

平成 27 年度

博士論文

**Mechanistic characterization of rRNA methylation
in ribosome assembly**

(リボソームアッセンブリーにおける rRNA メチル化修飾の機能解析)

指導教員 鈴木 勉 教授

東京大学大学院工学系研究科

化学生命工学専攻

鈴木研究室

37-117163 荒井 大河

背景

生物は、その生存と増殖を支えるために、膨大な量のタンパク質を合成する。そのためにはタンパク質合成装置であるリボソームが大量に必要である。実に、リボソームは大腸菌の乾燥重量の約 25%を占めており、リボソームの生合成は、生命の維持・増殖を支える重要なプロセスである。

リボソームは大小二つのサブユニットから構成されており、小サブユニットは暗号解読を、大サブユニットはペプチド転移反応を担う。各サブユニットはリボソーム RNA (rRNA)とリボソームタンパク質 (r-protein)から構成される。原核生物の大サブユニットはその沈降係数から 50S と呼ばれ、23S rRNA と 5S rRNA、及び 30 種以上の r-protein から構成されている。一方、小サブユニットは 30S と呼ばれ、16S rRNA と 21 種の r-protein から構成される。両サブユニットが会合した 70S リボソームは約 2.3 MDa の分子量を持つ。

rRNA にはメチル化やシュドウリジル化といった転写後修飾が施されている。これらの修飾は、ペプチド転移反応活性中心(peptidyl transferase center)や暗号解読中心(decoding center)、サブユニット間の会合面 (intersubunit bridge)といった機能部位に集中して存在する。大腸菌のリボソーム全体に、17 種類の修飾ヌクレオシドが、36 箇所が存在し、その内訳は、大サブユニット中に、14 種類、25 箇所、小サブユニット中に、7 種類、11 箇所となっている。原核生物においては、各修飾に対応する修飾酵素が存在するが、場合によっては、一つの修飾酵素が複数個所に修飾を導入することもある。

rRNA 修飾はその化学的性質によって、RNA の局所的な構造形成に寄与していると考えられる。例えば、水素原子の代わりにメチル基が入ることで、水素結合を弱めたり、疎水性相互作用を強めたりする効果がある。また、嵩高い置換基が入ることで、立体構造上の間隙を埋める効果も期待される。リボース 2'位のヒドロキシル基はしばしばメチル化される(2' Oメチル化修飾)ことが知られているが、この位置のメチル化により、リボースのコンフォメーションの平衡が C3'-endo 型に偏ることが知られている。これまでに知られている rRNA 修飾の機能としては、tRNA や mRNA との相互作用を調節することにより、翻訳活性や精度を制御したり、抗生物質に対する感受性に影響を与える、ということが挙げられる。最近では、各 rRNA 修飾を導入する修飾酵素が同定されたことで、遺伝学的かつ生化学的な解析が可能になり、rRNA 修飾の機能に関する研究が飛躍的に進展しつつある。

リボソームの生合成(アッセムブリ)は、rRNA の転写とカップルして行われることが知られており、その過程において、rRNA の二次構造の形成とプロセッシング、rRNA 修飾の導入、r-protein の組み込み、ドメイン間の会合などの、各イベントが協調的に進行する。37°Cで生育する大腸菌ではリボソームのアッセムブリが 3 分で完了するとの報告もある。したがって、大量のリボソームを生合成するには、単に rRNA や r-protein の発現量を増やすだけではなく、アッセムブリ過程を正確にかつ効率的に進行させる必要がある。リボソームのアッセムブリには、最終的に完成したリボソームには組み込まれることのないアッセムブリを補助する因子(アッセムブリ因子)が重要な役割を担っている。アッセムブリ因子には、RNA ヘリケース、GTPase、rRNA 修飾酵素などが重要な役割を担っており、リボソームのアッセムブリは大量のエネルギーを消費する過程である。

