

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

研究の過程で、30S サブユニット上のヘリックスを欠失した変異型リボソームの中に、bridge B1a の相互作用が弱くなっているものを見出した。これは、16S rRNA のヘリックス 33(h33)を短縮化した変異型リボソームで、bridge B1a と転座反応の関係についてさらに知見を得るために、この変異型リボソームについても解析を行うこととした。大腸菌リボソームの 30S サブユニットの立体構造と、16S リボソーム RNA の二次構造を示す(図 24)。h33 は head の一部、nose の部分を構成するヘリックスで、bridge B1a を構成する S13 と隣接しているが、それ自身はサブユニット間隙に面していると言うよりは側面に位置しており、bridge 等、50S サブユニットとの相互作用は持たない(図 1B, 3B, 24)。この h33 を欠失したリボソームについて、R. K. Agrawal らと cryo 電子顕微鏡解析を用いた共同研究(Agrawal, not published)を行った。解析の結果、図 25 に示すような構造であることが明らかとなった。h33 の欠失によりこの nose がヘリックスの分だけ小さくなり、それによって nose を含む head 全体が溶媒側へ後退し、また、蛋白質 S3 の電子密度が低下していることが分かった。さらに、この変異型リボソームでは、head が後退して 50S サブユニットとの距離が離れたためか、bridge B1a が外れていることが明らかになった。これまでの研究で、bridge B1a を相互作用出来ないよう短くすると転座反応活性が上がるということが明らかとなっていたので、この h33 欠失リボソームでも同様の現象が観察されるのではないかと考えた。そこでこの h33 欠失リボソームを用いて、H38 短縮化リボソームと同様の活性評価を行った。

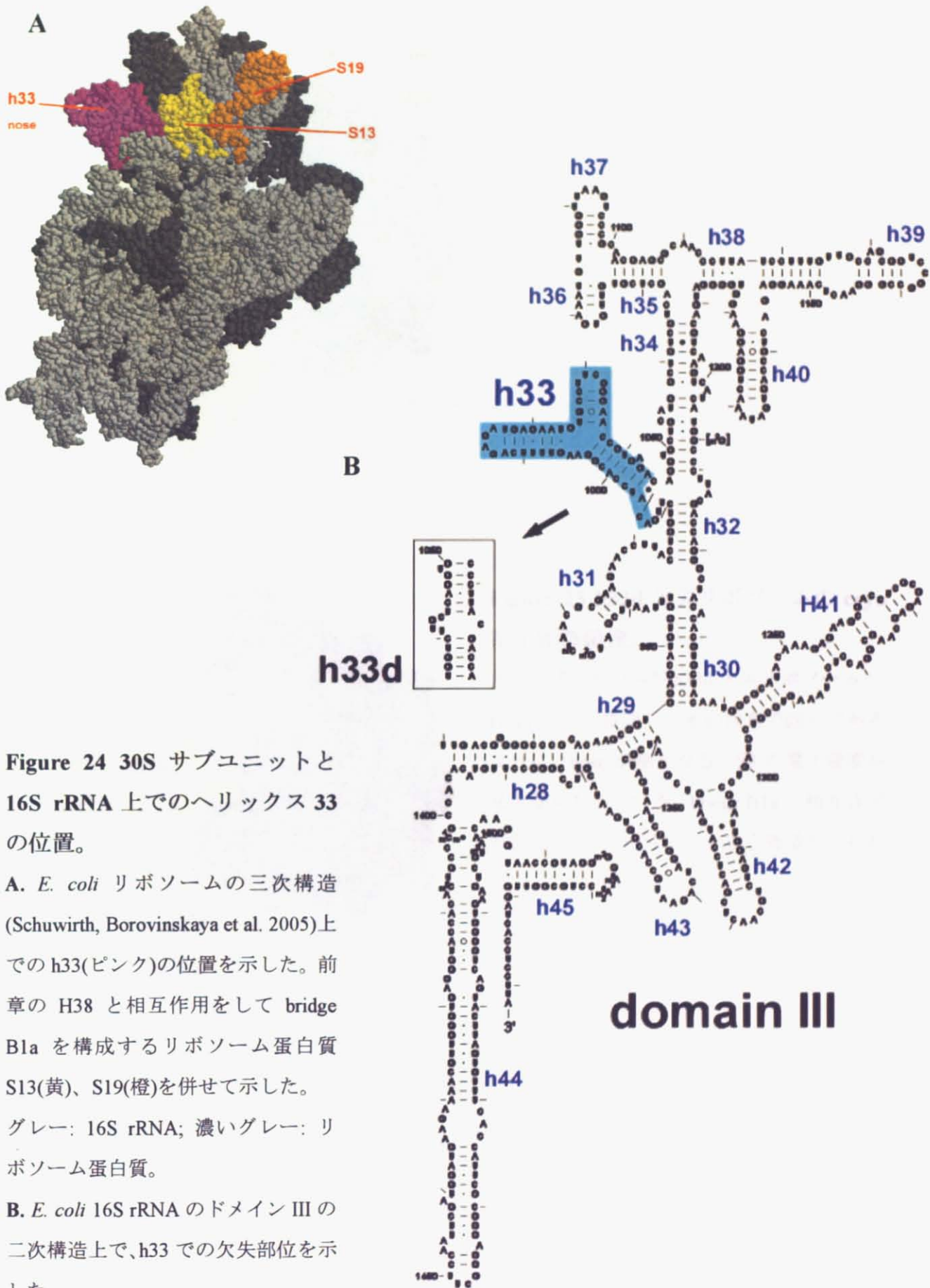


Figure 24 30S サブユニットと 16S rRNA 上でのヘリックス 33 の位置。

A. *E. coli* リボソームの三次構造 (Schuwirth, Borovinskaya et al. 2005) 上での h33(ピンク)の位置を示した。前章の H38 と相互作用をして bridge B1a を構成するリボソーム蛋白質 S13(黄)、S19(橙)を併せて示した。
 グレー: 16S rRNA; 濃いグレー: リボソーム蛋白質。

