

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
2005 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 名	
研究課題名	枯草菌の亜鉛結合リボソーム蛋白質とそのパラログ遺伝子の分子進化				
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・博士後期課程 2年		名取 陽祐 印		
研究組織	在籍研究科・専攻・学年		氏名		
研究期間	2005 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。)

枯草菌には亜鉛結合部位の有無で分類可能なリボソーム蛋白質が3種(S14,L31,L33)存在しているが、なぜこのような重複を有しているのかは不明である。そこで、2種のS14蛋白質であるRpsN蛋白質(亜鉛結合型)、YhzA蛋白質(亜鉛非結合型)に着目し、解析を行った。その結果、2種のS14蛋白質は2種のL31蛋白質が有する発現制御機構とは異なる機構を有しており、枯草菌においてはRpsN蛋白質が主にS14蛋白質として機能し、亜鉛が結合できない条件ではS14蛋白質として機能することができないために亜鉛が欠乏した際の生存戦略としてYhzA蛋白質を獲得したことを明らかにした。

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。)

[枯草菌] [リボソーム] [S14蛋白質]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

バクテリアでは、リボソームを構成するリボソーム蛋白質は 50 数種存在するが、一生物につき一遺伝子ずつゲノム上にコードされているものと考えられてきた。しかし、全塩基配列が決定されると、多くのバクテリアにおいて、いくつかのリボソーム蛋白質遺伝子には類似した遺伝子(パラログ)が同一ゲノム上に重複して存在することが明らかになった。さらに、これらのパラログ重複を詳しく調べると、その遺伝子産物の大半は亜鉛結合部位の有無によって分類可能であることが分かった。枯草菌には S14、L31、L33 リボソーム蛋白質でこのようなパラログ重複が確認されている。これまでに、2 種の L31 蛋白質 (RpmE, YtiA) が細胞内の亜鉛濃度に呼応してリボソームにて入れ替わるということを見出した。亜鉛結合型の RpmE 蛋白質は亜鉛を含有することで安定となる一方で、*yhza* 遺伝子の転写は亜鉛存在下では Zur 蛋白質によって負の制御を受けるため、RpmE, YtiA 蛋白質は亜鉛環境変動に適応するために使い分けられている可能性を強く示唆する結果であった。しかし、パラログ重複をしているリボソーム蛋白質全てにおいて実際にこのような発現制御機構が働いているかは不明である。そこで、2 種の S14 蛋白質である亜鉛結合型の RpsN 蛋白質、亜鉛非結合型の YhzA 蛋白質に着目し、2 種の S14 蛋白質においても亜鉛環境に対する適応機構が存在するのか、なぜ亜鉛結合部位の有無の相違のある 2 種が存在しているのかを解明するべく、解析を始めた。

機能解明の一助として、まず、亜鉛結合部位を有する RpsN 蛋白質をコードする *rpsN* 遺伝子と亜鉛非結合型の YhzA 蛋白質をコードする *yhza* 遺伝子の破壊を試みた。その結果、*rpsN* 遺伝子は破壊不可能であったが、*yhza* 遺伝子の破壊は可能であった。そこで、RpsN 蛋白質が細胞の増殖に必須か否かを検討するため、Pspac プロモーターと *rpsN* 遺伝子との転写融合遺伝子を構築し、これを *aprE* 遺伝子領域内に挿入した株を作製した。この株に *rpsN::cat* 変異を導入することで、*rpsN* 遺伝子の発現を IPTG で制御可能な株を構築した。*cat* 遺伝子の挿入の際、*rpsN* 遺伝子はリボソーム蛋白質をコードする 21 個の遺伝子からなる *spc* クラスター内に存在していることから、後方の遺伝子発現への影響を考慮し、*cat* 遺伝子のプロモーター、ターミネーターを付加せずに導入した。この導入法を用いることでクラスター内の単一遺伝子への変異導入を行うことができた。この株 (*aprE::Pspac-rpsN*, *rpsN::cat*) を用いて解析を行った結果、IPTG 添加時に野生株と同様の増殖速度を示すが IPTG 非添加時には細胞の増殖が停止し、70S 複合体形成に異常が生じることが明らかになった。この結果から、RpsN 蛋白質はリボソームの構成に重要な役割を担っており、*rpsN* 遺伝子が細胞の増殖に必須であることが明らかになった。

