

立教大学学術推進特別重点資金 (立教 S F R)
 大学院生研究
 2004 年度研究成果報告書

研究科名	立教大学大学院			理学研究科	生命理学専攻
指導教員	所属・職名		氏名		
	理学部・教授		河村 富士夫 印		
自然・人文の別	自然・人文	個人・共同の別	個人・共同		
研究課題	亜鉛結合部位を含む枯草菌リボソームたんぱく質とそのパラログ遺伝子の機能解析				
研究代表者	在籍研究科・専攻・学年		氏名		
	理学研究科・生命理学専攻 博士課程後期課程1年		赤沼 元気 印		
研究組織	在籍研究科・専攻・学年		氏名		
研究期間	2004 年度				
研究経費	500 千円				

研究の概要 (200~300 字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

現在までに、亜鉛濃度の変化によって二種の L31 がリボソームに入れ替わることを見出し、さらに細胞内の亜鉛濃度を人為的に抑制する培養系を確立させた。よって、この培養系を活用し *rpmE*、*ytiA* の機能解析を行うことでなぜ枯草菌に二種の L31 が存在し、入れ替わる必要があるのか？ 言い換えると枯草菌が二種の L31 を使い分けている意義を明らかにすることを目的とした。また、当研究を通じてリボソーム複合体は環境の変動によって構成を変化させ、適応するものであることを証明し、リボソーム蛋白質が遺伝子重複を起こした理由を考えたい。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

[リボソーム] [亜鉛] [枯草菌]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

これまで、私たちは二種 L31 の解析を半合成培地である CSM を使用してきた。しかしながら、この培地では YtiA, RpmE の入れ替わりが自然形質転換期と重なるため、入れ替わりが亜鉛濃度の減少のみに依存していると断言できなかった。そこで、細胞内亜鉛濃度を擬似的に減少させることのできる Zinc starvation assay を用いて、*ytiA-lacZ* 融合遺伝子の β -galactosidase 活性を測定したところ、この検定系の培地である NLZM に ZnSO₄, IPTG を添加しなかった場合において、細胞の生育とともに活性が上昇することが確認できた。さらに、NLZM に ZnSO₄, IPTG を添加し、細胞内の亜鉛濃度を保てるような条件では活性はほとんど認められなかった。また、PLZM 固形培地に IPTG を 1 mM 加えた場合と 2 mM 加えた場合では、2 mM 添加した方が培養開始後 1 時間の段階では活性が抑えられているが、大きな差は見られなかった。なお、亜鉛と IPTG 添加した場合、添加しなかった場合と比較して 3 時間後からの生育が若干良かった。

上記の培養法条件下 (PLZM に添加する IPTG は 2mM とした) における RpmE, YtiA, それぞれの細胞内蛋白質量をウエスタンブロットにて解析した結果、培養開始 1 時間後から RpmE 蛋白質は徐々に減少し、2.5 時間後にはほぼ検出されなくなった。その一方で YtiA 蛋白質は RpmE の減少と反比例して増加していくことが分った。

以上の結果より、栄養増殖期においても細胞内の亜鉛濃度が欠乏することで YtiA の発現が誘導されるのに対し、RpmE は不安定となり分解されてしまうことが明らかになった。つまり、二種の L31 の入れ替わりは純粋に細胞内亜鉛濃度の変化によって引き起こされていることが示された。

rpmE, *ytiA* 両遺伝子の機能を明らかにするため、それぞれの破壊株を作製し、LB, CSM, 2×SG, を用いて様々な解析を行ったところ、CSM でのみ *rpmE* 破壊株と *rpmE*, *ytiA* 二重破壊株に若干の生育阻害と孢子形成能の低下が認められた。しかし、両者の相関性及び機能を特定できるような顕著な表現型は見出すことができなかった。そこで、Zinc starvation assay を用いて新たに L31 破壊株の表現型を検索した。まず、生育曲線を測定したところ、NLZM に亜鉛と IPTG を添加した場合の *rpmE* 破壊株と *rpmE*, *ytiA* 二重破壊株に若干の生育阻害が見られた。

さらに、ショ糖密度勾配超遠心法にて 70S 形成能を測定した結果、NLZM での培養開始後 30 分の段階で *rpmE* 破壊株および *rpmE*, *ytiA* 二重破壊株に 70S 形成の異常が確認できた。この結果は亜鉛欠乏状態である培養開始 3 時間後のサンプルになるとさらに顕著になり、*rpmE* 破壊株と *rpmE*, *ytiA* 二重破壊株の間にも有意な差(二重破壊株では 70S リボソーム形成がさらに影響を受けていた)が見られた。