B. *E. coli* 16S rRNA のドメイン III の二次構造上で、h33 での欠失部位を示した。

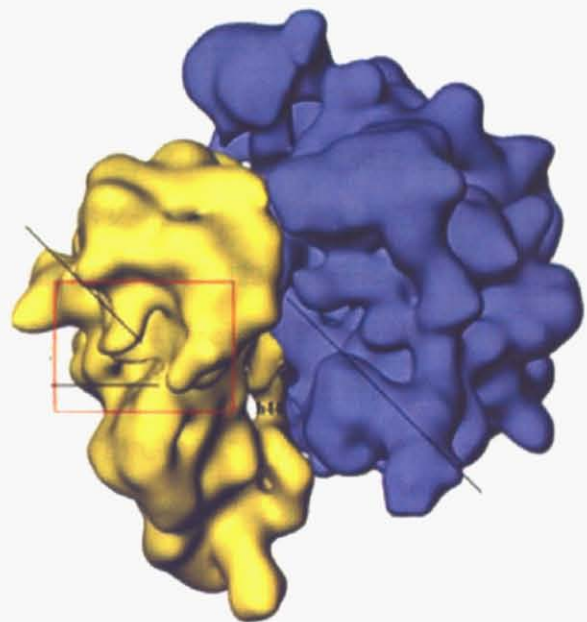
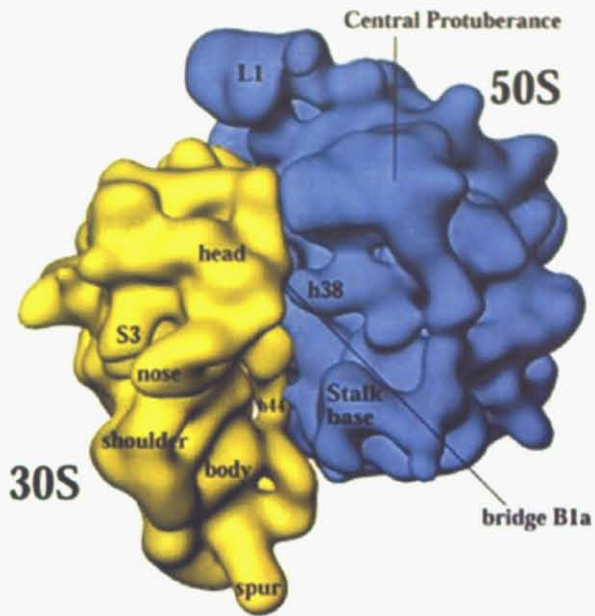


Figure 25 h33d 欠失リボソームの cryo 電子顕微鏡像。

上が WT、下の図が h33d 欠失リボソーム。
 Head 全体が後退し、赤の四角で囲んであるように、nose が細くなる、S3 の電子密度が見えなくなっている、bridge B1a の相互作用が見えなくなっている、と言う特徴が見られた。

IV-1. 試料の調整

基本的な操作は前章と同様に行った。変異 *rrnB* 遺伝子を含むプラスミドの構築に用いたプライマーを下に示す。

H33d fwd (48 nt) <E. coli *rrnB* 16S np -972~993+CT+1045~1068>:

5' - cgaagaaccttacctggtcttggctcaggtgctgcatggctgctcgtcag-3'

H33d rev (48 nt):

5' - ctgacgacagccatgcagcacctgagcaagaccaggtaaggttcttcg -3'

以下、構築した変異型リボソームを h33 欠失リボソーム h33d と呼ぶ。対照として H38d22 短縮化リボソームを用いた。

IV-2. 結果

《1》変異 *rrnB* 遺伝子のみを持つ大腸菌株の構築

III と同様に、h33 に欠失をもつ変異 *rrnB* 遺伝子のみを持つ大腸菌株を構築した。h33 を 51 塩基 (Δ 994-1044)欠失し、間をCTで繋いで、二又のヘリックス構造全体を失った49塩基欠失を持つh33d変異体を得た。対照として H38d22 を用いた。h33 欠失株が構築出来たことから、h33 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、h33d と H38d22 変異株について成長速度を測定した(表 5, 図 26)。倍化時間から判断すると、h33 の欠失は成長速度にある程度の影響があることが観察された。表に示すように h33d は 60.4 min で、比較的影響が少ないと言えるが([WT]=50.1 min)、前章の H38d22 と成長曲線を比較すると、少し影響が出ていることが伺えた。従って、h33(nose)への変異はリボソームの機能を低下させていると言え、このヘリックス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

A-site tRNA と相互作用する bridge B1a の結合が弱くなっているため、H38d22 と同様、h33 の欠失が mRNA の暗号解読の精度に及ぼす影響を確認した。表 6 に示すように、h33d 変異株では、野生株と H38d22 株の中間程度まで+1 フレームシフト頻度の上昇が見られた。しかし、H38d22 株と同様、-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野生型と有意な差は観察出来ず、H38d22 株と非常に良く似た性質を持つことが明らかになった。以上の結果から、この実験系では、h33 欠失は+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

前章と同様に、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、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 27 のように、解離しているサブユニットが多かった。この結果、 OD_{260} で換算して、収率は 35%程度であった。この波形から、リボソームのサブユニット会合能を測定した(表 7, 図 27)。10 mM Mg^{2+} 条件下では、WT(71%)、H38d22 (70%) と比較して、h33d は 46%と会合率が低かった。ここから、h33d 変異株での成長速度の低下はサブユニット間の会合が弱くなったことに起因する可能性がある。以上から、h33 を欠失させると、サブユニット会合に大きな影響があり、h33 は、直接はサブユニット間の相互作用を担っていないにも関わらず、会合に重要な役割を果たすと言える。

《4》 In vitro での活性測定

in vitro での h33 欠失リボソームの活性を測定するために、以下の実験を行った。

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

h33 欠失による翻訳への影響を評価するために、bridge B1a の減弱に着目して、H38d22 と同様に様々な EF-G 濃度下で in vitro 翻訳反応を行った(0-75 nM)。

系に加える EF-G 濃度を変えて行った 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 28A にプロットした。その結果、h33d でも、H38d22 程ではないが低 EF-G 濃度下で顕著に高い poly(U)-poly(Phe)合成活性を持つことが確認出来た。さらに、十分量の EF-G(600 nM)を加え、EF-Tu の濃度を変化させて poly(U)-poly(Phe)合成反応を行うと(図 28B)、h33d は WT と同様に H38d22 短縮化リボソームとも同様の挙動を示した。以上から、h33 の欠失は低 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

