

学位論文

大腸菌 23S リボソーム RNA における  
保存領域の機能解析

東京大学大学院 新領域創成科学研究科  
先端生命科学専攻

平林直己

# 目次

序論	1
第 1 章 序論	14
SSER 法の原理	24
方法と手順 (SSER 法)	27
SSER 法	27
Bscan 法	31
SSER 法による機能的リボソーム変異体の選択	31
Bscan 法による機能配列の決定	32
試薬と機器	33
手順	35
プラスミドの作製	35
プラスミドのメチル化	36
プラスミドの精製	36
トランスフォーメーション	37
コロニーの選別	37
生育速度の測定	37
23S rRNA の H69 領域のランダムイズとライブラリーの作成	38
SSER 法による機能的リボソーム変異体の選択	39
Bscan による機能配列の決定と H69 への塩基の挿入および欠失	40

サブユニット間の会合状態の検証	43
試薬と機器	43
手順	44
$\beta$ ガラクトシダーゼ活性による翻訳精度の測定	45
試薬と機器	45
手順	46
ポリウリジン依存ポリフェニルアラニン合成反応	47
試薬と機器	47
手順	47
P-site binding	49
試薬と機器	49
手順	50
A-site binding	51
試薬と機器	51
手順	52

結果	54
23S rRNAヘリックス69の機能配列の決定	54
H69変異体の生育速度の検証	59
H69変異体におけるサブユニット会合状態の検証	61
H69の保存領域は翻訳の正確性に影響を及ぼす	64
H69のタンパク質合成に対する影響	67
tRNAのA-siteとP-siteにおけるH69との結合	70
まとめと考察	72
第2章 序論	79
方法と手順 (プライマー伸長法)	83
CMC 化学修飾	83
試薬と機器	83
手順	84
プライマー伸長法	84
試薬と機器	84

手順	85
結果	87
まとめと考察	90
引用論文	93
謝辞	97

## 序論

タンパク質生合成すなわち翻訳は、生命の情報と機能を結びつける最も根元的な生命過程である。その基本的なしくみは全生物に共通で RNA が深く関与している。ワトソンとクリックが DNA の二重らせんを発表した 1953 年当時、すでに翻訳こそが生命の本質を解く鍵であり、そこに関わる遺伝物質は DNA ではなく RNA だということが認識されていた。続いてタンパク質生合成に使われるアミノ酸がトランスファーRNA (tRNA) と呼ばれるアダプター分子に結合すること、直接の鋳型がメッセンジャーRNA (mRNA) であること、そしてリボソームがタンパク質合成の場であることが明らかになった。

翻訳反応の場を提供するリボソームはリボソーム RNA(rRNA)とタンパク質から構成された質量比が 2:1 の複合体で、30S という分子量約 90 万 Da の小サブユニットと 160 万 Da の 50S という大サブユニットの会合体であることが知られている。30S は鎖長約 1600 の 16S rRNA と 21 個のリボソームタンパク質(S1~S21)からなり、50S は鎖長約 2900 の 23S rRNA と鎖長 120 の 5S rRNA、34 個のリボソームタンパク質(L1~L34)からなる。リボソームの立体構造は 2000 年から 2001 年にかけて解明され、大サブユニットリボソーム (50S) は好塩基性古細菌 *Haloarcula marismortui* 由来<sup>1</sup>、放射線耐性細菌 *Dainococcus radiodurans* 由来<sup>2</sup>のものが解析されており、小サブユニットリボソーム (30S) は高度高熱菌 *Thermus thermophilus* のものが 2 つのグループから報告されている<sup>3,4</sup>。また、リボソーム全体 (70S) の立体構造として *Thermus thermophilus* 由来<sup>5</sup>のものが解析されており、tRNA と mRNA が結合した複合体の状態でも報告されている。また最近の報告では大腸菌 *E. coli* のリボソームの立体構造<sup>6</sup>も明らかになった(図.0-1)。

これらの立体構造の解析結果からリボソームの機能が原子レベルで解明されようとしている。リボソームの 50S、30S いずれのサブユニットも rRNA が立体的に折りたたまれることによって基本的な骨格を形成している。サブユニットの会合面は RNA で占められており

リボソーム表面はタンパク質によって覆われている。そして多くのリボソームタンパク質は球状のドメインと長く伸びたペプチド鎖で構成されており、そのペプチド鎖の部分がRNA鎖に深く入り込みRNAの構造を安定化している。リボソームの主要な機能部位はサブユニットの会合面に存在しており、RNAの働きを外側からタンパク質が支える構造になっている(図.0-1)。サブユニットの会合面はほとんどRNA-RNA、またはRNA-タンパク質相互作用で達成されており、tRNAの接触相手もほとんどがrRNAであることからリボソームの機能がRNAで担われていることが明確になった。

30S小サブユニットはmRNAとtRNAのアンチコドン領域を結合し、コドン解読反応を行う。その反応を担う16S rRNAは4つのドメインから構成されるが、そのうち3'マイナードメイン(3'末端の1400~1542)に機能部位が集中している。主な機能部位はmRNAのSD配列を認識してリボソームに固定する役割を持つアンチSD配列とmRNAのコドンをA-siteに固定する暗号解読センター(decoding center:1400~1410と1490~1502)である。

50S大サブユニットはtRNAのCCA末端領域(後述)を結合し、ペプチドの重合反応を行うが、その主要な反応場所は23S rRNAの6つのドメインのうち5番目のドメインVに存在し、ペプチジルトランスフェラーゼセンター(PTC)と呼ばれている。また、50Sには開始反応(IF2)、伸長反応(EF-TuおよびEF-G)、終結反応(RF3)の各ステップにおけるGTP加水分解反応を担う共通のGTPaseセンター(ドメインII)が存在する(図.0-2)。リボソーム上には30Sと50SサブユニットにまたがってtRNAの結合部位が3つ存在し、mRNAの下流から上流に向かって、アミノアシルtRNA(aa-tRNA)の取り込み口であるA-site、開始tRNA(f-Met-tRNA)と合成中のペプチドのついたtRNA(pep-tRNA)のみが結合するP-site、それにペプチドを失ったtRNAの出口となるE-siteが位置する(図.0-3)。

最近の研究から、リボソームの重要な機能であるペプチド結合形成反応の活性を担っている大サブユニットリボソームにおいて、その活性中心がすべてリボソームRNAによって

形成されていることが明らかとなり RNA が触媒するペプチド転移反応の機構が提唱された<sup>7</sup>。ペプチド転移反応の遷移状態を模倣したアナログを使用し、ペプチド転移反応の阻害活性を持つ合成化合物(CCdAp-ピューロマイシン)を 50S サブユニットの結晶にしみこませた実験では、そのアナログは結晶構造を崩さずにそれまで生化学的に同定されていたドメイン V 中の PTC 領域に充填されることがわかった。その結果、ペプチドの転移点から半径 18Å 以内にはタンパク質がまったく存在しないことが判明し、ペプチド転移反応は RNA だけで行われることが明らかになった。

このようにペプチド転移反応はリボソーム自身によって触媒されるが、タンパク質の翻訳のためにはリボソームのほかにもさまざまな翻訳因子が必要となる。tRNA は翻訳過程に関わる RNA としては最小分子で、およそ 80 個のヌクレオチドからなる鎖が分子内の相補的な塩基対形成によってクローバーリーフ状に折りたたまれ、さらに L 型の三次元立体構造をとる (図.0-4)。tRNA は 5'末端から 3'末端に向かって 1~76 と番号を付ける。中央の真中にあるアンチコドンと呼ばれる 3 個のヌクレオチド残基は 34、35、36 位で、30S 小サブユニットのデコーディングセンターで mRNA に対応した aa-tRNA の認識が行われる。tRNA の 3'末端にはどの tRNA にも共通の CCA 末端が存在し、この末端 A 残基のリボース部分にアミノ酸がエステル結合することにより活性化され、リボソーム上でのタンパク質合成の直接の基質となる。さらに、翻訳に関連する因子としてアミノ酸を対応する tRNA へ結合させるアミノアシル tRNA 合成酵素がある。アミノアシル tRNA 合成酵素はアミノ酸と tRNA の結合を触媒するが、この反応はペプチド結合生成のためのアミノ酸の活性化を兼ねており、2 個の高エネルギーリン酸結合を消費する。アミノ酸と tRNA を正しく対応させることは翻訳の正確さを決定する重要な段階のひとつであり、この酵素は tRNA の構造を認識する精緻な仕組みと、構造が類似したアミノ酸を見分ける校正機能を併せ持っている。また、アミノアシル tRNA (aa-tRNA) をリボソームへと運ぶ EF-Tu、mRNA と tRNA を 1 コドン分ずらす転座反応を触媒する EF-G などがある。



原核生物のタンパク質合成においてはさまざまな翻訳因子が関与しているが、ペプチドの伸長において、A-site のコドンに対応するアンチコドンをもつ aa-tRNA が EF-Tu と GTP で三者複合体を形成し、リボソームの A-site へ導入される (図.0-5)。この状態を A/T state といい、また最近の報告では、この複合体を形成している tRNA はねじれた構造をとっていることが示唆され、このねじれた構造を tRNA が形成することで tRNA のアンチコドン不意が小サブユニットのデコーディングセンターに結合が可能になる molecular spring という説が提唱された (図.0-5A)。このときにその対合が正しいければ EF-Tu の GTP が加水分解され tRNA のアミノアシル末端が 50S 大サブユニットの A-site へと導入される。しかし、コドンアンチコドンの対合が正しいものでなければ GTP は加水分解されずに tRNA はリボソームから遊離する。したがって 30S 小サブユニットは何らかの形で正しいコドンアンチコドンの対合をモニターし、その結果を 50S 大サブユニットに伝えることで間接的に EF-Tu の GTP 加水分解を引き起こすと考えられるがその詳細については明らかになっていない。次に 50S 大サブユニット中のペプチジルトランスフェラーゼセンター(PTC)において、P-site に位置するペプチジル tRNA は A-site のアミノアシル tRNA のアミノ末端にペプチド結合を形成しアミノ酸の重合が行われる (図.0-5B.C)。このとき、50S 大サブユニット中の 23S rRNA がこの反応を触媒すると考えられている。次に伸長因子のひとつである EF-G が GTP の GDP への加水分解エネルギーを用いて mRNA を両 tRNA ごと 1 コドン分移動させ、P-site tRNA は E-site に、A-site の aa-tRNA は P-site へ移動し、伸長反応が進行する (トランスロケーション)。

翻訳反応におけるリボソームの構造、機能相関は主に生化学、分子生物学の手法と遺伝子工学や構造生物学を駆使して調べられてきた。そして、ペプチドの重合過程において rRNA はその反応を直接触媒していると予測された。1981 年にノラーらは大腸菌の rRNA 遺伝子の全塩基配列を決定し<sup>8</sup>、その二次構造予測から 23S rRNA が 6 個の機能ドメインからなることを明らかにしたが、その後の種々の生物由来の rRNA が解析されるにつれてこ

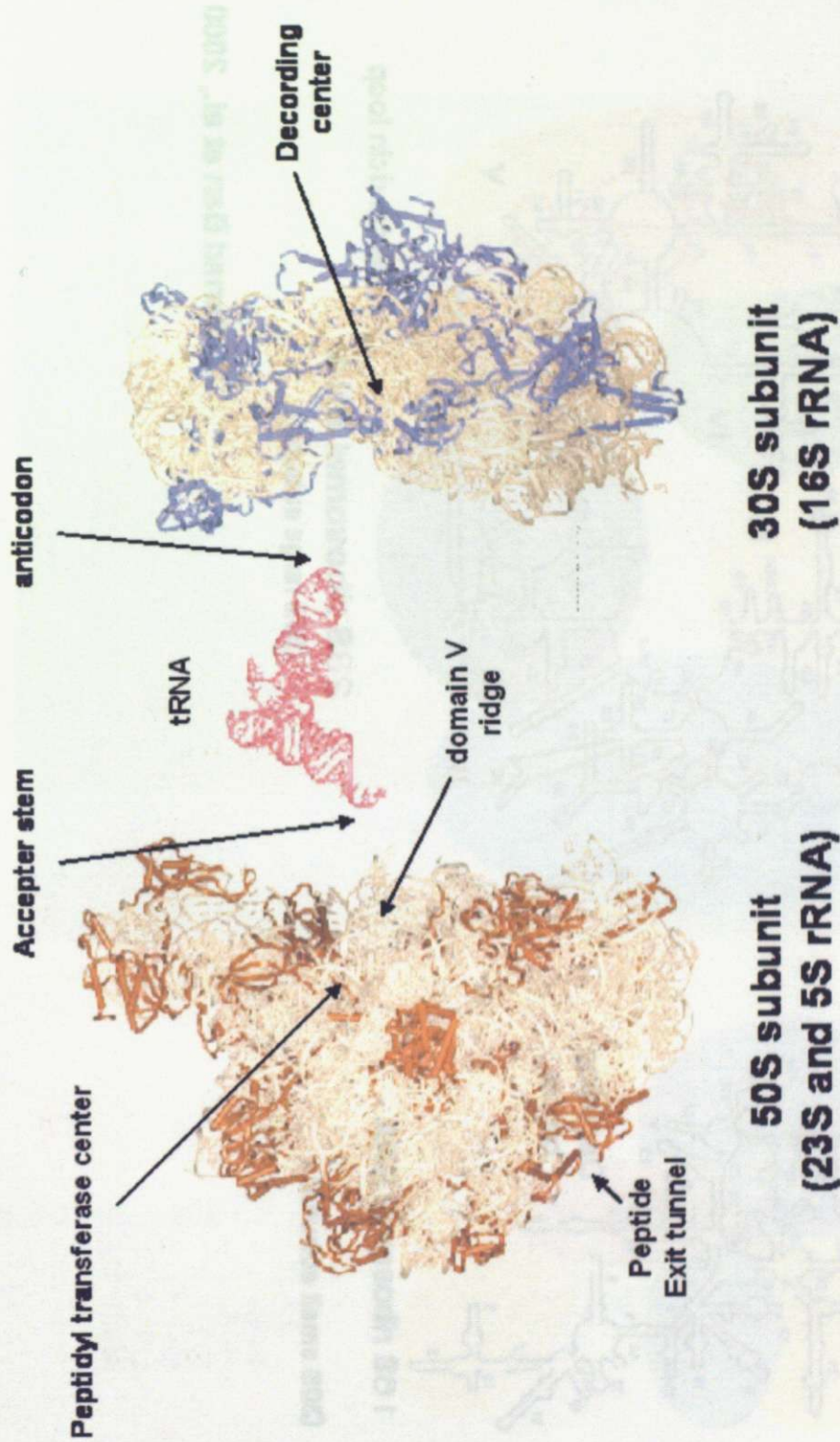
これらのドメインの機能的に重要と思われる領域はすべての生物種で保存されていることが明らかになった(<http://www.rna.icmb.utexas.edu>)。(図.0-6) 一方、リボソームタンパク質は生物種によって変化が激しく保存性がほとんどないこと、リボソームの再構成実験でいくつかのタンパク質を除いても活性のあるリボソームが得られること、翻訳反応を阻害する抗生物質はほとんどの場合 rRNA を標的にすることなど、これらのことからリボソームの機能は主に rRNA に担われていてタンパク質はその足場を作っているに過ぎないと考えられる。このことからタンパク質の合成のメカニズムはすべての生物に共通かつ普遍的で、その機能は rRNA 自身が担い、さらにその起源は同一であることが示唆される。

このような観点から、リボソームの塩基配列において種を超えて保存されている領域の保存性の意義を実験的に検証することは、リボソーム研究において、とりわけいまだ明らかになっていないタンパク質合成の詳細なメカニズムの解明に大変有用であるといえる。現在、リボソームの研究は構造解析や、生化学的な実験によりそれぞれのペプチドの伸長過程におけるタンパク質合成のメカニズムの解析が行われているが、その一連の連続した合成過程は明らかになっていない。また、生命の根本的なプロセスであるタンパク質合成メカニズムの解析は、そのもっとも根元的な生命過程を解析することで生命の進化的な疑問を解明する手がかりになりうると思われる。このような見地から本研究ではタンパク質合成のメカニズムの解明を目的とし、生化学的な実験を行った。

そこで本研究では rRNA の非常に高く保存された領域の機能的重要性を知るために、本研究室で新規に開発された SSER 法(systematic selection of functional sequence by enforced replacement)と名づけた実験手法を使い、rRNA の塩基配列をランダムにしたライブラリーの中から、リボソームとしての機能に必要な不可欠な配列(機能配列)を決定した。この方法は目的の rRNA 領域の塩基配列をランダムに組み合わせたライブラリーを作り、その中からリボソームとしてのタンパク質合成機能を持つ変異体のみを回収する手法で、この実験によって目的領域の rRNA の機能配列を決定できる。本研究では塩基配列が

非常に高く保存されているが機能未知の領域であるヘリックス 69 (H69) について、この SSER 法を用いて機能配列を決定した。さらに、その得られた変異体を用いてタンパク質合成における役割について解析を行った。

H69 は非常に高くその二次構造が保存されている領域であり、3 つの修飾塩基が含まれる。そしてこの修飾塩基はすべて同一の修飾酵素 RluD によってその修飾を受けている (図.1-1)。また H69 の修飾塩基 1915 にはシュードウリジル化のほかにメチル化酵素によってメチル化の修飾もを受けている。このメチル化酵素は現在のところ同定されていない。本研究の第 2 章では、H69 の修飾塩基についてプライマーエクステンション法を用いて変異体の修飾塩基を検出した。そして、その修飾を司る修飾酵素 RluD の認識機構についても検討した。



Joseph D. Puglisi et al., 2000

図.0-1 リボソームの立体構造。大サブユニットと小サブユニットの会合面は平らな構造になっている。tRNAの3'末端はPTCに結合し、アンチコドンは小サブユニットのデコーディングセンターに結合する。

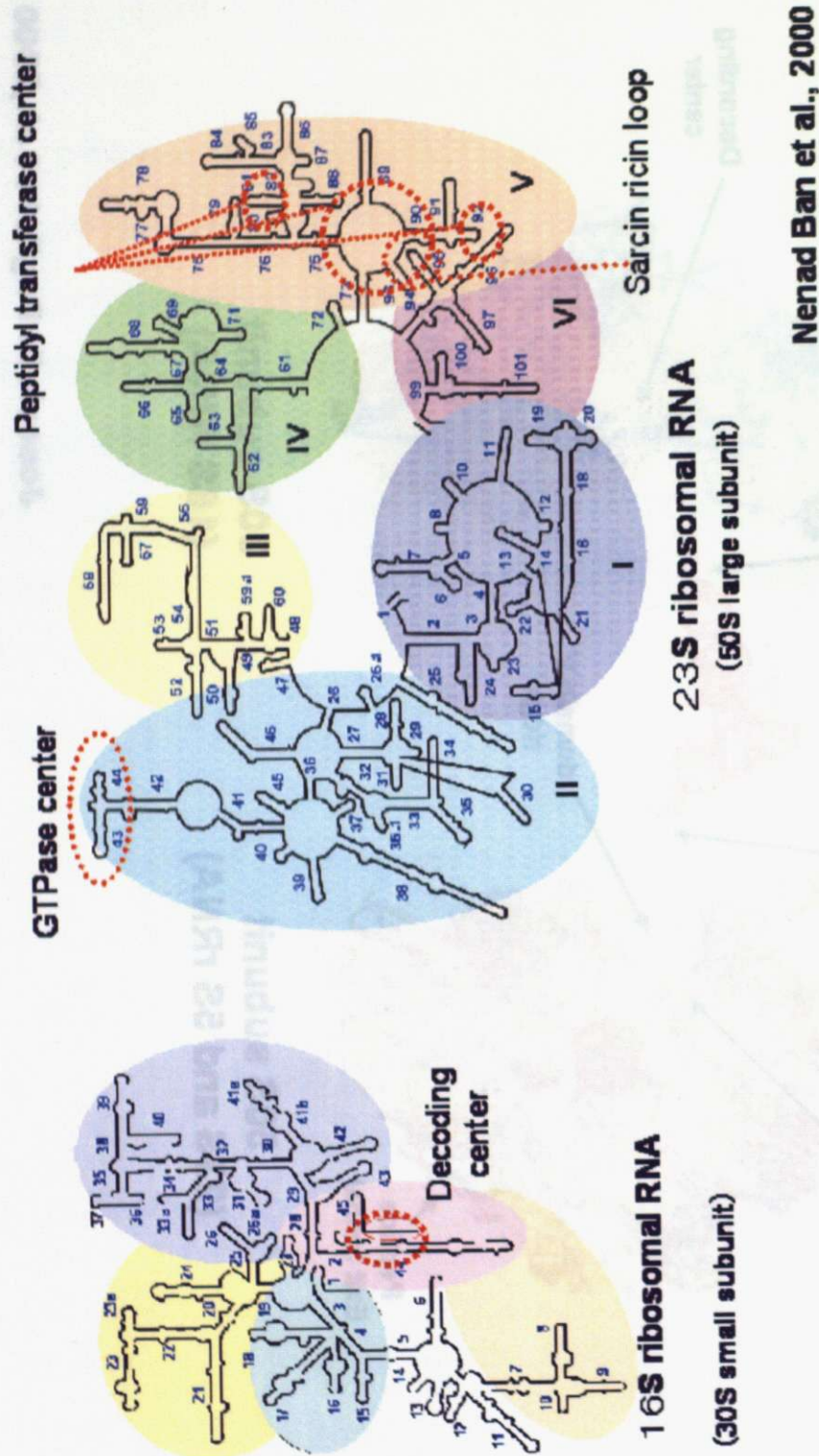


図. 0-2 16S rRNAと23S rRNAの二次構造。rRNAは各ドメインに分かれ、機能部位を持つ。

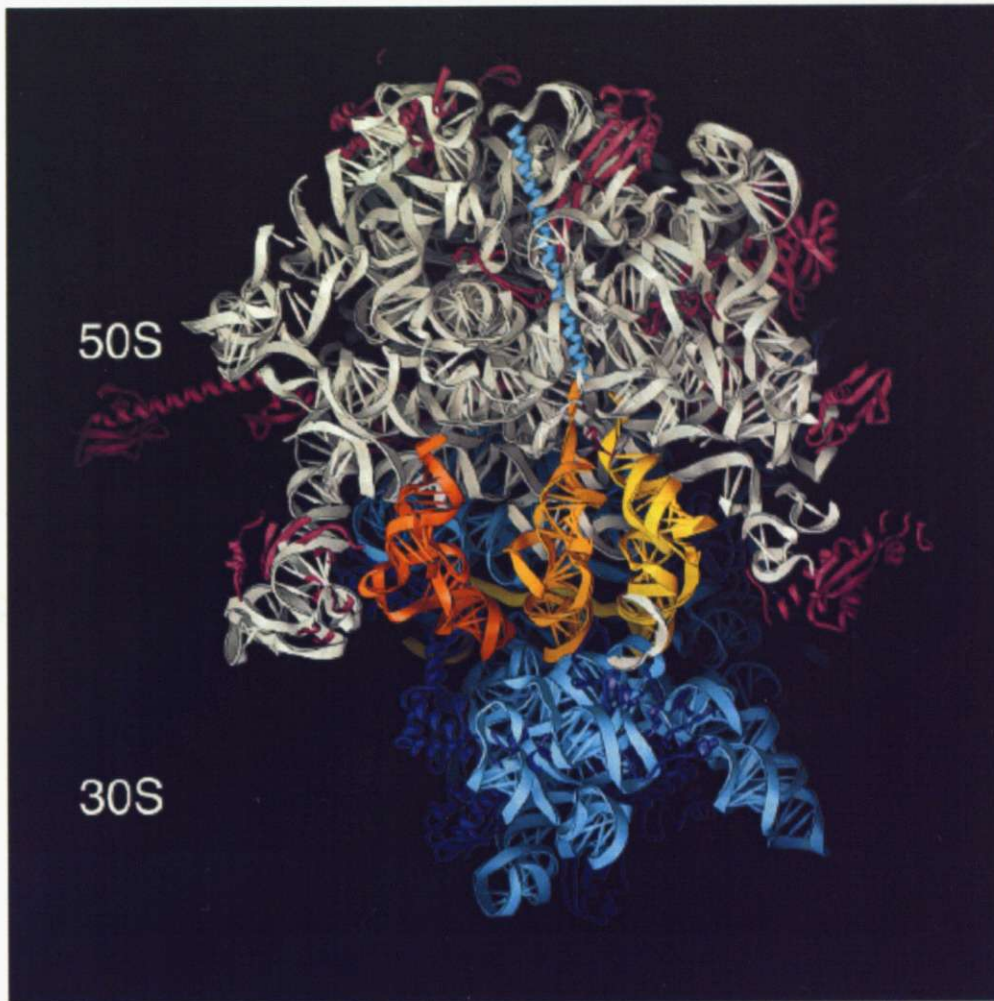


図. 0-3 tRNAの結合した状態のリボソーム。tRNAはそれぞれ、A-site (黄色) P-site (オレンジ)、E-site (暗いオレンジ) に位置している。16S(シアン) 23S(グレー) 小サブユニットタンパク質(青色) 大サブユニットタンパク質(マゼンタ)。新生ペプチドは $\alpha$ ヘリックスの構造でペプチドトンネルから出て行く。tRNAはA-siteからP-site、E-siteへ順に移動する。

