

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

立教大学大学院理学研究科生命理学専攻

鈴木 祥太

2013 年

## 要約

グラム陽性細菌の一種である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は、様々な生育環境に適応するため、自然形質転換能、遊走能、孢子形成などの生存戦略機構を有している。1997年に野生株 (168 株) の全ゲノム情報が公開され、約 4,000 遺伝子が染色体 DNA 上に存在し、2003 年にこれらの全遺伝子に対して破壊株作製プロジェクトの成果が報告されたが、リボソームタンパク質遺伝子は増殖に必須なものと判断され解析の対象から外された。そこで、改めて全リボソームタンパク質遺伝子に対して単独欠失実験が行われた結果、57 種のリボソームタンパク質遺伝子のうち 22 種が単独欠失可能であり、*rpsU* (S21) 遺伝子の欠損変異株で遊走性の低下、*rplA* (L1) 遺伝子の欠損変異株で孢子形成率の低下がみられた。したがって、リボソームタンパク質が細胞分化などの細胞機能にも関与している可能性が示唆された。これまでリボソームタンパク質は抗生物質との相互作用の解析などについて多く報告されているが、ほとんどのリボソームタンパク質の機能が未だ明らかにされていない。そこで、11 種のリボソームタンパク質遺伝子を含む S10 クラスターへ、エラー校正活性の低い DNA ポリメラーゼを使った PCR 法でランダムに変異導入し、点変異により増殖温度感受性と孢子形成欠損を示す変異株を取得することでリボソームタンパク質の機能解析を行った。本論文では、この変異導入によって得られた必須リボソームタンパク質である L2、L3、S10 をコードする遺伝子変異株の解析結果を報告する。

第二章では、L2 リボソームタンパク質の変異で増殖温度感受性の *rplB142* 変異株の解析および、そのサプレッサー変異株(*rplB142 srb1*)の解析結果について報告する。

### <*rplB142* 変異株の解析>

L2 タンパク質に H142L 変異をもつ *rplB142* 変異株は 45°C以上の高温では増殖できず、30°C、32°Cの低温でのみ増殖できる。また、対数増殖期で 32°Cから 45°Cに温度を

上げたところ 90 分後から生菌数の減少がみられた。この 90 分後のリボソームのプロファイルを 10-40%のショ糖密度勾配超遠心法で調べた結果、温度を上げる前に比べて 70S リボソームの形成量に減少がみられた。この 70S リボソームを RFHR 二次元電気泳動で調べた結果、野生株に比べて L2 タンパク質の量の減少と L16 リボソームタンパク質の著しい減少がみられ、50S\*サブユニットでも L2 タンパク質の減少と L16 タンパク質の欠失がみられた。この 50S\*サブユニットに 70S リボソーム形成能があるか再構成実験で調べた結果、70S リボソームを形成できなかった。したがって、高温では H142L 変異をもつ L2 タンパク質が 50S サブユニットへ結合できず、L16 タンパク質も欠失した 50S\*サブユニットが蓄積して 70S リボソームが形成できないため増殖できないことが明らかにされた。また、*in vivo* で L16 タンパク質の 50S サブユニットへの結合に L2 タンパク質が必要であることも見出した。

<サプレッサー (*rplB142 srb1* 変異株) の解析>

*rplB142*変異株は30°Cの増殖速度が著しく遅いため、増殖速度が回復したサプレッサーの単離を試みた結果、45°Cでは増殖できず低温で増殖速度が回復した*rplB142 srb1*(suppressor of *rplB* mutation)変異株を単離した。この*srb1*変異の同定を行った結果、機能未知遺伝子である*yaaA*遺伝子のプロモーター領域が一塩基欠失していた。このプロモーター領域についてプライマーエクステンション解析とβ-ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) を使用したレポーターアッセイで転写活性を調べた結果、*srb1*変異によって転写活性が野生株よりも増加していた。さらに*rplB142 srb1*変異株は*rplB142*変異株よりも 70Sリボソームの形成量に回復がみられ、リボソーム画分をRFHR二次元電気泳動で調べた結果、H142L変異をもつL2の結合量の回復と共にL16も回復していた。これらの結果から、*yaaA*遺伝子の転写の上昇によって増加したYaaAタンパク質が、H142L変異を持つL2の50Sサブユニットへの結合を補助することでL16の結合も回復し、70Sリボソームを形成できる50Sサブユニットが形成できるようになり、翻訳活性が回復することで低

温における増殖速度を回復したことが示唆された。

第三章では L3 リボソームタンパク質の Gly 52 Asp の変異 (G52D) を持つ孢子形成温度感受性の *rplC52* 変異株と、S10 リボソームタンパク質の His 56 Arg への変異 (H56R) を持つ孢子形成欠損の *rpsJ56* 変異株の解析結果を報告する。