次に、h33d 欠失リボソームによる EF-G/GTPase 活性化能について WT、H38d22 と比較を行った。図 29 に示すように、h33d 欠失リボソームは GTPase 反応を WT より強く亢進し、H38d22 短縮化リボソームに近い効率的な活性化が見られた。

以上の結果から、h33d 欠失リボソームは、サブユニット会合能を除き、H38d22 短縮化リボソームによく類似した表現型を持つことが明らかとなった。cryo 電子顕微鏡解析の結果と考え合わせると、h33d 欠失リボソームにおけるこの現象は bridge B1a の結合が弱くなったことにより、H38d22 短縮化リボソームと同様に EF-G とリボソームの相互作用を促進していることを示唆している。

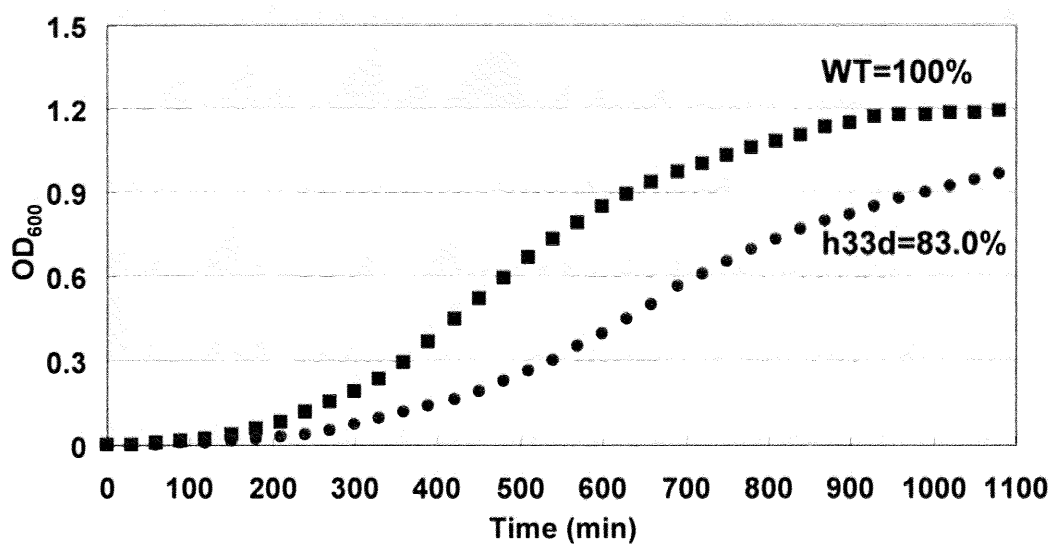


Figure 26 各 rRNA 変異株の成長曲線。

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。

WT:■; h33d:●

Table 5 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	50.1	± 0.66
h33d	60.4	± 1.9
H38d22	58.6	± 3.5

※H38d22 は別途測定した。これを測定した時の WT の倍化時間は 52.1±1.6 であった。

Table 6 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
h33d	49.7 ±4.5	163 ±20	681 ±166	86.5 ±14

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

Table 7 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	NL
Ratio [(50S in 70S) / all 50S]	0.71	0.70	0.46

