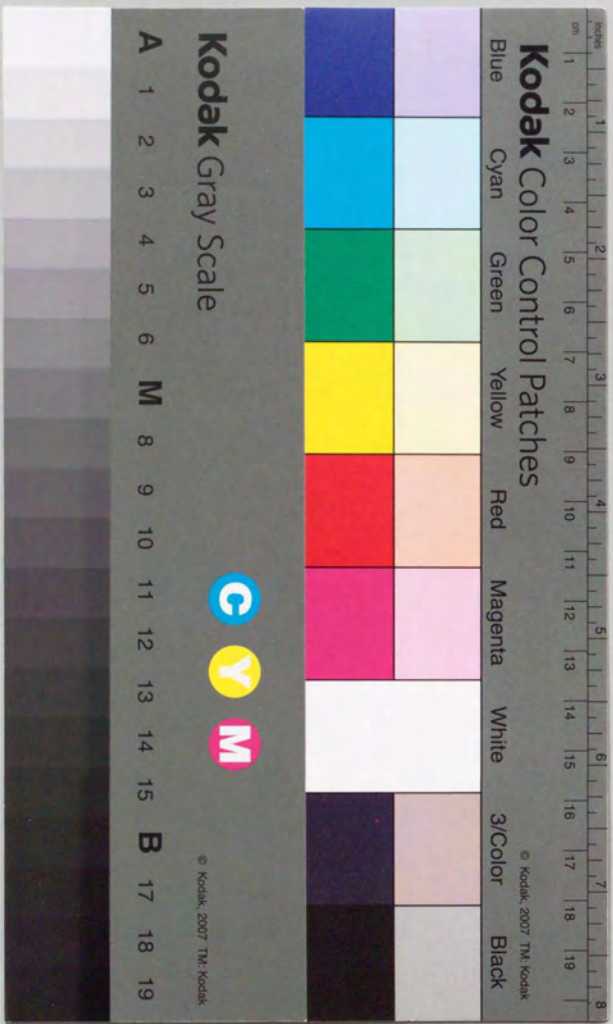


大腸菌 *era, rnc* オペロンと *suhB* 遺伝子の  
分子遺伝学的研究

東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻  
博士課程（平成元年進学） 稲田 利文



①

博士論文

題目 大腸菌 *era, rnc* オペロンと *suhB* 遺伝子の  
分子遺伝学的研究

氏名  
指導教官

稲田 利文  
中村 義一

## <目次>

第一章 序	1
第二章 材料と方法	
(1) 大腸菌株、プラスミドとλファージ	17
(2) 培地と抗生物質濃度	19
(3) P1ファージの変異原処理	20
(4) <i>era</i> 変異株からの <i>era</i> 遺伝子領域のクローニング	20
(5) <i>era</i> 変異を保持するλファージの作製	21
(6) Eraタンパク質過剰生産プラスミドの作製	21
(7) Eraタンパク質の精製	21
(8) GTP結合活性測定試験	22
(9) [ <sup>3</sup> H]ウリジン標識によるリボソーム構成状態の検討	22
(10) リボソームの抽出と精製	23
(11) 試験管内翻訳反応によるリボソームの活性測定	23
(12) リボソームの30S/50S各サブユニットの分離	24
(13) λ1105によるトランスポゾン挿入変異の分離	24
(14) Muファージによるin vivoクローニング	25
(15) Polymerase Chain Reaction(PCR)によるクローニング	25
(16) パルスラベル	26
(17) β-ガラクトシダーゼの酵素活性測定	26
(18) ノザンハイブリダイゼーション	27
第三章 結果	
第一節 <i>era</i> 遺伝子内変異株による高温感受性変異株の分離と解析	
(1) 温度感受性変異の分離	28
(2) 温度感受性変異の同定	30
(3) <i>era</i> 変異株の解析	32
(4) 変異型Eraタンパク質の生化学的解析	35
第二節 <i>era</i> 高温感受性変異株内のリボソーム合成の欠損	

(1) <i>era</i> 高温感受性変異株におけるリボソームの 合成速度の遅延	39
(2) 制限温度下における30Sリボソーム合成の阻害	42
(3) <i>era</i> 高温感受性変異株リボソームの試験管内翻訳活性	44
第三節 <i>era</i> 高温感受性変異株のサプレッサー変異の分離	
(1) spontaneousな <i>era</i> 遺伝子外変異による サプレッサー変異( <i>ersA</i> )	
1. <i>ersA</i> 変異の分離とマッピング	48
2. <i>ersA2</i> 変異の同定と、変異株内の <i>suhB/ssyA</i> 遺伝子の発現	49
(2) トランスポゾン挿入変異による サプレッサー変異の分離( <i>ersB,C</i> )	
1. <i>ersB,C</i> 変異の分離とクローニング、マッピング	50
2. 野生型 <i>ersB</i> 遺伝子のクローニングと挿入部位の決定	51
第四節 <i>suhB/ssyA</i> 遺伝子の分子遺伝学的解析	
(1) <i>era</i> 、 <i>suhB/ssyA</i> 低温感受性変異株の分離と解析	
1. <i>era</i> 、 <i>suhB/ssyA</i> 低温感受性変異株の分離	55
2. <i>suhB10</i> 変異株における翻訳延長反応の遅延	56
(2) <i>rpoH</i> 変異株のサプレッサー変異( <i>suhB2</i> ) 低温感受性変異株の解析	
1. <i>suhB2</i> 変異株の同定	59
2. <i>suhB2</i> 変異株における翻訳延長反応の欠損	60
3. <i>suhB2</i> 変異株における <i>suhB</i> 遺伝子の発現	61
(3) <i>suhB10</i> 低温感受性変異株の <i>rnc</i> 遺伝子内サプレッサー変異	
1. <i>rnc</i> 遺伝子内サプレッサー変異の分離と同定	61
2. サプレッサー変異の翻訳反応への寄与	62
3. <i>sscA7,10</i> 変異の <i>suhB2</i> 低温感受性変異株に対する サプレッサー活性	63
第四章 考察	65
参考文献	75
謝辞	83

## 第一章 序

大腸菌翻訳延長因子EF-Tuの作用機構の解析から、上代らはGTP結合性タンパク質が活性型であるGTP結合型と不活性型であるGDP結合型の2つの異なる立体構造をとり、生体内における”分子スイッチ”の役割を果たすモデル(図1)を提唱した(43)。以来、GTP結合性タンパク質は原核から真核にいたる広い生物種に存在し、広範な生命現象におけるその重要な機能が年々明らかになってきている。1990年末までの情報を総括したMcCormickらの総説においては、GTP結合能ではなくGTPase活性を保持する因子を、”GTPaseスーパーファミリー”の一員として定義し、主にその機能に基づいて分類をおこなっている(11)。以下、個々のサブファミリーにおけるGTP加水分解の機構と機能について述べる。

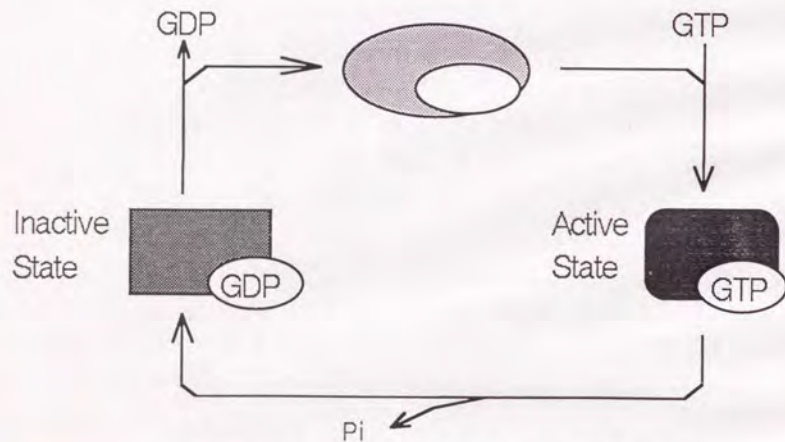


図1 GTPaseタンパク質の作用機構のモデル

**翻訳因子** 大腸菌EF-Tuは、反応の各素過程が詳細に解析された最初の”GTPase”タンパク質である(43)。図2に示す翻訳延長反応において、EF-Tuの関わる各反応が厳密な条件に依存することで、翻訳延長反応の方向性と正確さが保証されている。まず、GDP結合型EF-TuがEF-TsによりGDP/GTP交換反応を行ない、GTP結合型に変換される。GDP結合よりはるかに高いアミノアシル

tRNAに対する親和性を保持するGTP結合型のEF-Tuは、EF-Tu/GTP/アミノアシルtRNAの三量体を形成する。このEF-Tu/GTP/アミノアシルtRNAの三量体がリボソーム上の”Aサイト”に結合し、正しくmRNAのコドンを認識した場合に、EF-Tuはリボソーム依存性にGTPを加水分解する。GDP結合型となったEF-Tuは、リボソームへの親和性を失い解離し一回の反応が終了する。これら一連の翻訳延長反応においては、リボソーム依存性のGTPが加水分解により、翻訳の正確さが担われている。大腸菌の翻訳開始因子IF2の場合にも、条件に拘束されたGTPの加水分解が行なわれる。IF2/GTP/フォルミル-メチル-tRNAが30Sリボソームと複合体を形成し、50Sリボソームが会合して開始複合体が完成した後に、初めてGTPが加水分解される。このような、厳密な条件に依存したGTPの加水分解が、各反応の正確さを保証している。

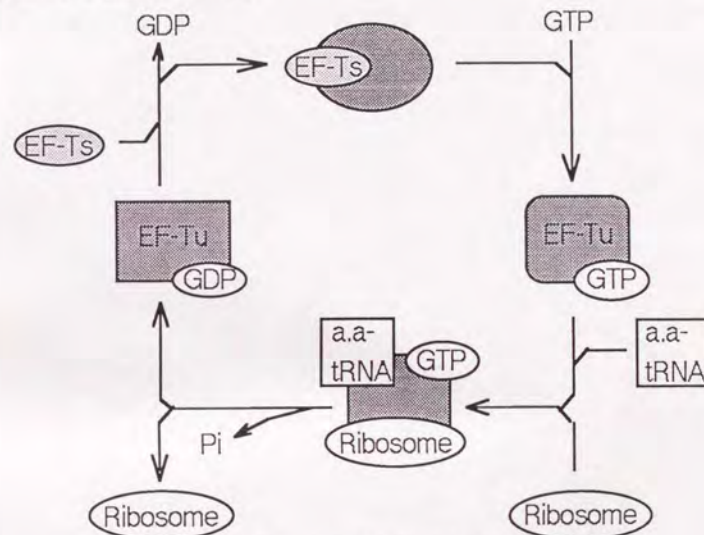


図2 大腸菌における翻訳延長反応

**Gタンパク質** Gタンパク質は、細胞膜に存在しホルモン等の外界からの刺激を細胞内へ伝達する機能を持つGTPaseタンパク質であり(30,46)、 $\alpha$ サブユニットがGTPase活性を持つ $\alpha\beta\gamma$ の三量体を形成している。まず、外界からの刺激が膜上の受容体を活性化し、活性化された受容体がGDP- $\alpha\beta\gamma$ からGTP- $\alpha\beta\gamma$ への交換反

応を促進する。GTP結合型の $\alpha$ サブユニットは、 $\beta\gamma$ サブユニットと解離して単独で標的因子（エフェクター）を活性化することにより、細胞内へ情報を伝達する。 $\alpha$ サブユニットは単独でGTPを加水分解しGDP結合型の元の状態に戻り、次の刺激に対応可能な状態になる。この系においては、 $\alpha$ サブユニットのGTPase活性は、他の因子や条件に依存していない。これは、他のGTPaseタンパク質と大きく異なる、Gタンパク質に特異的な特徴である。これは、外界の刺激に対して常に応答可能な状態を保持することが細胞にとって重要である為か、シグナルがオンの状態が不必要に長く保持されない為ではないかと考えられる。

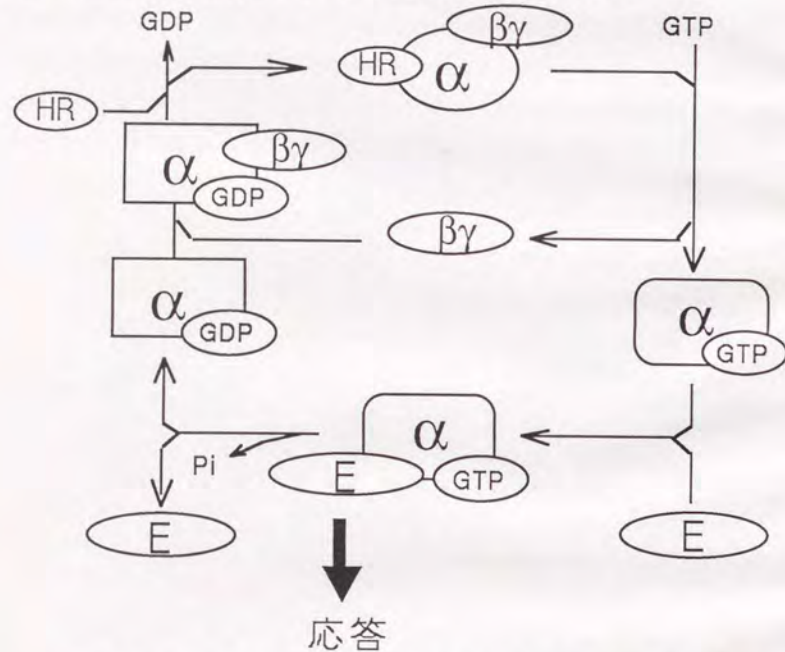


図3 Gタンパク質を介する情報伝達機構 (HR:活性化型受容体、 $\alpha\beta\gamma$ :Gタンパク質サブユニット、E:エフェクター)

出芽酵母においては、接合因子からの情報伝達に関わるGタンパク質が発見され、 $\alpha\beta\gamma$ の各サブユニットの遺伝子が分離され遺伝学的解析が行なわれた。その結果、接合因子からの情報を細胞内に伝達するのは、 $\beta\gamma$ サブユニットの機能であ

ることが示唆された(91)。つまり、 $\alpha$ サブユニットがGTP結合型になることは、 $\beta\gamma$ サブユニットが解離して活性化型となるために必要であり、GTPase活性は $\alpha$ サブユニットがGDP結合型に迅速に戻り $\beta\gamma$ サブユニットと会合して $\beta\gamma$ サブユニットを不活性化型にする為に必要であると考えられる。また、分裂酵母においても最近二つのGタンパク質が発見され、一つは接合因子からの情報伝達系に、もう一つは窒素源枯渇の情報伝達系に関わることが示唆されている。しかしこれらの場合、 $\alpha$ サブユニットのGTPase活性が他の因子や条件に依存する可能性は生化学的に確認されていない。Gタンパク質の普遍的な作用機構を考察するためにも、今後の解析が待たれる。

Rasタンパク質 rasは、最も研究がすすめられている癌遺伝子の一つであり、哺乳動物から酵母にわたる広い生物種から分離されている遺伝子である。これまでの研究により、図4に示す様なモデルが提唱され、各因子の分離が進められている。

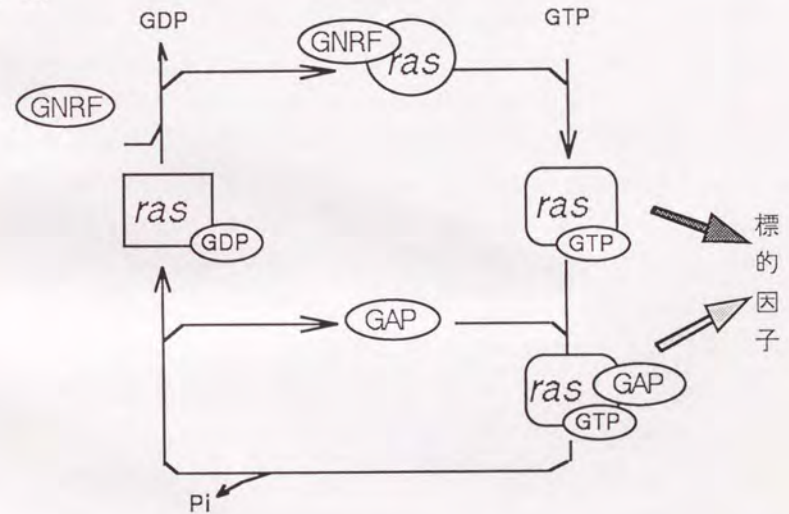


図4 Rasタンパク質の作用機構のモデル (GNRF:Guanine Nucleotide Releasing Factor,GAP:GTPase Activating Protein)

p21タンパク質は哺乳動物において最初に発見された*ras*遺伝子であり、最も解析の進んでいる癌遺伝子の一つである。試験管内におけるp21タンパク質のGDP/GTP交換反応とGTPase反応は、EF-Tuと同様に単独では反応速度が遅い。従って、GDP/GTP交換反応を促進する因子(GNRF)と、GTPase活性を促進する因子(GAP)の存在が予想され、p21タンパク質のGAPが実際に分離された。癌化能を保持する変異型p21タンパク質の解析により、GDP/GTP交換反応が促進された変異と、GAPに結合するがGAPによるGTPase活性促進作用を受けない変異が分離されている。また、PDGF, EGF等の増殖因子はTyrキナーゼ型の受容体に結合し、GTP結合型のp21タンパク質の増加と、GAPタンパク質のリン酸化が同時に起こっていることが明らかになっている(25,55)。これらの結果は、GTP結合型のp21タンパク質とGTP/p21/GAPのいずれかが細胞内への情報伝達を担っていることを予想させる。このp21タンパク質の場合にも、GTPの加水分解はGAPタンパク質依存性であり、細胞内への増殖刺激の正確な伝達を保証していると考えられる。

出芽酵母においては、二つの*ras*遺伝子が分離され、アデニレートサイクレーズを活性化しcAMP濃度を増加させることが明らかとなっている(85,86)。また、GDP/GTP交換反応を促進する因子としてCdc25(12)、GTPase活性を促進する因子としてIra1,2が分離同定されている。分裂酵母においても*ras*遺伝子が発見され、接合因子からの情報伝達系に関わることが示唆されている。また、GDP/GTP交換反応促進因子とGTPase活性促進因子をコードすると予想される遺伝子が分離された。これら酵母における遺伝学的、生化学的解析により、図4のモデルが検証されることが予想される。

Rasタンパク質からの情報を受け取る下流の因子については、出芽酵母においてアデニレートサイクレーズが同定された。そのアデニレートサイクレーズは分裂酵母においてはGタンパク質の下流に位置し、哺乳動物においては他の*smg* (small GTPase)により活性化されることが示唆されている。したがって、GTPaseタンパク質によるアデニレートサイクレーズの活性調節という機構が広く存在する可能性を示唆している。

**小胞輸送** 出芽酵母において、細胞内小器官間の輸送、特に小胞体からゴルジ体への輸送に関わる因子としてYpt1が、また小胞の細胞膜への輸送に関わる因子としてSec4が分離され、これらはGTPaseタンパク質であった。また、哺乳動物G<sub>s</sub>のαサブユニットのADP-リボシル化因子として分離されたARF(ADP-

ribosylation factor)が小胞の細胞膜への輸送に関わるGTPaseタンパク質であり、これらの新しいGTPaseタンパク質がGTPaseタンパク質のサブファミリーを形成することが明らかになっている(79)。その作用機構のモデルを、Sec4を例として図5に示す。GTP結合型のSec4は、GDP結合よりはるかに高い小胞(Donor)に対する親和性を保持し、Sec4/GTP/小胞の三量体を形成する。この三量体が細胞膜(Acceptor)に会合し、Sec4はGTPを加水分解しGDP結合型となり膜への親和性を失い解離した後に、小胞膜と細胞膜との膜融合が行なわれるというモデルが考えられている。

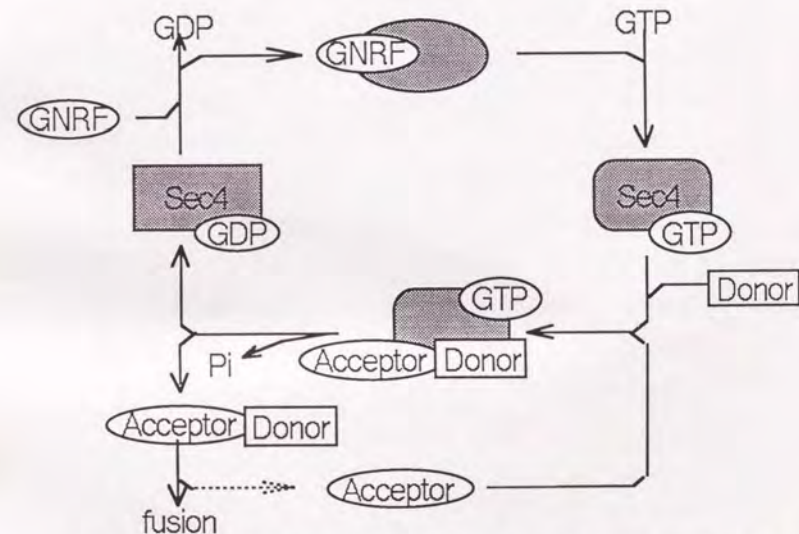


図5 Sec4による細胞内小器官間の輸送の作用機構のモデル

これら一連の反応において、Sec4/GTP/小胞の三量体と細胞膜の会合がGTPの加水分解の必要条件となることにより、小胞から細胞膜への方向性を保証すると

考えられる。細胞膜がSec4のGTPase活性を促進することは確認されていないが、今後の研究により明らかにされると予想される。

**SRP(signal recognition particle)** シグナル配列を持つタンパク質は、翻訳反応の途中においてシグナル配列がSRPと結合し、GTP依存的に小胞体膜上のSRP受容体と複合体を形成し、分泌の経路へ移行する。このSRPは哺乳動物においては7SL RNA-タンパク質複合体であり、54KサブユニットがGTP結合活性とシグナル配列結合活性を保持している(8)。また、酵母や大腸菌を含むいくつかの原核生物にも同様の構造を保持する低分子量RNAが存在しており、この系が広く生物界において保存されていると考えられる。特に、大腸菌の4.5SRNAについては詳細に解析され、哺乳動物との共通性が以下の三つの知見から示唆されている。1) 哺乳動物の54KサブユニットとSRPの受容体であるSR $\alpha\beta$ が、大腸菌の4.5SRNAとの複合体においてGTPase活性を示す(68)。2) 54KサブユニットとSRPの受容体であるSR $\alpha$ に相同性を持つ遺伝子、*ffh*, *fts Y*が大腸菌において分離された(8)。3) 7SL RNAと相同性を持つ低分子量RNAにおいて、特異的な二次構造が哺乳動物から大腸菌まで共通に存在する。この二次構造を重複して保持する変異型4.5SRNAの過剰生産により、シグナル配列を持つ分泌タンパク質の分泌が阻害される(68)。また、大腸菌の4.5SRNAは翻訳延長反応に必須であり(10,14,15)、4.5SRNAの発現減少によりヒートショック応答がおこる(9)。また、4.5SRNAの発現減少をEF-Gの変異がサプレッションすることが明らかになっており(13)、翻訳と細胞内輸送を含めた分泌機構間の相互作用の存在を強く示唆している。

このSRPの哺乳動物の系において、SRPの54KサブユニットとSR $\alpha\beta$ は、それぞれ単独ではGTPase活性を持たず、7SL RNAとの四量体でのみGTPase活性を示す(19)。また、SRPによるシグナル配列の認識はGDP結合型でもおこることと、SRPの複合体からの解離はペプチド鎖の膜への挿入に依存していることが明らかになっている。以上からGTPの加水分解は、SRPによる細胞内輸送が完了した後SRPが膜から解離する為に必要であると考えられる(73)。

**大腸菌Eraタンパク質** 1986年にInouye博士らにより、GTP結合性タンパク質に相同性を持つ遺伝子が発見された(1)。彼らは図6に示す様に、出芽酵母の

Ras1タンパク質と有意な相同性があると考え、この遺伝子を*E. coli*の*ras*という意味で*era*と命名した。彼らは、"GTPaseスーパーファミリー"に特異的に保存されている三つのドメインについてEraタンパク質とEF-Tu, Ras1, H-rasと比較をおこなっている。第一のドメインは、 $\beta, \gamma$ のリン酸基との相互作用を行なう領域であり、第二のドメインはMg<sup>2+</sup>と、第三のドメインはグアニン塩基と相互作用を行なう領域である。それぞれドメインにおけるアミノ酸配列の比較からは、Eraタンパク質はEF-Tuを含めた大腸菌のGTPaseタンパク質との相同性が高いと考えられる。

