1950	1915,1939	ccgacaaggaatttcgctaccttaggaccgttatagttacggccgcttt
23S_1941-1990	1962	gcctggccatcattacgccattcgtgcaggtcggaacttaccgacaagg
23S_2023-2073	2030,2069	ggttacggggtctttccgtcttgcgcgggtacactgcatcttccacagcg
23S_2221-2271	2251	ctctttaggaggagaccgccccagtcaaactaccaccagacactgtccgc
23S_2424-2476	2445,	tgaactcttggcggtatcagcctgttatccccggagtacctttatccgttg
23S_2478-2527	2498, 2503	gccccaggatgtgatgagccgacatcgaggtgccaacaccgcccgat
23S_2529-2579	2552	gctcgcgtaccactttaaatggcgaacgccatacccttgggacctcttc

表 2-2, rRNA 修飾率解析で用いた oligomer

Oligomer 保護による rRNA 修飾の解析で用いた oligomer の配列。各 oligomer に対応する修飾の番号も記した。

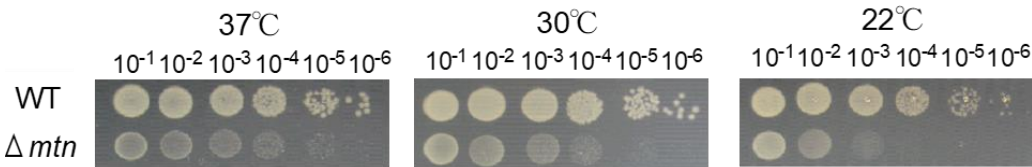


図 2-1, WT と  $\Delta mtn$  との生育の比較

LB plate を用いた生育実験の結果。培地は LB 培地、培養時間はそれぞれの温度によって異なる。

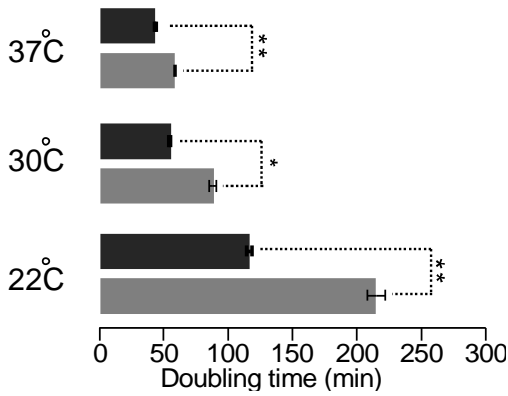


図 2-2, 各温度での WT と  $\Delta mt n$  との doubling time の比較

液体培地を用いた生育実験の結果。培地は LB 培地、培養時間はそれぞれの温度によって異なる。Doubling time は log phase における菌体の OD を対数グラフ上にプロットすることで計算した。

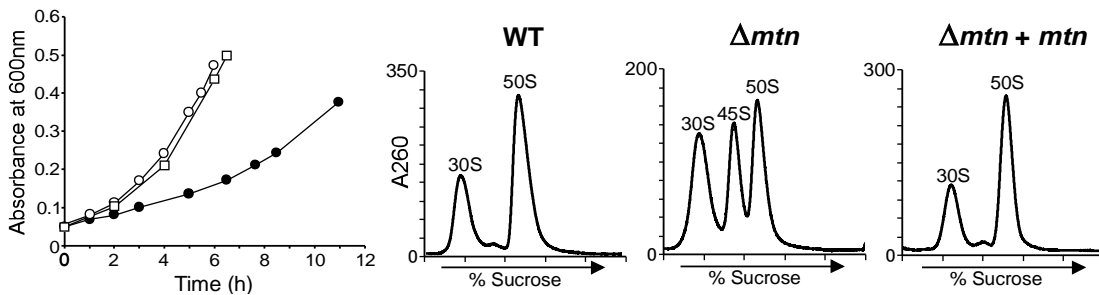


図 2-3, *mtn* の相補により  $\Delta mt n$  の生育阻害が回復する

左は Growth curve。□: WT、●:  $\Delta mt n$ 、○:  $\Delta mt n + mtn$ 。菌体の培養温度は全て 22°C、培地は LB 培地。右は、log phase で回収した菌体のリボソーム組成。

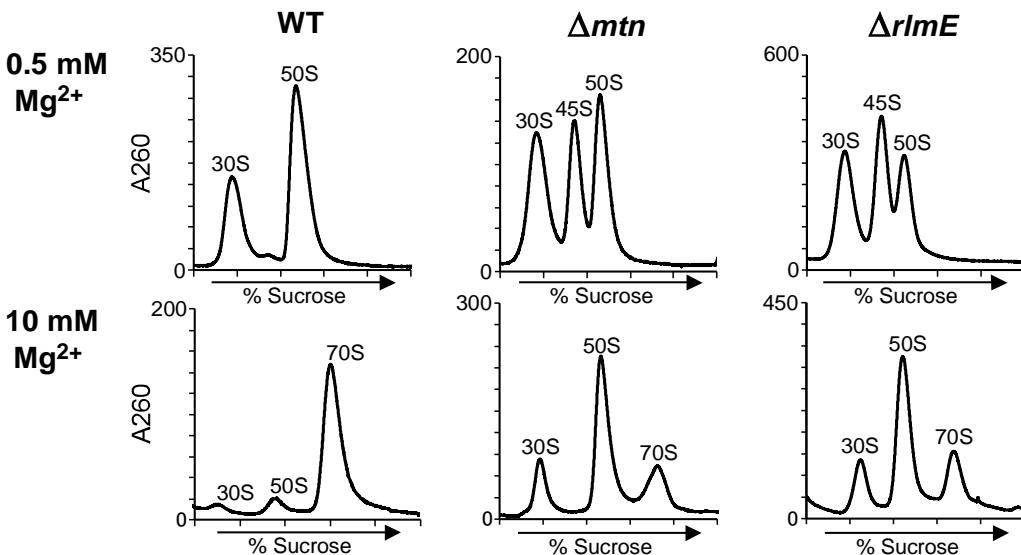


図 2-4, *mtn* 遺伝子の欠損株では 45S 前駆体が蓄積する

各株のリボソーム組成を SDG 法によって解析した。上段は解離条件、下段は会合条件。菌体の培養温度は全て 22°C、培地は LB 培地。

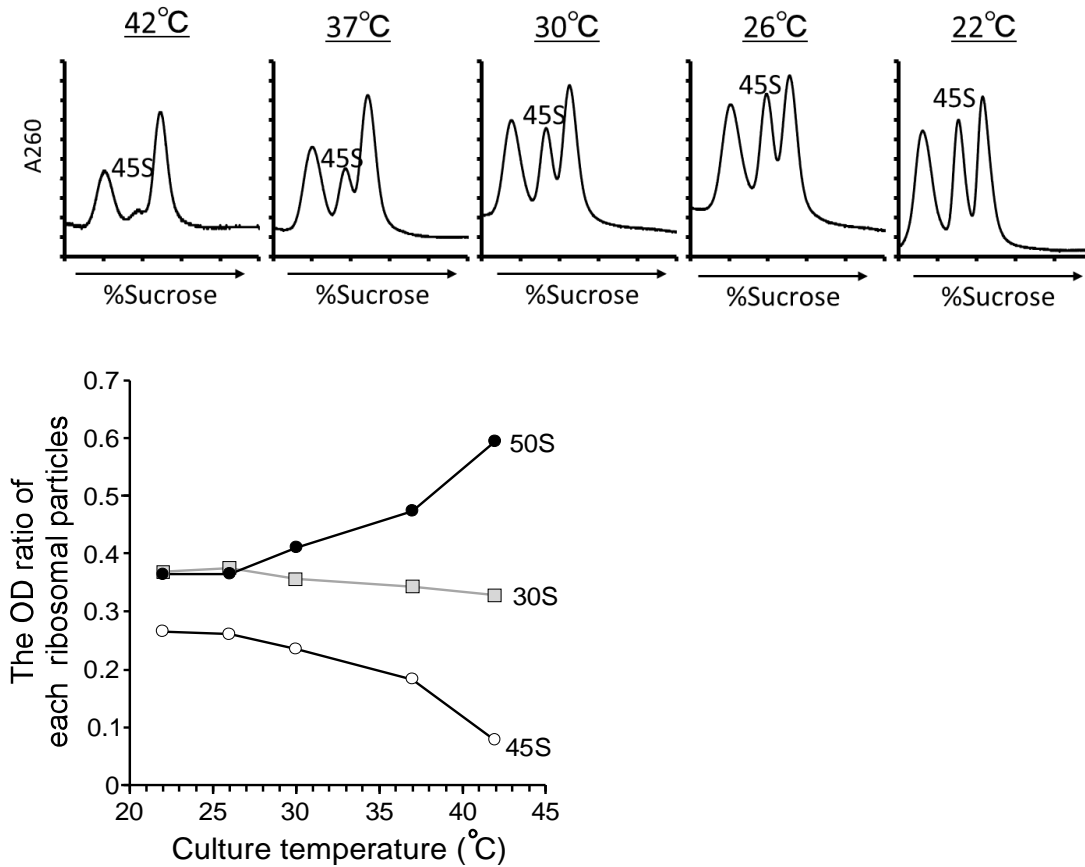


図 2-5, *mtn* 遺伝子でみられる 45S 前駆体の蓄積は温度依存的である

様々な培養温度での  $\Delta mtn$  のリボソーム組成。培地は全て LB 培地。下グラフは SDG プロファイルで見られる 260nm の吸光度からそれぞれの粒子に当たるピークの面積を計算し、比率として計算したものの。

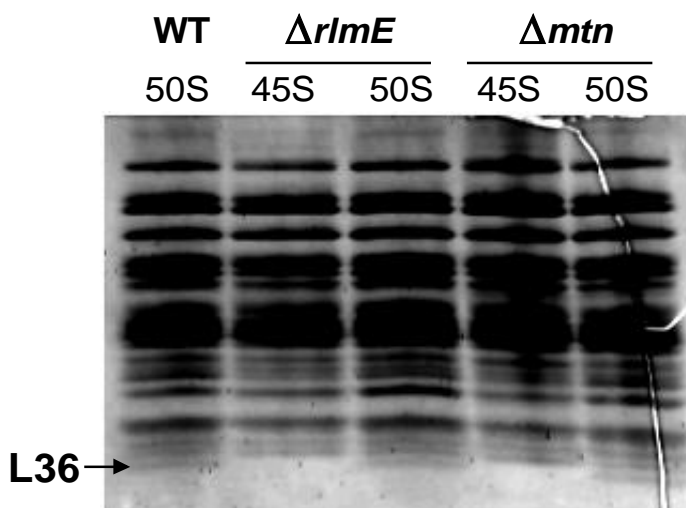


図 2-6,  $\Delta mtn$  でみられる 45S 前駆体は L36 を欠損している

Tricine PAGE による各リボソーム粒子の r-protein の存在量の解析結果。一番下のバンドが L36 に当たる。菌体の培養温度は全て 22°C、培地は LB 培地。

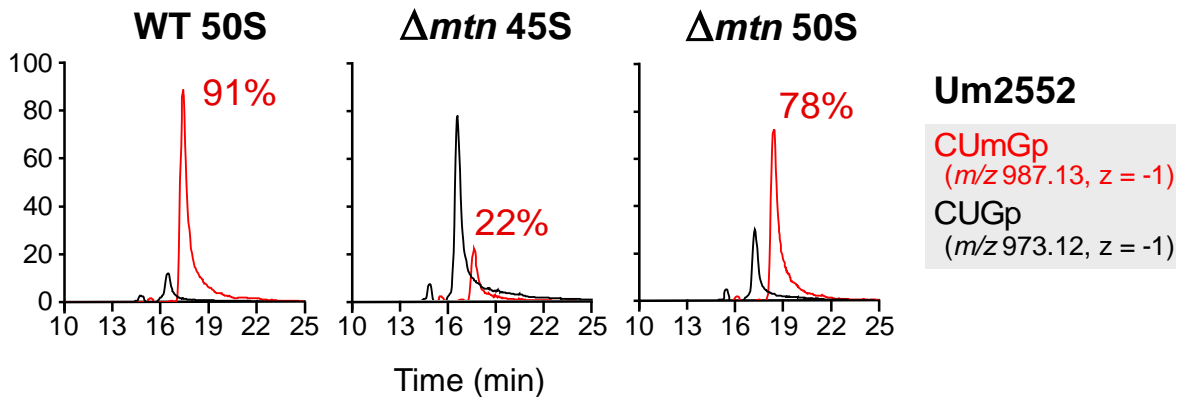


図 2-7,  $\Delta mtn$  でみられる 45S 前駆体は Um2552 を欠損している

各リボソーム粒子を SDG 法で単離し、LC/MS により Um2552 修飾率を解析した。菌体の培養温度は全て 22°C、培地は LB 培地。

Growth analysis in M9 medium (30°C)

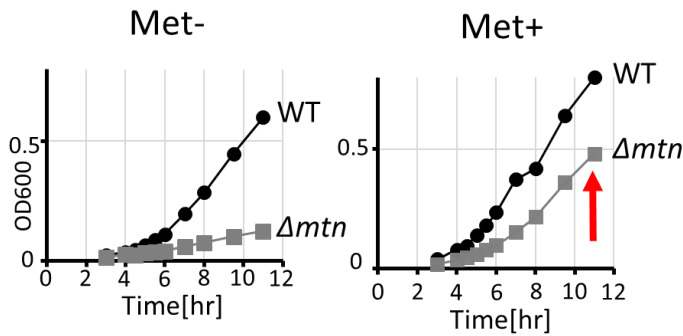


図 2-8, Met の培地中への添加により  $\Delta mtn$  の生育が回復する

M9 培地で WT と  $\Delta mtn$  株の生育を比較した。培養温度は全て 30°C。アミノ酸はメチオニンとシステインを除くすべてのアミノ酸を添加している。

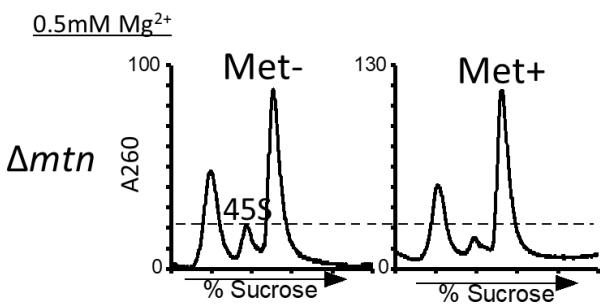


図 2-9, Met のない M9 培地で育てた  $\Delta mtn$  株では 45S 前駆体の蓄積が観察される

M9 培地で培養した  $\Delta mtn$  の解離条件でのリボソーム組成を解析した。培養温度は 30°C。アミノ酸はメチオニンとシステインを除くすべてのアミノ酸を添加している。