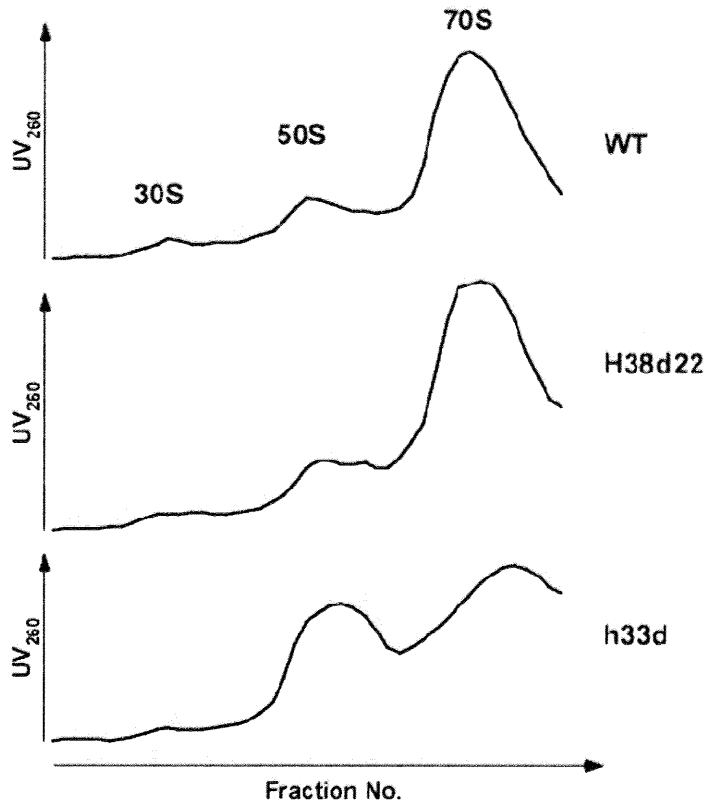


Figure 27 SDG 法による 70S リボソーム、50S サブユニット、30S サブユニットの分画。

画分毎の OD₂₆₀ を測定し、プロットして近似曲線を引いた。

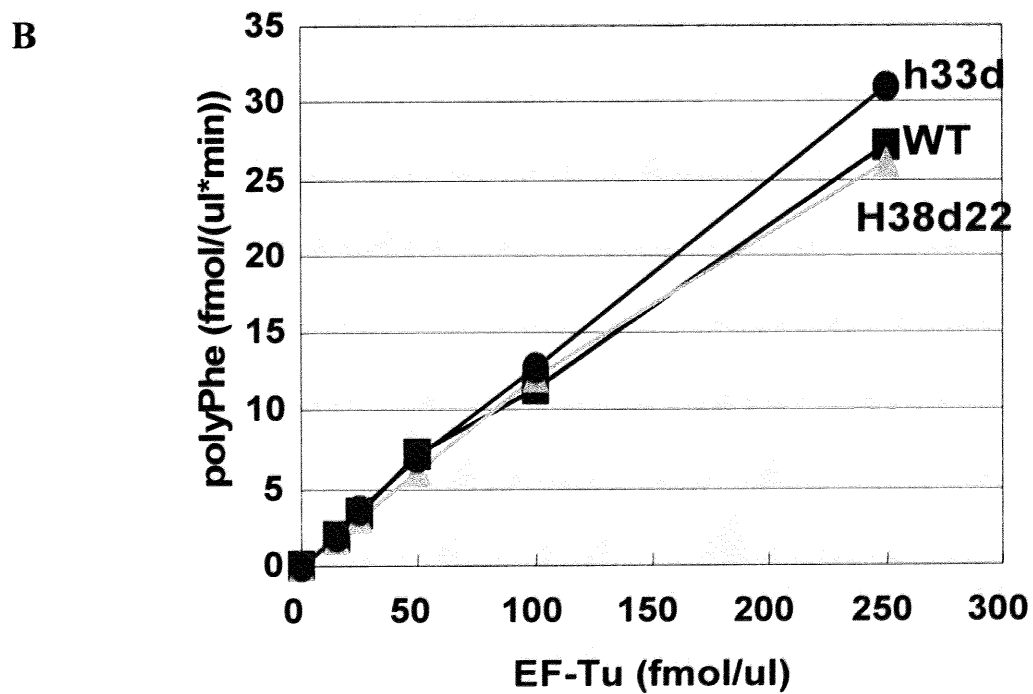
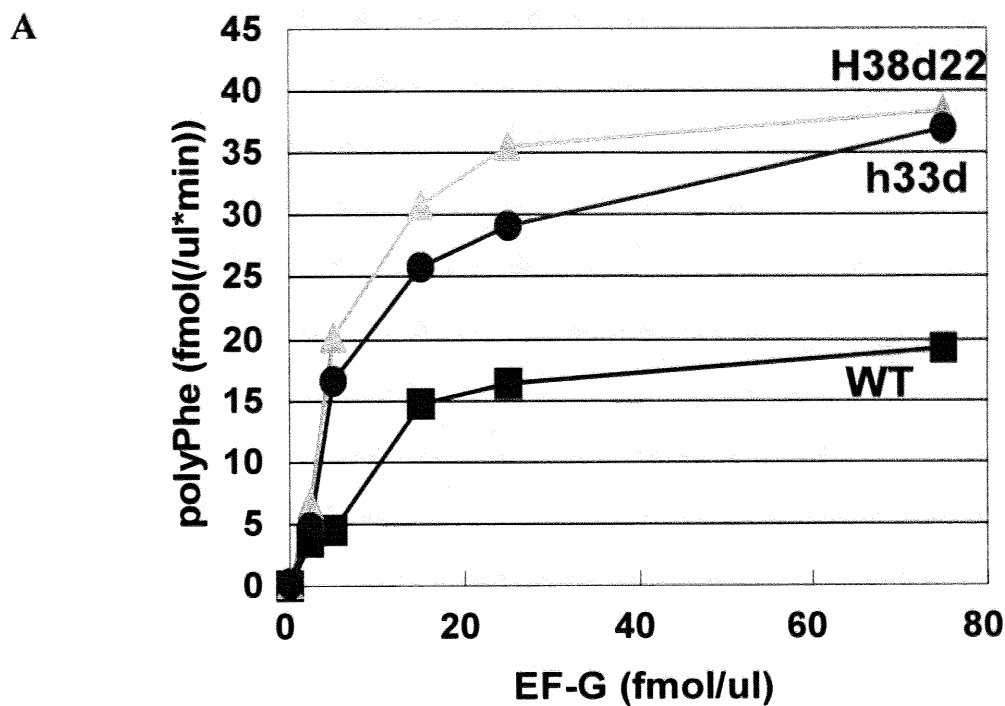


Figure 28 h33d 変異型リボソームを用いた *in vitro* 蛋白質翻訳反応。

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: ▲; h33d: ●

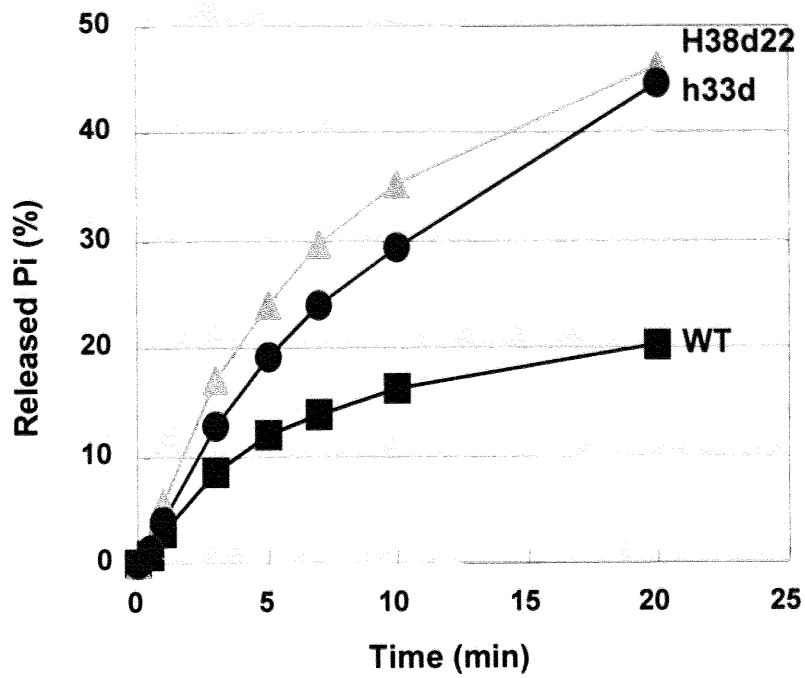


Figure 29 h33d 変異型リボソームを用いた EF-G/GTPase 活性化反応のタイムコース。
横軸に系に反応時間、縦軸に分解された Pi を示した。

WT: ■; H38d22: ▲; h33d: ●

IV-3. 考察

研究の過程で、30S サブユニット上のヘリックスを欠失した変異型リボソームの中に、bridge B1a の相互作用が弱くなっているものを見出した。そこでこれについても解析を行うこととした。h33 を欠失したリボソームについて、R. K. Agrawal 博士との共同研究で cryo 電子顕微鏡解析を行った結果、bridge B1a が弱まっていることが明らかになった。これまでの研究で、bridge B1a を相互作用出来ないよう短くすると転座反応活性が上がるということが明らかとなっていたので、この h33 欠失リボソームでも同様の現象が観察されるのではないかと考えた。この 16S rRNA 上の h33 は 30S サブユニット head の縁にある nose を構成している。本章ではこの h33 を欠失したリボソームで bridge B1a が弱くなっていることに着目して、このリボソームについて解析を行い、bridge B1a の役割についてのさらなる知見を得ることとした。