一方、S14 蛋白質のパラログである YhzA 蛋白質は、細胞の増殖に必須な機能を担っている RpsN 蛋白質の機能を相補可能なのであろうか。次にこの疑問を解決するべく *yhza* 遺伝子の発現を IPTG で制御可能な株を構築し、この株に対し *rpsN::cat* 変異の導入を試みた。その結果、IPTG 添加時にのみ形質転換体 (*aprE::Pspac-yhza*, *rpsN::cat*) が出現し、得られた形質転換体は、IPTG 非添加の場合には著しくその増殖が阻害されるが、IPTG 添加時には野生株よりも遅い速度ではあるが増殖は可能であることが分かった。さらに、YhzA 蛋白質はリボソーム分画に見出され、S14(RpsN)蛋白質不在で生じた 70S 複合体形成の異常を回復できることが明らかになった。次に、RpsN 蛋白質を有する株と YhzA 蛋白質を有する株では増殖速度が異なることから、RpsN 蛋白質、YhzA 蛋白質を有するリボソームでは翻訳効率が異なることが考えられた。そこで、野生株と RpsN 蛋白質、YhzA 蛋白質の発現を IPTG で制御可能な株 (*aprE::Pspac-rpsN*, *rpsN::cat*, *aprE::Pspac-yhza*, *rpsN::cat*) を用いて、それぞれの株から、野生型のリボソーム、及び、RpsN 蛋白質、YhzA 蛋白質それぞれ有するリボソームを精製し、これらを用いて *in vitro* translation assay を行った。その結果、RpsN 蛋白質を有するリボソームの翻訳活性は野生型と同程度であるが、YhzA 蛋白質を有するリボソームの翻訳活性は野生型の 50 パーセント以下であることが分かった。

研究成果の概要 つづき

以上の結果から、YhzA 蛋白質は RpsN 蛋白質機能を一部相補可能だが、完全には相補できないことが明らかになった。

YhzA 蛋白質をコードする *yhza* 遺伝子の転写は *ytiA* 遺伝子(L31B)と同様、亜鉛の取り込み装置に関与する遺伝子の発現を負に制御する Zur 蛋白質によって負の制御を受けていることが予想された。そこで、*yhza* 遺伝子の転写調節領域と *lacZ* との転写融合遺伝子を構築し、*yhza* 遺伝子発現を β -ガラクトシターゼ活性を指標として測定すると、野生株では *yhza* 遺伝子の転写は常に抑制されているが、*zur* 遺伝子破壊株においては *yhza* 遺伝子の構成的な転写が確認できた。このことから、*yhza* 遺伝子の転写は Zur 蛋白質によって負の制御を受けていることが明らかになった。次に、2種の S14 蛋白質は 2種の L31 蛋白質と同様、細胞内の亜鉛濃度に呼応した「入れ替わり」のメカニズムを有しているのか否かを検討した。その結果、2種の L31 蛋白質がリボソームにて入れ替わる条件、つまり、亜鉛が欠乏した条件においても 2種の S14 蛋白質(RpsN, YhzA)はリボソーム分画に見出されることが分かり、S14 蛋白質は L31 蛋白質とは異なった制御機構を有していることが明らかになった。以上より、枯草菌において、亜鉛結合部位を有している RpsN 蛋白質が主に S14 蛋白質として機能しており、亜鉛が結合できない条件では S14 蛋白質として機能することができないため、細胞内の亜鉛が欠乏した際の生存戦略として YhzA 蛋白質を獲得したものと考えられることができる。

次に、RpsN 蛋白質と YhzA 蛋白質のアミノ酸配列を比較すると、YhzA 蛋白質は亜鉛結合部位を持たない代わりに、RpsN 蛋白質には見出されない 28 個のアミノ酸からなる領域が付加されていることが確認できた。この付加された配列は YhzA 蛋白質が S14 蛋白質として機能するために必須な配列なのであろうか。これを調べるため、*yhza* 遺伝子に付加された 28 個のアミノ酸をコードする領域を除去した DNA 断片を構築し、この断片と *Pspac* プロモーターとの転写融合遺伝子を構築し、これを *aprE* 遺伝子領域内に挿入した株を作製した。この株に対し、*rpsN::cat* 変異の導入を試みた。その結果、IPTG 添加時、非添加時、どちらの場合においても形質転換体を得ることが出来なかった。つまり、YhzA 蛋白質に付加された 28 個のアミノ酸は S14 蛋白質として機能するために必須な領域であり、この配列は亜鉛結合部位を補うために獲得したものと考えられることができる。このようなアミノ酸配列の付加は、その他の亜鉛結合部位の有無でパラログ重複しているリボソーム蛋白質についても見出されている。比較ゲノム解析から亜鉛結合部位の有無でパラログ重複しているリボソーム蛋白質は亜鉛結合型であったものが亜鉛結合・非結合型の 2 種に重複したのち亜鉛非結合型のみに進化したのではないかと提唱がある。実際、古細菌などでは亜鉛結合型 S14 蛋白質が見出され、プロテオバクテリアでは亜鉛非結合型 S14 蛋白質を有している。 γ -プロテオバクテリアの一種である大腸菌の S14 蛋白質は亜鉛非結合型のみを有しており YhzA 蛋白質よりもさらにアミノ酸の数が大きいことが確認できる。つまり、亜鉛は生物にとって微量必須金属元素であるが、自ら作り出せないものであることから、生育環境中の亜鉛に依存するのではなく、自身で安定して供給可能なアミノ酸を利用することで機能できる亜鉛のいない蛋白質へと進化していったと仮説を考えることができる。この仮説と本年度の研究から得られた結果より、YhzA 蛋白質は RpsN 蛋白質機能を完全に相補可能でないことから、枯草菌の S14 蛋白質は、亜鉛結合・非結合型の 2 種の S14 蛋白質から大腸菌が保持するような亜鉛非結合型の S14 のみへと進化している途中の蛋白質ではないかと考えることができる。