

博士論文

枯草菌の **GTP** 結合タンパク質の機能解析 ーリボソームの生合成における **GTP** 結合タンパク質の役割ー

松尾 芳隆

2006 年 2 月 2 日

奈良先端科学技術大学院大学
情報科学研究科 情報生命科学専攻

本論文は奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科に
博士(理学)授与の要件として提出した博士論文である

松尾芳隆

審査委員：

小笠原 直毅 教授	(主指導教員)
箱嶋 敏雄 教授	(委員)
金谷 重彦 教授	(委員)
川端 猛 助教授	(委員)

枯草菌の GTP 結合タンパク質の機能解析

ーリボソームの生合成における GTP 結合タンパク質の役割ー

松尾芳隆

内容梗概

近年、多くの生物のゲノム配列が明らかになったことで、大腸菌の Era や枯草菌の Obg に代表される GTP 結合タンパク質(Era/Obg スーパーファミリー)が、細菌だけでなく高等真核生物にまで広く保存されていることが明らかになってきた。本研究室では、これらのファミリーに属するタンパク質が、枯草菌において 10 種類存在し、そのうち 7 種類 (Obg, Era, YsxC, YphC, YlqF, YqeH, YloQ) ものタンパク質が細胞の増殖に必須であることを明らかにしている。しかしながらほとんどの GTP 結合タンパク質の細胞内機能は不明のままである。

本研究では、枯草菌の細胞増殖に必須である GTP 結合タンパク質の一つである YlqF が、50S サブユニットの後期生合成ステップに関与していることを報告する。YlqF は GTP の非加水分解類似物(GTP γ S)の存在下でのみ遊離した 50S サブユニットに結合し、成熟した 50S サブユニットによって自身のもつ GTP 加水分解能が促進される。さらに、DMS フットプリント法では、23S rRNA の Helix 38, 81, 85 に結合することを示し、酵母 2 ハイブリッド法では、YlqF とリボソームタンパク質 L25(Ctc)の相互作用を見いだした。このことは、YlqF が 50S サブユニットの A サイトと P サイトの周辺に結合することを示している。YlqF を枯渇させた枯草菌細胞内では、YlqF の結合領域に存在するリボソームタンパク質 L16 および L27 を失っている未成熟な 50S サブユニットが蓄積されことも見いだした。これらの結果は、YlqF が 50S サブユニットの生合成において L16 と L27 の取り込みに関与していることを示している。

キーワード

必須遺伝子、GTP 結合タンパク質、GTP 加水分解能、リボソームの生合成

*奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 情報生命科学専攻 学位論文、 NAIST-IS-DD0361033, 2006 年 2 月 2 日.

Functional analysis of GTP-binding proteins in *Bacillus subtilis*

~The role of GTP-binding proteins in the biogenesis of ribosome~

Yoshitaka Matsuo

Abstract

With the recent explosion of available genome sequence data, a widely distributed bacterial subfamily of GTP-binding proteins was discovered, as represented by the *Escherichia coli* Era and the *Bacillus subtilis* Obg. Although function of a number of the GTP-binding proteins belonging to the subfamily has shown to be related to ribosome function, their specific role remains unknown. In *B. subtilis*, we have previously identified ten GTP-binding protein encoding genes, which belong to the subfamily. Targeted genes disruptions have shown seven of GTP-binding proteins (Obg, Era, YqeH, YsxC, YlqF, YphC, and YloQ) are indispensable for the *B. subtilis* cell growth.

In this study, we report that YlqF participates in the late step of 50S ribosomal subunit assembly. YlqF was co-fractionated with the 50S subunit, depending on the presence of non-cleavable GTP analogue. Moreover, the GTPase activity of YlqF was stimulated specifically by the 50S subunit *in vitro*. DMS footprinting analysis disclosed that YlqF binds to the Helix 38, 81, 85 of 23S rRNA. Yeast two-hybrid data revealed interactions between YlqF and the *B. subtilis* L25 protein (Ctc). Specifically, YlqF is positioned around the A-site and P-site on the 50S subunit. Proteome analysis of the abnormal 50S subunits that accumulated in YlqF-depleted cells showed that L16 and L27 proteins, located near the YlqF-binding domain, are missing. Our results collectively indicate that YlqF will organize the late step of 50S ribosomal subunit assembly.

