

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏 名 石黒 健介

1, 背景

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の欠乏はこれらメチル化の修飾率の低下を通じて細胞の増殖や分化、脳の機能などに影響を与え、様々な疾患の原因になっていることが知られている。AdoMetはDNAのメチル化やヒストンのメチル化に関わることでエピジェネティックな遺伝子発現に関与することが知られていたが、近年の研究によりRNAにおけるメチル化修飾が転写後における遺伝子発現を制御することが明らかとなり、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。さらに、AdoMetの濃度変化はリボソーム生合成を制御することが示唆されていたが、その詳細な機構は明らかとなっていなかった。

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、rRNA修飾酵素、RNAヘリケース、GTPaseなど、アッセンブリー因子と総称される多様な酵素が関与している。これらの因子は、細胞のおかれた生育環境や外界からのストレスなど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生育や分化など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、リボソームの生合成過程がどのように制御さ

れるかについては研究が進んでいないのが現状である。

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 ヘリケース (DeaD, DbpA)、GTPase (ObgE)、RNA 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 を基質とする RNA メチル化酵素であり、23S rRNA のペプチド転移反応活性中心(PTC)に位置する Helix92 (H92)上の U2552 を 2'-Oメチル化(Um2552)する反応を触媒する。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。この 45S 前駆体は 30S サブユニットとの会合能を持たないこと、Mg 濃度依存的に沈降係数を変化させ、高 Mg 条件(10 mM)では 50S サブユニットに近い沈降係数を持つことがわかっている。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 PTC 近傍の rRNA のコンフォメーションの形成と L36 などの r-protein の取り込みを促し、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。

本研究において、私は 50S サブユニットの生合成後期過程に着目し、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。

2, 本論

2-1, 細胞内 AdoMet 濃度の低下により 45S 前駆体が蓄積する

細胞内の AdoMet は ATP とメチオニン(Met)を用いて *de novo* 合成される経路と、メチル化反応に用いられた後に生じる S-adenosylhomocysteine (AdoHcy)が Met にまで代謝され、AdoMet が再生される経路によって、維持されている。細胞内での AdoMet 濃度の低下が生育に与える影響を解析するため、AdoHcy を代謝する AdoHcy nucleosidase (*mtn* 遺伝子)に注目した。先行研究において *mtn* を欠損した株(Δmtn 株)では AdoMet の再生経路が阻害され、細胞内 AdoMet 濃度が野生株(WT)に比べ 1/3 程度にまで減少することが知られている(WT:300 μ M, Δmtn :100 μ M)。LB 培地における生育を調べると Δmtn 株は WT に比べ生育速度が遅く、低温感受性を示した。さらに興味深いことに、シヨ糖密度勾配遠心法(SDG)を用いて Δmtn 株のリボソームの組成を解析すると、45S 前駆体の蓄積が観察された。

次に、45S 前駆体の蓄積が細胞中の AdoMet 濃度の低下により直接引き起こされているのかを解析した。AdoMet は細胞中で Met と ATP から合成される。そのため、AdoMet のリサイクル経路が阻害されている Δmtn 株では細胞内の AdoMet 濃度が培地中の Met の濃度に依存すると考えられる。Met を含まない M9 培地では、 Δmtn 株は顕著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。一方、培地に Met を添加すると、 Δmtn 株の生育は大きく回復し、45S の蓄積量が減少した。この結果は、細胞中の AdoMet 濃度の低下が Δmtn での 45S 前駆体の蓄積の原因であることを示唆している。

