

転座反応に関与する 23S リボソーム RNA 保存領域の機能解析

**Functional analysis on the conserved region in 23S
ribosomal RNA associated with translocation**

指導教官 鈴木勉 助教授

(工学系研究科 化学生命工学専攻 遺伝子発現工学研究室)

薦田 多恵子(Taeko KOMODA) 学籍番号 : kk27514

旧・構造生命工学分野(鈴木勉研究室)

I. 目次

I. 目次

II. 序論

III. 23S rRNA ヘリックス 38 短縮化リボソームの機能解析

III-1. 試料の調整と実験手法

- 《1》 変異型大腸菌株の構築と成長速度の測定
- 《2》 変異 *rrnB* 遺伝子を含むプラスミドの構築
- 《3》 *In vivo* での翻訳精度の測定
- 《4》 菌体からの crude リボソームの調製
- 《5》 70S リボソームの精製とサブユニット会合能の評価
- 《6》 蛋白質因子の調製
- 《7》 tRNA、mRNA の調製
 - i) tRNA^{Phe} の調製
 - ii) tRNA のアミノアシル化とアセチル化
 - iii) mRNA の調製
- 《8》 *In vitro* での活性測定
 - i) ポリウリジン RNA 依存ポリフェニルアラニンペプチド合成反応
 - ii) リボソームによる EF-G/GTPase 活性化反応
 - iii) アミノアシル tRNA のリボソーム A-site への結合能の測定
 - iv) ペプチジル tRNA のリボソーム P-site への結合能の測定
 - v) ペプチド転移反応活性測定
 - vi) puromycin 反応を用いた転座活性測定
 - vii) primer extension 法を用いた転座反応活性測定

III-2. 結果

- 《1》 変異 *rrnB* 遺伝子のみを持つ大腸菌株の構築
- 《2》 *In vivo* での翻訳精度の測定
- 《3》 菌体からのリボソームの調製とサブユニット会合能
- 《4》 *In vitro* での活性測定

- i) ポリウリジン RNA 依存ポリフェニルアラニンペプチド合成反応
- ii) リボソームによる EF-G/GTPase 活性化反応
- iii) tRNA の A-site、P-site への結合能とペプチド転移反応活性
- vi) 転座活性測定

III-3. 考察

IV. 16S rRNA ヘリックス 33 短縮化リボソームを用いた機能解析

IV-1. 試料の調整

IV-2. 結果

- 《1》変異 *rrnB* 遺伝子のみを持つ大腸菌株の構築
- 《2》*In vivo* での翻訳精度の測定
- 《3》菌体からのリボソームの調製とサブユニット会合能
- 《4》*In vitro* での活性測定
 - i) ポリウリジン RNA 依存ポリフェニルアラニンペプチド合成反応
 - ii) リボソームによる EF-G/GTPase 活性化反応

IV-3. 考察

V. まとめ

VI. 今後の展望

VII. 参考文献

VIII. 謝辞

II. 序論

すべての現存する生物は機能を担う分子としての蛋白質を持っている。近年、機能を持った RNA 分子が次々と発見され、それらの重要性も明らかとなってきたはいるが、生体内での機能の大半は蛋白質が行っていることは間違いなく、蛋白質は生命の根幹を成すものの 1 つである。従って、蛋白質翻訳系は生物にとって必須の、かつ最も重要な系の 1 つであり、その分子メカニズムの解明は、生命の本質を理解する上で非常に重要な課題である。

蛋白質翻訳反応は大きく分けて開始(initiation)、伸長(elongation)、終結(termination)、リボソーム再生(ribosome recycling) の 4 つの段階からなる。原核生物での翻訳を図に示す。(図 1A)

リボソームは普遍的に保存された RNA・蛋白質超分子複合体で、mRNA 上の遺伝暗号を蛋白質に翻訳する装置である。原核生物では、大(50S)サブユニットと小(30S)サブユニットが結合して 70S リボソームとなる(図 1B)。開始の段階でまずリボソームの 30S サブユニットとメッセンジャー RNA (messenger RNA, mRNA)が複合体を作り、開始専用のトランスファー RNA (transfer RNA, tRNA)である、フォルミルメチオニン(fMet)-tRNA_{f^{Met}}と、蛋白質性の翻訳因子の 1 つである開始因子 2 (initiation factor 2, IF2) が相互作用して、30S サブユニットのペプチジル(peptidyl, P)-site に結合する。IF1 は 30S サブユニットのアミノアシル(aminoacyl, A)-site に結合して IF2 と特異的に相互作用してこの働きを助ける。IF3 は P-site に結合した fMet-tRNA_{f^{Met}}のアンチコドンシステムを認識する因子で P-site に fMet-tRNA_{f^{Met}}が結合する前に 50S サブユニットと会合してしまうのを防ぐ。この 30S 開始複合体(30S, IF1, IF2, fMet-tRNA_{f^{Met}}, mRNA)が 50S サブユニットと会合すると IF1、IF3 が解離し、IF2 は 50S サブユニットから突出している L7/L12 stalk と相互作用して GTP を加水分解しリボソームからはずれる(Moreno, Sorensen et al. 2000)。

伸長の過程を、Noller らが提唱した hybrid state model (Moazed and Noller 1989)に基づいて説明すると(図 2)、伸長因子 Tu (elongation factor Tu, EF-Tu) がアミノアシル tRNA (aminoacyl- tRNA, aa-tRNA)、GTP と三者複合体 (ternary complex) を作り L7/12 stalk と相互作用する。この時 tRNA は A/T state という状態を取り、アミノ酸結合部位は EF-Tu と結合したままアンチコドン部位は 30S サブユニットの A-site の mRNA のコドンを認識する。コドン-アンチコドンの対合が正しければ EF-Tu は GTP の加水分解により大きくその構造を変えることで aa-tRNA との結合がはずれ aa-tRNA は A-site に結合し (A/A state、50S サブユニット上でも 30S サブユニット上でも A-site にいる状態)、EF-Tu はリボソームからはずれる。リボソームから遊離した EF-Tu・GDP には多くの G 蛋白質と同様、グアニンヌクレオチド交換因子(guanine nucleotide exchanging factor, GEF)にあたる伸長因子 Ts (EF-Ts) が存在し、この EF-Ts が EF-Tu から GDP を解離させ、入れ替わりに GTP を結合させる。リボソーム上では引き続いて、A-site にいる aa-tRNA のアミノ酸結合部位側が P-site にいるペプチジル tRNA (peptidyl-tRNA, pep-tRNA, P/P state) に接近し、ペプチド転移反応が起こり、A-site tRNA にペプチド鎖が移り、pep-tRNA として A/P state (アミノ酸結合部位は 50S サブユニッ

トの P-site に、アンチコドン部位は 30S サブユニットの A-site にいる状態) をとる。一方、アミノ酸のはずれた P-site tRNA はデアシル tRNA (deacyl-tRNA, de-tRNA)として P/E state (アミノ酸結合部位は 50S サブユニットの E-site に、アンチコドン部位は 30S サブユニットの P-site にいる状態) をとる。

ペプチド転移反応は、23S リボソーム RNA(ribosomal RNA, rRNA)の高度に保存されたドメイン V のペプチジルトランスフェラーゼ活性中心によって触媒されることが知られているが、最近の研究によると、rRNA の主な役割は 2 つの tRNA 末端を近接させるための鋳型として働いており、アミノ基の吸核置換攻撃を直接触媒する一般酸塩基触媒に相当する残基をもたないことが判明している(Polacek and Mankin 2005; Yonath 2005)。むしろ、P-site tRNA の末端塩基の 2'OH 基がアミノ基のプロトンをシャットリングする働きがあり、この活性がペプチド転移反応において一種の触媒的な働きがあると言われている(Rodnina, Beringer et al. 2006)。23S rRNA ドメイン V に存在する高度に保存された残基は、活性中心にアーチ型の空間を形成することで、ペプチド転移反応後の転座反応において、tRNA の末端を正確に 180 度回転させるために重要な役割を果たしていることが、当研究室のこれまでの研究で明らかになっている(Sato, Hirabayashi et al. 2006)。

ペプチド転移反応後のリボソームに伸長因子 G (elongation factor G, EF-G) が結合し、L7/12 stalk との相互作用を介して GTP を加水分解することで、2 つの tRNA と mRNA の転座反応(translocation) を引き起こす。EF-G の 5 つのドメインの内、ドメイン III-V が tRNA 様の構造をしていることが知られているが(分子擬態と呼ばれる)、このドメイン III-V が A-site へ入り込むことで、de-tRNA を P/E state から E-site (30S サブユニットには E-site に相当する部位はない) へ、pep-tRNA を A/P state から P/P state へ移行させ、同時に mRNA を 1 コドン分進ませる。こうして E-site に移ったデアシル tRNA がリボソームからはずれることにより、またリボソームが EF-Tu・GTP・tRNA 三者複合体を受け入れられる状態になり、伸長過程が繰り返される。これまで、EF-G に対する GEF の存在は報告されておらず、EF-G は細胞質中で GTP と優先的に結合しているとされていた。それを元に、EF-G が他の翻訳因子同様に GTP 結合型が機能を持ち、GTP 分解のエネルギーはリボソームからの解離に用いられる古典的な G 蛋白質として働くとする説と GTP 分解のエネルギーを転座反応自体に作用させるモーター蛋白質のように働くとする説が展開されてきた。しかし細胞質中の GTP 濃度や EF-G の GTP、GDP へのアフィニティの問題から、昨年、EF-G に対する GEF はリボソーム自身であるとする新たな説が提唱され、転座反応への理解も新たな局面へと展開している(Zavialov, Haurlyuk et al. 2005)。しかし、EF-G 上の GTP からの Pi の放出が転座反応に先立って起こるとする結果もあり(Rodnina, Savelsbergh et al. 1997; Rodnina, Savelsbergh et al. 1999)、結論を得るにはさらなる研究の結果を待たなければならない。

伸長反応が進み、A-site の mRNA の配列が終止コドン、つまり対応する tRNA を持たないコドン (UGA、UAA、UAG) になると、ここへ各々の終止コドンに対応する解離因子 (releasing factor,

RF1, RF2) が結合する。RF1 は UAA と UAG を、RF2 は UAA と UGA を認識して結合し、23S rRNA と協調して、P-site tRNA から新生ペプチド鎖を切り離しリボソームから放出する。ここで A-site にさらに GTPase 活性を持つ解離因子 RF3 が結合し、RF1、RF2 をリボソームから解離させ、自らもリボソームからはずれる。

しかし、まだリボソームと P-site の de-tRNA、mRNA は結合したままなので、新たな蛋白質合成に移るためにはリボソーム再生の過程が必要となる。リボソーム再生因子(ribosome recycling factor, RRF)が EF-G と共にリボソームに働きかけ、これらを解離させることが知られている(Pavlov, Freistrotter et al. 1997; Karimi, Pavlov et al. 1999; Selmer, Al-Karadaghi et al. 1999)。

翻訳反応においては、その精度が非常に重要である。翻訳精度は、コドン-アンチコドンの正確な対合と、読み枠の維持によって担保されている。コドン-アンチコドン対合のエラーによる間違ったアミノ酸の取り込みは生体内では通常 3×10^{-4} 程度の頻度で生じるが、実際に極端に異なるアミノ酸に置き換わってしまい蛋白質の構造や機能に重篤な影響を及ぼすものは更にこの内の 1 / 400 程度と考えられている。コドン-アンチコドン対合は 30S サブユニットにある 16S rRNA のヘリックス 44(h44)と蛋白質 S12 から構成される暗号解読中心(decoding center)が監視している。暗号解読中心ではコドン 1 字目-アンチコドン 3 字目、コドン 2 字目-アンチコドン 2 字目の対合を、h44 上の残基が A minor モチーフと呼ばれる相互作用により厳密に認識している(Ogle, Brodersen et al. 2001)。コドン 3 字目-アンチコドン 1 字目の対合はしばしば wobble 塩基対が観察される部位であり、rRNA による認識は緩くなっている。この認識により、30S の shoulder 部位に大きな構造変化が誘起され、30S サブユニットは closed form と呼ばれる状態となる(Ogle, Murphy et al. 2002)。リードスルーなどのミスセンスエラーを誘発する抗生物質や変異はこれを逆手に、closed form を取りやすくする機構を持つものが多く報告されている(Carter, Clemons et al. 2000; Ogle, Carter et al. 2003; Ogle and Ramakrishnan 2005)。

一方フレームシフトは間違ったアミノ酸の取り込みに比べ非常に起こり難い(1 / 300000)。フレームシフトが一旦起きるとほぼ必ず不適切な蛋白質が生成されてしまうことを考えると、読み枠を維持し、フレームシフトを低頻度に維持することは生物にとって非常に重要であると言える。同時に、フレームシフトは RF2 のネガティブフィードバック(Donly, Edgar et al. 1990)などの調節機構やトランスポゾンの機能には重要である場合も知られている(Sundararajan, Michaud et al. 1999)が、フレームシフトのメカニズムについてはまだ盛んな議論がなされている(Farabaugh 2000; Baranov, Gesteland et al. 2004; Nierhaus 2006)。

近年、リボソームの 50S サブユニット (Ban, Nissen et al. 2000; Harms, Schluenzen et al. 2001)、30S サブユニット (Wimberly, Brodersen et al. 2000)、さらには 70S リボソーム全体(Yusupov, Yusupova et al. 2001; Schuwirth, Borovinskaya et al. 2005) (図 3)での精密な結晶構造解析が次々と報告された。これらの構造生物学的な解析により、ペプチド転移反応や暗号解読過程が完全に rRNA の作用によ

って行われていることが明らかになる等、翻訳系について様々なことが理解された。しかし、結晶という非生理的環境での1つの静止した構造に過ぎないため、動的な機能についてはまだ十分な知見があるとは言えず、また、共に働く沢山の蛋白質性の翻訳因子や、それらのリボソームとの相互作用についても、まだまだ分かっていないことが多い。

翻訳の素過程におけるリボソームと翻訳因子の動的な機能についても、様々な研究がなされている。抗生物質でトラップした状態のリボソームとの複合体の cryo 電顕研究(Agrawal, Heagle et al. 1999; Frank and Agrawal 2000; Stark, Rodnina et al. 2000)から、この転座反応時の EF-G 結合によりリボソームは大きなコンフォメーション変化を起こすことが明らかになった。50S サブユニットに対して 30S サブユニットが回転するこの変化は ratchet-like rotation (歯止め装置様の動き)と呼ばれ、EF-G が外れると元の位置に戻り、この動きに連動して転座反応が起こると考えられる。他の翻訳因子との cryo 電顕研究も盛んで IF2 とリボソームの複合体(Allen, Zavialov et al. 2005)、EF-Tu との複合体(Stark, Rodnina et al. 1997)、RF3 との複合体(Klaholz, Myasnikov et al. 2004)、RRF との複合体(Agrawal, Sharma et al. 2004)等、様々な動的な瞬間が明らかになってきている。

リボソームの構造を細かく見てみると、図 1B、図 3 のように、50S サブユニットは、A-site 側から E-site 側へ向けて、L7/12 stalk、Central Protuberance (中央突起, CP)、L1 stalk と呼ばれる3つの突起を持つ。50S サブユニットは2つの rRNA 分子 (23S rRNA, 約 2900 nt, 5S rRNA, 120 nt) と L1~L36 までの 34 の蛋白質から構成される。30S サブユニットは、Head と Body を Neck と呼ばれる構造が繋いだような構造で約 1500 nt の 16S rRNA 分子と S1~S21 と呼ばれる 21 の蛋白質からなる。それぞれの rRNA は図のようなヘリックスとループからなる 2 次構造(図 4)がさらに複雑に折り畳まれた高次構造をとる。

両サブユニットは、RNA-RNA、RNA-蛋白質、蛋白質-蛋白質の相互作用により構成される 12 のサブユニット間架橋構造 bridge B1a~B8 によって繋がっている(Yusupov, Yusupova et al. 2001; Gao, Sengupta et al. 2003)。

転座反応時に 50S サブユニットに対して 30S サブユニットが回転する、ratchet-like rotation (Frank and Agrawal 2000)に際して、50S サブユニットの CP と 30S サブユニットの Head 部分を繋ぐ架橋構造である bridge B1a と B1b は大きなコンフォメーションの変化を起こすことが知られている。

23S rRNA 上のドメイン II にあるヘリックス 38 [H38, 塩基番号(nucleotide positions, np) 827-942] は 50S サブユニットの CP の根元からサブユニット間隙へ突出した長いヘリックス構造で、原核生物、古細菌、真核生物と葉緑体に広く保存された構造である。図 5 に各生物種での H38 の配列保存性を示す。塩基配列そのものの保存性は、全体に高いとは言えないが、一方でヘリックス構造とその長さは、原核生物、古細菌において非常に高度に保存されているのが分かる。真核生物細胞質リボソームでは図のように H38 は二又に分かれた構造を取るが、分かれたヘリックスはサブユニットの溶媒側を裏打ちする構造であり(Spahn, Beckmann et al. 2001)、主となる H38 の部分は、

ループの部分こそ長さの自由度があるが、ヘリックス構造の保存性は他の 2 種の生物に遜色が無い。葉緑体でも H38 は観察されるが、他と比べるとヘリックスの長さにある程度の自由度があることがわかる。

H38 は 30S サブユニットの head に存在する蛋白質 S13 と相互作用して架橋構造 bridge B1a を構成する。また、A-site tRNA の近傍に存在し、遺伝暗号解読の間を通して A-site tRNA の L 字構造(図 1)の角の部分 (D ループ、T ループ) と直接相互作用することから“A-site finger (ASF)” (Stark, Orlova et al. 1997)と呼ばれている(Osswald, Doring et al. 1995; Rinke-Appel, Junke et al. 1995; Yusupov, Yusupova et al. 2001)。5.5Å の解像度で解かれた *Thermus thermophilus* リボソーム(Yusupov, Yusupova et al. 2001)では、A-site tRNA の D ループ、T ループとそれぞれ H38/ASF の np 881-883、898-899 が相互作用している(図 1C, 6)。H38/ASF の先端の np 886-888 は S13 のアミノ酸残基 92-94 と相互作用している。しかし、3.5Å の解像度の*E. coli*リボソームでは(Schuwirth, Borovinskaya et al. 2005)、結晶化の条件や結晶の構造のためか H38/ASF の先端が見えなくなっているため、bridge B1a は確認出来ない。EF-G が結合して ratchet-like rotation が起こっている間(Frank and Agrawal 2000)は、H38/ASF は S13 ではなく S19 との相互作用で bridge B1a を構成している(Valle, Zavialov et al. 2003)。コンピュータシミュレーションで(Razga, Koca et al. 2005)、この H38/ASF の劇的な動きは H38/ASF の根元にある kink-turn モチーフによる可能性が示唆された。EF-Tu-GTP- aminoacyl-tRNA 三者複合体の結合は、H38/ASF のコンフォメーションに影響しない(Stark, Rodnina et al. 1997)が、RF1/2 が解離した後に RF3 と H38/ASF が相互作用することが知られている(Klaholz, Myasnikov et al. 2004)。

H38/ASF と bridge B1a とその伸長過程への関与については上述のように多数の構造的、生化学的解析が行われてきたにも関わらず、H38/ASF の機能的な役割は未解明のままであった。私は、H38/ASF の機能的な重要性と転座反応への関連を評価するために、H38/ASF を短くした変異型リボソームを構築した。そして、これら H38/ASF 短縮化リボソームの生化学的解析によって、H38/ASF が転座反応に関与していると言う明確な証拠を示すことが出来た。さらに、16S rRNA の変異体の中から、bridge B1a の結合が外れた変異型リボソームを見出し、このリボソームも H38/ASF 短縮化リボソームと同様な表現型を示すことを明らかにした。これらの観測に基づき、H38/ASF と bridge B1a が転座反応において果たすと思われる機能的な役割について論じたい。

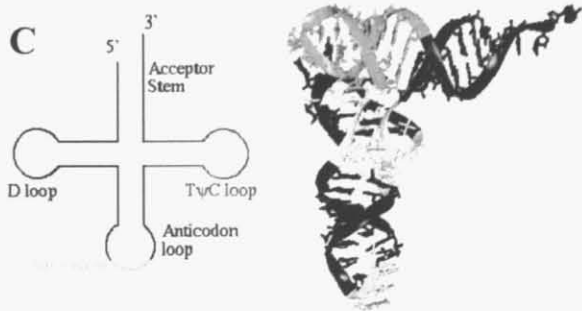
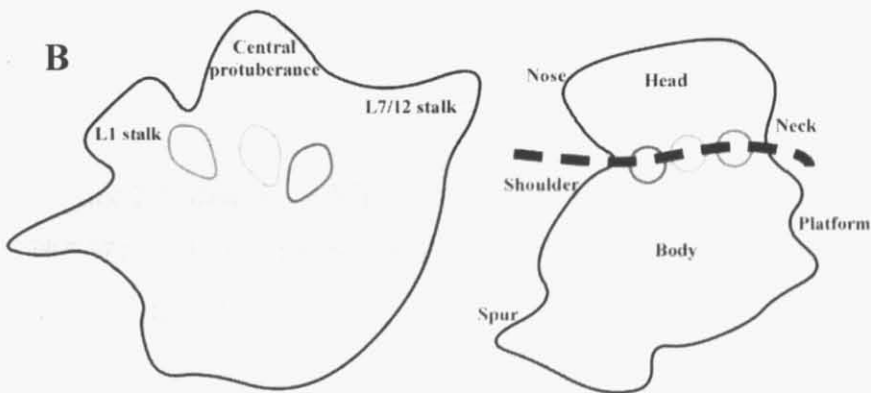
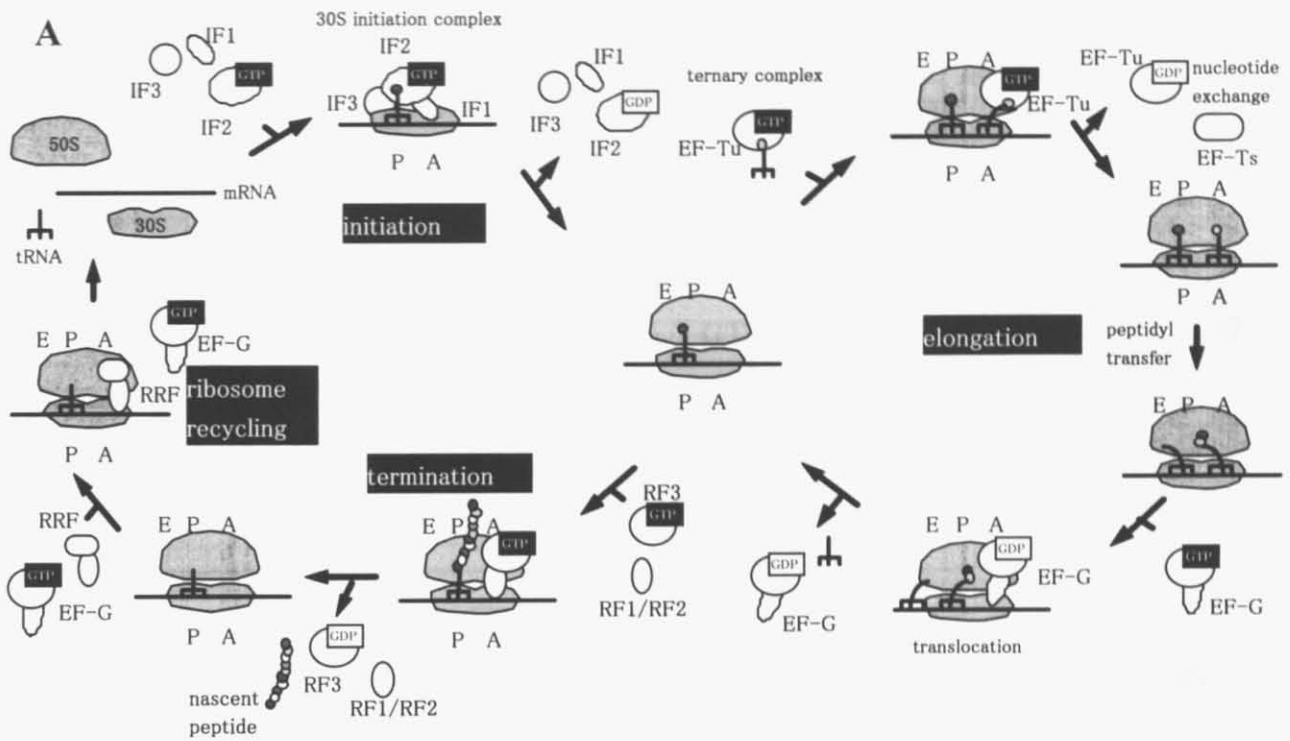


Figure 1 A. 原核生物での翻訳機構の概観。翻訳過程を図に示した。(志村・渡辺共編、128 頁)より一部改変した。

B. リボソームの模式図。左が 50S サブユニット、右が 30S サブユニットで、サブユニット間隙面より見た図。50S サブユニットの L1 stalk から L7/12 stalk へ向けて、tRNA の結合する E、P、A-site を示した。30S サブユニットでは逆に右から左へ A-、P-、E-site となる。Neck を走る点線は mRNA の通り道を示している。