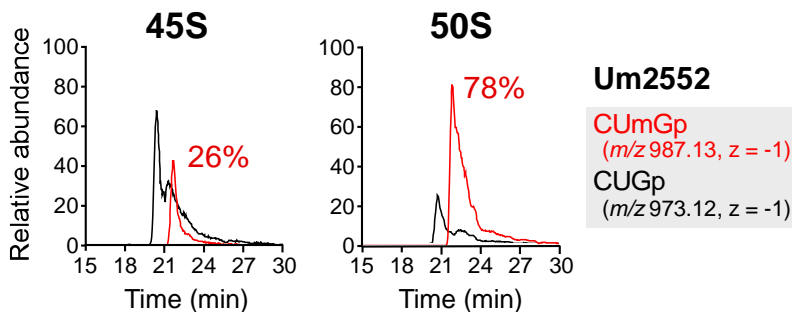


図 2-10, *Met* のない M9 培地で育てた  $\Delta mt n$  株で蓄積する 45S 前駆体は Um2552 を欠損している

M9 培地(*Met*-)で培養した  $\Delta mt n$  でみられる 45S 前駆体及び 50S サブユニットから rRNA を抽出し、Um2552 修飾率を LC/MS で測定した。

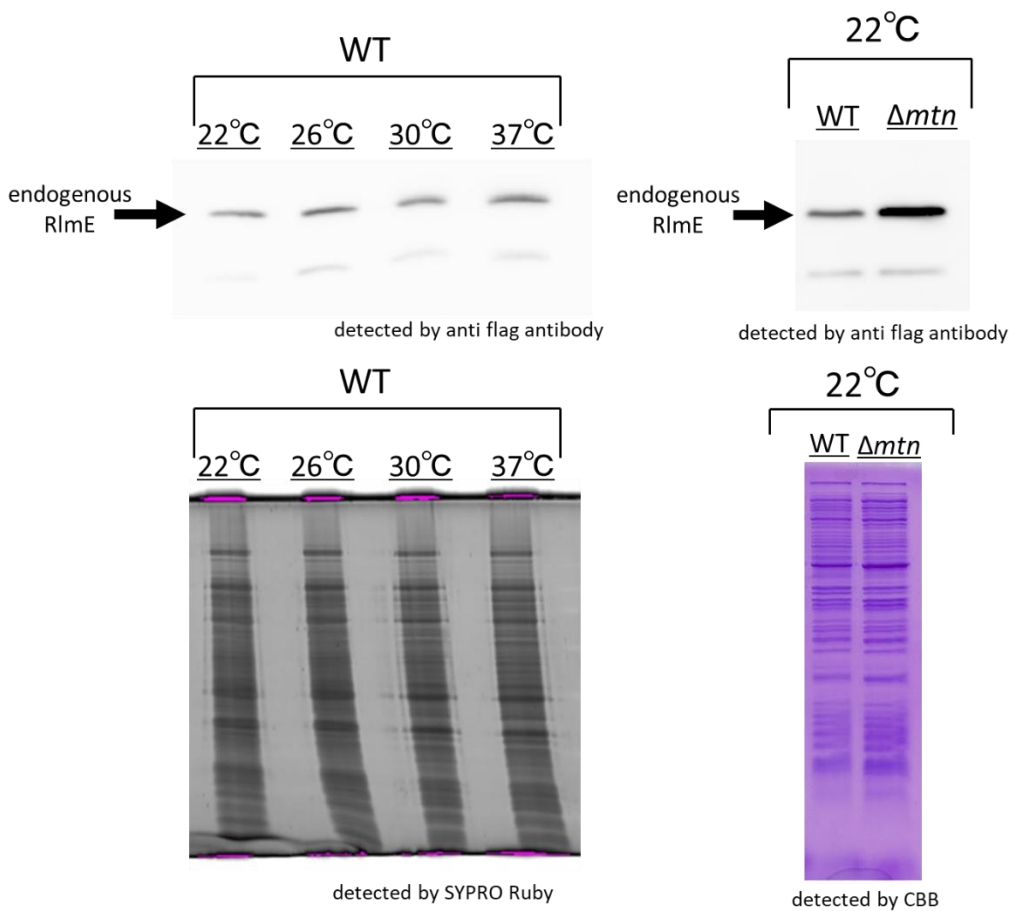


図 2-11, *RlmE* の発現量は温度によって変化しない

*rlmE* の発現量を western blotting で測定した。菌体は SPA-tag 株を用い、LB 培地で培養し、log phase で回収した。1 次抗体として flag 抗体、2 次抗体として Donkey Anti-Mouse IgG 抗体を用いた。各ウェルにロードするタンパク質の量は Bradford 法で定量しそろえた。また、Western blotting と同じ量のタンパク質を別のゲルにロードし、SYPRO Ruby もしくは CBB で測定することで各サンプル間にロードしたタンパク質の総量がそろっていることを確認した。

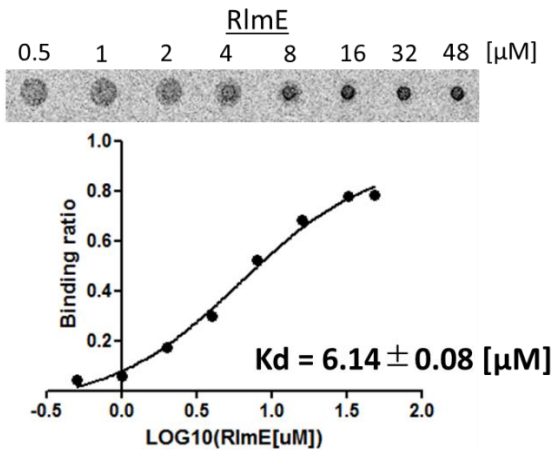


図 2-12, Dracala による RlmE と AdoMet との相互作用

Dracala 法を用いて RlmE と AdoMet の相互作用を測定した。 $^{14}\text{C}$ -AdoMet の濃度は 500nM。放射線標識した AdoMet を IP プレートで検出し、中心円と外円で検出される  $^{14}\text{C}$ -AdoMet の比率から RlmE に結合している AdoMet の割合を算出する。

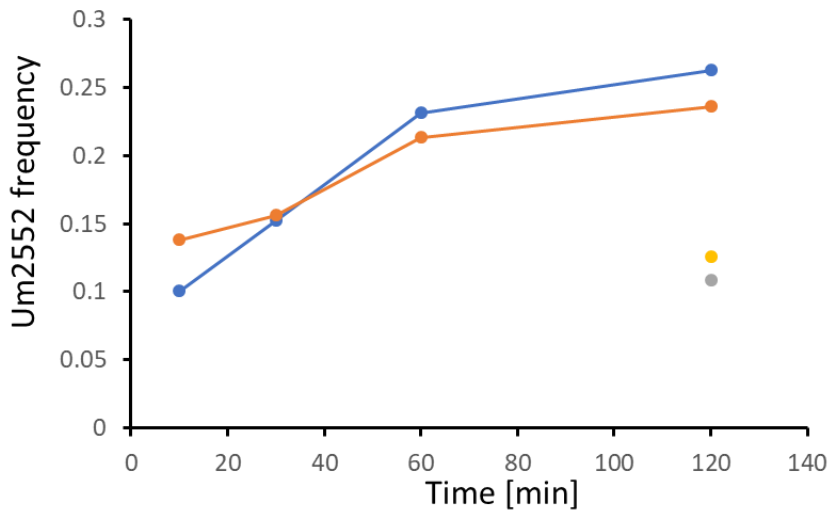


図 2-13, *in vitro* における RlmE の修飾活性測定

LC/MS を用いて *in vitro* における RlmE の修飾活性を測定した。青と灰色は 45S 前駆体を、オレンジと黄色は 50S サブユニットを基質としている。また、灰色と黄色は AdoMet-、青とオレンジは溶液中に AdoMet を 3mM 添加している。

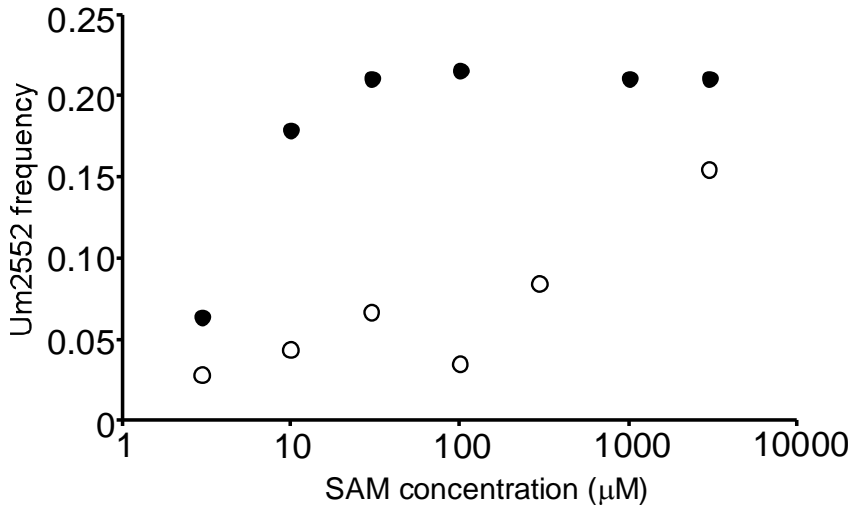


図 2-14, *in vitro* における RlmE の修飾活性測定

45S 前駆体または 50S サブユニットを基質としたときの RlmE による Um2552 修飾活性。横軸は基質 AdoMet 濃度、縦軸は修飾率。詳しく黒丸は 50S を基質としたとき、○は 45S を基質としたとき。AdoMet-のときの修飾率を background としている。

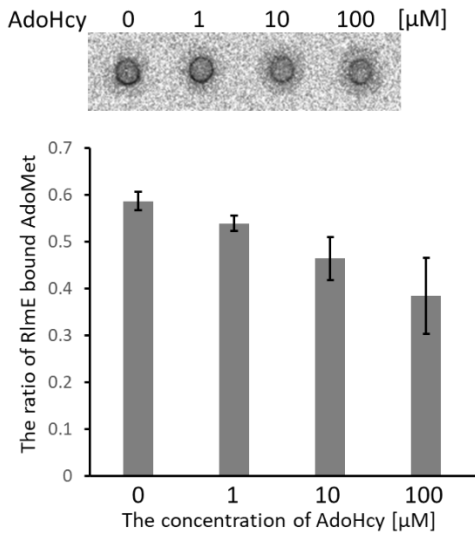


図 2-15, Dracala による AdoHcy による RlmE と AdoMet との相互作用阻害実験

Dracala 法を用いて RlmE と AdoMet の相互作用を AdoHcy が阻害するかを調べた。<sup>14</sup>C-AdoMet の濃度は 500nM、RlmE の濃度は 10μM。系中に AdoHcy を 1~100μM 加え、RlmE に結合する AdoMet の比率が低下するかを解析した。



Modification	Enzyme	WT 30S	$\Delta mtn$ 30S
m <sup>7</sup> G527	RsmG	100	100
m <sup>2</sup> G966	RsmD	100	100
m <sup>5</sup> C967	RsmB	49 ± 9.9	50 ± 9.7
m <sup>2</sup> G1207	RsmC	87 ± 2.8	82 ± 7.3
m <sup>4</sup> Cm1402	RsmH, RsmI	40 ± 4.3	31 ± 4.0
m <sup>5</sup> C1407	RsmF	89 ± 2.6	41 ± 4.7
m <sup>3</sup> U1498	RsmE	72 ± 13	42 ± 4.6
m <sup>2</sup> G1516	RsmJ	95 ± 3.4	97 ± 5.2
m <sup>6</sup> <sub>2</sub> A1518 1519	RsmA (KsgA)	90 ± 2.8	86 ± 9.3

表 2-3, 16S rRNA に存在する rRNA メチル化修飾の修飾率変化

22°C、LB 培地で培養した WT 及び  $\Delta mtn$  から 30S リボソームを単離し、各メチル化修飾の修飾率を LC/MS を用いて解析した。赤文字は有意に減少したことを示す (p<0.05)

Modification	Enzyme	WT 50S	$\Delta mtn$ 45S	$\Delta mtn$ 50S
m <sup>1</sup> G745	RlmA	100	100	100
m <sup>5</sup> U747	RlmC	100	60 ± 16	61 ± 13
m <sup>6</sup> A1618	RlmF	100	100	100
m <sup>2</sup> G1835	RlmG	100	100	100
m <sup>3</sup> Ψ1915	RlmH	96 ± 1.4	30 ± 14	86 ± 2.9
m <sup>5</sup> U1939	RlmD	98 ± 0.3	81 ± 3.5	98 ± 0.8
m <sup>5</sup> C1962	RlmI	100	100	100
m <sup>6</sup> A2030	RlmJ	97 ± 0.9	94 ± 1.4	94 ± 0.2
m <sup>7</sup> G2069	RlmKL	100	96 ± 1.7	96 ± 2.3
Gm2251	RlmB	99 ± 0.4	96 ± 2.2	93 ± 0.5
m <sup>2</sup> G2445	RlmKL	100	100	100
Cm2498	RlmM	97 ± 0.2	96.1±0.4	98 ± 0.2
m <sup>2</sup> A2503	RlmN	100	100	100
Um2552	RlmE	91 ± 5.2	28 ± 16	81 ± 8.7

表 2-4, 23S rRNA に存在する rRNA メチル化修飾の修飾率変化

22°C、LB 培地で培養した WT 及び  $\Delta mtn$  から 50S リボソームや 45S 前駆体を単離し、各メチル化修飾の修飾率を LC/MS を用いて解析した。赤文字は有意に減少したことを示す (p<0.05)