Protein	Sequence
Region 1	
<i>E. coli</i> EF-Tu	-Gly-His-Val-Asp-His-Gly-Lys-Thr- (18-25)
<i>E. coli</i> EF-G	-Ala-His-Ile-Asp-Ala-Gly-Lys-Thr- (17-24)
<i>E. coli</i> LepA	-Ala-His-Ile-Asp-His-Gly-Lys-Ser- (11-18)
<i>E. coli</i> IF2	-Gly-His-Val-Asp-His-Gly-Lys-Thr- (398-405)
<i>S. cerevisiae</i> RAS1	-Gly-Gly-Gly-Gly-Val-Gly-Lys-Ser- (17-24)
<i>S. cerevisiae</i> RAS2	-Gly-Gly-Gly-Gly-Val-Gly-Lys-Ser- (17-24)
Human Ha-ras, N-ras, Ki-ras	-Gly-Ala-Gly-Gly-Val-Gly-Lys-Ser- (10-17)
<i>E. coli</i> Era	-Gly-Arg-Pro-Asn-Val-Gly-Lys-Ser- (15-22)
Region 2	
<i>E. coli</i> EF-Tu	-Asp-Cys-Pro-Gly-His- (80-84)
<i>E. coli</i> EF-G	-Asp-Thr-Pro-Gly-His- (88-92)
<i>E. coli</i> LepA	-Asp-Thr-Pro-Gly-His- (77-81)
<i>E. coli</i> IF2	-Asp-Thr-Pro-Gly-His- (444-448)
<i>S. cerevisiae</i> RAS1	-Asp-Thr-Ala-Gly-Gln- (64-68)
<i>S. cerevisiae</i> RAS2	-Asp-Thr-Ala-Gly-Gln- (64-68)
Human Ha-ras, N-ras, Ki-ras	-Asp-Thr-Ala-Gly-Gln- (57-61)
<i>E. coli</i> Era	-Asp-Thr-Pro-Gly-Leu- (62-66)
Region 3	
<i>E. coli</i> EF-Tu	-Asn-Lys-Cys-Asp- (135-138)
<i>E. coli</i> EF-G	-Asn-Lys-Met-Asp- (142-145)
<i>E. coli</i> LepA	-Asn-Lys-Ile-Asp- (131-134)
<i>E. coli</i> IF2	-Asn-Lys-Ile-Asp- (498-501)
<i>S. cerevisiae</i> RAS1	-Asn-Lys-Leu-Asp- (123-126)
<i>S. cerevisiae</i> RAS2	-Asn-Lys-Ser-Asp- (123-126)
Human Ha-ras, N-ras, Ki-ras	-Asn-Lys-Cys-Asp- (116-119)
<i>E. coli</i> Era	-Asn-Lys-Val-Asp- (124-127)

表1 Gドメインにおける相同性の比較(文献(1)より抜粋)

	BglI	
1	CGCCGAACAGCGGTTGAAAAAAGCTGGAGCTGGAATGAGCATCGATAAAAGTTACTGCGGA	60
	MetSerIleAspLysSerTyrCysGly	9
	AlaGluGlnAlaLeuLysLysLeuGluLeuGlu---	
61	TTTATTGCCATCGTCGGACGTCGGAACGTTGGCAATCCACATTGTTGAACAACTGCTG	120
10	PheIleAlaIleValGlyArgProAsnValGlyLysSerThrLeuLeuAsnLysLeuLeu	29
	BamHI	
121	GGGCAGAAAATCTCCATCACTTCCCGCAAGCGCGCAGACAACTCGTCACCCGATTGTCGGG	180
30	GlyGlnLysIleSerIleThrSerArgLysAlaGlnThrThrArgHisArgIleValGly	49
181	ATCCACTACTGAAGCGGGTATCAGGGGATCTACGTCGATACACCCGGCGCTGCATATGGAA	240
50	IleHisThrGluGlyAlaTyrGlnAlaIleTyrValAspThrProGlyLeuHisMetGlu	69
241	GAAAAACGGCCATTAAACCGCTGATGAACAAGCGGGCAGCAGCTCTATTGGCCGATGTT	300
70	GluLysArgAlaIleAsnArgLeuMetAsnLysAlaAlaSerSerSerIleGlyAspVal	89
301	GAGCTGGTGATTTTTGTGCTTGAAGGCACCCGCTGGACGGCGGACGACAAATGGTGCTC	360
90	GluLeuValIlePheValValGluGlyThrArgTrpThrProAspGluMetValLeu	109
361	AACAAACTCGCGGAAGCGCAAGCGCGGTAATCCTCGCGGTGAACAAGTGGCAACAAGTG	420
110	AsnLysLeuArgGluGlyLysAlaProValIleLeuAlaValAsnLysValAspAsnVal	129
421	CAGGAGAAAGCCGATCTGCTGCCGCACCTGCAGTTCCTGGCAAGCCAGATGAACTTCCTC	480
130	GlnGluLysAlaAspLeuLeuProHisLeuGlnPheLeuAlaSerGlnMetAsnPheLeu	149
481	GATATCGTGCCAATCTCTGCCGAAACCGGGCTCAATGTTGACACTATTGGCGCAATCGTG	540
150	AspIleValProIleSerAlaGluThrGlyLeuAsnValAspThrIleAlaAlaIleVal	169
541	CGTAAGCATCTACCTGAAGCGACTCATCACTTCCCGGAAGATTACATCACCAGTCCGCTCA	600
170	ArgLysHisLeuProGluAlaThrHisHisPheProGluAspTyrIleThrAspArgSer	189
601	CAGCGTTTTATGGCGTCTGAAATCATCGCGAAAAACTGATGCGTTTCTCCGCGGCTGAA	660
190	GlnArgPheMetAlaSerGluIleIleArgGluLysLeuMetArgPheLeuGlyAlaGlu	209
661	CTGCCGTACTCCGTGACCGTGGAGATCGAACGTTTCGTCTTAACGACGCGGTGGTTAT	720
210	LeuProTyrSerValThrValGluIleGluArgPheValSerAsnGluArgGlyGlyTyr	229
721	GACATCAACGGTTTGATTCTCGTTGACCGTGAAGGGCAGAAGAAGATGGTCATTGGCAAC	780
230	AspIleAsnGlyLeuIleLeuValGluArgGluGlyGlnLysLysMetValIleGlyAsn	249
781	AAAGGGCCCAAGATCAAAACCATCGGATTGAAGCGGTAAAGACATGCAGGAATGTTC	840
250	LysGlyAlaLysIleLysThrIleGlyIleGluAlaArgLysAspMetGlnGluMetPhe	269
841	GAAGCGCCTGTTACCTTGAAGTGTGGTAAAGTGAATCCGGTTGGGCGGACGACGAA	900
270	GluAlaProValHisLeuGluLeuTrpValLysValLysSerGlyTrpAlaAspAspGlu	289
901	GCGCACTGCGCAGTCTCGGTTACGTTGACGATCTTTAAGAGTAACTCCGATGGAAGGCTG	960
290	AlaHisCysAlaValSerValThrLeuThrIlePheLysSerAsnSerAspGlyArgLeu	309
	AatII	
961	GCAGCGCGCATTTGCTCCTGCATAGTCGCCCGTGGAGCGAAACCAGCCTGATGCTGACGCTC	1020
310	AlaAlaArgIleCysProAla---	316

図6 era遺伝子の塩基配列と予想されるアミノ酸配列 (文献(1)より抜粋)

1988年に米国NIHのD. Court博士らの研究室において、このera遺伝子が大腸菌の生育に必須であることが示唆された。また同研究室において、Eraタンパク質の過剰生産系の構築と精製が行なわれ、Eraタンパク質がグアニン塩基特異的な結合能を保持することが示された。さらに、Eraタンパク質が単独で高いGTPase活性を保持することが示された(18)。また、Inouyeら研究室においてもEraタンパク質のGTP結合活性とGTPase活性が大まかな方法により確認されている(52)。これまで述べたように、Gタンパク質以外の”GTPaseスーパーファミリー”においては、GTPase活性はそれぞれ厳密な条件に拘束されることにより、生体内での正確な機能を果たしていると考えられる。従って、Eraタンパク質が単独で高いGTPase活性を保持することは、Gタンパク質と類似の機構により機能することが予想される。また、EF-Tu, K.H-ras, RAS1との相同性の検討からはEF-Tuと最も高い相同性を示す為、EF-Tuの保持するいずれかの活性と類似の活性をEraタンパク質が担う可能性も否定できない。

rncオペロン このera遺伝子は、大腸菌染色体地図上55.5分に存在し、rnc, recO遺伝子とオペロンを構成している(1,6)。era遺伝子上流にはGTPaseスーパーファミリーと相同性を持つlepA遺伝子と、シグナルペプチダーゼ構造遺伝子であるlepがオペロンを形成して存在している(50,51,95)。rnc遺伝子産物は二重鎖RNA特異的RNaseであり(21)、recO遺伝子産物はrecF経路と呼ばれる組み換え機構に関わっている(44)。このrncオペロンのmRNAには、rnc遺伝子上流の非翻訳領域にRNaseIII自身の基質となる構造が存在し、RNaseIIIによる切断を介した自己発現制御がおこなわれている(6)。

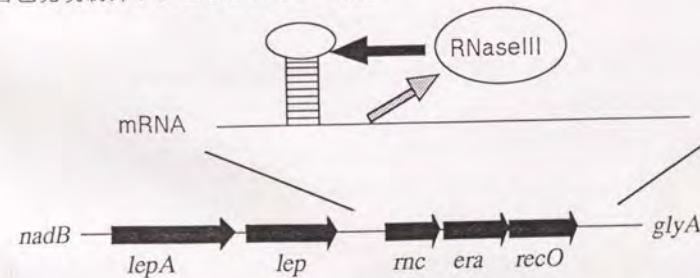


図7 era遺伝子近傍の染色体構造とRNaseIIIによる自己制御機構



これは、mRNAの安定性を介した自己発現制御系としては、最初の系である。またRNaseIIIは、その特徴的な活性により生体内において重要な機能を果たしている。以下四つの系におけるRNaseIIIの機能を示す。

1)  $\lambda$  ファージの *int* 遺伝子の発現にたいして、240bp下流の領域(*sib*)はシスのみで阻害的な作用を持つ(31,35)。この制御系はレトロレギュレーションと命名され、この *sib* 領域の mRNA が形成するステムループを大腸菌側の因子である RNaseIII が切断し、*int* 遺伝子の mRNA の分解を引き起こす機構が明らかとなった。この系は、mRNA の特異的な二次構造の認識を介した、転写後の遺伝子発現制御系としては最初の例である。また、T7 ファージの 1.2 遺伝子発現制御にも RNaseIII による切断が関与している(24)。この場合、1.2 遺伝子下流のステムループを RNaseIII が切断することにより、1.2 遺伝子上流の 1.1 遺伝子の S.D 配列と相補的な配列があらわれ、これらの mRNA が二重鎖 RNA を形成する。その結果、1.1 遺伝子の翻訳開始が阻害されるという、転写後の遺伝子発現制御が明らかになっている(76)。

2)  $\lambda$  ファージの *cIII* 遺伝子の mRNA には RNaseIII の認識部位があり、RNaseIII の結合により二重鎖 RNA 構造が変化し S.D 配列が現われて翻訳が開始する。また、RNaseIII によって切断された mRNA は試験管内において翻訳されない為、RNaseIII による結合と切断の調節が *cIII* 遺伝子の発現を転写後の段階で制御するモデルが考えられる(2,3)。

3) 大腸菌の遺伝子においても、ステムループを形成する mRNA を RNaseIII が切断することにより、mRNA の安定性が変化することによる遺伝子発現制御が Pnp (ポリヌクレオチドフォスフォリラーゼ) の遺伝子において明らかになっている(69,83)。

4) rRNA は 30S の前駆体として転写され、RNaseIII により 25S, 17S, 5S に切断され、さらに他の切断酵素によるプロセッシングをうけて成熟体 rRNA となる(29,37,53)。このプロセッシングはリボソームのアセンブリーと共役していることが示唆され、またリボソームタンパク質 S12 の高温感受性変異株が *rnc* 遺伝子内変異によりサプレスされることもこれを示唆している(60)。

以上の様にタンパク質因子による特異的な RNA の二次構造の認識が、種々の生命現象を担うことが RNaseIII において明らかとなった。特に、RNA とタンパク

質間の複雑な相互作用が必須であるリボソームのアセンブリーにおける RNaseIII の機能解析は、この系の研究に寄与するものと考えられる。

リボソームアセンブリー リボソームは多くの因子が関与する翻訳反応の中心的機能を担う重要な因子である。この生体内最大のタンパク質核酸複合分子であるリボソームの合成は、rRNA の合成からプロセッシングと共役したリボソームタンパク質との集合化の過程までを含む複雑な反応系である(29,37,38,40)。その合成には多くのエネルギーを必要とする為、rRNA やリボソームタンパク質の合成段階での自己制御が存在する。複数のリボソームタンパク質遺伝子からなるオペロンにおいて、オペロンに含まれる特定のリボソームタンパク質が mRNA の二次構造を認識して結合し、翻訳を阻害することによる自己発現制御が明らかになっている(7,62)。また、rRNA の合成が翻訳に関与しないリボソームにより阻害される制御機構が考えられている(33,71)。

rRNA とリボソームタンパク質の複合体形成過程は、30S リボソームの試験管内での再構成系が野村博士らによって構築されて以来、自己集合の概念が広く受け入れられている(64,66,72,88)。しかしながら、この試験管内での再構成系においては、生体内と比較して 1) 高塩濃度存在下、2) 高温処理が必要であることの 2 点が大きく異なっている(88)。30S リボソームの試験管内再構成系においては、低温において沈降係数をもつ中間体(RI)が形成され、精製された RI が温度処理のみで沈降係数が異なる RI\* となる。その後、RI に含まれないリボソームタンパク質と RI\* を低温で保温することで、成熟体 30S が再構成されることが明らかになっている(88)。

- 1) 16S RNA + [S4, S8, S7, S15, S13, S20, S16, S17, S9, S5, S18, S6, S11, S12]  $\rightarrow$  RI particles (低温)
- 2) RI particles  $\rightarrow$  RI\* particles (高温処理)
- 3) RI\* particles + [S14, S10, S3, S21, S2, (S1)]  $\rightarrow$  30S (低温)

従って、高エネルギーの遷移状態を経ることがリボソームの自己集合に必須であり、生体内では低温においても何らかの機構によりこの状態が形成されると考

えられる。この複合体形成過程に直接関与する因子の存在が予想され、低温感受性変異株の分離による同定の試みがなされた。リボソームの構成欠損を持つ低温感受性変異株が複数分離されたが、いずれもリボソームタンパク質自身の変異であり、複合体形成過程に直接関与する因子は未だに発見されていない(36,39,40, 58,59)。しかし、リボソームタンパク質の高温感受性変異のサプレッサー変異の同定により、この仮想因子である可能性を持つ遺伝子が分離されている。一つは、リボソームタンパク質L24の高温感受性変異のマルチコピーサプレッサー変異として分離された*srmB*遺伝子(65)、もう一つはリボソームタンパク質S2の高温感受性変異のマルチコピーサプレッサー変異として分離された*deaD*遺伝子である(87)。これらの遺伝子産物は、eIF-4Aに代表されるATP依存性RNAヘリケース因子群と相同性を持ち、これらの因子群に特徴的なD-E-A-Dのアミノ配列を保持している(65,70,87)。*srmB*遺伝子産物については、精製タンパク質についてATP非依存性RNA結合活性と核酸依存性ATP加水分解能を保持することが示されている(65)。L24タンパク質は50Sリボソームのアセンブリーに必須な因子であることから、*srmB*遺伝子産物はATP依存性RNAヘリケース活性により50Sリボソームのアセンブリーに関与する可能性が考えられている。しかしながら、これらの因子がリボソームのアセンブリーに直接関与することは生体内でも試験管内の再構成系においても示されており、今後の研究が必要とされる。一方、RNaseIIIは、その活性について詳細な生化学的解析がおこなわれ、生体内でも試験管内の反応においてもrRNAのプロセッシングに関与することが証明されている因子である。このRNaseIIIの構造遺伝子内変異によりリボソームタンパク質S12の高温感受性変異株サプレスされることは、RNaseIIIがアセンブリーに積極的に関与する可能性を示唆している(60,61)。RNaseIIIの結合による二重鎖RNA構造の変化がcIII遺伝子の翻訳反応開始に必須であることから、RNaseIIIが二重鎖RNAを切断するのみでなく、RNAの二次構造を認識し結合する活性により多様な機能を生体内において果たす可能性が考えられる。

ssyA/suhB 遺伝子 本研究において、*era*高温感受性変異のサプレッサー変異を分離同定した結果、翻訳延長反応に関与すると考えられる*suhB/ssyA*遺伝子内変異が分離された。*ssyA/suhB*遺伝子は、分泌タンパク質の膜透過に必須な因子

*SecY*の高温感受性変異の低温感受性サプレッサー変異として最初に発見された。*secY*高温感受性変異(*secY24*)の制限温度下においてみられた分泌タンパク質(OmpA)の前駆体の蓄積が、この変異(*ssyA3*)により解消された(80,81)。また、*ssyA3*変異株の低温においては、翻訳延長反応に欠損がみられた。しかしながら高温においては、野生型と比較して翻訳延長反応に差異がみられず、この翻訳延長反応の遅延により*secY24*変異の膜透過機構欠損が相補される可能性は証明されていない。

また*ssyA/suhB*遺伝子は、ヒートショック応答を担う転写因子である $\sigma^{32}$ 構造遺伝子である*rpoH*高温感受性変異の低温感受性サプレッサー変異としても同定され、塩基配列が決定された(96)。この*suhB2*変異と*rpoH15*変異の二重変異株では、高温において、翻訳段階での $\sigma^{32}$ の量の増加が見られた。この表現型は*suhB2*変異単独では高温においても見られず、*ssyA/suhB*遺伝子産物が $\sigma^{32}$ の翻訳段階での発現調節に直接関与するかは不明である。しかし、ヒートショックタンパク質により、 $\sigma^{32}$ の発現が抑制される機構の存在が示唆されており、*rpoH15*変異によるこの制御の欠損と*suhB2*変異の二重変異が $\sigma^{32}$ の発現増加に必要なことも考えられる。

さらにまた*ssyA/suhB*遺伝子は、染色体の複製に関与する*dnaB*遺伝子の高温感受性変異の低温感受性サプレッサー変異としても分離されている(16)。この場合は、*dnaB*遺伝子産物の増加はみられず、前2例とは異なる機構によるサプレッションが考えられる。この*dnaB*遺伝子の高温感受性変異(*ts121*)は、カルボキシ端へのMu c遺伝子断片の挿入変異であり、この*dnaB*遺伝子のカルボキシ端は1) プロテアーゼ抵抗性 2) ATP, ssDNA結合活性 3) 重合化部位 の機能を担うことが示唆されている(57)。*ts121*変異株を高温に遷移前後の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みの実験から高温遷移後もある程度の直線的な取り込みがみられることから、*ts121*変異により*dnaB*遺伝子産物の素活性ではなく、重合化の段階に欠損があることが考えられている。*suhB/ssyA*遺伝子と相同性を持つ遺伝子として、アンモニアの膜透過に必須な遺伝子として発見された*amtA*遺伝子と(26)、哺乳類のイノシトールモノフォスファターゼ遺伝子が見いだされた(23,28,42)。また、*amtA*遺伝子はシステイン合成系にかかわる*cysQ*遺伝子としても同定された(63)。これらの遺伝子産物に共通する活性はフォスファターゼ活性であり、*suhB/ssyA*遺伝子

産物が同様の活性を保持する可能性も考えられる。

```

10      20      30      40      50      60
CATGCCACGGGCAACAGAACCCATATTGCCGGTGTGTGACGCTCCACCAGCACAATTCCG
70      80      90      100     110     120
AATATTTTGCAGCATTGTCTTTCTTCATCTAAAGATTATTCAGCATCTTATCATAAAAC
130     140     150     160     170     180
GAAGACAGATGCCGATCTCGCTGCTATAGCTGCGCGCGTTTCCCGTTCTTAAACATCCA
190     200     210     220     230     240
GTGAGAGAGACCGATGCATCCGATGCTGAACATCGCGGTGCGCGCACCGCGCAAGCGCGG
MetHisProMetLeuAsnIleAlaValArgAlaAlaArgLysAlaGly
250     260     270     280     290     300
TAAATTAATTGCAAAAACTATGAAACCCCGGACGCTGTAGAAGCGGACCCAGAAAGCGAG
AsnLeuIleAlaLysAsnTyrGluThrProAspAlaValGluAlaSerGlnLysGlySer
310     320     330     340     350     360
TAACGATTTTCGTGACCAACGTAGATAAAGCTGCCGAAGCGGTGATTATCGACACGATTCG
AsnAspPheValThrAsnValAspLysAlaAlaGluAlaValIleIleAspThrIleArg
370     380     390     400     410     420
TAAATCTTACCCACAGCACCCATCATCACCAGAAAGCGGTGAACTTGAAGGTACTGA
LysSerTyrProGlnHisThrIleIleThrGluGluSerGlyGluLeuGluGlyThrAsp
430     440     450     460     470     480
TCAGGATGTTCAATGGGTTATCGATCCACTGGTGGCACTACCACTTTATCAACGCTCT
GlnAspValGlnTrpValIleAspProLeuAspGlyThrThrAsnPheIleLysArgLeu
490     500     510     520     530     540
GCCGCACTTCGGGTATCTATCGCTGTTTCGTATCAAAGCGCGCACCGAAGTTGCTGTGGT
ProHisPheAlaValSerIleAlaValArgIleLysGlyArgThrGluValAlaValVal
550     560     570     580     590     600
ATACGATCTATGCGTAACGAAGTTCACCGCCACTCGCGGTGAGGGCGCACAGCTGAA
TyrAspProMetArgAsnGluLeuPheThrAlaThrArgGlyGlnGlyAlaGlnLeuAsn
610     620     630     640     650     660
CGGCTACCGACTGCTCGGCAGCACCGCTCGCGATCTCGACGGTACTATTCGGCGACCGG
GlyTyrArgLeuLeuGlySerThrAlaArgAspLeuAspGlyThrIleLeuAlaThrGly
670     680     690     700     710     720
CTTCCCGTTCAAAGCAAAACAGTACGCCACTACCTACATCAACATCGTCGGCAAATGTT
PheProPheLysAlaLysGlnTyrAlaThrThrTyrIleAsnIleValGlyLysLeuPhe
730     740     750     760     770     780
CAACGAATGTCAGACTTCCGCTCGTACCGGTTCTCGCGCGCTGGATCTGGCTTACGTCGC
AsnGluCysAlaAspPheArgArgThrGlySerAlaAlaLeuAspLeuAlaTyrValAla
790     800     810     820     830     840
TGCGGGTCTGTTGACGGTTTCTTTGAAATCGGTCTCGCGCGTGGGACTTCGCGCGCAGG
AlaGlyArgValAspGlyPhePheGluIleGlyLeuArgProTrpAspPheAlaAlaGly
850     860     870     880     890     900
CGAGCTGCTGTTGCGTGAAGCGGGCGGCATCGTCAGCGACTTCACCGTGGTCACTAATA
GluLeuLeuValArgGluAlaGlyGlyIleValSerAspPheThrGlyGlyHisAsnTyr
910     920     930     940     950     960
CATGCTGACCGGTAACATCGTTGCTGTAACCCGCGGTTGTTAAAGCCATGCTGCCGAA
MetLeuThrGlyAsnIleValAlaGlyAsnProArgValValLysAlaMetLeuAlaAsn
970     980     990     1000    1010    1020
CATGCGTGACGAGTTAAGCGACGCTCTGAAGCGTAAATGACTCAGCGCGGTGATATC
MetArgAspGluLeuSerAspAlaLeuLysArg

```

図8 *suhB/ssyA* 遺伝子塩基配列と予想されるアミノ酸配列 (文献(96)より抜粋)

```

bovinsmn. MADPWQECMDYAVTLAGQAGEVVREALKNEMNI-MVKSSPADLVTATDQKVEKMLITSIK
           . . . . .
suhb.aa    MHPMLNIAVRAARKAGNLIKKNYETPDAVEASQKGSNDFVTNVDKAAEAVIIDTIR
           . . . . .
ecoamta.aa MLDQVCQLARNAGDAIMQVYDGTKPMDVVSKADNSPVTAADIAAHTVIMDGLR
           * * * * *

bovinsmn. EKYPESHFEGEE-SVAAGEKSILTD-NPTWIIDPIDGTTNFVHGFPFVAVSIGFVVNKKM
           . . . . .
suhb.aa    KSYPQHTIITEE-S---GELEGTDQ-DVQWVIDPLDGTTFNFKRLPHEAVSIAVRIKGR
           . . . . .
ecoamta.aa TLTPDVVPLSEEDP---PGWEVRQHWQRYWLVDPLDGTKEFIKRNGEFTVNIALIDHGK
           * * * * *

bovinsmn. EFGIVYSCLEDKMYTGRKKGAFNGQKLVSHQEDITKSLVTELGSSRTPETVRIILS
           . . . . .
suhb.aa    EVAVVYDEMRNELFTATRGQGAQLNGYRLLGSTARDLDTILATGF-PFKAKQYATTYIN
           . . . . .
ecoamta.aa ILGVVYAPVMNVMSAAEGKAWKECGVRKQIQVRDARPPVVVISR-SHADAEL-KEYLQ
           ** * * * *

bovinsmn. NIERLLCLPIHGIRGVGTAALNMCLVAAGAADAYYEMG-IHCWDVAGAGIIVTEAGGVLL
           . . . . .
suhb.aa    IVGKLF-NECADFRRTGSAALDLAYVAAGRVDFEIG-LRPWDFAAAGELLVREAGGIVS
           . . . . .
ecoamta.aa QLGE---HQTTSI----GSSLKFLVAEGQAHVYPRFGPTNIWDTAAGHAVAAAAGAHVH
           * * * * *

bovinsmn. DVTGGP-FDLMSRRVIASSNKTLAERIAKEIQIIPLQRDDED
           . . . . .
suhb.aa    DFTGGH-NYMLTGNIVAGNPRVVKAMLANMRDELSDALKR
           . . . . .
ecoamta.aa DWQGGKPLDYTPRESFLNPGFRVSIYRIQMAETVYFLILPS
           * *