C. tRNA の模式図。 左はクローバー様の二次構造で、この D ループと T(ψC)ループが相互作用して L 字型の三次構造をとる。L 字の右上にアミノ酸が結合し、下の部分がアンチコドンとなる。

Translocation Step of Prokaryote ~ Hybrid State Model ~

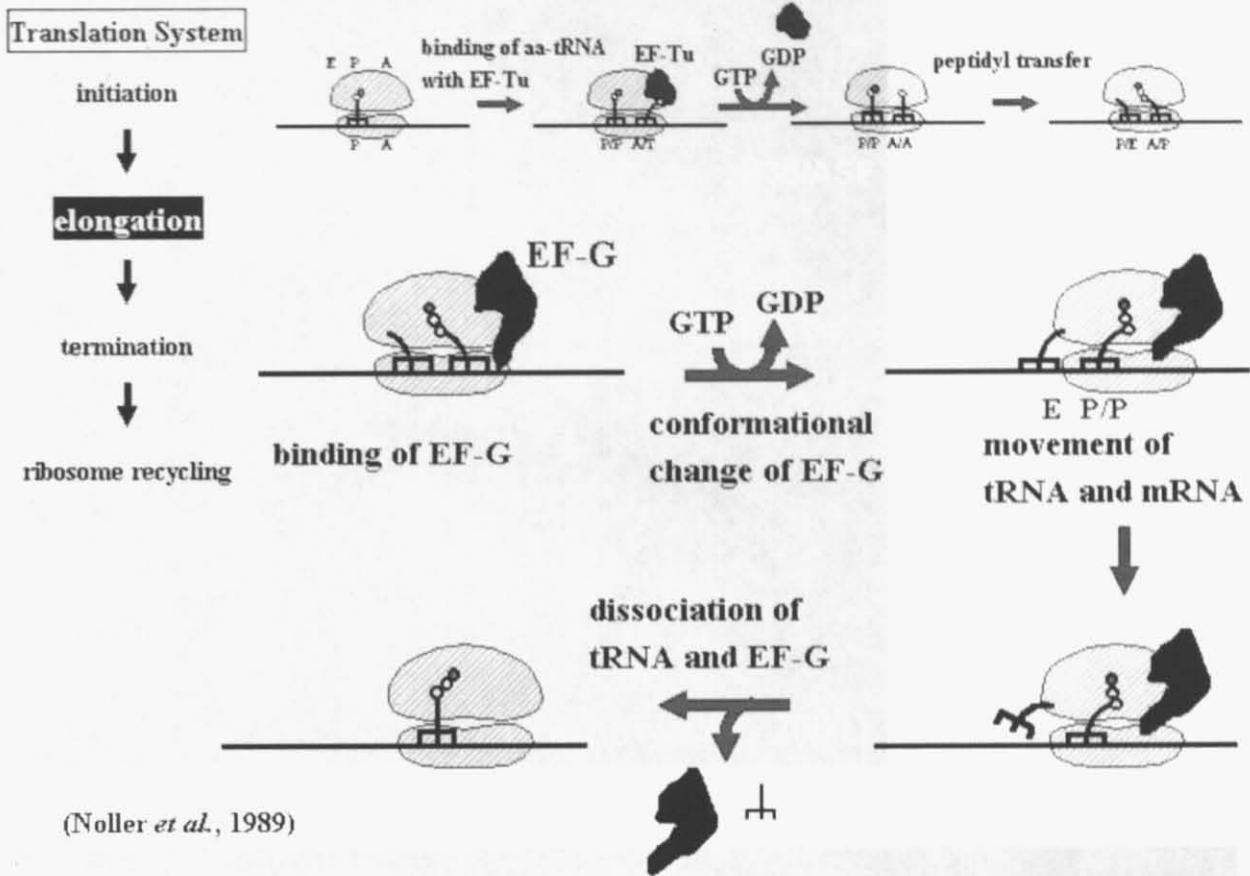


Figure 2 Noller らが提唱した Hybrid state model(Moazed and Noller 1989)。

伸長反応の途中では tRNA は 50S サブユニットと 30S サブユニットでそれぞれ別の site にいる中間状態が存在するとした。

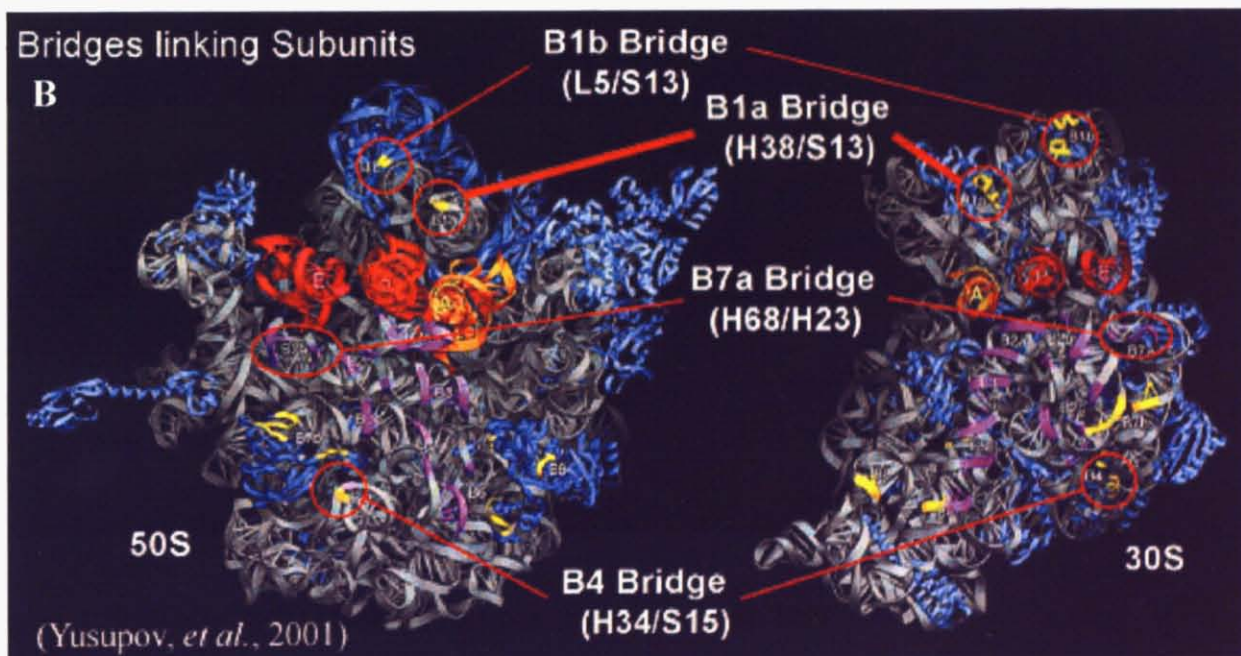
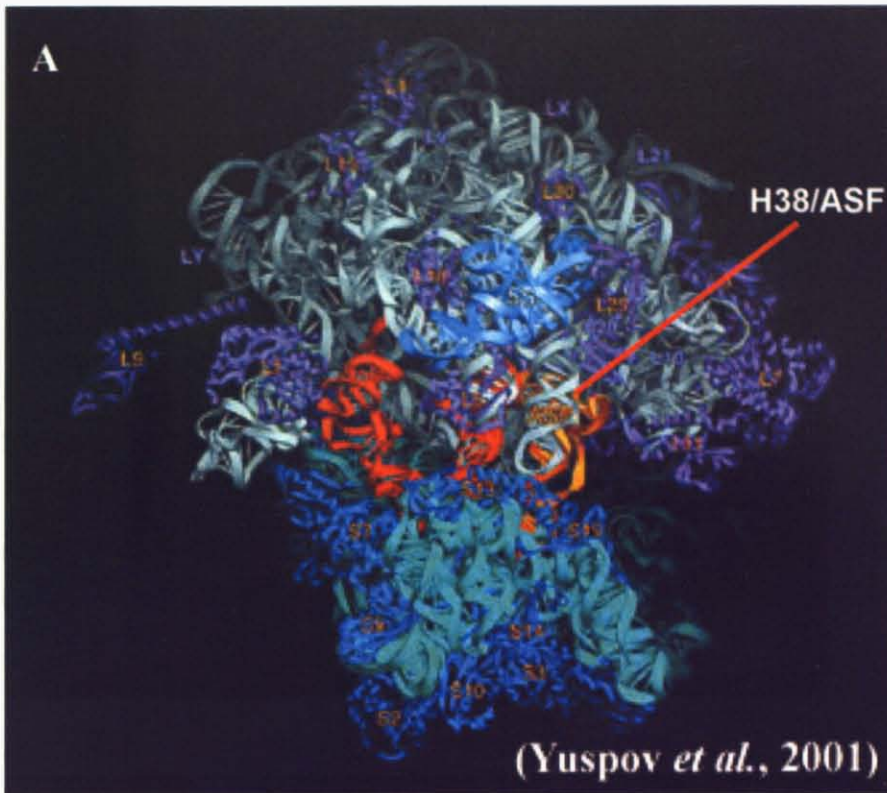


Figure 3 リボソームの立体構造(Yusupov, Yusupova *et al.* 2001)。

A. 2つのサブユニットが結合した状態。50S サブユニットの Central protuberance と 30S サブユニットの head 側から見た図を示す。

B. サブユニット間 bridge を示した図。本研究では bridge B1a に着目した。

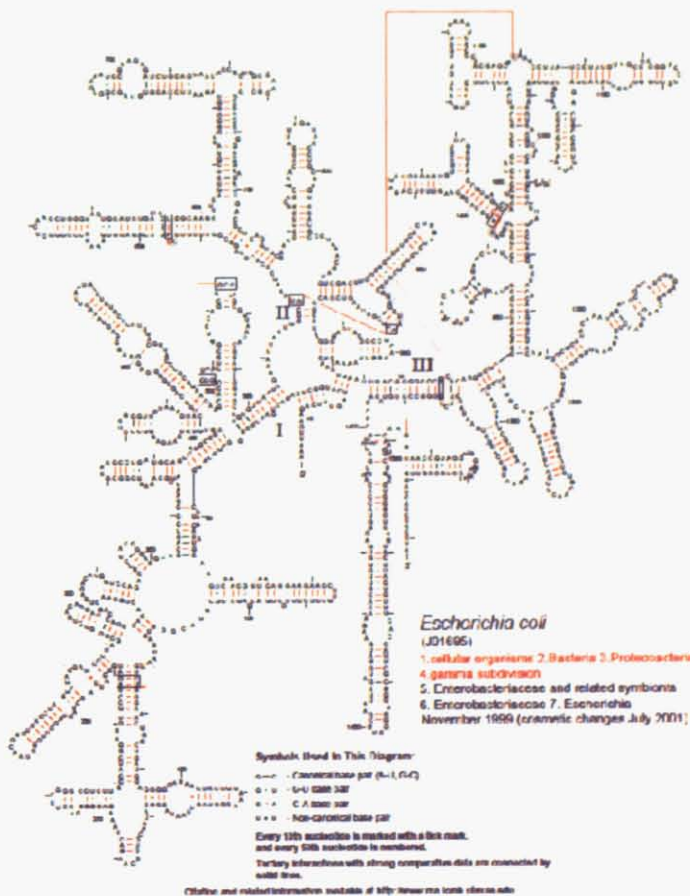
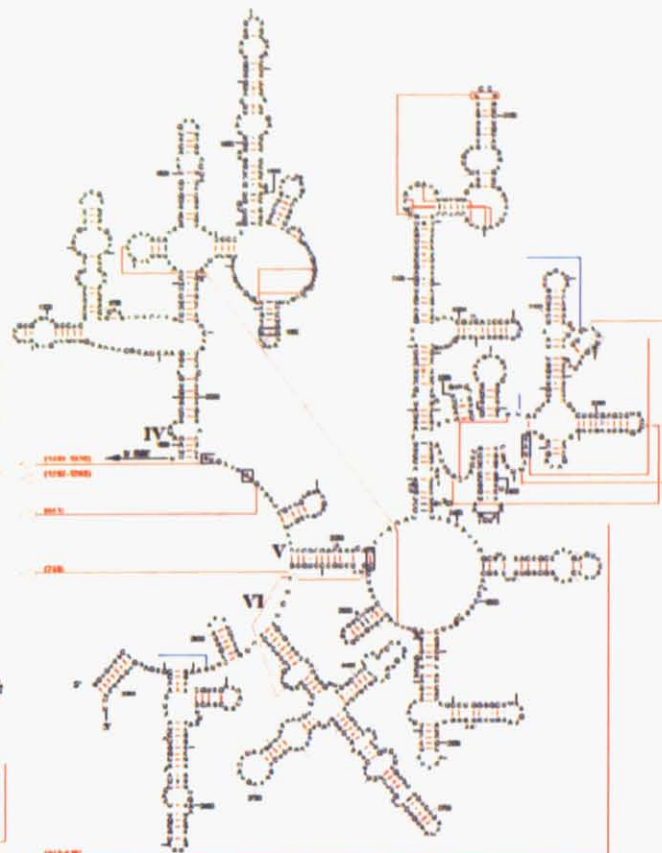
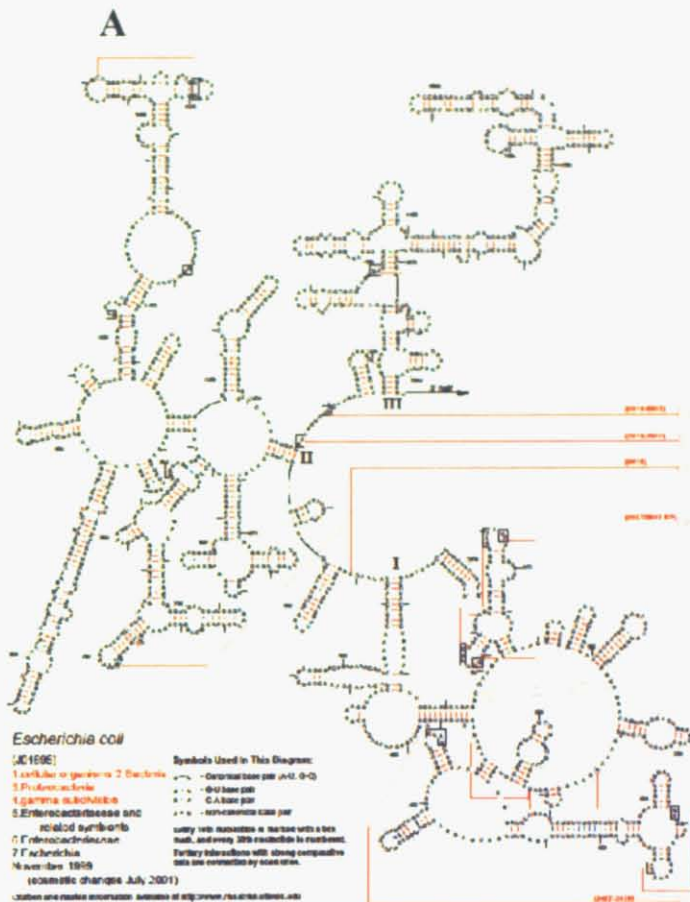


Figure 4 大腸菌 rRNA の二次構造。

A. 50S サブユニット 23S rRNA。

B. 30S サブユニットを構成する 16S rRNA。

(Gutell Lab Comparative RNA website

[<http://www.rna.icmb.utexas.edu/>]より)

95%以上の種で存在する塩基:

大文字: >98%保存; 小文字: 90-98%保存

・: - 80-90%保存; ◦: <80%保存

それ以下の頻度で存在する塩基:

[0-n]: 種によっては 0-n 塩基挿入

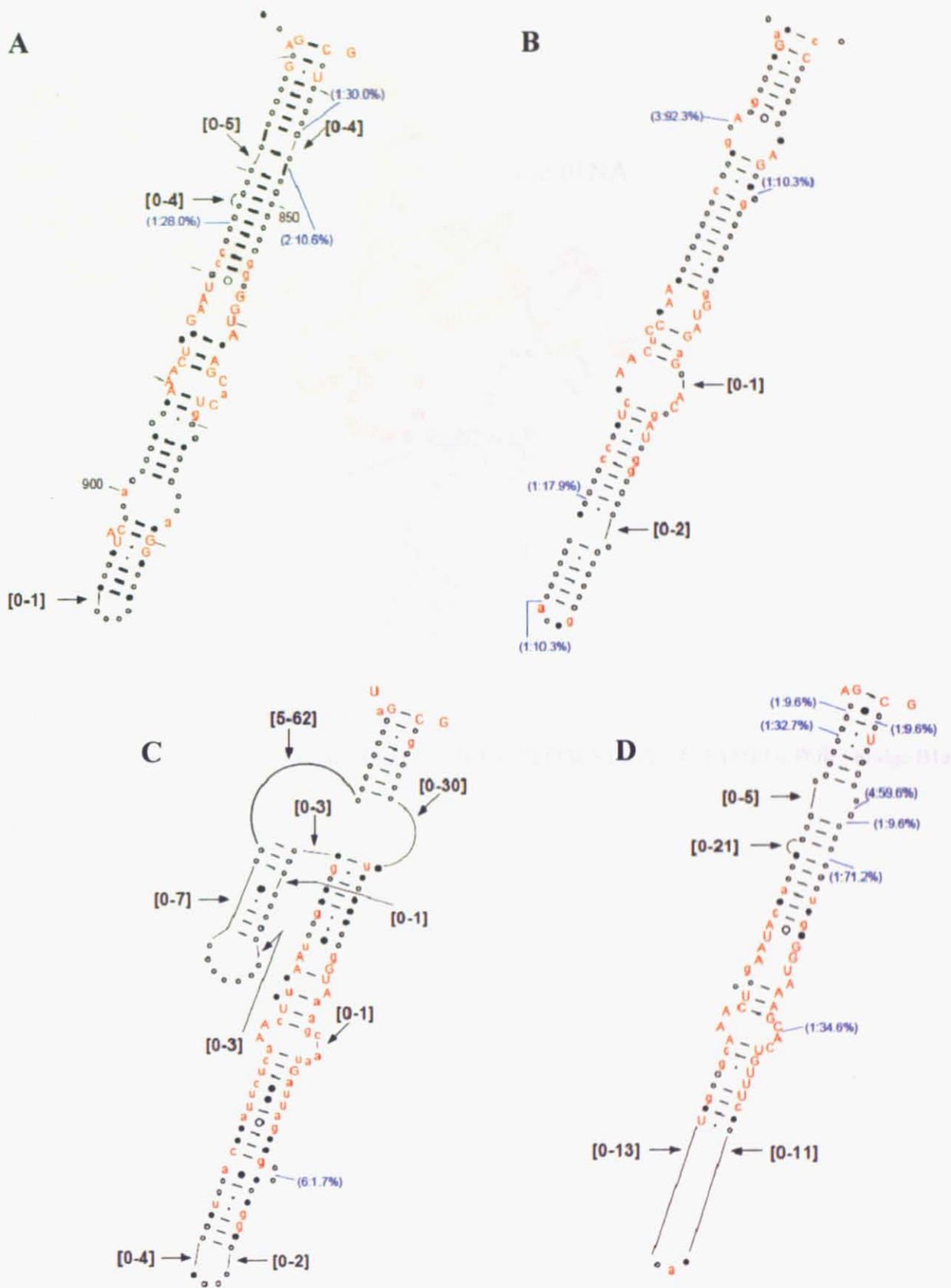


Figure 5 各生物種での H38 の配列保存性。

A. 真性細菌。 B. 古細菌。 C. 真核生物細胞質。 D. 植物葉緑体。

いずれにおいても H38 は長いヘリックス構造を持つことが知られている。(Gutell Lab Comparative RNA website [<http://www.rna.icmb.utexas.edu/>]より、凡例は図 4 に同じ)

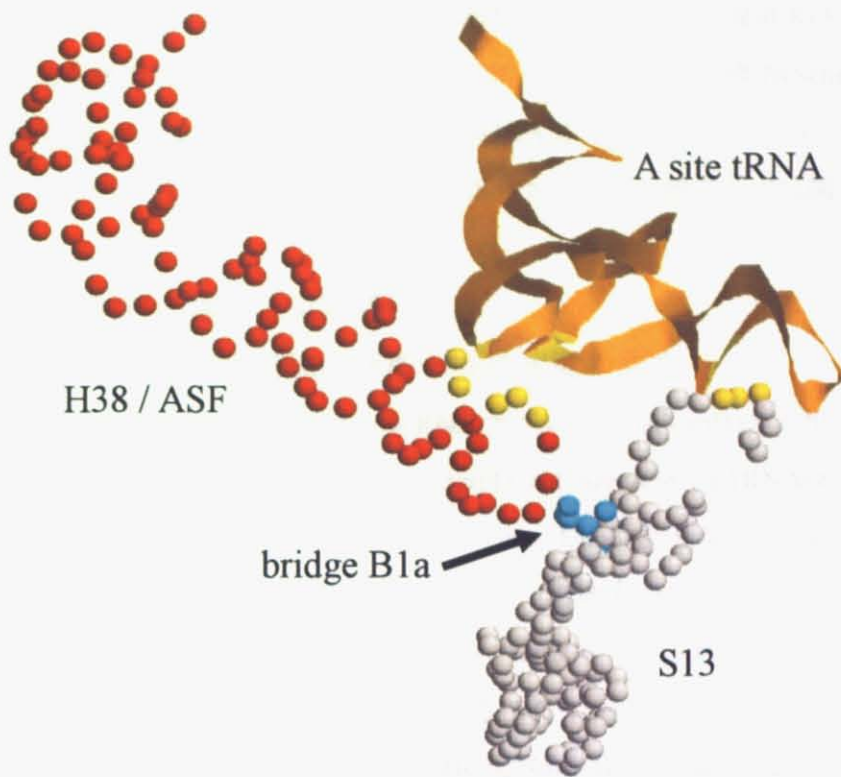


Figure 6 H38 の近傍との相互作用。

H38 / A-site finger(赤、左上)と A-site tRNA(橙、右上)、蛋白質 S13(白、右下)の相互作用。**bridge B1a** を矢印で示す。

III. 23S rRNA ヘリックス 38 短縮化リボソームの機能解析

結晶構造解析で得られた、大腸菌 50S サブユニットの構造(Schuwirth, Borovinskaya et al. 2005)を図 7A に示した。本研究で着目した H38/ASF と、対照として用いた H34、H68 の短縮部位は色のついた部分である。またこれらは 23S rRNA の二次構造上では図 7B に示す箇所にあたる。

III-1. 試料の調整と実験手法

《1》変異型大腸菌株の構築と成長速度の測定

ゲノム上の全てのリボソーム RNA オペロン(rrnA~rrnH)を欠損した大腸菌株 TA542 (Δ rrnE Δ rrnB Δ rrnA Δ rrnH Δ rrnG::cat Δ rrnC::cat Δ rrnD::cat Δ recA56 / pTRNA66 pHKrrnC) (Asai, Zaporozjets et al. 1999)は Catharine L. Squires 博士(Tufts Univ.)より供与を受けた。レスキュープラスミド pRB101(Sato, Hirabayashi et al. 2006)は、培地中のショ糖から毒性物質を生成する酵素の遺伝子 SacB と rrnB オペロンを、ニッポンジーンより市販されている pMW118 (ampicillin 耐性、Amp^r)に導入して構築した。マーカーの異なるベクターpMW218(ニッポンジーン、kanamycin 耐性、Km^r)に rrnB オペロンのみを導入し、pRB102(Sato, Hirabayashi et al. 2006)とした。TA542 株の持つプラスミド pHKrrnC を pRB101 で置換して出来た株を NT101 と名付け、本研究での様々な変異株作成における宿主とした。細胞は 37°C の 2×Luria-Bertani 培地(2×LB)中で培養した。

2×Luria-Bertani 培地

2% Bacto Tryptone

1% Yeast extract

1% NaCl

(1.5% Bacto Agar)

抗生物質は以下に示す濃度で必要に応じて加えた。

40 µg/mL spectinomycin (Spc)

100 µg/mL ampicillin (Amp)

50 µg/mL kanamycin (Km)

NT101 株のプラスミドを置換する際には、さらに 5%ショ糖を培地に加えた。NT102 株とは pRB101 を pRB102 か pRB102 由来の変異プラスミドで置き換えた一連の大腸菌株を指す。

図 8 のように、pRB101 と pRB102 は同一の複製開始点を持つため 2 つのプラスミドは一時的には共存するが、長期的に共に維持され続けることは無い。NT101 に変異型 pRB102 を導入すると、変異遺伝子が優性致死の場合は、pRB102 は排除され、kanamycin 中で生育出来る株は得られない。