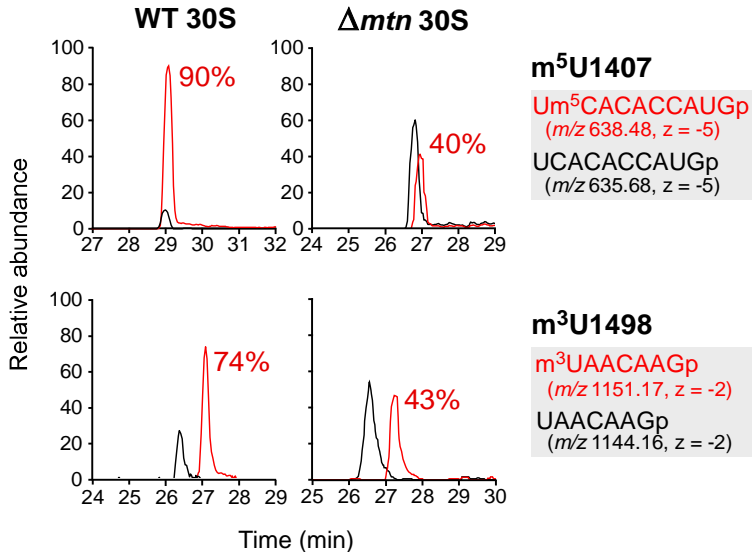


図 2-16, 16S rRNA で有意に修飾率が減少する修飾

表 2-3 に示したうち  $\Delta$ mtn で有意に修飾率が減少した修飾について LC/MS の結果を示す。赤線は修飾断片、黒線は未修飾断片を表す。

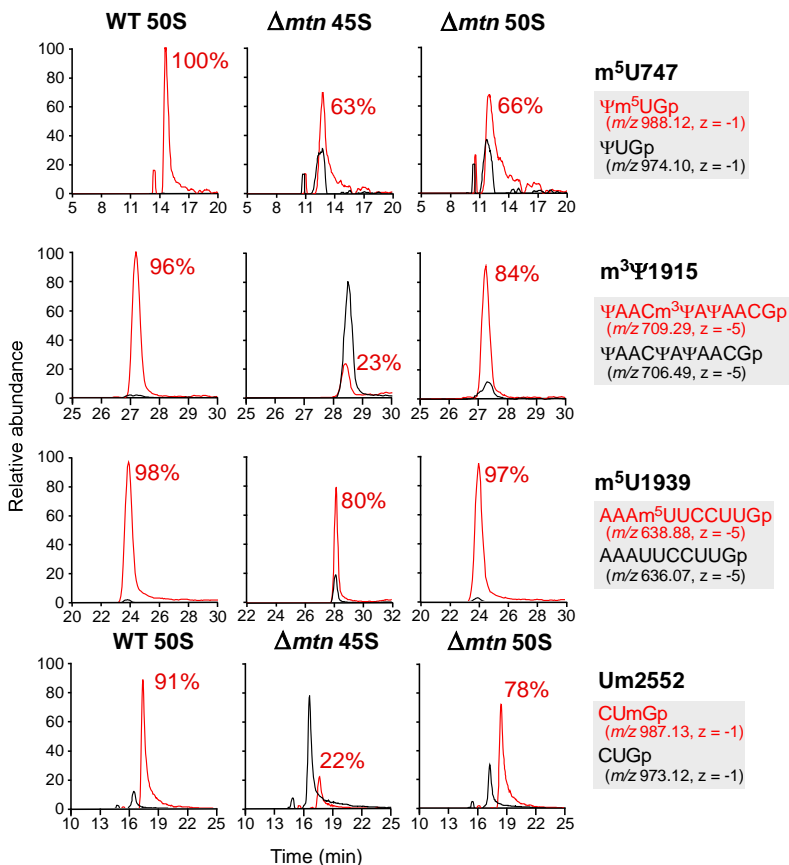


図 2-17, 23S rRNA で有意に修飾率が減少する修飾

表 2-4 に示したうち  $\Delta$ mtn で有意に修飾率が減少した修飾について LC/MS の結果を示す。赤線は修飾断片、黒線は未修飾断片を表す。

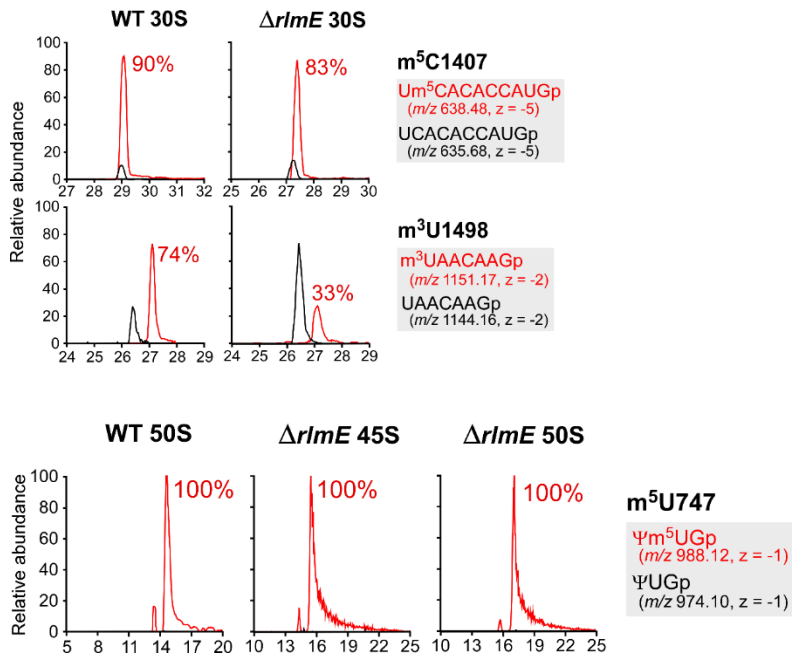


図 2-18,  $\Delta rlmE$ での各 rRNA 修飾の修飾率

$\Delta mtn$  で有意に修飾率が減少した修飾について、 $\Delta rlmE$ でも修飾率が低下するかを LC/MS を用いて解析した。赤線は修飾断片、黒線は未修飾断片を表す。培養温度は 22°C、培地は LB 培地。

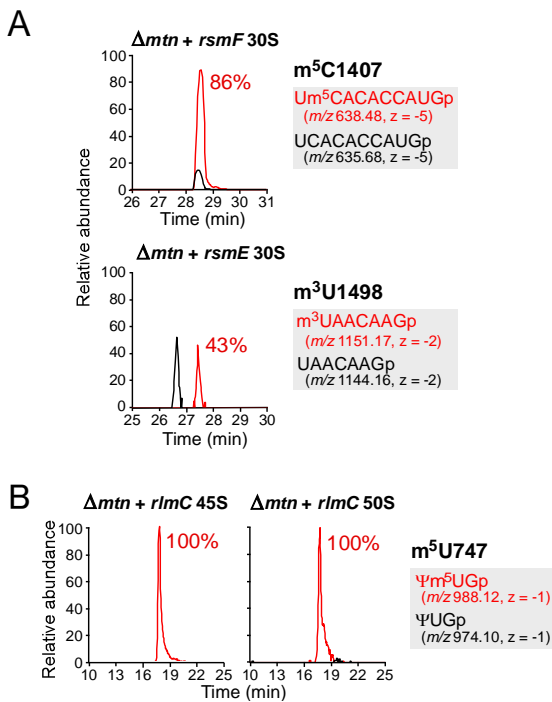


図 2-19,各 rRNA 修飾酵素を過剰発現した時の修飾率の回復

$\Delta mtn$  で有意に修飾率が減少した修飾について、それぞれの修飾酵素を過剰発現することで修飾率が回復するかを LC/MS を用いて解析した。赤線は修飾断片、黒線は未修飾断片を表す。培養温度は 22°C、培地は LB 培地。

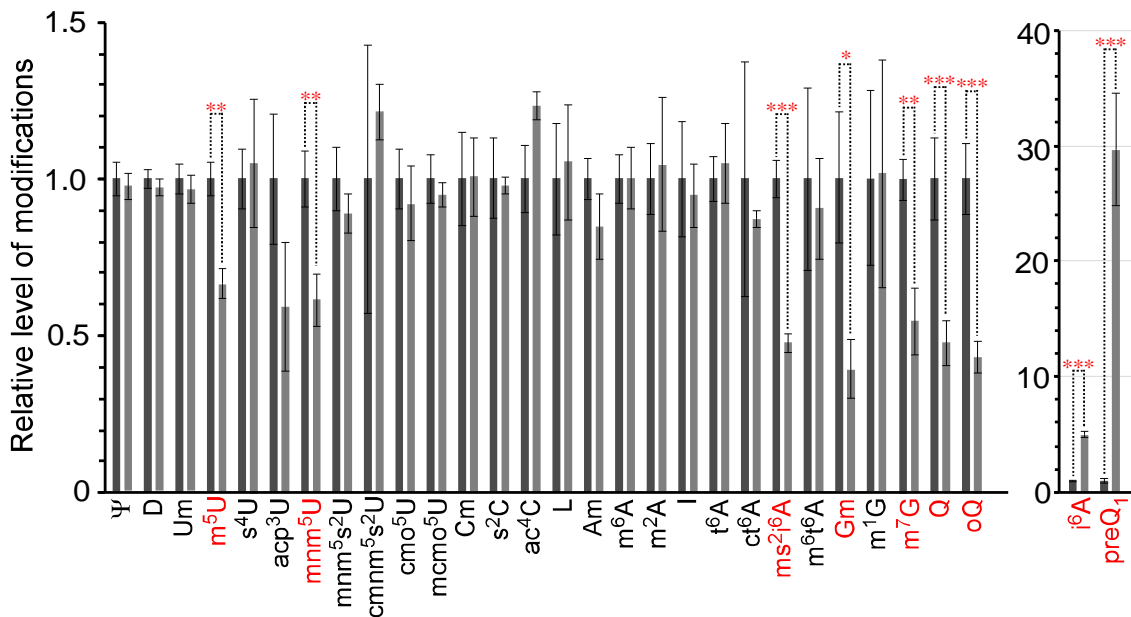


図 2-20, AdoMet 濃度低下時の tRNA 修飾の変化

WT 及び  $\Delta mtn$  から tRNA 画分を精製し、tRNA 修飾の修飾率を LC/MS を用いて解析した。左 (黒色) は WT、右 (灰色) は  $\Delta mtn$ 。赤は有意に修飾率が変動した修飾。\*:  $p < 0.025$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ 。菌体の培養温度は 22°C、培地は LB 培地。

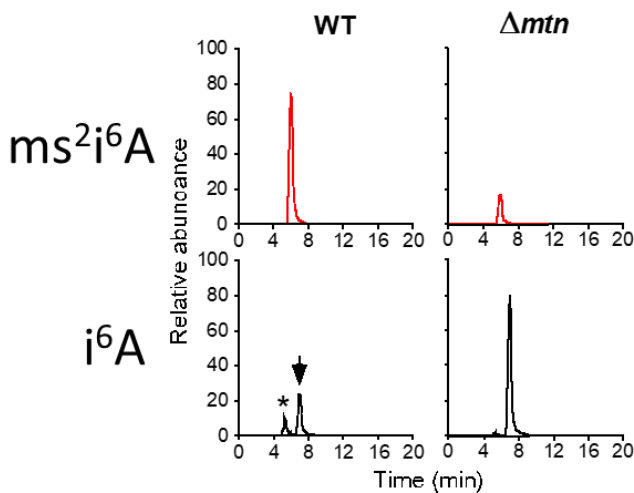


図 2-21, AdoMet 濃度低下時の  $ms^2i^6A$  修飾の変化

WT 及び  $\Delta mtn$  の  $ms^2i^6A$  および  $i^6A$  の LC/MS 解析結果。これらのピークは Adenine のピークを基準としている。

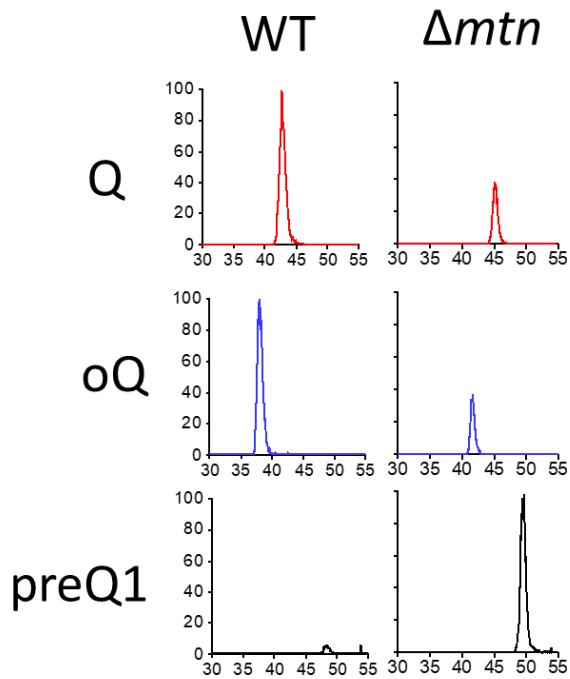


図 2-22, AdoMet 濃度低下時の Q 修飾の変化

WT 及び  $\Delta mt n$  の Q, oQ, preQ1 の LC/MS 解析結果。これらのピークは Guanosine のピークを基準としている。