rRNA 修飾酵素である RlmE はアッセムブリ因子として知られている。RlmE は S-アデノシルメチオニン (AdoMet)をメチル基供与体として、23S rRNA の Helix92 (H92)に存在する 2552 位のウリジンを 2'-Oメチル化する(Um2552) (図 1)。RlmE 及び Um2552 は大腸菌からヒトに至る様々な生物種間で広く保存されており、このことは RlmE および Um2552 がリボソームのアッセムブリにおいて機能的に重要な役割を担っていることを示唆している。rlmE 欠損株は低温感受性を示し、50S のアッセムブリ中間体と考えられる粒子が蓄積することが知られている。蓄積した粒子は細胞内の Mg^{2+} 濃度では 50S の沈降係数を持つが、 Mg^{2+} 濃度を下げていくと沈降係数が下がり、サブユニットが解離する条件 (0.5mM Mg^{2+})では 45S の沈降係数を持つ(図 2、以降、この粒子を 45S と呼ぶ)。 Mg^{2+} は RNA の会合と安定性に重要な役割を担う金属イオンであり、実際にリボソームの結晶構造

中には多数の Mg^{2+} イオンが存在する。したがって、45S の Mg^{2+} 濃度依存的な沈降係数の変化は骨格となる 23S rRNA の構造がフレキシブルであることを示唆している。以上の事実は、RlmE による Um2552 修飾は大サブユニットのアッセムブリ過程に作用し、50S の構造的な成熟に関与する可能性を示唆している。本研究では、遺伝学と生化学を駆使することで、RlmE の欠損で生じる 45S の詳細な解析を通じて、Um2552 修飾が 50S サブユニットの後期生合成過程にどのような機能的役割を果たしているかを明らかにすることを旨とした。

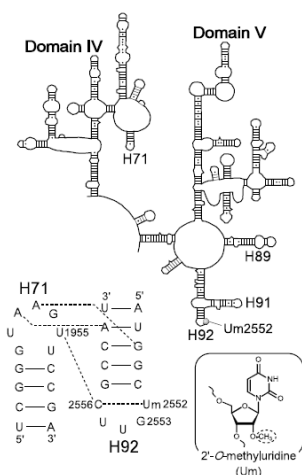


図1 23S rRNA domain IVとVの二次構造、H71、H92の配列、及びUm2552の化学構造 H71とH92の間で形成されている相互作用を線で示した(Arai et al., 2015より転載)。

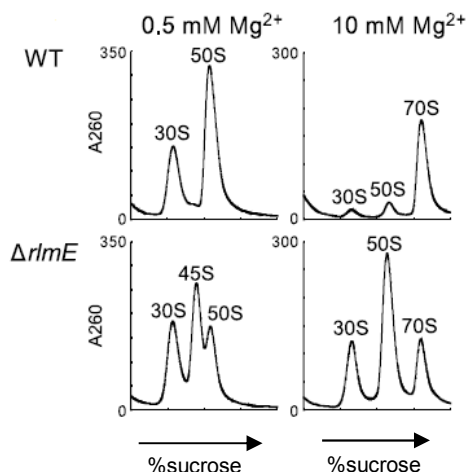


図2 ショ糖密度勾配遠心法を用いた *rlmE* 欠損株のリボソームプロファイル 0.5mM Mg^{2+} 存在下で現れる 45S のピークは 10mM Mg^{2+} 存在下では 50S にシフトする(Arai et al., 2015より転載)。