変異遺伝子が機能を持たない場合には、一時的に 2 つのプラスミドが共存することになり、kanamycin 中では生育可能だが、ショ糖を含む培地では SacB の生成する毒性物質により致死となる。従って、kanamycin とショ糖を含む培地で選択することで、機能的な変異 *rrnB* 遺伝子を持つ株だけを得ることが出来る。これを利用し、培養液を kanamycin と spectinomycin のみ、および kanamycin、spectinomycin とショ糖を含む寒天培地に蒔き、両方で生育したクローンをピックアップしてシングルコロニーにした後、3100 Genetic Analyzer(ABI PRISM)で配列の確認を行った。

成長速度の測定をする際には、前培養した培養液(OD₆₀₀≈1.0-1.2)を約 1.16×10⁶ cells となるように 1.5 mL の 2×LB に接種し、200 μL ずつ 5 つに分け、SpectraMax 190 プレートリーダー(Molecular Device, inc)を用いて、OD₆₀₀ を 30 min 毎に 24 hr まで測定し、SoftMax Pro (Molecular Device, inc)によりデータを収集、編集した。定法に従い倍化時間を算出し、統計処理を行った。

《2》変異 *rrnB* 遺伝子を含むプラスミドの構築

上記の方法を用いてヘリックス短縮化した 23S rRNA のみを発現する大腸菌を作成するのに用いるプラスミドの構築方法を示す。文献(Sato, Hirabayashi et al. 2006)に示すように、鋳型プラスミド pRB102 を M-*Alu* I、M-*Hae* III、M-*Hap* II で処理して高度にメチル化し、Quik-Change site-directed mutagenesis (STRATAGENE)によってプロトコルに従い変異を導入した。これは 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を持ち、長い配列の増幅に適した DNA 合成酵素 PfuTurbo (STRATAGENE)を用いてプラスミド pRB102 を鋳型に、PCR サイクルにかける方法で、これによってプラスミド全長を増幅する形でミスマッチ部分をプライマーの配列に置き換えることが出来る。このために使用したプライマーと反応液の組成、反応条件を下記に示す。

H38d22 fwd (40 nt) <E. coli *rrnB* 23S np -865~875+GAGA+902~926>:

5' -cactgtttcgggagaccgatgcaaacactgccaataccggag-3'

H38d22 rev (40 nt):

5' -gtttgcatcgggtctcccgaacagtgctctacccccggag-3'

H38d9 fwd (46 nt) <E. coli *rrnB* 23S np -868~883+893~922>:

5' -tgtttcggcaaggggcttaccacccgatgcaaacactgccaatacc-3'

H38d9 rev (46 nt):

5' -gtttgcatcgggttggttaagcccccttgccgaacagtgctctacc-3'

H38d34 fwd (46 nt) <E. coli *rrnB* 23S np -851~871+906~930>:

5' -ctccgggggtagagcactgtttgcaaacactgccaataccggagaatg-3'

H38d34 rev (46 nt):

5' -cattctccggtattcgcagtttgcaaacagtgctctacccccggag-3'

H34d fwd (46 nt) <E. coli rrnB 23S np -699~708+711~720+723~748>:
5' -aggttgaaggggtaaacactctggaggaccgaaccgactaatgttg-3'

H34d rev (46 nt):
5' -ggctctccagcgtgttacccttcaacctgcccattggctagatc-3'

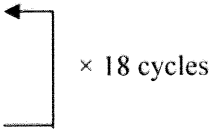
H68d fwd (40 nt) <E. coli rrnB 23S np -1834~1851+1899~1920>:
5' -tgcccggtgccggaaggtaaaccggcggccgtaactataac-3'

H68d rev (40 nt):
5' -ggccgccgtttaccttccggcaccgggcaggcgtcacac-3'

10×pfu buffer	5 μL
2 mM dNTP mix	5 μL
pRB102 (WT)	150 ng
each primers	12.5 pmol
PfuTurbo polymerase	2.5 U

up to 50 μL

95 °C 30 sec
95 °C 30 sec
55 °C 1 min
68 °C 20 min



PCR 反応(DNA Engine PTC-200, MJ Research)後、反応液に *Dpn* I (New England Biolabs) を 1 μL 加え、37°Cで 2 hr 処理してメチル化された鋳型プラスミドを分解し、QIA-Quick column (QIAGEN) によって精製した。こうして得た各変異プラスミドを大腸菌 DH5α (ニッポンジーン) にヒートショック法で導入して培養後、アルカリ SDS 法を用いて抽出、精製し、3100 Genetic Analyzer にて配列を確認した後、NT101 に導入し、上述のように選択した(Sato, Hirabayashi et al. 2006)。

《3》 In vivo での翻訳精度の測定

これは下のような 5 種類のプラスミドを大腸菌に導入し、β-ガラクトシダーゼ活性を測定することで、フレームシフトやリードスルーのおき易さを評価する系である。図 9 の 5 種類のプラスミド WT、p240 (-1)、Plac7 (+1)、P415 (TGA)、P12-6 (TAG)(O'Connor, Thomas et al. 1997)は、それぞれ、正常な β-ガラクトシダーゼ遺伝子(WT)、ORF の N 末端近傍にフレームシフト(-1, +1)、ま

たは終止コドン(TGA, TAG)を含む遺伝子配列を持つ。例えば p240 (-1)は 2 塩基挿入されているため、翻訳の間に-1 のフレームシフトが起きないと、活性のある酵素は作られない。従って、株毎に測定した酵素活性から、-1 フレームシフトが起きた頻度を相対的に比較することが出来る。同様に、他のプラスミドを導入すれば+1 フレームシフト、UGA リードスルー、UAG リードスルーの頻度を評価出来る。これらのプラスミドは Michael O'Connor (Univ. of Missouri-Kansas City)、Al Dahlberg (Brown Univ.)両博士より供与頂いた。変異 NT102 株にこれらのプラスミドを導入し、ピックアップしたコロニーを液体培地で 24 hr 前培養した。この培養液の 3-5%を新鮮な液体培地に接種し、0.3~0.5 OD₆₀₀ まで振盪培養した。この培養液 1 mL から 7,000 rpm、10 min の遠心分離により菌体を回収し、-20°Cに保存した。この際、リードスルーを起こしやすい株(error-prone [EP], 16S rRNA に C912G/G885U 変異を持つ,(Lodmell and Dahlberg 1997))を UGA、UAG リードスルーの陽性対照として、逆にフレームシフトを引き起こしやすくなる株(high fidelity [HF], C912G and G888U, (Lodmell and Dahlberg 1997))を-1、+1 フレームシフトの陽性対照として、同様に 5 種類のプラスミドを導入し、菌体を回収した。

ONPG (o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)を基質として下記の要領で β-ガラクトシダーゼ活性を測定した(Miller 1992)。

Z buffer*

60 mM Na₂HPO₄

40 mM NaH₂PO₄

10 mM KCl

1 mM MgSO₄

※：pH が 7.0 となることを確認した。合わない場合には Na₂HPO₄ と NaH₂PO₄ を用い調整する必要がある。

ONPG solution

4 mg/mL ONPG in Z buffer

菌体に 2 mL の Z buffer(+0.01% SDS)を加えよく混ぜ、25 μL のクロロホルムを加え、よく攪拌した。以降は各サンプルにつき 5 本ずつ調製し測定して統計処理を行った。

100 μL *E. coli* mixture in Z buffer (0.01% SDS)

+250 μL ONPG solution

vortex

↓ @r.t., 6~10 min (β -ガラクトシダーゼ反応)

+250 μ L 2 M Na_2CO_3 (反応停止)

vortex

1,600 \times g、15-20 min(SIGMA 4K15C, QIAGEN)で遠心分離し、上清 200 μ L を 96 穴の平底プレートに移し A_{420} を測定した(SpectraMax190)。 β -ガラクトシダーゼ活性は t (min)を反応時間、 v (mL)を培養液の液量(1 mL)として下記の式から求めた。

Units β -gal= $[A_{420}\times 1,000]/[t\times v\times \text{OD}_{600}]$ (Miller units)

《4》 菌体からの crude リボソームの調製

定法に従い、磨砕用アルミナ(Al_2O_3)で菌体を磨砕し、crude リボソームを調製した(Hanada, Suzuki et al. 2001; Hirabayashi, Sato et al. 2006)。大腸菌は 20 hr 以上前培養した後、kanamycin、spectinomycin とショ糖を含む新鮮な培地に対して 3%接種した。定法では定常状態まで生育させることもあるが、より活性の高いリボソームを高収量で得るため、0.5~0.6 A_{600} で集菌した。回収は SORVALL 3B PLUS 遠心分離機を用い、1 L の遠心管で 4 $^{\circ}$ C, 4,500 rpm, 25 min の条件でスケールダウンし、GRX-220(TA-23 ローター, TOMY)を用い、4 $^{\circ}$ C, 6,500 rpm, 30 min の条件で沈殿を回収した。菌体の湿重量を測定し、液体窒素で凍結し、-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。以下、氷上または低温室にて作業を行った。菌体を静置により解凍して乳鉢に移し、2 倍量のアルミナを加えて乳棒で 10 min 程度磨砕した。臭いが消え、混合物がクリーム状になったところでやめ、下記のバッファに懸濁した。磨砕が短すぎると収量が減り、磨砕をし過ぎるとリボソームの活性が低下するため、注意が必要である。

RBS buffer

20 mM HEPES-KOH (pH 7.6)

30 mM NH_4Cl

10 mM $\text{MgO}(\text{Ac})_2$

6 mM 2-mercaptoethanol(2-ME)

液量は菌体に対し、重量で等量程度が好ましいが、2 g の菌体に対して 10 mL 程度を上限として使用した。懸濁液を 50 mL チューブに移し、遠心分離にかけた(4 $^{\circ}$ C, 7,000 rpm, 15 min)。遠心分離後は、上から上清、菌体、アルミナの順となるので澄んだ上清のみを回収し、菌体の沈殿に再度

バッファを 3~5 mL 程度加えて再懸濁し、同じ条件で回収を行った。回収した上清を合わせて、液量に応じて、下記のいずれかの条件で超遠心分離を行った(XL-70 ultracentrifuge, BECKMAN)。

4°C, 19,500 rpm, 45 min (70 Ti ローター, 遠心管の容量は 25 mL 弱)

4°C, 22,000 rpm, 45 min (50 Ti ローター, 遠心管の容量は 10 mL 強)

上清を回収した。この上清は S-30 画分(supernatant-30,000g, 30,000×g で遠心後に得られた上清液)と呼ばれ、細胞膜や細胞壁等は除かれるが、細胞内の超分子複合体等は含んだ状態である。ここに DNase を 1 μL / 10-20 mL 加え、遠心分離を行った。

4°C, 35,500 rpm, 4-6 hr (70 Ti ローター)

上清(S-100 画分)を捨て crude リボソームを得た。1 mL / 菌体 1 L 程度になるようにエッペンチューブ用のペレットミキサーを用いて懸濁した後、500 μL~1 mL 程度に分注し、-80°Cに保存した。この crude リボソームは EF-G を強く結合しているため、活性測定には引き続きショ糖密度勾配遠心法により 70S リボソームへと精製を行った。

《5》 70S リボソームの精製とサブユニット会合能の評価

さらにリボソームを精製するためにショ糖密度勾配遠心法(sucrose density gradient 法, SDG)を行った。SDG は沈降係数 S の違いを利用して混合物を分離する方法で、解離してしまったサブユニットや、mRNA と pep-tRNA を結合してポリソームとなっているものや EF-G を除き、会合した 70S リボソーム(会合型リボソーム、tight coupled ribosome)の形になったものだけを得るために用いた。これによって得られたリボソームは *in vitro* 翻訳反応においても高い活性を示し、また、結合能測定等の定量的な実験に用いることが出来る。

RBS buffer (6% sucrose)

20 mM HEPES-KOH (pH 7.6)

30 mM NH₄Cl

10 mM MgO(Ac)₂

6% sucrose

6 mM 2-ME

RBS buffer (38% sucrose)

20 mM HEPES-KOH (pH 7.6)

30 mM NH₄Cl

10 mM MgO(Ac)₂

38% sucrose

6 mM 2-ME

遠心管(25×89 mm, OPEN-TOP POLYCLEAR 7052, SETON)に、ロングキャップ用のショ糖溶液の境界の位置に目印の線を引いた。

以降、低温室で作業を行った。ショ糖密度勾配を作るために、Gradient Mate (Bio-Comp)を用いた。まず水平調節を行い、下記のプログラムを入力した。

Time / Angle / Speed = 5.34 / 56 / 25

遠心管を並べ、目印の線まで 6%ショ糖溶液を加え、長い針を付けたシリンジを用いて 6%ショ糖溶液の下に、目印の線まで静かに 38%ショ糖溶液を注入した。気泡が入らないようにロングキャップをはめ、Gradient Mate を開始した。勾配が出来てから 10 min 程静置して密度勾配を安定化させた。-80℃に保存してあった crude リボソームを融解し、この遠心管に、1本につき 100 ODunit、液量にして 600 μL 程度(厚さ 1 mm 程度)までを均一になるように重層した。遠心管をスイングローターSW28 (BECKMAN)にセットし、遠心分離を行った。

accel / brake / temperature / speed / time = 7 / 7 / 4 °C / 20,000 rpm / 14-16 hr

これを Fraction collector(Bio-Comp)で遠心管の上から下へ、48 穴の平底プレートに回収した。設定は(distance / speed / fraction / program = 1 mm / 0.2 / 70 / D2)とした。“D2” とは delay=2 sec, 各フラクションの回収毎に 2 sec のインターバルを挟むことであり、より厳密に分画を行う際には、“R2A1D2”(rinse 2 sec, air 1 sec, delay 2 sec)等のプログラムを使用することが出来るが、本研究では活性の高いリボソームを得ることが目的であったため、水による洗浄や空気でのパージは行わなかった。

この条件では 450 μL 程度のフラクションとなるので、1 / 20 希釈して UV 吸収を測定した (SpectraMax 190)。260, 280, 320 nm での吸光度を測定した。260 nm での値をフラクション順にプロットし、70S のピークを、中心に 50S を含まないように注意して 70S フラクションとして回収し、UV₂₆₀ を測定(GeneSpecV, HITACHI)し、1 OD₂₆₀ unit=24 pmol として濃度を算出した後、-80℃に保存した(Spedding 1990)。波形はフラクション毎の吸光度をプロットし、2 区間の移動平均で近

似曲線を引くことで得た。

サブユニット会合能の評価をする際には、同様に SDG、分画を行い、フラクション 20 までの値を background として、50S と 70S のピークの高さを求め、70S リボソーム中に含まれる rRNA の全長の塩基数の和と 50S に含まれる rRNA の塩基数の比率を使って、70S リボソーム中の 50S サブユニットの吸光度を計算した。

$$50S \text{ in } 70S = A_{260}<70S> \times (2904+120) / (2904+120+1542) = A_{260}<70S> \times 0.634$$

$$\text{Total } 50S = \text{free } 50S (A_{260}<50S>) + 50S \text{ in } 70S$$

50S サブユニットの総量は、上記のように 50S のピークと 70S 中の 50S サブユニットの合計であるので、前者を後者で割ることで、サブユニット会合能として算出した。

《6》 蛋白質因子の調製

Histidine tag を持つ大腸菌伸長因子 EF-Tu と EF-G は、(Shimizu, Inoue et al. 2001)に示すように、Histidine tag のついた蛋白質を大腸菌で発現させ、FPLC(ÄKTA explorer, Amersham)を用いて Ni アフィニティカラムに吸着させ、イミダゾールの濃度勾配により精製した状態の蛋白質を清水義宏、梅影創両博士(東京大学)より供与を受けた。

《7》 tRNA、mRNA の調製

in vitro の実験に使用するために tRNA と mRNA の調整を行った。

i) tRNA^{Phe} の調製

in vitro 翻訳反応であるポリウリジン RNA 依存ポリフェニルアラニンペプチド合成反応には、以下で述べるように市販の tRNA mixture (Boehringer Mannheim)に¹⁴C]Phe を加え、S-100 画分でアミノアシル化した¹⁴C]Phe-tRNA を用いた。しかし、翻訳の素過程を評価する際には、この中に含まれる大量のコールドの aa-tRNA や de-tRNA があるといけないので、混合物ではない tRNA を用いることとした。当初、in vitro の転写反応により tRNA を得ようと考え、合成条件の検討を行った。CCA 末端を含む DNA 鎖を転写して得た断片と、CCA 末端の無い DNA 鎖を用い転写反応時に CCA enzyme を加え末端を付加した断片を比較した。前者では転写の末端まで均一に合成されない可能性があるが、後者の反応系では酵素により均一な末端の断片を得やすいと考えた。

合成した tRNA^{Phe} の配列を示す。末端の 74~76 残基にあたる CCA(下記二重線)の配列にアミノ酸が結合する。

tRNA^{Phe} (76 nt)

5' -GCCCGGAUAGCUCAGUCGGUAGAGCAGGGGAUUGAAAAUCCCCGUGUCCUUGGUUCGAUUCCGAGUCC
GGGCACCA-3'

以下の3つの合成DNAを用い、図10Aに示すように、*E. coli* tRNA^{Phe}とその前にT7 RNAポリメラーゼ認識配列を持つDNA断片を合成した。効率よく転写を行うためGで開始するのが一般的であるが、tRNA^{Phe}はGから始まっているためそのままの配列を用いることとした。下線部分がT7 RNAポリメラーゼ認識配列に当たる。

Phe-5' (29 nt): 5' -gctaatacgactcactatagccccggatag-3'

Phe-3' (25 nt): 5' -tggtgccccggactcggaatcgaacc-3'

(または shortPhe-3' (25 nt): 5' -tgccccggactcggaatcgaaccaag-3')

Ec.tRNA-Phe<syn> (72 nt) :

5' -ctatagccccggatagctcagtcggtagagcaggggattgaaaatccccgtgtccttggttcgattccg
agtc-3'

rTaq DNA polymerase を用いて下記の条件で熱サイクルをかけて反応を行った。

10×rTaq buffer (-Mg²⁺)

100 mM Tris-HCl (pH 8.3)

500 mM KCl

10×rTaq buffer 10 μL

25 mM MgCl₂ 4 μL

2 mM dNTP mix 10 μL

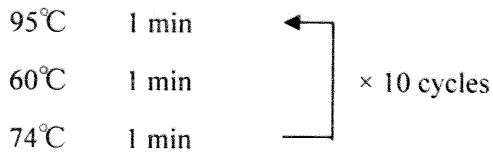
Ec.tRNA-Phe<syn> 20 pmol

Phe-5' / Phe-3' (または ShortPhe-3') 200 pmol

rTaq DNA polymerase 0.4 μL

up to 100 μL

95°C 2 min



得られた DNA 断片をスケールにあった QIAGEN-tip (QIAGEN)を用い、プロトコルに従って精製し、1×TBE 10% native PAGE にて分離し、EtBr 染色により確認を行った。

この DNA 断片を鋳型として用い、転写反応を行った。転写開始の 5'末端は G であり、間違いなく反応を開始、進行させるために、反応系に GTP の 10 倍量の GMP を加え、この GMP から転写が開始されるようにする。多量の GMP により反応系の粘性が上昇するのを防ぐために、GTP 量は他の NTP の半量とした。

NTP mix (10 mM)

- 10 mM ATP
- 10 mM UTP
- 5 mM GTP
- 10 mM CTP

transcription buffer A

- 40 mM HEPES-KOH (pH 7.8)
- 20 mM MgCl₂
- 5 mM dithiothreitol (DTT)
- 2 mM spermidine
- 0.2 mg/ml BSA

100 mM GMP	10 μL
10 mM NTP mix	10 μL
DNA fragment	250 pmol
T7 RNA polymerase	1 μL
± 0.4 μg/mL <i>E. coli</i> CCA enzyme	0 / 0.2 μL

up to 100 μL

↓ 37°C, 3 hr

+1/10 1.5 M EDTA (pH 8.0) [reaction stop]

+等量 酸性フェノールにてフェノール処理(攪拌後、15,000 rpm, 10 min, 4°C)

上清に 1/10 量の NaOAc (pH 5.5)、2.5 倍量の 100%エタノールを加え、-80°Cに 15 min 静置して 15,000 rpm, 15 min, 4°C(エタノール沈殿)、70%エタノールですすぎ、乾燥させて回収し、milliQ 水に溶解した。1×TBE 10% UREA PAGE により、転写の確認を行い、ゲルからの切り出しにより精製を行った。切り出し後のエタノール沈殿においては、1~1.5/10 量のグリコーゲンを加えた。tRNA の 260 nm での吸光度を測定し、 $1\text{OD}_{260}\text{ unit}=1,500\text{ pmol tRNA}^{\text{Phe}}$ として換算し、tRNA^{Phe} 濃度を算出し収量を求めた。スケールを上げる際には、大量に調製した反応液を 1 mL ずつ分注し、転写反応を進行させた。

しかし、結果にて述べるが、いずれの転写 tRNA もアミノアシル化活性が低く(15~40%程度)、実験に用いるのには不適切であったため、大腸菌から精製した native の tRNA を用いることとした。

native tRNA^{Phe} と native tRNA_f^{Met} は大腸菌 A19 株より固層化プローブ法(Suzuki, Suzuki et al. 2001)により精製した状態で、当研究室の宮内健常氏より供与を受けた。tRNA_f^{Met} は転座反応の条件検討の過程で、poly(U) RNA でなく合成 mRNA を用いた転座反応では P-site に AUG コドンが来るようにデザインしたため、P-site に結合させる de-tRNA として用いた。

ii) tRNA のアミノアシル化とアセチル化

ポリウリジン RNA 依存ポリフェニルアラニンペプチド合成反応には、購入した E coli tRNA mixture (Boehringer Mannheim)に¹⁴C]フェニルアラニン(Amersham)と大腸菌 S-100 画分を加えて、mixture 中の tRNA^{Phe} をフェニルアラニル化した。

100 mM Tris-HCl (pH 7.8)

10 mM KCl

5 mM MgCl₂

1 mM DTT

2 mM ATP

E. coli tRNA mixture 4 OD₂₆₀ unit

[¹⁴C]Phenylalanine 10 μL

E. coli S-100 fraction 6 μL

up to 200 μ L

この反応液 36 本分(7.2 mL)を一度に調製した。各チューブに S-100 画分を加えることで反応を開始し、37°Cで 10 min 反応後、等量の酸性フェノールを加えて攪拌し 4°C, 15,000 rpm, 5 min 遠心分離した。上層を NaOAc (pH 5.5)を塩としてエタノール沈殿(4°C, 15,000 rpm, 20 min)した。0.3 M KOAc (pH 5.2)に溶解し、プロトコルに従って 2 本の脱塩カラム NAP25 (Amersham)を通すことで ATP を除去し、溶出液をエタノール沈殿として回収、milliQ 水に溶解し-80°Cに保存した。この際、一部を取って液体シンチレーションカウンターLSC6100 (ALOKA)で測定し、濃度を算出した。

また、精製 tRNA にフェニルアラニンを結合させる際には、下記の条件にてアミノアシル化を行った。緩衝液として HEPES-KOH を用いたのは、アミノアシル化の後にアセチル化を行う場合、Tris-HCl ではアセチル化反応が阻害されるためである。アミノ酸はモル数で tRNA 量の 2 倍程度となるように加えた。括弧内に小スケールにてアミノアシル化活性の確認を行う反応で用いた条件を示す。

30 mM HEPES-KOH (pH 7.8)

10 mM KCl

5 mM MgCl₂

1 mM DTT

2 mM ATP

<i>E. coli</i> tRNA ^{Phe}	750 pmol	(100 pmol)
[¹⁴ C]Phenylalanine	15 μ L	(2.5 μ L)
<i>E. coli</i> S-100 fraction	2.5 μ L	(1.5 μ L)

up to 50 μ L

aa-tRNA の 260 nm での吸光度を測定し、1 OD₂₆₀ unit=1,500 pmol tRNA^{Phe}として換算し、tRNA^{Phe}濃度を算出した。これと RI のカウントから算出したアミノ酸濃度から、アミノアシル化効率を算出した。

AcPhe-tRNA は、tRNA をアミノアシル化後、酸性フェノール処理を行い、1/10 量の 3 M NaOAc (pH 5.5)を加え、氷上で無水酢酸を 1/10 量加えて 10 min 静置する作業を 4 回繰り返した。エタノール沈殿により濃縮し、milliQ 水に溶解した。

アセチル化の確認のため、少量を分取し milliQ 水で容量を増やし、0.1 N NH₃水溶液を 1/10 量加

え(1 μ L AcPhe-tRNA + 8 μ L milliQ + 1 μ L 0.1N NH₃), 80°Cで 30 min 加熱した。液量を 2 倍程度に薄めて適当量を Silica gel 60 F₂₅₄ プレート(MERCK)にスポットして下記の溶媒で薄層クロマトグラフィー(TLC)を行った。マーカーとして、遊離フェニルアラニン(Phe)と、遊離フェニルアラニン 1 μ L に無水酢酸 0.95 μ L を加え、37°C, 1 hr 反応させて完全にアセチル化した、アセチルフェニルアラニン(AcPhe)を用いた。

