

## 論文の内容の要旨

論文題目      Mechanistic characterization of rRNA methylation in ribosome assembly (リボソームアッセムブリーにおけるrRNAメチル化修飾の機能解析)

氏      名      荒井   大河

### 背景

生物は、その生存と増殖を支えるために、たくさん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。大腸菌の乾燥重量の約 25%をリボソームが占めており、リボソームの生合成過程には大量のエネルギーが消費される。したがって、リボソームの生合成過程は生命の維持・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。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。

リボソームの生合成(アッセムブリー)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。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、アッセンブリー過程を効率的かつ素早く進行させる必要がある。そのためには、RNA ヘリケース、GTPase、rRNA 修飾酵素などのアッセンブリーを補助する因子(アッセンブリー因子)が重要な役割を担っている。rRNA 修飾酵素である RlmE はアッセンブリー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ンブリー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* 欠損株では 50S のアッセンブリー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)。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 と 5S 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ンブリー過程に作用し、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、RlmE の欠損で生じる 45S の詳細な解析を通じて、Um2552 修飾が 50S サブユニットの生合成において果たす機能的役割の解明を目標とした。

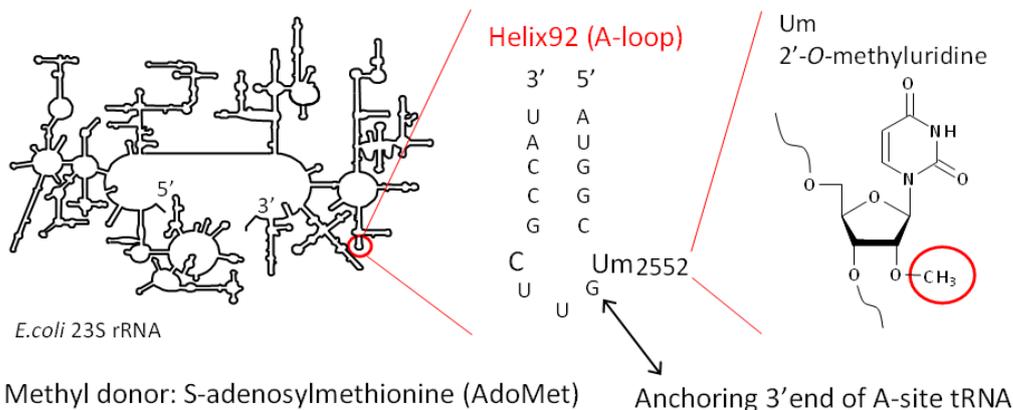


図 1 23S rRNA domain IV と V の二次構造、H71, H92 の配列、及び Um2552 の化学構造 H71 と H92 の間で形成されている相互作用を線で示した。

## 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 50S の生合成中間体ではなく、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* 欠損株を培養中に、転写を阻害すると、時間経過に伴って蓄積した 45S が減少し、代わりに 50S が増加した。この結果は、45S が dead-end product ではなく 50S の生合成中間体であることを支持して

いる。

#### Um2552 の 2'-O メチル修飾が 50S アッセンブリーに寄与する

RlmE の 50S 生合成中間体への結合と、U2552 位のメチル化のどちらかが 50S アッセンブリーを促進しているかを調べるため、リボソームに 2552 位のメチル化レベルが低下する U2552C 変異を導入した大腸菌株でリボソームプロファイル調べた結果、*rlmE* 欠損株と同様に 45S が蓄積した。さらに、*rlmE* 欠損株から単離した 45S にリコンビナント 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 再構築実験を行ったところ、RlmE は AdoMet が存在するときのみ 50S アッセンブリーを促進した。以上の結果は、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 近傍に存在する L36 の組み込みも 50S アッセンブリーへ寄与する

45S に結合している r-protein を 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かった。さらに L36 をコードする *rpmJ* の欠損株で 45S が蓄積した。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、大きな生育阻害が生じた。これらの結果から、L36 も 45S から 50S への成熟過程を促進しており、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唆された。

#### 45S の物性解析

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、45S から解離した r-protein を観察した結果、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た。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。

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。45S と 50S の構造の違いを比較するとともに、 $Mg^{2+}$  濃度の違いによる 45S の構造変化も観測した。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明らかになった。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、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。ドメイン間の会合面の中には、 $Mg^{2+}$  濃度の低下に伴いプロービングされる部分が多く含まれており、これは  $Mg^{2+}$  濃度の低下に伴う沈降係数の減少がドメイン間の解離に起因するものであることを示唆している。

## 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、*rlmE* 欠損株で蓄積する 45S が 50S へとアセンブリーしうる生合成中間体であること、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、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。さらに、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。したがって、U2552 の 2'-O メチル化修飾は H71 と H92 の会合に寄与し、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 2)。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 3)。さらに、L36 は 50S の後期アセン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。

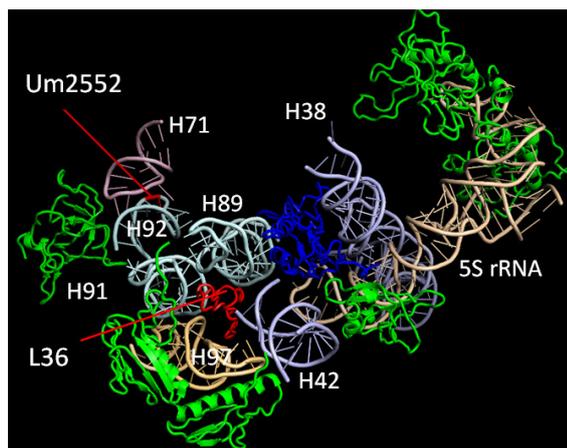


図 2 Um2552 とその近傍

## 結論

本研究では RlmE による 23S rRNA の U2552 位のメチル化が 50S アセンブリーを促進していることを支持する遺伝学的・生化学的なデータを提示した。さらに、ヒドロキシラジカルプロービングによって 45S の構造を解析した結果、U2552 位のメチル化が近傍の RNA の構造安定化を通じて、L36、L16 といった r-protein の組み込みを促進し、50S サブユニット全体に影響を与えるというメカニズムが示唆された。