Keywords

Essential genes, GTP-binding proteins, GTP hydrolysis activity, Biogenesis of ribosome

.*Doctoral Dissertation, Department of Bioinformatics and Genomes, Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, NAIST-IS-DD0361033, February 2, 2006.

目次

I. 序論	8
はじめに	
I-1. 単量体 GTP 結合タンパク質の特徴	8
I-2. Era/Obg スーパーファミリー	10
I-2-1. Era ファミリー	
I-2-2. Obg ファミリー	
I-2-3. EngA(YphC)ファミリー	
I-2-4. YihA(YsxC)ファミリー	
I-2-5. TrmE/ThdF ファミリー	
I-2-6. YlqF ファミリー	
I-3. リボソームの生合成	20
I-3-1. rRNA のプロセッシング	
I-3-2. リボソームタンパク質のアッセムブリー	
I-3-3. リボソームの生合成に関与する因子	
I-4. 本研究の目的	26
II. GTP 結合タンパク質とリボソームの関係	29
はじめに	
II-1. 材料と方法	30
II-1-1. 菌株と培養条件	
II-1-2. プラスミドとその作製	
II-1-3. Gateway テクノロジー	
II-1-4. 緩衝液	
II-1-5. 枯草菌の形質転換	
II-1-6. GTP 結合タンパク質の精製	
II-1-7. 複合体解析	
II-1-8. 質量分析計によるタンパク質の同定	
II-1-9. リボソームプロファイルの観察	
II-1-10. ウェスタンブロット法	

II-1-11. 粗リボソーム画分の調整	
II-1-12. GTP 加水分解能の測定	
II-2. 結果	38
II-2-1. Era/Obg スーパーファミリーの複合体解析	
II-2-2. Era/Obg スーパーファミリーとリボソームの結合	
II-2-3. リボソームが与える GTP 結合タンパク質の GTP 加水分解への影響	
II-2-4. Era/Obg スーパーファミリーの枯渇による枯草菌への影響	
II-3. 考察	51
II-3-1. YlqF とリボソームの関係	
II-3-2. Era とリボソームの関係	
II-3-3. Obg, YphC, YsxC, YqeH とリボソームの関係	
II-3-4. 第 2 章のまとめ	
III. リボソームの生合成における YlqF の役割の追求	57
はじめに	
III-1 材料と方法	58
III-1-1. 菌株と培養条件	
III-1-2. プラスミドとその作製	
III-1-3. 50S および 30S サブユニットの精製	
III-1-4. in vitro における 50S サブユニットと YlqF の結合解析	
III-1-5. YlqF の GTP 加水分解能の測定	
III-1-5-a. 50S サブユニットによる YlqF の GTP 加水分解能への影響	
III-1-5-b. 抗生物質による 50S サブユニット依存的な YlqF の GTP 加水分解能の促進への影響	
III-1-6. DMS フットプリント法	
III-1-6-a. DMS による修飾	
III-1-6-b. プライマー伸長法	
III-1-7. 酵母 2 ハイブリッド法	
III-1-7-a. 酵母の培養条件	
III-1-7-b. 酵母の形質転換	

III-1-7-c. 酵母の接合	
III-1-8. in vitro における YlqF と Ctc の相互作用解析	
III-1-8-a. GST-YlqF および GST の精製	
III-1-8-b. Grutathione-カラムを用いた Pull-down assay	
III-2 結果	64
III-2-1. in vitro における YlqF とリボソームの結合解析	
III-2-2. 50S サブユニットが与える YlqF の GTP 加水分解能への影響	
III-2-3. DMS フットプリント法によるリボソームの YlqF 結合領域の決定	
III-2-4. YlqF とリボソームタンパク質の相互作用解析	
III-2-5. YlqF の枯渇によるリボソームへの影響	
III-3 考察	76
III-3-1. YlqF の GTP 加水分解能の役割について	
III-3-2. 50S サブユニットの生合成における YlqF の役割	
III-3-3. 枯草菌の L25 タンパク質	
IV. 本研究のまとめ	81
V. 参考文献	83
VI. 謝辞	98
VII. 業績リスト	99