TLC 展開溶媒

(n-butanol : acetic acid : water) = (4 : 1 : 1)

iii) mRNA の調製

転座反応の条件検討として、転座反応前の complex として以下の 2 つを検討するため、下記の mRNA の配列をデザインした。

リボソーム・poly(U) RNA・de-tRNA^{Phe}・AcPhe-tRNA^{Phe}

リボソーム・designed mRNA・de-tRNA^{Met}・AcPhe-tRNA^{Phe}

後述の primer extension 法により検出する転座反応評価系で用いる T4 gene 32 mRNA をデザインのベースとした。転写効率を上げるため 5'末端に GG を加えた。しかし配列中に長い A の連続があり、2 本の DNA を熱サイクルで伸長する定法(図 10B, 左)で全長 2 本鎖の鋳型 DNA を得るのは難しい可能性があったため、他の方法を並行して検討した。T7 ポリメラーゼ認識配列が 2 本鎖になっていれば転写の対象となる配列部分は 1 本鎖でよい、とする報告が知られていたため、アンチセンス側の T7 ポリメラーゼ認識配列を含む全長の DNA と、センス側の T7 ポリメラーゼ認識配列と転写開始末端の“GG”までの長さの DNA をアニールさせ転写反応の鋳型とする方法を試みた(図 10B, 右)。下線部分が T7 RNA ポリメラーゼ認識配列、四角で囲んだのが 16S rRNA と相補的に結合する SD 配列(Shine-Dalgarno 配列)に当たる。また、P-site に入る“AUG”コドン¹を太字、グレー、A-site に入る“UUU”コドン²を太字で示した。

mRNA32# (56 nt):

5' -GGAAAUUAAAAAAAAAAGGA¹AAUAAAAAUGUUU²AAACGUAAAUCUACUGCUGAACUC-3'

mRNA32#PCR-5' (48 nt):

5' -gctaatacgaactcactataggaaattaaaaaaaaaagga¹aataaaaatg²-3'

mRNA32#PCR-3' (50 nt):

5' -gagttcagcagtagatttacgtttaaacatTTTTATTTCCTTTTTTTTA-3'

以上のプライマーを用いて熱サイクルで全長を伸長させた。熱サイクルによる伸長反応は上述の tRNA の鋳型合成と同じ組成と、下記のプライマー濃度、サイクル数で反応を検討した。

mRNA32#PCR-5' & 3' primer	10 / 20 / 50 / 75 / 100 pmol each
rTaq DNA polymerase	0.33 μ L

up to 50 μ L

95°C	2 min	
95°C	1 min	← × 3 / 10 cycles —
60°C	1 min	
74°C	1 min	

一方、一部 1 本鎖の露出した合成 DNA 鎖として用いた下記の配列のプライマーは、1 mM MgCl₂ 中でアニーリングを行った。

mRNA32#-5' (21 nt): 5' -gctaatacagactcactatagg-3'

mRNA32#-anti (75 nt):

5' -gagttcagcagtagatttacgtttaaacatTTTTATTTCCTTTTTTTTAATTCCTATAGTGAGTCG
tattagc-3'

1 mM MgCl₂

mRNA32#-5' & anti primer	100 pmol each	(500 pmol each)
--------------------------	---------------	-----------------

up to 20 μ L (50 μ L)

80°C 10 min

↓徐々に温度を低下させた(1.5 hr)

35°C

35°Cまで温度が下がったことを確認して、-30°Cにて凍結保存することとした。

双方の鋳型について 1×TBE 10% native PAGE を行い、期待されるバンドが得られるか確認を行った。

次に、転写反応は上述の tRNA の鋳型合成と同様にして、鋳型溶液を加え、反応を行った。転写反応については 2 種類の組成で転写活性を比較し、よりよい方で大量調製を行うこととした。tRNA はアミノアシル化の後、一部アセチル化を行うが、この際、Tris-HCl がアセチル化反応を阻害するため、tRNA の転写についてはこの点は検討しなかった。

transcription buffer A	transcription buffer B
40 mM HEPES-KOH (pH 7.8)	40 mM Tris-HCl (pH 8.0)
20 mM MgCl ₂	24 mM MgCl ₂
5 mM DTT	5 mM DTT
2 mM spermidine	2 mM spermidine
0.2 mg/ml BSA	0.05% Triton X-100
template DNA(thermal cycle)	8 μL
template DNA(anneal)	8 pmol
T7 RNA polymerase	1 μL
<hr/>	
up to 100 μL	

大量調製する際には溶液を 1 mL×5 本反応させ、1×TBE 10% UREA PAGE により、転写の確認を行い、ゲルからの切り出しにより精製を行った。

《8》 In vitro での活性測定

in vitro で H38 短縮化リボソームの活性を測定するため以下の実験を行った。各実験は 3 回以上行い、同様の傾向を示すことを確認し、可能な場合は統計処理を行った。

i) ポリウリジン RNA 依存ポリフェニルアラニンペプチド合成反応

これは、リボソーム、EF-Tu、EF-G に対して、アミノアシル tRNA として Phe-tRNA、鋳型として poly-Uracil RNA、エネルギー源として GTP を加えると、フェニルアラニンのペプチドが合成されるという古典的な in vitro 翻訳反応系である(Spedding 1990; Terasaki, Suzuki et al. 2004)。開始のメカニズムは解明されていないが in vitro で翻訳系の活性を測定するには一般的に用いられるアッセイである。EF-G、EF-Tu は特に記載が無い場合はそれぞれ 600 fmol/μL を系に加えた。

50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
60 mM KCl
6.5 mM MgCl₂
0.5 mg/mL poly Uracil RNA
1 mM DTT
0.1 mM spermine
2.5 mM phosphoenol pyruvic acid**
2.5 unit/mL pyruvate kinase(type II、SIGMA)**
0.5 mM GTP

0.075 pmol/μL 70S ribosome
0~0.6 pmol/μL *E.coli* EF-Tu
0~0.6 pmol/μL *E.coli* EF-G
0.3 pmol/μL [¹⁴C]Phe-tRNA

up to 50 / 70 μl

※100 mM phosphoenol pyruvic acid : pyruvate kinase = 19 : 1 の混合液を反応液に 1/40 量加えた。

[¹⁴C]Phe-tRNA と GTP を加える前の反応液を 37℃で 3 min preincubate を行い、最後に [¹⁴C]Phe-tRNA を加えて反応を開始した。37℃におき、2、4、6、10 min または、2、5、10 min の各タイムコースで反応液を 15 μL ずつとり、濾紙 (3 MM CHR, Whatman)にスポットした。10% trichloro acetic acid(TCA)溶液中に濾紙を浸し、80℃で 30 min 温浴して[¹⁴C] Phe-tRNA から Phe を除去(deacylation)した。これにより翻訳によって合成された poly(Phe)のみが濾紙上に沈着する。10% TCA 溶液を換えて氷上、15 min の振盪で2回洗い、100%エタノール中で氷上、5 min 振盪した後、充分に乾かしてから液体シンチレーションカウンターで測定した。タイムコースから直線上に乗る数値を用い、最小二乗法によって求めた近似直線の傾きを反応速度とした。

ii) リボソームによる EF-G/GTPase 活性化反応

これは、EF-G の GTPase のリボソームによる活性化を測定する系で、単体では GTPase 活性が殆ど見られない EF-G が、空のリボソームの存在により活性化され効率よく GTP を分解することを利用した系である(Conway and Lipmann 1964; Terasaki, Suzuki et al. 2004)。γ 位に ³²P を含むリン

酸基を持った GTP(γ - ^{32}P GTP)を基質として反応させ、TLC によって GTP と無機リン酸(Pi)を分離して、放出された Pi 量をオートラジオグラフィーで定量した。以下のような組成の反応液で、放射性でない GTP と γ - ^{32}P GTP を反応液に最後に加えると同時に 37°C にした。

20 mM Tris-HCl (pH 7.5)

70 mM NH_4Cl

30 mM KCl

7 mM MgCl_2

Ribosome 0~3 pmol

E.coli EF-G 6 pmol

25 μM GTP 5 μL

γ - ^{32}P GTP 0.5 μL (Amersham)

up to 25 μl

以降、30 sec、1 min、3 min、5 min、7 min、10 min、20 min で 2 μL ずつ反応液を取り、10 %ギ酸 150 μL 中に入れることで反応を止めた。

この反応液を含んだギ酸溶液を 0.5 μL ずつ TLC プレートである POLYGRAM CEL 300 PEI/UV₂₅₄(MACHERY-NAGEL)にスポットし、0.75 M KH_2PO_4 (pH 3.5)でプレートの 2/3 程度まで展開し、乾燥させてからオートラジオグラフィーで検出した。BAS-5000 (FUJIFILM)を用いて測定を行い、Image Gauge3.46 (FUJIFILM)を用いて定量した。レーン毎の GTP と Pi のスポットの強度の和を 100%とし、Pi のスポットの割合を算出した。

iii) アミノアシル tRNA のリボソーム A-site への結合能の測定

生体内で aa-tRNA は EF-Tu の働きによって A-site に結合する。実験的には P-site に de-tRNA を結合させておくことによって、EF-G 非依存的な転座反応で P-site へ移動するのを防ぐ必要がある。P-site を埋めておかないと、aa-tRNA は A-site へ結合しても、0°C でも A-site から P-site へのスライディングが起きてしまい、どちらに結合しているか不明となってしまう。さらには、空いてしまった A-site に新たに aa-tRNA が結合してペプチド転移反応が起こり、このペプチドを観察してしまうこととなりうる。また、P-site を de-tRNA で埋めておくことによって、EF-Tu 非存在下でも、aa-tRNA を選択的に A-site に結合させることが出来る(図 11)。

本実験では mRNA として poly(U)RNA を使用し、de-tRNA^{Phe} で P-site を埋めたりボソームの A-site に [¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} を結合させ、tRNA の A-site への結合能を評価した。

10×70S binding buffer

500 mM Tris-HCl (pH 7.5)
65 mM MgCl₂
600 mM KCl
10 mM DTT
5 mM spermine

wash buffer / 1×70S binding buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
6.5 mM MgCl₂
60 mM KCl
1 mM DTT
0.5 mM spermine

P-site pre-filling mix

10×70S binding buffer	1 μL
70S ribosome	20 pmol
native <i>E. coli</i> de-tRNA ^{Phe}	40 pmol
(transcript de-tRNA の場合)	100 pmol)
2.5 mg/mL poly(U)RNA	2 μL

up to 10μL

↓ 37°C, 30 min

+

aa-tRNA mix

10×70S binding buffer	1 μL
native <i>E. coli</i> [¹⁴ C]Phe-tRNA ^{Phe}	3 / 15 pmol

up to 10μL (total volume 20 μL)

↓ 37°C, 15 min

反応終了後、氷上に置き、直ちにサンプリングマニホールド(Millipore)にセットしたニトロセルロースフィルター(0.45 μ M, ADVANTEC, A045B025A)にスポットした。氷冷した wash buffer 5 mL でフィルターを洗浄した後、よく乾燥させ、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。(Shimizu, Inoue et al. 2001; Kirino, Yasukawa et al. 2004)

iv) ペプチジル tRNA アナログのリボソーム P-site への結合能の測定

N-アセチル化した aa-tRNA (acaa-tRNA)はアミノ基がアミド結合となりアミノ基を失うため pep-tRNA のアナログとなることが知られている。pep-tRNA はリボソーム上では P-site に優先的に結合することが知られているため、この acaa-tRNA の各変異型リボソームの P-site への結合能を評価した(図 11)。別項で述べた方法で N-acaa-tRNA を調製し、反応に用いることとした。

10 \times 70S binding buffer	1 μ L
70S ribosome	12.5 pmol
native <i>E. coli</i> [14 C]AcPhe-tRNA ^{Phe}	2.5 pmol
2.5 mg/mL poly(U)RNA	1 μ L

up to 10 μ L

↓ 37°C, 15 min

on ice

+ 1 \times 70S binding buffer 10 μ L

前項の通り、氷冷して反応を停止させ、直ちにニトロセルロースフィルターにトラップし、洗浄して放射活性の測定を行った。

AcPhe-tRNA^{Phe}量は、リボソームに対して 1/5 と低濃度の条件を使用した。伸長の過程では、転座反応の直前には A-site に pep-tRNA が存在しうるため acaa-tRNA は A-site に入りうること、上記で調製した AcPhe-tRNA^{Phe}には de-tRNA^{Phe}が混在していることから、リボソームに対して tRNA 量が多いと P-site に de-tRNA (P/E state)、A-site に AcPhe-tRNA^{Phe} (A/P state)が結合する可能性が考えられたためである。

実際には、本実験では上述の 3 倍量の溶液を調製し、P-site への tRNA 結合と並行して、一部を下記のペプチド転移反応まで続けて反応させ、測定を行った。詳細は次項にて述べる。(Shimizu, Inoue et al. 2001; Kirino, Yasukawa et al. 2004)

v) ペプチド転移反応活性測定

リボソームによるペプチド転移反応の評価は puromycin 反応によって行った。pep-tRNA のアナログとして、上述のように acaa-tRNA を P-site に結合させた後、系に puromycin を加え、反応させた(図 11)。puromycin は aa-tRNA の 3'末端からアミノ酸にかけての構造に類似しており(図 11C)、リボソームの A-site の 50S 側に結合し、P-site に結合している acaa-tRNA と反応して、acetyl-aminoacyl-puromycin (acaa-puro)を生じる。生じた acaa-puro はリボソームから遊離するので、酢酸エチルにて抽出し、定量した。遊離の acaa も幾分酢酸エチル層に抽出されるため、バックグラウンド(BG)として puromycin を加えずに酢酸エチル抽出を行った分を差し引いた。

10×70S binding buffer	3 μ L
70S ribosome	37.5 pmol
native <i>E. coli</i> [14 C]AcPhe-tRNA ^{Phe}	7.5 pmol
2.5 mg/mL poly(U)RNA	3 μ L

up to 30 μ L

↓ 37°C, 15 min

この反応液を 10 μ L ずつに分注し、それぞれに以下の溶液を加えた。1 本あたり、acaa-tRNA 2.5 pmol、70S リボソーム 12.5 pmol となることは前項の通りである。

1. +(4 μ L 10mM puromycin, 1 μ L 10×70S binding buffer, 5 μ L milliQ): puromycin reaction
2. +10 μ L 1×70S binding buffer: BG for puromycin reaction
3. +10 μ L 1×70S binding buffer: P-site tRNA binding

3 については前項の通り、前項の通り、氷冷して反応を停止させ、直ちにニトロセルロースフィルターにトラップし、洗浄して放射活性の測定を行った。

1, 2 については、引き続き氷上に 2 hr 静置し、1 では終濃度 2 mM の puromycin により puromycin 反応を進行させた。

+20 μ L stop buffer [250 mg/mL MgSO₄, 0.3 M NaOAc (pH 5.5)]

+ 1 mL ethyl acetate

パラフィルムにて密封し、1 min 激しく攪拌した。15,000 rpm, 2 min 遠心した後、上層の酢酸エチル層から 700 μ L を分取し、Ultima Gold (PerkinElmer) 3 mL と十分に混合して液体シンチレーシ

シンカウンターで放射活性を測定した。この値に 1/0.7 を乗じることで、酢酸エチル 1 mL 中に抽出された放射活性を算出し、1 の値から 2 の BG を差し引いて、puromycin 反応によって生成した acaa-puro 量であるとした。(Shimizu, Inoue et al. 2001; Kirino, Yasukawa et al. 2004)

vi) puromycin 反応を用いた転座活性測定

転座反応の効率の評価を行うために、まず転座反応前の状態のリボソーム・mRNA・tRNAs pre-translocation complex を得る必要がある。これはペプチド転移反応が起こりかつ転座反応前の状態であるので、図 12 のように mRNA を結合させ、P-site に de-tRNA を、そして A-site に pep-tRNA アナログである acaa-tRNA を結合させることで調製出来る。この時、acaatRNA は A/P state と呼ばれる状態でリボソームに結合しており、この状態では puromycin に対して反応性は無い。この複合体に対して EF-G を加えると、転座反応が起こり、pep-tRNA は E-site へ、aa-tRNA は P-site へ移動する(post-translocation)。P-site にいる pep-tRNA は上述の puromycin 反応により検出出来る(Hanada, Suzuki et al. 2001; Kirino, Yasukawa et al. 2004)。WT と H38d22 を 1 本ずつ、反応を行う場合の条件を記す。まず、各種の反応液を調製する。

EF-G/GTP mix (1 サンプルに 3 μ L 使用)

10 \times 70S binding buffer	1 μ L
<i>E. coli</i> EF-G	200 / 100 pmol
20 mM GTP	3 μ L
PEP/PK mix	1.5 μ L

up to 10 μ L

※PEP/PK mix: 100 mM phosphoenol pyruvic acid : pyruvate kinase = 19 : 1 の混合液。

↓ 37°C, 15 min (GDP form EF-G → GTP form EF-G)

ribosome solution

10 \times 70S binding buffer	2.5 μ L
70S ribosome	25 / 12.5 pmol

up to 25 μ L

mRNA solution

10×70S binding buffer	1.25 μL
2.5 mg/mL poly(U)	0~12.5 μL
または mRNA32#	0~125 pmol

up to 12.5 μL

de-tRNA solution

10×70S binding buffer	1.25 μL
native <i>E. coli</i> de-tRNA	0~125 pmol

up to 12.5 μL

AcPhe-tRNA solution

10×70S binding buffer	2 μL
native <i>E. coli</i> [¹⁴ C]AcPhe-tRNA ^{Phe}	37.5 / 62.5 / 18.75 pmol

up to 25 μL

下記の手順で反応させ、pre-translocation complex を得た。

ribosome solution	25 μL each
↓ 37°C, 10 min	
+mRNA solution	6.25 μL each
↓ 37°C, 6 min	
+ de-tRNA solution	6.25 μL each
↓ 37°C, 10 min	
+ AcPhe-tRNA solution	12.5 μL each
↓ 37°C, 20 min	
↓ on ice, 15 min	
↓ @r.t., 5 min	

10 μL ずつに 5 等分し、それぞれに対して以下の溶液を加えた後、操作を行った。

1. +(4 μ L 10 mM puromycin, 1 μ L 10 \times 70S binding buffer, 5 μ L milliQ) \rightarrow on ice: time 0 for translocation
2. +10 μ L 1 \times 70S binding buffer \rightarrow on ice: BG for puromycin reaction
3. +3 μ L EF-G mix \rightarrow 37 $^{\circ}$ C, 20 min: translocation
4. +3 μ L 1 \times 70S binding buffer \rightarrow 37 $^{\circ}$ C, 20 min: negative control in translocation
5. +10 μ L 1 \times 70S binding buffer: A-site tRNA binding

5 については前項の通り、氷冷して反応を停止させ、直ちにニトロセルロースフィルターにトランプし、洗浄して放射活性の測定を行った。

1, 2 については氷上にて puromycin 反応を 2 hr 進行させてから上述の stop buffer で反応を停止した。3, 4 については、引き続き、

+(4 μ L 10mM puromycin, 0.7 μ L 10 \times 70S binding buffer, 2.3 μ L milliQ) \rightarrow on ice, 2hr \rightarrow stop

を行って、puromycin 反応を 2 hr 進行させてから停止した。1, 3 において、puromycin は終濃度 2 mM となる。1~4 については stop buffer を加えた後、前項の puromycin 反応同様、酢酸エチル抽出を行い、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。この値に 1/0.7 を乗じることで、酢酸エチル 1 mL 中に抽出された放射活性を算出し、4 を陰性対照として、EF-G の有無で起こった puromycin 反応の差(3-4)から転座反応の進行を比較した。

vii) primer extension 法を用いた転座反応活性測定

この系では、mRNA の下流の配列と相補的な DNA をプライマーにして逆転写酵素によって DNA 鎖を伸長させる(図 12)。酵素はリボソームにぶつかると止まり、逆転写反応はそれ以上進まない。従って、転座反応の前後では 1 コドン分長さの異なる断片が得られる。この cDNA を電気泳動すると転座反応の前と比べ、後では転座反応により 1 コドン分短い断片が出る。この量を経時的に比較して転座反応の活性を評価した(Joseph and Noller 1998; Phelps, Jerinic et al. 2002; Phelps, Malkiewicz et al. 2004)。

リボソーム P-site に結合させた tRNA アナログ ASL6^{Phe} との T4 gene 32 mRNA の一部、mRNA の下流に結合するプライマーの配列を示す。四角で囲んだ部分が 16S rRNA と相補的に結合する SD 配列(Shine-Dalgarno 配列)に当たる。また、P-site に入る“AUG”コドンを太字、グレー、A-site に入る“UUU”コドンと対応するアンチコドンを太字で示した。

ASL6^{Phe} (Yeast tRNA anticodon stem loop, 6 bp):

5' -ggcagacug**aa**gaucugcc-3'

T4 gene 32 mRNA (-57~+85):

5' -...AAAUUAAAAAAAAAAGGA⁺AAUAAAAAUGUUUAAACGUAAAUCUACUGCUGAACUC...-3'

AL2 primer (20 nt): 5' - [³²P] acactcacagttttctcttt-3'

translocation buffer

80 mM K-cacodylate (pH 7.2)

20 mM MgCl₂

150 mM NH₄Cl

3 mM 2-ME

前項の転座反応測定系と同様、「EF-G+GTP」、「リボソーム」、「gene 32 mRNA+ AL2 primer」、「*E. coli* de-tRNA_f^{Met}」、「ASL6^{Phe}」の反応液をそれぞれ上記の組成で調製した。

最終的に以下の濃度となるように、文献(Phelps, Jerinic et al. 2002; Phelps, Malkiewicz et al. 2004)に記載の手順で反応させ、リボソーム・designed mRNA・de-tRNA^{Met}・ASL6^{Phe}の pre-translocation complex を得た。

70S ribosome 0.4 μM

mRNA 0.8 μM

E. coli de-tRNA_f^{Met} 0.8 μM

anticodon stem loop (ASL)6^{Phe} 6 μM

E. coli EF-G 0.08 / 2 μM

GTP 300 μM

up to 25 μL

ribosome solution

↓ 37°C, 10 min

+mRNA mix

↓ 37°C, 6 min

+ de-tRNA solution

↓ 37°C, 10 min
+ ASL6^{Phe} solution
↓ 37°C, 30 min
↓ on ice, 20 min
↓ @r.t., 10 min

液量が 25 μ L となるように EF-G/GTP mix を反応液に加え、室温で転座反応を進行させた。EF-G/GTP mix を加える前を対照(control)とし、以降、30 sec、2 min、5 min、10 min、30 min、60 min で 2 μ L ずつ反応液を分取し、氷上において反応を止めた。この反応液に下記の組成となるようにして AMV-reverse transcriptase を加え、37°C, 10 min の primer extension 反応を行った。

reverse transcription buffer

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

10 mM MgO(Ac)₂

60 mM NH₄Cl

6 mM 2-ME

375 μ M dNTP

translocation mix 2 μ L

AMV-RTase 1 U

up to 10 μ L

反応液を 10% denaturing PAGE にて分離し、プライマーの放射活性をオートラジオグラフィーで検出し、phosphorImager (Molecular Dynamics)でゲル上のバンドの強度を定量した。転座反応の起こっていないバンドと起こったバンドでの強度の和を 100%とし、転座反応の起こったバンドの割合を算出した。3回独立に行った。