今回の結果において注目すべき点は、*rpmE* 破壊株、ならびに *rpmE*, *ytiA* 二重破壊株の 50S と 70S の間に新たなピーク(仮に 60S とする)が確認できたということである。このピークは 30 分後では 70S 付近に検出されたが 3 時間後では 50S のピークに寄っており、亜鉛の欠乏が進むにつれ 70S から 50S へと沈降係数を変えていくものであると考えられる。60S が形成される原因の一つとして考えられるのは、L31 の欠失によるリボソームの立体構造変化である。リボソームの骨格は rRNA であり、そこに結合するリボソーム蛋白質が欠落すれば、rRNA の構造に変化をもたらす、それによって沈降係数が変化するという可能性である。もう一つの可能性は、L31 は (*Deinococcus radiodurans*) におけるリボソームの立体構造解析で、tRNA の排出口である Exit site 付近に位置していることが明らかにされており、仮に L31 の機能が tRNA 排出に重要な役割を果たしているとする、70S リボソームないし 50S に tRNA が蓄積することで沈降係数が変化するということである。いずれの仮説も論証に乏しいため、有力とは言い難いが、今後の解析により明らかにできるものと考えている。

破壊株の解析を進める過程で、YtiA, RpmE は互いに発現量、細胞内濃度を制御しあっていることを示唆する結果が得られた。CSM 培地、NLZM 培地のどちらの培地を用いた場合にも *rpmE* 破壊株では YtiA の発現時時期が遅れ、*ytiA* 破壊株では RpmE の

研究成果の概要 つづき

細胞内濃度減少がずれ込むことがウエスタンブロット解析より明らかになった。この細胞内濃度変化のラグが転写の段階で起きているのか否かを検証するべくノーザンブロット解析を行った結果、*rpmE* 破壊株でのそれは転写によるものであることが解った。しかし、*ytiA* 破壊株では野生株と比較しても変化は見られず、転写後に YtiA が何らかの形で RpmE の細胞内濃度を調節していることが考えられた。

ytiA を破壊すると RpmE が安定になるということは、YtiA を過剰に発現させると逆の現象が起こりうると考え、*ytiA* のリプレッサーである *zur* を破壊した株、ならびにマルチコピープラスミドである pDG148 に *ytiA* をクローニングし、これを形質転換させた株を作成、IPTG の有無により YtiA を誘導可能な株 (pDG*ytiA*/168 株) を作成した。これらの株を用い、YtiA を培養開始直後から発現させた状態でのウエスタンブロット解析を行ったところ、予想通り RpmE の細胞内濃度が培養開始直後から減少し、3 時間後にはほぼ検出されなくなった。確認のため、ノーザンブロット解析にて転写量を測定したが野生株と同様の転写パターンを得ることができた。さらに、pDG*ytiA*/168 株に IPTG を添加した場合とそうでない場合で RpmE の半減期を *in vivo* で測定した。具体的には CSM で二時間培養し、これに転写阻害、翻訳阻害効果のある抗生物質を添加することで細胞の増殖を停止させ、この条件下での RpmE の分解効率をウエスタンブロットにてモニターした。結果、IPTG を添加しなかった場合に比べ添加した場合は半減期が 10 倍近く早まることが解った。

以上より YitA の発現が RpmE を不安定にさせることを証明できたので、この現象がどのようなシステムで成り立っているのかを検証するべく、上記の条件でリボソームに何が起きているかを検証した。通常、CSM での培養開始 2 時間後では RpmE がリボソームに結合しているが、YtiA を培養開始直後直後から発現させると RpmE がリボソームから検出されなくなり、YtiA が結合することが解った。これは上記の株より調製したリボソームを RFHR 二次元電気泳動にて展開した結果である。さらに、YtiA と RpmE のリボソームへの親和性を *in vitro* リボソーム再構成実験で検討した。まず、*ytiA*, *RpmE* 二重破壊株より抽出したリボソームに対して YtiA、RpmE の両精製蛋白質を等 mol 作用させた場合、約 80% の YitA がリボソームに結合し、RpmE は検出可能な量まで結合できなかった。また、*ytiA* 破壊株より調製したリボソーム、つまり RpmE が結合しているリボソームに対して YtiA を作用させた場合では、結合していた RpmE がリボソームより減少し、YitA が代わって結合するという結果が得られた。このことから、YtiA は RpmE よりリボソームへの親和性が高く、RpmE を押し出す形でリボソームに結合することが可能であることが解った。

これらの事実を踏まえ、二種 L31 のリボソームへの入れ替わりは RpmE が YtiA によってリボソームから追い出される形で遊離し、遊離した RpmE は不安定であるため分解されやすくなり、それによって細胞内濃度の減少が引き起こされるという結論を導き出すことが出来た。以上の研究成果は現在論文投稿中である。