I. 序論

はじめに

枯草菌(*Bacillus subtilis*)は古くから低 GC 含量のグラム陽性菌のモデル生物として研究されている。1997 年に全ゲノム配列の解読が終了したことで、約 4100 種類のタンパク質をコードする遺伝子が存在することが明らかになり(Kunst *et al*, 1997)、続いて行われた 4100 遺伝子の系統的な破壊株の作製によって、271 種類の遺伝子が枯草菌の細胞増殖に必須であることも明らかにされた(Kobayashi *et al*, 2002)。しかしながら、この 271 種類の遺伝子がコードするタンパク質のうち約 20 種類のタンパク質についてはいまだに機能未知のままである。この約 20 種類の機能未知必須遺伝子のうち、7 種類は Era/Obg スーパーファミリーに所属する GTP 結合タンパク質をコードしており、これらのタンパク質の機能の解明が、枯草菌の細胞増殖の制御システムを知る上で重要な課題になっている。

I-1. 単量体 GTP 結合タンパク質の特徴

全ての生物に存在する単量体 GTP 結合タンパク質は、多くのタンパク質からなるスーパーファミリーを形成し、細胞周期の進行、シグナル伝達、タンパク質の合成、輸送、分泌など、様々な細胞内機能を担っている。そして、これらの GTP 結合タンパク質は、GTP 結合理型と GDP 結合理型という 2 つの構造の相互転換という共通の特徴を持っている。この反応機構を図 1 に示した。一般的に、GTP 結合タンパク質は活性型が GTP 結合理型、不活性型が GDP 結合理型であると考えられており、GTP 結合理型から GDP 結合理型への変換はタンパク質がもつ内在性の GTP 加水分解能によって行われ、GDP 結合理型から GTP 結合理型への変換は、タンパク質に結合した GDP と遊離の GTP とのヌクレオチド交換反応によって行われる。また、2 つの構造の相互転換を制御する因子として、GDP/GTP 交換反応制御因子 (guanine nucleotide exchange factor ; GEF) と GTP 加水分解反応活性化因子 (GTPase activating protein ; GAP) が知られている。GEF には、グアニンヌクレオチド解離促進因子 (guanine nucleotide dissociation stimulator ; GDS) とグアニンヌクレオチド解離阻害因子 (guanine nucleotide dissociation inhibitor ; GDI) が含まれる。例えば、EF-Tu や EF-G などの翻訳因子がもつ 2 つの構造の

相互転換は、タンパク質合成の各ステップで重要な役割をもっている。GTP 型の EF-Tu はアミノアシル-tRNA と複合体を形成し、リボソームの A サイトにアミノアシル-tRNA を運搬する。GTP 型の EF-Tu は tRNA のアンチコドンと A サイトのコドンが一致した時だけリボソームによって内在性の GTP 加水分解能が促進され、その結果、GDP 型へと変換されることでアミノアシル-tRNA とリボソームから解離する(Ronina *et al*, 2000)。EF-G は2つのステップを経由して tRNA のトランスロケーションを誘導する。GTP 型の EF-G は、pre-translocation state のリボソームを translocation-intermediate state へと変換させる。そして GTP 型の EF-G は translocation-intermediate state のリボソームによる加水分解能の促進によって GDP 型へと変換され、GDP 型の EF-G は translocation-intermediate state のリボソームを post-translocation state へと変換する(Zavialov *et al*, 2003)。

アミノ酸配列における GTP 結合タンパク質の特徴は、GTP 結合領域に存在する G1、G3、および G4 の配列モチーフが保存されていることが挙げられる。G1 (G/AXXXGKT/S)、G3 (DXXG)、G4 (NKXD)は GTP 結合能と GTP 加水分解能に必要なモチーフであり、G2 モチーフはそれぞれの GTP 結合タンパク質ファミリーによって異なるユニークな配列で、標的タンパク質との相互作用に必要なモチーフである。