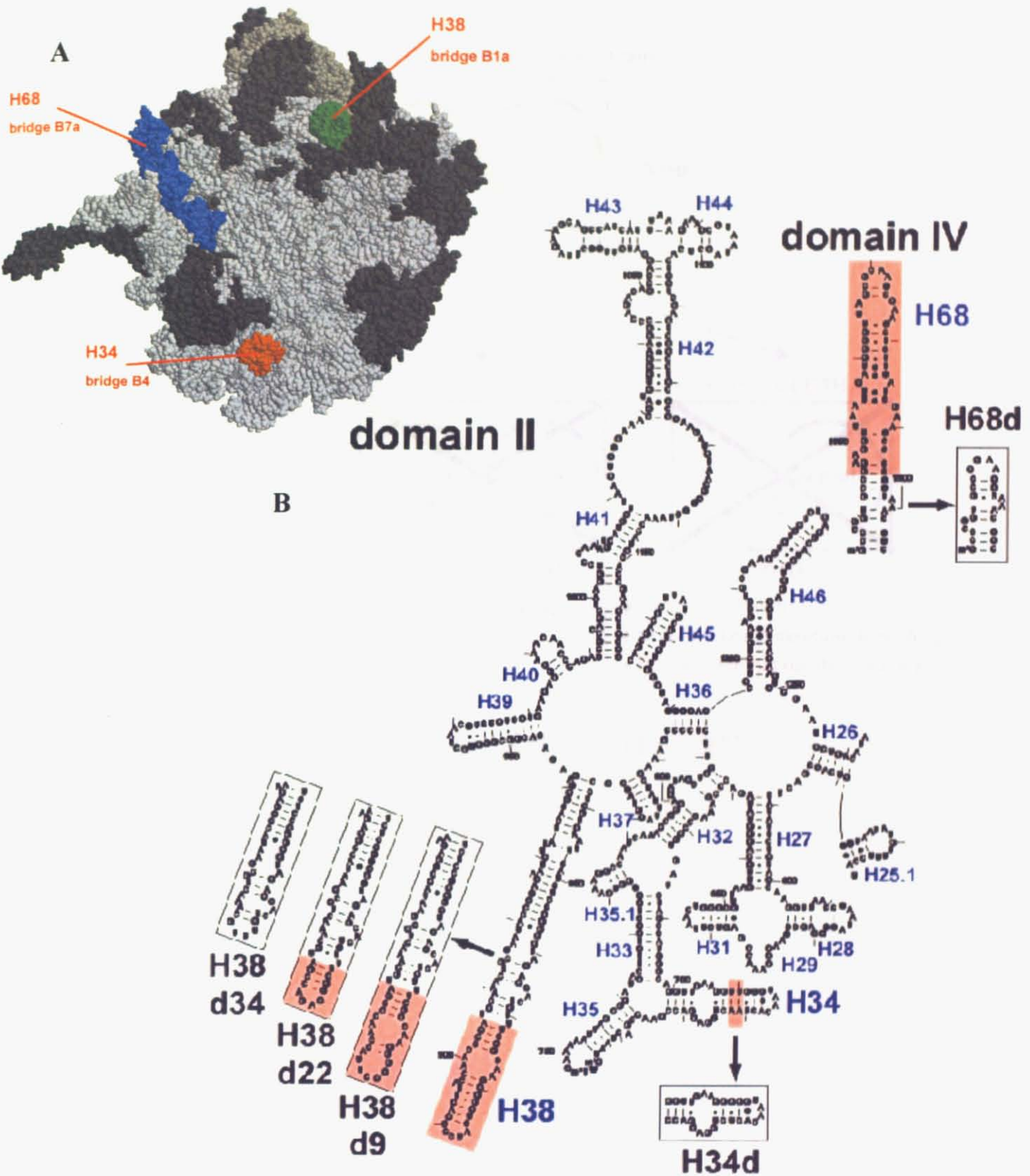


Figure 7 23S rRNA に導入した変異の箇所。

A. *E. coli* リボソームの三次構造(Schuwirth, Borovinskaya et al. 2005)上での H38(黄緑)、H34(橙)、H68(青)の位置を示した。薄紫: 23S rRNA; グレー: 5S rRNA; 濃いグレー: リボソーム蛋白質。

B. *E. coli* 23S rRNA のドメイン II の二次構造上での H38、H34、ドメイン IV にある H68 での欠失部位を示した。

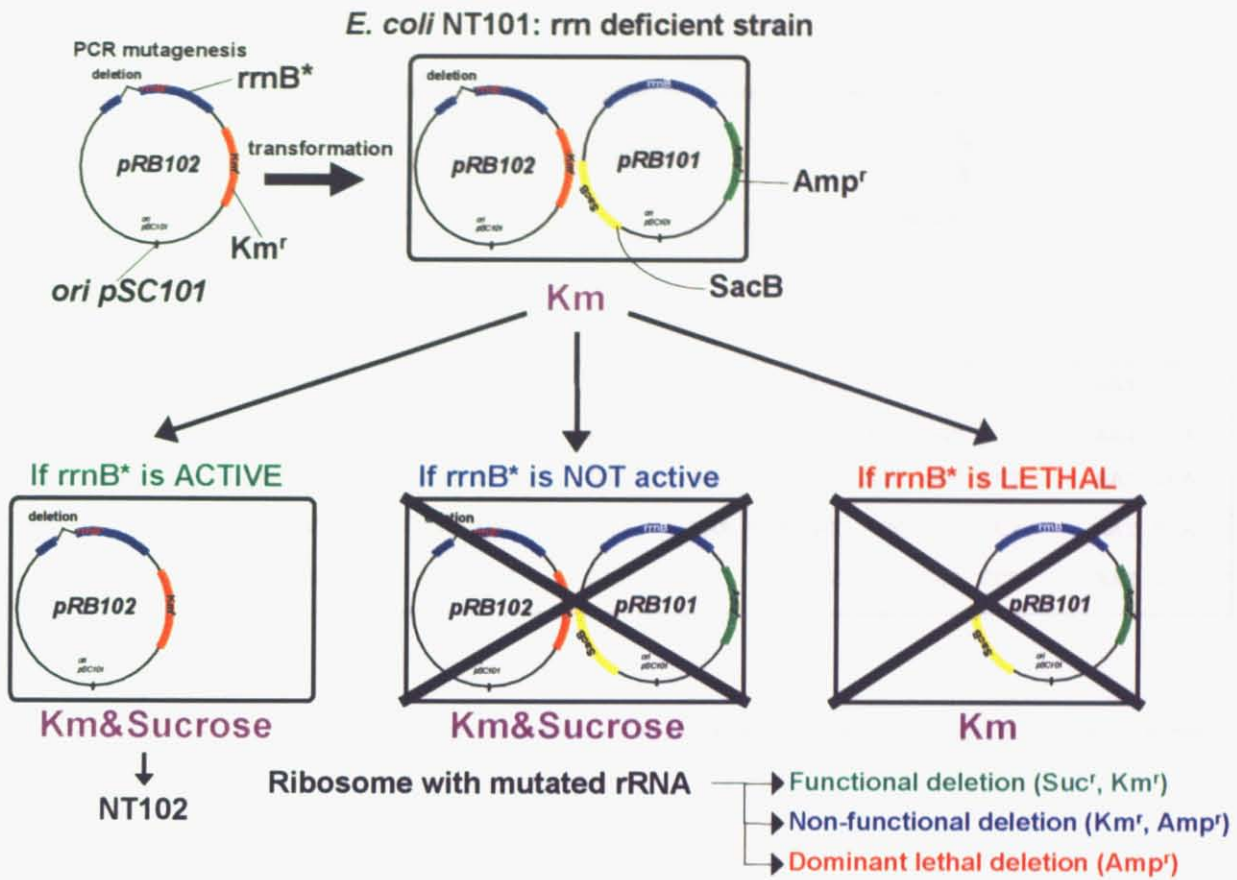
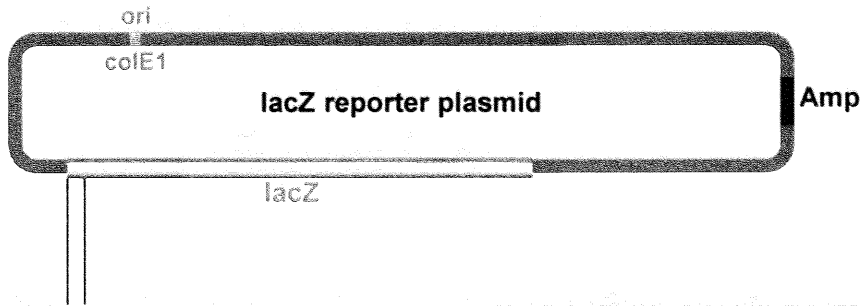


Figure 8 変異型 rRNA 遺伝子のみを持つ大腸菌株の構築と選択方法。



WT	WT	ATA ATG AAA AGC TTA GAT TGG GGT AAG GGC CCT AAT TCA
p240	-1	ATA ATG AAA AGC TTT AAC GTG TA GGT AGC GGC AAT TCA
plac7	+1	ATA ATG AAA AGC TTT GTG T AGG GTT AGC GGC CCT AAT TCA
p415	TGA	ATA ATG AAA AGC TTT GTG AAA TGA GCC AGC GGC CCT AAT TCA
p12-6	TAG	ATA ATG AAA AGC TTT GTT TAG GGC GGC CCT AAT TCA

<Reporter plasmid series (WT, p240, plac7, p415 p12-6)-gift from Dr. M. O'connor>

Figure 9 翻訳精度測定用プラスミド。

翻訳精度の測定のために用いたβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を持つプラスミドの配列を示す。-1 フレームシフト、+1 フレームシフト、TGA リードスルー、TAG リードスルーが起きないと活性のある全長の遺伝子が翻訳されない。

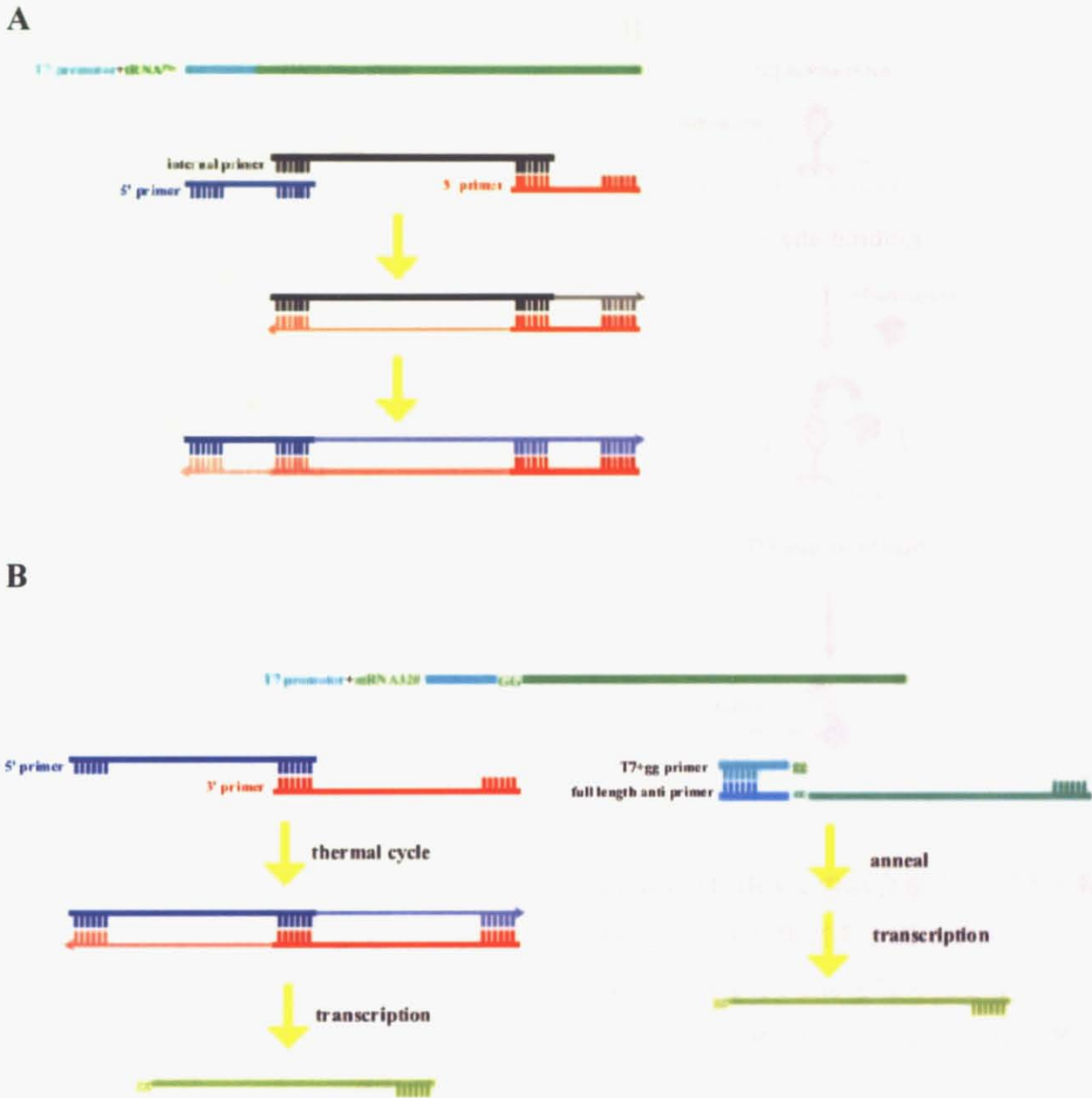


Figure 10 tRNA と mRNA の鋳型 DNA の合成方法。

A. 3本のプライマーをデザインし、熱サイクルにかけて T7 ポリメラーゼ認識配列と tRNA^{Phe} を繋いだ配列の DNA 断片を得た。これを鋳型として転写反応を行った。

B. mRNA の鋳型を得るために 2つの方法を検討した。各々 2種類ずつプライマーをデザインし、熱サイクルで 2本鎖の鋳型 DNA を調製(左)、またはアニーリングで一部 1本鎖の剥き出しになった鋳型 DNA を調製(右)した。

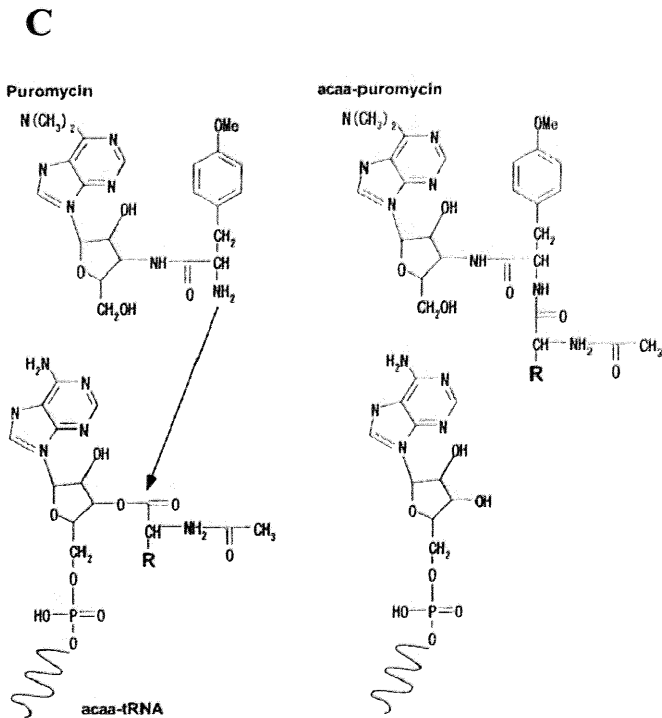
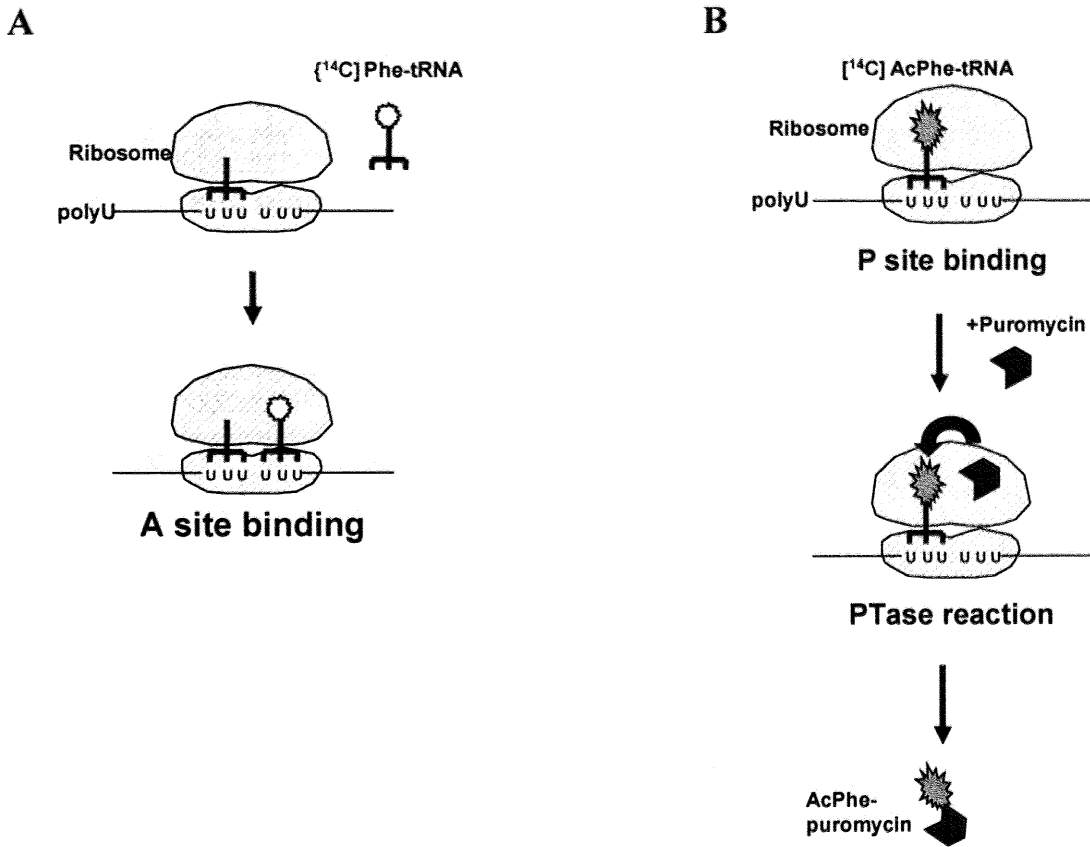


Figure 11 tRNA の結合能とペプチド転移反応活性の測定系を図に示す。

A. de-tRNA で P site を埋めたリボソームに対し、aa-tRNA の A-site への結合量を測定した。

B. pep-tRNA アナログである acaa-tRNA の P-site への結合量を測定した。その後、aa-tRNA アナログである puromycin を系に加え、遊離した acaa-puro を測定した。

C. Puromycin は図のようにアデノシンとアミノ酸が結合した aa-tRNA の末端のような構造を持つ。A-site に puromycin が入ると tRNA のアデノシンとペプチドの間の結合を攻撃し、新たなペプチド結合を作り、リボソームから遊離する。

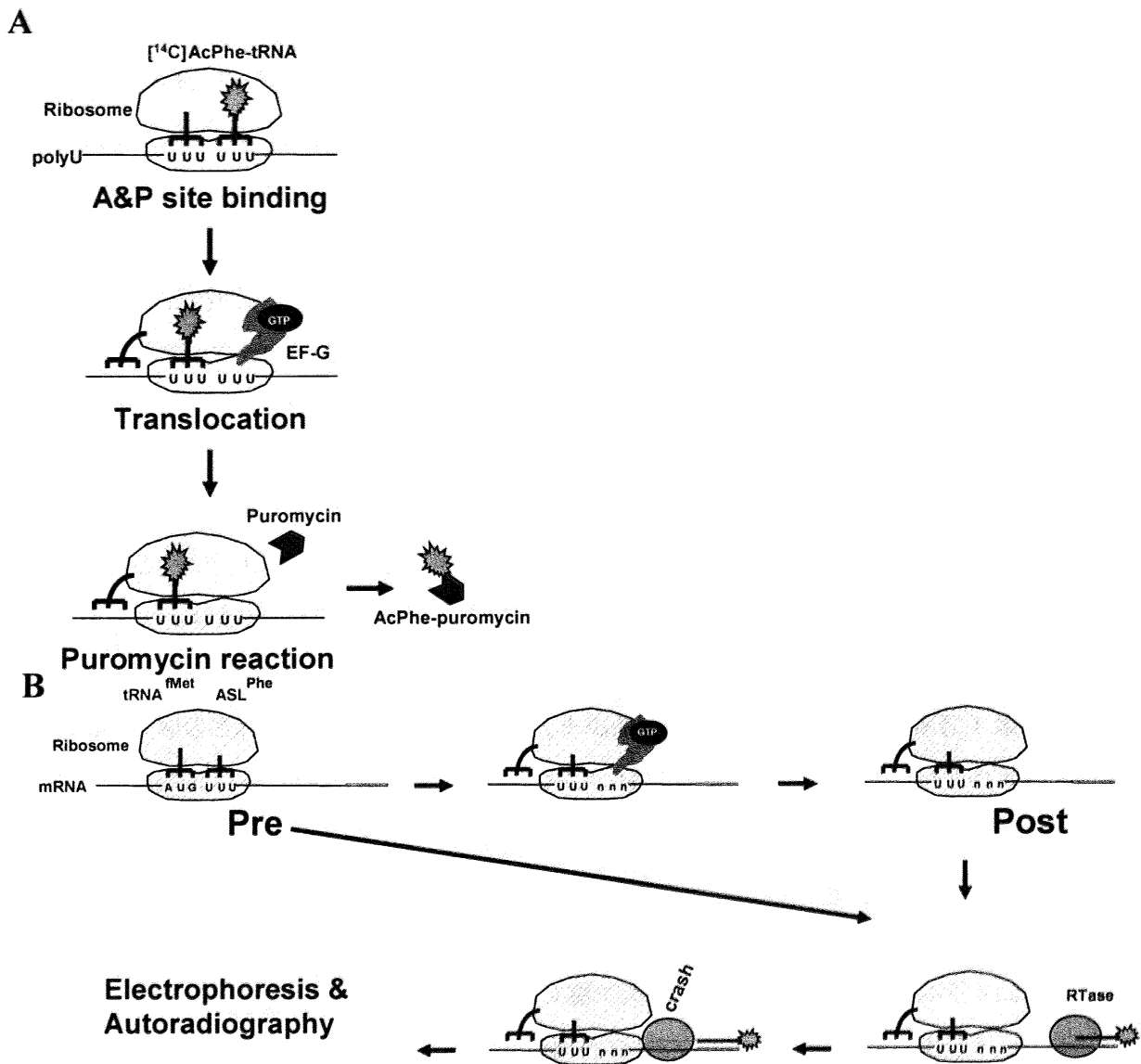


Figure 12 転座反応活性測定系の模式図。

A. 転座反応前の pre-translocation complex は puromycin と反応しないため、転座反応を起こした post-translocation complex のみ検出される。

B. primer extension 法により検出すると、Pre(転座反応前)と Post(転座反応後)で1コドン分長さが異なる断片が得られる。

III-2. 結果

《1》変異 *rrnB* 遺伝子のみを持つ大腸菌株の構築

23S rRNA 上の H38/ASF の機能的な重要性を解析するために、まず、7つ全てのゲノム上の rRNA オペロンを欠き、rRNA 遺伝子 *rrnB* 及び培地中のショ糖から毒性物質を作る *sacB* を持つプラスミド pRB101(ampicillin マーカー)でレスキューした *E. coli* NT101 株を用いた(Sato, Hirabayashi et al. 2006)。bridge を構成するヘリックスの短縮化操作は、*rrnB* を含み、pRB101 と同一の複製開始点と異なる選択マーカー(kanamycin)を持つ pRB102 に対して行った。bridge B1a を構成する H38/ASF、bridge B4 を構成する H34、bridge B7a を構成する H68 とする 23S rRNA 上のヘリックスについて、bridge の相互作用が出来ないように短縮化した変異型リボソームを構築した。H38/ASF については、ループの先端を中心に 26 塩基(Δ 876-901)短縮化し、両端を GAGA ループで繋ぐことで H38d22 変異体を得た。また、H38 を段階的に短縮化して比較を行うため、9 塩基欠失した H38d9(Δ 884-892)と、34 塩基欠失した H38d34(Δ 876-901)もそれぞれ構築した。本論文の執筆中に、Dontsova らのグループにより 34 塩基短縮化した H38/ASF 欠失変異体(Δ 872-905) (Sergiev, Kiparisov et al. 2005) についての研究が報告された。これは H38d34 と欠失塩基数が同一である上に位置も 1 塩基ずれていただけで非常に近かったため、本論文では、構築した H38 変異体の表現型についての考察の他に、H38d34 で得られた結果と Dontsova らの結果の関係についても考察したい。

H34 を短縮化した H34d と H68 を短縮化した H68d を対照として用いた。H34 は 4 塩基短縮化し(Δ 709-710,721-722)、H68 は 47 塩基欠失させた(Δ 1852-1898)。NT101 にこれらの変異遺伝子を持つプラスミド pBR102 を導入し、kanamycin とショ糖で選択した。各変異型プラスミドはレスキュープラスミドである pBR101 と置換され、ショ糖耐性で ampicillin 感受性の株を生じた。こうして得られた株は短縮化した rRNA を持つリボソームのみによって生存出来る。このことは、これらの bridge を構成するヘリックスの欠失は、最低限のリボソームの機能を失わせるものではなかったことを意味している。

次に、H38d22 や他の株の成長速度を測定した(表 1, 図 13)。倍化時間から判断すると、それぞれのヘリックスの欠失は成長速度にある程度の影響を及ぼすことが観察された。表に示すように H38d9、H38d22 の場合は僅かな影響しか受けていない([H38d9]= 54.3 min, [H38d22]=58.6 min, 野生型[WT]=52.1 min)一方で、H68d の成長速度は著しく低下していた(108 min)。H38d34 と H34 ではこれらの中程度の成長速度の低下が観察された([H38d34]=65.0, [H34]=61.7 min)。従って、これらのサブユニット間 bridge への変異はリボソームの機能を低下させていると言え、これらの bridge が何かしらの機能的な役割を担うことを示唆している。