結果

45S は 50S の生合成中間体である

従来の報告によると、*rlmE* 欠損株で生じる 45S が中間体ではなく、成熟した 50S が壊れたもの (break-down product)か、あるいは、50S になることのできない経路に陥ったもの (dead-end product) であることが示唆されていた。そこで、蓄積している 45S が生合成過程で生じた中間体であるかどうかを検証した。*rlmE* 欠損株を低温で培養することで 45S を蓄積した状態で、転写阻害剤であるリファンピシンを添加すると、時間経過に伴って蓄積した 45S が減少し、代わりに 50S が増加する様子が観察された(図3)。新しく生じた 50S は 30S との会合能をもつことから、45S が成熟した 50S へと変化することが判明した(図3)。したがって 45S は dead-end product ではなく 50S の生合成中間体であることが明らかとなった。さらに、rRNA 修飾を質量分析法により解析すると、23S rRNA の 1915 位のメチル化が 45S では形成されていないことがわかった。この部位のメチル化を担う RlmH は 70S リボソーム中の 50S のみを基質とすることが知られていることから、45S は break-down product でもないことが示された。さらに、45S に結合しているタンパク質を質量分析法により解析すると、RNA ヘリケースや他の rRNA 修飾酵素といったアッセムブリ因子やリボソームの成熟に必要な因子が検出され、45S が生合成中間体であることを裏付ける結果となった。

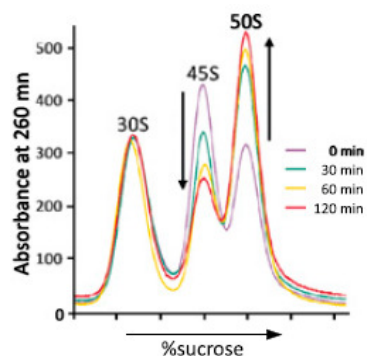


図3 リファンピシン添加後のリボソームプロファイルの変化 (Arai et al., 2015より転載)

RlmE によるメチル化は 50S のアッセムブリを促進する

次に、RlmE による Um2552 修飾が 50S のアッセムブリを促進するかどうかを調べるために、*rlmE* 欠損株から抽出した粗リボソーム画分に対して、組換え RlmE と AdoMet を加えたところ、45S が 50S に移行する様子が観察された(図 4A)。RlmE のみ、あるいは AdoMet のみを添加した場合にはリボソームプロファイルに変化は見られなかった。次に、*rlmE* 欠損株から単離した 45S に、組換え体 RlmE と AdoMet、wash 画分 (crude ribosome から高塩濃度条件で解離する画分)を加えて 50S 再構成実験を行ったところ、RlmE と AdoMet が存在するときのみ 50S アッセムブリが促進し、約 25% の 45S が 50S へと変換した(図 4B)。反応後に Um2552 の修飾率を調べたところ、45S は約 20%、50S は約 50%の効率でメチル化されていた(図 4B)。以上の結果は、RlmE による 2552 位の 2'-O メチル化そのものが 50S への成熟に直接関与していることを示している。またこの結果は、試験管内において、50S サブユニットのアッセムブリを酵素的に促進した初めての結果である。

Um2552 の 2'-O メチル修飾がアッセムブリに関与する

アッセムブリ因子としての RlmE の機能を考えた時に、RlmE が 50S の生合成中間体に一時的に結合することが 50S への成熟を促進しているか、あるいは RlmE によって導入された Um2552 修飾そのものが 50S の成熟に必要なか、という問題がある。そこで、ゲノムにコードされた 7 つの rRNA オペロンをすべて欠失した大腸菌 $\Delta 7rrn$ 株を用い、相補したプラスミド上の *rrnB* オペロン上で U2552 を C に変える一塩基変異を導入した。この変異リボソームにおける C2552 の修飾を調べたところ、2'-O メチル化修飾が顕著に低下していることを確認した。U2552C 変異株を低温で培養すると、生育阻害が起きると同時に *rlmE* 欠損株と同様に 45S が蓄積することが判明した(図 5)。さらに質量分析法を用いて、U2552C 変異を有する 50S に結合した RlmE を調べたところ、野生型 50S と同程度に結合していることが示された。また、*rlmE* 欠損と