この h33d 欠失株は野生株、H38d22 株と H38d34 の中間程度の成長速度で増殖した(表 5, 図 26)。また、一群の ASF 短縮化リボソーム同様、緩やかな +1 フレームシフト頻度の上昇が見られた(表 6)が、サブユニット会合能については H38d 短縮化リボソームとは異なり、WT より大きく低下していた(表 7, 図 27)。以上から、h33d 変異株での成長速度の低下はサブユニット間の会合が弱くなったことに起因する可能性があり、h33 は、直接はサブユニット間の相互作用を担っていないにも関わらず、会合に重要な役割を果たすと言える。これは cryo 電子顕微鏡解析から得られたように、h33d 欠失リボソームでは 30S サブユニット上の広範囲に亘る大きな rearrangement があり head 全体が後退していることが、head 部分の幾つもの bridge の相互作用に少なからぬ影響を与えていると考えたと妥当な結果であると言える。

in vitro の翻訳反応を行ったところ、h33d 欠失リボソームは H38d22 短縮化リボソーム同様、低 EF-G 濃度下で WT より転座反応が進行することを見出した(図 28A)。また、EF-Tu の濃度に対しては WT、H38d22 短縮化リボソーム双方と同様の挙動を示した(図 28B)。GTPase 活性化反応において、h33d 欠失リボソームは H38d22 短縮化リボソーム同様、EF-G の GTPase 活性を H38d22 短縮化リボソームに近いレベルまで遥かに亢進させるという知見(図 29)を統合すると、h33d 欠失リボソームが H38d22 短縮化リボソームと同様に、転座反応での減衰器としての働きが減弱しているのではないかと考えられ、h33d 欠失リボソームが H38d22 短縮化リボソームと同様の性質を持つことを支持すると言える。

本章での結果は bridge B1a の相互作用が失われると転座反応が進行しやすくなり、翻訳の読み枠の維持に支障を来たすと言う前章での知見からの仮説を裏付けるものだった。

一方で、h33d 欠失リボソームではサブユニット会合能が大きく低下していた(図 27, 表 7)が、bridge B1a の相互作用の消失はサブユニット会合に影響を及ぼさないため(図 15, 表 3)、これは h33 の欠失による別の現象に起因すると考えられる。H33d 欠失リボソームは head 部分全体が溶媒側に後退しており、影響を受ける構造は bridge B1a のみではないため、bridge B1a のみを消失した

H38d22 短縮化リボソームでの EF-G との相互作用の活性化と言う表現型以外の表現型が表れていることは妥当であると言える。この点については、引き続き、大きく影響を受けていた head 部分全体や S3 蛋白質に着目し、サブユニットの会合を低下させる原因を探っていく必要がある。

また、h33d 欠失リボソームの表現型が、H38d22 や d34 と同様であって H38d9 とは同様でない点も着目したい。前章で H38d9 短縮化リボソームでの表現型の違いは A-site tRNA に起因するのではないかと結論付けた。h33d 欠失リボソームにおいて bridge B1a が弱まっている(電子密度が低下している)ということは、H38/ASF がリボソーム全体に対して固定されずふらふらしていると考えられる。H38 はその構造から分かるように(図 3, 6, 7B)、比較的真っ直ぐなステム構造であり、また転座反応時の H38 の大きな可動性は根元の kink-turn に因るとする報告(Razga, Koca et al. 2005)があることから、H38 の長いヘリックスの途中からではなく、H38 全体が動いていると考えられる。cryo 電子顕微鏡像では途中までは構造が確認できるが(図 25)、これは、根元を中心に揺れ動いているために先端に行く程電子密度の広がりが大きくなり可視化出来なくなっているのだろう。つまり、この h33d 欠失リボソームでは、bridge B1a の相互作用のみならず、A-site tRNA との相互作用も併せて弱まっていると推測される。この結果、A-site tRNA との相互作用部位の残る H38d9 とは表現型が異なり、bridge B1a と A-site tRNA 双方の相互作用が失われた H38d22、H38d34 と同様の表現型を示すこととなったのではないだろうか。この点に関しては、今後 h33d 欠失リボソームについて、A-site tRNA が結合した状態での cryo 電子顕微鏡像を得ることや、A-site への tRNA 結合能の評価が必要であろう。

また、h33 は bridge B1a を構成する S13 蛋白質と隣接しているため、その欠失が S13 に直接影響を及ぼして bridge B1a の相互作用を減弱させた可能性もある。しかし、h33 の欠失は head 全体の rearrangement を引き起こすため、この関係は簡単には説明出来ない。前章で言及した、S12 または S13、または S12 と S13 両方を除いて再構築したリボソームで観察される EF-G 非依存的な転座反応(Cukras, Southworth et al. 2003)との関係を含め、h33 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。

本章で記述した生化学的な観察は、前章の H38d 短縮化リボソームで見られた現象が bridge B1a としての相互作用を失うことにより引き起こされており、bridge B1a の消失が、EF-G のターンオーバーを加速することにより、この相互作用相手の切り替えを促進し、転座反応を加速することを示している。以上から、bridge B1a と ASF が翻訳精度を維持するために、転座反応を制御する機能的な減衰器として作用することをより明確に証明する結果であったと言える。

V. まとめ

蛋白質翻訳系は生物に必須の機構であり、そこには非常に多くの因子が関わり、複雑に相互作用をしている。また、その機構と構造は原核生物、真核生物、古細菌、ミトコンドリア、葉緑体等様々な系において普遍的に保存されている。本研究では 50S サブユニットの特徴的な構造である H38/ASF と、これが構成するサブユニット間架橋構造 bridge B1a に着目し、未だ詳細の明らかになっていない転座反応の分子メカニズムについての理解を深めることを目的とした。

23S rRNA 上の H38/ASF を短縮化した変異型リボソームを構築し、それが翻訳の各過程に及ぼす影響を検証した。また、リボソーム上の別の構造である h33(16S rRNA)の欠失により bridge B1a の相互作用を失った変異型リボソームについても、同様の検証を行った。この結果、これら変異型リボソームのどちらも大腸菌の生育に十分な翻訳活性を持つことが確認出来た。また、これらについての生化学的な解析から、以下のような結果が得られた。