2-2, 細胞内 AdoMet 濃度の低下は Um2552 を含む特定の RNA 修飾の修飾率を下げる

次に、AdoMet 濃度の低下が rRNA 修飾に与える影響を LC/MS を用いて解析した。大腸菌の rRNA には合計 36 か所に修飾が存在するが、そのうち 24 か所が AdoMet を基質としたメチル化修飾である。WT と Δmtn 株からそれぞれのリボソーム粒子を単離し、rRNA を抽出後に、LC/MS を用いて個々の rRNA メチル化修飾の修飾率を解析した。その結果、ほとんどのメチル化修飾部位では大きな修飾率の変動がみられなかった一方で、Um2552 修飾を含む 4 つの rRNA 修飾(16S rRNA の m⁵C1407 と m³U1498, 23S rRNA の m⁵U747 と Um2552)は Δmtn 株で有意に修飾率が減少していた。16S rRNA の m⁵C1407, m³U1498 は P サイトに位置し、23S rRNA の m⁵U747 は新生ペプチドトンネルに位置する修飾である。このことから、これらの修飾率の減少は AdoMet 濃度低下時の翻訳制御にかかわる可能性がある。

また、tRNA 修飾についても同様に Δmtn 株での修飾率の変化を解析した。すると、いくつものメチル化修飾(m⁷G, Gm, m⁵U, mnm⁵U, ms²i⁶A)と、Q の修飾率の低下が確認された。これらの修飾はコドン認識の正確性や tRNA の安定性の調節に関与している可能性がある。

2-3, Um2552 修飾率の低下が 45S 前駆体の蓄積と生育の悪化を引き起こす

これらの部位の修飾率の低下が Δmtn 株の生育の悪化と 45S 前駆体の蓄積に寄与しているかを調べるため、 Δmtn 株でそれぞれの修飾を担う修飾酵素を過剰発現することで各修飾を回復させ、 Δmtn 株の生育が改善するかを解析した。その結果、*rlmE* を過剰発現させた株では生育が一部回復し、45S 前駆体の蓄積が大きく減少した一方で、*rlmE* 以外の rRNA 修飾酵素または tRNA 修飾酵素は過剰発現させても生育は回復せず、45S 前駆体の蓄積量にも変化はなかった。さらに、メチル化活性を持たない *rlmE* の変異体の過剰発現では Δmtn 株の生育の回復や 45S 前駆体の蓄積の減少はみられなかった。このことは、 Δmtn 株でみられる 45S 前駆体の蓄積の主な原因が Um2552 修飾率の低下にあり、また 45S 前駆体の蓄積が Δmtn 株の生育悪化の主因の一つであることを示唆している。

次に、 Δmtn 株でみられる 45S 前駆体の蓄積が、*rlmE* の発現量の変化によって引き起こされている可能性を検討したが、RlmE の発現量は WT と Δmtn 株間で大きな差はみられなかった。そこで、RlmE の修飾活性が AdoMet 濃度によって制御されている可能性を検証した。通常、rRNA メチル化修飾酵素の AdoMet に対する Km 値は数 μ M であり、細胞中の AdoMet 濃度(WT:300 μ M, Δmtn :100 μ M)の範囲内ではメチル化活性はほとんど変化しない。しかし、45S 前駆体を基質として RlmE のメチル化修飾活性を *in vitro* で測定すると、細胞中の AdoMet 濃度(WT:300 μ M, Δmtn :100 μ M)の範囲内で RlmE のメチル化活性が敏感に変化することが判明した。このことから、 Δmtn 株における AdoMet 濃度の低下が、RlmE による Um2552 修飾活性を特異的に低下させ、45S 前駆体の蓄積を引き起こし

たとえられる。

3, 結論と今後の展望

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、細胞内 AdoMet 濃度を敏感に感知して 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。細胞内の AdoMet 濃度が十分に高いときは、RlmE による Um2552 修飾の形成によって 45S 前駆体から 50S サブユニットへの成熟が促進され、細胞内のリボソーム量が高く維持される。これにより、効率の良い翻訳と増殖が可能になる。

一方、AdoMet 濃度が低下すると、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 Δmtn 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。また、この機構に関与するほかのアッセンブリー因子の探索や、真核生物を含めほかの生物種で同様の機構が保存されているかを検証することも今後の研究課題に挙げられる。