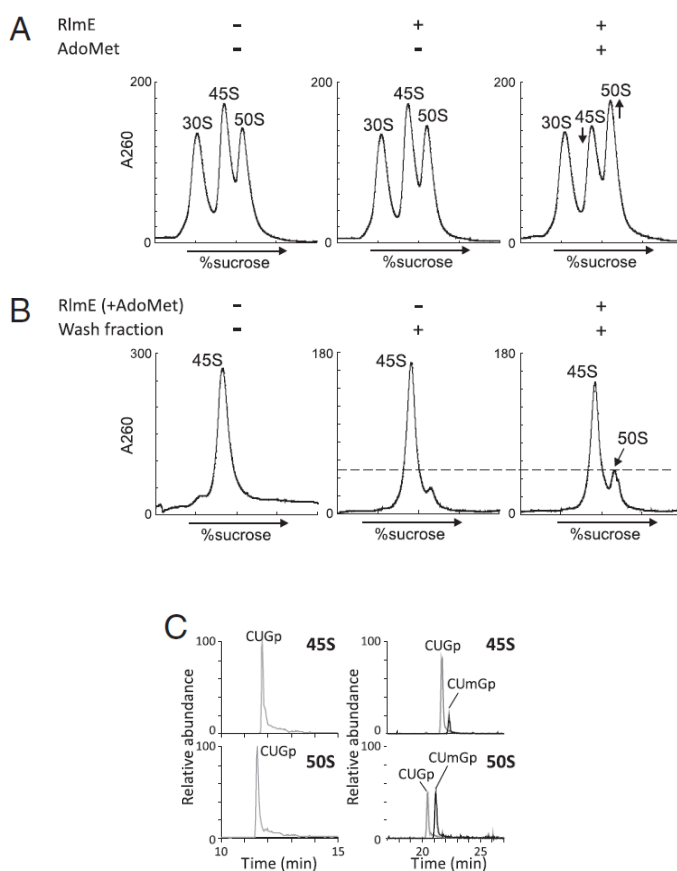


図 4 37°C で 2.5 時間インキュベートした後のプロファイル (A) *rlmE* 欠損株の粗リボソーム画分に RlmE と AdoMet を加えてインキュベートした。(B) *rlmE* 欠損株から精製した 45S に RlmE、AdoMet、wash fraction を加えてインキュベートした。(C) U2552 位のメチル化の有無を質量分析により解析した。左列は *rlmE* 欠損株から単離した 45S と 50S、右列は単離した 45S を用いて修飾再構成を行った後の、45S と新たに生じた 50S に対応する。((A)~(C)いずれも Arai et al., 2015 より転載)

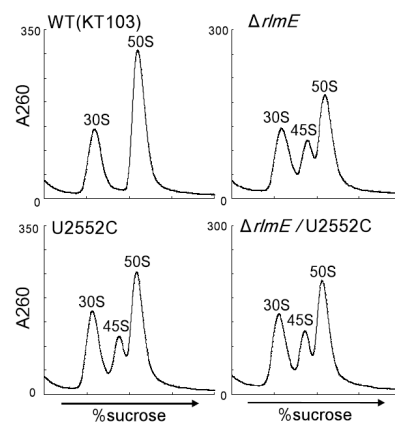


図 5 U2552C 変異株のリボソームプロファイル (Arai et al., 2015 より転載)

U2552C 変異をかけあわせても、合成的な表現型は見られず、またリボソームプロファイルにも変化が生じないことから、二つの変異は同じ効果をもたらしていると考えられる。以上の結果は、RlmE が 45S に結合することではなく、2552 位の 2' O メチル化そのものが 50S への成熟に直接関与していることを示している。

