

論文の内容の要旨

論文題目 rRNA の化学修飾の生理的意義の解明

氏名 久間 達彦

【導入】

rRNA はメチル化などの転写後修飾を受ける。このような転写後修飾は、生物種間で高度に保存されている。また、このメチル化は、rRNA に対して非特異的になされるわけではなく、rRNA の機能上重要な部位に集中している。さらに、rRNA のメチル化を担う酵素が同定され、基質に対する高い特異性が報告されている。rRNA のメチル化酵素は細胞の生存と増殖に必須ではなく、欠損株を用いた解析がなされている。rRNA メチル化酵素の欠損株において、増殖が親株と同等である事や、リボソームの機能が変化する事が知られている。しかし、rRNA メチル化酵素の欠損株における明瞭な表現型の異常の報告例は乏しく、rRNA メチル化の生理的意義についてはよく判っていなかった。本研究において私は、rRNA メチル化を担う酵素が、細菌の病原性に寄与する事を見出した。この結果から私は、rRNA メチル化の生理的意義の理解を目的とし、rRNA メチル化酵素が病原性に寄与するメカニズムの解明を試みた。

【結果】

(1) 16S rRNA メチル化酵素 RsmH, I は新規病原性因子である。

私は、黄色ブドウ球菌の新規病原性因子を、宿主殺傷能力を指標として探索し、同定する事を試みた。そこで、細菌間で高度に保存されている機能未知遺伝子の破壊株を作出した。さらに、それらの破壊株の病原性を、カイコを用いて評価した。その結果として、SA0447, SA1022 遺伝子の破壊が、黄色ブドウ球菌のカイコに対する低病原性を導く事を見出した（次項 図 1）。さらに、ここで見られた低病原性は、破壊した遺伝子を、プラスミドを用いて再導入する事により回復した。また、これらの遺伝子破壊株の栄養培地中での増殖は親株と同程度であった（次項 図 2）。以上の結果から私は、SA0447, SA1022 が、黄色ブドウ球菌の新規病原性遺伝子であると判断した。

SA0447, SA1022 がコードするタンパク質は、大腸菌の 16S rRNA の 1402 番目のシチジン (1402C) の異なる二ヶ所をメチル化し、ジメチル化シチジンを形成する酵素 RsmI, RsmH と一次配列の類似性を示した。そこで SA0447, SA1022 が黄色ブドウ球菌における 16S rRNA メチル化酵素 RsmI, RsmH であるかを知る目的で私は、SA0447, SA1022 遺伝子が、このジメチル化シチジンの形成に必要であるか否かを検討した。その結果、大腸菌の 16S rRNA 1402C に相当する部位である、黄色ブドウ球菌の 16S rRNA の 1412 番目のシチジン (1412C) は、野生株ではジメチル化を受けていた。さらに、このジメチル化は SA0447, SA1022 の破壊株では失われ、モノメチル化体が検出された。以上の結果から私は、SA0447, SA1022 は、黄色ブドウ球菌の 16S rRNA メチル化酵素 RsmI, RsmH をコードすると判断した。以降の解析において私は、これらの遺伝子の二重破壊株を作出し、解析を行った。

続いて私は、RsmH, RsmI が、黄色ブドウ球菌において、哺乳動物に対する病原性に寄与するか検討した。その結果、*rsmH* / *rsmI* 二重破壊株はマウスに対する低病原性を示すことが判明した。さらに、ここで見られた低病原性は、*rsmH*, *rsmI* 遺伝子の導入により相補された。以上の結果から、RsmH, RsmI は黄色ブドウ球菌のマウスに対する病原性に寄与すると判断した。