```

図9 *suhB/ssyA* 遺伝子産物と *cysQ* 遺伝子、イノシトールモノフォスファターゼ遺伝子産物間の相同性。点は類縁アミノ酸を、二重点は同一アミノ酸を示す。三つの遺伝子産物間で保存されているアミノ酸を★で示した。

以上のように、*ssyA/suhB* 遺伝子産物が低温において翻訳延長反応に寄与することは示唆されているが、その本質的機能は未特定であり、このタンパク質の活性の解析を含めた研究が、*era* 遺伝子の機能解明にも必要と考えられた。本研究では、*era* 遺伝子産物の機能を解明することを目的として、*era* 高温感受性変異株を分離し、リボソームアセンブリーにおける欠損を検討した。また *era* 高温感受性変異のサブレッサー変異として、*ssyA/suhB* 遺伝子内変異が分離された為、この遺伝子の分子遺伝学的研究を行なった。

## 第二章 材料と方法

### (1) 大腸菌株、プラスミドとλファージ

株	遺伝子型	由来と文献
大腸菌 K 1 2 株		
W3110		laboratory stock
KH5402	<i>thr metE ilv thy tyr</i> (Am) <i>trpE9829</i> (Am) <i>supF</i> (Ts6)	67
PA3306	<i>thi argH lacY malA mtl xyl ara gal str tonA supE44 purL nadB</i>	60
HT30	<i>era13::ΔTn10 his relA1 ilv</i>	84
HT31	W3110 A17::ΔTn10	84
DC569	<i>glyA::Tn5 his relA1 ilv pglΔ8 rpsL</i>	84
TAP106	[ Δ( <i>int-cIII</i> )BAM N::kan λc1857( <i>cro-bioA</i> )]	84
NC124	W3110 <i>nadB::Tn5</i>	84
CSH22	Δ( <i>lac pro</i> ) Charon 25	93
KK583	Δ( <i>mec era</i> )130::kan λKKF2( <i>mec era recO::cat</i> )	本研究
KY1451	MC4100 <i>suhB2</i>	97
M8820	F <sup>-</sup> <i>araD139</i> Δ( <i>araCOIBA leu</i> )7697 Δ( <i>proAB argF lacIPOZYA</i> ) <i>rpsL</i>	32
IT17	KH5402 <i>era770 era13::ΔTn10 rnc70</i>	本研究
IT32	W3110 <i>era770 era13::ΔTn10 rnc70</i>	本研究
IT136	W3110 Δ( <i>mec era</i> )130::kan (λIT31)	本研究
IT137	W3110 Δ( <i>mec era</i> )130::kan (λIT32)	本研究
IT138	W3110 Δ( <i>mec era</i> )130::kan (λIT34)	本研究
IT144	W3110 Δ( <i>mec era</i> )130::kan (λIT39)	本研究
IT286	IT32 <i>ersA1</i>	本研究
IT288	IT32 <i>ersA2</i>	本研究
IT526	IT32 <i>ersB1::Kan</i>	本研究
IT527	IT32 <i>ersB2::Kan</i>	本研究
IT528	IT32 <i>ersC::Kan</i>	本研究

IT546	W3110 A17::ΔTn10 <i>suhB10</i>	本研究
IT706	IT546 <i>nadB::Tn5 sscA7 A17::ΔTn10 suhB10</i>	本研究
IT707	IT546 <i>nadB::Tn5 sscA10 A17::ΔTn10 suhB10</i>	本研究
IT711	W3110 <i>nadB::Tn5 sscA7 zfe208::Tn10 suhB2</i>	本研究
IT712	W3110 <i>nadB::Tn5 sscA10 zfe208::Tn10 suhB2</i>	本研究
IT713	W3110 <i>zfe208::Tn10 suhB2</i>	本研究
IT714	W3110 <i>nadB::Tn5 sscA7</i>	本研究
IT715	W3110 <i>nadB::Tn5 sscA10</i>	本研究

### プラスミド

pTD101	Amp <sup>r</sup> <i>lepA<sup>+</sup> lep<sup>+</sup> rnc<sup>+</sup></i>	84
pACS1	Amp <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup> <i>rnc<sup>+</sup> era<sup>+</sup></i>	84
pACS3	Amp <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup> <i>rnc<sup>+</sup></i>	84
pACS21	Amp <sup>r</sup> <i>rnc<sup>+</sup></i>	84
pPP'106	Amp <sup>r</sup> <i>EcoRI</i> site cassette for in vivo transfer to λ Charon 25	今井博士より分与
pJL6	Amp <sup>r</sup> λ <i>p<sub>L</sub></i> promoter vector	本研究
pCE31	Amp <sup>r</sup> pJL6 <i>era<sup>+</sup></i>	18
pEG5005	pBC0::Mu d5005(10.2kb) Kan <sup>r</sup>	32
pIT3	Kan <sup>r</sup> <i>lep<sup>+</sup></i>	本研究
pIT7	Amp <sup>r</sup> <i>rnc70 era770 era13</i>	本研究
pIT12	Amp <sup>r</sup> <i>rnc<sup>+</sup> era</i> ( <i>Bam</i> HI filled in with 4 base pairs)	本研究
pIT13	Amp <sup>r</sup> <i>rnc</i> ( <i>Bst</i> XI-Δ4 bp) <i>era<sup>+</sup></i>	本研究
pIT15	Amp <sup>r</sup> pJL6 <i>era770</i>	本研究
pIT19	Amp <sup>r</sup> pJL6 <i>era770 era13</i>	本研究
pIT31	Amp <sup>r</sup> pPP'106 <i>rnc<sup>+</sup> era770</i>	本研究
pIT32	Amp <sup>r</sup> pPP'106 <i>rnc<sup>+</sup> era770 era13</i>	本研究
pIT34	Amp <sup>r</sup> pPP'106 <i>rnc<sup>+</sup> era<sup>+</sup></i>	本研究
pIT39	Amp <sup>r</sup> pPP'106 <i>rnc<sup>+</sup> era13</i>	本研究
pIT45	Amp <sup>r</sup> pJL6 <i>era13</i>	本研究
pIT134	pEG5005 Kan <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	本研究

pIT135	Kan <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> clone from IT526 Mu cts/pIT134	本研究
pIT136	Kan <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> clone from IT528 Mu cts/pIT134	本研究
pIT140	pIT135 2kb BamHI-BamHI in pUC119 BamHI	本研究
pIT149	λ523 6kb EcoRI-PvuII in pUC119 EcoRI-SmaI	本研究
pIT154	λ522 6kb BamHI-BamHI in pUC119 BamHI	本研究
pIT158	λ523 6kb EcoRI-EcoRI in pUC119 EcoRI	本研究
pIT159	pIT149 2kb BamHI-BamHI in pUC119 BamHI	本研究
pIT169	pIT159 HincII-BamHI in pUC119 SmaI-BamHI	本研究
λファージ		
Charon25	<i>imm<sup>21</sup> attP<sup>r</sup> int<sup>r</sup> lac5</i>	本研究
λIT31	<i>Amp<sup>r</sup> rnc<sup>r</sup> era770</i>	本研究
λIT32	<i>Amp<sup>r</sup> rnc<sup>r</sup> era770 era13</i>	本研究
λIT34	<i>Amp<sup>r</sup> rnc<sup>r</sup> era<sup>+</sup></i>	本研究
λIT39	<i>Amp<sup>r</sup> rnc<sup>r</sup> era13</i>	本研究
λ522		Kohara library
λ523		Kohara library

## (2) 培地と抗生物質濃度

### 培地

Lブロス	Yeast Extract (Difco)	5 g
	Bact Tryptone (Difco)	10 g
	Sodium Chloride	5 g/1 liter
λブロス	Yeast Extract (Difco)	1 g
	Bacto Tryptone (Difco)	10 g
	Sodium Chloride	2.5g/1 liter
MEブロス	MgSO <sub>4</sub>	0.4 g

Citric AcidH <sub>2</sub> O	4 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhydrous	20 g
NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	7 g/2 liter

プレートの場合は、寒天（タイトー海藻）を 10 g / l の濃度で加えた。

### 抗生物質濃度

アンピシリン（萬有製薬）	50 μg/ml
カナマイシン（明治製薬）	50 μg/ml
テトラサイクリン（SIGMA CHEMICAL CO.）	15 μg/ml

### (3) P1ファージの変異原処理

P1ファージの変異原処理は、以下の条件で行なった。P1ファージ 0.4 ml (10<sup>12</sup> pfu/ml)を、0.4 ml 0.5 M フォスフェート [pH 6.0] / 5 mM EDTA, 0.5 ml H<sub>2</sub>O, 0.8 ml ヒドロキシアミン溶液 (70 μg/ml ヒドロキシアミン, 0.45 M NaOH) の混合液とともに、37°C において12から14時間保温した。処理によって、P1ファージの titer が約1%前後に減少したことを確認し、遠心 (25,000rpm, 2時間, 4°C) により変異原を除去し、以後の実験に使用した。

### (4) era変異株からのera遺伝子領域のクローニング

IT32株から抽出した染色体DNAとpUC9をEcoRIで処理した後ライゲーションし、形質転換後、Amp<sup>r</sup>のコロニーを選択した。ニトロセルロースフィルター上で溶菌させた後アルカリ処理によりDNAを固定し、era遺伝子を含むDNA断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行なった。得られたpIT7クローンは、*rnc*上流のEcoRI部位からmini-Tn10内のEcoRI部位までを、pIT8クローンはmini-Tn10内のEcoRI部位からera下流のEcoRI部位までを保持した。

#### (5) *era*変異を保持するλファージの作製

pACS1の*recO*遺伝子内*NruI*切断部位に*EcoRI*リンカーを挿入した後、得られた*EcoRI-EcoRI*断片をpPP'106の*EcoRI*部位に挿入して得られたプラスミドをpIT34とした。このpIT34の*rnc-era*領域をpIT7由来の断片と入れ替えることにより、pIT31,32,39を作製した。pIT32(*era770 era13*)は、pIT34の1.4kb*ClaI-NruI*断片をpIT7由来の1.7kb*ClaI-NruI*断片(pIT7の*NruI*切断部位は、mini-Tn10内)と置換することにより作製し、pIT32の0.4kb*ClaI-EcoRV*断片を野生型により置換しpIT39(*era13*)を作製した。またpIT31(*era770*)は、pIT34の0.14kb*ClaI-BamHI*断片をpIT7由来と置換し作製した。これらのプラスミドにより、Charon 25の溶原菌であるCSH22を形質転換した。Charon 25とpPP'106は*EcoRI*切断部位の両側に*lacZ*と*bla*遺伝子の相同な塩基配列を持ち、この領域において相同的な組み換えを行なったλファージはアンピシリン耐性となる。これを利用し、形質転換株にUVを照射することにより相同的組み換えの活性化とλプロファージの誘導を起こさせた後、得られたλファージからアンピシリン耐性のものを選択した。得られたアンピシリン耐性のλファージが、Charon 25のimmunity(*imm*<sup>21</sup>)を持ち、挿入断片が*lac5*と置換して*Lac*'の表現型を示すことを確認後変異再構成実験に用いた。

#### (6) Eraタンパク質過剰生産プラスミドの作製

Eraタンパク質過剰生産プラスミドを作製するため、*p<sub>L</sub>*プロモーターによる発現ベクターであるpJL6に*era*遺伝子を含むpACS1由来の*BstXI-NruI*断片を挿入したが、Eraタンパク質の生産が見られなかった。その為、*rnc*遺伝子部分と*era*遺伝子の3番目のコドンまでを高効率のShine-Dalgarno配列を含む合成オリゴヌクレオチドにより置換した結果、非常に効率良くEraタンパク質が生産される系が得られた(18)。このpCE31プラスミドの0.14kb*ClaI-BamHI*断片をpIT7由来と置換しpIT15(*era770*)を、また1.4kb*ClaI-NruI*断片をpIT7由来の1.7kb*ClaI-NruI*断片と置換しpIT19(*era770 era13*)、pIT19の0.4kb*ClaI-EcoRV*断片を野生型により置換しpIT45(*era13*)を作製した。

#### (7) Eraタンパク質の精製

TAP106 [Δ(*int-cIII*)BAM N::kan λcI857(*cro-bioA*)]にEraタンパク質過剰生産

プラスミドであるpCE31(*era*<sup>+</sup>),pIT15(*era770*),pIT19(*era770 era13*),pIT45(*era13*)を低温(32°C)で導入した。これら形質転換株をアンピシリン(50 μg/ml)を含むLプロスで低温培養し、42°Cで2時間Eraタンパク質の合成を誘導させた。1mlの培養液をエッペンドルチューブで遠心(15,000 rpm,10分,4°C)した後、水中で35 μlのTris-HCl (50 mM,pH 8.0)-sucrose (25 %)緩衝液に溶解し、35 μlのリゾチーム (1 mg/ml)溶液により溶菌させた。その後、5 μlのMgCl<sub>2</sub> (0.2 M)、2.5 μl DNaseI (10 U/μl)、20 μl 5xlysis buffer (5 % Nonidet P-40, 2.5 % sodium deoxycholate, 0.5 % NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 7.2], 5 mM EDTA)を加え、0°Cで30分間保温した。Eraタンパク質は容易に沈殿を形成するため、遠心(15,000 rpm,10分,4°C)により他の分画と分離した。得られた沈殿をlysis buffer (1 % Nonidet P-40, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1 % NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 7.2], 1 mM EDTA)への懸濁と遠心を繰り返すことにより分離をすすめた。3回の操作の後、ground buffer(50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol)に懸濁させ、さらに3回懸濁と遠心を繰り返し、得られた試料をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS/PAGE)により精製度を検討した。

#### (8) GTP結合活性測定試験

5 μlの試料を5 μlのnucleotide binding 溶液(100 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 % Nonidet P-40,0.2 mg/ml bovine serum albumin)と、最終濃度0.2 μCi/μlの[α-<sup>32</sup>P] nucleotide (400 Ci/mmol; Amersham Corp.)と混合させ、32°Cで30分間保温した。反応試料の8 μlをニトロセルロースフィルター上に滴下した後、10 mlの洗浄液(50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol)で3回洗浄した。フィルターを乾燥させ、放射活性を測定した。

#### (9) ウリジン標識によるリボソーム構成状態の検討

MEプロスにチミン (2 μg/ml)、グルコース(0.5 %)を加え、菌を培養する。低温(32°C)で1晩培養した培養液を50倍に希釈し、低温でOD<sub>600</sub>=0.2-0.3まで培養する。高温(42°C)に遷移して30分後、20 μCi [<sup>3</sup>H]-ウリジンを加え、15, 30, 60, 120, 180分後に氷冷し集菌する。高温遷移後180分間 [<sup>14</sup>C]-ウリジンで標識したW3110を対照として加え、TMA溶液 (10 mM Tris-HCl [pH 7.6], 30 mM

NH<sub>4</sub>Cl, 0.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM β-メルカプトエタノール) で洗浄したのち、ドライアイスで凝固させる。アルミナを用いて菌を破碎し、遠心(15,000 rpm, 10分, 4 °C)によりアルミナを除去した上清を、TMA溶液を用いた10-30%のsucrose密度勾配遠心(22,500 rpm, 27時間, 5 °C)後分画した。各分画の放射活性を測定することにより、リボソームの構成状態を検討した。

#### (10) リボソームの抽出と精製

MEプロスにチミン(2 μg/ml)、グルコース(0.5%)を加え、野生株(W3110)と変異株(IT32)を培養する。低温(32 °C)で1晩培養した培養液を50倍に希釈し、低温でOD<sub>600</sub>=0.1まで培養する。高温(42 °C)に遷移して3時間培養し、OD<sub>600</sub>が約0.5程度の時点で集菌する。溶液I (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 60 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM β-メルカプトエタノール) で洗浄したのち、ドライアイスで凝固させる。アルミナを用いて菌を破碎し、溶液Iに懸濁した後、遠心(15,000 rpm, 10分, 4 °C)によりアルミナを除去した。さらに遠心(30,000 rpm, 30分, 4 °C)により、菌の不溶性分画を除去した後、遠心(50,000 rpm, 2.5時間, 4 °C)による沈殿を溶液II (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 300 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM β-メルカプトエタノール)を加え、氷中で懸濁する。さらに、遠心(50,000 rpm, 2.5時間, 4 °C)により、付随するタンパク質が解離した、精製リボソームを沈殿として得た。これを、再び溶液Iに氷中で懸濁し、以後の実験に用いた。

#### (11) 試験管内翻訳反応によるリボソームの活性測定

ポリU-RNAを鋳型とする試験管内翻訳反応は、以下の条件で行なった。直前に調製したMix溶液(80 mM Tris-HCl [pH 7.5], 80 mM NH<sub>4</sub>Cl, 2 mM dithiothreitol, 1.5 mM ATP, 0.5 mM GTP, 2 mM phosphoenolpyruvate, 50 μg pyruvate kinase, 30 μM フェニルアラニン, 30 μg *E. coli*. tRNA, 0.2 mg/ml polyuridine, 2 mM スベルミジン)と、10 μg リボソーム, 50 μg *E. coli*. S-100, 8-10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 μCi [<sup>3</sup>H]-フェニルアラニン(110 Ci/mmmole, 1 mCi/ml)氷中で混合する(各濃度は最終濃度)。37 °Cで10分保温した後、反応溶液50 μlのうち40 μlを3MMのろ紙に滴下する。10%TCA(trichloroacetic acid)中で、20分間沸

騰させた不溶性画分の放射活性を、液体シンチレーションカウンターにより測定した。

精製したリボソームの翻訳忠実度は、ポリU-RNAを鋳型とした、ロイシンの不溶性画分への取り込みによって測定した。直前に調製したMix溶液(80 mM Tris-HCl [pH 7.5], 80 mM NH<sub>4</sub>Cl, 2 mM dithiothreitol, 1.5 mM ATP, 0.5 mM GTP, 2 mM phosphoenolpyruvate, 50 μg pyruvate kinase, 30 μg *E. coli*. tRNA, 0.2 mg/ml polyuridine, 2 mM スベルミジン)と、10 μg リボソーム, 50 μg *E. coli*. S-100, 8-10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 μCi [<sup>3</sup>H]-ロイシン(143 Ci/mmmole, 1 mCi/ml)氷中で混合する(各濃度は最終濃度)。以後は、[<sup>3</sup>H]-フェニルアラニンの場合と同様に行なった。

MS2 RNAを鋳型とする試験管内翻訳反応は、以下の条件で行なった。

直前に調製したMix溶液(50 mM Tris-acetate, 80 mM potassium acetate, 2 mM dithiothreitol, 1.5 mM ATP, 0.5 mM GTP, 0.2 μg pyruvate kinase, 4 mM phosphoenolpyruvate, 15 μg *E. coli*. tRNA, 3% (w/v) poly(ethylene glycol)-6000, 3 μg folinic acid, リジン以外の19種のアミノ酸を100 μM, 1 μM リジン, 10 μg MS2 RNA)と、10 μg リボソーム, 50 μg *E. coli*. S-100, 6-8 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 μCi [<sup>3</sup>H]-リジン(143.7 Ci/mmmole, 1 mCi/ml)と氷中で混合する(各濃度は最終濃度)。37 °Cで20分保温した後、ポリU-RNAを鋳型とする反応と同様に、放射活性を測定した。

#### (12) リボソームの30S/50S各サブユニットの分離

溶液I (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM β-メルカプトエタノール)に溶解状態のリボソームを、TMA溶液(10 mM Tris-HCl pH 7.6, 30 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM β-メルカプトエタノール)を用いた10-30%のsucrose密度勾配遠心(22,500 rpm, 27時間, 5 °C)後分画した。各分画のタンパク量を260 nmの吸収により測定し、各サブユニットのピークの分画を収集した。

#### (13) λ1105によるトランスポゾン挿入変異(*ersB,C*)の分離

λ1105ファージは、Kan<sup>r</sup>のトランスポゾンを無作為に効率良く染色体上に転座

させる目的で作製された" $\lambda$ hop"と命名されたファージの1つである(90)。これらのファージは、菌体内における複製、染色体への挿入に欠損を持つ。また $\lambda$ 1105ファージは、Kan<sup>r</sup>の遺伝子の両側に転座に必須な121bpのIS10由来のDNA断片を挿入し、転座に必要なトランスポゼースの構造遺伝子をこの外側に置いている。このため、染色体上に転座したKan<sup>r</sup>のトランスポゾン、安定に保持される。IT32株に $\lambda$ 1105を37°Cでm.o.i=0.3の条件で感染させ、室温で30分吸着させた後37°Cで90分間転座と薬剤耐性遺伝子の発現をおこなわせ、42°Cで1晩保温しKan<sup>r</sup>で高温耐性株を選択した。独立に分離された40株について、IT32株を受容菌とするP1マッピングを行なった結果、Kan<sup>r</sup>と高温耐性が100%のリンケージである株として3株が同定された。

#### (14) Muファージによるin vivoクローニング

染色体上のKan<sup>r</sup>のトランスポゾンをクローニングする目的で、Muファージのレプリコンを保持するプラスミドpEG5005にCm<sup>r</sup>遺伝子を導入した、pIT134プラスミドを作製した(32)。pEG5005のBamHI-BglII断片にBamHI-BamHIのCm<sup>r</sup>遺伝子を保持する断片を挿入し、Kan<sup>s</sup> Cm<sup>r</sup>のクローンを選択しpIT134とした。一方、トランスポゾン挿入変異によるサプレッサー変異株IT526,528にMu ctsファージを感染させ、高温感受性により溶原化を確認した後、pIT134による形質転換株を32°Cで選択した。得られた形質転換株を高温(42°C)処理することにより、pIT134プラスミド上のMuレプリコンの染色体への転座と複製が、連動して起こる(17,34)。この際、近接して染色体へ転座した2つのMuレプリコン間での相同的組み換えが行なわれた場合、染色体の一部を含むMuファージがMuファージとして形成される。従って、調整したMuファージを低温(32°C)においてMu cts溶原株に感染させ、Kan<sup>r</sup> Cm<sup>r</sup>を保持するクローンを選択することにより、染色体上のKan<sup>r</sup>のトランスポゾン近傍のDNA断片を染色体からクローニングすることができる。このようにして、pIT135,136クローンが得られた。

#### (15) Polymerase Chain Reaction(PCR) によるクローニング

*suhB/ssyA*遺伝子を含むEcoRV-EcoRVのDNA断片の5'端と3'端の塩基配列をもつオリゴヌクレオチドを用いて、PCR反応により*ersA2*変異株内の*suhB/ssyA*遺

伝子と*rnc*遺伝子領域をクローニングした。50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 10 mM 4x dNTPs, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 pmole プライマーの反応溶液につまようじでとった菌を溶解し、0.5  $\mu$ l AmpliTaq DNA polymerase (TAKARA)を加え良く攪拌する。その後ZYMO REACTER (ATTO)により94°C 3分を1回、94°C 1.4分、50°C 1.5分、72°C 2.4分を40回繰り返すことにより、増幅した*suhB/ssyA*遺伝子領域のDNA断片を得た。これを、フェノール/クロロフォルム処理後、エタノール沈殿により精製し、EcoRV, HindIII処理しpUC119にサブクローニングした。シングルストランドDNAを調製し、マルチクローニングサイトの40塩基上流のプライマーを用い塩基配列を決定した。

*suhB/ssyA*遺伝子の5'端と3'端の塩基配列をプライマーの塩基配列は、

5'GGAAGCTTCGAATATTTTGC3' と

5'GGGATATCACCCGCCTGAGTCATT3' であり、

*rnc*遺伝子領域のクローニングは、*rnc*遺伝子上流のEcoRI切断部位を含む

5'GAATTCGCTTTCCGAGCG3'のプライマーと*era*遺伝子3'端を含む

5'GGAAGCTTCAAGCCGTCGTAAGGC3'である。

独立に2回のクローニングと塩基配列の決定を行ない結果が一致することを確認した。DNAの塩基配列は文献(77)にしたがって決定した。

#### (16) パルスラベル

各変異株を*suhB2*変異は42°C、*suhB10*変異は37°Cの温度でMEプロスにて培養した後、OD600=0.2-0.3において25°Cに遷移する。1時間後に16.6  $\mu$ Ci/mlの [<sup>35</sup>S]メチオニン(16.6  $\mu$ Ci/ $\mu$ l, 1000 Ci/mmol, Amersham)により2分間ラベルし、TCA(トリクロロ酢酸)による沈殿分画についてSDS/PAGE後、X線フィルムに露光させオートラジオグラフィーを行なった。SDS/PAGEにおいて、RNAポリメラーゼ $\beta\beta'$ 近傍には他のタンパク質が存在しないので同定は比較的容易に行なえた。各バンドの放射活性はイメージアナライザー(富士フィルム)により測定した。

#### (17) $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素活性測定

培地は、Qプロス (1% ポリペプトン, 0.5% 塩化ナトリウム)を用いた。IT546 (*suhB10*) に関しては37°C、IT713 (*suhB2*) に関しては42°C で一晩培養し