Um2552 修飾と L36 の組み込みは相互補完的に 50S のアッセムブリーへ寄与する

45S に結合している r-protein を SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture)法を用いて定量的に解析した。また、低分子量の r-protein に関しては Tricine-SDS-PAGE によって解析した。その結果、いくつかのリボソームタンパク質の組み込み効率の低下と共に、Um2552 近傍に位置する L36 が 45S に全く組み込まれていないことが判明した。同様に、U2552C 変異株で蓄積する 45S においても L36 が欠けていることが観測された。これまでの研究で L36 がリボソームアッセムブリーなどの段階で組み込まれるのか明らかになっていなかったが、今回の結果により L36 が 45S から 50S にかけての成熟過程において組み込まれることが示された。さらに L36 をコードする *rpmJ* の欠損株で 45S が蓄積すること(図 6)、さらにこの 45S では Um2552 の修飾率が顕著に低下していることが判明した。次に L36 と Um2552 の遺伝学的な相互作用を調べるため、*rpmJ* と *rlmE* の二重欠損株を作成したところ、大きな生育阻害が観測された。これらの結果から、L36 と Um2552 は相互補完的に 45S から 50S への成熟過程に関与していることが示された。

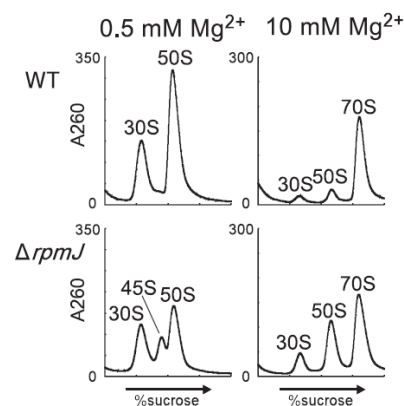


図 6 L36 欠損株のリボソームプロファイル (Arai et al., 2015 より転載)

45S の物性解析①—高塩濃度処理によるストリッピング

次に 45S の物性を解析するため、*rlmE* 欠損株で蓄積した 45S を高濃度の塩化アンモニウム存在下でインキュベートし、ショ糖密度勾配遠心法により分画することで、45S から脱離した r-protein を観察した。その結果、50S と比較して、45S では、5S rRNA と一部の r-protein が外れやすくなっていることが判明した(図 7)。この結果は、45S において 5S rRNA や一部の r-protein の組み込みが不完全なことを示している。SILAC 法を用いて定量解析した結果、L5, L6, L9, L14, L16, L25, L27, L28 などの、Um2552 を含む H92 近傍や、5S rRNA とその近傍からなる Central protuberance と呼ばれる部位に存在する r-protein が特に外れやすくなっていた。このことは、45S において Um2552 のメチル化が導入されないと近傍の構造形成が不完全であることを示唆している。また、同様の傾向は、L36 の欠損株から調製した 45S でも観測された。

45S の物性解析②—ヒドロキシラジカルによるプロービング

より詳細に 45S の構造を解析するため、ヒドロキシラジカルによるプロービングにより 23S rRNA の糖リン酸骨格の溶媒近接性を評価した。フェントン反応により発生させたヒドロキシラジカルで 45S および 50S を処理した後、プライマー伸長法により 23S rRNA の切断部位を検出した。また、Mg²⁺ 濃度の違いによる 45S の構造変化も観測した。

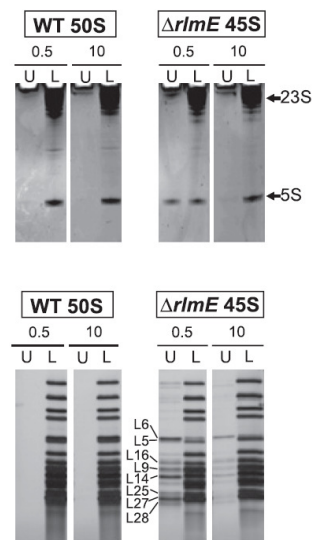


図 7 0.5M NH₄Cl 存在下で処理した後のサブユニット 上段は RNA、下段はタンパク質の泳動結果を表す。U はサブユニットから解離した因子が存在する画分、L はサブユニットに結合した因子が存在する画分を示す (Arai et al., 2015 より転載)。