(2) RsmH, RsmI は黄色ブドウ球菌の酸化ストレス耐性の向上を介して病原性に寄与する。

続いて私は、rRNA メチル化の生理的意義を解明する目的で、RsmH, RsmI が黄色ブドウ球菌の病原性に寄与するメカニズムの解明を試みた。これまでに大腸菌において、*rsmH*, *rsmI* 遺伝子の破壊により、軽微な翻訳忠実性の異常が見られることが知られている。また、酸化ストレスは宿主による細菌の殺傷に用いられている。さらに、酸化ストレスは正常な翻訳を阻害することが知られている。これらの知見に基づき私は、黄色ブドウ球菌の *rsmH*, *rsmI* 遺伝子の破壊株は、酸化ストレスに対して感受性であると考えた。そして、この遺伝子破壊株は酸化ストレスの存在下においては、増殖、並びに翻訳における異常を示し、ここで見られるような酸化ストレス感受性が、*rsmH* / *rsmI* 破壊株における病原性低下の原因であると考えた。そこで *rsmH* / *rsmI* の二重破壊株の酸化ストレス耐性度を評価した。その結果、野生株と比べ、二重破壊株では酸化ストレス耐性度が低

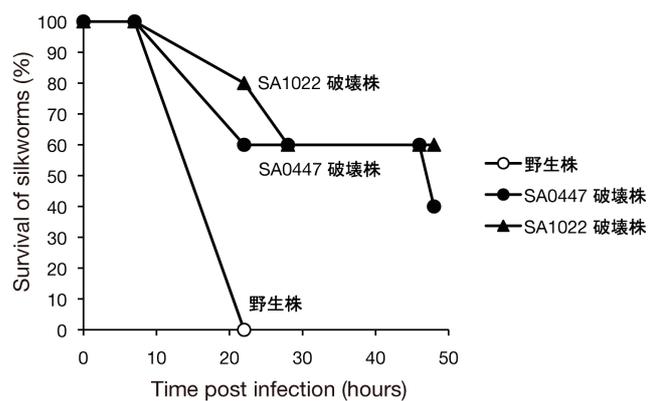


図 1. SA0447, SA1022 破壊株のカイコに対する病原性

黄色ブドウ球菌の野生株、SA0447, SA1022 破壊株を注射したカイコの生存を観察した。

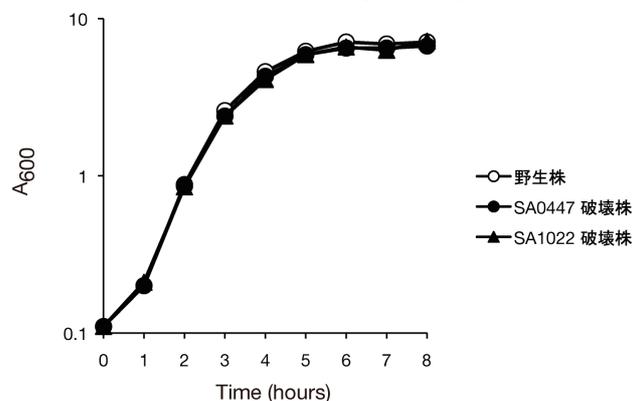


図 2. SA0447, SA1022 破壊株の増殖能力

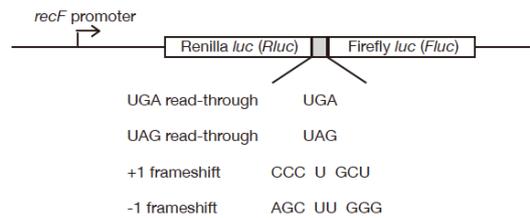
黄色ブドウ球菌の野生株、SA0447, SA1022 破壊株の栄養培地中での増殖を、A₆₀₀ を経時的に測定することで評価した。

下していた。また、酸化ストレス存在下における翻訳忠実性について評価したところ、*rsmH* / *rsmI* 遺伝子の二重破壊株では酸化ストレス依存的な翻訳忠実性の低下が見られた (図3)。さらに、*rsmH* / *rsmI* 二重破壊株で見られたカイコ殺傷能力の低下は、酸化ストレスを除去する薬剤である N-acetyl-L-cysteine の投与により回復した。以上の結果は、RsmH, RsmI が酸化ストレス耐性の向上を介して黄色ブドウ球菌の病原性に寄与する事を示唆する。