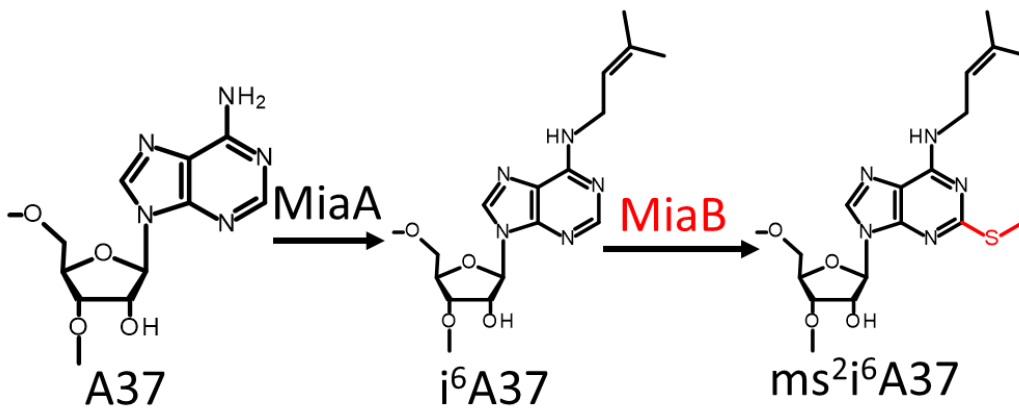


図 2-23, 大腸菌における  $ms^2i^6A$  修飾の生合成機構

大腸菌における  $ms^2i^6A$  修飾の生合成機構を示す。

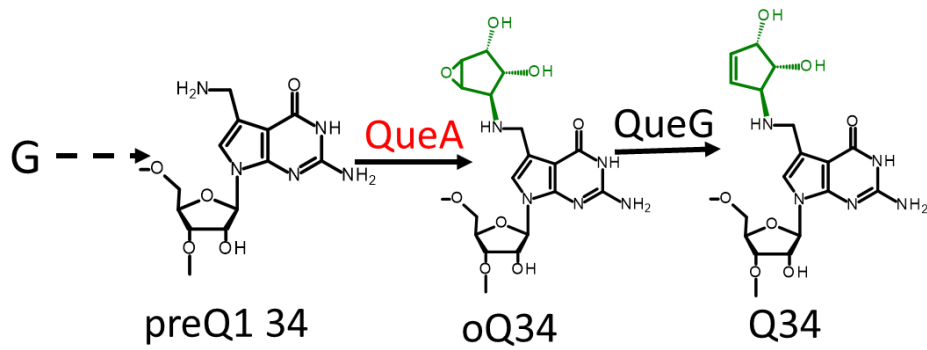


図 2-24,大腸菌における Q 修飾の生合成機構

大腸菌における Q 修飾の生合成機構を示す。図には生合成の後期過程のみを示した。

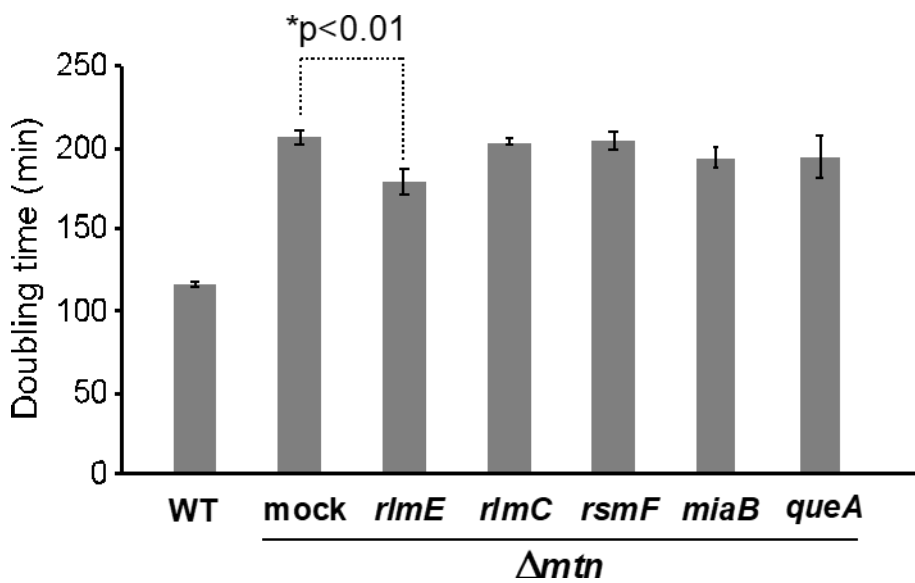


図 2-25,各修飾酵素を過剰発現した時の  $\Delta mtn$  の生育の変化

$\Delta mtn$  に各修飾酵素を過剰発現した株の doubling time。培養温度は 22°C、培地は LB 培地。

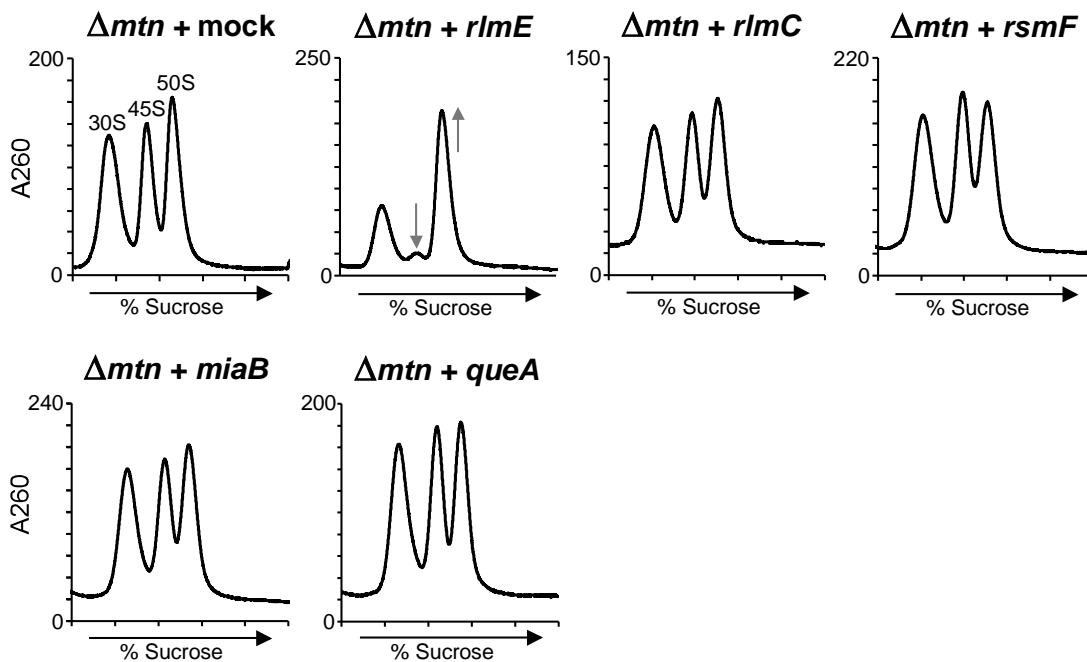


図 2-26, *rlmE* を過剰発現した時の  $\Delta mtn$  のリボソーム組成の変化

$\Delta mtn$  に各修飾酵素を過剰発現した株の解離条件におけるリボソーム組成。培養温度は 22°C、培地は LB 培地。

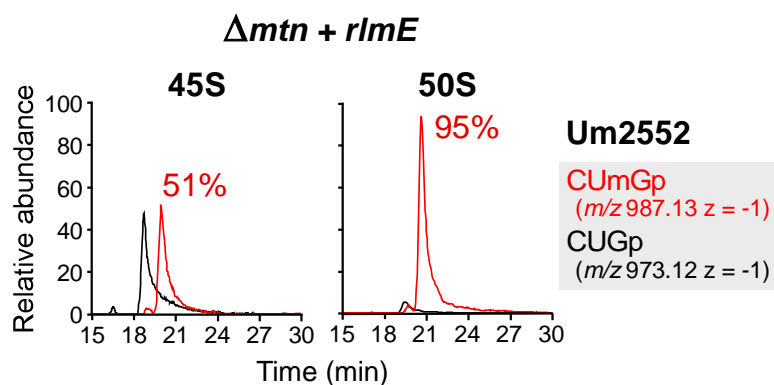


図 2-27,  $\Delta mtn + rlmE$  の 45S, 50S の Um2552 修飾率

$\Delta mtn + rlmE$  から抽出した 45S 前駆体及び 50S サブユニットから rRNA を抽出し Um2552 修飾率を LC/MS を用いて解析した。培養温度は 22°C、培地は LB 培地。

### Growth curve

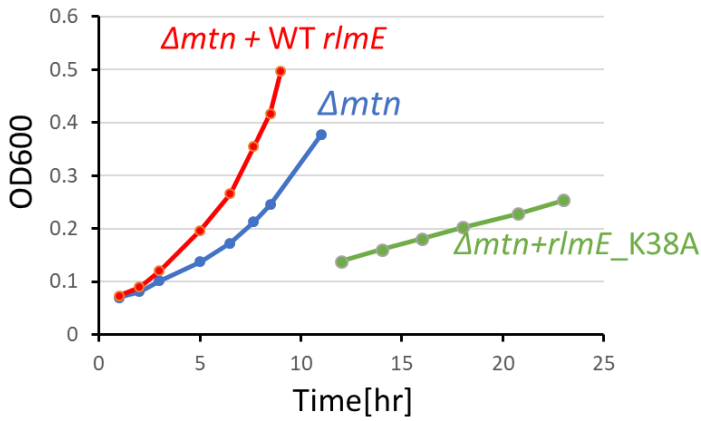


図 2-28, *rlmE* の active site mutant を過剰発現した時の  $\Delta mtn$  の生育

$\Delta mtn$  に *rlmE* の active site mutant を過剰発現した株の growth curve。培養温度は 22°C、培地は LB 培地。

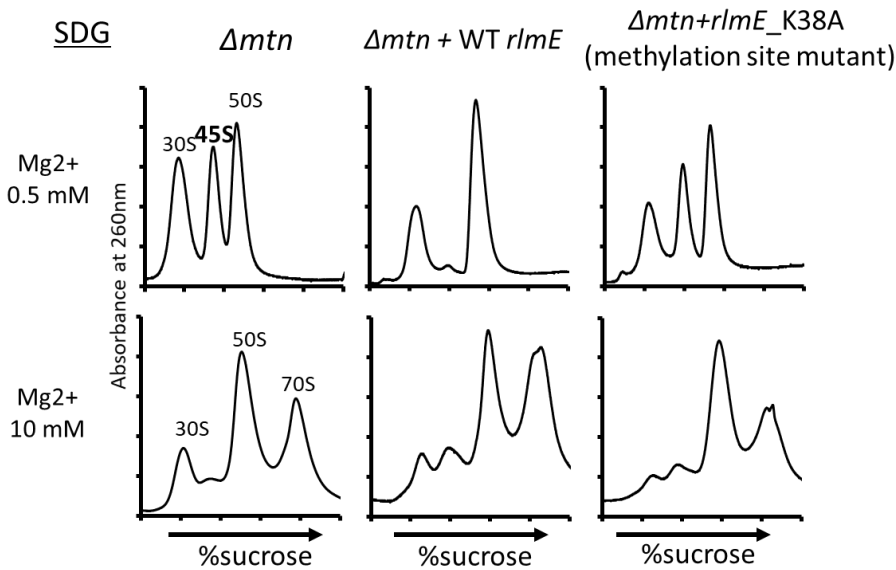


図 2-29, *rlmE* の active site mutant を過剰発現した時の  $\Delta mtn$  のリボソーム組成

$\Delta mtn$  に *rlmE* の active site mutant を過剰発現した株のリボソーム組成。培養温度は 22°C、培地は LB 培地。



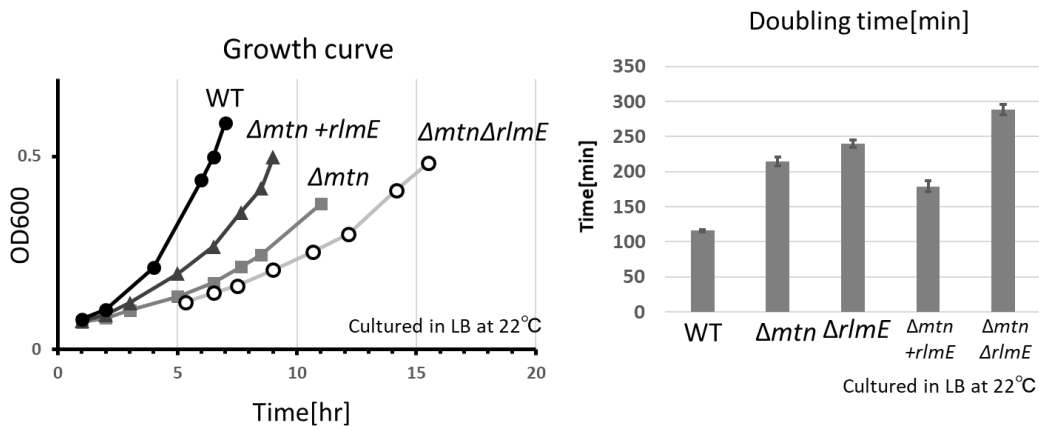


図 2-30,  $\Delta rlm E \Delta mt n$  の生育

$\Delta rlm E \Delta mt n$  の growth curve と doubling time。培養温度は 22°C、培地は LB 培地。

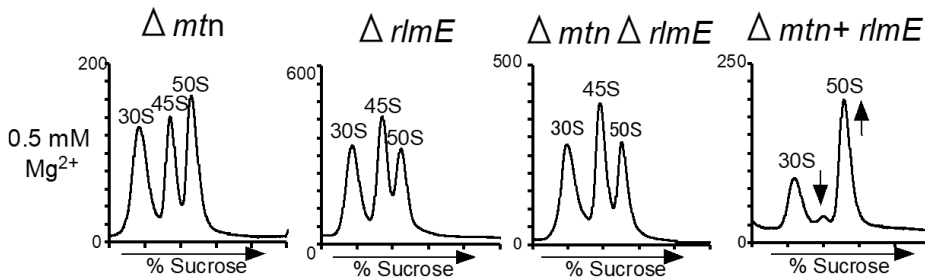


図 2-31,  $\Delta rlm E \Delta mt n$  のリボソーム組成

$\Delta rlm E \Delta mt n$  のリボソーム組成。培養温度は 22°C、培地は LB 培地。

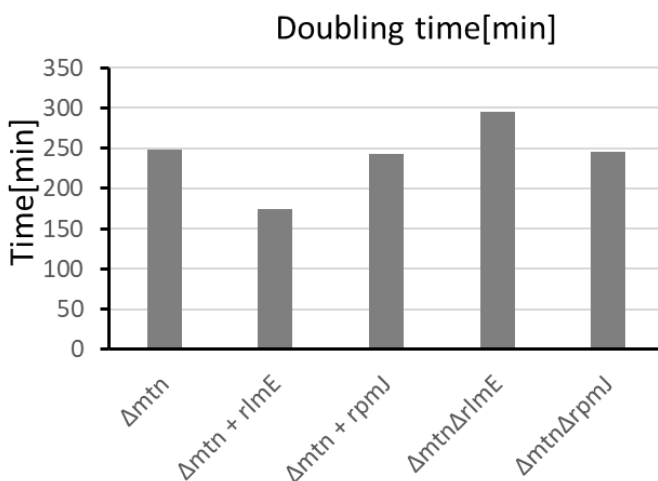


図 2-32,  $mt n$  と L36( $rpm J$ ) の二重欠損株の生育

$\Delta mt n + rpm J$  および  $\Delta rlm E \Delta mt n$  の doubling time。培養温度は 22°C、培地は LB 培地。