50S との比較で 45S 特異的にプロービングされた領域は、 Mg^{2+} 濃度に関係なく溶媒に露出している領域と Mg^{2+} 濃度が低いときのみ溶媒に露出している領域の二種類が存在することがわかった(図 8A)。結晶構造上に 45S 特異的にプロービングされた領域をマッピングしていくと、L36、L6、L16 など 45S で欠けているあるいは顕著に減少している r-protein の周辺部に加え、H92(ドメイン V)-H71(ドメイン IV)間をはじめとするドメイン間の会合面の溶媒近接性が上昇していることが判明した(図 8B)。また、低 Mg^{2+} 濃度依存的にプロービングされる領域は、ドメイン間の会合面に加え、ドメイン III に多く存在することが判明した。したがって、45S 前駆体が Mg^{2+} 濃度依存的に沈降係数を変化させる性質は、主にドメイン間の会合の変化とドメイン III の構造変化によるものであることが強く示唆された。さらに、この結果は、U2552 の 2'-O メチル化修飾が H92 と H71 の会合、すなわちドメイン V と IV の会合を通じて、50S 前駆体全体を安定化する働きがあることを示唆している。さらに、45S では、H38 と 5S rRNA との会合面が露出していることがわかった(図 8C)。このことは、45S においては 5S rRNA と L5、L18、L25 を含む central protuberance の構造形成が不完全であることを示している。また前述した、高塩濃度処理により 5S rRNA が 45S から外れやすくなった結果とも一致している。