(3) RsmH, RsmI は rRNA を酸化から保護する
RsmH, RsmI が酸化ストレス耐性に寄与するという上記の結果に基づき私は、RsmH, RsmI によるメチル化が酸化ストレス耐性を与えるメカニズムの解明を試みた。これまでに RNA の酸化が RNA の機能の異常を導くことが知られている。そこで私は、rRNA は RsmH, RsmI によるメチル化を受けることにより酸化から保護されていると考えた。黄色ブドウ球菌の野生株、並びに *rsmH* / *rsmI* 遺伝子の二重破壊株から rRNA を調製し、酸化ストレスに曝露した後に、RsmH, RsmI によりメチル化される 1412C の近傍の酸化の程度を評価した。その結果、*rsmH* / *rsmI* 二重破壊株由来の rRNA において、1412C の近傍が酸化を受ける程度が上昇していることが判った。

さらに私は、*rsmH* / *rsmI* 二重破壊株において rRNA が酸化され易くなり、正常な rRNA が減少することが酸化ストレス感受性を導いているのではないかと考えた。この点を検証するために、rRNA の過剰発現が *rsmH* / *rsmI* 二重破壊株の酸化ストレス感受性を抑圧するか検討した。ネガティブコントロールとして用いたルシフェラーゼの mRNA を過剰発現した株と比べ、rRNA を過剰発現した *rsmH* / *rsmI* 二重破壊株では、酸化ストレス感受性が回復した。以上の結果は、RsmH, RsmI が rRNA を酸化から保護することにより酸化ストレス耐性の向上に寄与することを示唆する。

A



B

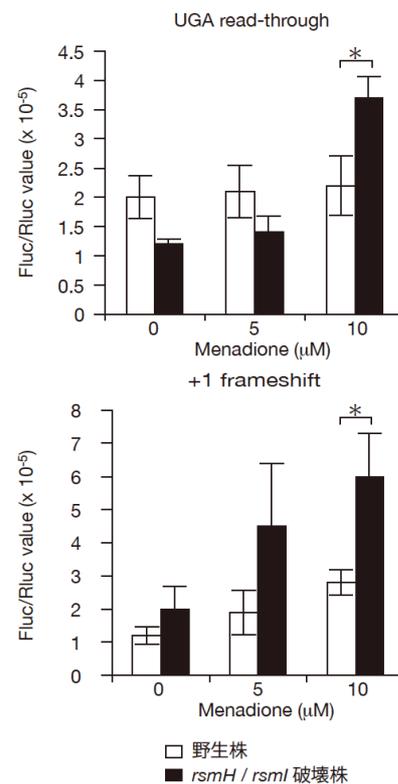


図3. *rsmH* / *rsmI* 二重破壊株の酸化ストレス存在下における翻訳忠実性

(A) 翻訳忠実性の測定に用いたプラスミドの構造

(B) 終止コドンの読み飛ばしとフレームシフト頻度の評価

酸化ストレスを与える薬剤であるメナジオンの存在下において、翻訳の異常に依存して発現するルシフェラーゼの活性を用いて翻訳忠実性を評価した。縦軸の値が大きいほど、翻訳忠実度が悪化していることを示す。アスタリスクは T-test P value < 0.05 を示す

(4) 病原性に寄与する 16S rRNA メチル化酵素の探索

1412C 以外の 16S rRNA メチル化の生理的意義を解明する目的で、RsmH, RsmI 以外の 16S rRNA メチル化酵素 (RsmA, RsmB, RsmC, RsmD, RsmE, RsmF, RsmG) の破壊株を作出し、その病原性を評価した。その結果、*rsmA* 遺伝子の破壊株においてカイコ殺傷能力の低下が見られた。この殺傷能力低下は、他の破壊株 (RsmB-RsmG) では見られなかった。また、*rsmA* 破壊株で見られたカイコ殺傷能力の低下は、*rsmA* 遺伝子の再導入により回復した。さらに、*rsmA* 破壊株の栄養培地中での増殖能力は、野生株と同程度であった (図 4)。

