

氏	名	鈴木 祥太
学 位 の 種 類		博士 (理学)
報 告 番 号		甲第369号
学 位 授 与 年 月 日		2014年 3月31日
学 位 授 与 の 要 件		学位規則 (昭和28年4月1日文部省令第9号) 第4条第1項該当
学 位 論 文 題 目		枯草菌の必須リボソームタンパク質 L2, L3, S10 をコードする遺 伝子の機能解析
審 査 委 員	(主査)	堀口 吾朗 塩見 大輔 関根 靖彦

I. 論文の内容要旨

遺伝子は転写と翻訳という過程を経て発現する。転写においては遺伝情報が mRNA へと写し取られ、翻訳では mRNA 上の遺伝暗号がリボソームによって読み取られ、遺伝暗号に対応するアミノ酸の重合反応が起きる。リボソームは全ての生物に普遍的に存在し、遺伝子発現の重要な過程を司るため、その構造、機能や生合成の機構が詳細に解析されてきた。しかしながら、リボソームの構成要素となるリボソームタンパク質は約 60~80 種もあり、それらの個々の機能にはいまだに未解明な点が多く残されている。一方、様々な生物種からリボソームタンパク質が翻訳以外の細胞内プロセスに関与する例が報告されており、リボソームタンパク質には未知の分子機能が備わっている可能性がある。

細菌においては、リボソームは2つのサブユニット(30S, 50S)が会合し 70S リボソームを形成することで機能する。本研究では、グラム陽性菌の一種である枯草菌 (*Bacillus subtilis*)を用いて、遺伝学的・分子生物学的手法によりリボソームタンパク質の機能の解析を行った。多数のリボソームタンパク質遺伝子が座乗する S10 クラスタ領域を標的とした突然変異株のスクリーニングを行ったところ、リボソームタンパク質の L2, L3 および S10 をコードする遺伝子の突然変異株(*rplB142*, *rplC52*, *rpsJ52* および *rpsJ56*)を得ることができた。

L2 に異常を持つ *rplB142* 変異株は、45°C以上の高温では生育できない温度感受性を示す。リボソームのタンパク質組成解析と再構成実験から、50S サブユニットへは変異型 L2 のみならず、L16 もが取り込み効率の低下を示すこと、そのような異常な 50S サブユニットは 70S リボソームが形成不能であることが明らかになった。さらに *rplB142* の抑圧変異株を単離し、その変異部位を特定したところ、機能未知の *yaaA* 遺伝子のプロモーター領域に 1 塩基の欠失が生じていること、さらにこの変異によって *yaaA* 遺伝子の転写レベルが増加することが明らかになった。この抑圧変異株では変異型 L2 および L16 のリボソームへの取り込みが回復していた。これらの結果から、L2 は L16 をリボソームに取り込ませる機能があること、その機能が *yaaA* 遺伝子の産物によって補助される可能性、および L2, L16 は 50S サブユニットが 30S サブユニットと会合するためにも必要であることが示唆された。

一方、L3 に異常を持つ *rplC52* 変異株では、70S リボソームの形成効率が減少していたが、野生型と同等の増殖能を保持していた。一般的に、リボソームの正常な翻訳活性が損なわれると細胞増殖に著しい悪影響が出ることを踏まえると、*rplC52* 変異株では翻訳機能そのものは比較的正常であると考えられる。一方、孢子形成能は 45°C以上の高温で著しく減少した。この結果は、L3 が孢子形成に関し、未知のリボソーム外機能を持つことを示唆している。

最後に、S10 に異常を持つ *rpsJ52* および *rpsJ56* 変異株を用いた解析を行った。これらの変異株では、増殖能の低下とともに孢子形成能の著しい低下が観察された。細胞形態から判断すると孢子形成はその初期段階から停止していた。これに対応するように、孢子形成のスイッチとして働く転写因子 Spo0A の標的遺伝子の発現が低下している可能性が示された。従って、S10 の作用点として、孢子形成情報伝達系のなかでも Spo0A を含む初期因子が想定された。S10 が孢子形成に果たす役割をさらに解析するため、*rpsJ52* 変異株を親株として 5 種の抑圧変異株を得た。そのうち 3 種は、S10 そのものあるいは 30S サブユニット内で S10 と隣接する S3, S14 にアミノ酸置換が生じていた。この結果は、変異型 S10 に起因する 30S サブユニットの構造異常が第 2 の変異によって補正されたことにより、30S サブユニットの機能が回復したためであると考えられる。これらのサプレッサーは増殖速度と孢子形成能の両方を相補した。一方、残りの 2 種は S アデノシルメチオニンの代謝に関わる酵素の遺伝子に変異持ち、孢子形成能のみを回復させた。これらの結果は孢子形成の過程において S アデノシルメチオニン代謝が重要な役割を持つ可能性を示すとともに、この過程に S10 が何らかの役割を持つことを示唆する。