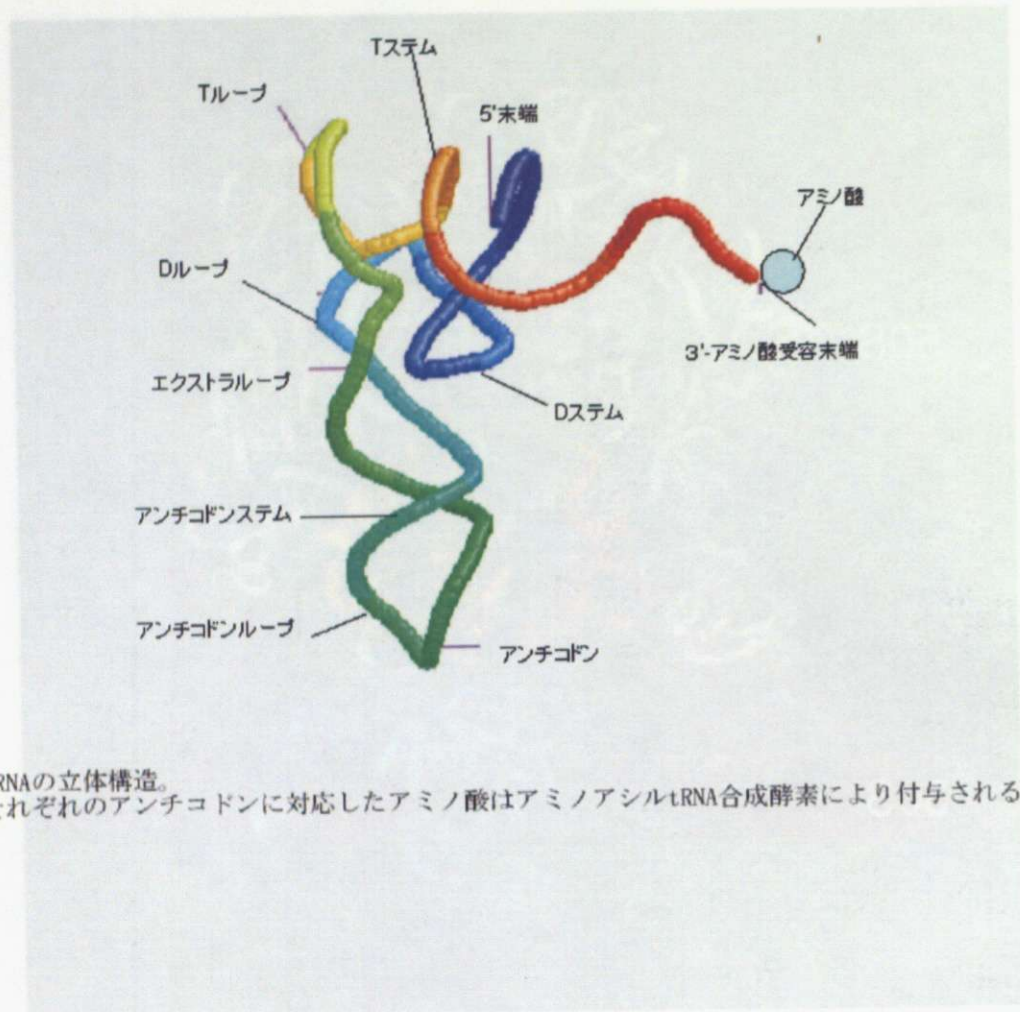


図. 0-4 tRNAの立体構造。  
 それぞれのアンチコドンに対応したアミノ酸はアミノアシルtRNA合成酵素により付与される

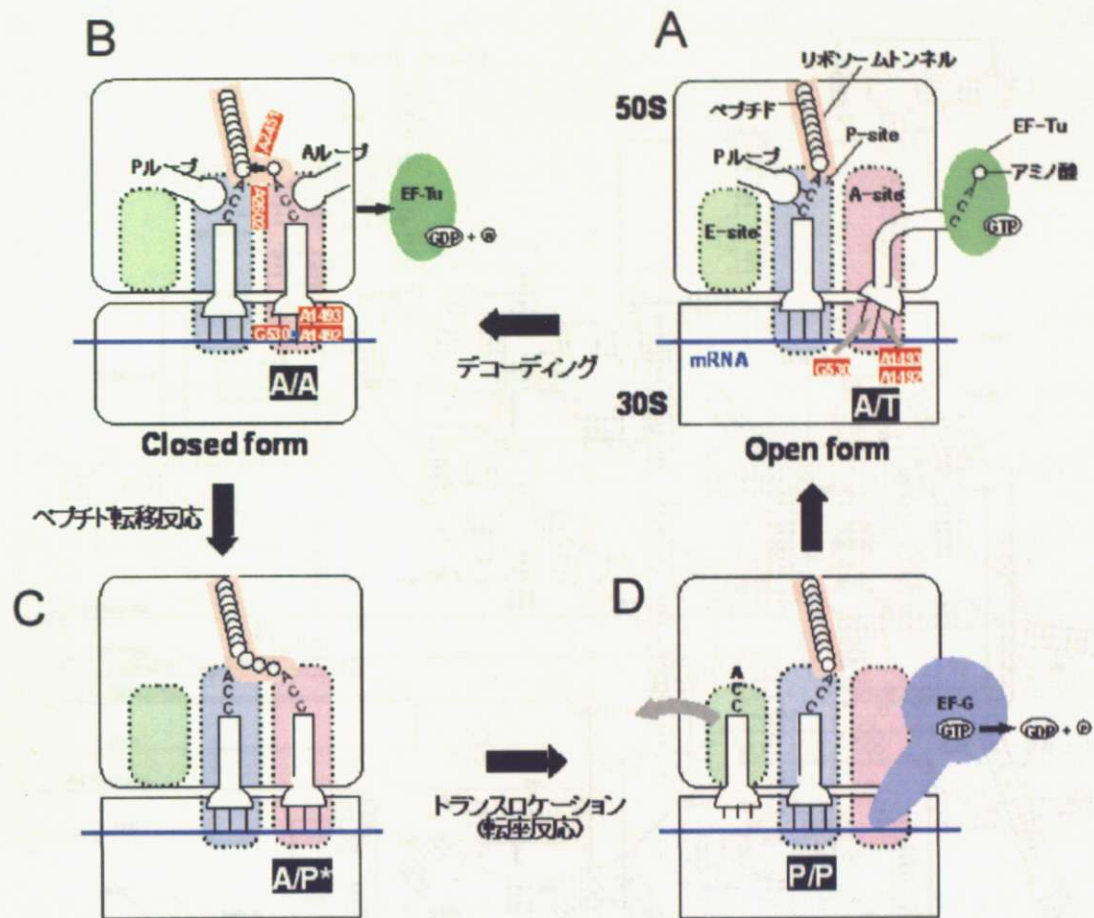


図.0-5 タンパク質合成におけるペプチド伸長反応。  
 ペプチド合成にはさまざまな因子が関与し、この反応の繰り返りでタンパク質合成が進む。



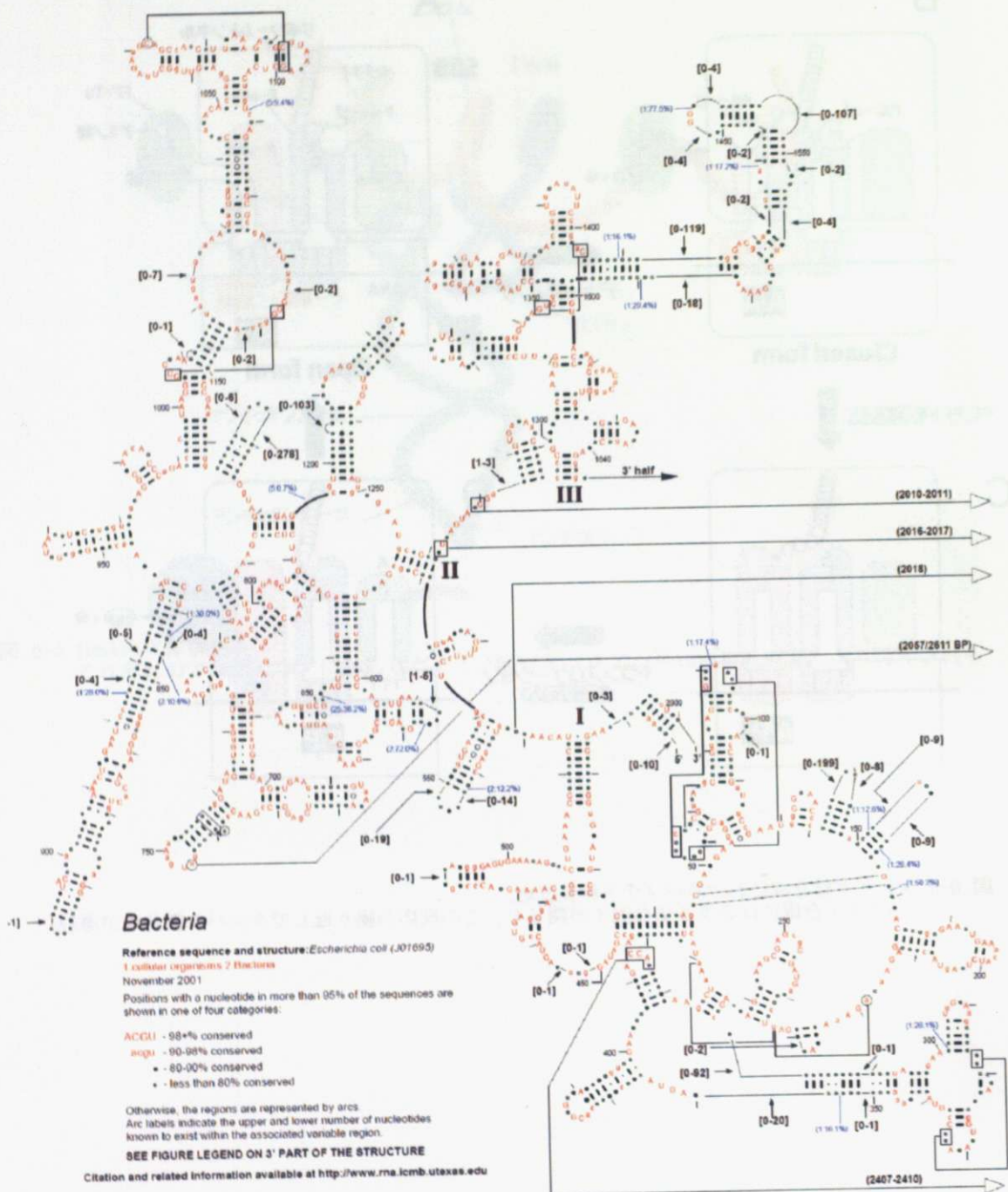
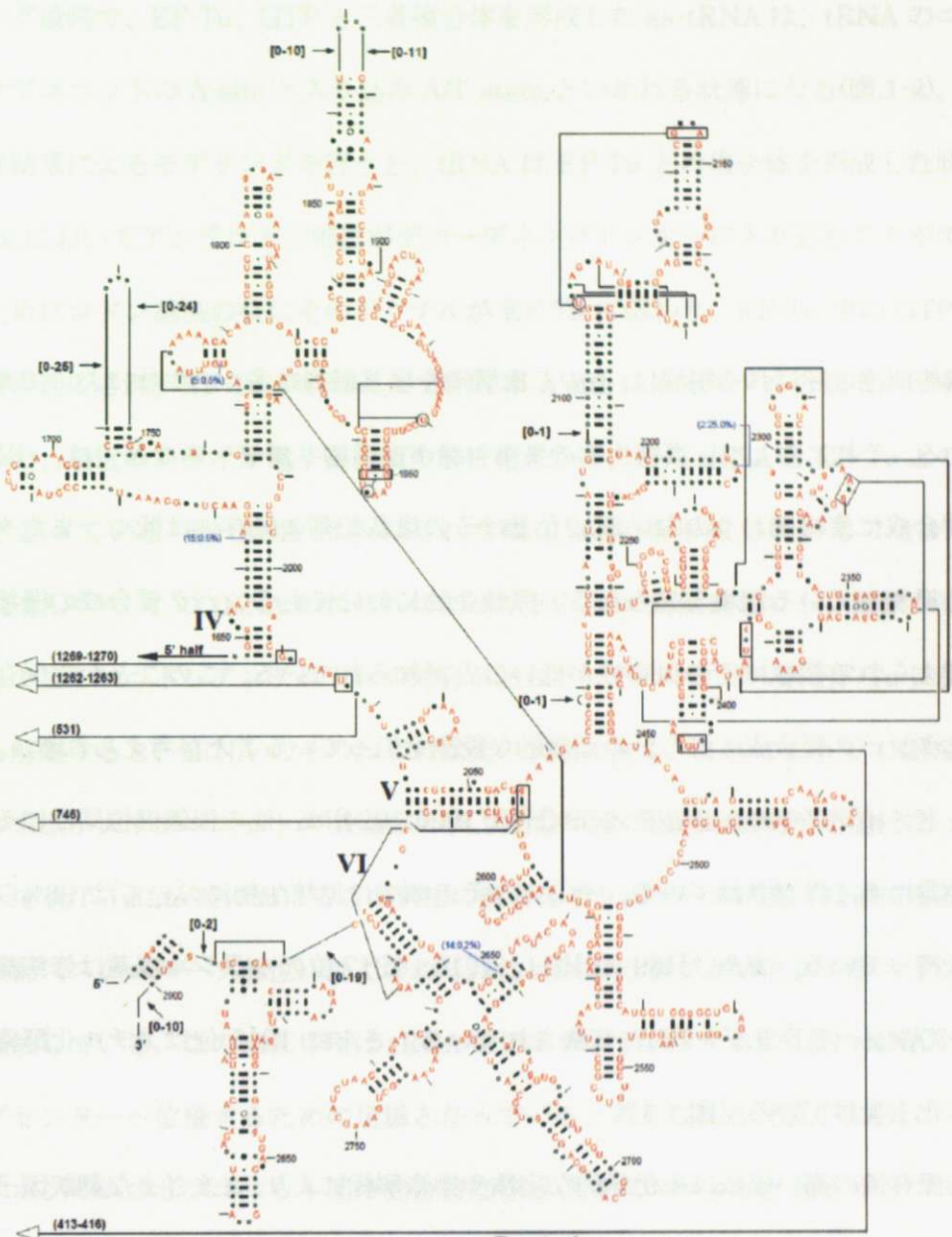


図 0-6 rRNAの保存配列 (バクテリア)  
 大文字の赤色は98%以上、小文字の赤色は90%~98%  
 機能配列といわれる部分は非常に高く保存されている。



Positions with a nucleotide in more than 95% of the sequences are shown in one of four categories:

- ACGU - 96+% Conserved
- acgu - 90-98% Conserved
  - - 80-90% Conserved
  - - less than 80% Conserved

Otherwise, the regions are represented by arcs.  
Arc labels indicate the upper and lower number of nucleotides known to exist within the associated variable region

Citation and related information available at <http://www.rna.lcmcb.utexas.edu>

### Bacteria

Reference sequence and structure: *Escherichia coli* (J01695)  
1. cellular organisms 2 Bacteria

November 2001

Number of sequences: 430

Blue tags indicate insertions relative to the reference sequence.

Insertions that appear are:

- (1) length 1-4 in more than 10% of sequences
- (2) length 5 or greater in at least one sequence

with format:  
(Max. Length of Insertion Percentage of seqs with any length insertion)

# 第1章

## 序論

rRNA の機能部位と呼ばれる領域は、その二次構造や塩基配列は多くの生物において高く保存されている。それに対して、真核生物のミトコンドリアのリボソームなどでは、rRNA のタンパク質合成に直接関わりのない領域などはその塩基配列の保存性は低く、またタンパク質に置き換わっている領域も見られる。原核生物においてもタンパク質合成の機能部位でないと考えられる領域はその保存性が低いことが知られている。このことから保存性の高い領域はタンパク質合成に何らかの直接的な役割を担っていることが考えられる。

23S rRNA ドメインIV中のヘリックス 69 (H69, 1906-1924)は、他の機能部位同様にその塩基配列は非常に高く保存されている。そして、その領域は原核生物においては 98%以上が同じ配列を持っている。また、H69 の 1911、1915、1917 位のウラシル塩基は修飾酵素 RluD によってシュードウリジン( $\Psi$ )に修飾されている。さらに 1915 位はメチル化酵素によってメチル化も受けている (図.1-1)。

rRNA 中の保存性の高い領域は生化学的な実験や構造解析により、さまざまな翻訳因子との相互作用が報告され、機能部位として多くの領域が同定された。現在までの研究から H69 もさまざまな因子との相互作用が考えられ、また他の機能部位と同様に保存性が高い。このことから H69 も機能部位のひとつで、タンパク質合成の過程において翻訳因子との相互作用をし、何らかの機能を持つと考えられるが、現在までのところその役割については明らかになっていない。H69 は現在までに大小サブユニット間の結合、A/T state、A-site、P-site との相互作用に関連していると考えられる (図.1-2.1-3.1-5)。

最近、molecular spring といわれるモデルが提唱された。コドン認識の起きるデコード

ィング段階で、EF-Tu、GTP と三者複合体を形成した aa-tRNA は、tRNA のコドン部位が小サブユニットの A-site へ入り込み A/T state といわれる状態になる(図.1-2)。結晶構造の解析結果によるモデリングを行うと、tRNA は EF-Tu との複合体を形成した状態では A/T state においてアンチコドン部位がデコーディングセンターに入り込むことができない。そのためコドン認識の後にそのシグナルが EF-Tu に伝わり、EF-Tu 中の GTP の加水分解が引き起こされ、EF-Tu が解離して tRNA が A site に入るモデルの説明がつかなかった。しかし、最近のクライオ電子顕微鏡の解析結果から、この tRNA と EF-Tu との複合体の形状をとっている aa-tRNA は、ねじれた構造(kink)を形成していることが観察された(図.1-2A)<sup>9, 10</sup>。この tRNA のねじれによって EF-Tu の解離前にコドン認識が可能になる。そして正しいコドンアンチコドンの対合がおこり、そのシグナルが EF-Tu に伝わり tRNA から解離すると、tRNA のそのねじれは元の状態に戻る。これによって tRNA のアミノアシル末端が大サブユニットの A-site へ入り込む一連の過程の説明が可能になった(図.1-2B)。そして A/T state 時におけるこの状態の複合体をリボソームにあてはめてみると、H69 の頭頂部(ステムループ部位)はこのねじれた tRNA の D ステムとアンチコドンステムの間に接触している。この相互作用は tRNA のアンチコドンステムが 16S rRNA のデコーディングセンターへ位置するための足場となっていると考えられる(図.1-2A)。

リボソームのサブユニット間の会合面は 50S 大サブユニットと 30S 小サブユニットをつなげるだけでなく、翻訳過程において重要な役割を持つと考えられる。近年の結晶構造解析の結果から H69 は 30S 小サブユニットとの会合面に位置し、16S rRNA のヘリックス 44(H44)と架橋していることが明らかになった(図.1-3)。H69 の A1913、A1914、A1918 は H44 の 1408-1410 と 1494-1495 の領域と架橋し、B2a bridge といわれる構造を形成している<sup>5, 6</sup>。また H69 は 50S サブユニットのみの構造では小さくまとまった構造をとるが<sup>2</sup>、70S リボソームの状態ではスモールサブユニット側のヘリックス 44 に伸びて相互作用をしている<sup>5</sup>。このことからこの H69 は柔軟な構造をし、さらには tRNA の A site から P site

への移動の際にバネのような動きをしていると考えられる。そこで、H69 は A/T state、A-site、P-site における tRNA と翻訳における各段階で直接相互作用をしていることや、他の機能部位と同様に保存性が高いことを考慮すると、H69 はタンパク質合成における機能部位のひとつと考えられる。

そして、さらに H69 にはその他の翻訳過程において間接的に関与していると考えられる報告もある。ペプチドの伸長反応において、PTC でペプチドの転移反応がおこった後に、EF-Tu、tRNA 複合体と分子擬態の構造をしている GTP 結合タンパク質の EF-G が A-site に結合する。EF-G は GTP の加水分解に伴う構造変化を駆動力として、対合している mRNA と tRNA に対してリボソームの小サブユニットを 3 塩基分移動させ、pep-tRNA のアンチコドンに P-site にいれるトランスロケーション反応を担う(図.0-5C.D)。EF-G は EF-Tu、tRNA 複合体の分子擬態をしているため、EF-Tu、tRNA 複合体と相互作用する H69 は、同様に EF-G とも相互作用する可能性が示唆されている<sup>11</sup>。

また、翻訳の開始では、まず mRNA 上の SD 配列と開始コドンからなる翻訳開始信号に、リボソームの小サブユニットと開始 tRNA(fMet-tRNA<sup>fMet</sup>)が結合する。開始 tRNA は小サブユニットの P-site で開始コドンと塩基対を形成する。この際、3 種類の開始因子(イニシエーションファクター、IF)と呼ばれるタンパク質が必要となる。IF-1 と IF-3 は小サブユニットと結合しており、IF-1 は A-site をふさぎ、IF-3 は準備が整う前に大小サブユニットが会合してしまうのを防いでいる。IF-2 は GTP 結合タンパク質であり開始 tRNA に結合して小サブユニットへとエスコートしている。次に、これらのイニシエーションファクターが遊離し、大サブユニットが合流して翻訳伸長活性のある 70S リボソームになる(図.1-4)。フットプリントの実験結果から、IF-3 の C 末端は小サブユニット 16S rRNA の H44(B2a) に結合し、サブユニットの会合を阻止していることが明らかになった<sup>12</sup>。また、その結合部位の分子構造は H69 と非常に似た構造をしており H44 は H69 と接触していることから、この領域が翻訳開始制御や、サブユニット間の会合に重要な役割を担っていると考えられ