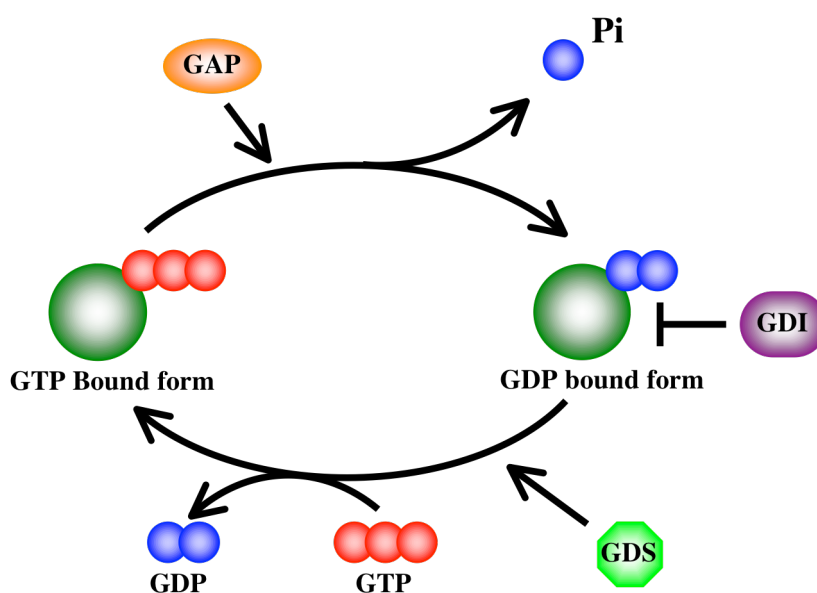


図.1 GTP結合タンパク質の反応機構

GTP結合型（活性型）とGDP結合型（不活性型）の2つの構造の相互転換が起こる。GDP・GTP交換反応制御因子(guanine nucleotide exchange protein: GEF)、GTP加水分解反応活性化因子 (GTPase activating protein: GAP)が要求される場合がある

I-2. Era/Obg スーパーファミリー

真核生物では、1981年に Ras が発見されて以来、Rho や Cdc42 など多種多様な低分子量 GTP 結合タンパク質が見出され、現在では細胞増殖や細胞骨格形成などの多くの生理的機能を制御する細胞内情報伝達の分子スイッチとして認識されるまでに至っている。一方、細菌の代表的な単量体 GTP 結合タンパク質には、タンパク質の合成に関わる翻訳因子や細胞分裂の収縮管を形成する FtsZ、そして分泌に関わる FtsY や Ffh などが挙げられる。また、1986年に、Ras に類似した単量体 GTP 結合タンパク質として大腸菌の Era (*E.coli* Ras like protein)が発見された(Ahnn *et al*, 1986)。当初、Era は Ras との相同性からその名前がつけられたが、後の解析で、Ras との相同性は GTP 結合領域だけであり、Ras のオルソログではないことが明らかになった(Chen *et al*, 1990)。また、枯草菌でも細胞の増殖に必須な GTP 結合タンパク質として Obg が発見され(Trach and Hoch, 1989)、Era や Obg を代表とする GTP 結合タンパク質は細菌型 GTP 結合タンパク質として認識されていた。しかしながら、最近では、様々な生物のゲノム配列が明らかにされたことで、これらのタンパク質が細菌だけでなく人などの高等真核生物にまで広く保存されていること、そして Era や Obg 以外にも EngA、YihA、YlqF、YqeH、YjeQ、ThdF などの数種類の GTP 結合タンパク質が存在し、さらに、これらのタンパク質の多くが細菌の細胞増殖に必須であることが明らかになっている。本研究ではこれらの GTP 結合タンパク質群を Era/Obg スーパーファミリーと呼ぶ。