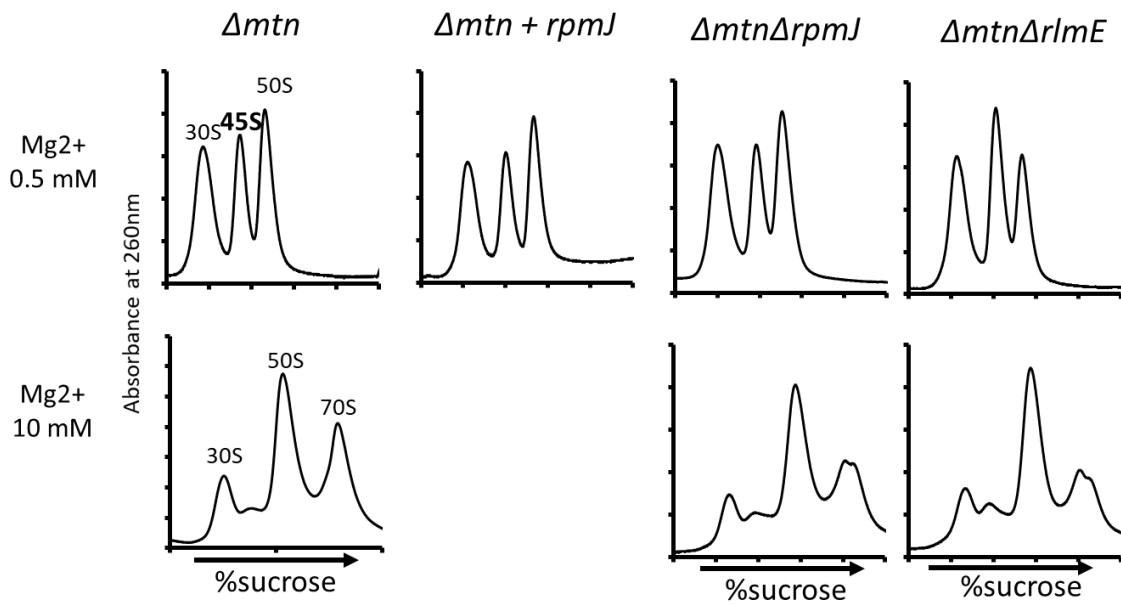


図 2-33, *mtn* と L36 の二重欠損株のリボソーム組成

$\Delta mtn + rpmJ$  および  $\Delta rlmE\Delta mtn$  のリボソーム組成。培養温度は 22°C、培地は LB 培地。

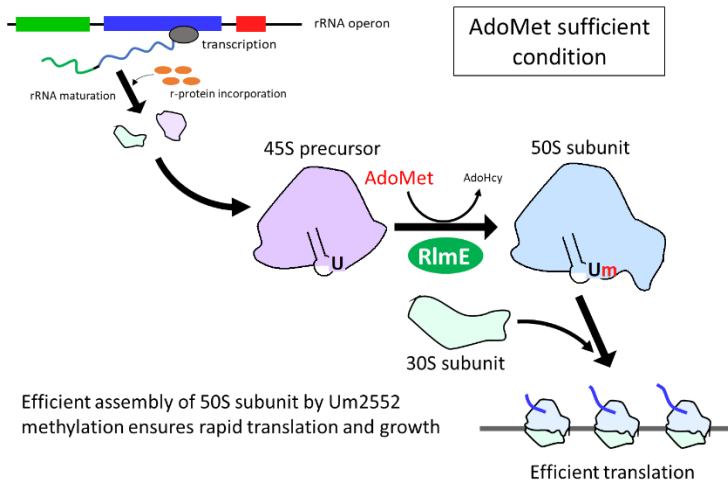


図 2-34, AdoMet 濃度が十分に高いときの 50S サブユニット生合成後期過程

細胞中の AdoMet 濃度が高いときは RlmE による Um2552 修飾率は高く維持され、45S 前駆体から 50S サブユニットへの生合成が迅速に促進される。この結果細胞中の 70S リボソーム量が維持され、高効率の翻訳と速い生育速度が達成される。

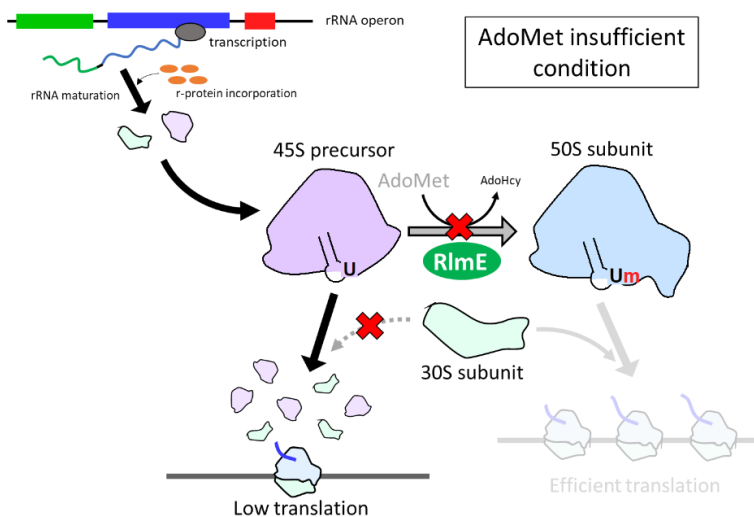


図 2-35, AdoMet 濃度が低下したときの 50S サブユニット生合成後期過程

細胞中の AdoMet 濃度が低下すると Um2552 修飾効率が低下し、45S 前駆体から 50S サブユニットへの生合成が抑制される。この結果 45S 前駆体の蓄積が観察される。45S 前駆体は 30S サブユニットと結合して 70S リボソームを形成することができないため細胞中のリボソーム量が低下し、翻訳効率が落ち生育が抑制される。

## 3, 本研究の意義と今後の展望

### 3-1, AdoMet 依存的なリボソーム生合成後期過程制御機構の生理学的意義

本研究により、大腸菌におけるリボソーム生合成の後期過程が AdoMet により制御されていることが判明した。この機構では AdoMet 濃度の変動にตอบสนองして RlmE による Um2552 修飾効率が変化し、それによって 50S 生合成後期過程が制御される。この機構により、細胞内のリボソーム量が AdoMet 濃度によって敏感に制御されるようになる。細胞内のリボソーム量は細胞の翻訳量や生育に大きな影響を与えるため、この機構は細胞が栄養条件に対応して生育速度を調節する機構であると考えられる。また、大腸菌においてリボソームは菌体の乾燥重量の 25% を占め、リボソームの生合成や翻訳には大量のエネルギーが必要となる。AdoMet を指標としてリボソーム生合成を調節することで、細胞内で消費するエネルギーを大幅に節約できると考えられる。AdoMet に対応してリボソーム生合成と生育を制御する意義として、AdoMet がほかの細胞内プロセスに関与する様々なメチル化修飾酵素の基質であることがあげられる。これらのメチル化修飾が Um2552 と連動して修飾率を変動させることで、細胞分裂や DNA の複製、翻訳などリボソーム生合成を協調させることができると推測される。また、AdoMet は Met と ATP から合成される(図 1-3)ため、AdoMet 濃度の変化は Met 濃度の変化に比例していると推測される。Met は N-Formyl methionine(fMet)として開始 tRNA に用いられるのをはじめ、タンパク質合成において重要な役割を果たす。このため、細胞中の Met 濃度は翻訳速度に強く影響すると考えられる。AdoMet を指標としてリボソーム生合成を制御することで、細胞中の Met 濃度に応じて細胞中のリボソーム量を制御することができ、Met 不足で翻訳が途中で停止してしまうような事態を防ぐことにつながると考えられる。

また、45S 前駆体はほぼ完成したリボソーム中間体であり、くみ上げるために多くのエネルギーを必要としている。そのため、細胞中の翻訳量を抑えるときにただ分解してしまうと大きなエネルギーロスとなる。このため、生合成後期過程でリボソームの生合成を制御する必要があるのだと考えられる。リボソーム生合成の調節は緊縮応答などの形で転写段階でも行われるが、転写段階での制御の場合制御が働いてから細胞中のリボソーム量に反映されるまでに時間がかかってしまう。生合成後期過程で制御することで AdoMet が低下した時に 45S 前駆体を貯蔵し、AdoMet 濃度が回復したらすぐに 50S サブユニットを合成して翻訳を回復させるといった敏感な生育制御が可能になると考えられる。

### 3-2, 本機構にかかわるほかのアッセンブリー因子の探索

今後の研究課題としては、大腸菌における AdoMet 依存的な 50S 生合成制御過程に関与するほかのアッセンブリー因子の同定があげられる。大腸菌の 50S 生合成後期過程には、RlmE 以外に GTPase である ObgE、Der や RNA helicase DbpA が関与している(Hwang and Inouye, 2001, 2006; Sato et al., 2005; Sharpe Elles et al., 2009) (表 1-3)。obgE の dominant negative 変異体を過剰発現させた株では 45S 前駆体に似たりボソーム粒子の蓄積が報告されている(Jiang et al., 2006)。一方、der の発現量を抑制した株では 70S リボソームの蓄積量が減少し、解離した 30S と 50S の比率が増加する(Hwang and Inouye, 2006)。さらに興味深いことに、これらの GTPase は過剰発現により  $\Delta rlmE$  のフェノタイプを回復させ

ることが知られている(Tan et al., 2002)。これらの結果は、ObgE や Der が RlmE とは独立して 50S の生合成後期過程を担っている可能性を示している。

一方、DbpA は Dead box RNA helicase に属し、Helicase domain と H92 binding domain によって構成される。DbpA は H92 binding domain を介して RlmE と同様に H92 を認識して結合し(Tsu et al., 2001)、その結合により自身の ATPase 活性を活性化して(Tsu et al., 2001)、周囲に存在する RNA の二次構造をほどく活性を持つと推測されている(Henn et al., 2001)。また、DbpA は *in vitro* において 50S サブユニットではなく 45S 前駆体を基質として好むことが明らかとなっている(Elles and Uhlenbeck, 2008; Tsu and Uhlenbeck, 1998)。このことは、DbpA が 50S 生合成後期過程に関与することを示唆している。さらに、*dbpA* の dominant negative 変異体(R331A 変異体)を過剰発現した株では 45S 前駆体の蓄積が観察されること(Sharpe Elles et al., 2009)から、DbpA は RlmE とともに 50S 生合成後期過程で働くことが推測されている。しかし、*dbpA* を欠損した株ではフェノタイプが見つかっておらず、その機能は未解明のままである。

今後は、これらのアッセムブリー因子の機能の解析を中心に、大腸菌における AdoMet 依存的な 50S 生合成制御機構の全容の解明を目指していきたい。

### 3-3, ほかの生物における考察

さらに、今後の研究課題として、ほかのバクテリアや真核生物において同様のリボソーム生合成制御機構が保存されているかを検証することがあげられる。RlmE と Um2552 はバクテリアにおいて広く保存されているが、枯草菌をはじめとするフィルミクテス門では保存されていない(図 3-1)。枯草菌においては U2552 に隣接する G2553 が 2'-O-メチル化修飾(Gm2553、枯草菌では Gm2582 に相当)を受けている(Hansen et al., 2002)。この位置の修飾は真核生物のミトコンドリアにおいて広く保存されており、ヒトにおいて Gm2553 を担う MRM3 を欠損した細胞では顕著な生育阻害とリボソーム生合成の異常が観察される(Rorbach et al., 2014)。枯草菌においても MRM3 の homolog は保存されており(図 3-1)、この修飾がフィルミクテス門において Um2552 の代わりにリボソーム生合成の後期過程を担っている可能性がある。

一方、真核生物においては RlmE と Um2552 は細胞質とミトコンドリアの両方で広く保存されている。RlmE の homolog は酵母をはじめとする真核生物において 3 つ(*trm7*, *spb1*, *mrm2*)存在するが、*trm7* は tRNA の 32 位か 34 位の 2'-O-メチル化修飾を担い(Pintard et al., 2002b)、*spb1* は細胞質リボソーム、*mrm2* はミトコンドリアリボソームの Um2552 修飾を担っている(Kressler et al., 1999; Pintard et al., 2002a)。このうち Spb1 と Mrm2 が真核生物においてもリボソーム生合成後期過程を担っているか、また AdoMet 依存的にリボソーム生合成を制御しているかについて以下に検討した。

ミトコンドリアでの homolog である *mrm2*/MRM2 は RlmE と非常に似通った配列を持ち(図 3-2)、ミトコンドリア大サブユニットの Um2552 修飾(酵母のミトコンドリアリボソームでは Um2819、ヒトのミトコンドリアリボソームでは Um1369 に相当)を担っている(Lee and Bogenhagen, 2014; Lee et al., 2013; Pintard et al., 2002a)。この修飾はリボソーム大サブユニットの生合成や安定性に関与していると考えられているが、その詳細な機能は未解明である(Rorbach et al., 2014)。ミトコンドリアリボソームは原核生物由来であると考えられているが、長い進化の過程で構造は大きく変化している。そ

ここで、ミトコンドリアリボソームにおいて H92 周辺の構造が保存されているかを Cryo-EM によるミトコンドリアリボソームの構造解析(Amunts et al., 2015; Desai et al., 2017)を参考に検証した(図 3-3)。すると、図 3-3 に示すように、ミトコンドリアリボソームにおいても Um2552-C2556-U1955 の base triple や H92 と H71 の相互作用、L36 周辺の RNA のコンフォメーションは保存されていることが分かった。さらに、先行研究により、大腸菌と同様にミトコンドリアリボソーム生合成でも L36 が生合成の最終段階で取り込まれることが明らかとなっている(Zeng et al., 2018)。これらは、大腸菌と同様、ミトコンドリアにおいても Um2552 修飾の形成がリボソームの生合成後期過程全体を促進する機能を持つことを示唆している。さらに、ObgE の homolog と考えられる Mgt2 や、大腸菌の Dead box RNA helicase と似た配列を持つ Mrh4 などもミトコンドリアリボソームの生合成後期過程に関与している(Datta et al., 2005; De Silva et al., 2013)。このことは、大腸菌におけるリボソーム生合成の制御機構がミトコンドリアにおいても保存されている可能性を示している。