る。

さらに、H69 は翻訳の終結において終止コドンを認識し、新生ペプチドの tRNA からの加水分解による分離を促すリリースファクター2、3(RF2、RF3)<sup>13-15</sup>、mRNA 上に残ったリボソームと tRNA を解離させリサイクルするために必要な因子のリボソームリサイクリングファクター(RRF)<sup>16</sup>、tmRNA-EF·Tu 複合体に結合する SmpB<sup>17</sup>とも相互作用することが示唆されている。これらのことから H69 は翻訳のさまざまな過程において重要な役割を担っていると考えられる。

二次構造の図にまとめると H69 のループ部分は小サブユニットとの架橋部位であり、A/T state において 1914 位の周辺は tRNA の D アーム 24、25 位と直接接触して相互作用をしていると考えられる(図.1-5)。H69 の保存領域(1913-1915)は A-site tRNA の D ステム(11-12,25-26)と相互作用している<sup>5</sup>。また、H69 の 1908-1909、1922-1923 の領域は、P-site に位置する tRNA の D ステム(12-13、25-26)と相互作用している。

rRNA における機能部位はペプチドの転移反応やコドンアンチコドンの対合など、ひとつの役割を持つ領域が多いが、この H69 については多くの翻訳因子と相互作用することや、サブユニット間の架橋部位のひとつであることから、タンパク質合成反応において翻訳の開始から終了までのさまざまな段階での関与が考えられる。しかし、この H69 についてはいまだ詳細な生化学的研究が行われておらず、機能については明らかになっていない。これらの理由から H69 の機能解析は大変重要であり H69 との相互作用に関わるタンパク質合成反応のコドン認識から tRNA の取り込み、転移までの一連の流れを解明する大きな手がかりになると考えられる。

この H69 の高く保存された領域のリボソーム機能面での重要性を明らかにするために、本章では当研究室で新規に開発された SSER 法(systematic selection of functional sequence by enforced replacement)を使い、H69 のループ部分 7 塩基(1912-1917)をランダムにした 16,384 通りのライブラリーの中から、リボソームとしての機能に必要な不可欠な配

列（機能配列）を決定した。さらに得られた変異体を用い、H69 の機能面での役割について解析を行った。

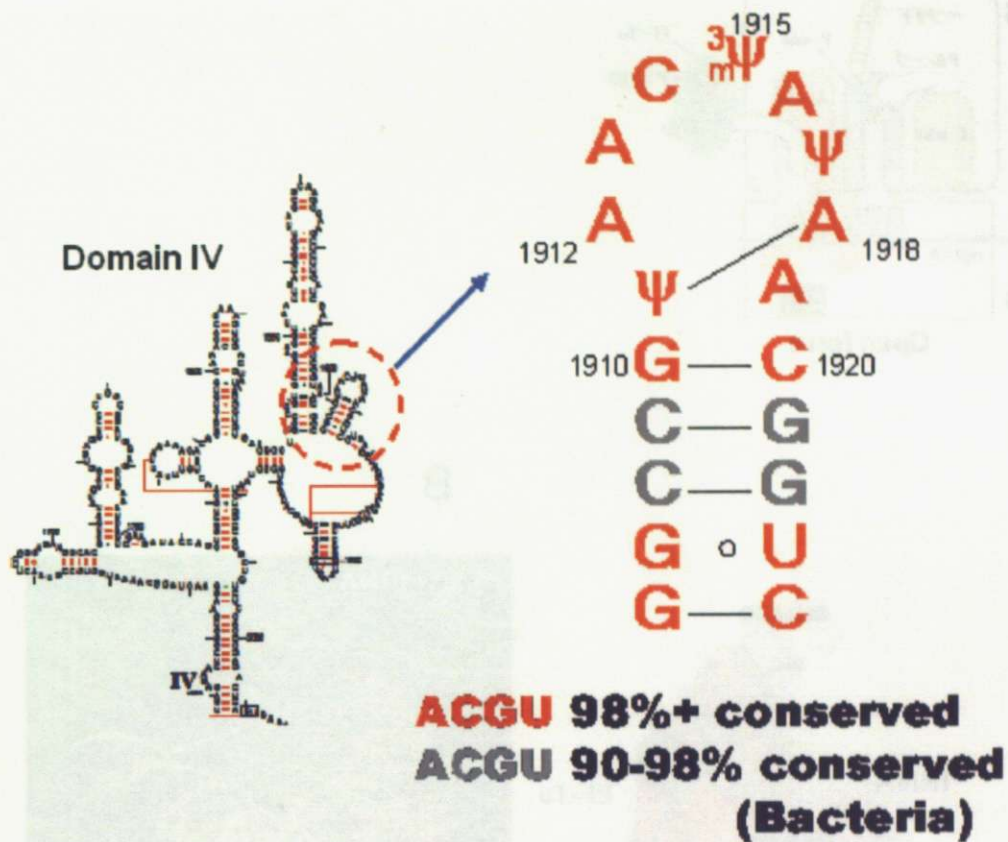
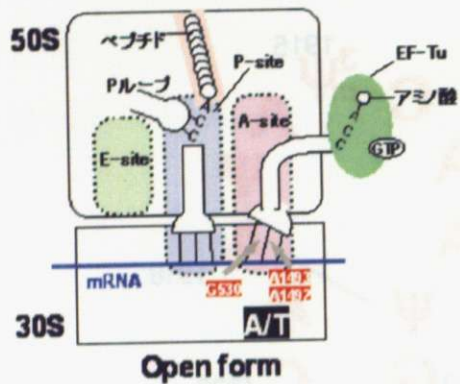
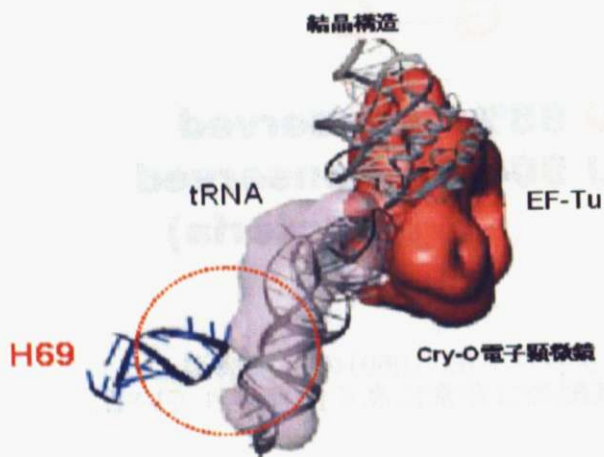


図. 1-1 23S rRNAドメインIV中のヘリックス69 (H69)の二次構造。  
 他の機能部位と同様に塩基配列は非常に高く保存されている。

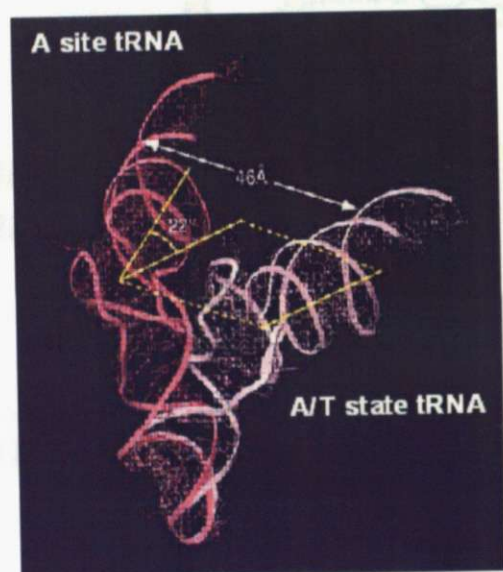




A



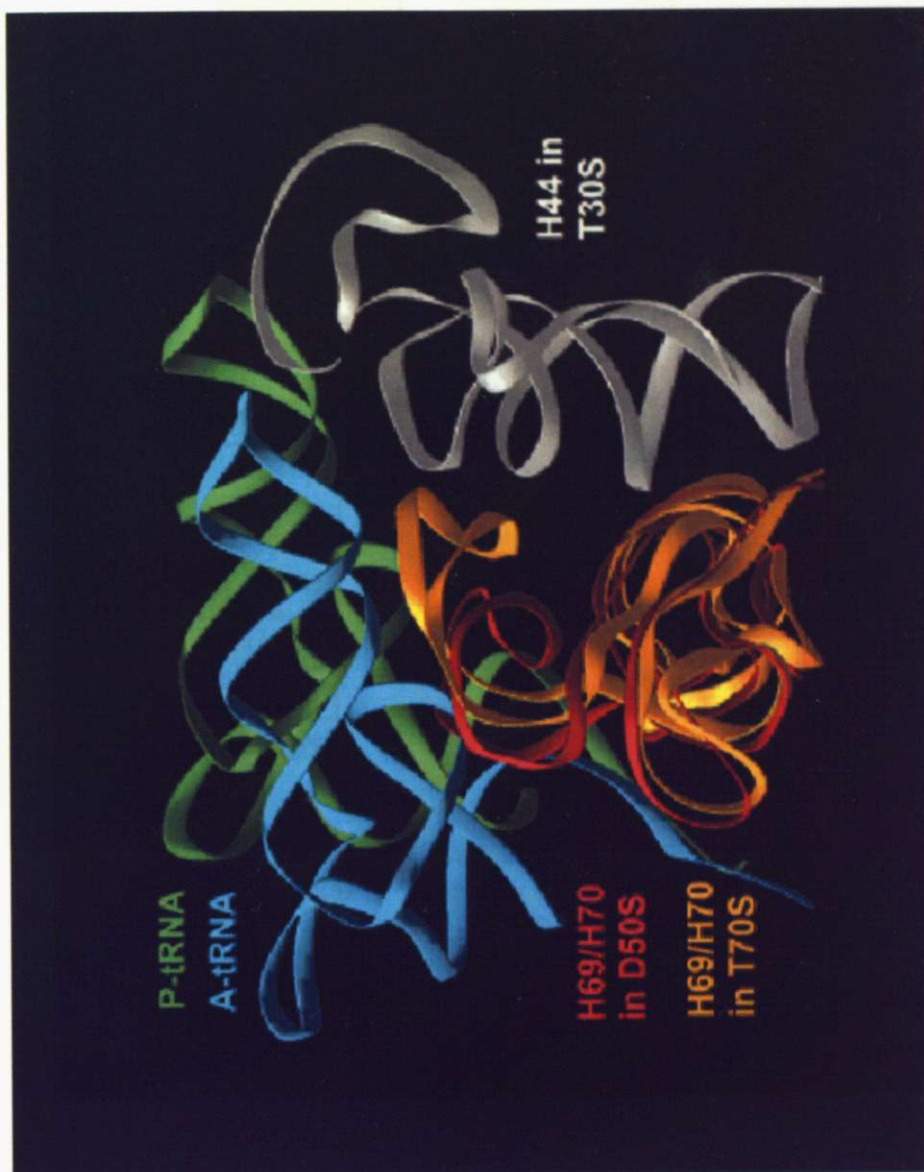
B



Valle et al., 2005

図. 1-2 molecular spring モデル

- A.) 結晶構造とクライオ電子顕微鏡の解析結果。クライオ電子顕微鏡ではtRNAはねじれた構造をとっている。  
 B.) A/T state とA-site時のtRNAの比較。  
 tRNAはねじれが戻り46Å、+22° 動くことでA-siteに入り込む。



Schlunzen F et al., 2001

図. 1-3 H69の小サブユニットとの架橋部位 (B2a)。  
 H69は大サブユニットのみの構造では (赤色) 内側に丸まった構造をとるが、  
 70Sの小サブユニットと結合した状態では (オレンジ) 小サブユニット側に伸びた構造を  
 形成して架橋している。  
 D50S (*Dainococcus radiodurans*) T70S (*Thermus thermophilus*)

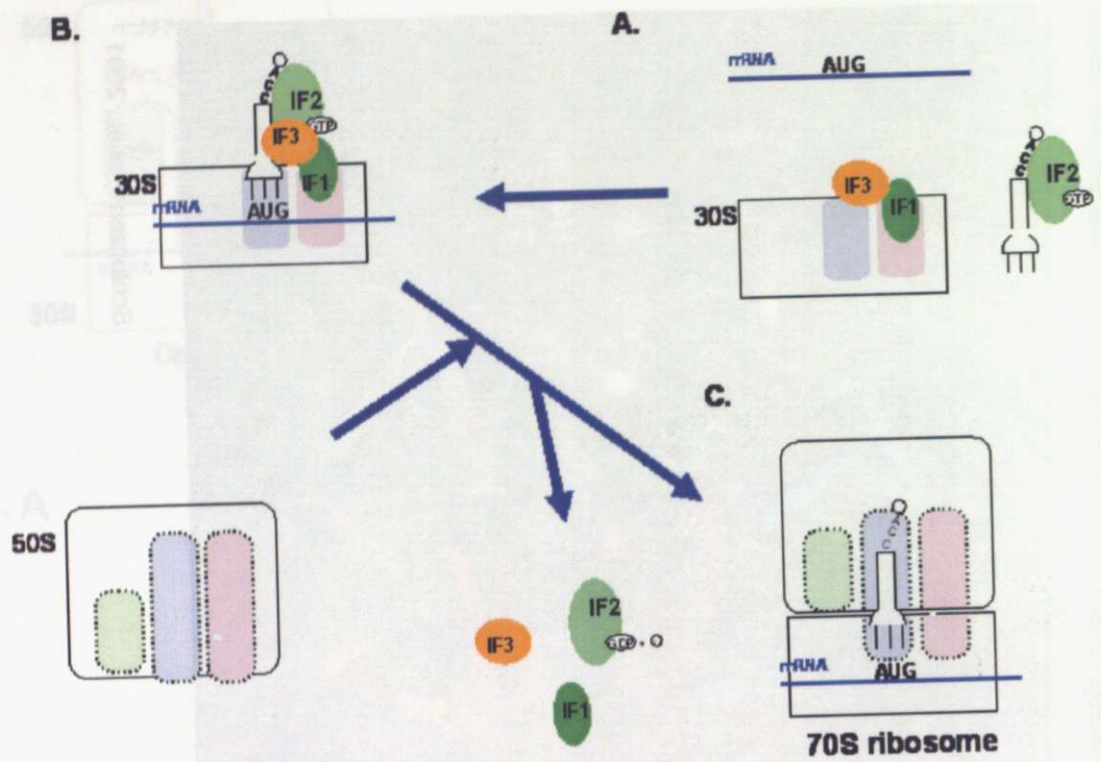
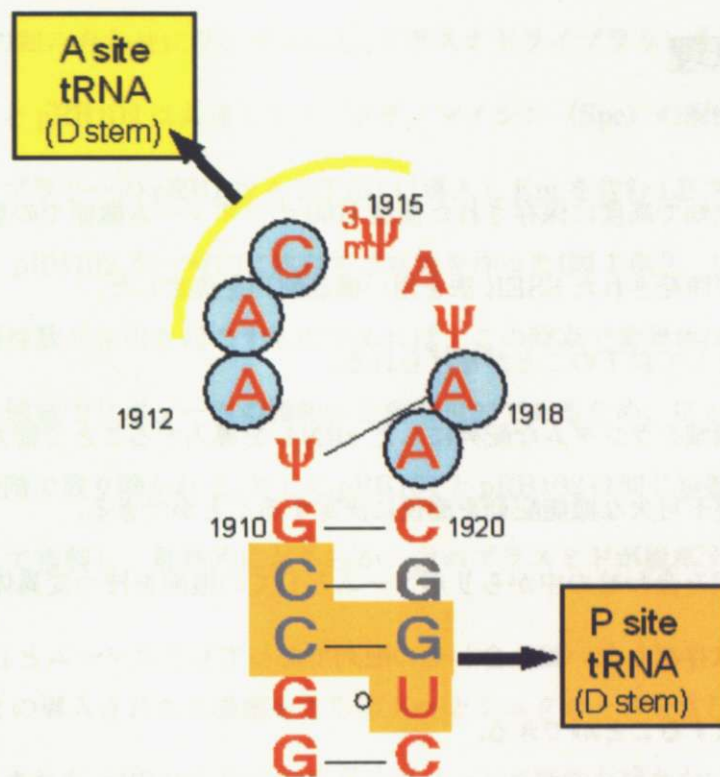


図. 1-4 翻訳の開始反応

- A.) mRNA上の開始コドン翻訳開始信号に、リボソームの小サブユニットと開始tRNA (fMet-tRNA<sup>fMet</sup>) が結合する。
- B.) 開始tRNAは小サブユニットのP-siteで開始コドンと塩基対を形成する。この際、IFと呼ばれるタンパク質が必要となる。
- C.) イニシエーションファクターが遊離し、大サブユニットが合流して70Sリボソームになる。



**ACGU 98%+ conserved**  
**ACGU 90-98% conserved**  
**(Bacteria)**

### Helix 69(B2a bridge)

#### B2a bridge

1913-1914,1918 30S helix44 1408-1410 1494-1495

around 1914 A/T-state D arm 24,25

1914-1915 A-site tRNA D stem 11,12

1913-1914 A-site tRNA D stem junction 25,26

1908-1909 P-site tRNA D stem 12,13

1922-1923 P-site tRNA D stem 25,26

図.1-5 H69の相互作用部位

## SSER 法の原理

本研究では機能未知で高度に保存された領域 H69 のリボソーム機能での重要性を解析するため、当研究室で開発された SSER 法を用い機能配列を決定した。

この方法の利点として以下のことが挙げられる。

細胞内に目的の領域をランダムな配列にした rRNA を導入することで膨大な組み合わせの中から生育に必要不可欠な機能配列を簡便に決定することができる。

ランダムにした組み合わせの中からリボソームとしての機能を持つ変異体のみを得られるので、自然界には存在しない組み合わせの配列であってもリボソームとしての機能を持つものであれば選択することができる。

野生株の塩基配列と相同性の低い組み合わせの配列でも、リボソーム機能を有するものであれば選択可能なため、研究者の憶測や恣意が反映されない中立的な解析が可能。

従来の変異導入法では野生株と変異体のリボソームが共存した状態での解析しか行えなかったために変異体リボソームが機能を持つものかどうかは判断することができなかったが、SSER 法では細胞内のリボソームを完全に変異体に置換するので、リボソームの機能維持に必要な不可欠な組み合わせの配列を持った変異体のみが回収でき、リボソーム機能維持に必要な不可欠な配列（機能配列）を決定できる。

SSER 法の手順については (図.1-6) に示した。

ゲノム上の 7 つのリボソームオペロンをすべてノックアウトし、リボソームの配列 *rrnB* と *sacB* 遺伝子をもつプラスミド pRB101 でその rRNA を供給した大腸菌 NT101 を使用した。この NT101 は pRNB101 プラスミド由来のリボソームのみで生育している (図.1-6A)。

そして pRB101 と同一の複製起点と *rrnB* を持ち、カナマイシン(Km)の選択マーカーを持つプラスミド pRB102 に対して 23S rRNA の目標部位 (H69) を、PCR を応用した方法

で 16,384 通りの組み合わせにランダムにし、プラスミドライブラリーを作製した(図.1-6B)。また、pRB101 と pRB102 は共通してスペクチノマイシン (Spc) の耐性遺伝子を持つ。

次にこのライブラリーの pRB102 を NT101 に導入し Km を含む LB プレートで形質転換し、pRB101 と pRB102 が一時的に共存する状態を作った(図.1-6C)。もしこの導入されたプラスミドが優性致死を引き起こすものであれば、この時点で変異体は得られない。H69 は保存性の高い領域でリボソームの機能に必要な不可欠であるため、ほとんどの組み合わせの配列がこの段階で取り除かれる。そして pRB101 と pRB102 は同じ複製起点を持つため、細胞内で競合して複製し、最終的にどちらか一方のプラスミドが脱落することで置換される。

この pRB102 の導入された大腸菌をさらに Km とシュクロースを含む培地にスポットした。もし、導入された pRB102 由来の変異リボソームが機能を持たない、もしくは非常に弱い機能しか持たないものであれば、プラスミドは置換されずに pRB101 は大腸菌内に残る。pRB101 の sacB 遺伝子はシュクロースを原料にして、バクテリアでは毒性の多糖類を作るためにシュクロース感受性となり、pRB101 を持つ大腸菌はこの培地では生育できない(図.1-6D)。

それに対して pRB101 が脱落した大腸菌は、sacB 遺伝子を失うためにシュクロースを含む培地で生育が可能になる。これにより pRB102 由来の変異リボソームのみで生育している大腸菌 NT102 を得た(図.1-6E)。さらに pRB101 はアンピシリン Amp 耐性遺伝子も持っているので、プラスミドの置換を確認するために Amp を含む LB プレートに NT102 をスポットし、pRB101 が脱落したことを確認した。完全にプラスミドの置換が行われていればコロニーは得られない。

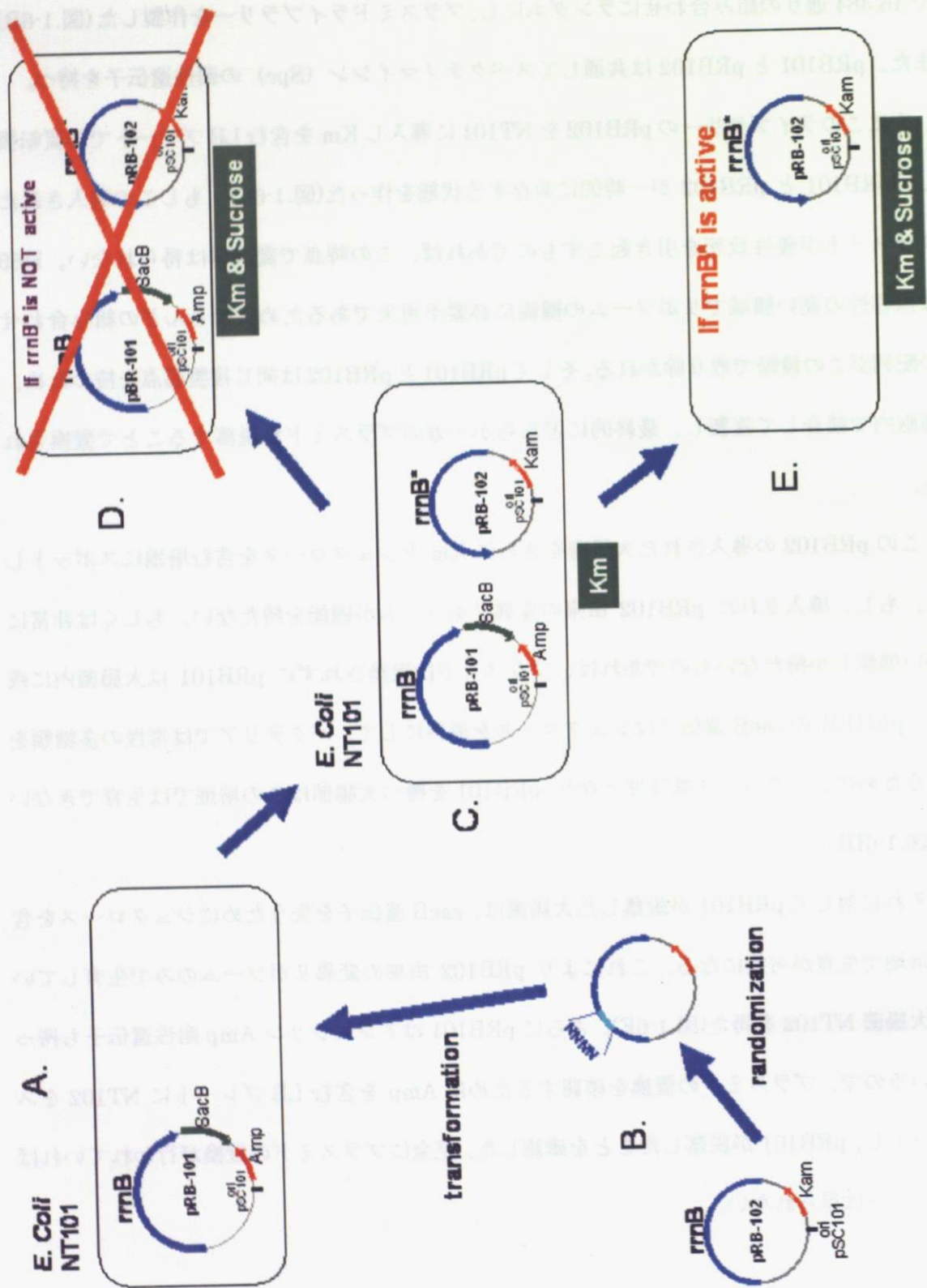


図. 1-6 SSER法の原理

## 方法と手順 (SSER法)

### SSER 法

ペプチド結合形成に必要不可欠な H69 の塩基配列を決定するため、ゲノム上の rRNA のオペロンをすべてノックアウトした大腸菌 TA542 を使用した<sup>18</sup>。この大腸菌株は rRNA のオペロンがひとつあるプラスミドで相補されている。このプラスミドを、rRNA の配列 *rrnB* と *sacB* 遺伝子をもつプラスミド pRB101 に置換し、この大腸菌を NT101 とした。この *sacB* 遺伝子はシュクロース存在下でフラクタンという多糖類を作り出す。この多糖類は大腸菌を含むバクテリアにとっては毒性があるので、変異体の選択マーカーとして使用できる<sup>19</sup>。

