

審査の結果の要旨

氏名 荒井大河

本研究は、大腸菌を材料として遺伝学および生化学的にリボソーム生合成過程を解析したものであり、本研究を通じて得られた知見に基づき、rRNA の転写後修飾がリボソームの生合成に寄与する機構を明らかにしたものである。

従来、リボソーム生合成過程においては、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ことが示されていた。しかし、個々のアッセンブリー因子がどのような分子機構でリボソームの生合成に関与するかについては、不明な点が多く残されている。大腸菌 rRNA 修飾酵素 RlmE もそのような因子の一つである。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 Helix 92 (H92)に存在する 2552 位のウリジンを 2'-*O*メチル化 (Um2552)する修飾酵素である。RlmE 及び Um2552 は大腸菌からヒトに至るまで生物種間で広く保存されており、この部位の修飾が機能的、生理学的に重要な役割を担っていることを示唆している。これまでに、*rlmE* 欠損株では 50S のアッセンブリー中間体と考えられる 45S 粒子が蓄積することが知られていた。そこで提出者は、この 45S 粒子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を探求した。

本論第一章で、提出者は RlmE がリボソーム生合成に直接寄与していることを検証した。まず、*rlmE* 欠損株で蓄積する 45S 粒子が細胞内で成熟した 50S へと移行することを証明し、45S は 50S の生合成中間体であることを明らかにした。さらに提出者は、試験管内において単離した 45S に対し、RlmE と AdoMet を用いて Um2552 修飾を導入すると、一部 50S サブユニットが再構成されることを示した。この結果は、RlmE による 45S のメチル化が、50S サブユニットの後期生合成の引き金になっていることを強く示唆している。またこれまでの研究で、アッセンブリー因子の酵素活性を用いて 50S サブユニットの生合成過程を進行させた例はなく、この結果は、50S サブユニットの酵素的な生合成を再現した初

めでの成果であるという観点からも意義深いものである。

本論第二章で、提出者は遺伝学的な手法により、45S から 50S への移行過程を解析した。提出者は、RlmE のターゲットサイトに U2552C 変異を導入した株を作成したところ、RlmE 存在下で、2'-O メチル化を減少させることに成功し、また *rlmE* 欠損株同様に 45S の蓄積が観測された。この結果から、RlmE による 2'-O メチル化そのものが 50S の生合成に重要な役割を担っていることを示した。さらに提出者は、定量的な質量分析法を用いて 45S のタンパク質成分を詳細に解析したところ、45S には L36 をはじめとするいくつかのリボソームタンパク質が組み込まれていないことを示した。さらに興味深いことに、RlmE と L36 は遺伝学的に強く相互作用していることが明らかとなり、Um2552 修飾と L36 は相互補完的に 50S の後期生合成に関与していることが示された。

本論第三章で、提出者は RlmE による 2'-O メチル化がリボソーム生合成を促進する分子メカニズムを明らかにするため、45S の構造を生化学的に解析した。まず、高塩濃度で 45S 粒子を処理することにより、5S rRNA 及び複数の r-protein が 45S 特異的に解離しやすくなっていることを明らかにした。さらに提出者は、ヒドロキシラジカルプロービングによる解析を行い、その結果、(i)U2552 を含む H92 と H71 が相互作用していない、(ii)45S で欠けている L16, L27, L35, L36 などの周辺が露出している、(iii)ドメイン間の会合面が完全に形成されていない、(iv) 5S rRNA とその近傍からなる Central protuberance と呼ばれる部位の形成が不完全である、といった 45S 前駆体の構造的特徴が明らかになった。この解析結果は、U2552 の 2'-O メチル化がドメイン間の会合を引き起こし、L36 などのリボソームタンパク質の組み込みや、5S rRNA の複合体の組み込みを促進することで、45S から 50S への生合成が進行することを示唆している。これまでに、rRNA 修飾がリボソーム生合成に与える構造的影響を明らかにした知見は報告されていないことから、提出者の結果は rRNA 修飾の作用メカニズムを示したという点からも、特筆すべき成果であると言える。

以上の研究成果により、RlmE による Um2552 修飾が、リボソーム 50S サブユニットの後期生合成を促進することが明らかとなった。この知見から、論文提出者は AdoMet 依存的な rRNA のメチル化がリボソーム生合成のチェックポイントになるのではないかと、という興味深い考察をしている。AdoMet の細胞内濃度は、細胞の栄養状態で変動することから、Um2552 修飾により、リボソームの生合成が制御される機構の存在を示唆し、本論文を締めくくっている。

以上の研究成果は、論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。