rsmA 破壊株において酸化ストレス感受性が見られる一方で、他の破壊株の酸化ストレス耐性は野生株と同程度であった。また、*rsmA* の破壊株では通常条件において翻訳忠実性の異常が見られ、この異常は、酸化ストレス存在下においては更なる増大を示した。さらに、*rsmA* 遺伝子破壊株で見られたカイコに対する病原性低下は、酸化ストレスを除去する薬剤である N-acetyl-L-cysteine の投与により回復した。以上の結果は、16S rRNA メチル化酵素 RsmA が酸化ストレス耐性の向上により黄色ブドウ球菌の病原性に寄与することを示唆する。

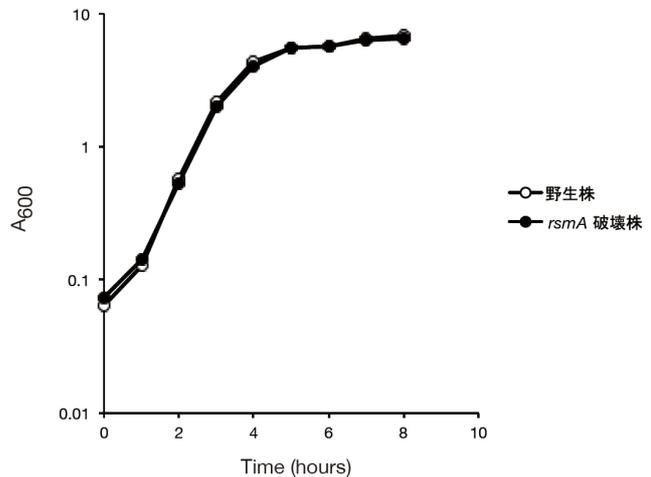


図 4. *rsmA* 破壊株の増殖能力

黄色ブドウ球菌の野生株、*rsmA* 破壊株の栄養培地中での増殖を、A₆₀₀ を経時的に測定すること評価した。

【総括】

本研究の結果は、16S rRNA メチル化酵素 RsmH, RsmI によるメチル化が、rRNA を酸化から保護することにより酸化ストレス耐性を導き、細菌の病原性に寄与することを示唆する (図 5)。また、16S rRNA メチル化酵素 RsmA についても酸化ストレス耐性の向上による病原性への寄与が見られた。RsmH, RsmI によるメチル化がなされる 16S rRNA 1412C、並びに、RsmA によるメチル化がなされる 1528A, 1529A は翻訳において中心的な役割を果たすと考えられている部位に位置する。加えて、これらの 3 つの塩基は 30S リボソームの表面に位置するため、活性酸素種等の有害な物質に曝されると考えられる。従って、RsmA, RsmH, RsmI によるメチル化は、rRNA の重要な部位を酸化ストレスから保護するという機能を持つと考えられる。酸化ストレスは生物において普遍的にみられるストレスである。従って、rRNA メチル化による酸化ストレス耐性の向上は、rRNA メチル化の生物種間における高度な保存性を説明すると考えられる。

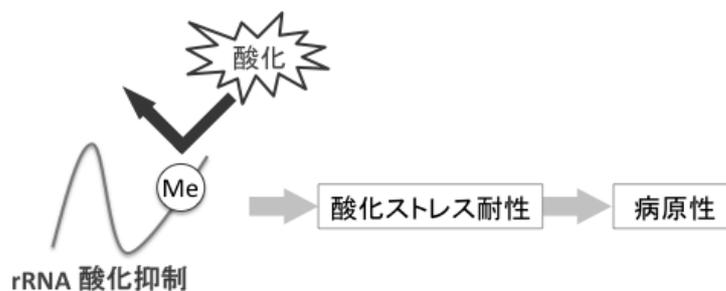


図 5. rRNA メチル化が病原性に寄与する機構