23S rRNA 遺伝子の目標部位 (H69) をそれぞれランダムに組み合わせたプラスミドライブラリーは、*rrnB* をコードし、pRB101 と同じ複製起点をもつが、選択マーカーの違うプラスミド pRB102(km<sup>r</sup>)上に作成した。H69 のループ配列(1912-1917)を完全にランダムに組み合わせた DNA プライマーを (N primer) 使い、PCR 法を応用した手法で作成した。

pRB102 に点変異を Quick-Change site-directed mutagenesis(Stratagene)を使用し PCR 法により導入した。この点変異を導入する理由は、N プライマーは野生株と同じ配列を持ったものも含まれるために、後に得られた変異体が野生株と同じ配列を持っていた場合に、SSER 法によって選択されたものかテンプレートのコンタミネーションによるものかの区別をするために点変異を導入した(図.1-7A)。まず pRB102 の rRNA の目標部位の近傍に、リボソーム機能に影響のない塩基を見つけ出し、そこに点変異を導入する。点変異は N プライマーによってももとの配列に戻すので、コンタミネーションならば得られた変異体は点変異を持っている。



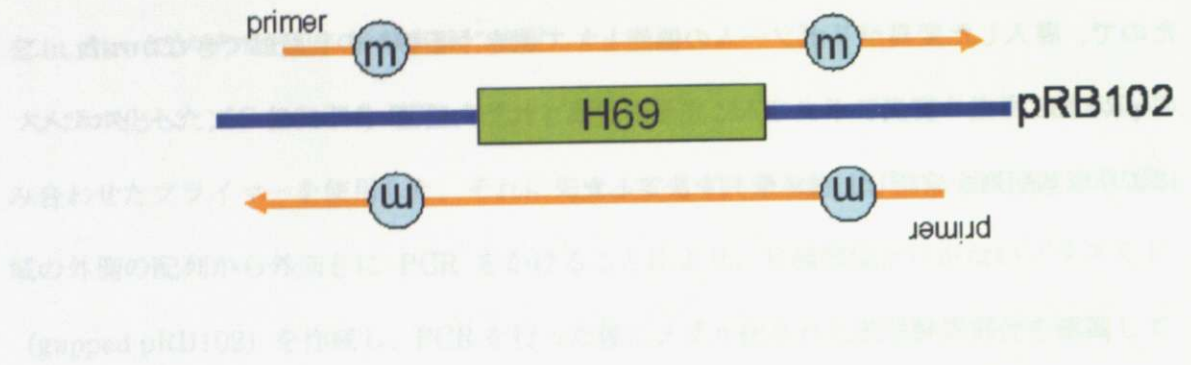
このプラスミドを NT101 細胞に導入し、この点変異が優勢致死を引き起こすものかを検証した。そして、導入された点変異が致命的なものでないと確認された pRB102 プラスミドを *in vitro* でメチル化し、後の実験に使用した。

メチル化したプラスミドを PCR のテンプレートとし、H69 ループに対するランダムに組み合わせたプライマーを使用した。それに先立ってまず、最初に PCR を H69 ループの領域の外側の配列から外向きに PCR をかけることにより、目標部位だけがないプラスミド (gapped pRB102) を作成し、PCR を行った後にメチル化された制限酵素部位を認識して働く酵素 DpnI と  $\lambda$  exonuclease によってテンプレートを分解処理した。そしてゲルから切り出し精製を行い、このプラスミドをテンプレートとして使用した(図.1-7B)。N primer を使用した PCR では、片側のプライマー設計は 5'側と 3'側を H69 ループの外側数十塩基分に相補的に、H69 ループの 7 塩基は AGTC の 4 塩基がまんべんなく組み合わされたプライマーを設計する。もう片側のプライマー設計は H69 ループの 5'側に相補的なプライマーを設計した(図.1-7C)。この方法で得られたプラスミドはシーケンスによって大腸菌に導入する前に確認した。

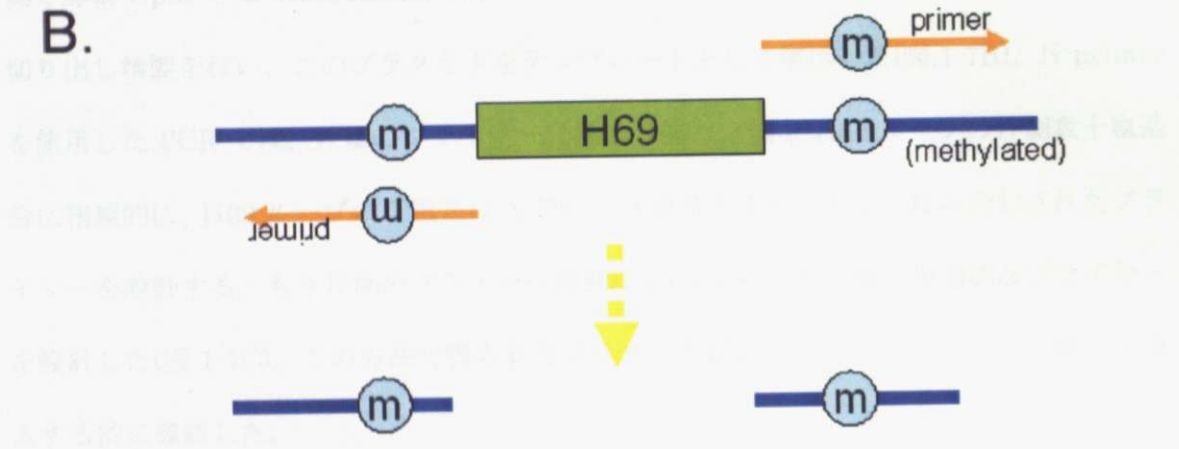
この作成したライブラリーのプラスミドを NT101 に導入し、Km を含む LB プレートで形質転換をした。もしこのプラスミドが優勢致死のもので大腸菌に毒性を示すものであれば、変異体は得られない。本研究で調べた H69 は保存性が高く、必要不可欠なものが多いために、この段階で多くの組み合わせが取り除かれる。この pRB102 のプラスミドが導入されたこの大腸菌をさらに、Km とシュクロースを含む培地にスポットし、pRB101 が脱落した大腸菌 (NT102) を回収した。pRB101 と pRB102 を両方含む大腸菌では、このプラスミドが同じ複製起点を持っているために競合し、どちらかのプラスミドが最終的に脱落することになるが、もし導入されたプラスミドがリボソーム機能を持たない、もしくは非常に弱い機能しか持たないのであれば、プラスミドは置換されずに pRB101 の持つ sacB の働きでシュクロース感受性となり、この培地では生育できない。これにより変異体リボソ

ームのみに置換されるためにリボソームとしての機能を持つ配列が決定できる。従来の機能解析では野生株リボソームと変異体リボソームが混在した状態での解析しかできなかったため、導入した変異がリボソームの機能として働きうるのかの判断はできなかった。この pRB102 由来の変異リボソームに完全に置換された大腸菌 (NT102) は、シーケンスにより塩基配列を確認し、機能配列を決定した。

A.



B.



C.



図. 1-7 点変異導入の手順

m (mutation)

## B-scan 法

それぞれの塩基のリボソーム機能の重要性を明らかにするために、H69 の 1912-1917 のそれぞれの塩基に対して他の 3 種類の塩基をデザインしたプライマー（目標塩基が A ならば G、T、C）を使用し、Quick-Change PCR を行った。テンプレートの消化のために、SSER 法と同様にテンプレートにはメチル化を施し、PCR 後に DpnI、 $\lambda$  exonuclease 処理を行った。そして SSER 法のセレクション方法と同様に NT101 に導入し、リボソーム機能を持つ変異体をシュクロース培地で選択した。もし、目標部位が必要不可欠な塩基であれば、変異体は得ることができない。そして得られた結果からそれぞれの塩基に対してのリボソームの機能に必要な不可欠な塩基を決定した。

## SSER法による機能的リボソーム変異体の選択

ランダムイズしたのち精製されたライブラリーの PCR プロダクトを NT101 細胞に導入し、Spc、Km を含む培地で形質転換をした。37°C で O/N 培養したのち、コロニーを楊枝で回収し、LB 培地に懸濁してプラスミドの置換を確認するために Spc、Km、5% シュクロースを含む LB プレートにスポットした。非常に薄いコロニーで生育速度の悪いものは、シュクロースを含まない km プレートにスポットし、コロニーが十分な大きさに成長してからシュクロースプレートで選択した。シュクロース耐性の株 (NT102) は 2 X LB (Spc、Km、5% シュクロース) で培養したのちシークエンスで配列を確認した。

プラスミドの置換を確認するためにそれぞれ得られた変異体はシュクロースプレートで培養すると同時に、Amp を含むプレートにもスポットした。プラスミドが完全に置換されて

いるならば Amp プレートでは pRB101 上の Amp 耐性遺伝子を失うので生育しない。リボソーム機能を持つ変異体は ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied biosystems) でシーケンスし、機能配列を決定した。

## B scan による機能配列の決定

1 塩基の変異導入による機能配列の解析 (Bscan) には、H69 ループの 7 塩基それぞれに対して、他の 3 塩基に置換したミックスプライマーを使用し、メチル化を施したテンプレートに対して Quick-Change(Stratagene)PCR を行った。もし目的とする塩基が A ならば G、C、T (B)、G ならば A、C、T (H)、C ならば A、G、T (D)、T ならば A、G、C (V) の配列を持つプライマーを使用する。

SSER 法でそれぞれの塩基に変異を組み込んだ pRB102 のライブラリーはアガロースゲル電気泳動で確認したのち、テンプレートの消化のために DpnI、 $\lambda$  exonuclease で処理した後に NT101 に導入した。得られた変異体はシュクロースプレートで選択されたのちシーケンスで配列を確認した。もし目的の塩基がリボソームの機能に必要不可欠であれば変異体は得られない。

## 試薬と機器

ゲノム上の 7 つのリボソーム遺伝子をノックアウトし、救済プラスミドで相補した大腸菌 *E. coli*  $\Delta 7rrn$  TA542 ( $\Delta rrnE$   $\Delta rrnB$   $\Delta rrnA$   $\Delta rrnH$   $\Delta rrnG::cat$   $\Delta rrnC::cat$   $\Delta rrnD::cat$   $\Delta recA56$  / pTRNA66 pHKrrnC) は Dr. Catherine L. Squires (Tufts Univ.) からいただいた。

救済プラスミドの pRB101 は pMW118 (Amp<sup>r</sup>) (Nippon gene) プラスミドに *sacB* 遺伝子と *rrnB* オペロンを導入することで構築した。

もうひとつの救済プラスミド pRB102 は pMW218 (Km<sup>r</sup>) (Nippon gene) に *rrnB* オペロンのみを導入することで構築した。

TA542 中の救済プラスミド pHKrrnC は pRB101 に置換され、その大腸菌は NT101 として SSER 法や B-scan に使用した。

## SOB

2% Tryptone

0.5% Yeast Extract

10mM NaCl

2.5mM KCl

10mM MgCl<sub>2</sub>

10mM MgSO<sub>4</sub>

SOC

SOB

20mM Glucose

2X LB

2% Tryptone

1% Yeast Extract

1% NaCl

2 X LB plate

2 X LB

1.5% agar

40  $\mu\text{g/ml}$  spectinomycin (Spc)

100  $\mu\text{g/ml}$  ampicillin (Amp)

50  $\mu\text{g/ml}$  kanamycin (Km)

## 手順

SSER 法に使用する大腸菌 NT101 には、PCR を応用した方法で H69 ループをランダムにし、ライブラリーを構築したプラスミド pRB102 を導入し、km を含む培地で培養した。そして pRB101 との置換を調べるため、5% シュクロースを含む培地で培養した。のちに pRB102 に置換された大腸菌 (NT102) を回収し、シーケンスによりその変異体のランダムにした領域を調べ、機能配列を決定した。またその変異体の生育速度を測定し表現型の検討を行った。

## プラスミドの作製

### [PCR の条件]

Plasmid	150ng
10X Buffer	5 $\mu$ l
Primer 5'	12.5pmol
Primer 3'	12.5pmol
dNTPmix (2mM each)	10 $\mu$ l
Pfu Turbo	1 $\mu$ l (2.5U)
ddH <sub>2</sub> O	
	to 50 $\mu$ l

1. 95°C 30sec
2. 95°C 30sec
3. 55°C 1min



4. 68°C 20min

2~4 X 18 cycle

一連の PCR はこの反応条件ですべて行った。

## プラスミドのメチル化

pRB102 のメチル化は SSER 法の選択過程においてバックグラウンドの影響を少なくする必要があるために行った。メチル化には 3 種類のメチル化酵素を使用し(M-*A*lu I、M-*Hae*III、M-*Hap*II) (Takara Bio inc., Japan)、50  $\mu$ g pRB102 を 80  $\mu$ M S-adenosylmethionine、メチル化酵素をそれぞれ 50U 分、50mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM DTT、1mM EDTA、200mM NaCl を全量 500  $\mu$ l に調製し、37°C で 30 分間、反応させた。次に、NaCl を濃度 600mM に調製し、さらに 37°C で 30 分間、反応させた。このメチル化したプラスミドは QIAprep(Qiagen) で精製した。

## プラスミドの精製

以下の順序で実験を行った。

50  $\mu$ l PCR (メチル化したプラスミド)

1%アガロースゲル電気泳動による確認

0.5  $\mu$ l DpnI (10U)、0.5  $\mu$ l Exonuclease (5U)によるテンプレートの消化

37°C 90min

QIA-Quick Mini Elute による精製

10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O で Elute

## トランスフォーメーション

200  $\mu$ l コンピテントセルに精製した PCR プロダクト 10  $\mu$ l を入れた

氷上 60min

42°Cに 45sec ヒートショック

氷上 2min

600  $\mu$ l SOC を加える

37°C 60min 振とう培養

LB plate (spc 40、kan 50) にまく

37°C O/N

## コロニーの選別

コロニーを楊枝でつついて 2X LB 150  $\mu$ l に懸濁した。

2X LB plate (spc 40、kan 50、5%SUC) に 5  $\mu$ l スポットした。

37°C O/N

コロニーを楊枝でつついて液体培地 2X LB (spc 40、kan 50、5%SUC) 2ml に植菌

(同時に 2X LB plate (spc 40、Amp 100) にスポットし O/N で pRB101 が完全に追い出されたかを確認する)

37°C O/N 振とう培養

菌体からプラスミドを回収

## 生育速度の測定

NT102 のコロニーを楊枝でつついて液体培地 2X LB (spc 40、kan 50、5%SUC) 2ml に植菌した。

37°C O/N 振とう培養

各サンプル 200  $\mu$ l をプレートリーダーで吸光度 (A600) を測定した。

液体培地 2 X LB (spc 40、kan 50、5% SUC) 200  $\mu$ l に菌液 0.2% (A600 が 1.2 のとき) になるように植菌

37°C O/N でマイクロプレートリーダーを使用し 30 分ごとに吸光度を測定した。

## 23S rRNA の H69 領域のランダムライズとライブラリーの作成

pRB102 上の H69 ステムループ G1910 と C1920 はワトソンクリック対を形成しているため Quick-Change(Stratagene) によってフリップし、変異を加えた。この pRB102(C1910-G1920)はのちの SSER 法に使用するが、この PCR を行うことで、得られた変異体がテンプレートとのコンタミネーションかどうか区別することが可能になる。

プライマーの配列

C1910-G1920F (5'-cggcggccctaactataagggtcctaaggtagcg-3')

C1910-G1920R (5'-ccttaggacccttatagttagggccgctttaccgggg-3')

この pRB102(C1910-G1920)は DNA メチルトランスフェラーゼ M-*Alu*I、M-*Hae*III と M-*Hap* II (Takara BIO inc., Japan)によりメチル化した。そしてこのプラスミドをライブラリー作成にテンプレートとして使用した。

まず、最初の PCR で H69 ループのすぐ両サイドにプライマーを設定し、gap PCR といわれる H69 ループ 7 塩基がない pRB102(C1910-G1920,gapped)プラスミドを作成した。

gap プライマーの配列

gap-F (5'-ggtcctaaggtagcgaaattccttgcggg-3')

gap-R (5'-ggccgccgtttaccggggcttcgatcaag-3')

このことにより、SSER 法による選択を行ううえで、ランダム PCR の効率が大きく上がり、さらにはバックグラウンドのテンプレート由来の株が増えるのを抑えることができる。

この gap プラスミドは大腸菌株 DH5 $\alpha$  (DH5 $\alpha$ 、TOYOBO) を用いて増幅し、ランダム PCR のテンプレートとして用いた。

ランダム N PCR 用プライマー

N primer (5'-gctaccttaggaccgtNNNNNNNacggccgccgtttaccgggg-3')

反対側のプライマーは gap-F を使用した。

条件を検討した結果、N7 のランダムにする側のプライマーはリバースの方向でデザインした。また C1910 と G1920 のフリップ変異はこのステップで元の配列に戻した。ランダムにしたプラスミドライブラリーの中からできるだけ多くの変異体を得るために、56 本分の PCR プロダクト (2800  $\mu$ l) を作製した。

PCR ののち反応液は消化酵素 *Dpn* I (New England Biolabs) と  $\lambda$  exonuclease (New England Biolabs) によって 37°C で 120min 処理しテンプレートプラスミドを完全に消化した。のちに QIA-Quick (Qiagen) で精製し、アガロースゲル電気泳動で PCR プロダクトを確認した。

## SSER法による機能的リボソーム変異体の選択

ランダム化したのち精製されたライブラリーの PCR プロダクトは NT101 細胞に導入され、km を含む培地にまいた (56 プレート)。37°C で O/N 培養したのち、コロニーを楊枝で回収し (896 個) LB 培地に懸濁してプラスミドの置換を確認するために km、5% シュク

ロースを含む LB プレートにスポットした。非常に薄いコロニーで生育速度の悪いものは、シュクロースを含まない km プレートにスポットし、コロニーが十分な大きさに成長してからシュクロースプレートで選択した。シュクロース耐性の株 (NT102) は総数 48 個回収でき 2 X LB (Spc,Km,5%SUC) で培養したのちシーケンスで配列を確認した。プラスミドの置換を確認するためにそれぞれ得られた変異体はシュクロースプレートで培養すると同時に、Amp を含むプレートにもスポットした。プラスミドが完全に置換されているならば Amp プレートでは pRB101 上の Amp 耐性遺伝子を失うので生育しない。リボソーム機能を持つ変異体は ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied biosystems) でシーケンスし、機能配列を決定した。

## B scan による機能配列の決定と H69 への塩基の挿入および欠失

保存された H69 ループ (1912-1918) の機能的な重要性を解析するために、本研究ではこれらの塩基に対して、他の 3 塩基に置換したミックスプライマーを使用し

Quick-Change(Stratagene)PCR を行った (B scan)。もし目的とする塩基が A ならば G、C、T (B)、G ならば A、C、T (H)、C ならば A、G、T (D)、T ならば A、G、C (V) の配列を持つプライマーを使用する。

また、同様に 1913 位、1916 位の塩基をそれぞれ 1 塩基ずつ削除したものと、1913 位と 1914 位の間に 1 塩基挿入したものと、さらには 1910 位と 1920 位を同時に削除しステムループを短くデザインしたプライマーも使用し、Quick-Change(Stratagene)PCR を行った。使用したプライマーは以下に記す。

B1912F (5'-ccggtaaacggcgccgtBactataacggctcctaagg-3')

B1912R (5'-ccttaggaccgttatagtVacggccgccggtttaccgg-3')

B1913F (5'-cggtaaacggggccgtaBctataacggcctaaggtagc-3')

B1913R (5'-gctaccttaggaccggttatagVtacggccgcccgtttacc-3')

D1914F (5'-ggtaaacggggccgtaaDtataacggcctaaggtagc-3')

D1914R (5'-gctaccttaggaccggttataHttacggccgcccgtttacc-3')

V1915F (5'-gtaaacggggccgtaacVataacggcctaaggtagc-3')

V1915R (5'-gctaccttaggaccggttatBgttacggccgcccgtttac-3')

B1916F (5'-gtaaacggggccgtaactBtaacggcctaaggtagc-3')

B1916R (5'-gctaccttaggaccgtaVagttacggccgcccgtttac-3')

V1917F (5'-gtaaacggggccgtaactaVaacggcctaaggtagc-3')

V1917R (5'-gctaccttaggaccggtBtagttacggccgcccgtttac-3')

B1918F (5'-gtaaacggggccgtaactatBacggcctaaggtagc-3')

B1918R (5'-cgctaccttaggaccgtVatagttacggccgcccgttta-3')

挿入および欠失に使用したプライマーは以下に記す。

Δ1913F (5'-cggtaaacggggccgtactataacggcctaaggtagc-3')

Δ1913R (5'-gctaccttaggaccggttatagtagggccgcccgtttacc-3')

Δ1916F (5'-gtaaacggggccgtaacttaacggcctaaggtagc-3')

$\Delta$ 1916R (5'-gctaccttaggaccgttaagttacggccgctttac-3')

$\Delta$ (1910-1920)F (5'-cggcggcctaactataaggtcctaaggtagcg-3')

$\Delta$ (1910-1920)R (5'-ccttaggaccttatagttaggccgctttaccgggg-3')

insN1913-4F (5'-ggtaaacggcggccgtaaNctataacggctcctaaggtagc-3')

insN1913-4R (5'-gctaccttaggaccgttatagNttacggccgctttacc-3').