た後に同様の培地に希釈し $OD_{600}=0.2-0.3$ において $25^{\circ}\text{C}$ に遷移し $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素活性測定を行なった。最終濃度 $50\ \mu\text{M}$ のIPTG(イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド, novabiochem)を添加後の各時間に $0.5\ \text{ml}$ を、氷水中の $50\ \mu\text{l}$ のクロラムフェニコール溶液中に分注する。 $0.5\ \text{ml}$ の $50\ \text{mM}$  Tris-HCl [pH 7.6]溶液で洗浄し、 $100\ \mu\text{l}$ の同溶液に懸濁させる。このうち $20\ \mu\text{l}$ にZ溶液 $1\ \text{ml}$ と、トルエン数滴を加え30分間 $37^{\circ}\text{C}$ で菌の溶解を行なわせる。これから $0.4\ \text{ml}$ をとり新しくZ溶液 $0.6\ \text{ml}$ を加え $28^{\circ}\text{C}$ で保温を開始し、5分後に $4\ \text{mg/ml}$ のONPG(O-ニトロフェニル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド, ナカライテスク)溶液を加えた時間を0分として反応を行なう。反応が進み、反応液が黄色に変化した時点で $0.5\ \text{ml}$ の $1\ \text{M}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ を加え反応を停止させ $420\ \text{nm}$ と $550\ \text{nm}$ の吸光度を測定する。ミラーの式によりユニット数を算出した(54)。Z溶液の組成と計算式は以下の様である。

Z溶液 0.1 M Sodium Phosphate Buffer [pH 7.0], 10 mM KCl,  
1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

$$U = (A_{420} - 1.75 \times A_{550}) / (V \times T \times A_{600})$$
 V; 反応液中の培養液の割合  
T; 反応時間

#### (18) ノザンハイブリダイゼーション

各株を、Lプラスに於て $OD_{600}=0.3$ 程度に培養する。氷水中で急冷し、十分温度が低下した時点で遠心( $5,000\ \text{rpm}$ , 10分,  $4^{\circ}\text{C}$ )により集菌する。沈殿を、 $1\ \text{ml}$ の予冷した溶液( $0.02\ \text{M}$  NaOAc (pH 5.5),  $0.5\ \%$  SDS,  $1\ \text{mM}$  EDTA)に懸濁した後、 $0.02\ \text{M}$  NaOAc (pH 5.5)で平衡化したフェノールを加え、良く攪拌し $60^{\circ}\text{C}$ で10分間保温する。これを、さらに繰り返した後にエタノール沈殿を行ない、TE溶液( $10\ \text{mM}$  Tris-HCl,  $1\ \text{mM}$  EDTA)に溶解する。ホルムアミドを用いた電気泳動を、1レーンあたり約 $4\ \text{g}$ のRNAを用いて行ない、RNAをHybond-N+にトランスファーした後、ホルムアミドを用いたノザンハイブリダイゼーションを行なった。電気泳動とノザンハイブリダイゼーションは、文献(48)に従って行なった。

## 第三章 結果

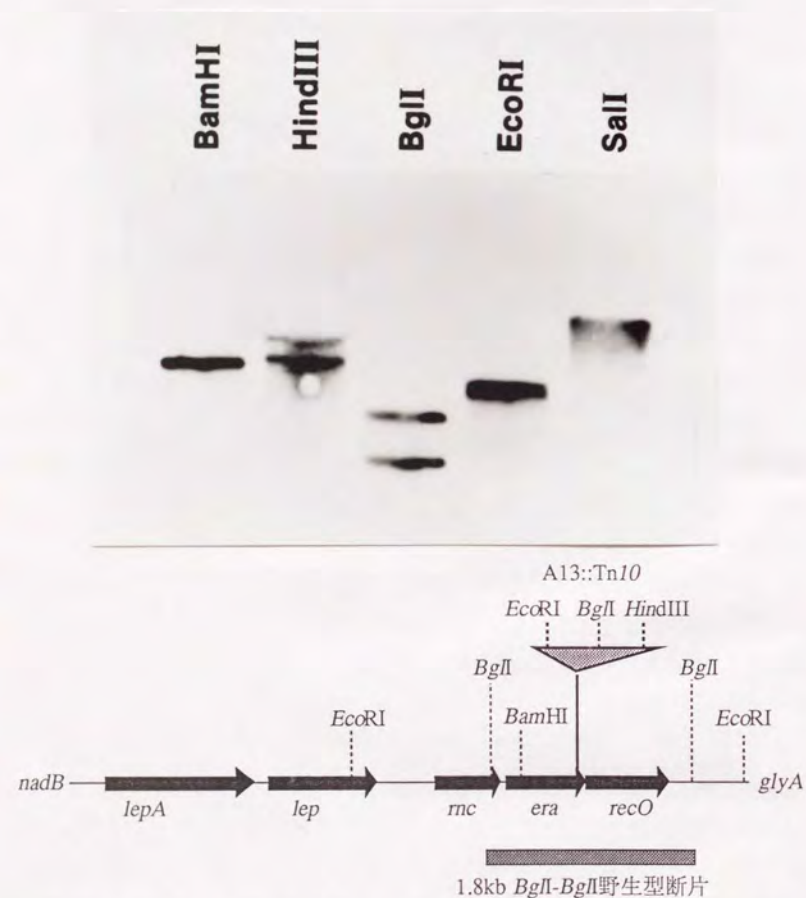
### 第一節 era遺伝子内変異による高温感受性変異株の分離と解析

#### (1) 温度感受性変異株の分離

大腸菌の分子遺伝学においては、変異株の分離と解析が、多くの遺伝子について重要な知見をもたらしてきた。我々は、P1ファージを用いたlocalized mutagenesis法により、era遺伝子内変異による温度感受性変異株の分離を試みた。共同研究を行なっている米国NIH D.Court博士の研究室において、テトラサイクリン耐性のマーカーを持つトランスポゾンであるmini-Tn10が、era遺伝子近傍に挿入された株が選択された(84)。これらの内mini-Tn10がera遺伝子に最も近接していると思われる株(HT30株)を分与していただき、Southernハイブリダイゼーションによりmini-Tn10の位置を確認した。era遺伝子近傍を含む $1.8\ \text{kb}$ のBglII-BglII DNA断片をプローブとし、BamHI, EcoRI, BglII, HindIII, SalI処理したHT30株由来の染色体DNAに対して、Southernハイブリダイゼーションを行なった。その結果、era遺伝子近傍を含む $1.8\ \text{kb}$ のBglII-BglII DNA領域内には、野生型はEcoRI, BglII, HindIIIによる切断部位を含まないにもかかわらず、HT30株においては2つの断片が反応した(図10)。従って、 $1.8\ \text{kb}$ のBglII-BglII領域にmini-Tn10が存在すると考えられた為、HT30株よりera遺伝子近傍のDNAをクローニングによりクローニングした。

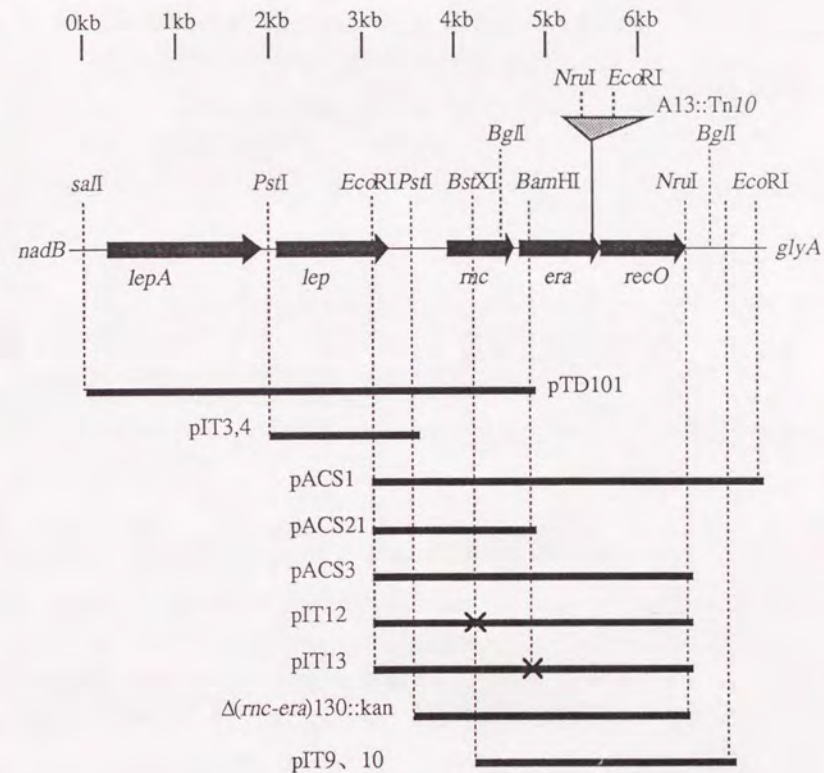
得られたクローンの塩基配列を決定した結果、テトラサイクリン耐性遺伝子の挿入によるera遺伝子のC末端22残基の欠失(era13変異)が同定された(図12)。しかしHT30株は生育に欠損が認められなかった為、この株をP1ファージの供与菌として用いて、era遺伝子近傍のlocalized mutagenesisを行なった。HT30株より調製したP1ファージを、ヒドロキシルアミンで処理した後に低温で受容菌(KH5402)に感染させ、テトラサイクリンを選択条件として形質導入コロニーを得た。これらの形質導入コロニーをレプリカ法でスクリーニングし、温度感受性株を約90株分離した。

図10 サザンハイブリダイゼーションによるA13::Tn10挿入部位の分析



HT30株より調製した染色体DNAを、*Bam*HI, *Hind*III, *Bgl*I, *Eco*RI, *Sal*Iにより処理し、1%アガロースゲルに電気泳動を行なった。DNAをGene-ScreenPlus膜にトランスファーした後、ラベルされた1.8kb *Bgl*I-*Bgl*I野生型断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行なった。*Bam*HI, *Eco*RIに反応する二つの断片が同一長であるため、単一のバンドのみが認められている。

図11 *era*遺伝子近傍の染色体構造とプラスミドの保持するDNA領域



$\Delta(rnc-era)130::kan$ については、*kan*遺伝子との置換による欠失領域を示す。  
xは制限酵素切断後の平端化による4bp欠失変異 (pIT12) または4bp重複変異 (pIT13)を意味する。kb数は、*lepA*遺伝子上流の*Sal*I認識部位からの距離を示す。

## (2) 温度感受性変異株の同定

次に各変異株について、変異を持つ遺伝子を同定するため、この近傍の野生型遺伝子を保持するプラスミドによる温度感受性の相補を検討した。図11に示す *era*遺伝子近傍の野生型遺伝子を保持するプラスミドにより、変異株を形質転換

した。その結果、表2に示すように*era*遺伝子により相補される変異株が1株、*era*遺伝子の上流に存在するシグナルペプチダーゼの構造遺伝子である*lep*遺伝子で相補される変異株が22株分離された(41)。

表2 *era*遺伝子近傍の高温感受性変異株の相補性試験

群	変異株数	各プラスミドの相補活性						
		pACS1	pACS21	pACS3	pIT12	pIT13	pTD101	pIT3
I( <i>era</i> )	1	+	-	+	+	-	-	-
II( <i>lep</i> )	22	-	-	-	-	-	+	+
III	67	-	-	-	-	-	-	-

90株の変異株に各プラスミドを形質転換し、高温での生育を検討した。pIT3はカナマイシン耐性で、これ以外のプラスミドはアンピシリン耐性により形質転換株を低温において選択し、高温に24時間保温しコロニー形成能を検討した。

次に、これらの変異株についてP1マッピングを行なった。変異株分離の際に受容菌として用いたKH5402株は、低温のみで本来終止コドンであるUGAコドン部位にTyr残基を挿入する活性(温度感受性ナンセンスサプレッサー活性; *supF*(Ts6))を保持する。従って、この株の遺伝的背景で温度感受性変異株になる可能性として以下の2つが考えられる。第一に、あるアミノ酸残基から他の残基への置換により、タンパク質の活性自身が温度感受性になった場合(ミスセンス変異)。第二に、遺伝子内のあるコドンが終止コドンに置換された結果、低温ではその部位にTyr残基が挿入され完全長の遺伝子産物が合成されるが高温では翻訳がその部位で終了するため、菌が致死性を示す場合(ナンセンス変異)である。変異株内に存在する変異を、P1ファージにより温度感受性ナンセンスサプレッサー活性を持たない株に形質導入し菌の温度感受性を検討した。表3に示す様に、*era*変異株はミスセンス変異であった。また、*lep*変異株については全てナンセンス変異であるが、*lep9*変異は温度感受性ナンセンスサプレッサー活性を持たない株においても温度感受性を示すことが明らかになった(41)。

### (3) *era*変異株の解析

*era*変異株(IT17)について、*era*遺伝子領域のDNA断片をコロニーハイブリダイゼーションによりpUC19プラスミド上にクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果N端から8番目のCys残基からTyr残基への置換をおこす点変異(*era770*)を見いだした(図12)。*era*変異株は、mini-Tn10によるC端22残基欠失変異(*era13*)を同時に保持し、*glyA::Tn5*(DC569)株を供与菌として行なったP1マッピングにより(表3)テトラサイクリン耐性(Tet<sup>r</sup>)と温度感受性(Ts)が分離できないことから、この2つの変異が共に温度感受性へ寄与する可能性が考えられた。

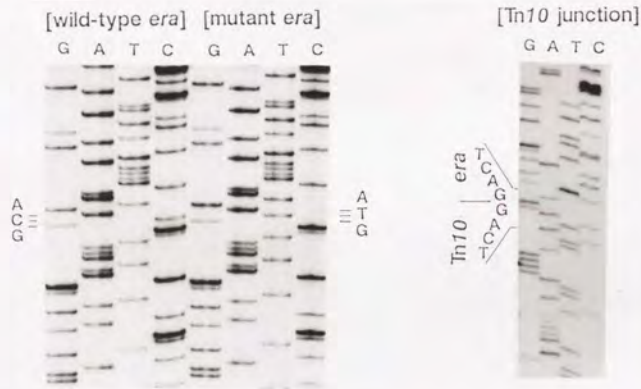
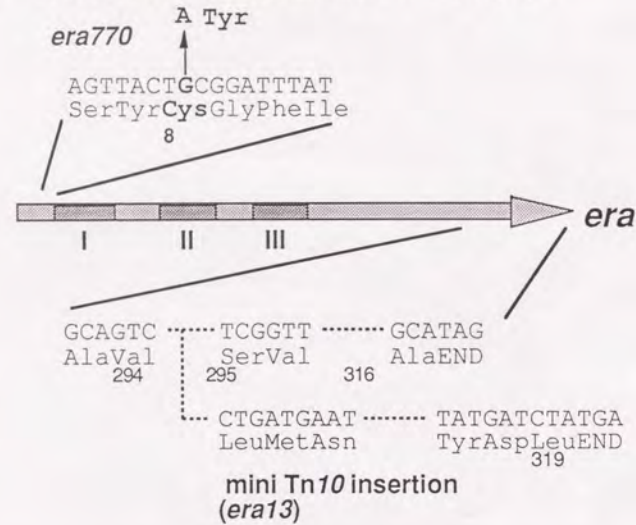
表3 *era*変異のP1によるマッピング

供給菌	受容菌	選択マーカー	非選択マーカーの分離		
			表現型	菌数	組み換え体の比率
IT17 (Tet <sup>r</sup> Ts)	W3110 <sub>+</sub> (Tet <sup>s</sup> Ts <sup>+</sup> )	Tet <sup>r</sup>	Ts Ts <sup>+</sup>	711 20	2.7% (Ts/Tet)
DC569 (Kan <sup>r</sup> Tet <sup>s</sup> <i>era</i> )	IT32 (Kan <sup>s</sup> Tet <sup>r</sup> Ts)	Kan <sup>r</sup>	Tet <sup>s</sup> Ts <sup>+</sup> Tet <sup>s</sup> Ts Tet <sup>r</sup> Ts <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> Ts	145 0 145 0	0.0% (Ts/Tet) 51.2% (Ts/Kan)

テトラサイクリンは15 µg/ml、カナマイシンは50 µg/mlの濃度を用いて、耐性株を選択した。得られた形質導入株は精製後、各表現型を検査した。

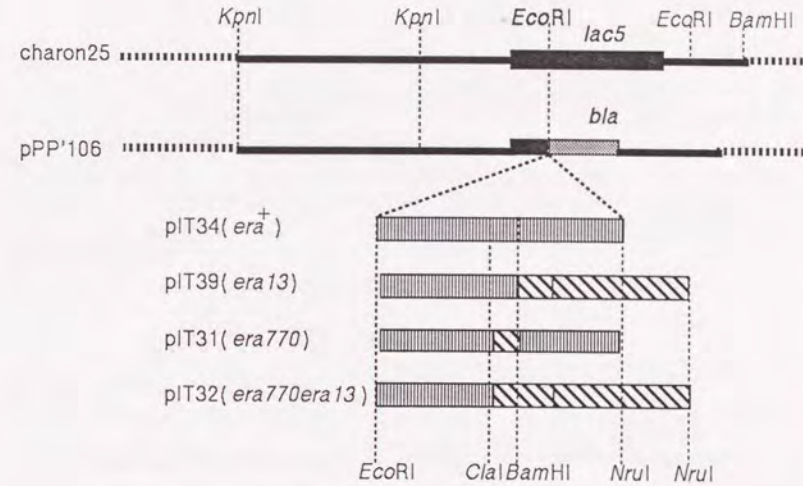
この可能性を確認する目的で、上記変異を種々の組み合わせで持つ形質導入ファージを作製し(図13)*era*変異株に対する相補性試験を行なった(表4)。その結果、両変異を持つファージ(λIT32)のみに相補活性がみられなかった。

図12 *era770era13*変異の塩基配列とアミノ酸配列



*era770*変異は23番目の塩基GからAへの変異であり、8残基目のCysがTyrで置換される。*era770*変異は882と883番目の塩基間にmini-Tn10が挿入され、22残基の欠失とともに人工的な25残基が付加されている。*era*遺伝子内のI, II, IIIは、GTP結合タンパク質に保存される”Gドメイン”に相同性を保持する領域を示す。

図13 *era*変異を保持するプラスミドとファージの構造



*era*変異株よりクローニングされたpIT7より*era770*変異と*era13*変異を含むプラスミド、pIT34(*era*<sup>+</sup>)、39(*era13*)、31(*era770*)、32(*era770 era13*)を作製した(材料と方法)。縦縞は野生型の領域を、斜線はpIT7由来の領域を示している。Charon25とpPP'106については、実線は相同な領域を点線部分は非相同的部分を示す。アンピシリン耐性、*lac*<sup>-</sup>のファージを選択することにより、EcoRI認識部位の両側の相同的な部分での組み換え体が得られた。

従って、両変異が温度感受性に必要であると考えられる。さらにこれを確認する目的で両変異の再構成株を作製した。上記のλファージ(λIT31, 32, 34, 39)を野生株(W3110)に溶原化し、*era*欠失変異( $\Delta(rnc\ era)130::kan$ )をP1ファージを用いカナマイシン耐性を選択マーカーとして、KK583より導入した。得られた再構成株の温度感受性を試験した結果(表4)より、*era770*点変異と*era13*欠失変異の両方が菌の温度感受性に必須であることが示された。

表4 *era770era13*変異の相補活性

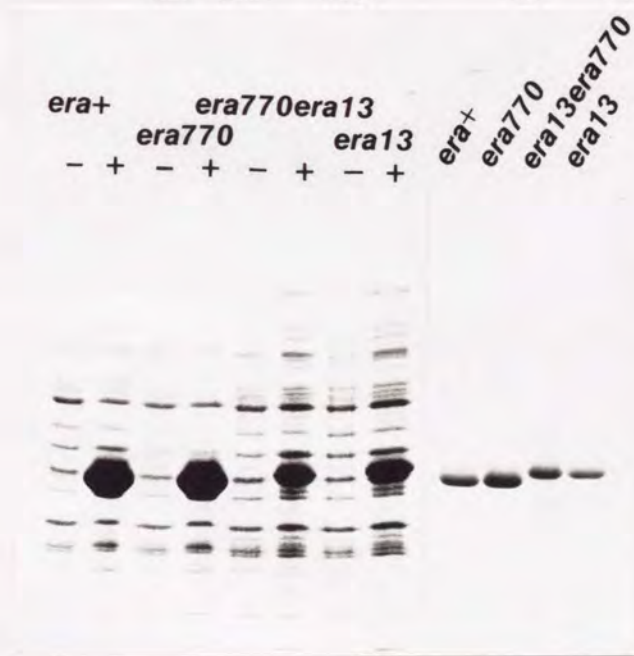
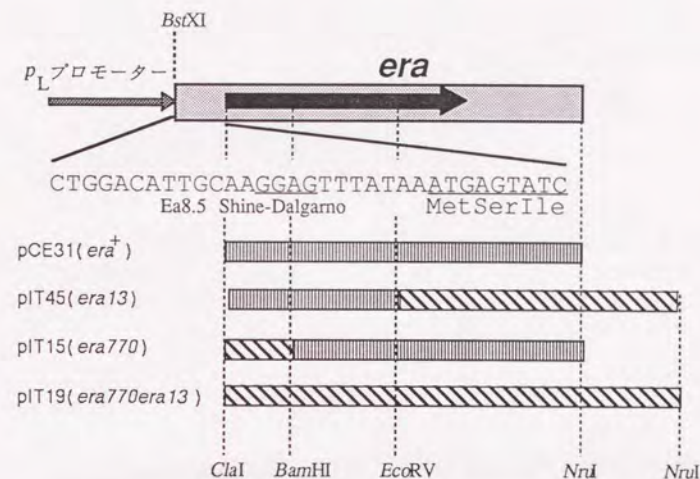
染色体上の <i>era</i> 遺伝子領域 の遺伝子型	溶原菌の高温感受性			
	$\lambda$ IT34 ( <i>era</i> <sup>+</sup> )	$\lambda$ IT39 ( <i>era13</i> )	$\lambda$ IT31 ( <i>era770</i> )	$\lambda$ IT32 ( <i>era13era770</i> )
<i>era</i> <sup>+</sup> (W3110)	+	+	+	+
<i>era770 era13</i> (IT32)	+	+	+	-
$\Delta$ ( <i>rnc-era</i> )130::kan	+	+	+	-

*era*<sup>+</sup> (W3110)、*era770 era13* (IT32)株については各ファージを感染させ、アンピシリン耐性をマーカーとして溶原菌を選択し、高温感受性を検討した。  
 $\Delta$ (*rnc-era*)130::kanについては、KK583からP1ファージによりカナマイシン耐性をマーカーとして、W3110の溶原菌に変異を導入し、高温感受性を検討した。

#### 4) 変異Eraタンパク質の生化学的解析

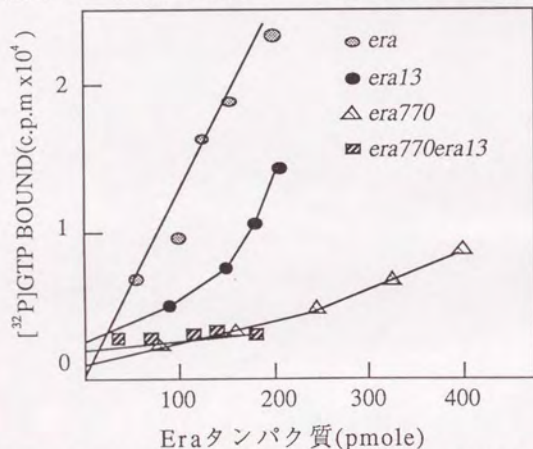
温度感受性に必須である2つの変異がEraタンパク質の活性に与える影響を検討する目的で、*p<sub>L</sub>*プロモーターの下流に*era*遺伝子を持つ過剰生産用プラスミド(pCE31)に、各変異を導入した。これらのプラスミドを高温感受性*c*リプレッサーを保持する株(TAP106)に低温で形質転換し、この菌を高温で培養することによりEraタンパク質が効率良く過剰生産される系を構築した(図14)。*era13*変異を保持する過剰生産プラスミドから生産されたEraタンパク質の分子量は、野生型よりやや増加していた。従って、*era13*変異はテトラサイクリン耐性遺伝子の挿入による*era*遺伝子のC末端22残基の欠失と人工的な25残基の付加変異であることが確認された。この系を用いて、変異型のEraタンパク質の精製を試みた。Eraタンパク質は*ras*遺伝子産物であるp21と同様に容易に沈殿を形成するため、迅速で簡便な精製方法として、各変異型Eraタンパク質を沈殿として高い純度で精製した(材料と方法、図14)。各変異型Eraタンパク質の活性を定性的にみるため、GTP結合能与タンパク量の比例関係を検討した。その結果図15に示す様に、*era770*変異を持つEraタンパク質は、野生型に比べGTP結合能に著しい欠損がみられた。

図14 Eraタンパク質過剰生産プラスミドの構造と、各変異型タンパク質の過剰生産と精製



$p_L$ プロモーターの下流に *era* 遺伝子を含む *Bst*XI-*Nru*I断片を挿入した後、*Bst*XI-*Cla*I断片を高効率のShine-Dalgarno配列を含むオリゴヌクレオチドにより置換した。このpCE31プラスミドをpIT7由来の断片により置換し、各変異を保持するプラスミドを作製した。縦線は野生型、斜線は変異株由来の断片を意味する。各プラスミドをTAP106(cI857ts)に導入し、Lプロスで32°Cにおいて培養する。42°Cで2時間培養し、各Eraタンパク質の合成を誘導し（左側部分）、精製度をSDS/PAGEにより検討した（右側部分）。