#### < *rplC52* 変異株の解析 >

L3 タンパク質に G52D 変異を持つ *rplC52* 変異株の増殖速度は野生株と同程度であるが、孢子形成は温度感受性を示し、32°C と 37°C では正常の孢子形成率を示すが、45°C と 46°C では野生株の孢子数に比べて 6.2% と 0.7% と顕著に低下した。顕微鏡観察から、孢子形成初期に形成される不等分裂膜の形成が 37°C で約 1 時間、45°C では約 5 時間遅延しており、孢子形成過程への進行に遅延がみられた。対数増殖期のリボソームのプロファイルは野生株に比べて 37°C で 30S サブユニットの蓄積がみられ、45°C でさらに蓄積が増加した。したがって、L3 タンパク質の G52D 変異によって、特に高温で 50S サブユニットの形成効率が低下することが示唆された。しかしながら、高温での増殖速度と 70S リボソームの形成量から全体的なタンパク質合成活性の低下は考えにくいため、高温における L3 タンパク質の G52D 変異による孢子形成阻害効果はタンパク質合成能の低下により引き起こされたものではなく、L3 タンパク質の未知の翻訳外機能による可能性が高いことが示唆された。

#### < *rpsJ56* 変異株の解析 >

S10 タンパク質に H56R 変異をもつ *rpsJ56* 変異株の増殖速度は、野生株と比較すると 32°C の低温では非常に遅いが、37°C、45°C と温度が上がると回復した。しかし、いずれの温度でも孢子が形成されなかった。37°C および 45°C で孢子形成期の細胞を顕微鏡観察しても、不等分裂膜の形成は観察できなかった。不等分裂膜は孢子形成初期のリン酸リレー系によってリン酸化 Spo0A タンパク質 (Spo0A~P) が生成されることで形成されるため、Spo0A~P ができていないことが示唆された。したがって、*rpsJ56* 変異

株では温度上昇に伴って増殖速度は回復する一方、どの温度でも孢子形成過程が初期段階で阻害されて孢子が形成できないのは、S10 タンパク質の翻訳外機能の欠損による可能性が高いことが示唆された。

第四章では *rpsJ56* 変異株および Leu 52 Pro の変異 (L52P) を持つ *rpsJ52* 変異株を利用して S10 リボソームタンパク質の孢子形成過程との関係を解析した結果を報告する。

<*rpsJ52* と *rpsJ56* 変異株およびサプレッサー変異株の解析>

S10 タンパク質の機能解析を行うにあたり孢子形成率が低下した *rpsJ52* (L52P) 変異株を新たに取得した。第三章の解析により *rpsJ56* 変異株の Spo0A~P 生成量の低下が示唆された。Spo0A~P は転写因子として機能するため、Spo0A~P が特異的に転写する *spo0APs* プロモーターに *bgaB* 遺伝子を融合して Spo0A~P 生成量を調べた。その結果、BgaB 活性が *rpsJ52* 変異株および *rpsJ56* 変異株で顕著に低下していた。したがって、S10 タンパク質が Spo0A~P 生成過程に関与しており、L52P 変異と H56R 変異によって阻害されること明らかにされた。LB 培地と孢子形成培地におけるリボソームのプロファイルを継時的に調べた結果、*rpsJ52* 変異株と *rpsJ56* 変異株ではダイマーリボソーム形成量が著しく低下していた。したがって、S10 タンパク質はダイマーリボソーム形成に関与することが示唆された。

孢子形成能が回復した復帰突然変異株の取得を試みた結果、*rpsJ52* 変異株から 14 種サプレッサーを取得し、その内の 5 種を解析した。その結果、3 種はリボソームタンパク質の S10 タンパク質の S61A 変異、S3 タンパク質の V127G 変異、S14 タンパク質の H31R 変異であり、これらは 30S サブユニット内で S10 タンパク質と隣接しているため、S10 タンパク質の L52P 変異を直接的に相補したため、孢子形成率および増殖速度も回復したことが示唆された。残りの 2 種の復帰変異は、SpeD タンパク質の E43K 変異 (*speD8* 変異) と TrmD タンパク質の H227Y 変異 (*trmD13* 変異) であり、孢子形成率のみを回復した。両者とも S アデノシルメチオニン (SAM) を基質とする酵素で

あるため、*speD8* 変異と *trmD13* 変異によって SAM の細胞内濃度に変化が起きることによって胞子形成初期の Spo0A~P の生成効率が回復した可能性が示唆された。

これらの解析から、L2, L3, S10 タンパク質がリボソームへ正確に取り込まれることが細胞増殖および胞子形成に必要であることが示される一方、L3, S10 タンパク質の変異体にみられる胞子形成阻害は翻訳活性のみで説明できない。したがって、リボソームタンパク質が細胞分化に関わる翻訳外機能 (Extra-ribosomal function) を持つことが強く示唆された。