一方、細胞質リボソームは原核生物とは構造が大きく異なり、L36 が保存されていない(Ban et al., 2014)。そこで、リボソームの結晶構造から L36 に代わる r-protein が真核生物において存在しないかを調べた(Ben-Shem et al., 2011; Khatte et al., 2015) (図 3-4)。すると、L36 に相当する場所に真核生物リボソームにのみ存在する eL40 という r-protein が存在することが分かった。さらに、この eL40 の発現を抑制した株では、rRNA のプロセッシングとリボソームの生合成後期過程に異常がみられた(Fernández-Pevida et al., 2012)。また、細胞質リボソームにおいても Um2552-C2556-U1955 の base triple や H92 と H71 の相互作用、eL40 周辺の RNA のコンフォメーションは保存されていることが分かった(図 3-4)。これらは、大腸菌と同様、真核生物においても Um2552 修飾の形成がリボソームの生合成後期過程全体を促進する機能を持つ可能性を示唆している。しかし、酵母での細胞質 homolog である *spb1* は通常の生育条件では Um2552 修飾ではなく隣接する Gm2553 修飾を担い、Um2552 修飾は snR52 により修飾が導入される(Lapeyre and Purushothaman, 2004)。snR52 は生合成の初期段階で修飾を導入するため、リボソーム生合成の後期過程に関与しているとは考えづらい。一方で、snR52 を欠損させた場合には Spb1 が Um2552 修飾を担う(Lapeyre and Purushothaman, 2004)ことから、特定の生育条件下で snR52 ではなく Spb1 が Um2552 修飾を担うことがあるのかもしれない。また、Spb1 や FTSJ3 はメチル化ドメイン(FTSJ domain)の配列は互いに似通っているものの、異なる機能を持つドメインと結合しており(図 3-2)、修飾とは別に酵素自体が rRNA プロセッシングの機能を有している可能性も示唆されている(Lapeyre and Purushothaman, 2004; Morello et al., 2011)。

真核生物におけるリボソーム生合成後期過程が Um2552 修飾を介して AdoMet 濃度によって制御されているという直接的な証拠は現時点で存在しない。しかし、細胞中の AdoMet 濃度低下が rRNA メチル化修飾率の低下とリボソームの生合成の阻害を引き起こす(Caboche and Bachellerie, 1977)ことや、ミトコンドリアへの AdoMet 輸送の阻害がミトコンドリアの翻訳と機能異常を引き起こす(Kishita et al., 2015)ことから、細胞中の AdoMet 濃度は真核生物の細胞質とミトコンドリアのリボソーム生合成に大きな影響を与えることが示唆される。今後詳細な解明を進めることで、AdoMet 濃度によるリボソーム生合成制御機構が真核生物においても存在するか明らかにしていきたい。

### 3-4, 図・表

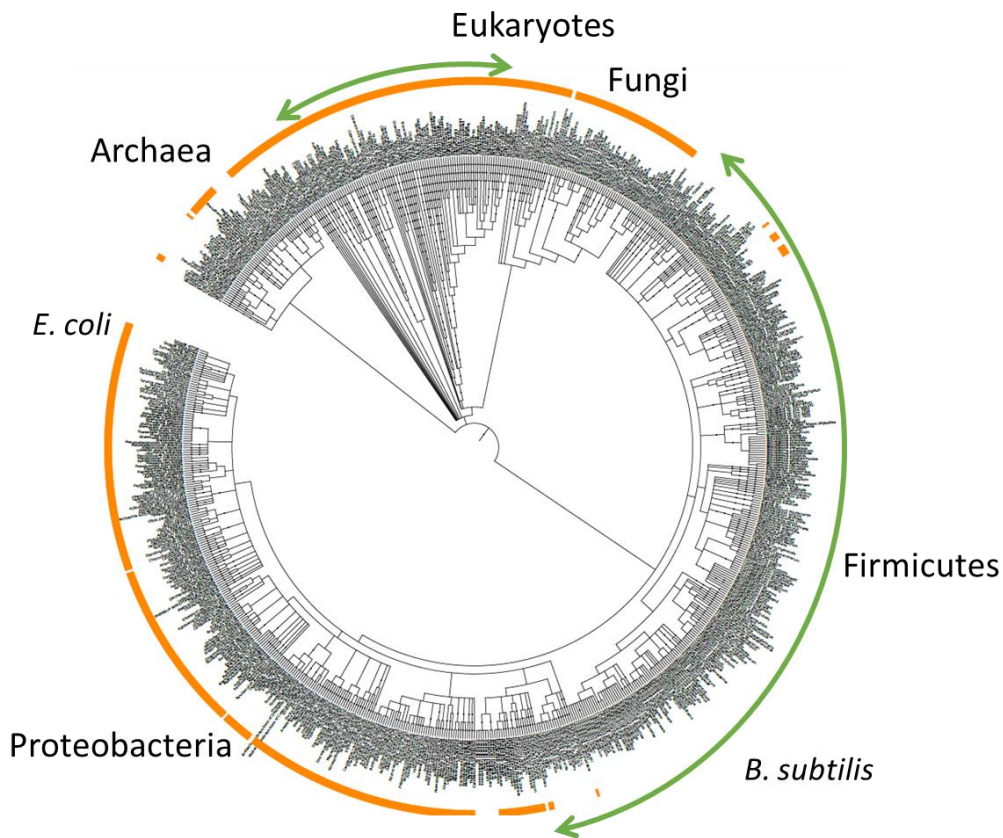


図 3-1. RlmE と MRM3 の生物間の保存性

様々な生物種における RlmE、MRM3 の保存性を系統樹に示す。RlmE が保存されている生物種をオレンジ色、MRM3 が保存されている生物種を緑色で示した。RlmE はプロテオバクテリア、真核生物、古細菌で幅広く保存されているが、フィルミクテスなどでは保存されていない。逆に、MRM3 はプロテオバクテリアでは保存されていないが、酵母を除く真核生物とフィルミクテスで保存されている。

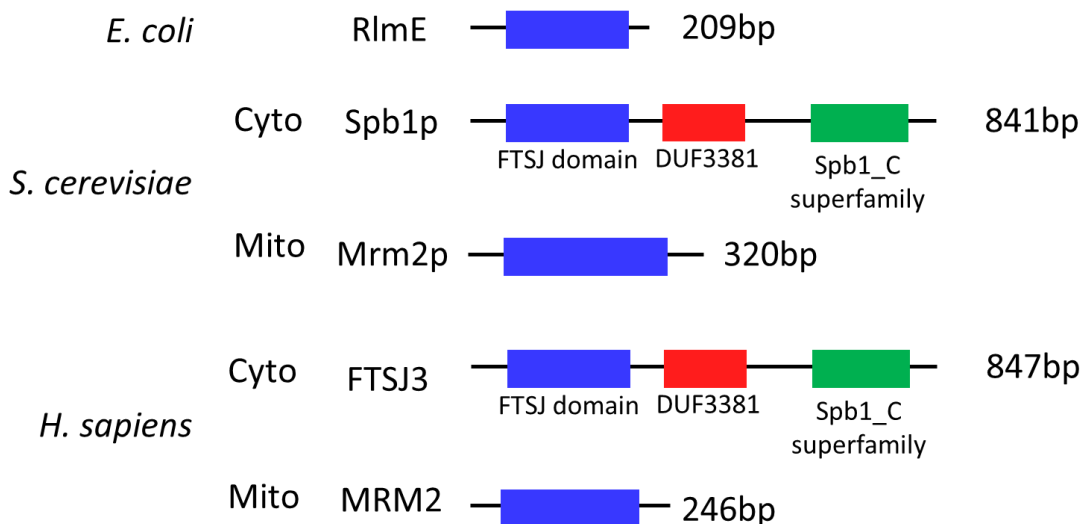


図 3-2. RlmE の真核生物における homolog

酵母及びヒトにおける RlmE の homolog を示した。ミトコンドリアの homolog が大腸菌の RlmE に近い配列を持つ一方、細胞質の homolog は機能未知のドメインが C 末端側に結合している。

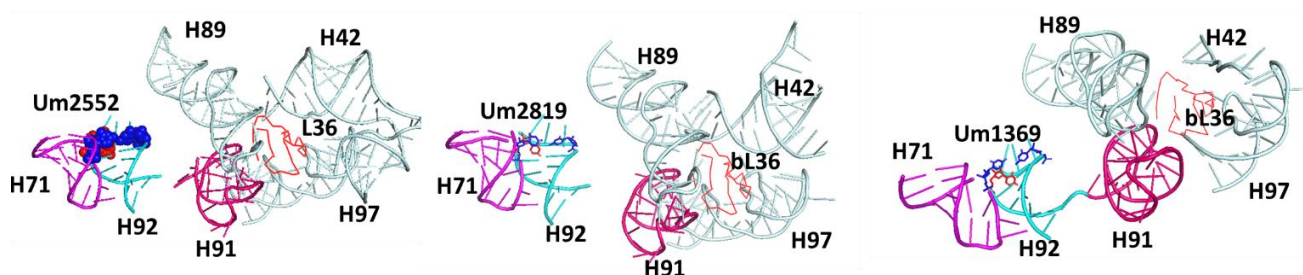


図 3-3. ミトコンドリアリボソームの PTC 近傍の構造

PTC 近傍の構造を大腸菌のリボソームと酵母及びヒトにおけるミトコンドリアリボソームとで比較した。左が大腸菌リボソーム(pdb:4ybb)、中央が酵母のミトコンドリアリボソーム(pdb:5mrc)、右がヒトのミトコンドリアリボソーム(pdb:3j9m)。Um2552 に相当する修飾を赤、base triple を青で示した。

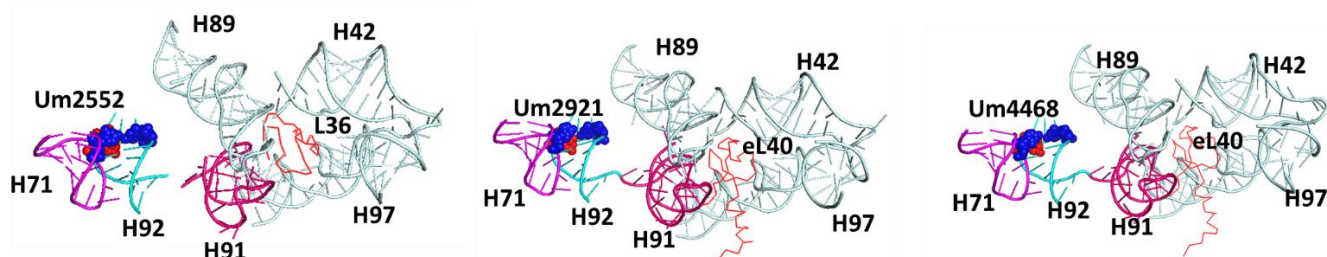


図 3-4. 真核生物細胞質リボソームの PTC 近傍の構造

PTC 近傍の構造を大腸菌のリボソームと酵母及びヒトにおける細胞質リボソームとで比較した。左が大腸菌リボソーム(pdb: 4ybb)、中央が酵母の細胞質リボソーム(pdb:4v88)、右がヒトの細胞質リボソーム(pdb:4ug0)。Um2552 に相当する修飾を赤、base triple を青で示した。



## 4, 引用文献

- Amunts, A., Brown, A., Toots, J., Scheres, S.H.W., and Ramakrishnan, V. (2015). Ribosome. The structure of the human mitochondrial ribosome. *Science* *348*, 95-98.
- Andersen, N.M., and Douthwaite, S. (2006). YebU is a m5C methyltransferase specific for 16 S rRNA nucleotide 1407. *J Mol Biol* *359*, 777-786.
- Anstee, Q.M., and Day, C.P. (2012). S-adenosylmethionine (SAME) therapy in liver disease: a review of current evidence and clinical utility. *J Hepatol* *57*, 1097-1109.
- Arai, T., Ishiguro, K., Kimura, S., Sakaguchi, Y., and Suzuki, T. (2015). Single methylation of 23S rRNA triggers late steps of 50S ribosomal subunit assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, E4707-4716.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H. (2006). Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* *2*, 2006.0008.
- Ban, N., Beckmann, R., Cate, J.H., Dinman, J.D., Dragon, F., Ellis, S.R., Lafontaine, D.L., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J.M., *et al.* (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Curr Opin Struct Biol* *24*, 165-169.
- Barritault, D., Expert-Bezancon, A., Guérin, M.F., and Hayes, D. (1976). The use of acetone precipitation in the isolation of ribosomal proteins. *Eur J Biochem* *63*, 131-135.
- Basturea, G.N., and Deutscher, M.P. (2007). Substrate specificity and properties of the Escherichia coli 16S rRNA methyltransferase, RsmE. *RNA* *13*, 1969-1976.
- Baudin-Baillieu, A., Fabret, C., Liang, X.H., Piekna-Przybylska, D., Fournier, M.J., and Rousset, J.P. (2009). Nucleotide modifications in three functionally important regions of the Saccharomyces cerevisiae ribosome affect translation accuracy. *Nucleic Acids Res* *37*, 7665-7677.
- Bauerle, M.R., Schwalm, E.L., and Booker, S.J. (2015). Mechanistic diversity of radical S-adenosylmethionine (SAM)-dependent methylation. *J Biol Chem* *290*, 3995-4002.
- Baxter-Roshek, J.L., Petrov, A.N., and Dinman, J.D. (2007). Optimization of ribosome structure and function by rRNA base modification. *PLoS One* *2*, e174.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* *334*, 1524-1529.
- Bjork, G.R., and Neidhardt, F.C. (1975). Physiological and biochemical studies on the function of 5-methyluridine in the transfer ribonucleic acid of Escherichia coli. *J Bacteriol* *124*, 99-111.
- Bonnerot, C., Pintard, L., and Lutfalla, G. (2003). Functional redundancy of Spb1p and a snR52-dependent mechanism for the 2'-O-ribose methylation of a conserved rRNA position in yeast. *Mol Cell* *12*, 1309-1315.
- Bottiglieri, T., Godfrey, P., Flynn, T., Carney, M.W., Toone, B.K., and Reynolds, E.H. (1990). Cerebrospinal fluid S-adenosylmethionine in depression and dementia: effects of treatment with parenteral and oral S-adenosylmethionine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *53*, 1096-1098.
- Bügl, H., Fauman, E.B., Staker, B.L., Zheng, F., Kushner, S.R., Saper, M.A., Bardwell, J.C., and Jakob, U. (2000). RNA methylation under heat shock control. *Mol Cell* *6*, 349-360.