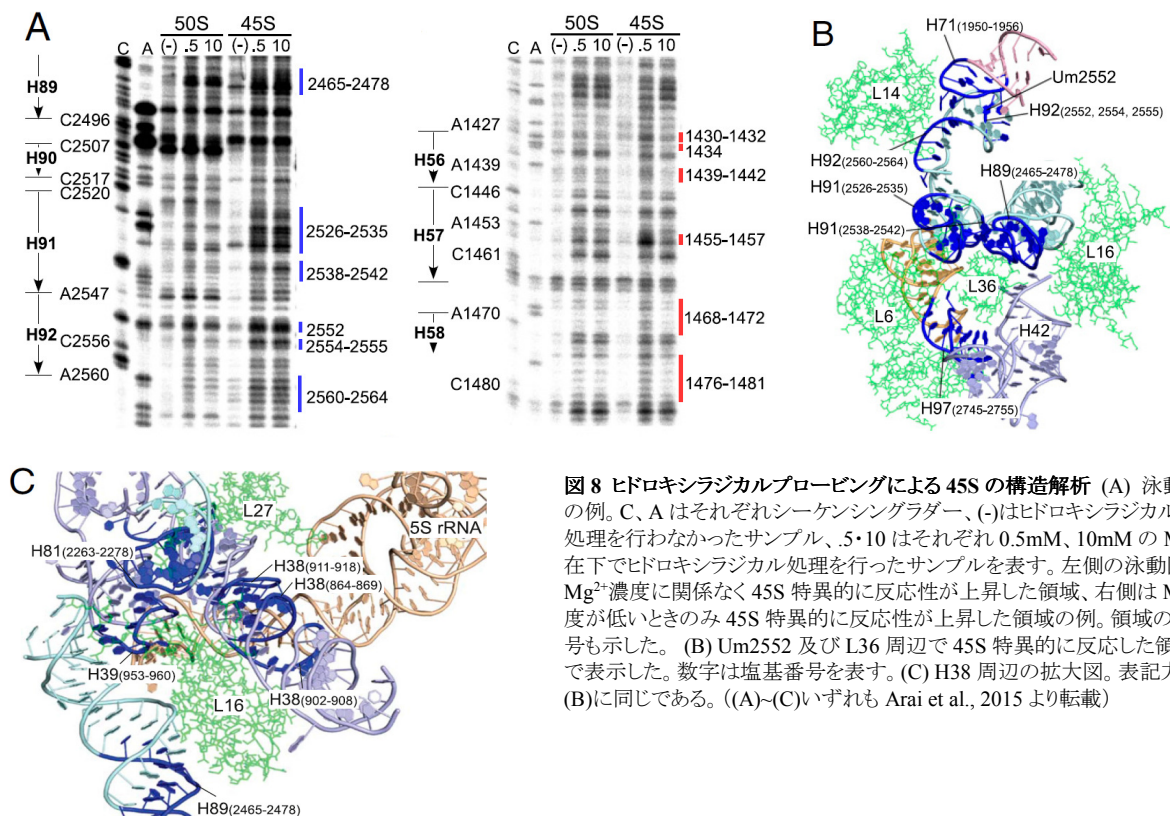


図 8 ヒドロキシラジカルプロービングによる 45S の構造解析 (A) 泳動結果の例。C、A はそれぞれシーケンシングラダー、(-)はヒドロキシラジカルによる処理を行わなかったサンプル、.5・10 はそれぞれ 0.5mM、10mM の Mg^{2+} 存在下でヒドロキシラジカル処理を行ったサンプルを表す。左側の泳動図は Mg^{2+} 濃度に関係なく 45S 特異的に反応性が上昇した領域、右側は Mg^{2+} 濃度が低いときの 45S 特異的に反応性が上昇した領域の例。領域の塩基番号も示した。(B) Um2552 及び L36 周辺で 45S 特異的に反応した領域を青で表示した。数字は塩基番号を表す。(C) H38 周辺の拡大図。表記方法は (B)に同じである。((A)~(C)いずれも Arai et al., 2015 より転載)

考察

U2552 の 2'-O メチル化修飾による 50S 成熟過程の促進メカニズム

本研究ではまず、*rlmE* 欠損株で蓄積する 45S が 50S へとアッセムブリーしうる生合成中間体であることが示された。また組換え RlmE が試験管内で 45S を基質とし、U2552 位に 2'-O メチル化修飾を導入できること、また Um2552 修飾に伴い、45S から 50S へのアッセムブリーが促進されることが明らかとなった。さらに U2552C 変異株では *rlmE* 欠損株で生じるものと同じ性質の 45S が蓄積することが判明した。これらの事実から、U2552 の 2'-O メチル化修飾そのものが 45S から 50S にかけての成熟過程に重要な役割を担っていることがあきらかとなった。また、*rlmE* 欠損株で蓄積する 45S には L36 が欠けており、L36 をコードする *rpmJ* の欠損株で 45S が蓄

積し、Um2552 修飾率が低いこと、さらには *rlmE* と *rpmJ* の二重欠損株でさらに大きな生育阻害が観測されたことから、L36 と Um2552 は相互補完的に 45S から 50S への成熟過程に関与していることが明らかとなった。ヒドロキシラジカルを用い 45S における rRNA の構造をプロービングしたところ、U2552 を含む H92 とドメイン IV の H71 との相互作用が弱いことが判明した。さらに、高塩濃度処理による 45S のストリッピングの結果から、Um2552 と H92 周辺の構造形成が不十分であり、この近傍に結合している複数のタンパク質がはがれやすいことが示された。U2552 は同じ H92 内の C2556 を介して、H71 の U1955 と相互作用しているが、RlmE による 2'-O メチル化修飾は、U2552 のリボースのコンフォメーションを C3' *endo* 型へと傾けさせるため、U2552-C2556-U1955 の base triple の形成を促進させる効果がある(図 9)。その結果、H71 と H92 が会合し、隣接する H89 や H91 を含めた近傍の構造を安定化すると考えられる(図 10)。H89 と H91 は L36 に接していることから、H92 の安定化が L36 の組み込みを促進する可能性がある。また、L36 は H42 (ドメイン II)や H97 (ドメイン VI)とも相互作用することから、L36 の組み込みはドメイン間の会合に寄与する重要な役割があると考えられる(図 10)。さらに、L36 は 50S の後期アッセムブリーに重要なタンパク質である L16 の組み込みを促進している可能性がある。L16 は H38 や 5S rRNA 複合体(L5, L18, L25 を含む)の会合を安定化すると考えられる。実際、45S では 5S rRNA の組み込みが不完全であることが今回の解析で示されている。