SSER 法でそれぞれの塩基に変異を組み込んだ pRB102 のライブラリーはアガロースゲル電気泳動で確認したのち、NT101 に導入した。得られた変異体はシュクロースプレートで選択されたのちシーケンスで配列を確認した。もし目的の塩基がリボソームの機能に必要不可欠であれば変異体は得られない。

## サブユニット間の会合状態の検証

H69 変異体のリボソームサブユニット会合状態を調べるために、シヨ糖密度勾配遠心法 (SDG) により検証を行った。細胞を、リゾチームを含む Buffer に懸濁して細胞の内容物を溶出させてから超遠心を行うことで、沈降係数の違いによるリボソームのサブユニット会合状態を調べることができる。

本研究ではシヨ糖密度勾配の作製には Gradient Mate(Bio-Comp)を用い、SW28 ローターを用いて遠心したのち Bio-mini UV monitor でリボソームの会合状態を検証した。

Gradient Mate は遠心チューブを 2 分するように高濃度と低濃度のシヨ糖溶液をセットしたのち適当な角度に傾けてチューブを回転させることにより直線的なシヨ糖の密度勾配を作製する機械である。

## 試薬と機器

超遠心機 (Beckman XL-70)

Beckman SW28 ローター

Gradient Mate (Bio-Comp)

Bio-mini UV monitor (ATTO, Japan)

高濃度シヨ糖溶液

20mM Tris-HCl(pH7.8)

6mM MgCl<sub>2</sub>

80mM KCl

7mM 2-mercaptoethanol

38% sucrose



低濃度ショ糖溶液

20mM Tris-HCl(pH7.8)

6mM MgCl<sub>2</sub>

80mM KCl

7mM 2-mercaptoethanol

6% sucrose

0.75mg/ml lysozyme

## 手順

それぞれの H69 変異体の NT102 は 50ml 2X LB で吸光度が 0.5 (A600) になるまで培養し、回収した。回収した細胞は RBS buffer に 0.75mg/ml リゾチームを加えたもので懸濁した。液体窒素で凍結、氷上で融解を 3 回繰り返す、200 $\mu$ l の上清を 10%~40%のショ糖密度勾配を作成した超遠心チューブに重層した。これを超遠心機 (SW28 ローター) で 20,000rpm、14hrs 遠心した。Mg 濃度を変化させた実験系では、Mg 濃度は RBS buffer で調節した(10mM、15mM)。SDG の吸光度は Bio-mini UV monitor (ATTO, Japan) で測定した。

## βガラクトシダーゼ活性による翻訳精度の測定

導入するプラスミド pNT3-*lacZ*(Amp<sup>r</sup>)はリボソーム変異体の翻訳精度を測定するため *lacZ* レポーター遺伝子を組み込んだ構造をしている。そして pNT3-*lacZ* プラスミドの *lacZ* 遺伝子 ORF 開始直後に 1 塩基の挿入もしくは欠失、UGA、UAG ストップコドンを含むため、フレームシフトとリードスルーを測定できる配列を持っている。これらのプラスミド (pNT3-*lacZ*(+1), pNT3-*lacZ*(-1), pNT3-*lacZ*(UGA) and pNT3-*lacZ*(UAG)) はそれぞれ *E.coli* JA200 (F+  $\Delta(trpE)5 recA thr-1 leu-6 lacY thigal xyl ara mtl$ ) に導入されており、この細胞がプラスミドを H69 変異体の NT102 に転移させることで(mating)レポーター遺伝子の活性を測定することが可能になる。

## 試薬と機器

### Z-buffer

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	60mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	40mM
KCl	10mM
MgSO <sub>4</sub>	1mM

### ONPG(O-nitrophenyl-β-D-galactoside)

Z-buffer 中に 4mg/ml になるように調整

### Chloroform

### 10% SDS

## 手順

まず、前培養をおこなった JA200-pNT-*lacZ* をそれぞれ 10  $\mu$ l と H69 変異体 NT102 10 $\mu$ l を、抗生物質を含まない 2 X LB 培地で 37°C 4hrs 混ぜ合わせ、静地した。そして pNT-*lacZ* レポーター遺伝子を転移された NT102 をスペクチノマイシン、カナマイシン、5% シュクロース、アンピシリンを含むプレート培地にスポットした。生育したコロニーを液体培地に楊枝でつつき、37°C で対数増殖期である吸光度 0.5 (A600) になるまで培養し回収した。 $\beta$  ガラクトシダーゼ活性の測定は Miller の方法に従って行った。ペレットに 0.01% SDS を含む Z-buffer 1ml を加え、懸濁したのちクロロフォルム 25  $\mu$ l を加えた。この溶液 50  $\mu$ l に SDS を含まない Z-buffer 50  $\mu$ l、250  $\mu$ l ONPG を加え 5min 静置した。2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 250  $\mu$ l を加えたのち 1600G 20min 遠心し、プレートリーダーで蛍光を測定した。

## ポリウリジン依存ポリフェニルアラニン合成反応

生成した変異体リボソームを用いてポリウリジン依存ポリフェニルアラニン合成能力を評価した。

### 試薬と機器

液体シンチレーションカウンター ALOKA

濾紙(Whatman 3MM)

10% TCA

5% TCA

100% エタノール

### 手順

以下のような反応系で実験を行った。

50 mM Tris-HCl (pH 7.5)

1 mM DTT

60 mM KCl

6.5 mM MgCl<sub>2</sub>

0.5 mg/ml poly(U)

0.1 mM spermine

2.5 mM phosphoenol pyruvic acid

2.5 unit/ml pyruvate kinase

0.5 mM GTP

0.6 pmol/μl *E.coli* EF-Tu

0.6 pmol/ $\mu$ l *E.coli* EF-G

0.15 pmol/ $\mu$ l *E.coli* EF-Ts

0.075 pmol/ $\mu$ l 70S ribosome

0.3 pmol/ $\mu$ l [ $^{14}$ C] Phe-tRNA<sup>Phe</sup>

アミノアシル tRNA 濃度による滴定にはそれぞれ [ $^{14}$ C] Phe-tRNA<sup>Phe</sup> 濃度を 0~0.9 pmol/ $\mu$ l に調整し実験を行った。

全量を 80 $\mu$ l に調整し、 [ $^{14}$ C] Phe-tRNA<sup>Phe</sup> を最後に加えると同時に 37°C で 6min 反応させた。反応液 10 $\mu$ l を 1min おきに濾紙(Whatman 3MM) にスポットし、 10%TCA に 80°C で 30 min ボイルしデアシル tRNA を取り除いた。

次に濾紙を 5%TCA で 30minX2 回、最後に氷冷 100%エタノールで 5min 洗い、乾燥させてから液体シンチレーションカウンターで測定を行った。

## P-site binding

tRNA はまずリボソームの P-site に結合することが明らかになっている。アミノアシル tRNA をアセチル化することで A-site への tRNA の結合を防ぎ、またアミノアシル tRNA のアミノ酸部分を [ $^{14}\text{C}$ ] でラベルすることで、mRNA 依存的にリボソームの P-site に結合する tRNA の量を測定した。

## 試薬と機器

### Binding 反応

#### 10X 70S binding buffer

500 mM Tris-HCl(pH 7.5)

65 mM  $\text{MgCl}_2$

600 mM KCl

10 mM DTT

5 mM spermine

#### WASH buffer

50 mM Tris-HCl(pH 7.5)

6.5 mM  $\text{MgCl}_2$

60 mM KCl

1 mM DTT

0.5 mM spermine

ニトロセルロースフィルター (Advantec)

液体シンチレーションカウンター (ALOKA)

## 手順

以下のような反応系で実験を行った。

10X 70S binding buffer 1 $\mu$ l

70S ribosome 12.5 pmol

Ac-[<sup>14</sup>C] Phe-tRNA<sup>Phe</sup> 2.5 pmol

poly(U) 2.5  $\mu$ g

10 $\mu$ l

Ac-[<sup>14</sup>C] Phe-tRNA<sup>Phe</sup>を加えると同時に 37°Cに 1 5 min 反応させた。反応後、氷上に置き全量をニトロセルロースフィルター (Advantec) に直接スポットした。5ml WASH buffer でフィルターを洗浄したのち、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。

バックグラウンドを測定するために poly(U)を反応系に加えないものも同時に行った。

## A-site binding

アミノアシル化された 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 にデアシル tRNA を結合させておくことによって、自発的なトランスロケーションを防ぐ必要がある。P-site を埋めておかないと 0°C でも A-site から P-site へのアミノアシル tRNA のスライディングが起きてしまう。この場合、A-site に新たなアミノアシル tRNA が結合するとペプチド結合生成反応が起こり、できたペプチドを観測してしまう。

## 試薬と機器

### Binding 反応

#### 10X 70S binding buffer

500 mM Tris-HCl(pH 7.5)

65 mM MgCl<sub>2</sub>

600 mM KCl

10 mM DTT

5 mM spermine

#### WASH buffer

50 mM Tris-HCl(pH 7.5)

6.5 mM MgCl<sub>2</sub>

60 mM KCl

1 mM DTT

0.5 mM spermine

#### PEP/PK mix



100mM phosphoenol pyruvic acid	19 $\mu$ l
<u>2.5 unit/ml pyruvate kinase</u>	<u>1 <math>\mu</math>l</u>
	20 $\mu$ l

ニトロセルロースフィルター (Advantec)

液体シンチレーションカウンター (ALOKA)

## 手順

(P-site pre filling mix)

10X 70S Buffer	1 $\mu$ l
<i>E. coli</i> 70S ribosome	5 pmol
<i>E. coli</i> deacyl tRNA <sup>Phe</sup>	10 pmol
<u>poly(U)</u>	<u>2 <math>\mu</math>g</u>
	10 $\mu$ l

デアシル tRNA を加えると同時に 37 °C で 20min 反応させた。

↓

(P-site pre filling mix) に

(EF-Tu/GTP+aa-tRNA mix)

10X 70S Buffer	1 $\mu$ l
PEP/PK mix	0.5 $\mu$ l
20mM GTP	0.5 $\mu$ l
[ <sup>14</sup> C]Phe-tRNA <sup>Phe</sup>	10 pmol
<u><i>E. coli</i> EF-Tu</u>	<u>12.5 pmol</u>
	10 $\mu$ l (total volume 20 $\mu$ l)

↓

37 °C for 10 min

反応後、氷上に置き直ちにニトロセルロースフィルター (Advantec) に直接スポットする。

5ml WASH Buffer でフィルターを洗浄したのち、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。

## 結果

### 23S rRNA ヘリックス 69 の機能配列の決定

高度に保存された H69 ループのリボソーム機能での重要性を解析するため、本研究では当研究室で開発された SSER 法を用い H69 ループの機能配列を決定した。この方法では細胞内にランダムな配列にした rRNA を導入することで生育に必要な機能配列を大量の組み合わせの中から簡便に決定することができる。

SSER 法で、pRB101 と pRB102 の共存状態である km を含む LB プレートでコロニーを 896 個回収し、シュクロースを含む培地にスポットした。その結果、総数 48 個のプラスミドが置換された NT102 を回収した。H69 ループは種を超えて非常に高く保存された領域であるにもかかわらず、16,384 通りの組み合わせの中から野生株と同じ配列 (AACUAUA) を持つものを含めて 13 種類のリボソームとしての機能を持つ変異体を得られた(図.1-8)。野生株と同じ配列 AACUAUA を持った NT102 (クローン 1) は 35 個回収された。他の変異体についてはクローン 2、3、6 については 2 個ずつ、その他のクローンについてはそれぞれ 1 個ずつの数量が得られた。

得られた変異体のそれぞれの塩基ごとの変異を検討すると、1912 位 (保存塩基 A) と 1917 位 (U) については、すべての得られた変異体リボソームにおいて、他の塩基に置換されることがなかったので完全に保存された塩基と考えられる。このことから、この 2 塩基はリボソームの機能に必要な不可欠であることが推定される。1913 位 (A) において、クローン 7 と 12 で得られた変異体は G の変異を持つものであった。この変異体は、自然界では *Streptomyces galbus* と *Streptomyces mashuensis* が 1913 位に G を持つことがわかっている (AGCUAUA)。1914 位 (C) についてはクローン 2、7、10、11、12、13 で A もし

くは G に置換されたが、1914 位はバクテリアと古細菌の rRNA ではすべて C で保存されていることから、自然界には存在しない非天然の配列であることが明らかになった。1915 位 (U) についてはクローン 3、4、8、9、10、11、12、13 において、C もしくは A を持った変異体が得られた。1915 位は *Wolbachiae* で A を (AACACUA)、古細菌 *Aerophrum* では C (AACCCUA) の配列を持つ。また 1916 位 (A) については、この塩基はクローン 5、8、10、11、12、13 において他の 3 つの塩基 (U、G、C) へ置換可能だった。1916 位の C は *Wolbachiae* (AACACUA)、*Staphylococcus piscifermentans* (AACUCUA) と古細菌 *Crenarchaeota* (AACUCUA) で見られる配列だった。1918 位については、クローン 6、9、13 で見られたが、1918 は真核生物 rRNA ではほぼ G で保存されている。クローン 6 の 1918 位のみ G の変異を持つ AACUAUG という配列は真核生物型の H69 の保存配列だった。そしてそれぞれの保存性をまとめると、ARVHNUR という結果になった。

SSER 法によって得られたこの結果とあわせて、リボソームの機能に必要な H69 の塩基を決める他の方法を行い最終的な機能配列を決定した。SSER 法により置換した H69 ループのそれぞれの塩基に対し、他の 3 種類の塩基を持つプライマーを設定し、Quick-Change PCR により 1912-1918 位を 1 塩基ごと置換した。もし目的の部位の塩基が A であるならば、他の 3 種類の塩基 G、C、T (B) を持つプライマーで pRB102 を置換し、SSER 法と同様に NT101 に導入し、リボソーム機能を持つ変異体をシュクロース培地から選択した。もし、目標の塩基がリボソームの機能に必要な不可欠であれば変異体は得られない。この SSER を応用した方法を B-scan と名づけた。

その結果から SSER 法で得られた変異体クローンと同様に 1912 位と 1917 位は他の塩基に置換できなかった。1918 位 (A) はこの方法によって G 以外の変異体は得られなかったことから機能配列 (機能塩基) は R (A もしくは G) と決定された。

1913 位と 1914 位については SSER 法で得られたクローンの持つ変異のほかに、1913 位は C、U の変異と 1914 位は U の変異が導入可能だった。最終的に 12 種類の機能配列を持

つ変異体がこの解析で得られたが、そのうちの5つがそれぞれ SSER 法で得られたクローン 2、3、4、5、6 と同じ変異体であった。そして 7 つの新しい変異体 AGCUAUA (*Streptomyces galbus*, *Streptomyces mashuensis* と同じ配列)、ACCUAUA、AUCUAUA、AAUAUA、AAUUAUA、AACUGUA、AACUUUA (残りはすべて非天然) が得られた。

結果的として (図.1-8) 下部に示したように H69 の機能配列は ANNHNUR となった。

そして、オルガネラの rRNA の H69 は 5 から 8 塩基で構成されているため、H69 ループにおける塩基数の変化が大腸菌リボソームの活性に影響するかどうかを、1 塩基の挿入もしくは欠失したプライマーを設計し、B-scan 法により検討した (図.1-9)。しかしながら A1913 もしくは A1916 の 1 塩基の欠失や A1913 と C1914 の間の 1 塩基の挿入では、リボソーム活性を持つ変異体は得ることができなかった。加えて、H69 のステム部分である G1910 と C1920 に対しても、この 2 塩基を同時に削除し、ステムループの長さを短くするような SSER 法も行ったが、同様に変異体は得られなかった。このことから、H69 のステムの長さやループの大きさは大腸菌リボソームの機能に必要不可欠であることが明らかになった。

No.	1912	1913	1914	1915	1916	1917	1918	
(WT)	A	A	C	U	A	U	A	原核生物型
clone.2	A	A	G	U	A	U	A	
clone.3	A	A	C	C	A	U	A	
clone.4	A	A	C	A	A	U	A	
clone.5	A	A	C	U	C	U	A	
clone.6	A	A	C	U	A	U	G	真核生物型
clone.7	A	G	A	U	A	U	A	
clone.8	A	A	C	C	C	U	A	
clone.9	A	A	C	A	A	U	G	
clone.10	A	A	A	C	U	U	A	
clone.11	A	A	A	A	C	U	A	
clone.12	A	G	A	A	C	U	A	
clone.13	A	A	G	C	G	U	G	
consensus	A	R	V	H	N	U	R	
B scan	A	N	N	H	N	U	R	

図. 1-8 SSER法によって得られた変異体と機能配列  
 pRB101とpRB102の共存状態のコロニーを896個、回収した。48個の得られた  
 変異体のうちクローン2、3、6については2個ずつ、その他のクローンは1個ずつ変異体を得た。

株とはほぼ同様の生育速度であった。また、この配列は、3'末端にシグナル配列を  
 とからクローン1における生育速度を比較すると、1915位へのAの交換は、生育速度を  
 考えられた。  
 この結果から、生育速度は、1915位、Aの交換で導入されることによるものと考えら  
 れる。また、1915位にAの交換を各行は、異なるクローンにおける生育速度を比較する。クロー  
 ン1、2、3、6、10、11、12、13の生育速度は、ほぼ同様の生育速度であった。クロー  
 ン10、11、12、13では生育速度の相違が認められることから、クローン1、2、3、6、10、11、12、13  
 株がリボゾームの機能を担っていると考えられる。また、1915位にAの交換は、生育速度を  
 比較する。クローン11 (AAASUCAG)、クローン12 (AAASUCAG)、クローン13 (AAASUCAG)の生育速度を比較する  
 ことから、1915位へのAの交換が生育速度を決定する重要な配列であると推定される。また、1915位にAの交換は、生育速度を  
 比較していると考えられる。

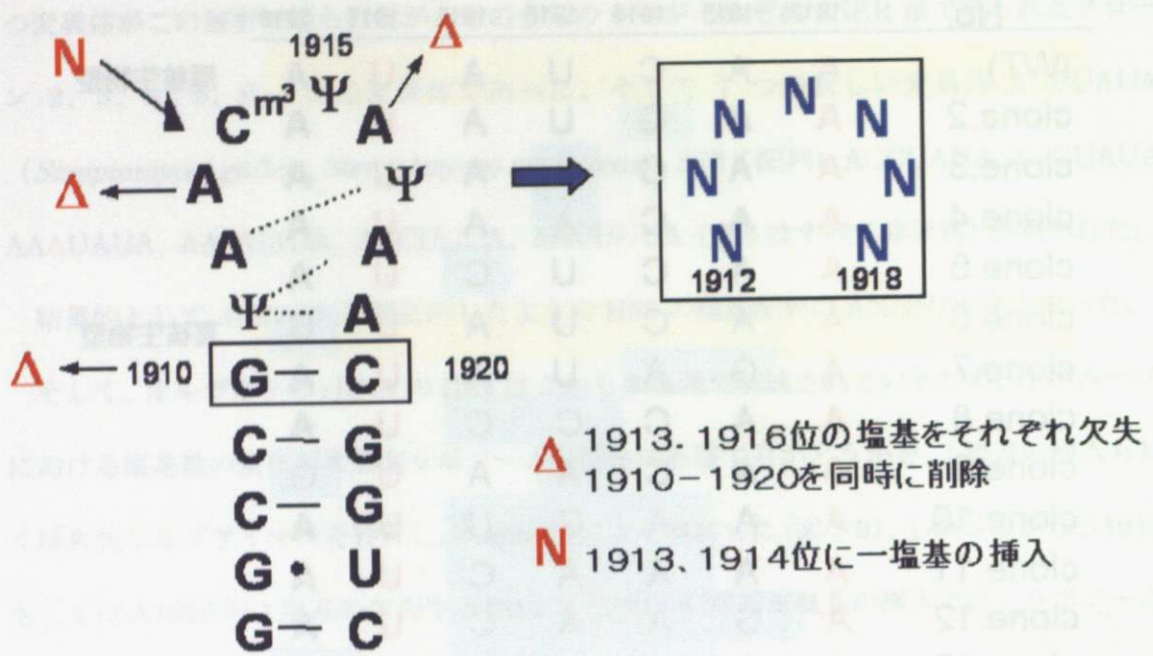


図. 1-9 H69の塩基数の変化によるリボソーム機能の検討  
 プライマー設計時に、塩基数を変えることにより挿入、もしくは欠失、  
 またはステムの長さの変化を試みた。

## H69 変異体の生育速度の検証

SSER 法で得られた変異体のリボソーム機能を検討するために、細胞の生育速度を、マイクロプレートリーダーを使用して 30 分ごとそれぞれの変異体について測定した。この変異体はリボソームが完全に変異体に置換されているために変異体リボソームのタンパク質合成能力が直接、生育速度に反映される。そこでそれぞれの生育速度を測定することによって間接的に変異体リボソームのタンパク質合成能力（リボソーム活性）を検討できる。生育速度はそれぞれの変異体について同時に 3well 測定し、平均値を結果として用いた。再現実験を 4 回行い、その傾向から野生株に対する生育速度の割合が 10% 程度の違いは誤差範囲として処理して生育阻害の評価を行った。

得られた結果から (図.1-10)、1915 位が A の変異体クローン 4 (AACAAUA) は非常に生育速度が低下し、野生株 NT101 の生育速度の約半分ほどの活性(44%)しか見られなかった。1915 位と 1918 位に変異を持つクローン 9 (AACAAUG) もまた生育阻害が観察された (62%)。また、1918 位に G の変異を持つクローン 6 (AACUAUG) については、野生株とほぼ同程度の生育速度だったことから、生育阻害は起きていないと判断した。このことからクローン 9 における生育阻害を表す原因は、1915 位への A の変異に起因することが考えられる。

この結果から、生育阻害は 1915 位に A の変異が導入されることによるものと考えられるが、1915 位に A の変異を含む変異体クローンの生育速度を考察すると、クローン 4 に比べてクローン 9 では生育速度の回復が見られることから、クローン 9 の 1918 位への G の変異がリボソームの機能を相補していると考えられる。また、同様に 1915 位に A の変異を持つクローン 11 (AAAAUCA)、クローン 12 (AGAACUA) についても生育速度が回復していることから、1915 位への A の変異が引き起こす生育阻害を、他の部位に導入された変異が相補していると考えられる。



No.	1912	1913	1914	1915	1916	1917	1918	doubling time	RGR (%)
(WT)	A	A	C	U	A	U	A	50.05 ± 2.6	
clone.2	A	A	G	U	A	U	A	47.33 ± 0.6	106
clone.3	A	A	C	C	A	U	A	45.21 ± 1.3	111
clone.4	A	A	C	A	A	U	A	114.92 ± 0.4	44
clone.5	A	A	C	U	C	U	A	57.11 ± 1.1	88
clone.6	A	A	C	U	A	U	G	54.48 ± 2.3	92
clone.7	A	G	A	U	A	U	A	47.19 ± 2.3	106
clone.8	A	A	C	C	C	U	A	53.78 ± 1.8	93
clone.9	A	A	C	A	A	U	G	81.05 ± 0.2	62
clone.10	A	A	A	C	U	U	A	44.51 ± 1.6	112
clone.11	A	A	A	A	C	U	A	69.78 ± 3.2	72
clone.12	A	G	A	A	C	U	A	73.81 ± 0.9	68
clone.13	A	A	G	C	G	U	G	46.47 ± 2.5	108
consensus	A	R	V	H	N	U	R		
B scan	A	N	N	H	N	U	R		

図. 1-10 SSER法で得られた変異体の生育速度の測定  
R(AもしくはG) V(A C G) H(A U G) N(すべての塩基)  
RGR(related growth rate)