Caboche, M., and Bachellerie, J.P. (1977). RNA methylation and control of eukaryotic RNA biosynthesis. Effects of cycloleucine, a specific inhibitor of methylation, on ribosomal RNA maturation. *Eur J Biochem* *74*, 19-29.

Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P., Costa, A., Desgres, J., and Richarme, G. (2000). The FtsJ/RrmJ heat shock protein of *Escherichia coli* is a 23 S ribosomal RNA methyltransferase. *J Biol Chem* *275*, 16414-16419.

Casero, R.A., Murray Stewart, T., and Pegg, A.E. (2018). Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer*.

Connolly, K., Rife, J.P., and Culver, G. (2008). Mechanistic insight into the ribosome biogenesis functions of the ancient protein KsgA. *Mol Microbiol* *70*, 1062-1075.

Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 6640-6645.

Datta, K., Fuentes, J.L., and Maddock, J.R. (2005). The yeast GTPase Mtg2p is required for mitochondrial translation and partially suppresses an rRNA methyltransferase mutant, *mrm2*. *Mol Biol Cell* *16*, 954-963.

De Bie, L.G., Roovers, M., Oudjama, Y., Wattiez, R., Tricot, C., Stalon, V., Droogmans, L., and Bujnicki, J.M. (2003). The *yggH* gene of *Escherichia coli* encodes a tRNA (m7G46) methyltransferase. *J Bacteriol* *185*, 3238-3243.

De Silva, D., Fontanesi, F., and Barrientos, A. (2013). The DEAD box protein Mrh4 functions in the assembly of the mitochondrial large ribosomal subunit. *Cell Metab* *18*, 712-725.

Desai, N., Brown, A., Amunts, A., and Ramakrishnan, V. (2017). The structure of the yeast mitochondrial ribosome. *Science* *355*, 528-531.

Dumelin, C.E., Chen, Y., Leconte, A.M., Chen, Y.G., and Liu, D.R. (2012). Discovery and biological characterization of geranylated RNA in bacteria. *Nat Chem Biol* *8*, 913-919.

Ejby, M., Sørensen, M.A., and Pedersen, S. (2007). Pseudouridylation of helix 69 of 23S rRNA is necessary for an effective translation termination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 19410-19415.

El Yacoubi, B., Bailly, M., and de Crécy-Lagard, V. (2012). Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annu Rev Genet* *46*, 69-95.

Elles, L.M., and Uhlenbeck, O.C. (2008). Mutation of the arginine finger in the active site of *Escherichia coli* DbpA abolishes ATPase and helicase activity and confers a dominant slow growth phenotype. *Nucleic Acids Res* *36*, 41-50.

Ero, R., Peil, L., Liiv, A., and Remme, J. (2008). Identification of pseudouridine methyltransferase in *Escherichia coli*. *RNA* *14*, 2223-2233.

Esberg, B., Leung, H.C., Tsui, H.C., Björk, G.R., and Winkler, M.E. (1999). Identification of the *miaB* gene, involved in methylthiolation of isopentenylated A37 derivatives in the tRNA of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* *181*, 7256-7265.

Fernández-Pevida, A., Rodríguez-Galán, O., Díaz-Quintana, A., Kressler, D., and de la Cruz, J. (2012). Yeast ribosomal protein L40 assembles late into precursor 60 S ribosomes and is required for their cytoplasmic maturation. *J Biol Chem* *287*, 38390-38407.

Fontecave, M., Atta, M., and Mulliez, E. (2004). S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends*

Biochem Sci 29, 243-249.

- Gaca, A.O., Colomer-Winter, C., and Lemos, J.A. (2015). Many means to a common end: the intricacies of (p)ppGpp metabolism and its control of bacterial homeostasis. *J Bacteriol* 197, 1146-1156.
- Garone, C., D'Souza, A.R., Dallabona, C., Lodi, T., Rebelo-Guiomar, P., Rorbach, J., Donati, M.A., Procopio, E., Montomoli, M., Guerrini, R., *et al.* (2017). Defective mitochondrial rRNA methyltransferase MRM2 causes MELAS-like clinical syndrome. *Hum Mol Genet* 26, 4257-4266.
- Gutgsell, N.S., Deutscher, M.P., and Ofengand, J. (2005). The pseudouridine synthase RluD is required for normal ribosome assembly and function in *Escherichia coli*. *RNA* 11, 1141-1152.
- Hager, J., Staker, B.L., Bugl, H., and Jakob, U. (2002). Active site in RrmJ, a heat shock-induced methyltransferase. *J Biol Chem* 277, 41978-41986.
- Halliday, N.M., Hardie, K.R., Williams, P., Winzer, K., and Barrett, D.A. (2010). Quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometry profiling of activated methyl cycle metabolites involved in LuxS-dependent quorum sensing in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 403, 20-29.
- Hansen, M.A., Kirpekar, F., Ritterbusch, W., and Vester, B. (2002). Posttranscriptional modifications in the A-loop of 23S rRNAs from selected archaea and eubacteria. *RNA* 8, 202-213.
- Harcourt, E.M., Kietrys, A.M., and Kool, E.T. (2017). Chemical and structural effects of base modifications in messenger RNA. *Nature* 541, 339-346.
- Haurlyuk, V., Atkinson, G.C., Murakami, K.S., Tenson, T., and Gerdes, K. (2015). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat Rev Microbiol* 13, 298-309.
- Henn, A., Medalia, O., Shi, S.P., Steinberg, M., Franceschi, F., and Sagi, I. (2001). Visualization of unwinding activity of duplex RNA by DbpA, a DEAD box helicase, at single-molecule resolution by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5007-5012.
- Herold, M., and Nierhaus, K.H. (1987). Incorporation of six additional proteins to complete the assembly map of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *J Biol Chem* 262, 8826-8833.
- Hwang, J., and Inouye, M. (2001). An essential GTPase, der, containing double GTP-binding domains from *Escherichia coli* and *Thermotoga maritima*. *J Biol Chem* 276, 31415-31421.
- Hwang, J., and Inouye, M. (2006). The tandem GTPase, Der, is essential for the biogenesis of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 61, 1660-1672.
- Jenner, L.B., Demeshkina, N., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010). Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* 17, 555-560.
- Jiang, M., Datta, K., Walker, A., Strahler, J., Bagamasbad, P., Andrews, P.C., and Maddock, J.R. (2006). The *Escherichia coli* GTPase CgtAE is involved in late steps of large ribosome assembly. *J Bacteriol* 188, 6757-6770.
- Kharbanda, K.K. (2009). Alcoholic liver disease and methionine metabolism. *Semin Liver Dis* 29, 155-165.
- Khatter, H., Myasnikov, A.G., Natchiar, S.K., and Klaholz, B.P. (2015). Structure of the human 80S ribosome. *Nature* 520, 640-645.
- Kimura, S., and Suzuki, T. (2015). Iron-sulfur proteins responsible for RNA modifications. *Biochim Biophys Acta* 1853, 1272-1283.

King, T.H., Liu, B., McCully, R.R., and Fournier, M.J. (2003). Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center. *Mol Cell* *11*, 425-435.

Kishita, Y., Pajak, A., Bolar, N.A., Marobbio, C.M., Maffezzini, C., Miniero, D.V., Monné, M., Kohda, M., Stranneheim, H., Murayama, K., *et al.* (2015). Intra-mitochondrial Methylation Deficiency Due to Mutations in SLC25A26. *Am J Hum Genet* *97*, 761-768.

Kiss, T., Fayet-Lebaron, E., and Jády, B.E. (2010). Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Mol Cell* *37*, 597-606.

Kressler, D., Rojo, M., Linder, P., and Cruz, J. (1999). Spb1p is a putative methyltransferase required for 60S ribosomal subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* *27*, 4598-4608.

Krogh, N., Jansson, M.D., Häfner, S.J., Tehler, D., Birkedal, U., Christensen-Dalsgaard, M., Lund, A.H., and Nielsen, H. (2016). Profiling of 2'-O-Me in human rRNA reveals a subset of fractionally modified positions and provides evidence for ribosome heterogeneity. *Nucleic Acids Res* *44*, 7884-7895.

Lafontaine, D., Delcour, J., Glasser, A.L., Desgrès, J., and Vandenhaute, J. (1994). The DIM1 gene responsible for the conserved m6(2)Am6(2)A dimethylation in the 3'-terminal loop of 18 S rRNA is essential in yeast. *J Mol Biol* *241*, 492-497.

Lafontaine, D., Vandenhaute, J., and Tollervey, D. (1995). The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. *Genes Dev* *9*, 2470-2481.

Lai, C.W., Chen, H.L., Lin, K.Y., Liu, F.C., Chong, K.Y., Cheng, W.T., and Chen, C.M. (2014). FTSJ2, a heat shock-inducible mitochondrial protein, suppresses cell invasion and migration. *PLoS One* *9*, e90818.

Lapeyre, B., and Purushothaman, S.K. (2004). Spb1p-directed formation of Gm2922 in the ribosome catalytic center occurs at a late processing stage. *Mol Cell* *16*, 663-669.

Lee, K.W., and Bogenhagen, D.F. (2014). Assignment of 2'-O-methyltransferases to modification sites on the mammalian mitochondrial large subunit 16 S ribosomal RNA (rRNA). *J Biol Chem* *289*, 24936-24942.

Lee, K.W., Okot-Kotber, C., LaComb, J.F., and Bogenhagen, D.F. (2013). Mitochondrial ribosomal RNA (rRNA) methyltransferase family members are positioned to modify nascent rRNA in foci near the mitochondrial DNA nucleoid. *J Biol Chem* *288*, 31386-31399.

Li, L., and Ye, K. (2006). Crystal structure of an H/ACA box ribonucleoprotein particle. *Nature* *443*, 302-307.

Liang, X.H., Liu, Q., and Fournier, M.J. (2007). rRNA modifications in an intersubunit bridge of the ribosome strongly affect both ribosome biogenesis and activity. *Mol Cell* *28*, 965-977.

Liang, X.H., Liu, Q., and Fournier, M.J. (2009). Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing. *RNA* *15*, 1716-1728.

Lin, J., Lai, S., Jia, R., Xu, A., Zhang, L., Lu, J., and Ye, K. (2011). Structural basis for site-specific ribose methylation by box C/D RNA protein complexes. *Nature* *469*, 559-563.

Luo, G.Z., Blanco, M.A., Greer, E.L., He, C., and Shi, Y. (2015). DNA N(6)-methyladenine: a new epigenetic mark in eukaryotes? *Nat Rev Mol Cell Biol* *16*, 705-710.

Madsen, C.T., Mengel-Jorgensen, J., Kirpekar, F., and Douthwaite, S. (2003). Identifying the methyltransferases for m(5)U747 and m(5)U1939 in 23S rRNA using MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* *31*, 4738-4746.

Maldonado, L.Y., Arsene, D., Mato, J.M., and Lu, S.C. (2018). Methionine adenosyltransferases in cancers: Mechanisms of dysregulation and implications for therapy. *Exp Biol Med (Maywood)* *243*, 107-117.

Mentch, S.J., Mehrmohamadi, M., Huang, L., Liu, X., Gupta, D., Mattocks, D., Gómez Padilla, P., Ables, G., Bamman, M.M., Thalacker-Mercer, A.E., *et al.* (2015). Histone Methylation Dynamics and Gene Regulation Occur through the Sensing of One-Carbon Metabolism. *Cell Metab* *22*, 861-873.

Methodiev, M.D., Lesko, N., Park, C.B., Cámara, Y., Shi, Y., Wibom, R., Hultenby, K., Gustafsson, C.M., and Larsson, N.G. (2009). Methylation of 12S rRNA is necessary for in vivo stability of the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Cell Metab* *9*, 386-397.

Meyer, B., Wurm, J.P., Sharma, S., Immer, C., Pogoryelov, D., Kötter, P., Lafontaine, D.L., Wöhnert, J., and Entian, K.D. (2016). Ribosome biogenesis factor Tsr3 is the aminocarboxypropyl transferase responsible for 18S rRNA hypermodification in yeast and humans. *Nucleic Acids Res* *44*, 4304-4316.

Miyauchi, K., Kimura, S., and Suzuki, T. (2013). A cyclic form of N6-threonylcarbamoyladenine as a widely distributed tRNA hypermodification. *Nat Chem Biol* *9*, 105-111.

Mizushima, S., and Nomura, M. (1970). Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *E. coli*. *Nature* *226*, 1214.

Morello, L.G., Coltri, P.P., Quaresma, A.J., Simabuco, F.M., Silva, T.C., Singh, G., Nickerson, J.A., Oliveira, C.C., Moore, M.J., and Zanchin, N.I. (2011). The human nucleolar protein FTSJ3 associates with NIP7 and functions in pre-rRNA processing. *PLoS One* *6*, e29174.

Moukadiri, I., Garzón, M.J., Björk, G.R., and Armengod, M.E. (2014). The output of the tRNA modification pathways controlled by the *Escherichia coli* MnmEG and MnmC enzymes depends on the growth conditions and the tRNA species. *Nucleic Acids Res* *42*, 2602-2623.

Murín, R., Vidomanová, E., Kowtharapu, B.S., Hatok, J., and Dobrota, D. (2017). Role of S-adenosylmethionine cycle in carcinogenesis. *Gen Physiol Biophys* *36*, 513-520.

Nierhaus, K.H. (1991). The assembly of prokaryotic ribosomes. *Biochimie* *73*, 739-755.

O'Connor, M., and Gregory, S.T. (2011). Inactivation of the RluD pseudouridine synthase has minimal effects on growth and ribosome function in wild-type *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* *193*, 154-162.

O'Connor, M., Thomas, C.L., Zimmermann, R.A., and Dahlberg, A.E. (1997). Decoding fidelity at the ribosomal A and P sites: influence of mutations in three different regions of the decoding domain in 16S rRNA. *Nucleic Acids Res* *25*, 1185-1193.

Okada, N., Yasuda, T., and Nishimura, S. (1977). Detection of nucleoside Q precursor in methyl-deficient *E. coli* tRNA. *Nucleic Acids Res* *4*, 4063-4075.