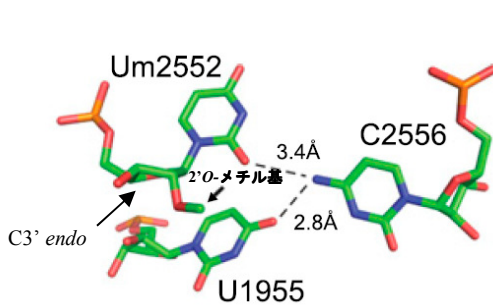


図 9 Um2552 が形成する base triple 矢印はメチル基を表す(Arai et al., 2015 より転載)。

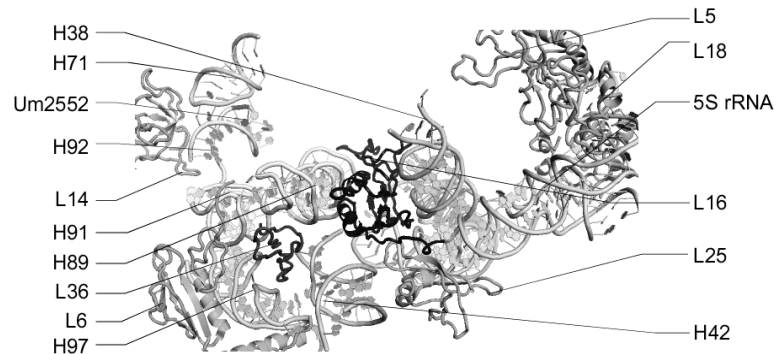


図 10 Um2552 とその近傍

Um2552 修飾形成が 50S アッセムブリーのチェックポイントとなることの生理学的意義

H92 は通称 A ループと呼ばれ、A-site tRNA の CCA 末端と相互作用する場所であり、タンパク質合成反応においても重要な役割を担う。45S は H92 の配置が成熟した 50S とは異なるため、翻訳能を持たないと考えられる。実際、45S は 30S と会合できないことが知られている。したがって、50S の後期アッセムブリーにおいて、Um2552 修飾形成に伴う H92 の正しい配置形成をチェックポイントとすることにより、活性を持たない大サブユニットが 30S と会合するのを防いでいるのではないかと考えている。RlmE は AdoMet を基質に Um2552 のメチル基を導入するが、AdoMet の細胞内濃度は生育環境における栄養状態と密接に関わっていることから、Ado-Met の細胞内濃度をセンスしてリボソームの合成量を巧みに調節している可能性もあるのではないかと考えており、今後はこの可能性を検証していきたい。

結論

私は、本研究の結果から、RlmE による Um2552 修飾が、ドメイン IV とドメイン V の会合を安定化し、L36 や L16 の組み込みを促進することで、ドメイン II の会合や 5S rRNA 複合体の組み込みへとつながる一連の構造変化が、45S から 50S へのアッセムブリーの本質であると考えている。Um2552 及び base triple を形成する C2556 と U1955 の三つの塩基は種を超えて高度に保存されており、RlmE のホモログも広く保存されていることから、今回私が大腸菌リボソームで見出した 50S アッセムブリーのメカニズムは、他の生物におけるリボソームにも一般的に適応さ

れる普遍的なしくみであると考えている。

投稿論文

Arai, T., Ishiguro, K., Kimura, S., Sakaguchi, Y., Suzuki, T. and Suzuki, T. (2015) Single methylation of 23S rRNA triggers late steps of 50S ribosomal subunit assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112, E4707-E4716

Bonnefond, L., Arai, T., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Ishitani, R. and Nureki, O. (2011) Structural basis for nonribosomal peptide synthesis by an aminoacyl-tRNA synthetase paralog, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 3912-3917