図15 変異型Eraタンパク質のGTPへの結合



精製された変異型Eraタンパク質のGTPへの結合をタンパク量と結合したGTPの量放射活性により検討した。

また、イオン交換クロマトグラフィーにより精製した可溶性の野生型Eraタンパク質と、*era770*変異を持つEraタンパク質について、ヌクレオチド特異性を検討した。その結果、表5に示す様に、Eraタンパク質はグアニンヌクレオチド特異的に結合し、その活性がEra770タンパク質において低下していた。

表5 各ヌクレオチドへのEraタンパク質の結合活性

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] labeled nucleotide triphosphate	結合放射活性(cpm)		
	Bovine serum albumin	Era	Era770
dGTP	3	23,731	2,098
CTP	0	832	119
UTP	0	14	23
ATP	9	1,605	260
GTP	0	44,596	1,421

1.5mgの可溶性の野生型Eraタンパク質を用い、材料と方法で述べた手順に従って、各ヌクレオチドへの結合活性を測定した。

## 第2節 era高温感受性変異株内のリボソームの合成欠損

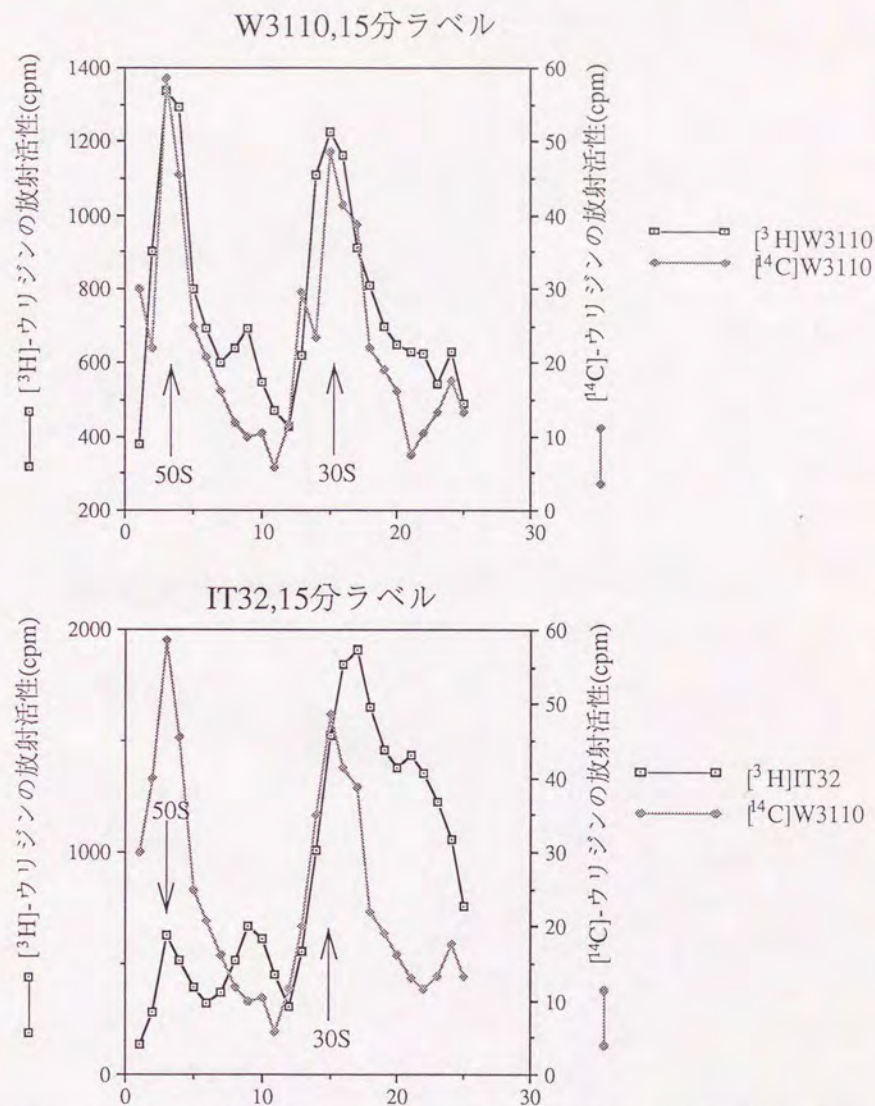
前節において、*era*遺伝子内変異による高温感受性変異株を分離同定し、変異株中に存在する*era13*,*era770*変異が共に菌の高温感受性に必要であることを示した。この変異株における欠損を同定することは、*era*遺伝子の機能解明に有用な示唆を与えると思われる。我々は、得られた*era*変異株について、他の遺伝子の発現に与える影響を2次元電気泳動等により検討したが、顕著な欠損が検出されなかった。また、*RAS1*との相同性から類推し大腸菌内のcAMPの濃度検定を行なったが、欠損が認められなかった。*Era*は、rRNAのプロセッシングを担うRNaseIIIと同じオペロンにコードされ、*rnc*,*era*遺伝子の発現が翻訳段階で共役していることから、リボソームの活性と合成を*era*高温感受性変異株において検討した。

### (1) *era*高温感受性変異株におけるリボソームの合成速度の遅延

野生型*rnc*遺伝子を保持するプラスミドpS1を持つIT32(*W3110 rnc70 era770 era13*)株を低温(32°C)で培養し高温(42°C)遷移後、<sup>3</sup>H-ウリジンによる標識を行なった。標識開始後、15,30,60,120,180分後に集菌しリボソームを抽出した後、sucrose密度勾配遠心により沈降係数によって分離した。遠心に用いた、TMA溶液のMg<sup>2+</sup>の濃度(0.3mM)は30Sリボソームと50Sリボソームが完全に分離する条件であり、各リボソームの存在比とその沈降係数を知ることができる。分画後、各分画の放射活性を測定しリボソームの構成状態を検討した。対照はpS1を持つW3110とした。図16に示すように、標識開始後15分後のリボソームの構成状態を比較した場合、変異株における成熟型50Sリボソームの位置に検出される放射活性が少ない。従って、リボソームの成熟化の速度が遅延していることが考えられた。

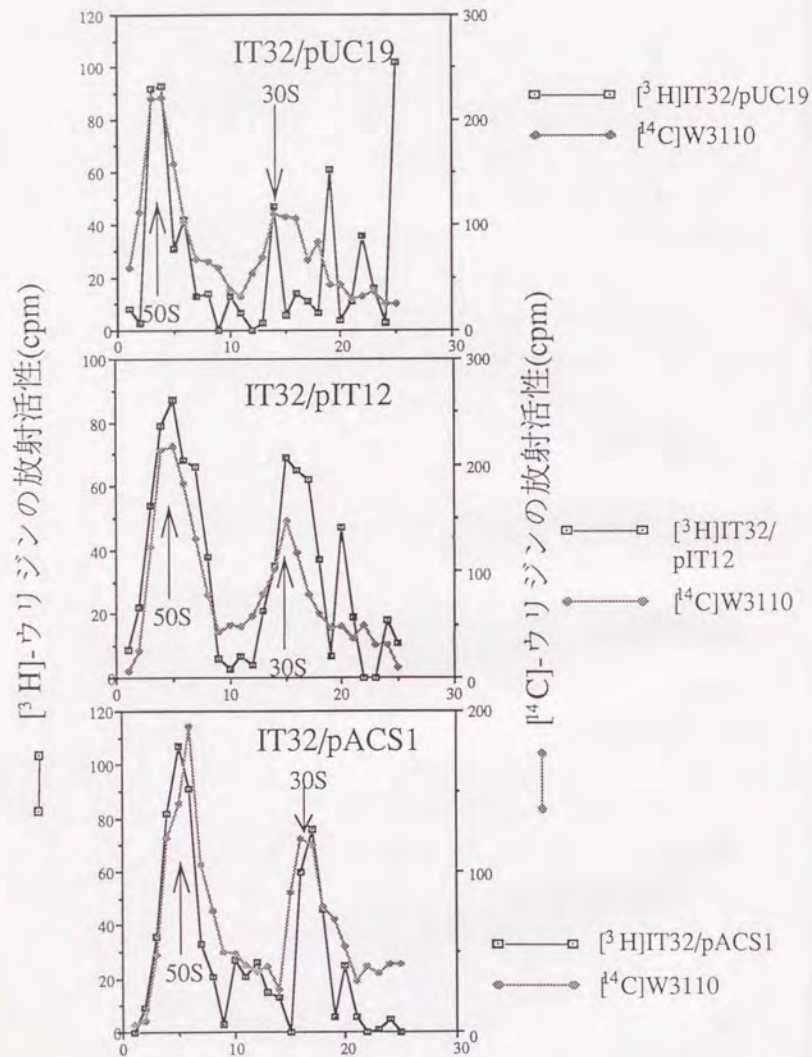
これを確認する為、pUC19,pACS1(*rnc*<sup>+</sup>,*era*<sup>+</sup>),pIT12(*era*<sup>+</sup>)を保持するIT32株について、<sup>3</sup>H-ウリジンによるパルスラベルを行なった後、リボソームの構成状態を解析した。<sup>3</sup>H-ウリジンにより4分間標識した後、非放射性ウリジンを最終濃度100 µg/mlで加え、20分間チェースを行ない、リボソームの構成状態を比較した。その結果、図17に示す様に野生型*era*遺伝子を保持する株においては、リボソームの構成状態は野生型とほぼ同じであった。よって*era*遺伝子産物の機

図16 *era*変異株におけるリボソーム合成の遅延



W3110/pS1, IT32/pS1を、<sup>3</sup>Hウリジンにより15分間標識し、3時間<sup>14</sup>Cで標識したW3110を対照として混合する。リボソームを抽出し、0.3 mM Mg濃度におけるsucrose密度勾配遠心により、30Sと50Sを分離した。沈降係数にしたがい分画して放射活性を測定し、リボソームの構成状態を検討した。

図17 era変異株のリボソーム合成遅延の相補性試験



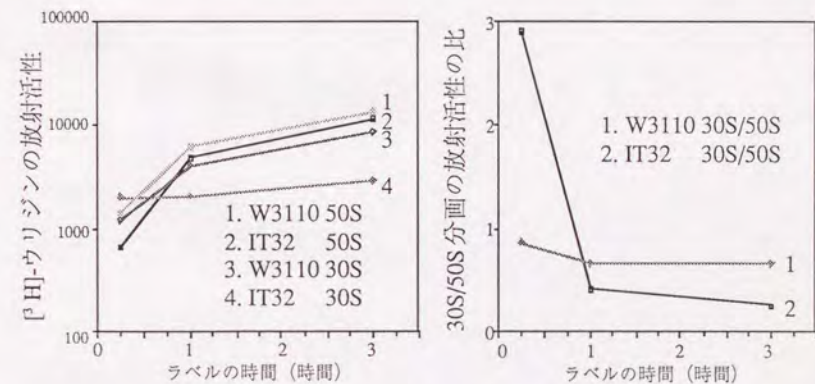
各株を、 $[^3\text{H}]$ ウリジンにより4分間標識し、 $100\mu\text{g/ml}$ ウリジンにより20分間チエースを行なう。3時間 $[^{14}\text{C}]$ で標識したW3110を対照として混合し、リボソームを抽出し、 $0.3\text{ mM Mg}$ 濃度におけるsucrose密度勾配速心により、30Sと50Sを分離した。沈降係数したがい分画し放射活性を測定し、リボソームの構成状態を検討した。

能欠損により、リボソームの合成速度が遅延する可能性があると考ええる。

2) 制限温度下における30Sリボソーム合成の阻害

次に、標識開始180分後のリボソームの構成状態を検討した場合、30Sリボソーム分画に存在する放射活性が、50Sリボソーム分画に存在する放射活性の量に比較して減少していた(図18)。そこで、30Sリボソーム分画に存在する放射活性を時間経過に従い算出すると、その値は一定のまま増加せず、その結果30Sリボソーム/50Sリボソームの量比が時間経過に従い減少していた(図19)。また、50Sリボソーム分画に存在する放射活性は時間経過に従い増加し、その位置も野生型と同一であり、総RNAと総タンパクの合成も野生株と比較して顕著な欠損が認められなかった(結果未掲載)。従って、rRNAの合成速度自体よりそれ以後のプロセッシングを含んだアセンブリーのいずれかの段階に欠損があることが考えられる。

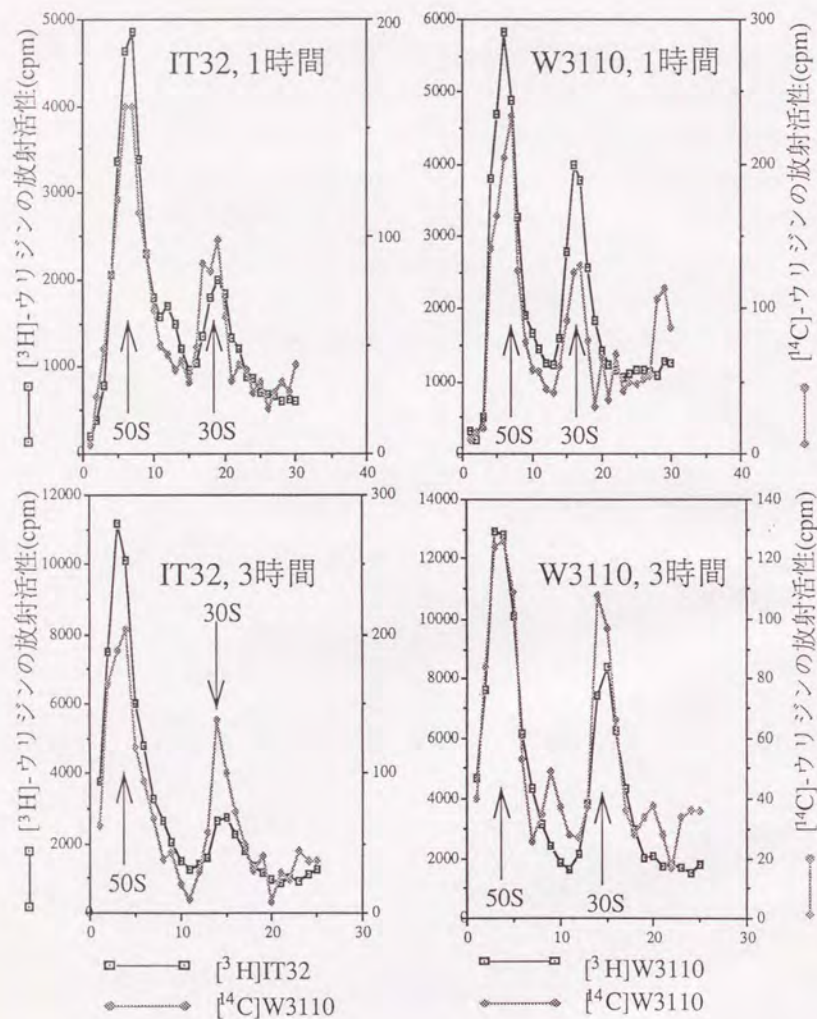
図19 30S,50S各分画の放射活性と、30S/50S比の経時変化



$20\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$   $[^3\text{H}]$ ウリジンで標識した後各時間において集菌し、リボソームを抽出した。sucrose密度勾配速心により30Sと50Sの各サブユニットに分離し、放射活性を測定した。右図は各サブユニットの放射活性の経時変化、左図は30Sと50Sの比の経時変化を示している。



図18 era変異株における30Sリボソーム合成の阻害

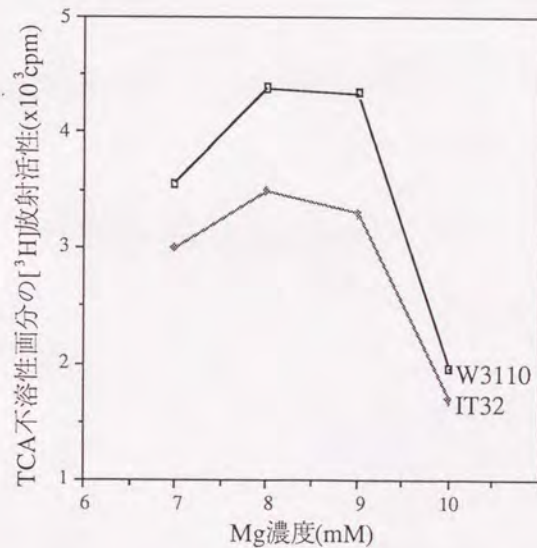


W3110/pS1, IT32/pS1を、 $[^3\text{H}]$ ウリジンにより1-3時間標識し、3時間 $[^{14}\text{C}]$ で標識したW3110を対照として混合する。リボソームを抽出し、0.3 mM Mg濃度におけるsucrose密度勾配遠心により、30Sと50Sを分離した。沈降係数にしたがい分画し、放射活性を測定してリボソームの構成状態を検討した。

(3) era高温感受性変異株リボソームの試験管内翻訳活性

era高温感受性変異株におけるリボソームの合成速度の遅延と、30Sリボソーム合成の阻害が見いだされた為、era高温感受性変異株のリボソーム活性を試験管内翻訳系により検討した。MEプロスにおいて、野生株(W3110)と変異株(IT32)を高温(42°C)で約3時間培養し、OD<sub>600</sub>が約0.5程度の時点で集菌する。材料と方法に従い、付随するタンパク質が分離したリボソームを得、これについてポリU-RNAを鋳型とする試験管内翻訳反応を行なった。各マグネシウム濃度における活性を比較した結果、図20に示す様に、最も活性の高い8 mM MgCl<sub>2</sub>の条件において活性の低下が認められた。

図20 野生株とera変異株由来リボソームの、試験管内翻訳反応活性



リボソームを10mg用い、ポリU-RNAを鋳型にし、試験管内の翻訳反応を行なった。TCA不溶性画分に存在する $[^3\text{H}]$ フェニルアラニンの放射活性により、翻訳反応の活性を測定した。

表6 *era*変異株リボソームの試験管内翻訳反応における忠実度の低下

株	[ <sup>3</sup> H]Phe放射活性(cpm)		<i>era</i> 変異株/ 野生株(1)		[ <sup>3</sup> H]Leu放射活性(cpm)		<i>era</i> 変異株/ 野生株(2)		(2)/(1)
	+poly U	-poly U	(+poly U) -(poly U)	野生株(1)	+poly U	-poly U	(+poly U) -(poly U)	野生株(2)	
野生株 (W3110)	10400	3600	6800	1.00	16600	8600	8000	1.00	1.00
<i>era</i> 変異株 (IT32)	6300	3100	3200	0.47	12600	6800	5800	0.73	1.56

10 μgのリボソームを用い、ポリU-RNAを鋳型とする試験管内翻訳反応を行なった。  
Mg濃度は、8 mMの条件で行なった。

10 mMの条件では野生株と変異株の差が見られないが、いずれの活性も最適条件の半分以下に低下しているため、比較はできないと思われる。また、ポリU-RNAを鋳型とする試験管内翻訳反応におけるロイシン残基のポリペプチドへの取り込みを測定し、試験管内忠実度が低下していることが明らかとなった(表6)。

次に、MS2 RNAを鋳型として用い、非合成RNAを鋳型とする試験管内翻訳反応における活性を比較した。その結果、生体内のRNAを鋳型とした場合にも、活性の低下が認められた。

*era*変異株においては、制限温度下で30Sリボソームの合成の阻害が見られるため、この活性の低下が30Sリボソーム量の低下によることが考えられる。これを確認する為、リボソームを30S/50S各サブユニットに分離した後に再構成して活性測定を行なった。その結果、表7に示す様に、野生型と同一の質量比の条件においても*era*変異株由来のリボソームは、いずれの鋳型を用いた場合にも活性の低下が認められた。従って、30Sリボソーム量の低下ではなくリボソーム自体の活性が低下していると考えられる。

### 第3節 era高温感受性変異株のサプレッサー変異の分離

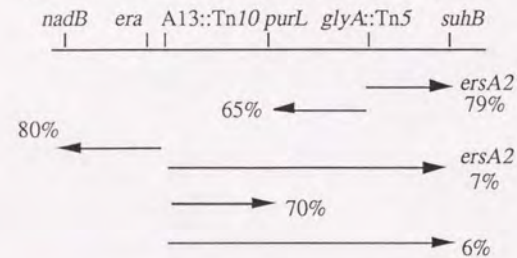
前節までにおいて、era遺伝子内変異による高温感受性変異株を分離同定し、変異株中に存在するera13, era770変異が共に菌の高温感受性に必要であり、これらの変異を保持するEraタンパク質においてGTP結合活性が低下していることが明らかとなった。Eraタンパク質と機能的な相互作用を持つ因子を同定することを目的として、era高温感受性変異のサプレッサー変異を分離同定し、その解析を行なった。

#### (1) spontaneous なera遺伝子外変異によるサプレッサー変異(ersA)

##### 1. ersA変異の分離とマッピング

era高温感受性変異株から高温耐性株を独立に40株分離し、P1ファージによるマッピングからera遺伝子外変異によるサプレッサー変異と考えられる株を複数株分離した。それらの内に、A13::ΔTn10と約30%のリンケージをもつサプレッサー変異が二株存在した。これら2株についてglyA::Tn5とA13::ΔTn10をマーカーとして用い、三点マッピングを行なった。供給菌としてIT32(W3110 era770 era13)を、受容菌としてDC569(glyA::Tn5)を用いP1マッピングを行なった。図21に示すようにサプレッサー変異は、二株ともera-glyA-supの順で存在していた。ここで、このサプレッサー変異をersA1,2(era suppressor A)と命名した。

図21 ersA変異株のP1マッピング



選択マーカーとしては、A13::Tn10のテトラサイクリン耐性とglyA::Tn5のカナマイシン耐性を用いた。耐性株を精製し、各マーカーとのリンケージを求めた。

表7 再構成30S/50Sサブユニットの試験管内翻訳反応活性と忠実度

株	<sup>3</sup> H]Phe放射活性(cpm)			<sup>3</sup> H]Leu放射活性(cpm)							
	50S	30S	+polyU	-polyU	(+polyU) -(-polyU)	era変異株/ 野生株(1)	+polyU	-polyU	(+polyU) -(-polyU)	era変異株/ 野生株(2)	(2)/(1)
C	C	C	10354	900	9454	1.00	12635	650	11985	1.00	1
C	M	C	8293	780	7513	0.79	10284	520	9764	0.81	1.02
M	C	C	8298	800	7498	0.79	12336	692	11644	0.97	1.22
M	M	M	5643	570	5073	0.53	8271	382	7889	0.66	1.24

30Sリボソーム6 μgと50Sリボソームを10 μgを混合し、ポリU-RNAを鋳型として試験管内翻訳反応を行なった。Mg濃度は、8 mMの条件で行なった。(C; W3110由来のリボソーム, M; IT32由来のリボソーム)

このサプレッサー変異の近傍には、これまで*secY*遺伝子内変異による高温感受性変異株のサプレッサー変異として同定された*ssyA*遺伝子がマップされていた(81)。この遺伝子は、*rpoH*遺伝子内変異による高温感受性変異株のサプレッサー変異として同定された*suhB*遺伝子と同一の遺伝子であることが明らかになっている(96)。*ersA*サプレッサー変異がこの*suhB/ssyA*遺伝子内変異である可能性を考え、野生型*suhB/ssyA*遺伝子のみを保持するプラスミドpRY61を京大ウイルス研由良研究室より分与していただき、サプレッサー変異株(IT286, IT288)に導入した(96)。その結果、IT286, IT288株共にサプレッサー活性が相補された(表8)。従って、*ersA*遺伝子は*suhB/ssyA*遺伝子と同一の遺伝子内変異であると考えられた。

表8 サプレッサー変異の相補性試験

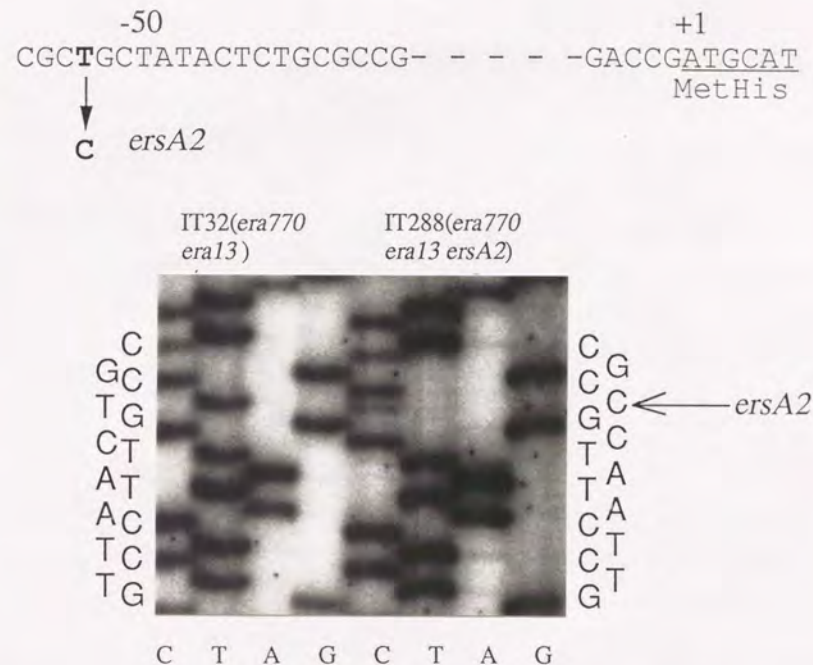
変異株	42°Cにおける生育	
	pBR322	pRY61
IT32( <i>era770 era13</i> )	-	-
IT288( <i>era770 era13 ersA2</i> )	+	-