大腸菌 Era や枯草菌 Obg のアミノ酸配列を用いた相同性検索から、枯草菌には 10 種類の Era/Obg スーパーファミリーに所属するタンパク質(Era, Obg, YphC, YsxC, YqeH, YloQ, YlqF, ThdF, YnbA, YyaF)が存在していることがわかった。これら 10 種類のタンパク質のアミノ酸配列における GTP 結合領域の位置関係を図.2に示す。枯草菌では、Obg と YloQ が GTP 加水分解能を有していること(Welsh *et al*, 1994; Campbell *et al*, 2005)や YloQ の活性が 30S サブユニットによって大きく促進されること(Campbell *et al*, 2005)、そして 5 種類のタンパク質(Era, YphC, YsxC, YqeH, YlqF)が GTP もしくは GDP と特異的に結合することが確認されている(Morimoto *et al*, 2002)。また、ThdF と YyaF の GTP 結合タンパク質としての活性は、枯草菌では報告されていないが、大腸菌の TrmE(ThdF ホモログ)が GTP や GDP との結合能および GTP 加水分解能を有していること(Cabedo *et al*, 1999; Scrima *et al*, 2005)や YchF(YyaF ホモログ)が GDP と結合することが確認されてい

る(Teplyakov, *et al*, 2003)。そのため、相同性検索で同定した 10 種類のうち 9 種類のタンパク質が実際に GTP 結合タンパク質の性質を有していると考えることができる。

Era/Obg スーパーファミリーには、アミノ酸配列によって分類できる 6 種類 [Era、Obg、EngA(YphC)、YihA(YsxC)、TrmE/ThdF、YlqF] のファミリーが存在する。これらのファミリーについてのこれまでの知見と生物間における保存性を以下にまとめた。

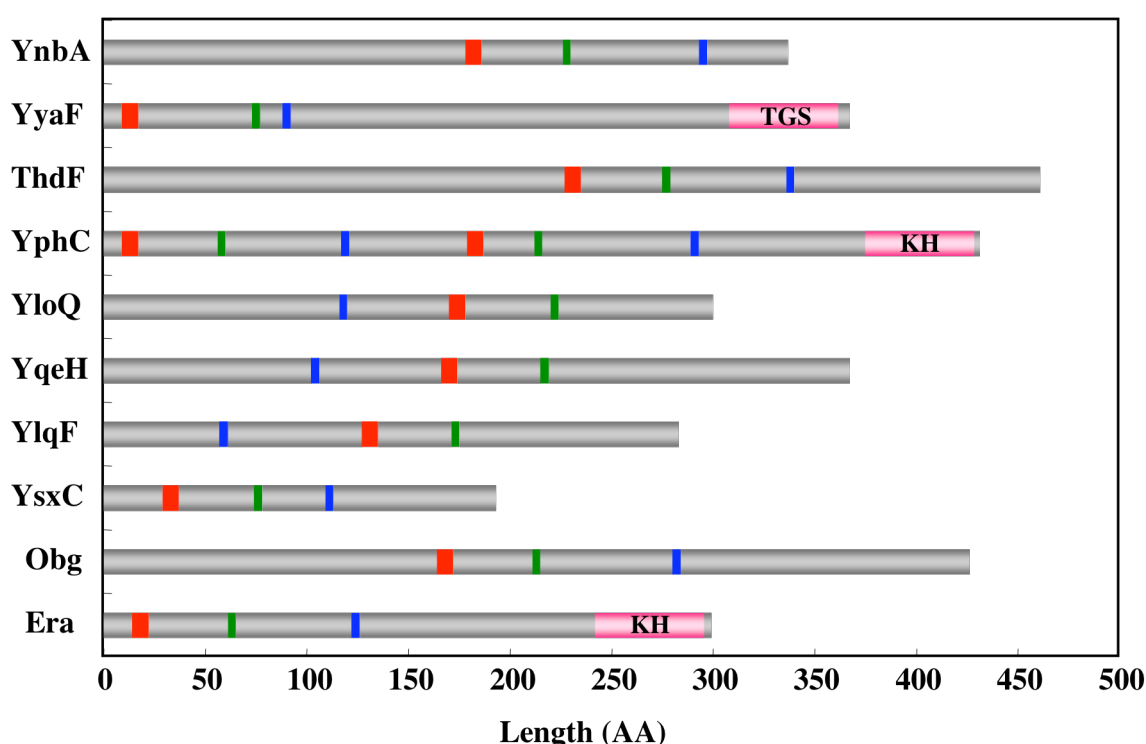


図.2 枯草菌のEra/Obgスーパーファミリーに所属するGTP結合タンパク質のドメイン
G1領域は赤、G3領域は緑、G4領域は青、そしてRNA結合ドメインはピンクで示した。TGS
とKHドメインは共にRNA結合ドメインである。