## H69 変異体におけるサブユニット会合状態の検証

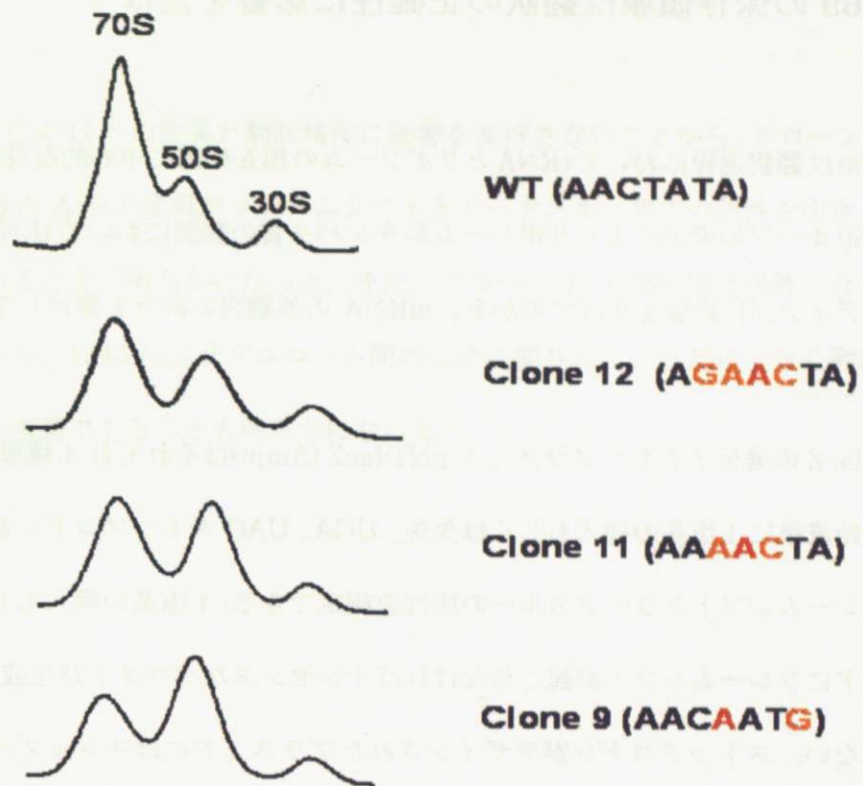
変異 rRNA を持つ NT102 における生育速度の低下は、それぞれの変異体リボソームのタンパク質合成能力が反映されるため、その変異体リボソームの機能低下が引き起こした結果と考えられる。そこで、H69 の変異がリボソームに与える影響を、現在までに明らかになっている知見を基に H69 と相互作用する因子について検討した。

H69 は小サブユニットと架橋することで B2a といわれる架橋部位を形成し、サブユニット間の会合に関与している。サブユニット間の会合はリボソームの機能にとって大変重要で、その会合が阻害されることは 70S リボソームの絶対量が減少するために細胞の成育にも大きな影響を及ぼす。そこで本研究では、ショ糖密度勾配遠心法 (SDG) を用いてリボソームサブユニット間の会合状態を、生育阻害を示したリボソーム変異体クローン 9、11、12 について、検証した。もっとも低い生育速度を示した 1915 位に A の変異を持つクローン 4 については、細胞の生育が非常に悪く、菌体やリボソームを回収して用いる実験には十分量を得ることができなかつたために解析不能だった。

SDG 法による解析結果から (図.1-11)、生体内の濃度に近い 6mM マグネシウム (Mg) の条件下では、50S 大サブユニットは野生株において全体の約 70% が 70S リボソームを形成していた。それに対して、H69 変異体のクローン 9、11、12 では野生株に対して明らかに 70S リボソームの割合が減少していた(図.1-11A)。また、サブユニット間の会合は Mg 濃度に左右されることが明らかになっているため、Mg 濃度変化による会合状態の変化をそれぞれの変異体について同様に SDG 法で検証した(図.1-11B)。得られた結果として、Mg 濃度を上昇させることにより 70S リボソームの割合がそれぞれの変異体である程度上昇した。しかしながらクローン 9 では高濃度 (15mM) の Mg でも 50S 大サブユニットの 60% が依然 30S 小サブユニットと会合することなく残っていた。この結果から、H69 ループの塩基配列がさまざまな組み合わせの配列に変換されることによって、リボソームのサブユニッ

ト間の会合に影響を与えることが明らかになった。そして結果から 1915 位の A はクローン 9、11、12 に共通していることから H69 の 1915 位はサブユニットの会合に関与し、通常の細胞の成育を導くのに必要な塩基であると推定される。

A.



B.

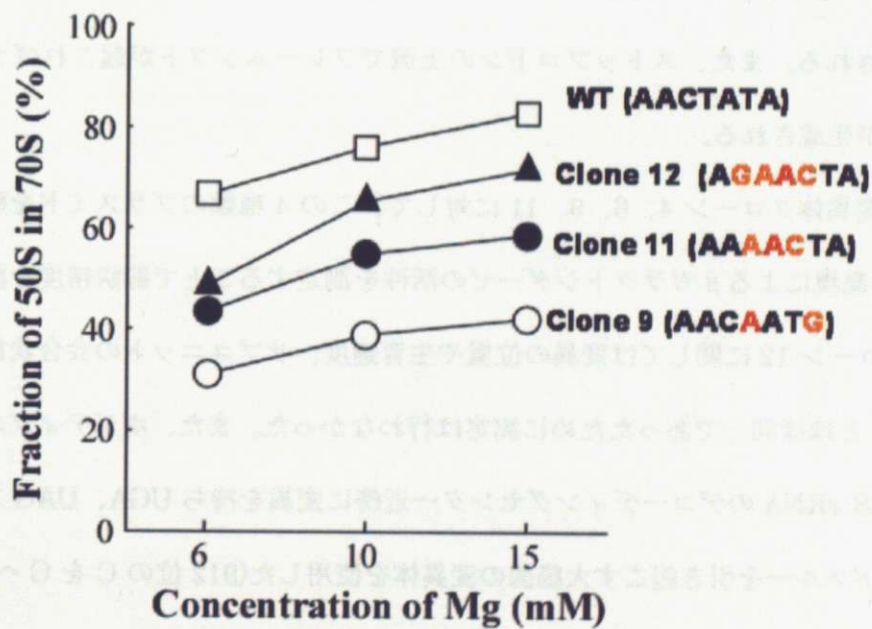


図. 1-11 SDGによるサブユニット間の会合状態  
 A) 6 mM Mg濃度条件下の会合状態  
 B) 6, 10, 15 mMのMg濃度による会合の割合

## H69 の保存領域は翻訳の正確性に影響を及ぼす

H69 は翻訳過程において tRNA とリボソームの相互作用に中心的な役割を果たすことから、H69 ループの変異によりリボソームがタンパク質の翻訳において tRNA と mRNA とのデコーディングに影響を及ぼすのかを、mRNA の誤翻訳の割合を測定してリボソーム機能を評価した。

lacZ の遺伝子をもつプラスミド pNT<sup>r</sup>-lacZ (Amp<sup>r</sup>) はそれぞれ 4 種類、lacZ 遺伝子の ORF 開始直後に 1 塩基の挿入もしくは欠失、UGA、UAG ストップコドンデザインすることでフレームシフトとリードスルーの活性を測定できる。1 塩基の挿入もしくは欠失したプラスミドにフレームシフトが起こらなければナンセンスなペプチドが生成されて lacZ は翻訳されない。ストップコドンがデザインされたプラスミドにはストップコドンにリリースファクター (RF) が入らず、アミノ酸をチャージした tRNA が入るリードスルーが起きれば lacZ 遺伝子は翻訳される。また、ストップコドンの上流でフレームシフトが起こればナンセンスなペプチドが生成される。

それぞれの変異体クローン 4、6、9、11 に対して、この 4 種類のプラスミドを導入して lacZ 遺伝子の発現による β ガラクトシダーゼの活性を測定することで翻訳精度を測定した (図.1-12)。クローン 12 に関しては変異の位置や生育速度、サブユニットの会合状態の結果がクローン 11 とほぼ同一であったために測定は行わなかった。また、ポジティブコントロールとして 16S rRNA のデコーディングセンター近傍に変異を持ち UGA、UAG ストップコドンのリードスルーを引き起こす大腸菌の変異体を使用した(912 位の C を G へ置換し、後に 885 位の G を U へ置換)。

結果として、生育速度が一番低かったクローン 4 とその次に悪かったクローン 9 はフレームシフトおよびリードスルー両方の活性が見られた。1918 位に G の変異を持つクローン 6 については野生株と比べてデコーディングの活性に明らかな差は見られなかった。クロー

ン 11 は +1 フレームシフトと UGA リードスルーについて活性が野性株に比べて高い傾向が見られた。

クローン 6 の 1918 位の G への変異が翻訳精度に影響を及ぼさないことから、クローン 4 と 9 において 1915 位の A への変異がフレームシフトとリードスルー両方の活性を引き上げることに関与していることが明らかになった。また、クローン 11 も翻訳精度が悪くなる傾向が見られたことから、1915 位はサブユニット間の会合に関与しているだけでなく翻訳精度にも影響を与える塩基であることも明らかになった。

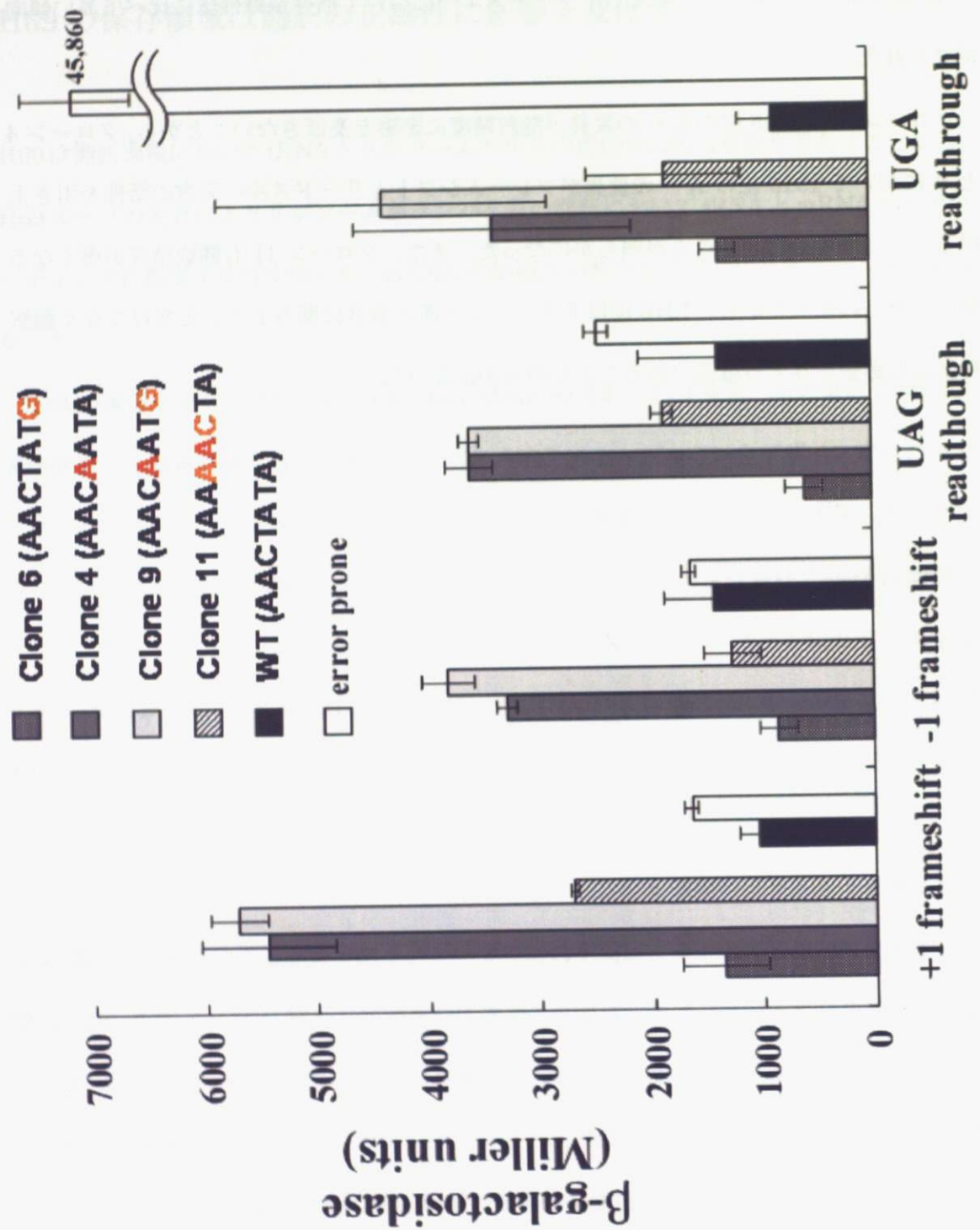


図. 1-12  $\beta$  ガラクトシダーゼの活性による翻訳精度の検証  
error prone (C912G, G885U)

## H69 のタンパク質合成に対する影響

次に本研究では、低い生育速度と翻訳精度も悪い傾向を示した 1915 位に A の変異を持つクローン 9 とクローン 11 について、H69 の変異がリボソーム自体の機能に影響を及ぼしているのかを知るためにタンパク質合成機能の活性を測定した。もっとも生育速度の低かったクローン 4 についてはリボソームを回収することはできなかったため、解析不能だった。

*in vitro* で野生株とクローン 9、クローン 11 のリボソームに poly-U mRNA、フェニルアラニン tRNA、その他の伸長因子 (EF-G、EF-Tu、EF-Ts) を混合させてポリペプチドの合成反応を検討するポリウリジン依存ポリフェニルアラニン合成反応により翻訳活性を検討した(図.1-13)。

得られた結果から、野生株のリボソームに対して、クローン 9、クローン 11 両方の変異体リボソームではポリペプチドの合成量から、合成速度が遅くなっていることが観察された(図.1-13A)。このことからそれぞれの変異体ではリボソームのタンパク質合成能力が弱くなっていることが考えられる。また、リボソームの活性が最も反映される生育速度の測定の結果、生育阻害が見られなかったクローンについてはリボソームのペプチド合成能力には野生株に比べて大きな差はないと推測される。

次に、ポリフェニルアラニンの合成量の違いをそれぞれの変異体についてアミノアシル tRNA の濃度を変化させ(0~0.9  $\mu$ M)、10  $\mu$ l あたりの 6 分間でのフェニルアラニンの取り込みを測定することで滴定した(図.1-13B)。その結果、それぞれの変異体クローンでポリフェニルアラニンの合成能力はアミノアシル tRNA の濃度依存的であることが明らかになった。それぞれのクローンで、野生株と同じリボソームの翻訳活性を示すには約 2 倍から 3 倍のアミノアシル tRNA の濃度が必要になることも明らかになった。そこで、伸長因子のひとつで翻訳過程のトランスロケーションに関与し、H69 のステム部位(1908 位-1909 位、1922 位-1923 位) との相互作用をしている EF-G についても同様にその濃度によるペプチ



ド合成量の違いを滴定した(図.1-13C)。野生株と変異体リボソームのペプチド合成能力には差があるためにこの反応系の至適条件では合成量の差が見られるが、EF-G の非常に低い濃度による滴定では野生株と変異体クローンとの間では明確なペプチド合成量の差は確認されなかった。

この結果から、クローン 9、11 は、翻訳の活性を上げるためにアミノアシル tRNA の高い濃度を必要とすることが明らかになった。このことから H69 は tRNA との結合に影響を及ぼすと考えられる。また、H69 ループは tRNA の A/T state から A-site への取り込みの段階で相互作用することから、H69 は tRNA との結合や取り込みに重要な役割を担っていると推測される。

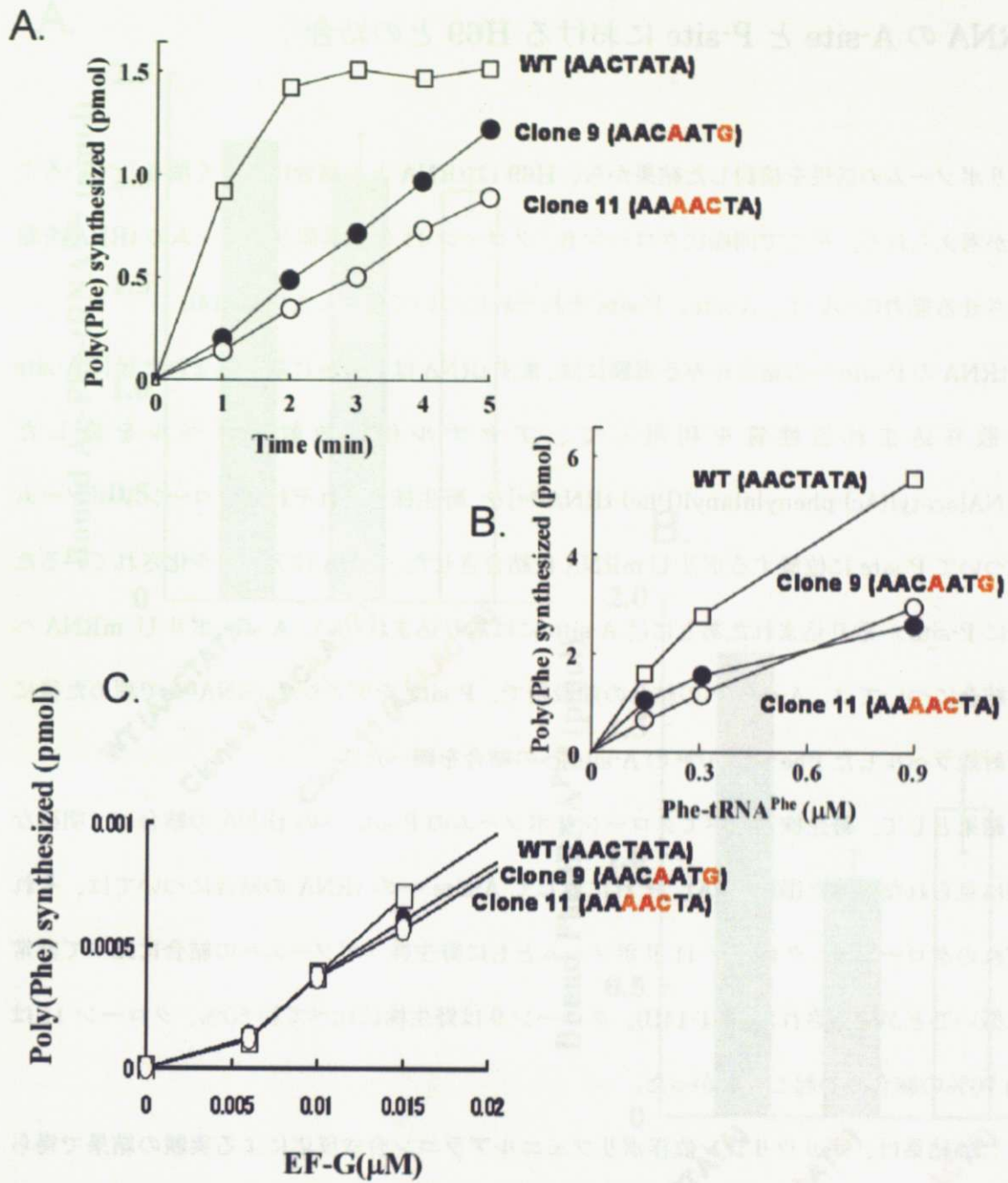


図. 1-13 ポリウリジン依存ポリフェニルアラニン合成反応 (Poly-U, Poly-Phe)  
 A) 時間経過によるポリフェニルアラニンの合成量  
 B) Phe-tRNA<sup>Phe</sup>の濃度変化による滴定  
 C) EF-Gの濃度変化による滴定

## tRNA の A-site と P-site における H69 との結合

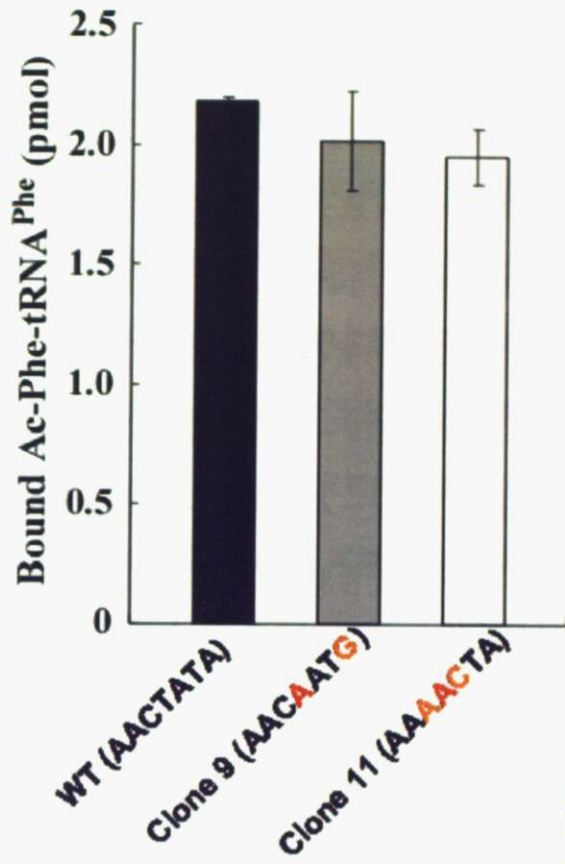
リボソームの活性を検討した結果から、H69 は tRNA との結合に大きく関与していることが考えられる。そこで同様にクローン 9、クローン 11 の変異体リボソームの tRNA を結合させる能力について、A-site、P-site それぞれについて検討した(図.1-14)。

tRNA の P-site への結合をみる実験には、まず tRNA は P-site に取り込まれた後に A-site へ取り込まれる性質を利用して、アセチル化と放射能ラベルを施した tRNA[acetyl(Ac)-phenylalanyl(Phe)-tRNA<sup>Phe</sup>]を、野生株とそれぞれのクローンリボソームについて P-site に位置するポリ U mRNA に結合させた。tRNA はアセチル化されているために P-site へ取り込まれたあとには A-site には取り込まれない。A-site ポリ U mRNA への結合については、A-site への結合の前段階で、P-site をデアシル tRNA<sup>Phe</sup> で埋めた後に放射能ラベルした Phe-tRNA<sup>Phe</sup> の A-site への結合を調べた。

結果として、野生株と比べてクローンリボソームの P-site への tRNA の結合には明確な差は見られなかった(図.1-14A)。それに対して A-site への tRNA の結合については、それぞれのクローン 9、クローン 11 リボソームともに野生株リボソームへの結合に比べて非常に低いことが確認された(図.1-14B)。クローン 9 は野生株に比べて約 50%、クローン 11 は約 70%の結合しか起こらなかった。

この結果は、ポリウリジン依存ポリフェニルアラニン合成反応による実験の結果で得られたポリフェニルアラニン合成の初速度の低下と、それぞれの変異体リボソームの活性は tRNA 濃度依存的である結果と一致する。このことから H69 ループ部位は P-site ではなく A-site への tRNA の結合に関与していることが考えられる。

A.



B.