このように、リボソームタンパク質遺伝子を標的とした遺伝学的手法を用いることで、3 種のリボソームタンパク質のリボソーム内機能が新たに明らかになった。またこれにとどまらず、L3 および S10 に関してはリボソーム外機能の存在が示唆されたほか、リボソームの構築および孢子形成のそれぞれにおいて新規因子を見いだすことができた。

II. 審査結果の要旨

リボソームは遺伝子発現の翻訳と呼ばれる重要な過程を担う、巨大なタンパク質-RNA 複合体である。タンパク質の工場と例えられるように、リボソームの機能は生命活動に必須である。従って、その構成因子の遺伝子の機能欠損は、成長の著しい不良や致死性をもたらす場合が多い。申請者は、リボソームタンパク質の個々の機能を明らかにするため、枯草菌を用いた遺伝学的、分子生物学的、生化学的解析を行った。枯草菌は遺伝学実験に優れた材料であり、その利点を生かして3種のリボソームタンパク質遺伝子の温度感受性変異株を単離した。L2 タンパク質の機能を明らかにする上で申請者は、変異型 L2 タンパク質それ自身の 50S サブユニットへの取り込み効率が低下していると同時に、L16 タンパク質の取り込み効率も低下していることを明らかにした。リボソームの構築機構は極めて複雑であり、それに関する知見は試験管内の再構成実験に負うところが大きい。これに対し、申請者は生体内で L2 と L16 との関係を示した点は、リボソーム構築機構の理解に大きな貢献を果たしたと評価できる。さらに特筆すべきことに L2 タンパク質変異株の抑圧変異株を単離し、その原因遺伝子 *yaaA* が L2 の 50S サブユニットへの組み込みの補助因子である可能性を示した。*yaaA* の分子機能は全く分かっておらず、また、リボソーム形成の補助因子についても不明な点が多いことから、この発見はリボソーム構築の分子機構を理解する上で新たな突破口となることが期待される。

リボソームが翻訳を担うことを考えれば、その構成因子の異常は生命活動のあらゆる過程に影響を及ぼすことは想像に難くない。ところが近年、リボソームタンパク質がリボソーム外の機能を持つ例が相次いで報告されている。申請者は孢子形成という特異なプロセスに異常を持つものの増殖能はほぼ正常な L3 タンパク質の変異株を見いだした。この結果は L3 が孢子形成に関しリボソーム外機能を持つ可能性を示唆する。その一方、L3 がリボソーム内で孢子形成に関わる遺伝子の翻訳に特殊な役割を果たす可能性も考えられる。いずれにしてもこの発見は、リボソームが単なるタンパク質工場ではなく、細胞の状況に応じ柔軟に遺伝子発現を制御する分子装置であることを支持するものであり、高く評価できる。

最後に申請者は、S10 のアミノ酸置換変異株の解析を通じ、S10 もまた孢子形成に重要な役割を持つことを示した。さらに、その抑圧変異株2種が S アデノシルメチオニンの代謝に関わる2種の酵素遺伝子であることを突き止めた。孢子形成は枯草菌の生活環において極めて重要なプロセスであり、それを制御する情報伝達系も詳細に解明されている。それにも関わらず、S アデノシルメチオニン代謝とリボソームタンパク質とが孢子形成に関わるという新たな発見を

成し遂げることができた点は大いに評価できる。

これらの研究成果は、申請者が長い研究の歴史がある枯草菌の性質に通じるとともに、リボソームという巨大なタンパク質装置の解析法を熟知していることに依るところが大きい。また、無数の解析例がある中でもこれまで全く知られていなかった因子を見いだすことに成功したことは、申請者個人の研究者としての資質が十分に備わっていることも示している。本審査委員会は本論文が微生物における遺伝学、分子生物学、生化学分野において学術上の大きな貢献を果たしたものと認める。

なお、2014年1月16日午後4時より本論文についての公聴会を開き、論文内容の説明とともに質疑応答を行った。申請者は論文について明快に説明し、質疑に対する応答も満足すべきものであった。