I-2-1. Era ファミリー

Era は菌類や古細菌には保存されていないものの、多くの真性細菌と動物や植物などの高等真核生物に広く保存されており(表.1)、大腸菌(*Escherichia coli*)や枯草菌などの多くの細菌の細胞増殖に必須なタンパク質である(Ahnn *et al*, 1986; Maeck *et al*, 1988; Takiff *et al*, 1989; Gollop & March, 1991; Anderson *et al*, 1996; Sato *et al*, 1998; Morimoto *et al*, 2002)。Era の構造的特徴は、N 末端の GTP 結合ド

メインの他に C 末端領域に RNA と結合するための KH ドメインを持っていることが挙げられ(図.2)、実際に KH ドメインは 16S rRNA に結合することが報告されている(Meier *et al*, 1999; Sayed *et al*, 1999)。

これまでに、Era は多くの遺伝学的解析がなされており、1989 年から 1998 年の間に、以下のような解析結果が報告されている。Era の温度感受性変異株を用いた解析では 27°C で Era の減少に伴い細胞の伸長がみられ(Gollop and March, 1991)、高温感受性変異株は 43°C で、いくつかの熱ショックタンパク質量の減少、TCA サイクルの活性化、細胞内 ppGpp レベルの減少といった様々な影響が見られている(Lerner and Inouye, 1991)。その他に DNA 複製のプライマーゼ DnaG の温度感受性変異株 *dnaG2903* と *parB* のサプレッサーとして *eral* 変異株が単離されている(Britton and Lupski, 1997)。この変異は Era の GTP 結合ドメイン G1 モチーフの 17 番目のアミノ酸であるプロリンがリジンに置換されたことで GTP の加水分解能が低下している(Britton *et al*, 1997)。また、*eral* 変異株は染色体複製フォークのヘリカーゼ *dnaB*、DNA ジャイレースのサブユニット *gyrB*、トポイソメラーゼ IV のサブユニット *parC*、染色体分配装置の一つである *mukB* の温度感受性変異を抑圧するが、細胞分裂に関わる遺伝子については抑圧しなかったことから、Era は染色体分配から細胞分裂の間で、細胞周期のチェックポイントに働くことが提案されていた(Britton *et al*, 1998)。

しかしながら、最近の研究では、遺伝学的解析だけでなく生化学的解析が取り入れられたことで、Era がリボソームの生合成に必要な因子であることが見いだされている。そのため、これまでの遺伝学的解析によって示唆された様々な細胞内機能への関与を示す結果は、タンパク質合成が阻害されることによって引き起こされた 2 次的な影響である可能性が考えられている。大腸菌細胞内にて Era が枯渇すると、細胞内の 70S リボソームの減少と 50S、30S サブユニットの増加が観察され、30S サブユニットの構成 RNA である 16S rRNA の前駆体 (17S rRNA) の蓄積も観察される(Inoue *et al*, 2003)。この現象は、Era の低温感受性変異株(E200K)を 25°C で生育させた場合も同様に観察され、さらに、Era の過剰発現が、16S rRNA のプロセッシングに必要な RbfA の枯渇による影響を抑圧することも報告されている(Inoue *et al*, 2003)。また、低温電子顕微鏡による 30S-Era 複合体の構造解析では、Era がリボソームタンパク質 S1 と同じ領域 (30S サブユニットの head と platform の間の cleft) に結合すること、そして GTP の非加水分解類似物(GDPNP)が結合した Era と 30S サブユニットの結合が、in vitro

において 30S と 50S サブユニットの会合を阻害することが明らかになっている (Sharma *et al*, 2005)。また、S1 タンパク質は 30S サブユニットへの mRNA の取り込みに必要な因子であることが報告されている (Sengupta *et al*, 2001)。

これらの研究結果より、Era は、30S サブユニットの生合成に必須な因子であること、そして 30S サブユニットが成熟するまで S1 の結合領域に結合し、未成熟な 30S サブユニットに誤って mRNA が取り込まれることを防いでいることが推測されている。