アンピシリン耐性をマーカーとして各変異株にプラスミドを導入し、42°Cにおける生育をコロニー形成能により検討した。

## 2. *ersA2*変異の同定と、変異株内の*suhB/ssyA*遺伝子の発現

サプレッサー変異(*ersA*)内の*suhB/ssyA*遺伝子断片をPCRを用いてクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、*ersA2*変異株内には、*suhB/ssyA*遺伝子のプロモーター領域と予想される開始コドンから52塩基上流のTからCへの置換が存在していた(図22)。この変異は野生型*suhB/ssyA*遺伝子に対して劣性であるため、プロモーターの活性が低下したことにより*era*高温感受性変異を抑制しているものと予想される。

図22 *suhB*遺伝子プロモーター領域内の*ersA2*変異



IT288(*era770 era13 ersA2 A13::Tn10*)株より、PCR反応により*suhB*遺伝子領域をクローニングし、塩基配列を決定した。

## (2) トランスポゾン挿入変異によるサプレッサー変異の分離(*ersB, C*)

### 1. *ersB, C*の分離とクローニング、マッピング

*Era*タンパク質の機能に対して抑制的に作用する遺伝子産物が存在すると仮定した場合、その遺伝子を破壊することにより*era*遺伝子内変異による高温感受性が抑制されると考えられる。この可能性を検討する目的で、カナマイシン耐性遺伝子を無作為的に染色体上に挿入させ、*era*高温感受性変異株から高温耐性株

を分離した。λファージ (λ1105) をIT32(W3110 *rnc70 era770 era13*)株に感染させ(90)、カナマイシン耐性で高温耐性の株を複数分離した。独立に分離された約40株のカナマイシン耐性高温耐性株からP1ファージを調製し、IT32(W3110 *era770 era13*)株に形質導入した。カナマイシン耐性とサブレッサー活性が、100%リンクする株として二株を同定し、*ersB*, *C*と命名した。

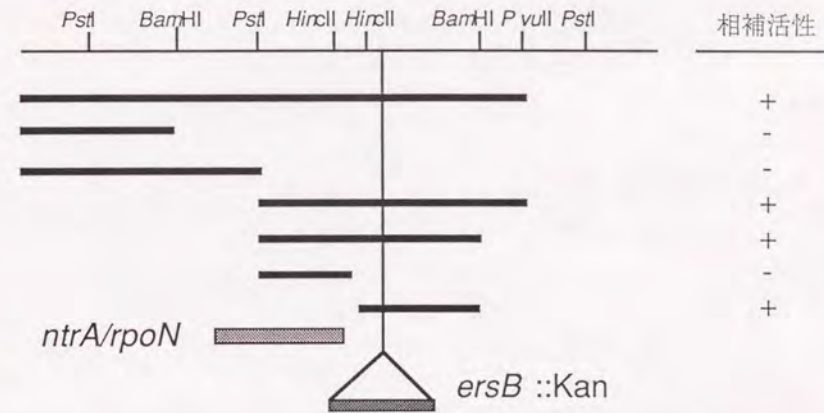
次に、これらのサブレッサー変異株に存在するカナマイシン耐性遺伝子の染色体上の位置を決定するため、カナマイシン耐性のDNA断片を、Muファージを用いた” in vivo クローニング”によりプラスミドにクローニングした(17,32,34)。*ersB*, *C*変異株(IT556, 558)にMu *cts*ファージを感染させ、温度感受性になった感染株を分離する。その株にpIT134(Mu ABC Cm<sup>r</sup>)を低温で形質転換させ、高温処理によりこの株からMuファージを誘発した。得られたMuファージをMu *cts* 溶原菌に低温で感染させ、Cm<sup>r</sup>Kan<sup>r</sup>の株を選択することにより、カナマイシン耐性遺伝子を含む染色体DNA断片を持つプラスミドを得た(pIT135, 136)。これらのDNA断片をプローブとして、Kohara library のλファージDNAが固定されたフィルターに対してサザンハイブリダイゼーションを行なった。*ersB*については、pIT140 由来の2kb *Bam*HI-*Bam*HI断片をプローブとした場合、70分近傍を保持するλ523、λ522のクローンに反応した。*ersC*については、pIT136由来の*Pst*I-*Pst*I断片をプローブとして場合、28.3分近傍を保持するλ256、λ257のクローンに対して反応した。

70分近傍を保持するλ523のクローンには*rpoN*遺伝子がマップされており(5,78)、*ersB*変異が*rpoN*遺伝子内変異である可能性を考え、野生型*ersB*遺伝子のクローニングと挿入部位の決定を行なった。

## 2. 野生型*ersB*遺伝子のクローニングと挿入部位の決定

*ersB*変異により破壊される遺伝子を同定するため、野生型*ersB*遺伝子をλ523のクローンよりプラスミドへサブクローニングを行なった。λ523から、野生型*rpoN*遺伝子を含む6kbの*Eco*RI-*Pvu*II断片をpUC119へクローニングし、これが*ersB*変異のサブレッサー活性を相補することを確認後、さらに細断片化した。その結果、野生型*rpoN*遺伝子の下流2kbの*Hinc*II-*Bam*HI断片に、相補活性があることが明らかとなった(図23)。

図23 *ersB*野生型遺伝子近傍のDNAを保持するプラスミドによる相補性試験



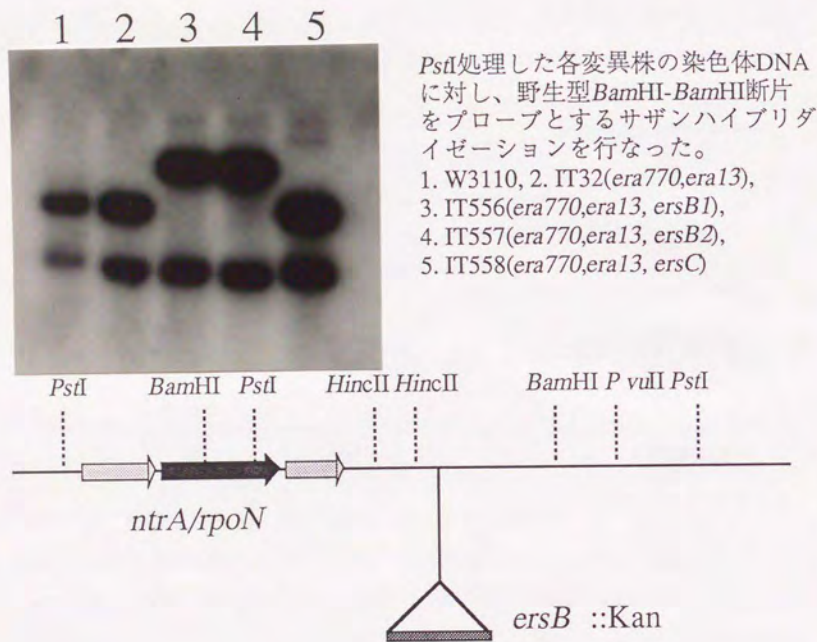
相補試験は、IT556(*era770era13ersB*)に各プラスミドを導入し、高温でのコロニー形成能を検討した。*ersB*のカナマイシン耐性遺伝子の挿入位置は、MuファージによりクローニングされたpIT135内の位置により決定した。

この*Hinc*II部位は野生型*rpoN*遺伝子の下流に存在し、カナマイシン耐性遺伝子が仮想的*rpoN*オペロンターミネーターの下流に挿入されていることから、*ersB*変異は*rpoN*オペロンとは異なる遺伝子内変異であると考えられる(78)。

また、染色体DNA上のこの領域にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されていることを確認する為、サザンハイブリダイゼーションを行なった。野生型(W3110)、*era*高温感受性変異株(IT32)、*ersB*変異株(IT556, 557)、*ersC*変異株(IT558)から調製した染色体DNAを、*Pst*Iで処理した後に電気泳動し、Hybond-N+にトランスファーした。*rpoN*遺伝子の一部分を含む2kb *Bam*HI-*Bam*HI断片をプローブとするサザンハイブリダイゼーションの結果を、図24に示す。*ersB*変異株(IT556, 557)のみが、野生型*rpoN*遺伝子の下流の*Pst*I-*Pst*I断片が長くなっていた。この結果は、Muファージを用いた” in vivo クローニング”により得られた、*ersB*, *C*変異株カナマイシン耐性遺伝子を含む染色体DNA断片を持つプラスミド

(pIT135)の制限酵素地図の結果とも一致しており、この領域にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されていると考えられる。

図 2 4 *ersB*変異株染色体上のトランスポゾン 挿入位置

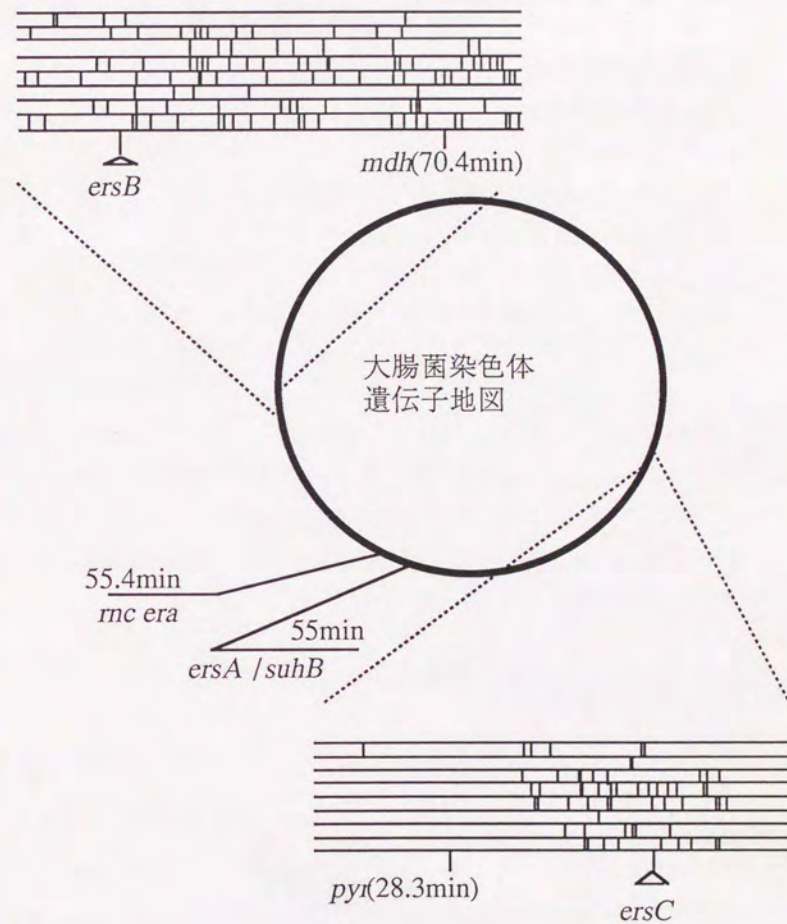


以上の様に、*era*高温感受性変異のサプレッサー変異を分離同定し、その解析を行なった結果を図 2 5 に示す。*era*遺伝子外の点変異によるサプレッサー変異として、翻訳延長反応に関与すると考えられる *suhB/ssyA* 遺伝子内変異が分離された(*ersA*)。変異は仮想的なプロモーター領域内に存在した。また、トランスポゾン挿入変異によるサプレッサー変異として2株が分離され(*ersB, C*)、70分近傍(*ersB*)と28.3分(*ersC*)近傍にマップされた。*ersB*変異については、野生型遺伝子のクローニングと挿入変異部位を決定した結果、*rpoN*遺伝子下流に存在する遺

伝子内変異であることが明らかとなった。

図 2 5 *era*変異のサプレッサー変異の分離とマッピング

- 1) 点変異によるサプレッサー *ersA(suhB)*
- 2) トランスポゾン挿入変異によるサプレッサー *ersB, C*



#### 第4節 *suhB/ssyA* 遺伝子の分子遺伝学的解析

前節で述べた様に、*era* 高温感受性変異のサブレッサー変異として *suhB/ssyA* 遺伝子プロモーター内変異が分離された。従って、*suhB/ssyA* 遺伝子の機能に関する知見を得ることは、*era* 遺伝子の機能解析にも有用であると考えた。本節では、1) *ssyA3* 変異においてみられた低温における翻訳延長反応の欠損が、*suhB2* 変異を含めた他の変異においても同様にみられるか、2) *suhB/ssyA* 遺伝子の欠損が *rnc, era* 遺伝子の変異によって回復する可能性はあるか、を確認することを目的として遺伝学的解析を行なった。

##### (1) *era, suhB/ssyA* 低温感受性変異株の分離と解析

###### 1. *era, suhB/ssyA* 低温感受性変異株の分離

*purL* 遺伝子近傍に存在する A17:: $\Delta$ Tn10 をマーカーとして用い、第1章で述べたと同様に P1 ファージを用いた localized mutagenesis によりこの近傍の遺伝子内変異による低温感受性変異株を分離した。HT31 から調製した P1 ファージを変異原処理し PA3306 (*nadB purL*) を受容菌として形質転換を行なった。高温 (37°C) でテトラサイクリン耐性として選択した後レプリカし、低温感受性の株を 23°C で選択した。得られた変異株に対し相補性試験を行なった結果、*era* 遺伝子内変異による低温感受性変異株として 3 株、*suhB/ssyA* 遺伝子内変異による低温感受性変異株として 1 株が分離された (表 9)。

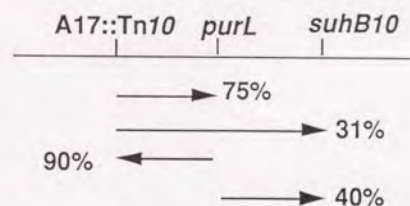
表 9 *era* 遺伝子近傍の低温感受性変異株の相補性試験

group	pCSBX	pRY61	
<i>era</i>	+	-	<i>era8,11,14</i>
<i>suhB</i>	-	+	<i>suhB10</i>

A17::Tn10 のテトラサイクリン耐性をマーカーとした localized mutagenesis により得られた 14 株の低温感受性変異株にたいして相補性試験を行なった。L プレート上で 23°C と 37°C においてコロニー形成能を検討した。

*suhB/ssyA* 遺伝子内変異について P1 ファージによるマッピングを行なった。各変異株を供給菌とし W3110 を受容菌とした結果、図 2.6 に示されるように、遺伝学的位置も *suhB/ssyA* 遺伝子と一致した (81,96)。

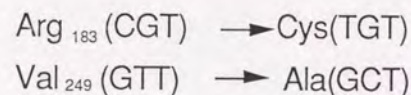
図 2.6 *suhB* 変異の P1 マッピング



A17::Tn10 をマーカーとする実験は、IT546 (W3110 *suhB10 purL*) を供給菌 W3110 を受容菌とし、*purL* をマーカーとする実験は、C600 を供給菌とし IT546 を受容菌とした。*purL* はニコチン酸要求性により検討した。

*suhB/ssyA* 低温感受性変異株 (*suhB10*) について、変異の同定を行なった。PCR 反応により変異株から、*suhB/ssyA* 遺伝子領域をクローニングし塩基配列を決定した。独立に得た 2 つのクローンの塩基配列を決定した結果、Arg<sub>183</sub>→Cys と Val<sub>249</sub>→Ala の二重変異が同定された (図 2.7)。

図 2.7 *suhB* 変異株内の二重変異



PCR による独立な 2 クローンについて塩基配列を決定した。

###### 2. *suhB10* 変異株における翻訳延長反応の遅延

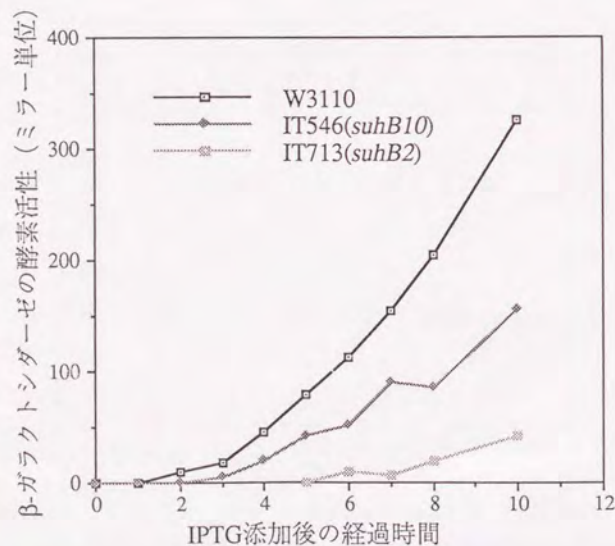
*secY* 遺伝子内変異による高温感受性変異株のサブレッサー変異として同定された低温感受性 *ssyA3* 変異は、低温における翻訳延長反応に欠損がみられる (81)。この欠損が、*suhB/ssyA* 低温感受性変異株に一般的にみられる可能性を確認する

目的で、*suhB10*変異について翻訳延長反応における欠損を以下の方法により検討した。

1.  $\beta$ -ガラクトシダーゼのIPTGによる合成誘導後、酵素活性の出現までに必要な時間を測定する。
2. 低温における $[^{35}\text{S}]$ -メチオニンによるパルスラベル後SDS/PAGEを行なう。

その結果、1. の実験からは25°Cにおける翻訳延長反応は、野生型の約2倍程度に遅くなっていること(図28)、2. の実験からは25°Cにおいて高分子量のタンパク質合成が遅れることが明らかとなった(図29、レーン2)。また、高分子量のタンパク質合成の指標としてRNAポリメラーゼ $\beta\beta'$ サブユニットの合成を比較した場合、野生型の30%程度であった(表10)。

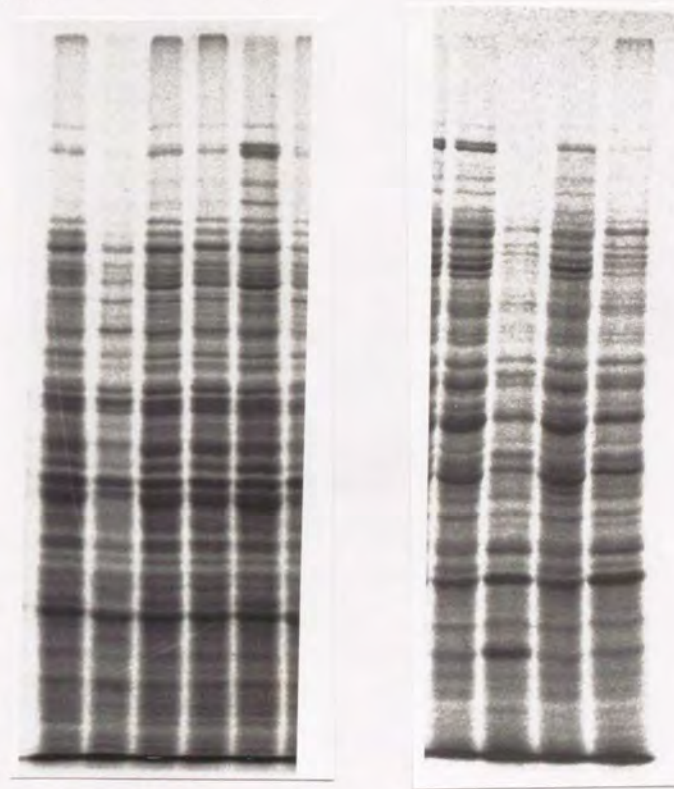
図28  $\beta$ -ガラクトシダーゼ合成誘導による*suhB*変異株の翻訳延長速度の測定



各変異株を、Qプロスで42°Cにおいて培養し25°Cに遷移し、2時間後にIPTGを添加した。各時間に、氷水中のクロラムフェニコール溶液と混合して翻訳反応を停止させ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定した。

図29  $[^{35}\text{S}]$ メチオニンのパルスラベルによる、翻訳延長速度の測定

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>suhB</i>	+	B10	B10	B10	B10	+	B2	B2	B2
<i>sscA</i>	+	+	A7	A10	+	+	+	A7	A10
pRY61	-	-	-	-	+	-	-	-	-



各変異株を高温でMEプロスで培養した後、25°Cに遷移し2時間培養する。 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで2分間標識し、TCA沈殿を形成したタンパク質をSDS/PAGEにより分離した。

1. W3110, 2. IT546 (*suhB10*), 3. IT706 (*suhB10 sscA7*), 4. IT707 (*suhB10 sscA10*), 5. IT546/pRY61 (野生型*suhB*遺伝子を保持するプラスミド), 6. W3110, 7. IT713 (*suhB2*), 8. IT711 (*suhB2 sscA7*), 9. IT712 (*suhB2*)





ていずれの系においても *suhB10* 変異株より顕著な欠損を示していた。*suhB2* 変異株は 40°C 以下の温度で生育不可能であるのに対し、*suhB10* 変異株は 30°C までの温度で生育可能である。従って、プレート上の生育における欠損の程度と、翻訳延長反応における欠損の程度が一致しており、翻訳延長反応における *suhB/ssyA* 遺伝子の機能が菌の生育に必須であることを支持すると考える。

### 3. *suhB2* 変異株における *suhB* 遺伝子の発現

*suhB2* 変異株において、IS10 様トランスポゾンが *suhB/ssyA* 遺伝子の仮想的プロモーター領域(-10領域)に存在していた。従って、*suhB/ssyA* 遺伝子の転写産物が増えていることが予想された。これを確認する目的で、Northern ハイブリダイゼーションを行なった。その結果、1) *suhB/ssyA* 遺伝子の転写産物は約 1.2 kb の長さであることから、モノシストロニックな遺伝子であることと、2) KY1451(MC4100, *suhB2*) における *suhB/ssyA* 遺伝子の転写産物は、野生株(MC4100)より数百 bp 大きくなっていること、が明らかになった。KY1451 においては、野生型と同一長の転写産物が認められない為、*suhB2* 変異の挿入部位がプロモーター領域であることを支持するものと思われる。

### (3) *suhB10* 低温感受性変異株の *rnc* 遺伝子内サプレッサー変異

#### 1. *rnc* 遺伝子内サプレッサー変異の分離と同定

*era* 遺伝子内変異による高温感受性変異株が、*suhB/ssyA* 遺伝子内の変異によりサプレスされることから、*suhB/ssyA* 遺伝子と *rnc, era* 遺伝子間の遺伝学的な相互作用を検証する目的で、*suhB10* 低温感受性変異株のサプレッサー変異の内、*rnc, era* 遺伝子にマップされる株を検索した。*suhB10* 低温感受性変異株から低温耐性株を独立に 20 株を分離した後、野生型の *rnc, era* 遺伝子を持つ  $\lambda$  ファージ ( $\lambda$ IT35,  $\lambda$ IT36) を感染させ溶原菌をアンピシリン耐性により選択した。それらについて低温感受性を検討した結果、*rnc* 遺伝子内変異によるサプレッサーとして 2 株が分離された。これらの変異を *sscA7, 10* (*suppressor of suhB/ssyA cold sensitive mutant A*) とした (表 1 1)。

次に、DC569 (W3110 *nadB::Tn5*) 株を供給菌として P1 マッピングを行なった

結果、サプレッサー変異は *nadB-sup-purL-A17::Tn10-suhB10* の順で存在した。また、PCR 反応により変異株から *rnc* 遺伝子領域をクローニングし塩基配列を決定した結果、*sscA7* は *rnc* 遺伝子内の Asp<sub>155</sub> → Glu, *sscA10* は Gln<sub>153</sub> → Pro の変異であった (図 3 1)。

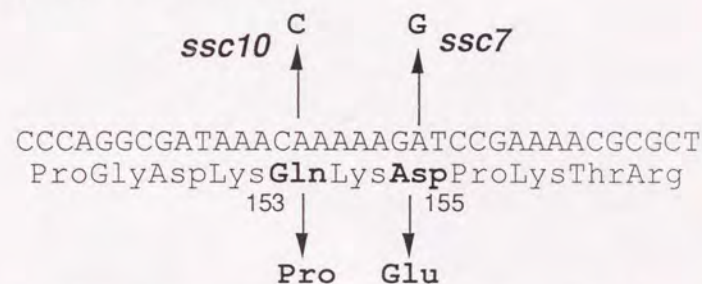
表 1 1 *suhB10* 変異株の *rnc* 遺伝子内サプレッサー変異 (*sscA7, 10*) の分離と相補性試験

group	pS1	pCSB	$\lambda$ IT35	$\lambda$ IT36	
<i>sscA</i>	+	+	-	+	<i>sscA7, 10</i>

IT546 (W3110 *suhB10*) より独立に低温抵抗性株を 20 株分離し、 $\lambda$ IT35, 36 の溶原菌を分離し相補活性を検討した。2 株が、 $\lambda$ IT36 により相補された。さらに pS1、pACS3 のプラスミドによっても、これらの株は相補された。