《2》In vivo での翻訳精度の測定

H38 は A-site tRNA と直接相互作用しているため、H38 の短縮化が mRNA の遺伝暗号解読の精

度に及ぼす影響を確認した。翻訳の精度の測定は、1塩基欠失、1塩基挿入、または終止コドンを組み込んだ β -ガラクトシダーゼ mRNA を用いて各変異型リボソームがこれらの mRNA から活性を持つ β -ガラクトシダーゼ蛋白質を翻訳する活性を測定した。すなわち、H38短縮化リボソームを有する株に、N末端近辺に1塩基欠失、1塩基挿入、中途終止コドン(UGA、UAG)を持つ β -ガラクトシダーゼを持つレポータープラスミドを導入した。この際、リードスルーを起こしやすい大腸菌株(error-prone [EP], 16S rRNA に C912G/G885U 変異を持つ(Lodmell and Dahlberg 1997))を UGA、UAG リードスルーの陽性対照として、またフレームシフトを引き起こしやすくなる株(high fidelity [HF], C912G/G888U(Lodmell and Dahlberg 1997))を-1、+1 フレームシフトの陽性対照として用いた。表 2 に示すように、EP では WT よりリードスルーが起こりやすく、HP はフレームシフト、特に+1 フレームシフトの頻度の上昇が見られ、反応系として適切であった。H38 変異株ではいずれも WT に比べ、+1 フレームシフト頻度の上昇が見られた。特に、H38d22 では H38d9 と H38d34 よりさらに高い頻度で観察された。しかし、H38d22、H38d9、H38d34 いずれも-1 フレームシフト、UGA リードスルー、UAG リードスルーについては WT と有意な差は観察出来なかった。以上の結果から、この実験系では、H38 短縮化は+1 フレームシフトの上昇を引き起こすと結論付けられる。

《3》 菌体からのリボソームの調製とサブユニット会合能

変異株の持つ変異型リボソームを細胞から精製するために、 $OD_{600}=0.5\sim 0.8$ で菌体を回収したところ、1 L の培養液から約 2 g の菌体を得られ、2 g の菌体から、約 700 ODunit の crude リボソームが得られた。ショ糖密度勾配(SDG)遠心法により分離し、分画してフラクション毎の UV_{260} を定量したところ、図 14 のように、30S サブユニット、50S サブユニット、70S リボソームの 3 つのピークが得られた。

70S リボソームを調製する際の SDG 法は 6 mM のマグネシウム濃度で行うのが定法であるが、会合能の低下した変異型リボソームもあったので、条件を揃えるため、より会合しやすい 10 mM Mg^{2+} の条件を採用した。WT リボソームの場合には、この条件で会合していないサブユニットは正常な活性を持たないと見なすが、変異型リボソームでは、変異により会合能が低下して、会合出来ないサブユニットも含まれる。これらのフラクションのうち、70S リボソームとして会合している部分を回収し、以降の *in vitro* の反応に使用した。収率は、 OD_{260} で換算して 50%程度であった。

また、SDG 法により得られた波形から、リボソームのサブユニット会合能を測定した(表 3, 図 14)。会合率は 70S リボソームと遊離の 50S サブユニットの量から求めた。10 mM Mg^{2+} 条件下では、WT の 71%の 50S サブユニットが tight-coupled(TC) 70S に取り込まれている。H38d22 (70%) と H38d9 (68%)、H38d34 (67%)は WT と同等の会合率を示した。対照的に、H34d と H68d はそれぞれ

れ 40%、54%と、WT より会合率が低かった。従って、H68d 変異株の成長速度の極端な減速はこの株のリボソームのサブユニット会合が弱くなったことに起因する可能性がある。以上の H38 短縮化リボソームについての結果から、H38 を短くして bridge B1a を破壊しても、サブユニット会合には影響が無いと言える。

《4》 In vitro での活性測定

in vitro での H38 短縮化リボソームの活性を測定するために、以下の 4 つの実験を行った。

i) ポリウリジン RNA 依存ポリフェニルアラニンペプチド合成反応

EF-G による転座反応の間、bridge B1a の相互作用は切られ、H38 と S13 の相対的な向き、位置は大きく変わる(Valle, Zavialov et al. 2003)。H38 の翻訳における機能をさらに評価するため、H38 短縮化リボソーム H38d22 について様々な EF-G 濃度下で in vitro 翻訳反応を行った(0-125 nM)。この反応に用いた^[14C]Phe-tRNA は、tRNA mixture をアミノアシル化して得たが、アミノアシル化効率は 20 pmol / IOD₂₆₀ unit 程度で、de-tRNA やコールドの aa-tRNA を含むが、翻訳反応には支障が無いことが知られている。

幾つか EF-G 濃度の条件を変えて行った in vitro ポリウリジン RNA 依存ポリフェニルアラニン [poly(U)-poly(Phe)]合成反応の速度を図 15A にプロットした。その結果、H38d22 リボソームは低 EF-G 濃度下においてのみ、WT より高い poly(U)-poly(Phe)合成活性を示すことが分かった。一方、H34d、H68d リボソームは広範囲の EF-G 濃度において、WT より低い活性しか持たなかった。より高濃度の EF-G を反応系に加えると(200~600 nM)、H38d22 と WT は同様な翻訳活性を示した(図 15B, C)。さらに、十分量の EF-G (600 nM)を加え、EF-Tu 濃度を変化させて poly(U)-poly(Phe)合成反応を行うと(図 15B)、H38d22 は WT と同様の挙動を示した。次に H38 について、H38d22 の他に、H38d9、H38d34 についても poly(U)-poly(Phe)合成反応を行った。図 16 に反応のタイムコースを示したが、H38d9 や H38d34 についても H38d22 程ではないが、低 EF-G 濃度下で WT より高い翻訳活性を持つことが確認出来た。以上から、長さによって差はあるが、H38 の短縮化は低 EF-G 濃度下での翻訳活性を上昇させると言える。

ii) リボソームによる EF-G/GTPase 活性化反応

EF-G の GTPase 活性は空のリボソームによって高度に充進されることが知られている(Conway and Lipmann 1964; Rodnina, Savelsbergh et al. 1997)。そこで、各変異リボソームによる EF-G/GTPase 活性充進能について比較を行った。図 17A に示すように、GTPase 反応は H38d22 短縮化リボソームによって WT より効率的に活性化された。一方で、H34d、H68d 変異リボソームは WT と同様の GTPase 活性化能を示した。次に、他の H38 短縮化リボソームについても同様に GTPase 活性化

能を比較したところ(図 17B)、H38d34 では H38d22 と同様に WT より高い活性化能を持つことが確認出来た。しかし、H38d9 については WT より活性化の程度が低いと言う現象が観察された。

iii) tRNA の A-site、P-site への結合能とペプチド転移反応活性

H38 短縮化リボソームでの高い翻訳活性は低 EF-G 濃度下でしか観察されなかったため、さらに伸長過程を素過程に分けてシングルラウンドでの活性の比較を行うこととした。ここで、in vitro 翻訳反応である poly(U)-poly(Phe)反応には市販の tRNA mixture (Boehringer Mannheim)を反応させた [¹⁴C]Phe-tRNA を用いたが、伸長の各素過程を評価する際には、混合物ではない tRNA を用いることとした。当初、in vitro の転写反応により tRNA を得ようと考え、合成条件の検討を行った。合成のプライマーを 3 本デザインしアニールさせて熱サイクルをかけることにより、T7 RNA ポリメラーゼ認識配列と tRNA 配列を繋げた DNA の 2 本鎖を得た。CCA 末端を含む DNA 鎖を転写して得た断片と、CCA 末端の無い DNA 鎖を用いた転写反応に CCA enzyme を加えて末端を付加した断片を比較した。前者では転写の末端まで均一に合成されない可能性があるが、後者の反応系では酵素により均一な末端の断片を得やすいと考えた。

DNA 合成反応では 100 μL×30 本の反応液の精製に対し QIAGEN-tip 20 (QIAGEN)を 2 本用いることが適していた。精製すると、0.5 OD₂₆₀ unit 程度の単一バンドの 2 本鎖 DNA が安定的に得られた。これを用いて転写反応を行い、1×TBE 10% UREA PAGE にて泳動したゲルから切り出した。泳動結果を図 18A に示す。切り出し後のエタノール沈殿においては、1~1.5/10 量のグリコーゲンを加えることにより収量が向上し、1 mL×30 本から 20 OD₂₆₀ unit 程度の tRNA が得られた。全長の DNA を用いた場合は長めの 2 本のバンドと短い 1 本が見られ、末端が不均一であることが分かった。下のバンドを排除してゲルから切り出すことで精製を行った。CCA 末端を持たない DNA から転写した産物は、CCA enzyme を入れた反応液と入れていない反応液との間でバンドの位置がシフトしており(図 18A)、CCA enzyme により末端が付加されていることは確認出来たが、バンド全体が広がっており、個々の nt 長のバンドとして分離出来なかった。そこで、バンドの上半分と下半分を分けてゲルから切り出して精製を行った。これらにつきアミノアシル化効率を比較した(表 4)。全長 DNA から転写して得た tRNA ではアミノアシル化効率は 15%強、CCA 末端を欠く断片から CCA enzyme と共に転写して得た tRNA では 10%程度と、バンドの上下を分けないとかえって低くなってしまったが、切り出しでこのバンドを上下に分けると、上側のバンドで 40%まで効率が上昇した(表 4)。しかし、いずれの転写 tRNA もアミノアシル化活性が低く、素過程を評価する際には de-tRNA の持ち込みによりリボソームへの結合の競合が起こるためアッセイに用いるには不適切であったことから、大腸菌から精製した native の tRNA を用いることとした。native tRNA を用いた場合のアミノアシル化効率は 70~75%程度(表 4)で、アッセイに適していた。こうして得た Phe-tRNA^{Phe}の一部を pep-tRNA アナログとして使用するため、Phe の N 末をアセチル化し

て N-AcPhe-tRNA^{Phe} を得た。NH₃ 処理により tRNA から AcPhe を遊離させ、TLC によりアセチル化効率を確認したところ、Phe は残っておらず、アセチル化は 100% 進行していた(図 18B)。

こうして調製した試料を用いて、伸長過程を素過程に分けてシングルラウンドでの活性の比較を行うことにした。伸長過程の転座反応以外の素過程 (tRNA の結合能、ペプチド転移反応活性) について、WT と H38d22 リボソームの比較を行った。酵素非依存条件下で Phe-tRNA^{Phe} をリボソームの A-site に結合させたところ、図 19A に示すように、Phe-tRNA^{Phe} の A-site への結合能は WT と H38d22 との間で違いが無かった。

次に、同様にペプチドアナログ、アセチルフェニルアラニン(AcPhe)を結合した tRNA^{Phe} を用い、WT と H38d22 各リボソームへの acetyl-phenylalanyl (AcPhe)-tRNA^{Phe} の結合を比較したところ、両者は P-site への結合能についても差が無かった(図 19B)。

さらに、この P-site に AcPhe-tRNA^{Phe} が結合したリボソームを含む反応系に puromycin を加え、ペプチド転移反応を起こさせることにより、H38d22 のペプチド転移反応活性を評価した。リボソーム上の tRNA の末端に結合していたアセチルフェニルアラニンはこの反応によって、アセチルフェニルアラニル puromycin (AcPhe-puromycin) となり、リボソームから遊離する。この遊離した AcPhe-puromycin の量を比較したところ、WT と H38d22 の間で puromycin への反応性に差は見られなかった(図 19B)。

これらの結果から、H38d22 が tRNA 結合やペプチド転移反応の活性については WT と同様であることを明らかになった。

vi) 転座活性測定

H38 短縮化リボソームでの高い翻訳活性は低 EF-G 濃度下でしか観察されなかったため、シングルラウンドの転座反応系を用いて、H38 短縮化リボソームの転座反応活性を評価することとした。

転座反応を評価するためには AcPhe-tRNA を A/P state に結合させることによりペプチド転移反応が起きた直後の状態、つまりリボソーム・mRNA・pep-tRNA complex を調製する必要がある。aca-tRNA は そのままでは P-site に優先的に結合するので、まずリボソームに対して十分量の de-tRNA^{Phe} を加えて P-site に結合させた。この系に AcPhe-tRNA^{Phe} を加え、A-site に結合させた。この溶液に対し、EF-G を加え、37°C で転座反応を進行させた。比較のために、1×binding buffer を加えて同様に 37°C に置き、両者の差分を転座反応活性とした。反応条件検討を行った結果、AcPhe-tRNA^{Phe} の A-site への結合について、

- ・ poly(U)濃度の変化は広い範囲で差が見られない
- ・ AcPhe-tRNA^{Phe} 量の増加により結合量が増加する
- ・ de-tRNA^{Phe} 量を増やすと結合量が低下する

と言う現象が確認出来た。また、転座反応活性についても、

- ・ AcPhe-tRNA^{Phe} 量を増やすと増加する
- ・ EF-G 量を増やすと増加する

と言うことが確認出来た。しかし、

- ・ de-tRNA^{Phe} 量の増加はリボソームへの結合には拮抗的に働くが、転座反応活性に対しては影響を及ぼさなかった
- ・ AcPhe-tRNA^{Phe} の A-site への結合量は条件によって変わりやすく、定量的な結果は得られなかった
- ・ 転座反応は puromycin を加えない BG が非常に高く、また安定しなかった(図 21A)

等、難しい点もあった。

この系で WT と H38d22 の転座反応活性を比較したところ(図 21A, B)、H38d22 が WT より高い活性を持つ傾向が観察されたことから、定性的には H38d22 は WT より転座反応活性が高いと考えられたが、上記の問題点により、定量的な結果を得られなかった。

そこで反応系を改善するために、より native に近い条件で反応を行うことを考え、poly(U)RNA でなく、SD 配列を持つ mRNA を用いて、P-site には de-tRNA_f^{Met} を結合させる方法を検討した。下記の primer extension 法で用いる mRNA32 をデザインのベースとしたが、配列中に長い A の連続があるため、熱サイクルで伸長する定法により全長 2 本鎖の鋳型 DNA を得るのは難しい可能性があったことから、アンチセンス側の T7 ポリメラーゼ認識配列を含む全長の DNA と、センス側の T7 ポリメラーゼ認識配列と転写開始末端までの DNA をアニーリングさせ転写反応の鋳型とする方法を併せて試みた。図 20A に示すように、前者の方法では複数のバンドが見られる条件が多かった。後者では、2 本鎖 DNA よりやや下の位置に 1 本のバンドが見え、アニーリングが起きていることが期待出来た。そこで、10 pmol primers, 10 cycles での熱サイクル反応から得た単一バンドの 2 本鎖 DNA と、アニーリングで得た DNA を鋳型として、2 種類の組成で転写反応を行ったところ、バッファ B の反応ではいずれもスミアでないバンドが得られた。tRNA は AcPhe-tRNA 調製に用いるが、Tris-HCl はアセチル化反応を阻害するため、tRNA の転写についてはバッファ B の組成を検討しなかった。バッファ B の反応では 2 種類の鋳型で差が見られなかったので(図 20B)、配列中の A の連続に配慮し、大量調製にはアニーリングで得た鋳型をバッファ B で転写することとした。大量調製し、精製して得られた mRNA32#は図 18C のように広いバンドになっていたが、これは転写における 3'末端の不均一に因ると考えられた。tRNA と異なり、3'末端の不均一は問題とならないと考えて、これを転座反応に用いた。

しかし mRNA を用いたこの系では、EF-G を加えた反応液と加えない反応液とでの差は非常に小さく、また、puromycin で検出する反応系でありながら、puromycin を加えなくとも高い BG が観察された(図 22A)。mRNA、EF-G いずれかを系に加えない場合と比べ、双方が存在すると確か

に転座反応は進行したが、濃度の変化による影響は評価出来なかった(図 22B)。このため、この系により転座反応を評価することを断念し、別の転座反応の評価系を持つ研究室と共同研究を行い、評価することにした。

転座反応活性について、primer extension 反応を用いた測定を行った。このアッセイでは、SD 配列を持ち P-site に Met コドン、A-site に Phe コドンが配置される mRNA を、リボソームに結合させる。この complex に deacyl-tRNA_f^{Met} を加え P-site に結合させた後、A-site に tRNA アナログとして、クローバー様の構造の内、アンチコドンを含むアンチコドンステムループ部分のみの RNA 断片 ASL6^{Phe} を結合させた。ここに EF-G を加えて転座反応を進行させた。mRNA の下流に相補的に結合するプライマーを用いて転座反応前後の反応液で primer extension 反応を起こさせ、リボソームとプライマーの距離を測定した。図 23 に示すように、低 EF-G 濃度下(図 23A)、高 EF-G 濃度下(図 23B)の両条件において、H38d22、H38d34 とともに、野生型リボソームより効率的に転座反応が進行した。全てのリボソームにおいて EF-G 濃度の上昇に応じて初速は増加したが(図 23B)、2 つの H38 短縮化リボソームが WT より高い活性を持つことは変わらなかった。poly(U)-poly(Phe)合成での結果(図 15, 16)と考え合わせると、野生型リボソームにおける H38/ASF は、制御しているのではないかと考えられる。

以上の結果から、H38 短縮化リボソームは EF-G とリボソームの相互作用を促進しており、H38 の短縮化がシングルラウンドでの転座反応を促進していることが明らかとなった。一方で、サブユニットの会合能、tRNA の結合能やペプチド転移反応活性と言った伸長反応の他の素過程には WT と差が見られなかった。また、ヘリックス 38 の短縮化は+1 フレームシフトの頻度を上昇させることが明らかとなった。これらのことから、WT における H38/ASF と bridge B1a は転座反応における EF-G のターンオーバーを負に制御し、遺伝暗号の読み枠の維持に寄与していると考えられる。

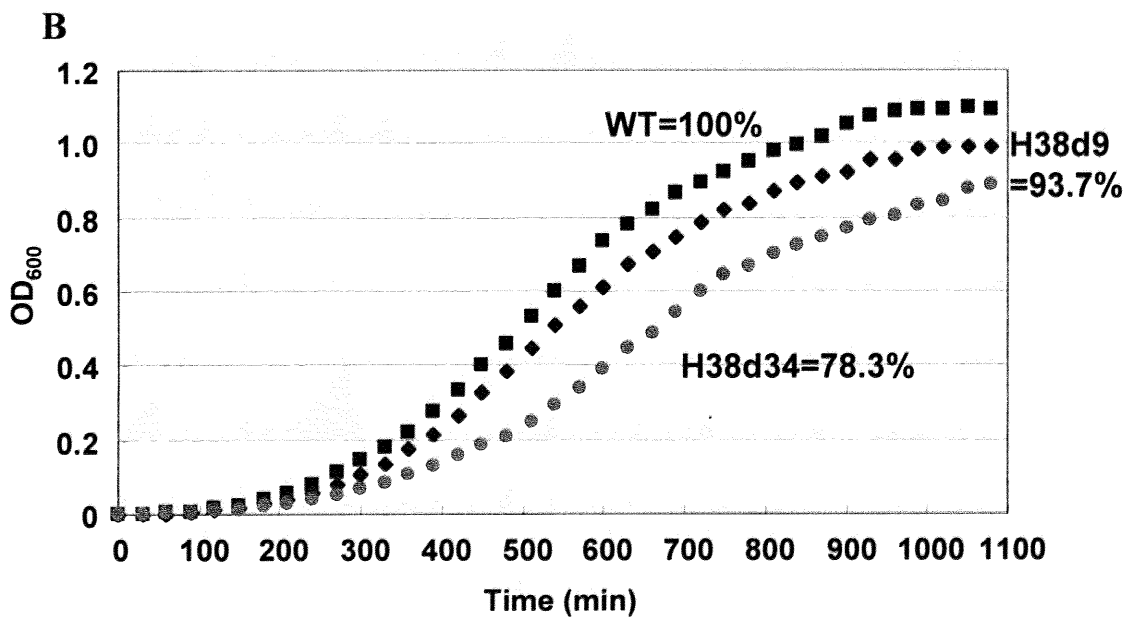
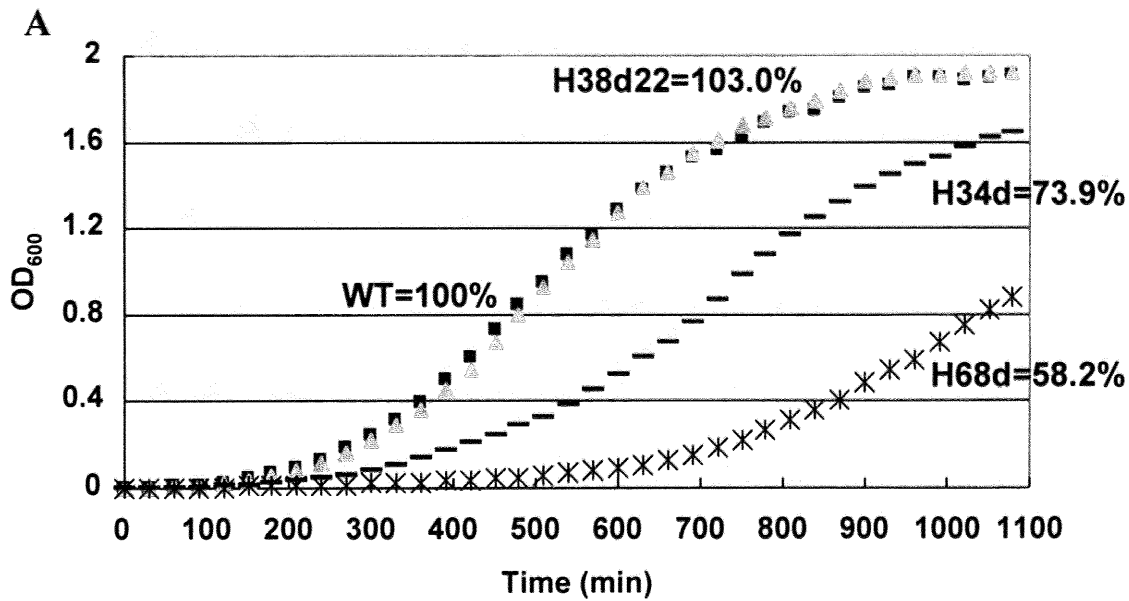


Figure 13 各 rRNA 変異株の成長曲線。

図中の数字は specific growth rate (SGR)であり、WT の倍化速度を 100%とした時の他の株での倍化速度を百分率で表した。

A. WT と H38d22、H34d、H68d。 **B.** WT と H38d9、H38d34。

WT: ■; H38d22: ▲; H34d: —; H68d: *; H38d9: ◆; H38d34: ●

Table 1 各 rRNA 変異株の倍化時間。

OD₆₀₀ の経時変化から求めた。5 回測定して、平均と標準偏差を算出した。

Doubling time (min)		
WT	52.1	± 1.6
H38d22	58.6	± 3.5
H34d	61.7	± 0.84
H68d	108	± 1.2
H38d9	54.3	± 1.1
H38d34	65.0	± 3.5

※H38d9、H38d34 は別途測定した。この 2 つを測定した時の WT の倍化時間は 50.9 ± 0.95 であった。

Table 2 各 rRNA 変異株を用いた *in vivo* 翻訳精度の測定。

5回測定して、平均と標準偏差を算出した。

	Frameshift		Readthrough	
	(-1)	(+1)	(TGA)	(TAG)
WT	39.5 ±4.0	117 ±3.9	872 ±19	99.4 ±0
EP	43.8 ±1.9	132 ±6.3	1620 ±92	220 ±13
HF	33.1 ±2.4	177 ±13	233 ±4.3	39.3 ±3.3
H38d9	46.2 ±3.3	135 ±8.1	753 ±3.0	74.3 ±1.3
H38d22	42.7 ±3.5	169 ±7.6	700 ±25	82.7 ±3.1
H38d34	47.6 ±8.6	132 ±2.4	580 ±30	68.5 ±5.7

(Miller units: $[A_{420} * 1000] / [\text{min} * \text{ml} * \text{OD}_{600}]$)

Table 3 各 rRNA 変異型リボソームのサブユニット会合能。

Subunit Association of Mutant Ribosomes						
Strain	WT	H38d22	H34d	H68d	H38d9	H38d34
Ratio [(50S in 70S) / all 50S]	0.71	0.70	0.40	0.54	0.68	0.67