I-2-2. Obg ファミリー

Obg ファミリーには 5 種類 (Obg, YyaF/YchF, Ygr210, Drg, Nog1) のサブファミリーが存在し、DRG と Nog1 サブファミリーは古細菌と真核生物に、Ygr210 サブファミリーは古細菌と菌類に、そして Obg と YyaF/YchF サブファミリーは真性細菌と真核生物に広く保存されている (表.1)。また、このファミリーに所属するいくつかのタンパク質は、GTP 結合ドメインの他に TGS ドメインと呼ばれる RNA 結合ドメインを持っている。

Obg は、Era/Obg スーパーファミリーに所属するタンパク質の中でも Era と並んで最もよく研究されてきたタンパク質であり、枯草菌と放線菌 (*Streptomyces coelicolor*) では、細胞の増殖と孢子形成に必須であることが報告されている (Trach and Hoch, 1989; Okamoto *et al*, 1997; Okamoto and Ochi, 1998; Vidwans *et al*, 1995; Welsh *et al*, 1994)。Vidwans らは、枯草菌における Obg の枯渇による孢子形成への影響を、Spo0A のリン酸化経路をバイパスすることにより抑圧できることを示し、Spo0A のリン酸化の調節に Obg が必要であることを示唆している (Vidwans *et al*, 1995)。同様に放線菌において、GTP 結合ドメインの変異が細胞分化に影響を与えることから、Obg は GTP/GDP 結合型の構造変換により、細胞分化の調節因子として働く可能性が報告された (Okamoto and Ochi, 1998)。このように細胞分化への移行を GTP 型 Obg が抑制していることが示唆されており、Obg は栄養飢餓状態に陥った細胞内の GTP 濃度のセンサーとして働き、GTP 型から GDP 型に変換することで細胞分化の引き金となるモデルが提唱されている (Okamoto and Ochi, 1998; Welsh *et al*, 1994)。このモデルの妥当性を評価するために、Lin らは出芽細胞 (*Caulobacter crescentus*) の Obg である CgtA の生化学的解析を行った (Maddock *et al*, 1997)。精製された CgtA 蛋白質は高い GDP 交換能と遅い GTP 加水分解能を有しており、GTP 濃度が高いと思われる通常の生育条件で

は GTP 型である可能性が示された。また、枯草菌 Obg がストレス条件下における転写因子 σ^B の活性化に必要でありあることも報告されている (Scott and Haldenwang, 1999; Scott *et al*, 2000)。しかしながら、Obg の細胞分化やストレス反応への関与を示す実験結果では、Obg が細菌の細胞増殖に必須である理由を説明することはできない。実際に、Obg は細胞分化を伴わない細菌にも保存されているため、現在もその他の機能に関する研究が進められている。Obg はほとんどの細菌の細胞増殖に必須であるが、ビブリオ菌 (*Vivrio harveyi*) では欠失変異株の作製が成功している。さらにその株を用いた解析では染色体複製に異常が見られており、大腸菌の Obg ホモログである ObgE の温度感受性変異株では染色体の分配に異常が見られている。このことから、Obg は染色体の複製や分配に必要な因子である可能性が示唆されている (Kobayashi *et al*, 2001; Slominska *et al*, 2002; Sikora-Borgula *et al*, 2002)。しかしながら、最近の研究結果では、Era と同じように遺伝学的解析だけでなく生化学的解析を取り入れたことで、Obg もリボソームの生合成に必要な因子である可能性が報告されている。枯草菌の Obg は 50S サブユニットの L13 タンパク質と相互作用し (Scott and Haldenwang, 1999)、大腸菌や出芽細胞の Obg も 50S サブユニットと共精製されることが明らかになっている (Lin *et al*, 2004; Wout *et al*, 2004; Sato *et al*, 2005)。さらに、大腸菌や出芽細胞の細胞内で Obg が減少すると、Era と同じ様に 70S リボソームの減少と 50S、30S サブユニットの増加が観察される (Lin *et al*, 2004; Wout *et al*, 2004; Datta, *et al*, 2004; Sato *et al*, 2005)。また、この現象は大腸菌 Obg の温度感受性変異株でも同様に観察される (Sato *et al*, 2005)。大腸菌の 23S rRNA のメチルトランスフェラーゼをコードする *rrmJ* の欠失変異株でも 70S リボソームの減少と 50S、30S サブユニットの増加が観察されるが、その影響を Obg の過剰発現が抑圧することも報告されている (Tan *et al*, 2002)。しかしながら、これらの現象がなぜ引き起こされるのかは全く明らかになっていない。