図 3 1 *rnc* 遺伝子内の *sscA7, 10* 変異の同定

### RNaseIII アミノ酸配列



PCR により、IT706 (*sscA7 suhB10*), IT707 (*sscA10 suhB10*) 株の *rnc* 遺伝子領域をクローニングした。独立の 2 クローンについて塩基配列を決定した。

### 2. サプレッサー変異の翻訳延長反応への寄与

*suhB10*変異の翻訳延長反応における欠損が、*sscA7,10*変異によりサプレッスされる可能性を検討した。*suhB10*変異と、*sscA7,10*変異それぞれとの二重変異株において、高分子量のタンパク質合成の指標としてRNAポリメラーゼβ'サブユニットの合成を比較した。その結果、*sscA7*変異はほぼ野生型と同程度にまで回復し、また*sscA10*変異も*sscA7*変異より弱い、ある程度のサプレッサー活性を示した。以上の結果から、*suhB10*変異における翻訳延長反応における欠損が*sscA7,10*変異によりサプレッスされていることが明らかとなった。(図29 レーン3,4、表10)

3. *sscA7,10*変異の*suhB2*低温感受性変異株に対するサプレッサー活性  
*suhB10*低温感受性変異株のサプレッサー変異として分離された*sscA7,10*変異が、*suhB2*変異サプレッスする可能性を検討した。その結果、*sscA7*はサプレッスするが、*sscA10*はサプレッス出来ないことが明らかとなった(表12)。

表12 *sscA7,10*の*suhB2*に対するサプレッサー活性

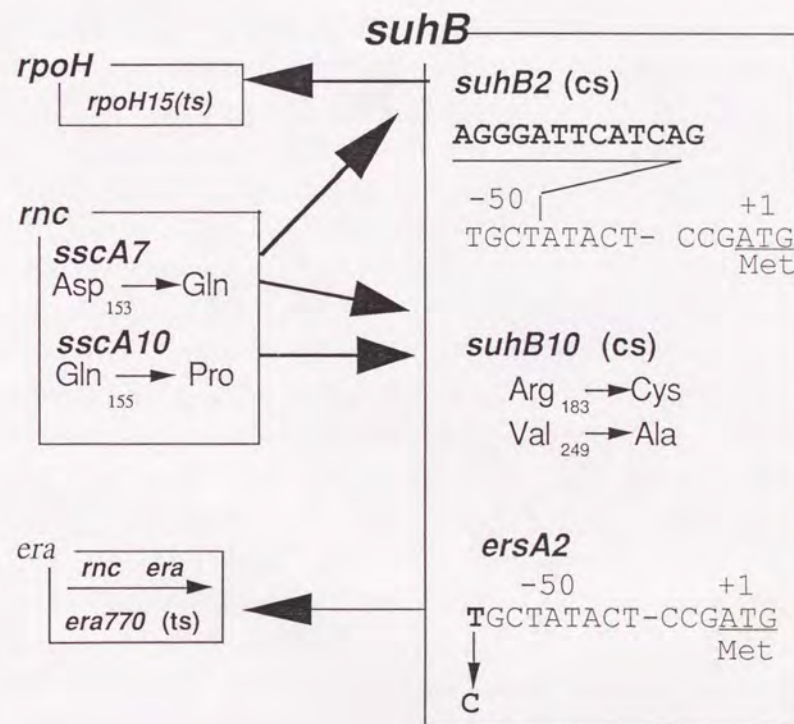
<i>ssc</i>	<i>suhB</i>	20 °C	30 °C	37 °C	42 °C
	<i>suhB2</i>	-	-	-	+
<i>sscA7</i>	<i>suhB2</i>	-	+	+	+
<i>sscA10</i>	<i>suhB2</i>	-	-	-	+

IT713 (W3110 *suhB2*)を受容菌とし、IT708 (*nadB::Tn5 A17::Tn10 purL sscA7 suhB10*) IT709 (*nadB::Tn5 A17::Tn10 purL sscA10 suhB10*)株を供給株としカナマイシン耐性をマーカーとして形質導入を行なった。テトラサイクリン耐性株株について、*purL*のマーカーを保持する株について低温感受性を検討した。

また、RNAポリメラーゼβ'サブユニットの単位時間あたりの合成を、二重変異株において検討した。その結果、*suhB2, sscA7*変異株においては野生型の約90%に回復するが、*suhB2, sscA10*二重変異株では*suhB2*変異単独と同様に、野生型の約10%程度の合成にとどまった(図29 レーン8、9)。

*suhB10*低温感受性変異株のサプレッサー活性の結果から*sscA7*がより強いサプレッサー活性を持つことから考え、サプレッサー活性の程度の異なる*rnc*遺伝子内変異が存在し、*suhB/ssyA*変異による翻訳延長反応における欠損の程度に応じてサプレッスすることが示されたと考える(図32)。このように*suhB/ssyA, rnc*遺伝子間に強い遺伝学的な関連が存在するため、機能的な相関性が存在することが考えられる。2つの遺伝子産物間に直接の相互作用が存在する可能性については、生化学的な解析により今後明らかにしたいと考える。

図32 *rnc, era*と*suhB*遺伝子間の遺伝学的関連



## 第四章 考察

era遺伝子は必須遺伝子である。共同研究者である米国NIH D.Court博士の研究室において、era遺伝子が必須遺伝子であることを検証する実験が行なわれた(84)。era遺伝子を保持するλファージを溶原化させ、染色体上のera遺伝子を薬剤耐性遺伝子の挿入により破壊した後に、このλファージの誘発を行ないλファージが欠落されうるかを検討するものである。この実験によりλファージが欠落されなかったことから、era遺伝子が必須遺伝子であると考えられる。本研究によりera遺伝子内変異による高温および低温感受性変異株が分離されたことは、era遺伝子が必須遺伝子であることを支持するものと考えられる。

eraはras相同遺伝子であるか rasサブファミリーにおいては、カルボキシ端近傍に存在するシステイン残基の修飾が機能に必須である(27,93)。era遺伝子産物にもカルボキシ端から四番目にシステイン残基が存在する(1)。Inouyeらはera遺伝子をrasサブファミリーの一員と考える根拠の一つとして、このシステイン残基の存在を挙げている(1)。しかし、era13欠失変異によりこのシステイン残基を欠失したHT30株において成育に欠損が見られない為、菌の成育に必須であるera遺伝子の機能にはこのシステイン残基が不必要であると考えられる。また、彼らは出芽酵母のRAS1との相同性を強調しているが、二つの遺伝子産物間の相同性はアミノ端側の197番目までであり、類縁のアミノ酸を含めた46%の相同性が有意な値であるかは疑問である。また、共同研究者である米国NIH D.Court博士の研究室において行なわれた比較によると、RAS1よりEF-Tuに高い相同性を示した。また、精製Eraタンパク質がp21タンパク質と比較して単独で高いGTPase活性を保持する事も、rasサブファミリーのタンパク質と大きく異なっている(18)。以上のことから、era遺伝子がrasサブファミリーに属しないと考える。

変異型Eraタンパク質のGTP結合能 era変異株の温度感受性には、era770点変異とera13欠失変異の両方が必須でありことが本研究により明らかにされた。era770変異を持つEraタンパク質は、野生型に比べGTP結合能に著しい欠損がみられた。しかし再構成実験から、era770変異のみでは温度感受性とならずera13

欠失変異を必要とする為、GTP結合能の欠損のみでは温度感受性に十分でないと考えられる。era13欠失変異を保持するHT30株は成育に欠損をもたないが、era13欠失変異を持つEraタンパク質は、過剰生産時の合成量がこの変異を持たないEraタンパク質に比べ減少している(図14)。これは合成量である可能性も考えられるが、era770変異を持つEraタンパク質との比較から、安定性における欠損である可能性が考えられる。過剰生産におけるタンパク質の安定性が、染色体上の遺伝子から発現するEraタンパク質と同様であるかを確認する必要があるが、era770変異によるGTP結合能の欠損とera13欠失変異における安定性の低下の両方の欠損により、温度感受性を示すことが考えられる。

Eraタンパク質には、3つのCys残基が含まれるがera13欠失変異が菌の生育に影響を持たない為、第3番目のCys残基はEraタンパク質の生物学的活性に必須ではないと考えられる。era770変異によりGTP結合能に欠損が引き起こされる原因として、1) era770変異により分子内S-S結合に関与していたCys<sup>8</sup>が置換されたため、分子内S-S結合が形成されず構造が不安定化し、活性に欠損が生じた 2) Cys<sup>8</sup>はドメインIの近傍にあり、GTP結合に直接関与するため活性に欠損が生じた、等が考えられる。1)の可能性については、可溶性精製Eraタンパク質内のCys残基の定量を行なうことにより確認できると考える。また2)の可能性についてはX線結晶解析が最も直接的な解析方法であるが、可溶性精製Eraタンパク質とGTP間の化学修飾等の実験によっても確認できると考えられる。

EF-Tuには、三つのシステイン残基が存在し、Cys<sup>81</sup>はアミノアシル-tRNAとの、Cys<sup>137</sup>はグアニンヌクレオチドとの相互作用に必須であることが知られている。Eraタンパク質のCys<sup>8</sup>は一次配列上と高次構造上も(20)これらのシステイン残基の位置とは異なるが、いずれかの活性を持つ可能性を確認する可能性があると考えられる。

野生型Eraタンパク質は、可溶性分画として精製でき、GTPとも等モル比で結合することを確認した。また、共同研究者である米国NIH D.Court博士の研究室においても各ヌクレオチドとの結合が検討され、グアニン特異的結合が可溶性の野生型Eraタンパク質において確認されている(18)。しかし、変異型Eraタンパク質においては、野生型よりさらに不安定で沈殿を容易に形成する為、可溶性分画として精製できなかった。従って、変異型Eraタンパク質のGTP結合能における

欠損は、結果の部分で述べた様に簡便な精製法により得られたEraタンパク質において比較を行なった。この系においては、野生型においても結合の比率はEra1分子あたりGTP0.03分子であり、活性は高いとはいえない。しかし、タンパク質の量とフィルター上に捕獲されるGTP量は比例し、変異型においては顕著な低下が認められる。従って、定性的ではあるが、変異型Eraタンパク質のGTP結合能における欠損を示唆したと考える。

本研究においては、Eraタンパク質の過剰生産系として高温処理を必要とする系を用いたが、tacプロモーターにより低温で過剰生産を行なわせる系も構築した。IPTGにより32℃において過剰生産を行なわせた場合にもEraタンパク質は不安定で沈殿を容易に形成し、変異型Eraタンパク質は可溶性画分として精製できなかった。高温処理により得られた高温感受性変異型Eraタンパク質の活性を野生型と比較することは不適当である可能性が考えられる為、低温で過剰生産を行なわせた変異型Eraタンパク質を可溶性の画分として精製し、GTP結合活性の温度依存性等の比較を定量的に行なう必要があると思われる。

rnc, era遺伝子の発現 本研究の過程において、1)  $p_L$ プロモーターの支配下にera遺伝子を含むBstXI-NruI断片を挿入したがEraタンパク質の生産が見られなかったことと(18)、2) era遺伝子を含むBstXI-KpnI断片を保持するプラスミドがera変異株の温度感受性を相補しない(結果未掲載)ことから、era遺伝子の翻訳にはrnc遺伝子の翻訳が必要であると考えられる。また、rnc遺伝子の終止コドンとera遺伝子の開始コドンはTGATGの塩基配列で重複する(1)こともこの可能性を支持するものと思われる。大腸菌において、共役して翻訳される遺伝子産物群が、複合体を形成し機能する例が知られており、EraとRNaseIIIタンパク質が協同して機能を果たす可能性が考えられる。rnc遺伝子とera遺伝子の翻訳が共役する可能性を確認する為に以下の実験が考えられる。1) rnc遺伝子内にナンセンス変異を導入したpACS3プラスミドが、era温度感受性変異株に対する相補活性を保持するかを確認する。2) era遺伝子を含むBstXI-KpnI断片をtacプロモーターの下流に挿入し、IPTGによるEraタンパク質の合成を試験管内反応系において検討する。

era変異株におけるリボソームアセンブリーの欠損 本研究で分離されたera高温感受性変異株においては、30Sリボソームの沈降係数に変化はみられないが、その存在量が減少していた。この欠損が、合成と安定性を含めた、いずれの段階であるかは明らかではないが、50Sリボソームの沈降係数とその存在量に全く欠損がみられないため、rRNAの合成の段階の欠損ではないことが予想される。また、era変異株リボソームの試験管内翻訳活性とその忠実度が低下していることから、リボソームの核酸とタンパク質の構成状態が変化していることが予想される。これらを確認する為に必要な実験としては、1) [<sup>3</sup>H]-ウリジンによるパルス後にチェースを1-3時間行ない、リボソームの安定性を検討する、2) 変異株内の30S, 50Sリボソーム内のrRNAの分子量とリボソームタンパク質の組成を確認する、3) 試験管内での再構成系に、精製したEraタンパク質を加え、再構成に必要な塩濃度と温度を検討する、等が挙げられる。特に3)は、Eraタンパク質が直接この系に関与することを確認する重要な実験であるが、本研究においては試験管内での再構成系の構築に成功できず、Eraタンパク質の関与を確認できなかった。今後は1) 2) の実験を含め、era高温感受性変異株内の欠損とEraタンパク質の試験管内での再構成系における活性について、より詳細な解析を進めていきたいと考える。

Eraの30Sリボソームアセンブリーにおける機能 これまでの考察をふまえ、30SリボソームアセンブリーにおけるEraタンパク質の機能を推察したい。まず、試験管内再構成系から、30Sリボソームの中間体のコンフォメーション変化に必要な因子の存在が予想される為、この因子がEraタンパク質である可能性が考えられる。EraはRNaseIIIと複合体を形成し、RNaseIIIによりrRNAの二重鎖領域が認識され、複合体が30Sリボソームの中間体を認識する。その後、Era単独か、または二重鎖rRNAに結合したRNaseIIIとEraタンパク質が協同して、30Sリボソームの中間体のコンフォメーション変化を引き起こすことが考えられる。Eraタンパク質は、単独で高いGTPase活性をしめす。従って、EraとRNaseIIIの複合体が30Sリボソーム中間体に結合した段階でGTP結合型に変換され、GTP結合型Eraが30Sリボソームの中間体のコンフォメーション変化を引き起こし、GTPが加水分解された段階でEraとRNaseIIIの複合体がリボソームから解離するモデルが考え

られる。

EraとRNaseIIIの複合体と相互作用する30Sリボソームの中間体内のタンパク質としては、S12とS5タンパク質が考えられる。その理由としては以下のことが挙げられる。1) S12の高温感受性変異株が*rnc*遺伝子内変異によりサプレスされる。2) 試験管内再構成系において、S12とS5タンパク質は最後に30Sリボソーム中間体に結合する(図33)。3) *era*変異株リボソームの試験管内翻訳活性とその忠実度が低下しているが、30SリボソームにおいてS12とS5タンパク質はEF-Tu, EF-Gと相互作用し、翻訳の忠実度に関与している。以上のモデルを図34に示す。

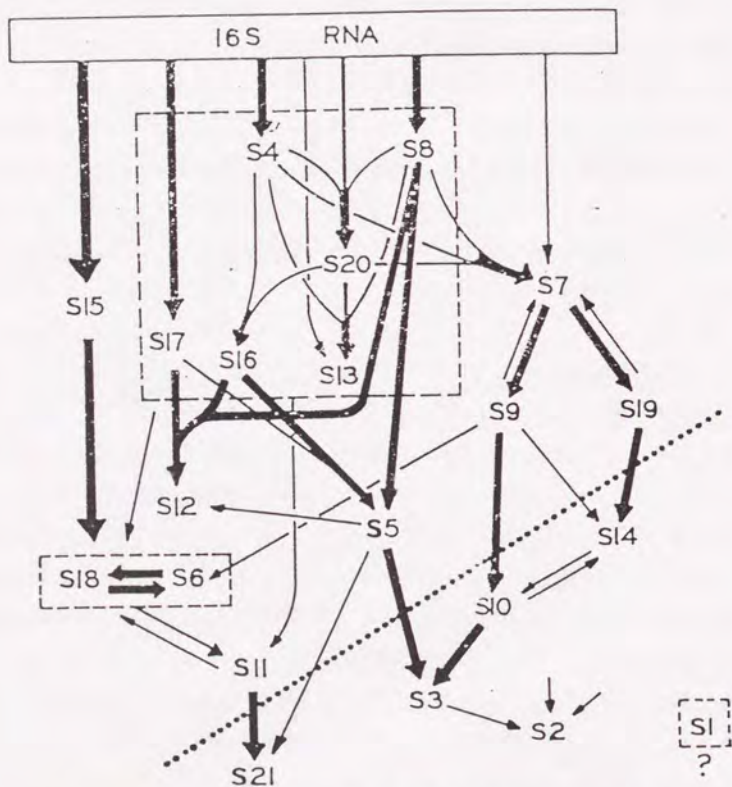


図33 30Sリボソームの試験管内再構成(文献(88)より抜粋)

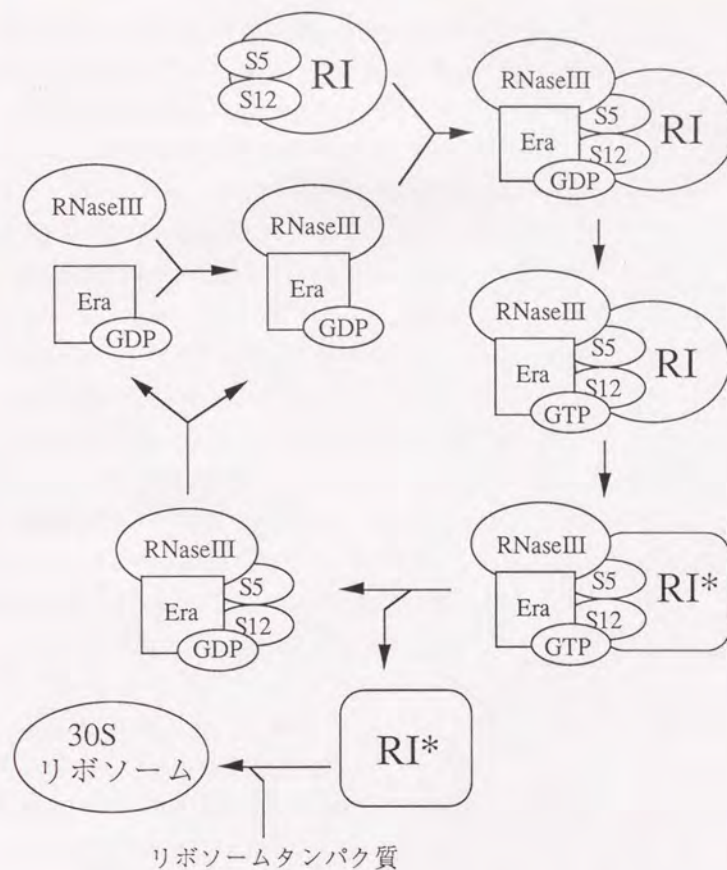


図34 リボソームアセンブリーにおけるEraの機能モデル  
(RI: 30Sリボソーム中間体、RI\*:構造変化後の30Sリボソーム中間体)

*era*変異の*ersB, C*サプレッサー変異 一般的にある変異が他の変異によりサプレスされる様式としては以下の様な可能性が挙げられる。1) 直接的相互作用; 特定因子の活性の低下または上昇が、それと相互作用を持つ因子の変異によりサプレスされる場合。2) 発現制御; 特定因子の活性の低下または上昇が、その発現を制御する他の因子の変異による発現の変化によりサプレスされる場合。

3) バイパス経路; 特定因子の活性のバイパスが存在し、そのバイパス経路に関与する因子の変異によりサプレッサーされる場合。 4) 間接的効果; ある因子の変異による生体内の変化が間接的に特定の因子の欠損をサプレッサーされる場合。

*era*遺伝子の様な機能が同定されていない因子を遺伝学的に解析する為、その遺伝子の変異株からサプレッサーを分離する手法が多く用いられる。このような場合、同定されたサプレッサー変異が、機能解析が進んでいる遺伝子である場合には、上記の可能性について検討することが可能になるが、未同定の遺伝子である場合にはこの解析は困難となる場合が多い。本研究においては、*ersB, C*遺伝子は未同定の遺伝子であり、検討可能な実験としては、1) これらの遺伝子産物とEraタンパク質との結合実験、2) サプレッサー変異と*era*変異の二重変異株におけるリボソーム合成、3) *ersB, C*変異による*era*遺伝子発現の変化、等が挙げられる。

*ersB, C*変異により破壊される遺伝子産物が、Eraタンパク質と直接相互作用すると仮定した場合、以下の様なモデルが考えられる。Eraタンパク質のGTPase活性はGタンパク質と同様の性質を持つ為、Gタンパク質と同様の作用機作が考えられる。従って、*ersB, C*遺伝子産物がEraの機能に対して抑制的に働くと考えた場合、これらがGDP結合型のEraタンパク質に結合する $\beta, \gamma$ サブユニットであると仮定できる。図34に示したモデルと考え合わせると図35の様なモデルが考えられる。

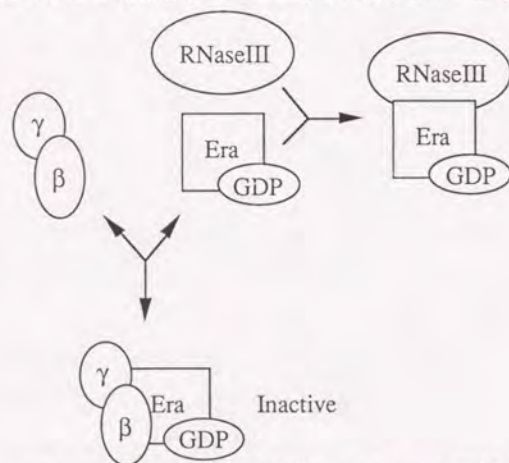


図35 *ersB, C*遺伝子産物によるEraの不活化モデル  
( $\beta, \gamma$ は、*ersB, C*遺伝子産物のいずれかに対応する)

*suhB/ssyA*遺伝子産物の機能 *ssyA*変異株において翻訳延長反応の欠損が見いだされていたが(81)、本研究により*rpoH*高温感受性変異のサプレッサー変異として分離され低温感受性である*suhB2*変異と、独立に低温感受性変異株として分離された*suhB10*変異のいずれの場合においても低温において翻訳延長反応の欠損が見いだされた。また、*rnc*遺伝子内変異により*suhB10*変異の低温感受性と翻訳延長反応のいずれかがサプレッサーされ、*suhB2*変異にたいしては変異座特異性を示した。このように、1) 3つの独立な変異座において翻訳延長反応の欠損がみられ、この欠損の程度と菌の生育が比例すること、2) この欠損に対しサプレッサー活性の異なる変異が存在することから、*suhB/ssyA*遺伝子産物が翻訳延長反応のいずれか段階に関与する一般的な必須因子であると考えられる。

*rnc*遺伝子内変異により*suhB*変異の翻訳延長反応と菌の生育がサプレッサーされ、変異座特異性がみられる。このように、2つの遺伝子間に変異座特異性がみられる場合には、その遺伝子産物間に直接の相互作用が存在するか、類似の活性を保持する可能性が示唆される。これを確認する実験としては、1) 各*suhB*変異株から調製したS100分画による試験管内の翻訳反応の欠損が、変異型RNaseIIIにより相補される可能性を検討する、2) 精製SuhBタンパク質とRNaseIIIとの結合を検討する、3) SuhBタンパク質がRNaseIIIの基質を認識する可能性を検討する、等の実験が考えられる。

京大ウイルス研由良研究室の研究により、ヒートショックによる生体内の最初の応答である $\sigma^{32}$ の増加は、主に翻訳段階における制御であることが示唆されている。その制御に必要な領域は、*rpoH*遺伝子コーディング領域内の二重鎖RNAを形成する可能性がある領域であった。また、*rpoH*高温感受性変異の低温感受性サプレッサー変異として*suhB/ssyA*遺伝子内変異が同定され、この*suhB2*変異と*rpoH15*変異の二重変異株では、高温において翻訳段階での $\sigma^{32}$ の量の増加が見られた(96)。さらに、本研究により二重鎖を特異的に認識するRNaseIII構造遺伝子内変異により*suhB*変異の翻訳延長反応と菌の生育がサプレッサーされ、変異座特異性がみられる事が明らかとなった。以上から、低温においては*rpoH*遺伝子mRNAの二重鎖領域に*suhB/ssyA*遺伝子産物が結合し翻訳が阻害されるが、高温への温度遷移によりこの阻害が解除され合成誘導がおきるモデルが考えられる。*suhB/ssyA*遺伝子産物が、翻訳延長反応のいずれか段階に関与する一般的な必

須因子であり、二重鎖RNA結合活性を保持すると考えた場合、結合する二重鎖RNAの候補の一つとして4.5SRNAが考えられる。4.5SRNAは、大腸菌の成育に必須で、翻訳延長反応にかかわるとともに、SRPの構成要素としてシグナル配列を保持するタンパク質の細胞膜への輸送にも関与すると考えられている。従って、4.5SRNAは、翻訳延長反応においては*suhB/ssyA*遺伝子産物と複合体を形成して機能し、細胞内輸送においてはSRPの構成要素として機能する、というモデルが考えられる(図36)。