- bridge B1a を構成する H38/ASF を短縮化したリボソームは高い転座反応活性を持つことが明らかとなった。
- H38/ASF の短縮化は+1 フレームシフトの頻度を上昇させる。
- 以上から、H38/ASF と bridge B1a は、転座反応を負に制御することによって、遺伝暗号の読み枠の維持に寄与していると考えられる。
- bridge B1a の相互作用が外れている別のリボソーム (h33 欠失リボソーム) においても、上の H38 短縮化リボソームと同様の現象が観察され、上記の仮説が支持された。

H38 短縮化リボソームは、低 EF-G 濃度下での翻訳反応において、WT より高い活性を示した。また、EF-Tu に対する挙動については、WT と H38 短縮化リボソームとの間で差異は観察されなかった。また、リボソームによる EF-G/GTPase 活性化反応においても、H38 短縮化リボソームは、EF-G による GTPase 反応を WT より高く活性化した。コントロールとして用いた他の bridge を構成する H34 や H68 を短縮化したリボソームではこのような現象は観察されなかった。従って、上で観察された H38 短縮化リボソームの転座反応の高活性はサブユニット間の bridge の数が減ったためではなく、H38/ASF と EF-G との相互作用に特異的な現象と言える。また、H38/ASF は A-site tRNA と相互作用することが知られているが、H38 短縮化リボソームは tRNA の結合やペプチド転移反応活性においては WT との差は見られなかった。そして、シングルラウンドの転座反応において H38 短縮化リボソームが WT より高い活性を示したことは、H38 短縮化が H38/ASF と EF-G

との相互作用を活性化することを明確に裏付けた。一方で、H38 短縮化リボソームでは翻訳精度に影響があり、WT より高い+1 フレームシフトを引き起こすことが明らかとなった。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ことにより、A-site への tRNA の結合が起こるまでの時間が長くなり、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、ASF の短縮化が転座反応時の 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と言える。

以上から、本研究で観察された事実は、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と言うことを証明しており、そして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とされる遺伝暗号の読み枠の維持に寄与しているものと考えられる。

また、30S サブユニットの nose を構成する h33 の欠失によって bridge B1a の相互作用が減弱した h33 欠失リボソームを用いて解析を行ったところ、サブユニット会合能が大きく低下していた。しかし、低 EF-G 濃度下での翻訳反応においては、H38 短縮化リボソーム程ではないが、WT より顕著に高い活性を示した。また、EF-Tu に対する挙動については、WT とも H38 短縮化リボソームとも同様の挙動を示した。また、リボソームによる EF-G/GTPase 活性化反応においても、h33 欠失リボソームは WT より高い充進能を示し、H38 短縮化リボソームに近い効率的な活性化が見られた。

以上の結果から、h33d 欠失リボソームは、サブユニット会合能を除いて、H38d22 短縮化リボソームによく類似した表現型を持っており、bridge B1a の結合が弱くなったことによって、H38 短縮化リボソームと同様に EF-G とリボソームの相互作用を促進していることが示唆される。

本論文で記述した生化学的な観察は、H38/ASF 短縮化や bridge B1a の相互作用の減弱が、EF-G のターンオーバーを加速することにより、この相互作用相手の切り替えを促進し、転座反応を加速することを示唆している。その結果、H38/ASF は翻訳反応において非常に重要な翻訳精度を維持するために、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。

VI. 今後の展望

H38/ASF 短縮化リボソームについて cryo 電子顕微鏡解析を行い、その構造を解明する予定である(R. K. Agrawal 博士との共同研究にて進行中)。本研究で用いた変異型リボソームによる EF-G 非依存的な転座反応の進行を、*p*CMB 処理の有無について検討し、EF-G による転座反応との共通点と相違点から、転座反応の分子メカニズムについての知見を得たいと考えている。サブユニット間架橋構造の相手である 30S サブユニット蛋白質 S13、S19 の転座反応に及ぼす影響について、S13 や S19 を除いて再構築したリボソームを用いて解析を行う。S13 や S19 と相互作用の出来ない H38 の置換変異体や S13 変異体の探索を行う。

将来的には、転座の反応の中のさらに素過程である EF-G のリボソームへの結合や GTP の結合、GTP の分解、Pi の放出、tRNA: mRNA complex の移動について、H38 短縮化リボソームを用いた解析を行い、転座反応の詳細な分子メカニズムについて理解を深めたい。

また、転座反応以外については、H38/ASF の短縮化が伸長反応以外の開始、終結、リボソーム再生に及ぼす影響を検討する。H38d9 短縮化リボソームについて、A-site tRNA との相互作用に着目してさらに解析を進める。h33 欠失リボソームについては、さらに、伸長過程、転座反応に関するより詳細な解析を行うと共に、会合能の低下をもたらした原因についても探っていきたい。