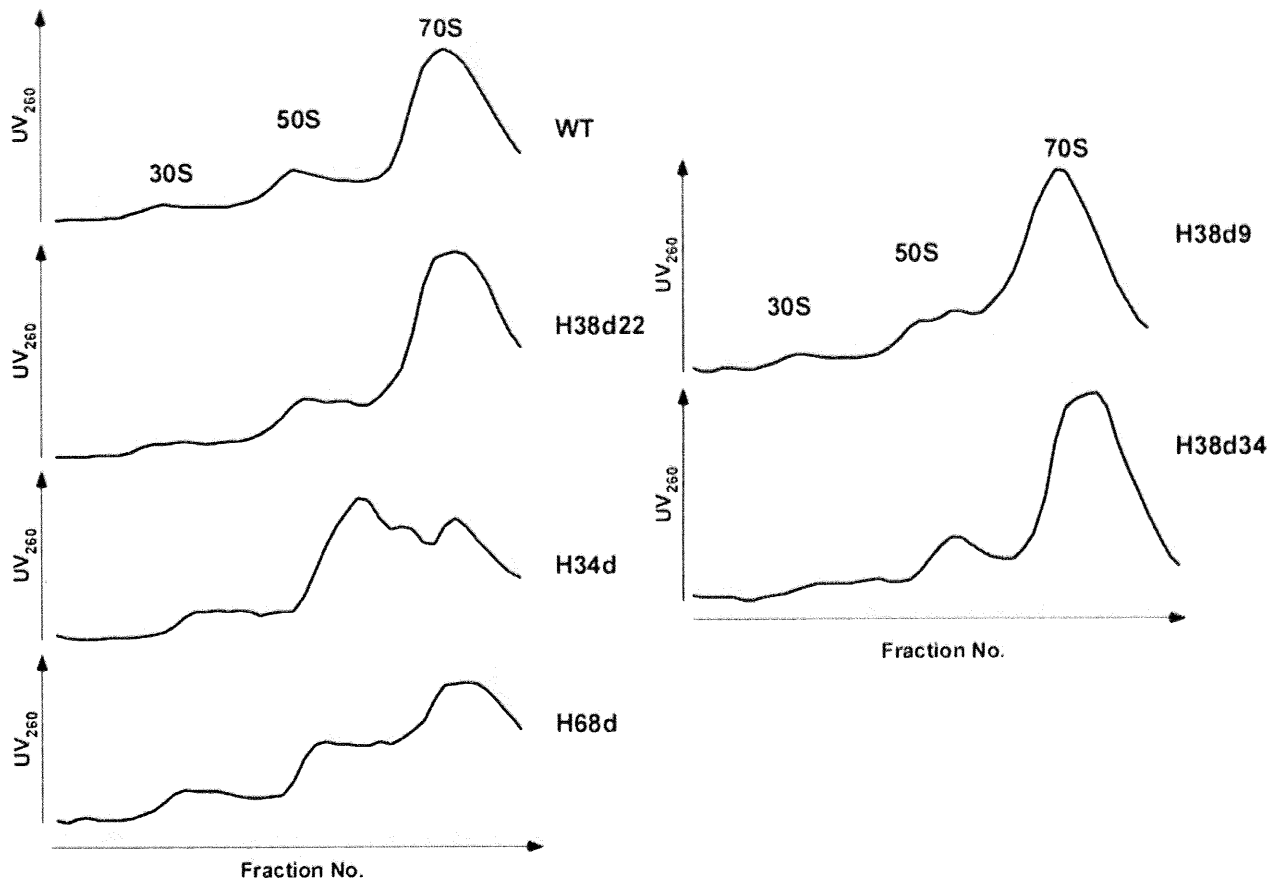
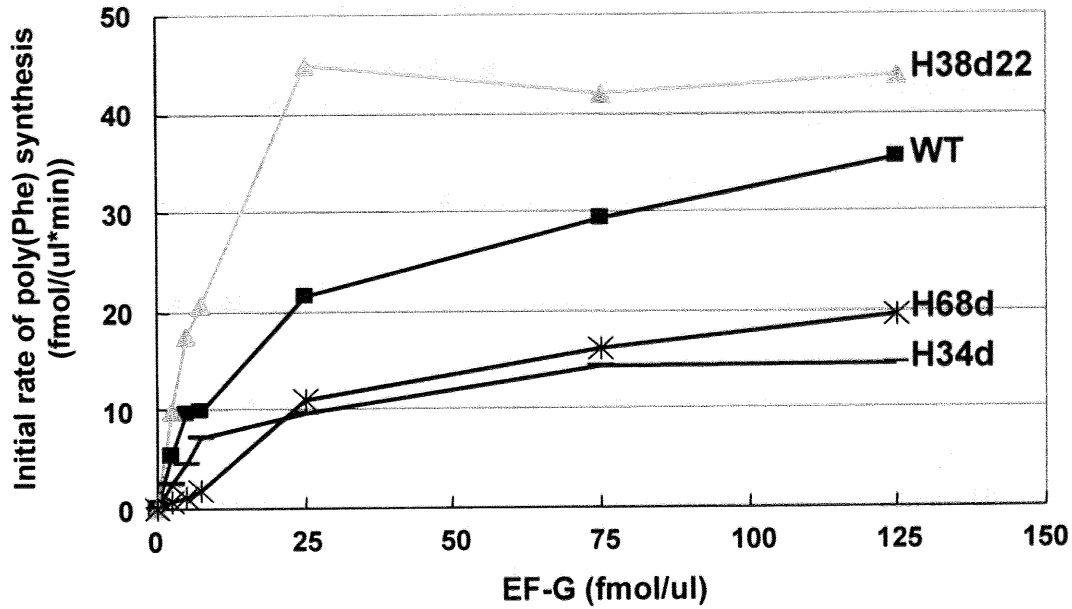


Figure 14 SDG 法による 70S リボソーム、50S サブユニット、30S サブユニットの分画。

フラクション毎の OD₂₆₀ を測定し、プロットして近似曲線を引いた。

A



B

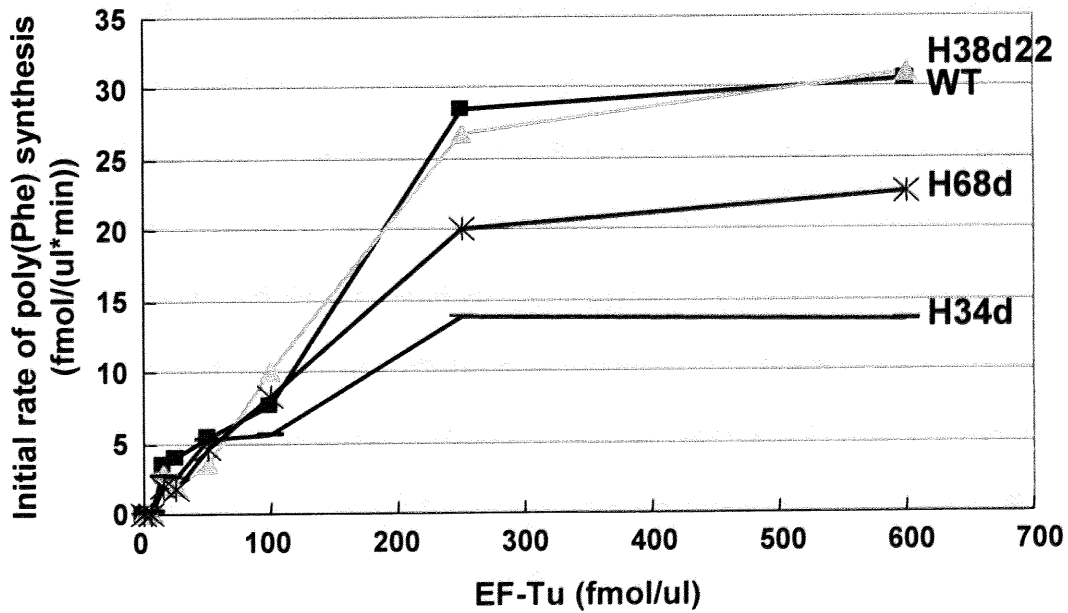


Figure 15 各 rRNA 変異型リボソームを用いた *in vitro* 蛋白質翻訳反応。

横軸に系に加えた伸長因子の濃度、縦軸に反応速度をプロットした。

A. 反応系に加える EF-G の濃度を変化させた。

B. 反応系に加える EF-Tu の濃度を変化させた。

WT: ■; H38d22: ▲; H34d: —; H68d: *

C

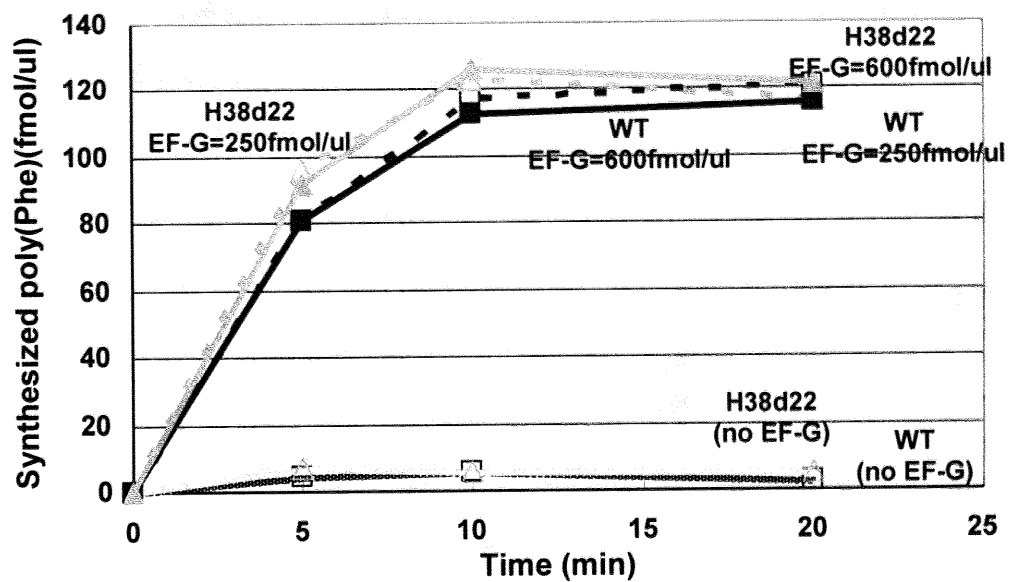


Figure 15(続き)

C. 高濃度の EF-G を系に加えて反応を行った場合のタイムコース。

WT: ■, □; H38d22: ▲, △;

EF-G= 600 fmol / μ L: 実線; EF-G= 250 fmol / μ L: 破線; no EF-G: 薄線

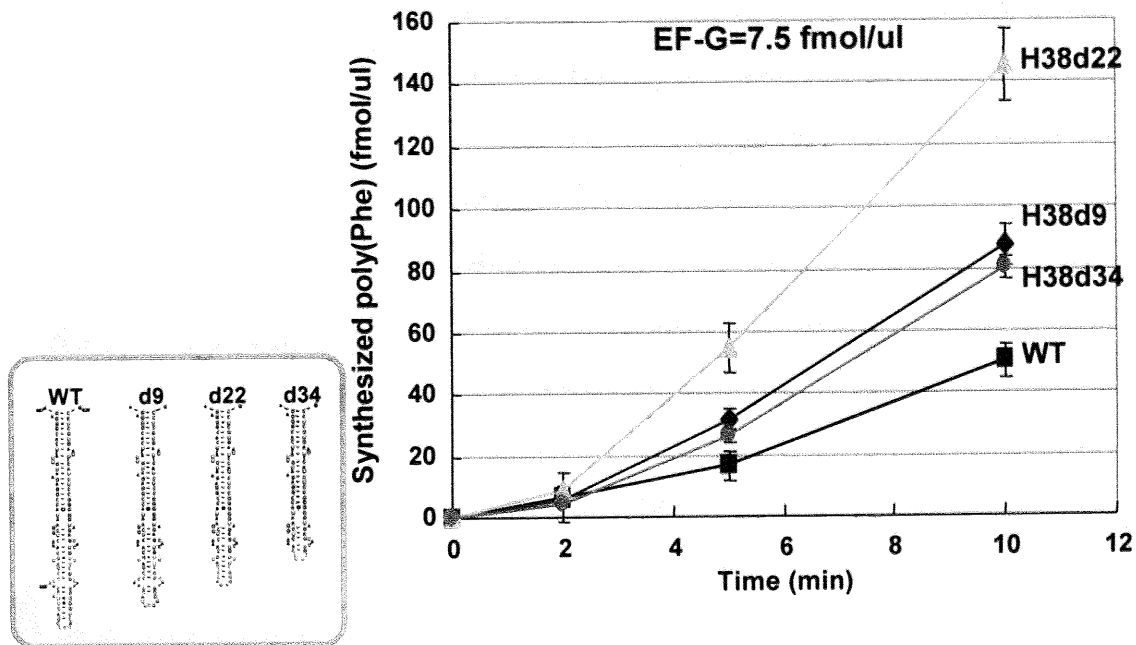


Figure 16 各 H38 変異型リボソームを用いた *in vitro* 翻訳反応のタイムコース。
横軸に反応時間、縦軸に合成された poly(Phe)をプロットした。

WT: ■; H38d22: ▲; H38d9: ◆; H38d34: ●

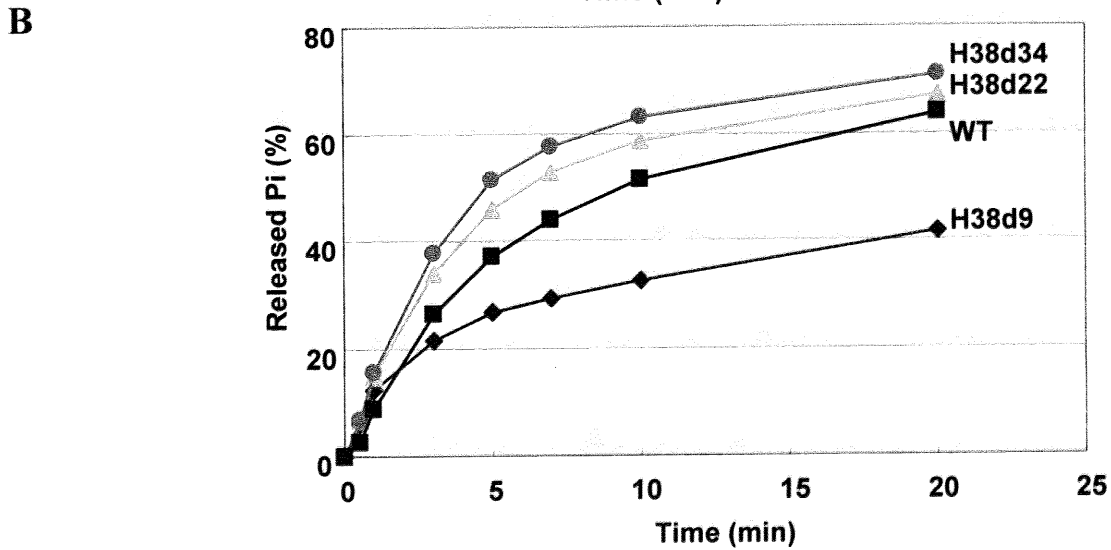
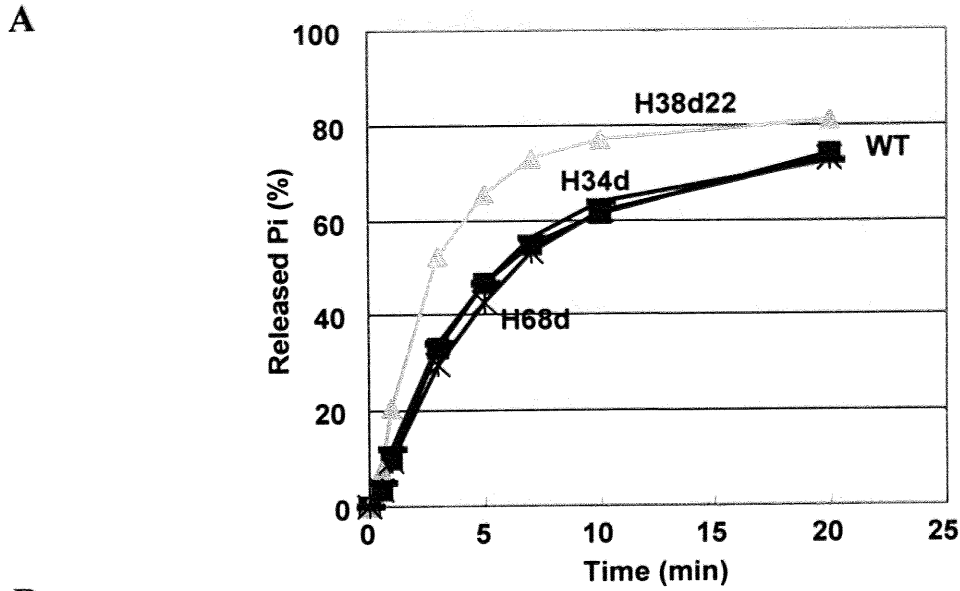


Figure 17 各 rRNA 変異型リボソームを用いた EF-G/GTPase 活性化反応のタイムコース。

横軸に系に反応時間、縦軸に分解された Pi を示した。[リボソーム]=1.5 pmol / reaction mixture。

A. WT と H38d22、H34d、H68d を比較した。

B. [リボソーム]=1.5 pmol / reaction で H38d22、H38d9、H38d34 を WT と比較した。

WT: ■; H38d22: ▲; H34d: —; H68d: *

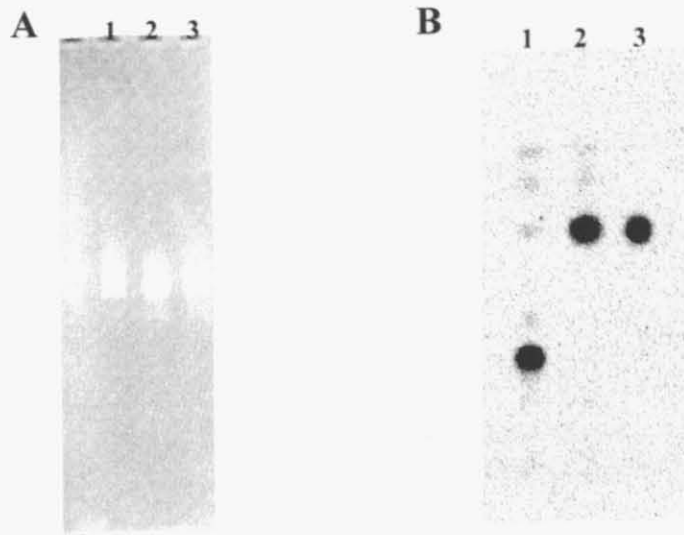


Figure 18 in vitro の反応に用いる tRNA の調製。

A. 転写後の tRNA^{Phe}。左端はマーカーとして泳動した 80 nt の転写 RNA 断片。

lane 1: 全長 DNA から転写を行った産物;

2: CCA 末端の無い DNA 断片から CCA enzyme を系に加えずに転写を行った産物 ;

3: CCA 末端の無い DNA 断片から CCA enzyme を系に加えて転写を行った産物

B. Phe-tRNA^{Phe} のアセチル効率を確認した。アセチル化により移動度が大きくなる。低い位置のスポットが Phe で、上にあるスポットが AcPhe。

lane 1: 遊離 Phe; 2: 遊離 AcPhe ; 3: AcPhe-tRNA^{Phe} + デアシル(NH₃)処理

Table 4 tRNA のアミノアシル化効率。

long: 全長の鋳型から転写して得た tRNA;

short: 短い転写産物に CCA enzyme で末端を付加して得た tRNA;

short ↑: 上記 short のバンドの上半分;

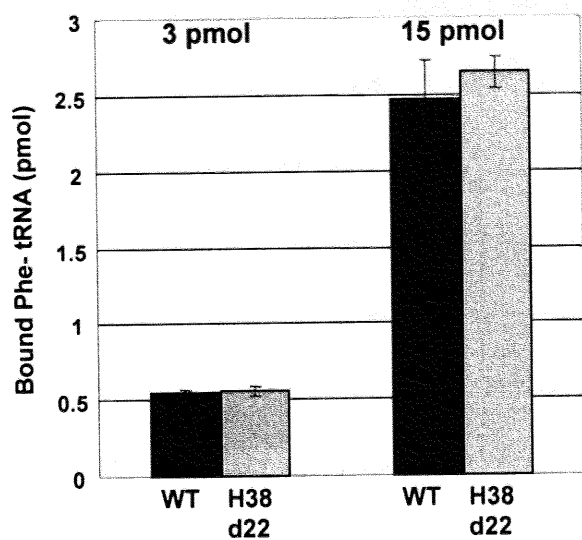
short ↓: 上記 short のバンドの下半分;

native: native tRNA^{Phe}

	Aminoacylation (%, Av.)
long	19
short	11
short ↑	41
short ↓	2
native	72

※それぞれ 2~3 回独立にアミノアシル化を行った平均を示した。同時に調整して比較したものではない。

A



B

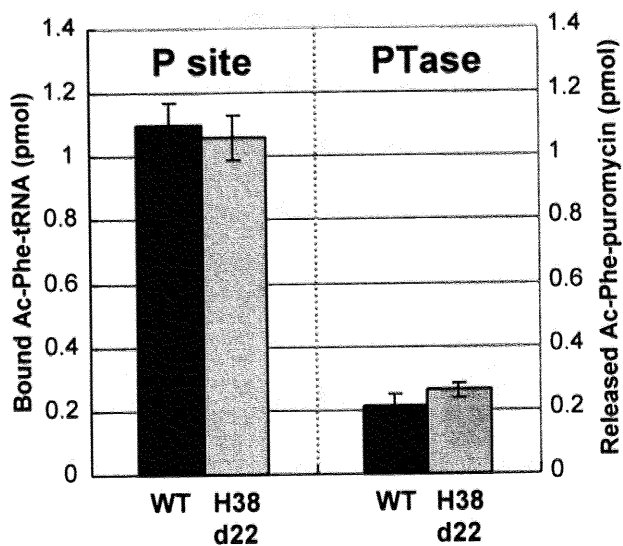


Figure 19 リボソームの tRNA 結合能とペプチド転移反応活性。

A. aa-tRNA の A-site への結合量。左で 3 pmol、右では 15 pmol の Phe-tRNA^{Phe} を系に加え、比較した。

B. pep-tRNA アナログ acaa-tRNA の P-site への結合量(左)と、puromycin を用いたペプチド転移反応活性(右)。

WT: ■; H38d22: ▒

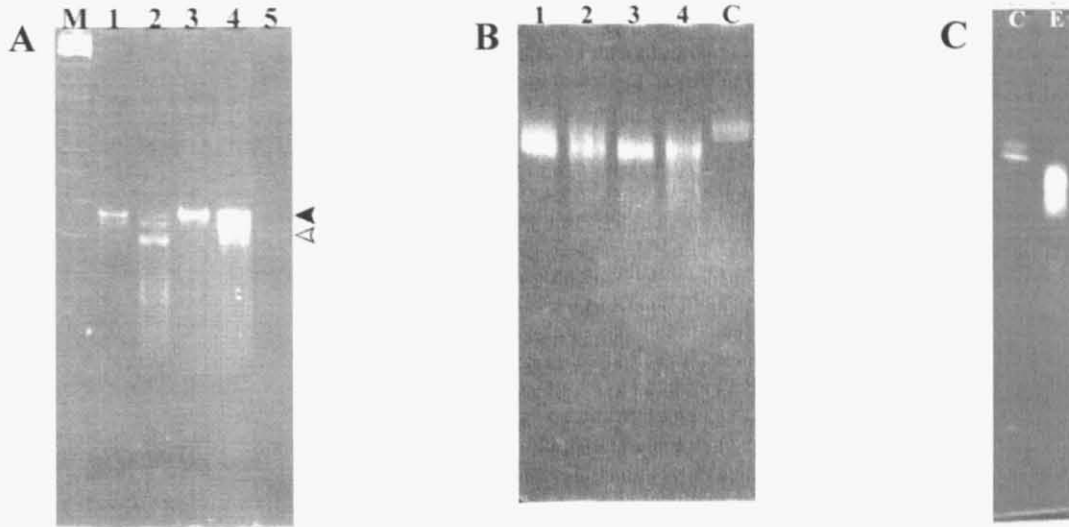


Figure 20 *in vitro* の反応に用いる mRNA32#の調製。

A. 鋳型 DNA の調製。黒の矢頭が 2 本鎖 DNA 断片、白の矢頭がアニーリングで得られた一部 1 本鎖の露出した DNA 断片と考えられる。

lane M: ϕ X174 DNA/*Hinf*I digest (726, 713, 563, 500, 427, 417, 413, 311, 249, 200, 151, 140, 118, 100, 82, 66, 48, 42, 40, 24 bp) ; 1~4: 熱サイクル; 1: 10 pmol primers, 3 cycles; 2: 100 pmol primers, 3 cycles ; 3: 10 pmol primers, 10 cycles ; 4: 100 pmol primers, 10 cycles ; 5: アニーリング

B. 転写された mRNA の確認。

lane 1: 熱サイクル, buffer A; 2: アニーリング, buffer A; 3:熱サイクル, buffer B; 4:アニーリング, buffer B; C: transcript tRNA^{Phe}