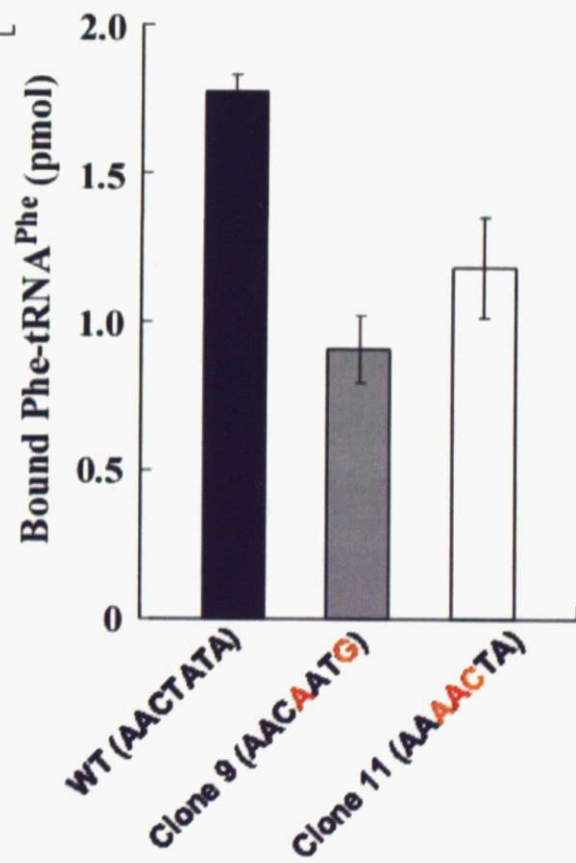


図. 1-14 t RNAの変異体リボソームとの結合  
 A) P-siteに対する t RNAとの結合  
 B) A-siteに対する t RNAとの結合

## まとめと考察

近年、リボソームの結晶構造解析の結果から、多くの 23S rRNA と tRNA とのリボソーム機能における関係が明らかになりつつある。その中でリボソーム機能に必要な不可欠な塩基配列を決定することは、ペプチド結合形成の機構を明らかにするために非常に重要な知見となりうる。PTC や H69、サルシンリシンループなどの高く保存された塩基配列は、進化の過程において常に選択された結果であり、これはリボソームの機能に非常に重要であるといえる。このことを踏まえると自然選択されたリボソームの機能配列は生存競争の結果であり、大量の機能配列がこの過程で失われていったと考えられる。しかし、リボソームの機能に必要な不可欠な塩基配列を決定するにあたり、データベースの塩基配列の保存性を参照するだけでは満足な結果は得られない。しかし、SSER 法の結果はその塩基配列が偶発的に保存され、本当にその塩基がリボソームの機能に必要な不可欠でないものかが判断できるので、この SSER 法の結果から重要な結果が得られる。

本章では SSER 法を用い大腸菌 23S rRNA の H69 ループ領域の機能配列を 16,384 通りの組み合わせの中から決定した(図.1-8)。この方法の一番大きな利点として、リボソームの機能に必要なすべての機能配列を調べることができるということである。野生株と同じ配列や自然界に存在する生物に見られる配列を含め、進化の過程で排除されたような自然界に存在しない配列でも機能を有するものであればこの方法で回収することができる。またこの方法は機能配列を決定する上で、研究者の憶測や恣意が反映されない中立的な解析方法であるということが利点として挙げられる。さらに、たとえばいくつかの配列が機能的であるにもかかわらず保存配列に比べホモロジーが低いものであっても SSER 法はこれらの配列をすべて決定でき、従来の野生株由来のリボソームと共存する変異導入法ではわからないこれら機能配列を決定できる。事実この方法で 7 塩基をランダムにした結果、4 塩基に変異を持つ H69 の機能配列 (クローン 12、13) を得た。SSER 法は *rrn* オペロンの置換

を基本としているので、翻訳に必要な大腸菌の rRNA 配列を厳密に選択できる。このことから短時間で進化の過程での自然淘汰を模倣できるといえる。またこの方法は 23S と 16S rRNA 両方のいずれの領域にも利用でき、機能配列の決定ができる。加えてこの方法で得られた変異体は変異リボソームのみを持つ大腸菌なので、in vivo での表現型を in vitro での生化学的な実験で得られたデータと同様にリボソームの機能として評価できる。

H69 は非常に高く保存された領域であるにもかかわらず、野生株と同じ配列を持ったものも含めて 13 個のリボソームとしての機能を持った変異体が得られた(図.1-8)。しかしながら、この SSER 法で、選択可能な組み合わせの配列をもつ変異体をすべて得るには非常に多くの時間が必要になる。実際に、自然界には今回の SSER 法によって得られなかった配列をもつ生物が存在する。このことから H69 の機能配列の組み合わせはすべて得られたわけではないと推測される。そこで、それぞれ 1 塩基ごとに SSER 法を行う B-scan 法によってそれぞれの機能配列(機能塩基)を決定した。この方法によって、他の変異の導入が可能かどうかやすべての変異体で選択された塩基が必要不可欠なのかの確認が行える。そして、B-scan によって加えて 7 つの 1 塩基のみに変異の入った変異体も得られた。そこで得られた 20 個のリボソーム機能を持つ変異体を解析した結果、1912 位の A と 1917 位の U の部位はすべての得られた変異体で完全に保存されており、このことからこれらの 2 つの塩基はリボソームの機能維持に必要不可欠であるということが明らかになった。1918 位の塩基についてはプリン残基であれば受け入れられ、ピリミジン残基では排除されることが明らかになった。そして 1918 位に G の変異をもつクローン 6 は生育速度には影響を与える変異ではなかった。また真核生物 rRNA では 1918 位は G で保存されていた。*Deinococcus radiodurans* の 50S サブユニットの結晶構造では 1918 位の A と 1911 位の Ψ は塩基対を組んでいて、このことから A-Ψ もしくは G-Ψ の対合が H69 の機能と構造の維持に必要不可欠であると考えられる。1915 位に関しては A もしくは C に置換することができた。1915 位に C の変異を持つクローン 3、8、10、13 は生育速度に影響はなかったが、1915 位に A

の変異を持つクローン 4 は著しい生育阻害を示した(図.1-10)。これは 1915 位がピリミジン塩基に置換されたことが原因であると考えられる。また、1915 位の A の変異は A-site への tRNA の結合と同様にサブユニット間の会合にも影響を与えることが明らかになった(図.1-11)。1913 位、1914 位、1916 位の塩基は 4 つすべての塩基が受け入れられ、進化的に保存されている領域にもかかわらず機能的なリボソームが作られることが明らかになった。にもかかわらず H69 の配列が進化的に非常に高く保存されている理由としては、構造的に他の配列の組み合わせよりも安定な構造をとる可能性や、H69 は翻訳精度にも影響をすることから、機能的にもっとも正確な働きをするような組み合わせであることが推測される。実際に、これらの得られた変異体の培養を繰り返すと野生株の配列をもったリバータントが出現し、最終的にはそのリボソームに置き換わることから推測できる。

H69 の立体構造から 1912 位と 1917 位が必要不可欠な塩基として同定された(図.1-15)。1918 位は原核生物型と真核生物型で違いが見られるものの同様に重要な塩基として同定された(図.1-15A)。1912 位と 1917 位の塩基は 30S 小サブユニット側の H44、1407 位と 1494 位の minor groove と相互作用している(図.1-15B)。この構造を維持することがリボソームの機能維持に必要不可欠と考えられる。今回の SSER 法により得られた 1915 位に A の変異をもつクローンは、サブユニット間の会合が非常に低下していた。立体構造の図から 1915 位は H44 との相互作用に関しては H69 ループの他の塩基に比べて直接的な水素結合は少ないが、これは 1915 位が A に置換されることで H69 の構造に変化がおきてサブユニット間の結合に影響を及ぼすと考えられる。

次に、H69 の得られた 20 個の変異体の中から、1915 位に A の変異を持つクローン 4、9、11、12 について H69 の機能解析を行った(図.1-10)。1915 位のみ A の変異を持つクローン 4 は著しい生育阻害を示した。(RGR44%) 1915 位に A と 1918 位に G の変異体クローン 9 も低い生育速度だった (RGR62%)。しかし多少クローン 4 に比べると生育速度が回復していた。1918 位のみ G の変異を持つクローン 6 は生育阻害を引き起こさなかったので、

クローン 9 の低い生育速度は 1915 位の A の変異に起因すると考えられる。加えて 1918 位の G の変異が 1915 位の A への変異を相補していると考えられる。また、1915 位の A の変異を持つ変異体クローン 11 と 12 については、クローン 4 とクローン 9 に比べて生育速度の回復が見られた (RGR72%、68%)。クローン 11 と 12 は共通して 1914 位に A と 1916 位に C の変異を持つため、これらの変異が 1915 位の A による生育阻害を引き起こす変異を相補していると考えられる。1915 に A と 1916 位に C の配列を持つ生物は、自然界に存在する生物の中で *Wolbachiae* rRNA にみられる(AACACUA)。このことから AACACUA の配列はリボソームとしての機能を持つ H69 の構造をとると考えられる。しかしながら今回の SSER 法ではこの配列を持つ変異体は得られなかった。そして、1915 位に A の変異を持つ変異体リボソームについて生化学的な解析を行うために、クローン 4 の代わりにクローン 9、11、12 について解析を行った。1915 位のみ A の変異を持つクローン 4 については、生化学的な解析を行う試みを行ったが、このクローンは非常に低い生育速度のため、生化学的な実験を行うために十分な試料を得ることができなかった。(図.1-12)において、クローン 6 における 1918 の G への変異は真核生物型の変異なので  $\beta$  ガラクトシダーゼレポーターアッセイによる翻訳精度に問題はなかったが、クローン 4 (1915 位のみ A の変異)と同様にクローン 9 (1915 に A、1918 に G の変異)は翻訳精度に影響を及ぼした。このことから 1915 位の A の変異がクローン 9 における翻訳精度への影響を与えることが明らかになった。1915 位の A の変異はサブユニット間の結合や A-site への tRNA の結合にも影響を及ぼすことから、これらの結果は低い翻訳速度や生育阻害の結果と一致し、説明がつく。

最近の H69 についての研究で、rRNA をコードしたプラスミドにそれぞれ 1914 位の C を U へ置換、1916 位の A 塩基の欠失、1916 位と 1917 位の間に 2 つのアデニン(+AA1916)の変異を導入し、大腸菌に共発現させた結果から、この変異は +1、-1 フレームシフトと同様にストップコドンのリードスルーも引き起こすことが明らかになった<sup>21</sup>。また他の研究



では、1912位のAをGへ置換、1919位のAをGへ置換、1917位のΨをCへの変異を組み込んだ rRNA プラスミドを共発現させることで、翻訳阻害と生育速度の低下を招くことが明らかになった<sup>22</sup>。さらには1916位のAからGへの変異は50S大サブユニットの形成を妨げることが確認された。しかしながらこの研究は大腸菌の中でプラスミドにコードされた変異 rRNA とゲノムに存在する野生株のリボソームが混在する形をとるために、この研究結果は変異リボソームが野生株リボソームの機能を抑制した結果であると考えられる。実際、細胞全体の30%~40%だけが変異リボソームになっている<sup>22</sup>。本研究でのSSER法はこれらの研究と違い、それぞれ変異リボソームに完全に野生株リボソームと置換している。本研究では、細胞内で野生株を変異リボソームに置換した結果、1912位のAをGに置換したもの（1912位は必要不可欠な塩基）、1917位のΨをCに置換したもの（1917位も必要不可欠な塩基）、1916位の欠失は変異体を得られなかったことから、これらの変異体はリボソームの機能を持たないということが明らかになった。1914位のCをUへの変異と1916位のAをGへの変異はリボソーム機能を持つ変異だった。また他の研究結果の1915位のΨをCへの変異と、1918位のAをGへの変異は表現型に影響しないことは本研究の結果と一致した。

1915位にAの変異をもつクローンにみられる翻訳精度の低下について検討すると、H69の頭頂部（1914位付近）はデコーディングの段階でA/T stateの状態のtRNAのD-stem(24-25)と直接接触することが知られている<sup>9</sup>(図.1-2)。この相互作用は30S小サブユニットにおけるコドンアンチコドンの対合が正しい位置で行われることを可能にするために、ねじれた形のアミノアシルtRNAを受け入れる重要な過程と考えられる。GTPの加水分解の後、アミノアシルtRNAからEF-Tuが解離するが、そのときにこのねじれたtRNAが緩み、元の形に戻ることでアミノアシル末端が50Sサブユニットのペプチジルトランスフェラーゼセンターに収まる。現在、このようなmolecular springというモデルが提唱されている。最近の研究から、Hirsh suppressorと名づけられたD-stemに24位のGがA

に置換された変異を持つ tRNA<sup>Trp</sup> は<sup>23</sup>、UGA ストップコドンのリードスルー活性を促進することが明らかになった。そして H69 ループは A/T state においてこの tRNA 側の 24 位と接触するが、またこの変異 tRNA は GTPase の活性を促進することで near-cognate コドンの誤認識を起し、tRNA のアミノアシル末端が、50S 大サブユニットの A-site への取り込みを促す<sup>24</sup>。この結果は翻訳精度の調節に重要な過程であるデコーディングセンターにおけるコドンアンチコドンの相互作用とは別の tRNA の D-stem と H69 の間の特異的な相互作用であるといえる<sup>25</sup>。今回の得られた結果から、H69 は tRNA との A/T state から A-site へかけての相互作用に関与していることが明らかになった。H69 の 1915 位に A をもつクローンは tRNA の誤翻訳を引き起こすこととあわせて考察すると、H69 の 1915 位はコドン認識の起る A/T state において、tRNA のステム部位と作用し tRNA の結合を調整している部位で、また、正しいコドンアンチコドンのシグナルを EF-Tu 側に伝える機構にも重要な役割を担っている可能性が考えられる。今までの研究ではコドン認識はスモールサブユニット側のデコーディングセンター付近のみで行われていると考えられてきたが、今回の結果からコドン認識には大サブユニット側も関与していると推測される。

リボソームにはさまざまな機能部位が存在し、それぞれの因子との相互作用でリボソーム機能を維持しているが、多くのリボソーム機能部位は単一の役割を担っている。それに対して、H69 は 50S 大サブユニットと 30S 小サブユニットとの会合に非常に重要な役割を担っているほかに、tRNA の結合にも大きな役割を担っていることが明らかになった。また、H69 との 30S 小サブユニット側の架橋部位である H44 には、タンパク質合成の開始時にすべての用意が整う前にサブユニットの結合がおこってしまうのを防ぐ IF3 が結合することや、H69 は翻訳終了後に 70S リボソームを大小のサブユニットに分離する RF とも相互作用することから、H69 は一連の翻訳過程におけるリボソームの機能に非常に重要な役割を担っている機能部位であると考えられる。

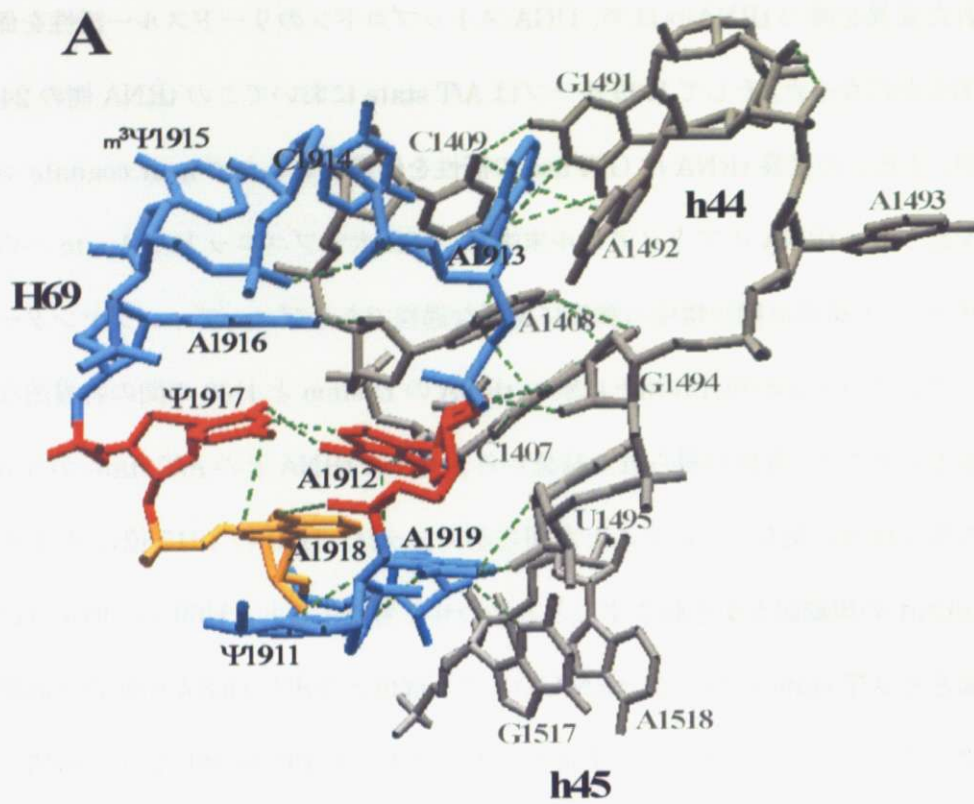


図 1-15 H69の立体構造

- A) 必要不可欠な塩基1912位、1917位は赤色、1918位はオレンジ、その他H69の塩基は青色  
 小サブユニットH44、H45はグレー  
 B) 必要不可欠な塩基1912位、1917位と小サブユニットとの相互作用

## 第2章

### 序論

すべての生物においてリボソーム RNA 中には多くの、さまざまな種類の修飾塩基が存在している。その中でシュードウリジン ( $\Psi$ ) はリボソーム RNA では一般的な修飾塩基のひとつで修飾塩基の中では一番多い。大腸菌の修飾塩基には  $\Psi$  のほかにも 1-methyladenosine ( $m^1A$ )、2-methyladenosine ( $m^2A$ )、 $N^6$ -methyladenosine ( $m^6A$ )、 $N^6, N^6$ -dimethyladenosine ( $m^6_2A$ )、5-methylcytidine ( $m^5C$ )、2'-O-methylcytidine ( $Cm$ )、 $N^4, 2'$ -O-dimethylcytidine ( $m^4Cm$ )、1-methylguanosine ( $m^1G$ )、 $N^2$ -methylguanosine ( $m^2G$ )、7-methylguanosine ( $m^7G$ )、2'-O-methylguanosine ( $Gm$ )、 $N^2, N^2$ -dimethylguanosine ( $m^2_2G$ )、dihydrouridine ( $D$ )、5-methyluridine ( $m^5U$ )、2'-O-methyluridine ( $Um$ )、3-methyluridine ( $m^3U$ )、3-methylpseudouridine ( $m^3\Psi$ ) が存在する (<http://medstat.med.utah.edu/RNAmods/>) (図.2-1)。また、シュードウリジンは mRNA のポリヌクレオチド鎖が合成された直後に、その特異的な場所が修飾を受ける<sup>26, 27</sup>。真核生物以外は、その修飾を受ける部位をガイドする snoRNA や修飾酵素のほかにはエネルギーを必要としないことがわかっているが (真核生物には Zn が必要)、その修飾部位の認識機構や異性化のプロセスはよくわかっていない。真性細菌の修飾部位の認識機構は、修飾部位に RNA が特異的に結合し、後に修飾酵素がメチル化や、U を  $\Psi$  への異性化を触媒する。しかしながら、このような合成が可能な部位は大サブユニットの RNA だけで 1200 以上の U があることから、修飾酵素による特異的な認識が行われていると考えられるが、その認識機構はいまだに明らかになっていない。このことから、現在までに多くの修飾酵素が発見されているが、それでもなおまだ多くの未知な修飾酵素が存在すると思われる。

現在、大腸菌では 10 個の  $\Psi$  への修飾酵素が知られている。その中では 3 つは tRNA への修飾酵素である。ひとは小サブユニットへ、残りの 6 つは大サブユニットへの修飾酵素である。また、ひとつの修飾酵素を削除しても、特定の場所の修飾が欠損するがすべての修飾が欠損するわけではないので、それぞれの酵素が特定の場所を修飾している。rRNA の修飾の意味については現在のところ明確な答えは出ていないが、おそらくリボソームがゲノムから転写され、立体構造をとる過程において、その成熟に関与しているのではないかと推測される。

修飾酵素 RluD は H69 のウラシル塩基 U1911、U1915、U1917 を特異的に修飾する酵素として知られているが、おそらくこの酵素は H69 のステムループ構造を認識し、U を  $\Psi$  に修飾していると考えられる。大腸菌の 7 つあるうちの RluD 以外の 6 つの修飾酵素を削除し、修飾欠損を引き起こした実験では、高温下、低温下を含め、生育速度に影響がないことが報告されている<sup>28-31</sup>。しかし、RluD を欠損した場合においてのみ、生育阻害を引き起こす<sup>32,33</sup>。この生育阻害は、修飾を rRNA に付与する反応部位を不活性化した RluD をこの欠損株に導入することである程度は相補される<sup>33</sup>。このことから RluD は通常の生育に必要であり、rRNA の修飾が直接的に生育阻害を引き起こしているわけではないことを示す。また、他の報告では、RluD の欠損によって 50S 大サブユニットの形成が阻害され、完全な形の 50S 大サブユニットの全体量が減少するために生育阻害を引き起こすといわれている。また同時にその H69 の修飾塩基を欠損した 50S 大サブユニットは 30S 小サブユニットとの会合が悪くなるということも報告されている<sup>34</sup>。

このことから RluD は直接的に 50S 大サブユニットの構築に関わる RNA シャペロンの活性部位を、修飾反応を司る部位のほかに持つと考えられる。修飾の付加は RluD の機能のひとつと考えられるが、その修飾がサブユニット間の会合に関与していることから大変重要と考えられる。また、この修飾塩基は A-site および P-site の tRNA と非常に近い場所に位置し、相互作用することから、この修飾がタンパク質合成に直接関わっている可能性が考

えられる。

前章で得られた結果では、H69 の変異体を得た結果として 1915 位は他の塩基に置換可能なことから、1915 位の  $\Psi$  については必ずしもその修飾がリボソームの成熟、もしくは機能に影響を及ぼすことはないといえる。さらに、1915 位の  $\Psi$  はシュードウリジル化のほかに、メチル化の修飾も受けているが、これも影響しないといえる。また、この塩基のメチル化酵素は現在のところ同定されていない。しかしながら、1917 位の U に関しては必要不可欠な塩基として決定されたことから、この部位の修飾がサブユニット間の会合、タンパク質合成や tRNA の A-site への結合に影響を及ぼす可能性は十分あり得る。また、H69 の SSER 法で得られた変異体は、この領域の塩基配列が異なるために RluD の認識に影響を及ぼし、修飾を受けていないことが考えられる。これを踏まえると、この修飾部位の欠損が原因で前章の結果が導かれた可能性も否定できない。そこで本章では、この得られた変異体について修飾塩基の有無をプライマー伸長法（プライマーエクステンション）で検証した。

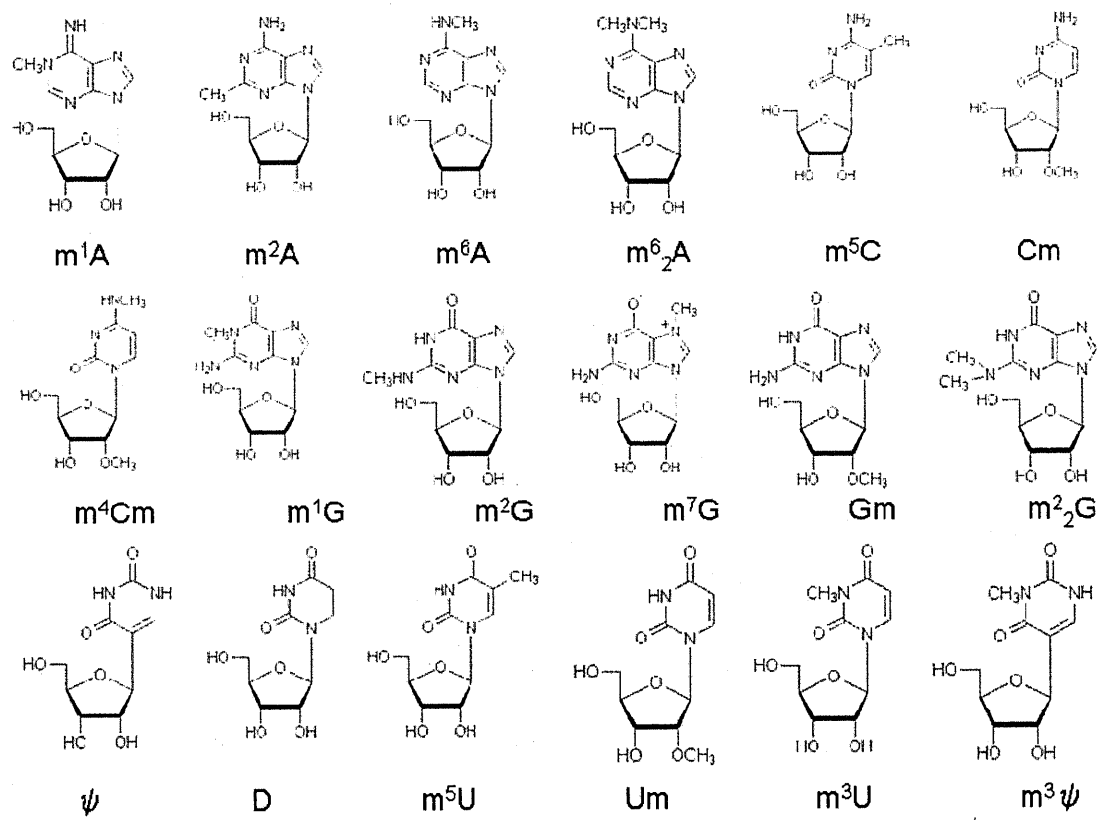


図. 2-1 大腸菌の修飾塩基

## 方法と手順 (プライマー伸長法)

### CMC 化学修飾

rRNA の修飾部位を検証するためにプライマー伸長法を用いた。rRNA の $\Psi$ の塩基は U と構造的にほぼ同じなので通常のプライマー伸長法ではその塩基を決定できない。そこで rRNA を逆転写反応の前に修飾部位特異的に作用する CMC 試薬を用いて化学的に修飾をし、 $\Psi$ を検出した。