VII. 参考文献

- Agrawal, R. K., A. B. Heagle, et al. (1999). "EF-G-dependent GTP hydrolysis induces translocation accompanied by large conformational changes in the 70S ribosome." *Nat Struct Biol* **6**(7): 643-7.
- Agrawal, R. K., M. R. Sharma, et al. (2004). "Visualization of ribosome-recycling factor on the Escherichia coli 70S ribosome: functional implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(24): 8900-5.
- Allen, G. S., A. Zavialov, et al. (2005). "The cryo-EM structure of a translation initiation complex from Escherichia coli." *Cell* **121**(5): 703-12.
- Asai, T., D. Zaporozhets, et al. (1999). "An Escherichia coli strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: complete exchange of rRNA genes between bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 1971-6.
- Ban, N., P. Nissen, et al. (2000). "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution." *Science* **289**(5481): 905-20.
- Baranov, P. V., R. F. Gesteland, et al. (2004). "P-site tRNA is a crucial initiator of ribosomal frameshifting." *Rna* **10**(2): 221-30.
- Carter, A. P., W. M. Clemons, et al. (2000). "Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics." *Nature* **407**(6802): 340-8.
- Conway, T. W. and F. Lipmann (1964). "Characterization of a Ribosome-Linked Guanosine Triphosphatase in Escherichia Coli Extracts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **52**: 1462-9.
- Cukras, A. R. and R. Green (2005). "Multiple effects of S13 in modulating the strength of intersubunit interactions in the ribosome during translation." *J Mol Biol* **349**(1): 47-59.
- Cukras, A. R., D. R. Southworth, et al. (2003). "Ribosomal proteins S12 and S13 function as control elements for translocation of the mRNA:tRNA complex." *Mol Cell* **12**(2): 321-8.
- Donly, B. C., C. D. Edgar, et al. (1990). "Frameshift autoregulation in the gene for Escherichia coli release factor 2: partly functional mutants result in frameshift enhancement." *Nucleic Acids Res* **18**(22): 6517-22.
- Farabaugh, P. J. (2000). "Translational frameshifting: implications for the mechanism of translational frame maintenance." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **64**: 131-70.
- Frank, J. and R. K. Agrawal (2000). "A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation." *Nature* **406**(6793): 318-22.
- Gao, H., J. Sengupta, et al. (2003). "Study of the structural dynamics of the E coli 70S ribosome using real-space refinement." *Cell* **113**(6): 789-801.
- Gavrilova, L. P., V. E. Koteliansky, et al. (1974). "Ribosomal protein S12 and 'non-enzymatic' translocation." *FEBS Lett* **45**(1): 324-8.
- Gavrilova, L. P. and A. S. Spirin (1971). "Stimulation of 'non-enzymic' translocation in ribosomes by

- p-chloromercuribenzoate." *FEBS Lett* **17**(2): 324-326.
- Gavrilova, L. P. and A. S. Spirin (1974). "Interaction of SH-reagents with the ribosomal 30 S subparticle and 'non-enzymatic' translocation." *FEBS Lett* **39**(1): 13-6.
- Geigenmüller, U., T. P. Hausner, et al. (1986). "Analysis of the puromycin reaction. The ribosomal exclusion principle for AcPhe-tRNA binding re-examined." *Eur J Biochem* **161**(3): 715-21.
- Hanada, T., T. Suzuki, et al. (2001). "Translation ability of mitochondrial tRNAs^{Ser} with unusual secondary structures in an in vitro translation system of bovine mitochondria." *Genes Cells* **6**(12): 1019-30.
- Harms, J., F. Schluenzen, et al. (2001). "High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium." *Cell* **107**(5): 679-88.
- Hirabayashi, N., N. S. Sato, et al. (2006). "Conserved loop sequence of helix 69 in Escherichia coli 23 S rRNA is involved in A-site tRNA binding and translational fidelity." *J Biol Chem* **281**(25): 17203-11.
- Joseph, S. and H. F. Noller (1998). "EF-G-catalyzed translocation of anticodon stem-loop analogs of transfer RNA in the ribosome." *Embo J* **17**(12): 3478-83.
- Karimi, R., M. Y. Pavlov, et al. (1999). "Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation." *Mol Cell* **3**(5): 601-9.
- Kirino, Y., T. Yasukawa, et al. (2004). "Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(42): 15070-5.
- Klaholz, B. P., A. G. Myasnikov, et al. (2004). "Visualization of release factor 3 on the ribosome during termination of protein synthesis." *Nature* **427**(6977): 862-5.
- Leder, P. and H. Bursztyn (1966). "Initiation of protein synthesis II. A convenient assay for the ribosome-dependent synthesis of N-formyl-C¹⁴-methionylpuromycin." *Biochem Biophys Res Commun* **25**(2): 233-8.
- Lodmell, J. S. and A. E. Dahlberg (1997). "A conformational switch in Escherichia coli 16S ribosomal RNA during decoding of messenger RNA." *Science* **277**(5330): 1262-7.
- Miller, J. H. (1992). *A Short Course in Bacterial Genetics: a Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria.*: 72-74.
- Moazed, D. and H. F. Noller (1989). "Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome." *Nature* **342**(6246): 142-8.
- Moreno, J. M., H. P. Sorensen, et al. (2000). "Macromolecular mimicry in translation initiation: a model for the initiation factor IF2 on the ribosome." *IUBMB Life* **50**(6): 347-54.
- Nierhaus, K. H. (2006). "Decoding errors and the involvement of the E-site." *Biochimie* **88**(8): 1013-9.
- O'Connor, M., C. L. Thomas, et al. (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**(6): 1185-93.
- Ogle, J. M., D. E. Brodersen, et al. (2001). "Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit." Science **292**(5518): 897-902.
- Ogle, J. M., A. P. Carter, et al. (2003). "Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures." Trends Biochem Sci **28**(5): 259-66.
- Ogle, J. M., F. V. Murphy, et al. (2002). "Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form." Cell **111**(5): 721-32.
- Ogle, J. M. and V. Ramakrishnan (2005). "Structural insights into translational fidelity." Annu Rev Biochem **74**: 129-77.
- Osswald, M., T. Doring, et al. (1995). "The ribosomal neighbourhood of the central fold of tRNA: cross-links from position 47 of tRNA located at the A, P or E site." Nucleic Acids Res **23**(22): 4635-41.
- Pavlov, M. Y., D. V. Freistoffer, et al. (1997). "Release factor RF3 abolishes competition between release factor RF1 and ribosome recycling factor (RRF) for a ribosome binding site." J Mol Biol **273**(2): 389-401.
- Phelps, S. S., O. Jerinic, et al. (2002). "Universally conserved interactions between the ribosome and the anticodon stem-loop of A site tRNA important for translocation." Mol Cell **10**(4): 799-807.
- Phelps, S. S., A. Malkiewicz, et al. (2004). "Modified nucleotides in tRNA(Lys) and tRNA(Val) are important for translocation." J Mol Biol **338**(3): 439-44.
- Polacek, N. and A. S. Mankin (2005). "The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition." Crit Rev Biochem Mol Biol **40**(5): 285-311.
- Razga, F., J. Koca, et al. (2005). "Hinge-like motions in RNA kink-turns: the role of the second a-minor motif and nominally unpaired bases." Biophys J **88**(5): 3466-85.
- Rinke-Appel, J., N. Junke, et al. (1995). "The ribosomal environment of tRNA: crosslinks to rRNA from positions 8 and 20:1 in the central fold of tRNA located at the A, P, or E site." Rna **1**(10): 1018-28.
- Rodnina, M. V., M. Beringer, et al. (2006). "How ribosomes make peptide bonds." Trends Biochem Sci.
- Rodnina, M. V., A. Savelsbergh, et al. (1997). "Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome." Nature **385**(6611): 37-41.
- Rodnina, M. V., A. Savelsbergh, et al. (1999). "Thiostrepton inhibits the turnover but not the GTPase of elongation factor G on the ribosome." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(17): 9586-90.
- Sato, N. S., N. Hirabayashi, et al. (2006). "Comprehensive genetic selection revealed essential bases in the peptidyl-transferase center." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(42): 15386-91.
- Schuwirth, B. S., M. A. Borovinskaya, et al. (2005). "Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution." Science **310**(5749): 827-34.