C. アニーリングで得た鋳型から mRNA を大量調製し、精製して得た mRNA。

C: transcript tRNA^{Phe}; E: mRNA32#

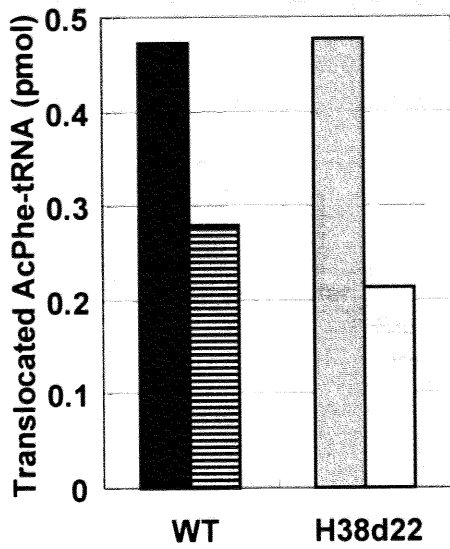
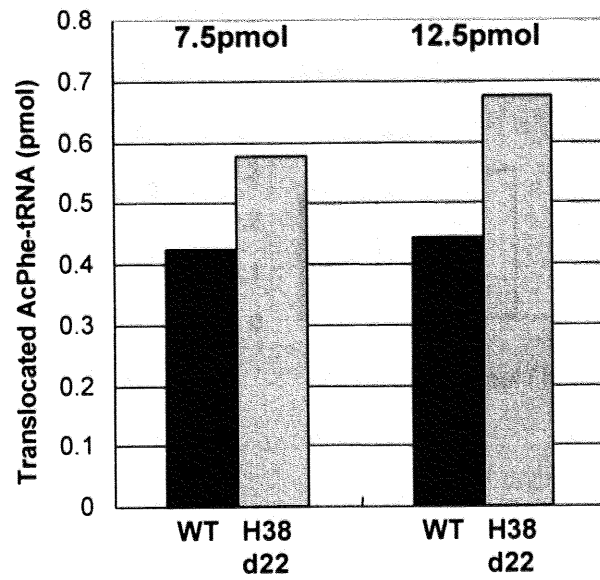
A**B**

Figure 21 poly(U)-RNA を鋳型とした、転座反応活性の比較。

転座反応の起こった complex を puromycin にて検出した。

A. EF-G を加えた反応液と EF-G を加えない反応液を 37°C に静置した結果。差分が転座反応活性に当たる。組成を以下に示す。ribosome: 5 pmol, AcPhe-tRNA: 7.5 pmol, de-tRNA: 10 pmol, poly(U): 2.5 μg, EF-G: 0 / 60 pmol

WT: ■; H38d22: ▨; + EF-G: 塗潰; - EF-G (+ buffer): 横縞

B. poly(U)-RNA を鋳型とした転座反応。図 19A と同様に実験を行い、BG を差し引いた。AcPhe-tRNA^{Phe} は 7.5 pmol(左)、または 12.5 pmol(右)を系に加えた。ribosome: 5 pmol, AcPhe-tRNA: 7.5 / 12.5 pmol, poly(U): 2.5 μg, EF-G: 60 pmol

WT: ■; H38d22: ▨

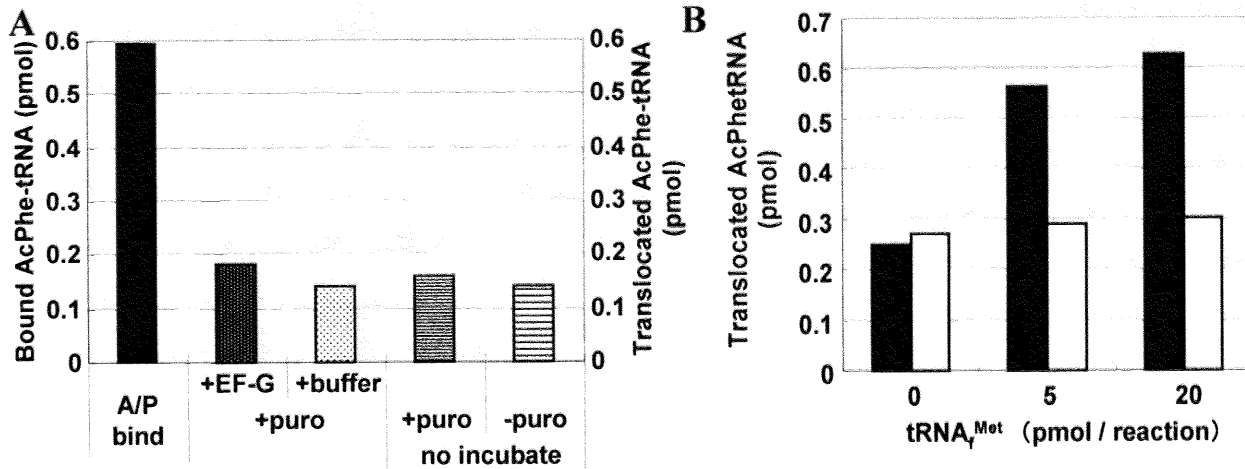


Figure 22 mRNA32#を鋳型する転座反応評価系の検討。

転座反応の起こった complex を puromycin にて検出した。

A. A/P state 結合量と、転座反応で BG として用いた各反応液から抽出された放射活性。AcPhe 濃度に換算した。組成を以下に示す。ribosome: 2.5 pmol, AcPhe-tRNA: 3.75 pmol, de-tRNA: 10 pmol, mRNA: 10 pmol, EF-G: 0 / 30 pmol

左から、AcPhe-tRNA binding; +EF-G; -EF-G; time 0(+puro); time 0(-puro)

B. mRNA32#を鋳型とした転座反応。tRNA^{Met}の濃度を変え、図 22A と同様に実験を行い、+EF-G と -EF-G を比較した。ribosome: 5 pmol, AcPhe-tRNA: 7.5 pmol, mRNA: 0~20 pmol, de-tRNA: 0 / 5 / 20 pmol, EF-G: 60 pmol

■: +EF-G; □: +buffer (-EF-G)

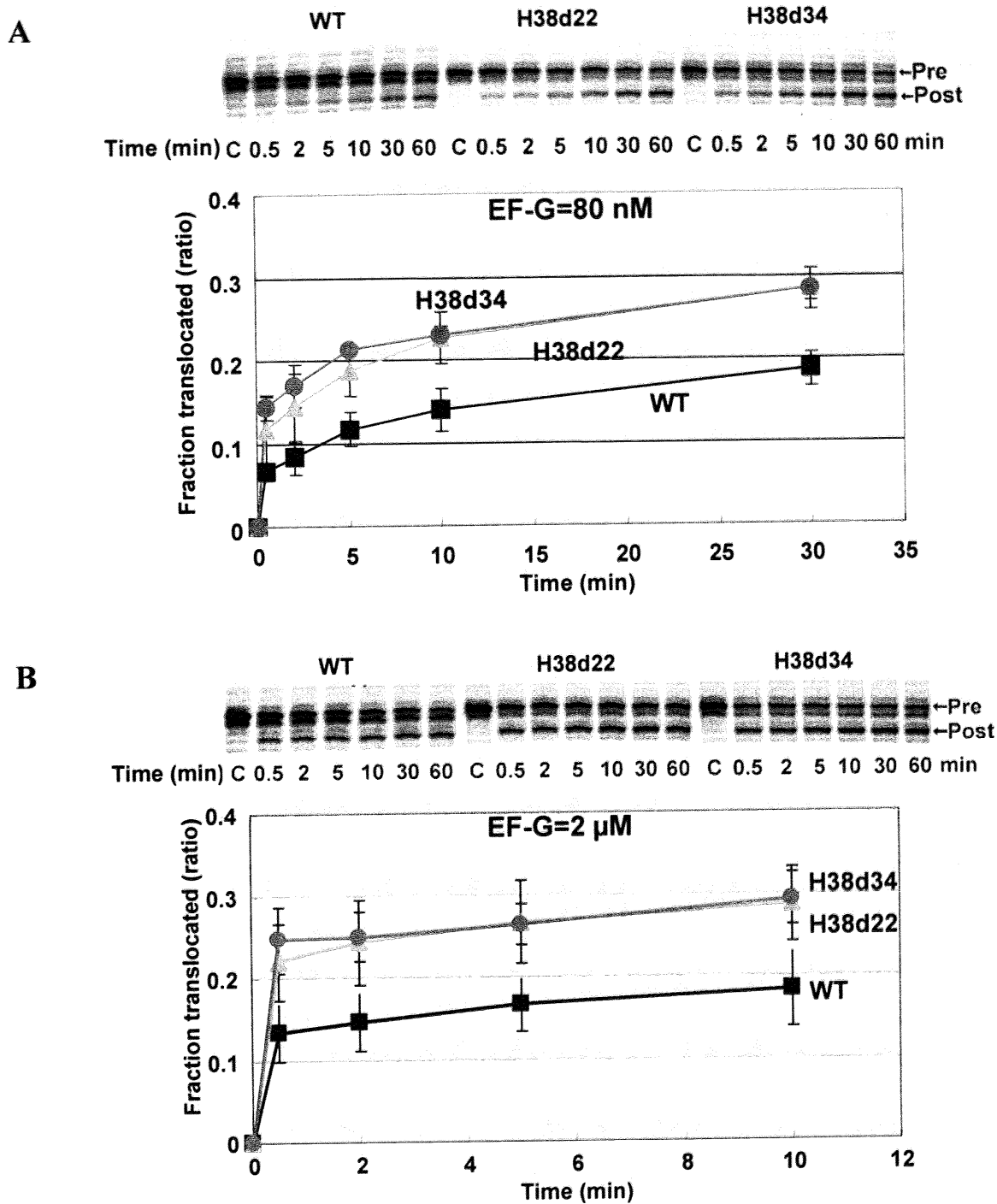


Figure 23 WT、H38d22、H38d34 短縮化リボソームの転座反応活性。

転座反応を primer extension 法により検出した。上に泳動結果を示す。転座反応により、Pre のバンドが減少し 1 コドン分下に来るバンド(Post)が増加する。下のグラフは泳動図からバンドを定量し、転座反応の進行した割合を算出した。

A. EF-G=80 nM。 **B.** EF-G=2 μM

WT: ■; H38d22: ▲; H38d34: ●

III-3. 考察

本研究では、23S rRNA 上のヘリックス H38/ASF の翻訳における役割を解析した。H38/ASF は 30S サブユニット蛋白質 S13 と相互作用してサブユニット間架橋構造 bridge B1a を構成するヘリックスである。この H38/ASF を段階的に短縮化したリボソームを持つ大腸菌株を構築したところ、これらの株はいずれも野生型(WT)に近い正常な成長速度で増殖した。一群の H38 短縮化リボソームにおいて緩やかな+1 フレームシフト頻度の上昇が見られた。-1 フレームシフト頻度は全ての株で低かったが、これは、P-site tRNA の結合している-1 方向へのフレームシフトは概して起こりにくいためと考えられた。一方で、H38 短縮化はサブユニット会合には影響が無かった。この点は、サブユニット会合能に支障を来たした、他の bridge を構成するヘリックス H34、H68 を短縮化したリボソームとは異なっていた。これらの結果から、H38 と bridge B1a がサブユニット会合において重要な役割を担っているとは考えにくいので、翻訳における他の機能に関与しているのではないかと考えられる。in vitro の翻訳反応を行うことにより、H38d22 短縮化リボソームが、高 EF-G 濃度下(200~600 nM)では WT リボソームと同様の翻訳活性を示すが(図 15B, C)、低 EF-G 濃度下で WT より反応が進行することを見出した(図 15A)。このことは、H38 短縮化リボソームは伸長反応において、EF-G とより効率よく相互作用をする、またはより速く EF-G をターンオーバーすることを示唆している。

次に、段階的に H38 の長さを変えた変異型リボソームについて翻訳活性の比較を行った。図 16 に反応のタイムコースを示したが、長さによって差はあるものの、やはりいずれも WT より活性が高く、特に H38d22 の場合に一番顕著に差が現れた。EF-G/GTPase 活性化反応において、H38d22、H38d34 短縮化リボソームが、EF-G の GTPase 活性を WT リボソームより効率的に亢進させるという知見(図 17)は、EF-G/GTPase 活性化は実際の転座反応とは異なる現象であるとは言え、上記の仮説を支持すると言える。H38d9 短縮化リボソームは WT より GTPase 活性化能が劣っており、他の 2 つと異なり、翻訳反応での高活性と GTPase 活性化の相関が見られなかった。H38d9 と他の 2 つの短縮化リボソームとの大きな違いは、A-site 近傍へ比較的長く突出して A-site tRNA との相互作用部位が残っていることである。リボソーム上での EF-G による GTPase 反応は 50S と 30S サブユニット両方に協調的な構造変化をもたらす(Agrawal, Heagle et al. 1999; Stark, Rodnina et al. 2000; Valle, Zavialov et al. 2003)。しかし、EF-G/GTPase 活性化の反応系には 50S と 30S サブユニットに跨って結合する tRNA は存在せず、50S におこる構造変化が 30S サブユニットとの連携が難しいために、完全に相互作用のない他の 2 つに比べ、かえって反応の進行が妨げられるのではないかと考えられる。しかし、結論を出すには、短縮化リボソームの構造や、より様々な長さの短縮化リボソームを評価する等、広く解析を進める必要があると考えられる。そこで本研究では、30S サブユニットとも A-tRNA とも相互作用を持たない H38d22、H38d34 に焦点を絞って、転座反応に着目して、翻訳反応の素過程についてさらなる解析を進めることとした。

転座反応の評価については、まず puromycin 反応による検出を試みた。本研究では puromycin 反応を転座反応の検出とペプチド転移反応活性の評価に用いたが、この反応をペプチド転移反応活性として検出する実験は古くから行われている(Leder and Bursztyrn 1966; Teraoka and Tanaka 1971)。しかし 37°C ではターンオーバーが起きてしまうことも知られており、シングルラウンドの反応を、しかし高頻度に進行させることは難しい(Geigenmüller, Hausner et al. 1986)。本研究では、ターンオーバーを避けるため氷上で反応を行ったが、その結果として低い活性を評価しなくてはならなくなった(図 19B)。また、AcPhe-puromycin の検出方法として用いた酢酸エチル抽出において、AcPhe-tRNA は抽出されず水層に残るが、遊離 AcPhe は一部有機層へ抽出されてしまう(data not shown)。調製した AcPhe-tRNA には遊離 AcPhe は含まれないが、リボソームと共にインキュベートすることにより遊離 AcPhe が生じ、BG が高くなってしまっていた(図 21, 22)。他のグループの論文では濾紙電気泳動等、異なる検出方法を用いたものが多い(Youngman, Brunelle et al. 2004; Cukras and Green 2005)。それでも、図 19B のようにペプチド転移反応活性そのものを評価するには十分な活性と検出感度であり、転座反応活性についても定性的な結果を得ることは出来た(図 21)。しかし反応の進行度を定量的に検出するには活性も検出感度も十分とは言えなかった。また、転座反応前の状態である AcPhe-tRNA の A-site への結合の測定が難しく、条件を揃えることが難しかった。Phe-tRNA の結合については問題なく測定出来た(図 19A)ため、AcPhe-tRNA の A-site への結合は A/P state を取るのが原因で不安定であるためと考えられた。また、反応系改善のために、より native に近い条件で反応を行うことを考え、poly(U)RNA でなく SD 配列を持つ mRNA を用いる方法を検討したが、この系はさらに不安定で活性評価が難しかった。結論として、いずれの反応系についても系に加えたリボソーム、mRNA、tRNA の量が多く、溶液の粘性が上がり反応を妨げる可能性があった。また、低濃度の EF-G では活性が評価出来なかったため非常に高い濃度条件で行ったが、EF-G のターンオーバーを評価するにはこれは不適切であった。さらにその結果、リボソーム、EF-G の持ち込みのバッファにより溶液組成が大きく変わってしまっている可能性があった。従って、本研究ではさらに、primer extension 法により転座反応活性を検出する反応系でも検証を行い、定量的な結果を得た。

puromycin 反応と primer extension 法のいずれを用いた転座反応評価系においても、H38 短縮化リボソームは WT より高い転座反応活性を持つことが示された(図 21, 23)。特に primer extension 法では、高 EF-G 濃度下(2 μ M)においても高い転座反応活性を示した。一方で、この EF-G 濃度においては、H38 短縮化リボソームの *in vitro* 翻訳反応の活性は WT と変わらなかったことは特筆すべき点である(図 15B, C)。これらを合わせて考えると、H38 短縮化リボソームが低 EF-G 濃度下でより効率的に伸長反応を行うと言う現象は、より速い EF-G ターンオーバーに因るものであると言えるだろう。EF-G と H38 は直接の相互作用は確認されていない(Frank and Agrawal 2000; Valle, Zavialov et al. 2003)ことから、以上で示した結果は、H38 の短縮化がリボソームを転座反応前の状

態から転座反応後の状態へ変換するのに必要なエネルギーを低減すると解釈するのが妥当であろう。さらに、H38はA-site tRNAのL字型構造の角の部分と相互作用する(Yusupov, Yusupova et al. 2001)が、H38の短縮化はA-siteへのtRNAの結合には影響を及ぼさなかった。加えて、H38d22はP-siteへのtRNAの結合能及びペプチド転移反応活性についても正常であった。以上で得られた結果は、H38/ASFが主にEF-Gが触媒する転座反応に関与しているということの意味していた。

H38短縮化リボソームでは+1フレームシフト頻度が上昇していた。これは、H38短縮化リボソームでは転座反応が進行しやすくなるために、転座反応後の状態にいる時間が長くなる、つまり伸長過程の律速反応であるA-siteへのtRNAの結合が起こるまでの時間が長くなるのでフレームシフトが起きやすくなっていると考えられる。或いは、H38の短縮化は転座反応そのもの以外にも、転座反応時のtRNAのリボソーム上での配置にも影響している可能性がある。それでもなお、この研究において観察された事実は、リボソームに本来備わっている転座反応活性は野生型リボソームで通常観察されるよりも実際には高いことを証明しており、それを負に制御する機構が存在することを示している。従って、H38/ASFは転座反応を負に制御する減衰器として作用する機能部位であり、転座反応を制御することによって、翻訳において非常に重要な遺伝暗号の読み枠の維持に寄与していると考えられる。

最近、Dontsovaら(Sergiev, Kiparisov et al. 2005)もASF短縮化(Δ 872-905)リボソームについて報告した。彼らの作成した短縮化リボソームは、本研究においてもっとも活性の高かった22塩基欠失より長い34塩基の欠失であり、彼らはこの変異体について成長不良及びサブユニット会合能の低下を見出している。加えて、彼らのASF短縮化リボソームではEF-G/GTPase活性化や転座反応活性についてWTとの違いが見られなかった。彼らの結果と本研究との隔たりは、幾つかの理由によると考えられる。

まず、本研究での遺伝学的な実験系は彼らの実験系と異なっている。彼らは、複製開始点ColE1を持つ多コピーのプラスミドの λ PLプロモータの支配下にrrnBオペロンを組み込んで、ゲノム上の全てのrrnオペロンを欠失した株に導入している。本研究では、同様にゲノム上のrrnオペロンを全て欠失したTA542由来の株を用いているが、この株をレスキューするのに用いているプラスミドはpSC101を複製開始点とする低コピーのものであり、ここに本来のプロモータであるP1P2と共にrrnBオペロンを組み込んでいる。大腸菌はゲノムに7つのrrnオペロンを持つことから、rrnオペロンを低コピーのプラスミド上に、本来のプロモータと共に組み込んだプラスミドにより相補すると、正常に近いコピー数のオペロンが細胞内に存在する可能性が高い。本研究で構築した野生株の倍化時間は50分程度で、彼らの株の場合(87 min)に比べて短いことはこの可能性を支持しているだろう。

2つ目に、上述したように、DontsovaらのASF短縮化リボソームは本研究で顕著な表現型を示したH38d22より欠失が長かった。彼らの株とよく似ていたのはH38d34であり、欠失塩基数が同

じで、欠失部位は 1 塩基だけ異なるが、非常に近いものと言える。確かに H38d34 株の方はやや成長速度が低く(65.0 min、図 13, 表 1)、低 EF-G 濃度での poly(U)-poly(Phe)合成反応においても、H38d22 程の活性を示さなかった(図 16)。しかし H38d34 は依然として WT より高い翻訳活性を持ち、また H38d22 と同様に、シングルラウンドの転座反応を効率的に行うことが出来た(図 16, 23)。

また、彼らは、*in vitro* の翻訳反応について EF-G の濃度による変化を確認せず、定法に則って高濃度の EF-G と EF-Tu を用いていた。本研究でも高濃度の EF-G の存在下では H38 短縮化リボソームの翻訳活性は WT と同等であった(図 15B, C)ことからすると、彼らの実験系では WT との差を検出出来なかったと考えられる。また、EF-G による GTPase 活性化についても、やはり彼らは WT との差を見出さなかったが、彼らは EF-G の濃度を変化させているために、反応液中の EF-G による潜在 GTPase 活性そのものや EF-G と GTP の濃度比が変わってしまっているのではないだろうか。従って彼らの実験系はリボソームによる影響を適切に評価する系であるとは言えない。以上から判断して、本研究で得られた結果がより妥当なものであると考え、私は、34 塩基欠失での表現型と 22 塩基欠失での表現型に程度の差は見られたものの、A-site tRNA と 30S サブユニット双方との相互作用を失う H38 の短縮化は一般に EF-G との相互作用を活性化し、転座反応を促進すると結論付けた。

チオール基に特異的に反応する試薬 *p*CMB (*para*-chloromercuribenzoate、P-クロル安息香酸第二水銀)でリボソームを処理すると、EF-G 非依存的な転座反応が起きることが古くから報告されており(Gavrilova and Spirin 1971; Southworth, Brunelle et al. 2002)、リボソーム自体が転座反応に必要な全ての装置を備えていると考えられている。30S サブユニットのリボソーム蛋白質 S12 が *p*CMB のターゲットとして挙げられていたが(Gavrilova, Koteliansky et al. 1974; Gavrilova and Spirin 1974)、実際、Green らは、S12 か S13、または S12 と S13 両方を除いて再構築したリボソームが EF-G 非依存的な転座反応を起こすことを報告している(Cukras, Southworth et al. 2003)。S13 は H38/ASF と相互作用して bridge B1a を構成するので、H38 短縮化リボソームにおいて効率的な転座反応を可能にする分子機構は、S13 を欠いたリボソームでの EF-G 非依存的な転座反応における分子機構と何らかの関係がある可能性がある。しかし、H38 と S13 は翻訳反応中に、直接の相互作用が構成的に維持されるのではなく、またどちらもリボソーム上で他の機能を持つため、この関係は簡単には説明出来ない。現に本研究で H38 を短縮化した変異型リボソームのうちで、bridge B1a は構成出来ないが A-tRNA との相互作用の残っている H38d9 の挙動は、他の 2 つとは異なっていた(図 17B)。それぞれの働きと転座反応の関連を理解するには、さらなる知見の蓄積が必要であろう。

また、今回は結果を記述しなかったが、H38 変異 *rrnB* の作成の過程で、複数のプライマー配列が組み込まれて挿入変異を起こした変異株が得られた。104 nt もの挿入が起こっていたが、倍化時間(72 min)や会合能等は WT に比べて支障はあるものの、十分生育可能であった。また、当研究室の研究で、11 nt の挿入を *rrnB* 遺伝子上にランダムに導入したところ、生育可能な株の内に H38

に挿入がある変異株が得られた。H38 はサブユニット間隙に突出しており、周囲にスペースは多い(図3)ため、ヘリックス構造を取ることが可能であれば、生育可能な機能は維持出来ると考えられる。

真核生物細胞質のリボソームでは H38 は原核生物より長く、二又に分かれている。分かれた方のステムループは CP の背面(溶媒側)を裏打ちしているが、主となる H38 ステムループは、原核生物のリボソームと同様に、A-site tRNA と相互作用し、bridge B1a を構成している(Spahn, Beckmann et al. 2001)。このように、bridge B1a と H38 は真性細菌、古細菌、真核生物細胞質、植物の色素体に至るまで広く保存されている。一方で動物ミトコンドリアリボソームでは H38 は非常に短くなっており、ウシミトコンドリアリボソームの cryo 電子顕微鏡解析では bridge B1a は見出されていない(Sharma, Koc et al. 2003)。その代わりに、ミトコンドリアリボソームには P-site 近傍にサブユニット間隙へ突出した構造が見出され、P-site finger(PSF)と名づけられた。ウシミトコンドリアリボソームでは EF-G が結合する際に、ratchet-like rotation は観察されないため(Agrawal, personal communication)、哺乳動物ミトコンドリアリボソームでは一般的なリボソームとは異なる分子機構によって転座反応が起こるのかも知れない。

大腸菌リボソームの結晶構造解析で観察された 30S の head 領域の回転(Schuwirth, Borovinskaya et al. 2005)と、cryo 電子顕微鏡解析で EF-G 結合時に観察された ratchet-like rotation(Frank and Agrawal 2000)と言う 2つの知見は、転座反応の分子機構の一部を紐解いた。また、転座反応前後の状態での構造の比較解析は、この構造変化が、H38 が bridge の相手を S13 から S19 へと変える出来事と関連していることを明らかにした(Valle, Zavialov et al. 2003)。本論文で記述した生化学的な観察は、H38 短縮化が、EF-G のターンオーバーを加速することにより、転座反応を加速することを示唆している。以上から、H38 は翻訳精度を維持するために、この相互作用の切り替えをにより転座反応を制御する機能的な減衰器として作用する、と言う新規な仮説が導かれた。