### 試薬と機器

CMC solution

0.17M CMC

7M Urea

50mM EDTA

Buffer A (pH5.6)

0.3M NaOAc

0.1mM EDTA

10N NaOH  $\rightarrow$ pH5.6



## 手順

大腸菌中のトータル RNA は ISOGEN キットを用いて回収した。4  $\mu$ g のトータル RNA をエタノール沈殿により乾燥させたあと 30  $\mu$ l の CMC solution に溶解させた。700  $\mu$ l の EtOH と 100  $\mu$ l の Buffer A を加え、-80°C に 1 時間置いた後、14000rpm で 20min、4°C で遠心した。もう一度、EtOH 沈殿を行った後、乾燥した RNA に 50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(pH10.4) を 40  $\mu$ l 加えて 4 時間 37°C で反応させた。前述と同じ条件で EtOH 沈殿を行い、500  $\mu$ l の 70%EtOH でリンスを 2 回行った。そして、RNA は 10  $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O に溶解し、プライマー伸長法の CMC 処理の RNA として使用した。

## プライマー伸長法

### 試薬と機器

10X PNK buffer

500mM Tris-HCl(pH8.0)

100mM MgCl<sub>2</sub>

100mM  $\beta$ -mercaptoethanol

T4 PNK(10U/ $\mu$ l) TOYOBO

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (Amersham)

loading solution

9M Urea

0.06%BPB

プライマーは 1940-1920 へ相補的なものをデザインした

5'-aatttcgctaccttaggaccg-3'

## 手順

以下の反応系で反応を行った。

プライマーの放射能ラベル

DNA primer (2pmol/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
10X PNK buffer	1 $\mu$ l
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP (Amersham)	1 $\mu$ l (0.37MBq)
T4 PNK (10U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
<u>milliQ water</u>	<u>5.5 <math>\mu</math>l</u>
total	10 $\mu$ l

この反応液を 37°C で 60min 反応させた。

次に以下の反応液を 80°C で 2min 保温させた後、室温まで徐冷することで DNA プライマーを rRNA にハイブリダイズさせた。

トータル RNA	0.3 $\mu$ g
[ <sup>32</sup> P] labeled DNA プライマー	0.1pmol
100mM Tris-HCl(pH8.0)	1 $\mu$ l

<u>10mM EDTA</u>	<u>1 <math>\mu</math>l</u>
total	10 $\mu$ l

続いて、これに SS III(super script III)逆転写酵素などを加えて 55°Cで 60min 保温することで逆転写反応を行った。新たに加えるマグネシウムは上記の反応で入れた EDTA に対するものである。

アニーリング後の溶液	10 $\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu$ l
d NTP mix 1.5mM	0.5 $\mu$ l
5X FS buffer	4 $\mu$ l
SS III	1 $\mu$ l
<u>milliQ water</u>	<u>1.5 <math>\mu</math>l</u>
total	20 $\mu$ l

この反応液に loading solution を入れることで反応を停止させ 7 M Urea 15% PAGE を行った。1600~2200V の電圧で 3~4 時間泳動し、BPB が下端まできたら泳動をとめ、FLA7000(Fuji Film)でバンドの検出、定量を行った。

## 結果

H69 については 3 つの修飾塩基が ( $\Psi$ 1911、 $m^3\Psi$ 1915、 $\Psi$ 1917) 存在することが明らかになっている。これらの修飾部位は RluD というひとつのシュードウリジン合成酵素によって行われていることが知られている。この合成酵素 RluD を欠損した株は、非常に低い生育速度を示す。また、この欠損株は 39S の未成熟のリボソーム大サブユニット分子が多く存在することから、50S 大サブユニットの形成が阻害されていることが報告されている<sup>35</sup>。

本研究では SSER 法により、修飾酵素 RluD によってウラシル塩基からシュードウリジンに修飾を受ける 1915 位、1917 位を含めた 7 塩基をランダムイズした。この修飾酵素 RluD の修飾部位認識機構は明らかになっていないため、この領域の塩基配列の変化が修飾酵素の働きに影響を及ぼすかどうかを、また修飾の有無がリボソームの働きに影響を与える可能性を、プライマーエクステンション法を用いてそれぞれの変異体で共通して保存された 1917 位の塩基が修飾を受けているのか、また 1915 位に U を持つ変異体はどのような修飾を受けているのかを調べた(図.2-2)。

通常のプライマーエクステンション法では、1915 位の  $m^3\Psi$  はメチル化を受けているために H69 の 5' 方向に逆転写反応がおこらず、そこで反応が止まるためにメチル化の修飾部位の検出ができる。(図.2-2A lane.1.3.9.11.13) では 1915 位に U( $\Psi$ ) を持つ変異体クローン 2、5、6、7 と野生株ではメチル化を受けていることが検出できた。しかし、 $\Psi$  は U と分子量に違いがなく、逆転写反応において逆転写酵素による反応がそのまま進んでしまうためにバンドとして検出されず、U か  $\Psi$  かの判断はつかない。そこで修飾塩基に対して反応する化学修飾剤 CMC [*N*-cyclohexyl-*N*- $\beta$ -(4-methylmorpholinium) ethylcarbodiimide *p*-tosylate] を用い、CMC- $\Psi$ 1917 の状態にし、1917 位の塩基が修飾を受けているのか検証した。

野生株で CMC による化学修飾を行わなかったものでは 1917 位の塩基で反応は止まらな

かった。そしてメチル化を受けている 1915 位の  $m^3\Psi$  塩基で反応は止まっていた。それに対して、CMC による化学修飾を行ったものでは 1917 位のところでバンドが濃くなっていることからこの塩基は修飾部位  $\Psi$  1917 であることが確認された。それぞれの変異体クローン 2~8 において同様に検討した結果、すべての得られた変異体は 1917 位の塩基は  $\Psi$  に修飾されていることが明らかになった。またクローン 9~12 についても同様の結果だった (data not shown)。このことからすべての変異体で共通に保存されている 1917 位の U は修飾酵素によって  $\Psi$  に変換されていることが確認された。このことから、前章の結果は修飾塩基の欠損によるものではなく、H69 そのものの機能を検証していると結論付けられた。また、修飾酵素の修飾部位認識機構は明らかになっていないが、変異体の塩基配列が本来の配列と違うにもかかわらず修飾を受けているので、RluD は H69 の塩基配列を認識して修飾を行っているわけではないことが明らかになった。しかしながら、CMC による化学修飾は  $\psi$  に対して 100%行われているのかの判断はつかないので、1917 位における  $\Psi$  への修飾効率は明らかにすることはできなかった。

修飾酵素 RluD の欠損株についても同様に解析を行ったところ、CMC 化学修飾を行った  $\Delta$ RluD と行わなかった株ではバンドの濃さに変化がなかったことから、1917 位が修飾を受けていないことが確認された (図.2-2B)。1915 位と 1917 位も RluD によって修飾を受けることから、同様に 1915 位の U、1911 位の U も修飾を受けていないと考えられる。しかし、同じ RluD により修飾を受ける 1915 位で反応が止まっていたことから、1915 位はメチル化酵素によってメチル基が付加されて、1915 位は  $m^3U$  になっていることが明らかになった。この部位のメチル化酵素は同定されていないが、この結果からこのメチル化酵素は、修飾を受けた 1915 位の  $\Psi$  のみを認識してメチル基を付加するのではなく、1915 位のポジションを認識し、U、 $\Psi$  のどちらにもメチル基を付与することのできる酵素だろうと推測される。

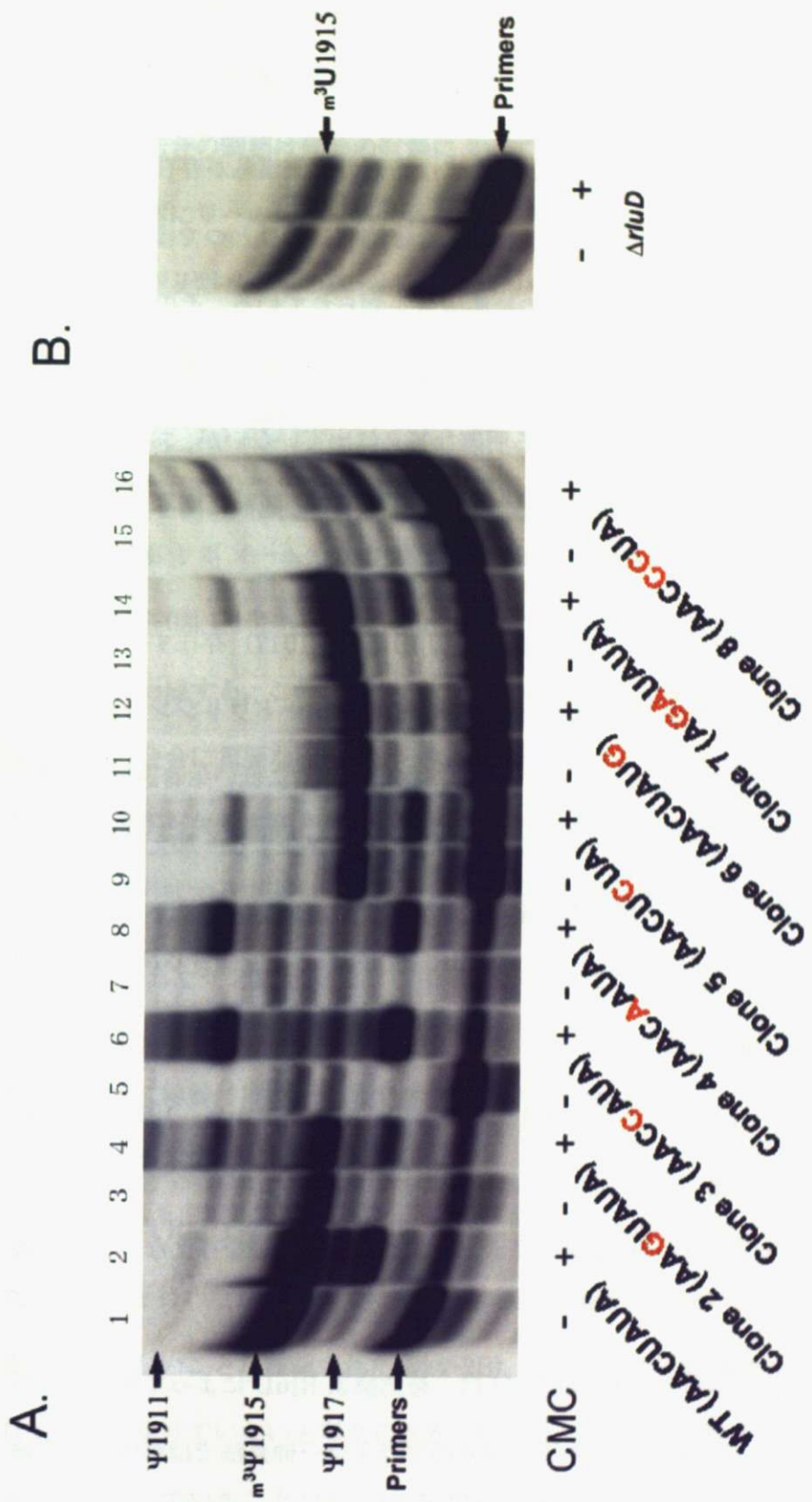


図. 2-2 プライマー伸長法による修飾塩基の検出

## まとめと考察

すべての生物において rRNA 中には多くの、さまざまな種類の修飾塩基が存在している。その中でシュードウリジン ( $\Psi$ ) は rRNA では一般的な修飾塩基のひとつで修飾塩基の中では一番多い。現在、大腸菌では 10 個の  $\Psi$  への修飾酵素が知られている。その中では 3 つは tRNA へ、ひとつは小サブユニットへ、残りの 6 つは大サブユニットへの修飾酵素である。rRNA の修飾の意味については現在のところ明確な答えは出ていないが、おそらくリボソームがゲノムから転写され、立体構造をとる過程において、その成熟に関与しているのではないかと推測される。

大腸菌の H69 には 3 つの修飾塩基が ( $\Psi$ 1911、 $m^3\Psi$ 1915、 $\Psi$ 1917) 存在することが明らかになっている。これらの修飾部位は RluD というひとつのシュードウリジン合成酵素によって行われている<sup>32</sup>。この合成酵素 rluD を欠損した株は、非常に低い生育速度を示し、50S サブユニットの形成が阻害され 39S の未成熟の分子が多く存在する。加えてその欠損株で形成された 70S リボソームは、野性株に比べてタンパク質合成能力が低下していることも明らかになった<sup>35</sup>。これらの結果は H69 のシュードウリジンは 50S サブユニットの合成と翻訳効率の両方に必要であるということを示している。前章の結果で変異体 1915 位に C の変異を持つクローン 3 が通常の生育速度を示すという実験結果から、1915 位の  $m^3\Psi$  はリボソームの機能には必要不可欠ではないということが SSER 法によって明らかになった。加えて、1911 位の  $\Psi$  から C への変異はリボソームの機能に影響を与えないことも報告されている<sup>22</sup>。

必要不可欠な塩基として決定された 1917 位の U は、修飾酵素 RluD によって  $\Psi$  に変換される。 $\Psi$  は構造的に U と大きな差はないために通常のプライマー伸長法では修飾部位を検出できない。そこで  $\Psi$  に対して特異的に反応する CMC 試薬を使用し、化学修飾を行った。それにより修飾の有無を検出した実験の結果(図.2-2)、すべての変異体が 1917 位に  $\Psi$  の修

飾が起こっていることが確認された。このことから、前章で導かれた結果は1917位のU( $\Psi$ )の修飾の欠如により導かれた結果ではないことが明らかになった。このことから、tRNAのA-siteへの結合の調節は修飾の有無によって行われているわけではないといえる。また、すべての変異体に $\Psi$ への修飾が行われていたことから、1917位への修飾が、50S大サブユニットの成熟やリボソームの機能に関連している可能性も考えられる。しかしながら、RluDの認識機構が明らかになっていないので、推測の範囲を出ないと思われる。プライマー伸長法の解析により、1917位のウラシルはすべてシュードウリジンに変換されていることが明らかになった。このことから、RluDは変異体に対しても酵素活性を持つといえる。

大腸菌70Sリボソームの立体構造から、1917位の $\Psi$ は必要不可欠な1912位のAと塩基対を形成する(図.1-15B)。この塩基は30S小サブユニットのC1407-G1494とminor grooveで塩基対を形成する。このことから1917位の $\Psi$ への修飾は、1912位のAとともにサブユニット間の会合に重要な役割を担っていると推測できる。1917位の $\Psi$ と1912位のAの塩基対は必要不可欠な塩基と考えられるが、立体構造の結果からGとCなどの他のワトソンクリックを形成する塩基対が受け入れられる可能性も考えられるが、SSER法ではこれら他の塩基対の組み合わせと1912位と1917位のA- $\Psi$ の組み合わせは同程度ライブラリーの中に存在する。得られた変異体は配列の組み合わせとして飽和していないと考えられることから、完全に結論付けることはできないがA- $\Psi$ の組み合わせしか得られないので、この構造維持が必要不可欠だといえる。

修飾酵素RluDの欠損株についても同様に解析を行ったところ、CMC化学修飾を行った $\Delta$ RluDと行わなかった株ではバンドの濃さに変化がなかったことから、1917位が修飾を受けていないことが確認された(図.2-2B)。このことから同様に1915位のU、1911位のUも修飾を受けていないと考えられる。しかし、同じRluDにより修飾を受ける1915位で反応が止まっていたことから、1915位はメチル化酵素によってメチル基が付加されて、1915位は $m^3U$ になっていることが明らかになった。この部位のメチル化酵素は同定され



ていないが、この結果から、このメチル化酵素は修飾を受けた $\Psi$ 1915のみを認識してメチル基を付加するのではなく、1915のポジションを認識し、U、 $\Psi$ のどちらにもメチル基を付与することのできる酵素だろうと推測される。

## 引用論文

1. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289, 905-20 (2000).
2. Harms, J. et al. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* 107, 679-88 (2001).
3. Wimberly, B. T. et al. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407, 327-39 (2000).
4. Schlueder, F. et al. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell* 102, 615-23 (2000).
5. Yusupov, M. M. et al. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292, 883-96 (2001).
6. Schuwirth, B. S. et al. Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 310, 827-34 (2005).
7. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920-30 (2000).
8. Noller, H. F. & Woese, C. R. Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science* 212, 403-11 (1981).
9. Valle, M. et al. Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. *Nat Struct Biol* 10, 899-906 (2003).
10. Valle, M. et al. Cryo-EM reveals an active role for aminoacyl-tRNA in the accommodation process. *Embo J* 21, 3557-67 (2002).
11. Agrawal, R. K. et al. Visualization of tRNA movements on the *Escherichia coli*

- 70S ribosome during the elongation cycle. *J Cell Biol* 150, 447-60 (2000).
12. Dallas, A. & Noller, H. F. Interaction of translation initiation factor 3 with the 30S ribosomal subunit. *Mol Cell* 8, 855-64 (2001).
  13. Klaholz, B. P. et al. Structure of the *Escherichia coli* ribosomal termination complex with release factor 2. *Nature* 421, 90-4 (2003).
  14. Rawat, U. B. et al. A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2. *Nature* 421, 87-90 (2003).
  15. Klaholz, B. P., Myasnikov, A. G. & Van Heel, M. Visualization of release factor 3 on the ribosome during termination of protein synthesis. *Nature* 427, 862-5 (2004).
  16. Wilson, D. N. et al. X-ray crystallography study on ribosome recycling: the mechanism of binding and action of RRF on the 50S ribosomal subunit. *Embo J* 24, 251-60 (2005).
  17. Valle, M. et al. Visualizing tmRNA entry into a stalled ribosome. *Science* 300, 127-30 (2003).
  18. Asai, T., Zaporozhets, D., Squires, C. & Squires, C. L. 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, 1971-6 (1999).
  19. Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E. & Hoch, J. A. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 153, 1424-31 (1983).
  20. Saka, K. et al. A complete set of *Escherichia coli* open reading frames in mobile plasmids facilitating genetic studies. *DNA Res* 12, 63-8 (2005).
  21. O'Connor, M. & Dahlberg, A. E. The involvement of two distinct regions of 23 S

- ribosomal RNA in tRNA selection. *J Mol Biol* 254, 838-47 (1995).
22. Liiv, A., Karitkina, D., Maivali, U. & Remme, J. Analysis of the function of *E. coli* 23S rRNA helix-loop 69 by mutagenesis. *BMC Mol Biol* 6, 18 (2005).
  23. Hirsh, D. Tryptophan transfer RNA as the UGA suppressor. *J Mol Biol* 58, 439-58 (1971).
  24. Cochella, L. & Green, R. An active role for tRNA in decoding beyond codon:anticodon pairing. *Science* 308, 1178-80 (2005).
  25. Daviter, T., Murphy, F. V. t. & Ramakrishnan, V. Molecular biology. A renewed focus on transfer RNA. *Science* 308, 1123-4 (2005).
  26. Johnson, L. & Soll, D. In vitro biosynthesis of pseudouridine at the polynucleotide level by an enzyme extract from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67, 943-50 (1970).
  27. Ciampi, M. S., Arena, F. & Cortese, R. Biosynthesis of pseudouridine in the in vitro transcribed tRNA<sup>Tyr</sup> precursor. *FEBS Lett* 77, 75-82 (1977).
  28. Conrad, J., Niu, L., Rudd, K., Lane, B. G. & Ofengand, J. 16S ribosomal RNA pseudouridine synthase RsuA of *Escherichia coli*: deletion, mutation of the conserved Asp102 residue, and sequence comparison among all other pseudouridine synthases. *Rna* 5, 751-63 (1999).
  29. Del Campo, M., Kaya, Y. & Ofengand, J. Identification and site of action of the remaining four putative pseudouridine synthases in *Escherichia coli*. *Rna* 7, 1603-15 (2001).
  30. Raychaudhuri, S., Niu, L., Conrad, J., Lane, B. G. & Ofengand, J. Functional effect of deletion and mutation of the *Escherichia coli* ribosomal RNA and tRNA pseudouridine synthase RluA. *J Biol Chem* 274, 18880-6 (1999).

31. Conrad, J., Sun, D., Englund, N. & Ofengand, J. The *rluC* gene of *Escherichia coli* codes for a pseudouridine synthase that is solely responsible for synthesis of pseudouridine at positions 955, 2504, and 2580 in 23 S ribosomal RNA. *J Biol Chem* 273, 18562-6 (1998).
32. Raychaudhuri, S., Conrad, J., Hall, B. G. & Ofengand, J. A pseudouridine synthase required for the formation of two universally conserved pseudouridines in ribosomal RNA is essential for normal growth of *Escherichia coli*. *Rna* 4, 1407-17 (1998).
33. Gutsell, N. S., Del Campo, M. D., Raychaudhuri, S. & Ofengand, J. A second function for pseudouridine synthases: A point mutant of RluD unable to form pseudouridines 1911, 1915, and 1917 in *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA restores normal growth to an RluD-minus strain. *Rna* 7, 990-8 (2001).
34. Ofengand, J. Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett* 514, 17-25 (2002).
35. Gutsell, N. S., Deutscher, M. P. & Ofengand, J. The pseudouridine synthase RluD is required for normal ribosome assembly and function in *Escherichia coli*. *Rna* 11, 1141-52 (2005).

## 謝辞

本研究を行うにあたって恵まれた研究環境を与えてくださり直接ご指導いただきました東京大学大学院工学系研究科鈴木勉助教授に深く感謝いたします。

また、現在産業総合研究所生物情報解析研究センターセンター長渡辺公綱博士には私を当研究室に受け入れていただき、また恵まれた研究環境を与えてくださり深く感謝いたします。

そして、博士論文作成にあたり、山本一夫教授、宇垣正志教授、松本直樹助教授、小嶋徹也助教授には多くの助言をいただき、大変感謝いたします。

四年間の研究室での生活の中で実験方法など数多くの有用なアドバイスいただき、さまざまな点でお世話になりましたリボソームチームのネウザさん、薦田さん、北原君、横山君、張さん、長岡さん、またここには挙げきれませんが研究室の多くの方々に深く感謝いたします。

最後に、私の両親をはじめとする家族のみんなに心から感謝いたします。