- Selmer, M., S. Al-Karadaghi, et al. (1999). "Crystal structure of *Thermotoga maritima* ribosome recycling factor: a tRNA mimic." Science **286**(5448): 2349-52.
- Sergiev, P. V., S. V. Kiparisov, et al. (2005). "The conserved A-site finger of the 23S rRNA: just one of the intersubunit bridges or a part of the allosteric communication pathway?" J Mol Biol **353**(1): 116-23.
- Sharma, M. R., E. C. Koc, et al. (2003). "Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins." Cell **115**(1): 97-108.
- Shimizu, Y., A. Inoue, et al. (2001). "Cell-free translation reconstituted with purified components." Nat Biotechnol **19**(8): 751-5.
- Southworth, D. R., J. L. Brunelle, et al. (2002). "EFG-independent translocation of the mRNA:tRNA complex is promoted by modification of the ribosome with thiol-specific reagents." J Mol Biol **324**(4): 611-23.
- Spahn, C. M., R. Beckmann, et al. (2001). "Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions." Cell **107**(3): 373-86.
- Spedding, G. e. (1990). Isolation and Analysis.
- Stark, H., E. V. Orlova, et al. (1997). "Arrangement of tRNAs in pre- and posttranslocational ribosomes revealed by electron cryomicroscopy." Cell **88**(1): 19-28.
- Stark, H., M. V. Rodnina, et al. (1997). "Visualization of elongation factor Tu on the *Escherichia coli* ribosome." Nature **389**(6649): 403-6.
- Stark, H., M. V. Rodnina, et al. (2000). "Large-scale movement of elongation factor G and extensive conformational change of the ribosome during translocation." Cell **100**(3): 301-9.
- Sundararajan, A., W. A. Michaud, et al. (1999). "Near-cognate peptidyl-tRNAs promote +1 programmed translational frameshifting in yeast." Mol Cell **4**(6): 1005-15.
- Suzuki, T., T. Suzuki, et al. (2001). "Novel taurine-containing uridine derivatives and mitochondrial human diseases." Nucleic Acids Res Suppl(1): 257-8.
- Teraoka, H. and K. Tanaka (1971). "Reaction of puromycin with N-acetylphenylalanyl-tRNA on ribosomes reassociated from *Escherichia coli* ribosomal subunits." Biochim Biophys Acta **247**(2): 304-9.
- Terasaki, M., T. Suzuki, et al. (2004). "Functional compatibility of elongation factors between mammalian mitochondrial and bacterial ribosomes: characterization of GTPase activity and translation elongation by hybrid ribosomes bearing heterologous L7/12 proteins." J Mol Biol **336**(2): 331-42.
- Valle, M., A. Zavialov, et al. (2003). "Locking and unlocking of ribosomal motions." Cell **114**(1): 123-34.
- Wimberly, B. T., D. E. Brodersen, et al. (2000). "Structure of the 30S ribosomal subunit." Nature **407**(6802): 327-39.
- Yonath, A. (2005). "Ribosomal crystallography: peptide bond formation, chaperone assistance and antibiotics activity." Mol Cells **20**(1): 1-16.

Youngman, E. M., J. L. Brunelle, et al. (2004). "The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release." Cell **117**(5): 589-99.

Yusupov, M. M., G. Z. Yusupova, et al. (2001). "Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution." Science **292**(5518): 883-96.

Zavialov, A. V., V. V. Hauryliuk, et al. (2005). "Guanine-nucleotide exchange on ribosome-bound elongation factor G initiates the translocation of tRNAs." J Biol **4**(2): 9.

志村令郎 and 渡辺公綱 共編 (2000). RNA 研究の最前線: 128. (Springer Verlag 東京)

VIII. 謝辞

本研究を行うにあたり、恵まれた研究環境を与えて下さり、有益な議論とご指導を賜り、校閲の労をとられた東京大学工学系研究科助教授鈴木勉博士(遺伝子発現工学研究室)に深く感謝致します。実験についてきめ細かいご助言を頂いた東京大学新領域創成科学研究科構造生命工学研究室研究員佐藤さとみネウザ博士には、非常に感謝しております。

自然科学研究機構基礎生物学研究所研究員花田孝雄博士には、何かとご相談させて頂き、ご指導、アドバイスを頂戴し、大変感謝しております。

構造生命工学研究室の難波直樹氏、寺崎真樹博士には、色々な実験についてご指導頂き、感謝致します。遺伝子発現工学研究室の宮内健常氏、平林直己博士、桐野陽平博士、佐藤文博士、北原圭氏、横山武司氏、新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻の梅影創博士、遺伝子発現工学研究室の黄宗博士、研究員張立博士には、個々の実験についての有意義な議論やサンプルの供与を頂く等、大変お世話になりました。心から、感謝致します。

また、共同研究を快諾して下さった University of California, San Diego の Simpson Joseph 助教授、Steven S. Phelps 博士、New York State University の Rajendra K. Agrawal 博士には、素晴らしい成果を共有させて頂き、心より感謝致します。有難う御座いました。

快くサンプルを供与して下さった Tufts University の Catharine L. Squires 博士、University of Missouri-Kansas City の Michael O'Connor 博士、Brown University の Al Dahlberg 博士、新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻の清水義宏博士のご好意に感謝いたします。

遺伝子発現工学研究室秘書の鈴木知子さんには、事務的なことで大変お世話になり、またいつも細やかに気を配っていただき、本当に感謝しております。

また、研究生生活において様々な協力と激励を下さり、また時に色々な意見交換をさせて頂いた、構造生命工学研究室、遺伝子発現工学研究室の皆様、そしてお世話になった全ての方々に、感謝致します。