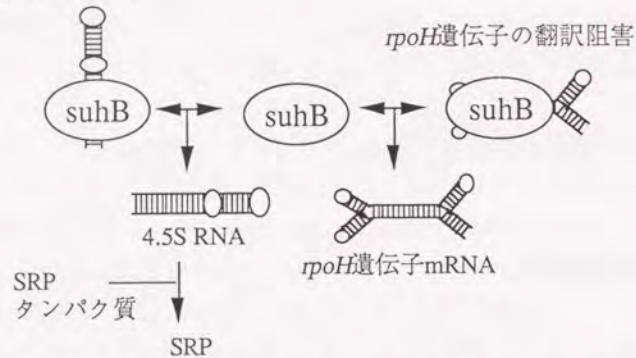


図36 *suhB*遺伝子産物による二重鎖RNA認識モデル

*dnaB, secY*変異の*suhB/ssyA*変異によるサプレッションの機構 表13に示す様に*era, rpoH, secY, dnaB*高温感受性変異株が、*suhB/ssyA*遺伝子内変異によりサプレッスされる。このサプレッションに共通の機構としては、シャペロンであるGroELSの発現増加が考えられる(33)。

1) *rpoH*遺伝子の場合：*suhB2*変異は、*rpoH15*変異の高温感受性をサプレッスするが、*suhB2, rpoH15*二重変異は40℃が限界温度であり、これ以上の温度では成育できない。これは、*rpoH*遺伝子欠失変異株が*groELS*遺伝子を保持するプラスミドの導入により、高温での成育が回復するが40℃が限界温度である(45)ことと一致している。また、*suhB2*変異、*rpoH15*二重変異では、40℃において $\sigma^{32}$ の量が増加し、ヒートショックタンパク質の合成誘導がみられる。従って、 $\sigma^{32}$ の量が増加しGroELSの発現が増加したことが*suhB2*変異によるサプレッションの原因と考えられる。42℃での成育をサプレッスできない理由としては、40℃以上の温

度においては、ヒートショックタンパク質の合成誘導以外の、 $\sigma^{32}$ 自身の持つ機能が菌の成育に必須であることが考えられる。

2) *secY*遺伝子の場合：*secY24*高温感受性変異のサプレッサーとして*ssyA3*変異が分離された。*secY24*変異は、*groELS*遺伝子を保持するプラスミドの導入により42℃において成育可能になる(33,89)。これは、*ssyA3, secY24*二重変異株が42℃で成育可能であることと一致している。

3) *dnaB*遺伝子の場合：*dnaB121*高温感受性変異は、*dnaB*遺伝子産物のカルボキシ端への挿入変異である。この部位はDnaBタンパク質が重合化するために必須であると考えられ、*dnaB121*変異株の表現型も活性自体の欠損でないことを示唆している。従って、この重合化の段階の欠損を、GroELSの発現増加によりサプレッスすることが考えられる。

以上の様に、*suhB/ssyA*遺伝子内変異により $\sigma^{32}$ の量が増加することによりGroELSの発現が増加し、各変異をサプレッスする可能性が考えられる。*era*高温感受性変異は、30Sリボソーム合成に欠損を持つため、この欠損がGroELSの発現増加によりサプレッスされる事が予想された。しかし、*groELS*遺伝子を保持するプラスミドの導入により、*era*高温感受性変異は、サプレッスされなかった。他のヒートショックタンパク質の発現増加によりサプレッスされる可能性か、または*suhB/ssyA*遺伝子産物が二重鎖RNA結合タンパク質であり、リボソームアセンブリーに阻害的に機能する可能性が考えられるが、今後の解析が必要である。

*suhB/ssyA*遺伝子と相同性を持つ遺伝子 *suhB/ssyA*遺伝子と相同性を持つ遺伝子として、アンモニアの膜透過に必須な遺伝子として発見された*amtA*遺伝子と、哺乳類のイノシトールモノホスフェート遺伝子が見いだされている。また、*amtA*遺伝子はシステイン合成系にかかわる*CysQ*遺伝子としても同定されている。本研究により独立に分離された*suhB10*変異株内の変異、Arg<sup>183</sup>→CysとVal<sup>269</sup>→Alaはいずれも*suhB/ssyA*遺伝子を含めた3つの遺伝子に共通に保存されている残基における変異であることは、翻訳延長反応の欠損がこれらの遺伝子産物に共通な活性の欠損によるものであることを予想させる。これらの遺伝子産物に共通な活性の有無については、今後の研究が必要であるが*suhB10*変異株がそれらの研究に貢献できることを期待したい。



<参考文献>

1. Ahnn, J., P. E. March, H. E. Takiff, and M. Inouye. 1986. A GTP-binding protein of *Escherichia coli* has homology to yeast RAS proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8849-8853.
2. Altuvia, S., H. L. Giladi, S. Koby, O. B. Nun, and B. Oppenheim. 1987. RNaseIII stimulates the translation of the cIII gene of bacteriophage  $\lambda$ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6511-6515.
3. Altuvia, S., D. Kornitzer, D. Teff, and B. Oppenheim. 1989. Alternative mRNA structures of the cIII gene of bacteriophage  $\lambda$  determine the rate of its translation initiation. J. Mol. Biol. 210:265-280.
4. Andersson, D., K. Bohman, L. Isaksson, and C. G. Kurland. 1982. Translation rates and misreading characteristics of *rpsD* mutants in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 187:467-472.
5. Bachmann, B. J. 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 7. Microbiol. Rev. 54:130-197.
6. Bardwell, J. C. A., P. Regnier, S.-M. Chen, Y. Nakamura, M. Grunberg-Manago, and D. L. Court. 1989. Autoregulation of RNaseIII operon by mRNA processing. EMBO J. 11:3401-3407.
7. Baughman Gail and Masayasu Nomura. 1983. Localization of the target site for translational regulation of the L11 operon and direct evidence for translational coupling in *Escherichia coli*. Cell 34:979-988.
8. Bernstein, D. Harris, Mark A. Poritz, Katharina Strub, Patricia J. Hoben, Sydney Brenner & Peter Walter. 1989. Model for signal sequence recognition from amino-acid sequence of 54K subunit of signal recognition particle. Nature 340:482-486.
9. Bourgaize, David B., Teresa A. Phillips, Ruth A. Vanbogelen, Pamela G. Jones, Frederick C. Neidhardt, and Maurille J. Fournier. 1990. Loss of 4.5S RNA induces the heat shock response and lambda prophage in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172:1151-1154.
10. Bourgaize, David B. & Maurille J. Fournier. 1987. Initiation of translation is impaired in *E. coli* cells deficient in 4.5S RNA. Nature 325:281-284.
11. Bourne, R. Henry, David A. Sanders & Frank McCormick. 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. Nature 348:125-132.
12. Broek, Daniel., Takashi Toda, Tamar Michali, Lonny Levin, Carmen Birchmeier, Mark Zoller, Scott Powers, and Michael Wigler. 1987. The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/Adenylate cyclase pathway. Cell 48:788-799.
13. Brown, Stanley., 1987. Mutations in the gene for EF-G reduce the requirement for 4.5S RNA in the growth of *E. coli*. Cell 49:825-833.
14. Brown, Stanley., and Maurille Fournier. 1984. The 4.5S RNA gene of *Escherichia coli* is essential for cell growth. J. Mol. Biol. 178:533-550.
15. Brown, Stanley. 1989. Time of action of 4.5S RNA in translation. J. Mol. Biol. 209:79-90.
16. Chang, S. -F., D. HG, L. Baird, and C. Georgopoulos. 1991. Analysis of an *Escherichia coli dnaB* temperature-sensitive mutation and its cold-sensitive extragenic suppressor. J. Biol. Chem. 266:3654-3660.
17. Castiliho, B., P. Olfson, and M. J. Casadaban. 1984. Plasmid insertion mutagenesis and *lac* gene fusion with mini-Mu bacteriophage transposons. J. Bacteriol. 158:488-495.
18. Chen, S.-M., H. E. Takiff, A. M. Barber, G. C. Dubois, J. C. A. Bardwell, and D. L. Court. 1990. Expression and characterization of RNaseIII and Era proteins. J. Biol. Chem. 265:2888-2895.
19. Connolly, Timothy., and Reid Gilmore. 1989. The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. Cell 57:599-610.
20. Cour, T.F.M.la, J. Nyborg, S. Thirup, and B.F.C. Clark. 1985. Structural details of the binding of guanosine diphosphate to elongation factor Tu from *E. coli* as studied by X-ray crystallography. EMBO J. 9:2385-2388.
21. Criuch, R. J. 1974. Ribonuclease III does not degrade deoxyribonucleic acid-ribonucleic acid hybrids. J. Biol. Chem. 249:1314-1316.
22. Date, D., and W. Wickner. 1981. Isolation of the leader peptidase gene and effects of leader peptidase overproduction *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6106-6110.
23. Diehl, Ronald E., Paul Whiting, Jean Potters, Nicolas Gee, C. Ian Ragan, David Linemeyer, Ralf Schoepfer, Carl Bennett, and Richard A. F. Dixon. 1990. Cloning and expression of bovine brain inositol monophosphatase. J. Biol. Chem. 265:5946-5949.
24. Dunn, J. J., and F. W. Studier. 1975. Effect of RNaseIII cleavage on translation of bacteriophage T7 messenger RNAs. J. Mol. Biol. 99:487-499.
25. Ellis, Christine., Micharl Moran, Frank McCormick & Tony Pawson. 1990. Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. Nature 343:377-381.
26. Fabiny, John M., A. Jayakumar, A. Craig Chinault, and Eugene M. Barnes, Jr. 1991. Ammonium transport in *Escherichia coli*: localization and

- nucleotide sequence of the *amtA* gene. J. Gen. Microbiol. 137:983-989.
27. Fujiyama, A., and F. Tamanoi. 1986. Processing and fatty acid acylation of RAS1 and RAS2 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:1266-1270.
  28. Gee, Nicolas S., C. Ian Ragan, Keith J. Watling, S. Aspley, Rosamond G. Jackson, Gillian G. Reid, David Gani, and Janis K. Shute. 1988. The purification and properties of *myo*-inositol monophosphatase from brain. Biochem. J. 249:883-889.
  29. Gegenheimer, P., and D. Apirion. 1981. Processing of procaryotic ribonucleic acid. Microbiol. Rev. 45:502-541.
  30. Gillman., A. G. 1987. G proteoms: transducers of receptor-generated signals. Annu. Rev. Biochem. 56:615-649.
  31. Gottesman, M., A. Oppenheim, and D. L. Court. 1982. Retroregulation: control of gene expression from sites distal to the gene. Cell 29:727-728.
  32. Groisman, E., and M. J. Casadaban. 1986. Mini-Mu bacteriophage with plasmid replicons for *in vivo* cloning and *lac* gene fusing. J. Bacteriol. 168:357-364.
  33. Goloubinoff, Pierre., Anthony A. Gatenby & George H. Lorimer. 1989. GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose bisphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. Nature 337:44-47.
  33. Gourse, Richard L., Yutaka Takebe, Robert A. Sharrock, and Masayasu Nomura. 1985. Feedback regulation of rRNA and tRNA synthesis and accumulation of free ribosomes after conditional expression of rRNA genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1069-1073.
  34. Groisman, E., B. Castiliho, and M. J. Casadaban. 1984. *In vivo* DNA cloning and adjacent gene fusing with a mini-Mu-*lac* bacteriophage containing a plasmid replicon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1480-1483.
  35. Guarneros, G., C. Montanez, T. Hernandez, and D. L. Court. 1982. Posttranscriptional control of bacteriophage *int* gene expression from a site distal to the gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:238-242.
  36. Guthrie, C., H. Nashimoto, M. Nomura. 1969. Structure and function of *E. Coli* ribosomes, VIII. Cold-sensitive mutants defective in ribosome assembly. Genetics 63:384-389.
  37. Hayes, F., and M. Vasseur. 1976. Processing of 17-S *Escherichia coli* Precursor RNA in the 27-S pre-ribosomal particle. Eur. J. Biochem 61: 433-442.
  38. Haywood, A. 1971. Cellular site of *Escherichia coli* ribosomal RNA synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68:435-439.
  39. Held, A. W., M. Nomura. 1973. Rate-determining step in the reconstitution of *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits. Biochemistry. 12:3273-3281.
  40. Homann, H., and K. Nierhaus. 1971. Ribosomal Proteins. Eur. J. Biochem 20:249-257.
  41. Inada, T., D. L. Court, K. Ito, and Y. Nakamura. 1989. Conditionally lethal amber mutations in the leader peptidase gene of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 171:585-587.
  42. Jayakumar, A., Sung J. Hwang, John M. Fabiny, A. Craig Chinault, and Eugene M. Barnes, Jr 1989. Isolation of ammonium or methylammonium ion transport mutant of *Escherichia coli* and complementation by the cloned gene. J. Bacteriol. 171:996-1001.
  43. Kaziro, Y. 1978. The role of guanosine 5'-triphosphate in polypeptide chain elongation. Biochim. Biophys. Acta 505:95-127.
  44. Kolodoner, R., R. A. Fischel, and M. Howard. 1985. Genetic recombination of bacterial plasmid DNA: effect of *recF* pathway mutations on plasmid recombination in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 163:1060-1066.
  45. Kusakawa, Noriko and Takashi Yura. 1988. Heat shock protein GroE of *Escherichia coli*: key protective roles against thermal stress. Genes & Develop. 2:874-882.
  46. Landis, Claudia A., Susan B. Masters, Anna Spada, Ann M. Pace, Henry R. Burne & Lucia Vallar. 1989. GTPase inhibiting mutations activate the  $\alpha$  chain of Gs and stimulate adenylate cyclase in human pituitary tumours. Nature 340:692-696.
  47. Langiarotti, G., E. Turco, C. Perlo, F. Altruda. 1975. Role of precursor 16S RNA in assembly of *E. coli* 30S ribosomes. Nature 253:569-570.
  48. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning (edition II): a laboratory manual edition II. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
  49. March, P. E., J. Ahnn, and M. Inouye. 1985. The DNA sequence of the gene (*rnc*) encoding ribonuclease III of *Escherichia coli*. Nucleic. Acids. Res. 13:4677-4685.
  50. March, P. E., and M. Inouye. 1985. Characterization of the *lep* operon of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 260:7206-7213.
  51. March, P. E., and M. Inouye. 1985. GTP-binding membrane protein of *Escherichia coli* with sequence homology to initiation factor 2 and elongation factor Tu and G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7500-7504.
  52. March, P. E., C. G. Lerner, J. Ahnn, X. Cui, and M. Inouye. 1988. The *Escherichia coli* Ras-like protein (Era) has GTPase activity and is essential for cell growth. Oncogene 2:539-544.
  53. Meyhack, B., I. Meyhack, D. Apirion. 1974. Processing of precursor

- particles containing 17S rRNA in a cell free system. FEBS Lett. 49:215-219.
54. Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
  55. Molloy, Christopher J., Donald P. Bottaro, Timothy P. Fleming, Mark S. Marshall, Jackson B. Gibbs & Stuart A. Aaronson. 1989. PDGF induction of tyrosine phosphorylation of GTPase activating protein. Nature 342:711-714.
  56. Munroe, David., and Allan Jacobson. 1990. mRNA poly(A) tail, a enhancer of translational initiation. Mol. Cell. Biol. 10:3441-3455.
  57. Nakayama Naoki, Naoko Arai, Yoshito Kaziro, and Ken-ichi Arai. 1984. Structural and functional studies of the DnaB protein using limited proteolysis. J. Biol. Chem. 259:88-96.
  58. Nashimoto, H., M. Nomura. 1969. Structure and function of bacterial ribosomes, XI. Dependence of 50S ribosomal assembly on simultaneous assembly of 30S subunits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67:1440-1447.
  59. Nashimoto, H., and H. Uchida. 1975. Late steps in the assembly of 30S ribosomal proteins *in vivo* in a spectinomycin-resistant mutant of *Escherichia coli* J. Mol. Biol. 96:443-453.
  60. Nashimoto, H., A. Miura, H. Saito, and H. Uchida. 1985. Suppressors of temperature-sensitive mutations in a ribosomal protein gene, *rpsL*(S12), of *Escherichia coli* K12. Mol. Gen. Genet. 199:381-387.
  61. Nashimoto, H., and H. Uchida. 1985. DNA sequence of the *Escherichia coli* ribonuclease III gene and its mutations. Mol. Gen. Genet. 201:25-29.
  62. Mattheakis, Larry, Loan Vu, Frederick Sor, and Masayasu Nomura. 1989. Retroregulation of the synthesis of ribosomal proteins L14 and L24 by feedback repressor S8 in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:448-452.
  63. Neuwald, Andrew F., B. Rajendra Krishnan, Igor Brikun, Saulius Kulakausakas, Kestutis Suziedelis, Tihamer Tomcsanyi, Thomas S. Leyh, and Douglas E. Berg 1992. *cysQ*, a gene needed for cysteine synthesis in K-12 only during aerobic growth. J. Bacteriol. 174:415-425.
  64. Nikolaev, N., and D. Schlessinger. 1974. Binding of ribosomal proteins to 30S preribosomal ribonucleic acid of *Escherichia coli*. Biochemistry. 13:4272-4277.
  65. Nishi, Kayoko, Francoise Morel-Deville, John W. B. Hershey, Terrance Leighton & Joachim Schnier. 1988. An eIF-4A-like protein is a suppressor of an *Escherichia coli* mutant defective in 50S ribosomal subunit assembly. Nature 336:496-498.
  66. Nomura, M., P. Traub, C. Guthrie, and H. Nashimoto. 1974. The assembly of ribosomes. J. Cell. Physiol. 74:241-252.
  67. Osawa, T., and T. Yura. 1980. Amber mutations in the structural gene for RNA polymerase sigma factor of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 180:293-300.
  68. Poritz, Mark A., Harris D. Bernstein, Katharina Strub, Dieter Zopf, Heike Wilhelm, Peter Walter. 1990. An *E. coli* ribonucleoprotein containing 4.5S RNA resembles mammalian signal recognition particle. Science 250:1111-1117.
  69. Portier, C., L. Dondon, M. Grunberg-Manago, and P. Regneir. 1987. The first step in the functional inactivation of the *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase messenger is a ribonuclease III processing at the 5' end. EMBO J. 6:2165-2170.
  70. Ray, Bimal K., T. Glen Lawson, Julie C. Kramer, Margarita H. Cladaras, Jamie A. Grifo, Richard D. Abramson, William C. Merrick, and Robert E. Thach. 1985. ATP-dependent unwinding of messenger RNA structure by eukaryotic initiation factors. J. Biol. Chem. 260:7651-7658.
  71. Robertson, Sue Jinks-, Richard L. Gourse, and Masayasu Nomura. 1983. Expression of rRNA and tRNA genes in *Escherichia coli*: evidence for feedback regulation by products of rRNA operons. Cell 33:865-876.
  72. Rohl, R., and K. Nierhaus. 1982. Assembly map of the large subunits (50S) of *Escherichia coli* ribosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:729-733.
  73. Rothman, James E. & Lelio Orci. 1992. Molecular dissection of the secretory pathway. Nature 355:409-415.
  74. Sachs, A.B., and R.W. Davis. 1990. Translation initiation and ribosomal biogenesis. involvement of a putative rRNA helicase and RPL46. Science 247:1077-1079.
  75. Sachs, A.B., and R.W. Davis. 1989. The poly(A) binding protein is required for poly(A) shortening and 60S ribosomal subunit-dependent translation initiation. Cell 58:857-867.
  76. Saito, Haruo., and Charles C. Richardson. 1981. Processing of mRNA by ribonuclease III regulates expression of gene 1.2 of bacteriophage T7. Cell 27:533-542.
  77. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequence with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467.
  78. Sasse-Dwight, S., and J. D. Gralla. 1990. Role of eukaryotic-type functional domains found in the prokaryotic enhancer receptor factor  $\sigma^{54}$ . Cell 62:945-954.
  79. Serafini, Tito., Lelio Orci, Mylene Amherdt, Michael Burner, Richard A.

- Kahn, and James E. Rothman. 1991. ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of golgi-derived COP-coated vesicles: A novel role for a GTP-binding protein. *Cell* 67:239-253.
80. Shiba, K., K. Ito, T. Yura, and D. P. Cerretti. 1984. A defined mutation in the protein export gene within the *spc* ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: isolation and characterization of a new temperature-sensitive *secY* mutant. *EMBO J.* 3:631-635.
81. Shiba, K., K. Ito, T. Yura. 1984. Mutation that suppresses the protein export defect of the *secY* mutations and causes cold-sensitive growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 160:696-701.
82. Shiba, K., K. Ito, T. Yura. 1986. Suppressors of the *secY24* mutation: identification and characterization of additional *ssy* genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 166:849-856.
83. Takata, R., T. Mukae, and D. L. Court. 1989. RNA processing by RNaseIII is involved in the synthesis of *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase. *Mol. Gen. Genet.* 209:28-32.
84. Takiff, H. E., S-M. Chen, and D. L. Court. 1989. Genetic analysis of the *rnc* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 166:364-367.
85. Tatchell, K. 1986. RAS genes and growth control in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 166:364-367.
86. Toda, T., I. Uno, T. Ishikawa, S. Powers, T. Kataoka, D. Broeks, S. Cameron, J. Broach, K. Matsumoto, and M. Wigler. 1985. In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40:27-36.
87. Toone, W. Mark, Kenneth E. Rudd, and James D. Friesen. 1991. *deaD*, a new *Escherichia coli* gene encoding a presumed ATP-dependent RNA helicase, can suppress a mutation in *rpsB*, the gene encoding ribosomal protein S2. *J. Bacteriol.* 173:3291-3302.
88. Traub, P., and M. Nomura. 1969. Structure and function of *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.* 40:391-413.
89. Van Dyk, Tina K., Anthony A. Gatenby & Robert A. LaRossa. 1989. Demonstration by genetic suppression of interaction of GroE products with many proteins. *Nature* 342:451-453.
90. Way, J. C., M. A. Davis, D. Morisato, D. E. Roberts, and N. Kleckner. 1984. New Tn10 derivatives for transposon mutagenesis and for construction of *lacZ* operon fusions by transposition. *Gene* 32:369-379.
91. Whiteway, Malcolm., Linda Hougan, Daniei Dignard, David Y. Thomas, Leslie Bell, Gena C. Saari, Francis J. Grant, Patrick O'Hara, and Vivian L. Mackay. 1989. The STE4 and STE18 genes of yeast encodes potential  $\beta$  and  $\gamma$  subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. *Cell* 56:467-477.
92. Williams, B. G., and F. R. Battner. 1980. Bacteriophage lambda vectors for DNA cloning, p. 201-229. In J.K. Setlow and A. Hollander(ed.). Genetic engineering, vol. 2. Plenum Publishing Corp., New York.
93. Willumsen, B. M., K. Norris, A. G. Parageoge, N. L. Hubbert, and D. R. Lowry. 1984. Harvey murine sarcoma virus p21 *ras* protein; biological and biochemical significance of cysteine nearest the carboxy terminus. *EMBO J.* 3:2581-2585.
94. Wolfe, P. B., W. Wickner, and J. M. Goodman. 1983. Sequence of the leader peptidase gene of *Escherichia coli* and the orientation of leader peptidase in the bacterial envelope. *J. Biol. Chem.* 258:12073-12080
95. Yano, R., and T. Yura. 1989. Suppression of the *Escherichia coli* *rpoH* opal mutation by ribosomes lacking S15 protein. *J. Bacteriol.* 171:1712-1717.
96. Yano, R., H. Nagai, K. Shiba, and T. Yura. 1990. Mutation that enhances synthesis of  $\sigma^{32}$  and suppresses temperature-sensitive growth of the *rpoH15* mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:2124-2130.

## <謝辞>

遺伝学の思考方法と基礎的な技術をご指導くださり、自由な実験環境の維持に努めてくださいました東京大学医科学研究所癌体質学研究部助教授 中村義一先生に深く感謝いたします。研究部の部長として、いつも温かく見守ってくださった東京大学医科学研究所癌体質学研究部教授 江川滉二先生に深く感謝いたします。長期にわたり生活環境と実験を共にし、有益な討論と適切な助言をくださった同癌体質学研究部助手 川上浩一博士に感謝いたします。研究室の円滑な運営に常に気を配り、楽しいジョークで励ましてくれた伊藤耕一君に感謝いたします。学生達の心配をし、面倒をみてくださった杉本お姉様に感謝いたします。お酒に付き合ってくれた北田一博君を始め、優しく接してくださった癌体質学研究部の皆様に感謝いたします。

pPP'106 プラスミドを供与してくださった、京都大学ウイルス研究所教授 今井六雄先生に感謝いたします。rpoH変異株や、pRY61プラスミドを供与してくださった、京都大学ウイルス研究所教授 由良 隆先生と、永井宏樹博士に感謝いたします。lep変異株の解析にご協力くださった京都大学ウイルス研究所教授 伊藤維昭先生、秋山芳展数博士に感謝いたします。多くのプラスミドと大腸菌株を供与して下さり、滞米の際に大変お世話になった米国NIH D.Court博士に感謝いたします。また、Eraタンパク質の精製に助言していただいた中国西安大学教授 S.-M. Chen博士に感謝いたします。試験管内翻訳反応を指導してくださった千葉大学教授 五十嵐一衛先生に感謝いたします。

いつも温かく支えてくれた、愛する妻に深く感謝します。