Parveen, N., and Cornell, K.A. (2011). Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism. *Mol Microbiol* *79*, 7-20.

Pendleton, K.E., Chen, B., Liu, K., Hunter, O.V., Xie, Y., Tu, B.P., and Conrad, N.K. (2017). The U6 snRNA m. *Cell* *169*, 824-835.e814.

Pierrel, F., Björk, G.R., Fontecave, M., and Atta, M. (2002). Enzymatic modification of tRNAs: MiaB is an iron-sulfur protein. *J Biol Chem* *277*, 13367-13370.

Pintard, L., Bujnicki, J.M., Lapeyre, B., and Bonnerot, C. (2002a). MRM2 encodes a novel yeast mitochondrial 21S rRNA methyltransferase. *EMBO J* *21*, 1139-1147.

Pintard, L., Lecointe, F., Bujnicki, J.M., Bonnerot, C., Grosjean, H., and Lapeyre, B. (2002b). Trm7p catalyses the formation of two 2'-O-methylriboses in yeast tRNA anticodon loop. *EMBO J* *21*, 1811-1820.

Poldermans, B., Roza, L., and Van Knippenberg, P.H. (1979). Studies on the function of two adjacent N6,N6-dimethyladenosines near the 3' end of 16 S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. III. Purification and properties of the methylating enzyme and methylase-30 S interactions. *J Biol Chem* *254*, 9094-9100.

Popova, A.M., and Williamson, J.R. (2014). Quantitative analysis of rRNA modifications using stable isotope labeling and mass spectrometry. *J Am Chem Soc* *136*, 2058-2069.

Richmond, C.S., Glasner, J.D., Mau, R., Jin, H., and Blattner, F.R. (1999). Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* *27*, 3821-3835.

Roelofs, K.G., Wang, J., Sintim, H.O., and Lee, V.T. (2011). Differential radial capillary action of ligand assay for high-throughput detection of protein-metabolite interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 15528-15533.

Rorbach, J., Boesch, P., Gammage, P.A., Nicholls, T.J., Pearce, S.F., Patel, D., Hauser, A., Perocchi, F., and Minczuk, M. (2014). MRM2 and MRM3 are involved in biogenesis of the large subunit of the mitochondrial ribosome. *Mol Biol Cell* *25*, 2542-2555.

Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Kang, B.I., and Suzuki, T. (2015). Nucleoside Analysis by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Methods Enzymol* *560*, 19-28.

Sato, A., Kobayashi, G., Hayashi, H., Yoshida, H., Wada, A., Maeda, M., Hiraga, S., Takeyasu, K., and Wada, C. (2005). The GTP binding protein Obg homolog ObgE is involved in ribosome maturation. *Genes Cells* *10*, 393-408.

Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* *1*, 16-22.

Schägger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* *166*, 368-379.

Seidel-Rogol, B.L., McCulloch, V., and Shadel, G.S. (2003). Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop. *Nat Genet* *33*, 23-24.

Sergiev, P.V., Aleksashin, N.A., Chugunova, A.A., Polikanov, Y.S., and Dontsova, O.A. (2018). Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation. *Nat Chem Biol* *14*, 226-235.

Shajani, Z., Sykes, M.T., and Williamson, J.R. (2011). Assembly of bacterial ribosomes. *Annu Rev Biochem* *80*, 501-526.

Sharpe Elles, L.M., Sykes, M.T., Williamson, J.R., and Uhlenbeck, O.C. (2009). A dominant negative mutant of the *E. coli* RNA helicase DbpA blocks assembly of the 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res* *37*, 6503-6514.

Shima, H., Matsumoto, M., Ishigami, Y., Ebina, M., Muto, A., Sato, Y., Kumagai, S., Ochiai, K., Suzuki, T., and Igarashi, K. (2017). S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N. *Cell Rep* *21*, 3354-3363.

Shiraki, N., Shiraki, Y., Tsuyama, T., Obata, F., Miura, M., Nagae, G., Aburatani, H., Kume, K., Endo, F., and Kume, S. (2014). Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metab* *19*, 780-794.

Slany, R.K., Bosl, M., Crain, P.F., and Kersten, H. (1993). A new function of S-adenosylmethionine: the ribosyl moiety of AdoMet is the precursor of the cyclopentenediol moiety of the tRNA wobble base queuine. *Biochemistry* *32*, 7811-7817.

Sloan, K.E., Warda, A.S., Sharma, S., Entian, K.D., Lafontaine, D.L.J., and Bohnsack, M.T. (2017). Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biol* *14*, 1138-1152.

Strunk, B.S., and Karbstein, K. (2009). Powering through ribosome assembly. *RNA* *15*, 2083-2104.

Suzuki, T., Ikeuchi, Y., Noma, A., and Sakaguchi, Y. (2007). Mass spectrometric identification and characterization of RNA-modifying enzymes. *Methods Enzymol* *425*, 211-229.

Swann, P.F. (1975). The effect of ethionine on ribonucleic acid synthesis in rat liver. *Biochem J* *150*, 335-344.

Tan, J., Jakob, U., and Bardwell, J.C. (2002). Overexpression of two different GTPases rescues a null mutation in a heat-induced rRNA methyltransferase. *J Bacteriol* *184*, 2692-2698.

Taoka, M., Nobe, Y., Yamaki, Y., Sato, K., Ishikawa, H., Izumikawa, K., Yamauchi, Y., Hirota, K., Nakayama, H., Takahashi, N., *et al.* (2018). Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome. *Nucleic Acids Res* *46*, 9289-9298.

Tehlivets, O., Malanovic, N., Visram, M., Pavkov-Keller, T., and Keller, W. (2013). S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and methylation disorders: yeast as a model system. *Biochim Biophys Acta* *1832*, 204-215.

Tokuhiya, J.G., Vijayan, P., Feldmann, K.A., and Browse, J.A. (1998). Chloroplast development at low temperatures requires a homolog of DIM1, a yeast gene encoding the 18S rRNA dimethylase. *Plant Cell* *10*, 699-711.

Tong, L. (2005). Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell Mol Life Sci* *62*, 1784-1803.

Tsu, C.A., Kossen, K., and Uhlenbeck, O.C. (2001). The Escherichia coli DEAD protein DbpA recognizes a small RNA hairpin in 23S rRNA. *RNA* *7*, 702-709.

Tsu, C.A., and Uhlenbeck, O.C. (1998). Kinetic analysis of the RNA-dependent adenosinetriphosphatase activity of DbpA, an Escherichia coli DEAD protein specific for 23S ribosomal RNA. *Biochemistry* *37*, 16989-16996.

Urbonavicius, J., Durand, J.M., and Bjork, G.R. (2002). Three modifications in the D and T arms of tRNA influence translation in Escherichia coli and expression of virulence genes in Shigella flexneri. *J Bacteriol* *184*, 5348-5357.

Urbonavicius, J., Qian, Q., Durand, J.M., Hagervall, T.G., and Bjork, G.R. (2001). Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *EMBO J* *20*, 4863-4873.

Van Lanen, S.G., and Iwata-Reuyl, D. (2003). Kinetic mechanism of the tRNA-modifying enzyme S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase (QueA). *Biochemistry* *42*, 5312-5320.

Wang, S., Arends, S.J., Weiss, D.S., and Newman, E.B. (2005). A deficiency in S-adenosylmethionine synthetase interrupts assembly of the septal ring in Escherichia coli K-12. *Mol Microbiol* *58*, 791-799.

Weissbach, H., and Brot, N. (1991). Regulation of methionine synthesis in Escherichia coli. *Mol Microbiol* *5*,

1593-1597.

Widerak, M., Kern, R., Malki, A., and Richarme, G. (2005). U2552 methylation at the ribosomal A-site is a negative modulator of translational accuracy. *Gene* *347*, 109-114.

Wolf, S.F., and Schlessinger, D. (1977). Nuclear metabolism of ribosomal RNA in growing, methionine-limited, and ethionine-treated HeLa cells. *Biochemistry* *16*, 2783-2791.

Wrzesinski, J., Bakin, A., Ofengand, J., and Lane, B.G. (2000). Isolation and properties of Escherichia coli 23S-RNA pseudouridine 1911, 1915, 1917 synthase (RluD). *IUBMB Life* *50*, 33-37.

Xiao, Y., Su, X., Huang, W., Zhang, J., Peng, C., Huang, H., Wu, X., Xia, M., and Ling, W. (2015). Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism. *Int J Biochem Cell Biol* *67*, 158-166.

Zeghouf, M., Li, J., Butland, G., Borkowska, A., Canadien, V., Richards, D., Beattie, B., Emili, A., and Greenblatt, J.F. (2004). Sequential Peptide Affinity (SPA) system for the identification of mammalian and bacterial protein complexes. *J Proteome Res* *3*, 463-468.

Zeng, R., Smith, E., and Barrientos, A. (2018). Yeast Mitochondrial Large Subunit Assembly Proceeds by Hierarchical Incorporation of Protein Clusters and Modules on the Inner Membrane. *Cell Metab* *27*, 645-656.e647.

Zenkin, N., and Yuzenkova, Y. (2015). New Insights into the Functions of Transcription Factors that Bind the RNA Polymerase Secondary Channel. *Biomolecules* *5*, 1195-1209.

Zorbas, C., Nicolas, E., Wacheul, L., Huvelle, E., Heurgué-Hamard, V., and Lafontaine, D.L. (2015). The human 18S rRNA base methyltransferases DIMT1L and WBSCR22-TRMT112 but not rRNA modification are required for ribosome biogenesis. *Mol Biol Cell* *26*, 2080-2095.



## 5, 発表業績

### 学術雑誌における論文

- (1) Arai, T., Ishiguro, K., Kimura, S., Sakaguchi, Y., Suzuki, T. and Suzuki, T. Single methylation of 23S rRNA triggers late steps of 50S ribosomal subunit assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 112, E4707-E4716 (2015)
- (2) Kimura, S., Sakai, Y., Ishiguro, K. and Suzuki, T. Biogenesis and iron-dependency of ribosomal RNA hydroxylation. *Nucleic Acids Res.*, 45, 12974-12986 (2017)
- (3) Kudrin, P., Dzhygyr, I., Ishiguro, K., Beljantseva, J., Maksimova, E., Sofia Raquel Alves Oliveira, Varik, V., Payoe, R., Konevega, A., Tenson, T., Suzuki, T. and Hauryliuk, V. The ribosomal A-site finger is crucial for binding and activation of the stringent factor RelA. *Nucleic Acids Res.*, 46, 1973–1983 (2018)
- (4) Oshima, T., Ishiguro, K., Suzuki, T., Kawahara, Y. Quantification of methylation efficiency at a specific N<sup>6</sup>-methyladenosine position in rRNA by using BNA probes. *Chem. Commun.*, 54(69), 9627–9630 (2018)
- (5) Ishiguro, K., Arai, T. and Suzuki, T. Depletion of S-adenosylmethionine impacts on ribosome biogenesis through hypomodification of a single rRNA methylation. *Nucleic Acids Res.*, accepted (2019)

### 学会における発表

- (1) 10th ribosome synthesis conference (Brussels Belgium)、2015年8月、ポスター発表
- (2) RNA society meeting 2016 (Kyoto Japan)、2016年6月、ポスター発表
- (3) 11th ribosome synthesis conference (Orford Canada)、2018年8月、口頭発表及びポスター発表
- (4) 第37回日本分子生物学会年会(横浜)、2014年11月、ポスター発表
- (5) 第19回日本RNA学会年会(富山)、2017年7月、口頭発表、優秀賞(特別)受賞
- (6) noncoding RNAネオタクソノミ主催第24回Tokyo RNA club(東京)、2017年12月、口頭発表
- (7) 第20回武田科学振興財団生命科学シンポジウム(大阪)、2019年2月、ポスター発表

## 6. 謝辞

研究を行うにあたり、大変興味深く取り組みがいのあるテーマと、非常に恵まれた研究環境を与えて下さった、指導教官の鈴木勉教授に感謝を申し上げます。研究会においてだけでなく、データを持って行ったときはいつでもディスカッションに付き合ってください、数多くの有用な指摘をいただきました。さらに、海外学会を含む様々な学会や、共同研究に参加する機会を与えていただきました。分野の異なる研究者と議論し、またともに研究を進めたことは今後の研究者人生において大きな財産になると考えています。鈴木研究室での経験をもとに、これからも精進してまいりたいと思います。

本研究を進めるにあたりご指導いただいた荒井大河博士に感謝いたします。博士三年という忙しい時期にもかかわらず、あらゆる実験操作や研究の進め方、研究発表の方法などをいつも一から懇切丁寧に指南して下さいました。さらに、卒業後もお仕事で忙しい中でも気軽に研究の相談に乗っていただきました。また、荒井さんの残した研究ノートは非常にわかりやすく、研究を進める中で非常に参考になりました。

木村聡博士には、荒井さんが卒業した後様々な形で実験や研究の相談に乗っていただき感謝しております。木村さんの研究に対する熱意や努力からも非常に多くのことを学ばされました。長尾翌手可助教には、研究や実験、研究発表に関する様々なアドバイスを頂き、また日々の研究室生活に関しても細かな心配りを頂き、大変お世話になりました。宮内健常博士には研究に関して様々なアドバイスをさせていただきました。宮内さんの幅広い知識にはとても感銘を受けました。坂口裕里子氏にはLC/MS解析において大変お世話になりました。LC/MSをいつも最適な状態に調整していただくだけでなく、MS解析について様々なアドバイスをいただき、とても感謝しています。鈴木健夫講師には申請書の書き方や研究発表に関する様々なアドバイスを頂きました。大平高之助教、小原光弘氏、酒井雄介氏には、イニシャルトレーニングで基礎的な実験方法や研究室の器具の使い方などを指導していただきました。また、緑川果琳氏、高倉眞優子氏とはともに楽しく研究室生活を送らせていただき感謝しています。実験を指導する中で、こちらでも様々なことを学ぶことができました。その他多くの研究室の先輩方、同期にも、日々のコミュニケーションを通じて、実験に関することや研究室での生活に関することなど、学ぶことが沢山あったことを、大変感謝しております。これからも、どうぞ宜しくお願い致します。

最後に研究生活を支えてくれた両親、祖父母に感謝いたします。本当にありがとうございました。