Obg サブファミリー以外のものについても以下にまとめた。DRG はマウスの胚形成過程の脳で高い発現が見られ (Kumar *et al*, 1992)、生化学的解析では、RNA との結合活性を有することが明らかになっている (Ishikawa *et al*, 2003)。Nog1 は酵母の細胞増殖に必須なタンパク質で、核に局在していることが報告されており (Park *et al*, 2001)、YyaF/YchF は結晶構造解析から DNA と結合するドメインをもつことが推測されている (TePLYakov *et al*, 2003)。しかしながらこれらのサブファミリーの解析は、まだ不十分であり、細胞内の機能は全く不明のままである。

また、Ygr210 の解析も現在のところ全く進んでいない。

I-2-3 EngA(YphC)ファミリー

EngA はリン菌(*Neisseria gonorrhoeae*)の細胞増殖に必須な GTP 結合タンパク質(Essential Neisserial GTPase A; EngA)として同定され、そこから名前が付けられている(Mehr *et al*, 2000)。また、リン菌だけでなく、枯草菌や大腸菌そして好熱菌(*Thermotoga maritime*)など、多くの細菌の細胞増殖に必須である(Hwang and Inouye, 2001; Morimoto *et al*, 2002)。EngA は真性細菌に広く保存され、いくつかの古細菌やシロイソナズナ(*Arabidopsis thaliana*)にも保存されているが、菌類や動物には保存されていない(表.1)。EngA は2つの GTP 結合ドメインを持つという非常に面白い特徴的な構造を持ち、さらに Era と同じ KH ドメインを C 末端に持っている(図.2)。EngA の過剰発現は Obg と同じ様に *rrmJ* の欠失変異株の影響を抑圧することが報告されているが(Tan *et al*, 2002)、細胞内での役割は全くわかっていない。

I-2-4 YihA(YsxC)ファミリー

YihA は、様々な生物に広く保存されており(表.1)、枯草菌や大腸菌の細胞増殖に必須である(Dassain *et al*, 1999; Morimoto *et al*, 2002)。また細菌の YihA は200 アミノ酸以下の非常に小さなタンパク質であるが、真核生物では N 末端に約 120 アミノ酸の付加がみられる。これまでの報告では、大腸菌の細胞内における YihA の減少に伴い、細胞の伸長が見られることから、細胞分裂に必要な因子ではないかと示唆されている(Dassain *et al*, 1999)。しかしながら、そのメカニズムは全くわかっていない。

I-2-5 TrmE/ThdF ファミリー

TrmE は actinobacteria を除く真性細菌と真核生物に広く保存されているが、古細菌には保存されていない(表.1)。このファミリーの酵母のメンバーである MSS1 はミトコンドリアの 15S rRNA に結合し翻訳に関与している可能性が報告されている(Decoster *et al*, 1993)。細菌では翻訳に関与する遺伝子のオペロン内に位置していることが多く(Wolf *et al*, 1999)、実際に、大腸菌の TrmE は、tRNA のウリジン塩基(U34 in tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu}, tRNA^{Arg}, tRNA^{Glu})の修飾(mnm⁵U; 5-methylaminomethyl-uridin)に関与していることが報告されている(Elseviers *et al*,

1984; Cabedo *et al*,1999; Scrima *et al*, 2005)。最近の結晶構造解析では、TrmE が DMGO(dimethylglycine oxidase)に類似した構造を持ち、DMGO と同じ様に 5-formyl-THF(5-formyl-tetrahydrofolate)と結合することから、TrmE が酵素として、tRNA の U34 の修飾を行っていることが報告されている(Scrima *et al*, 2005)。この修飾反応を図.3 に示す。この修飾反応は、図.3A に示した様に、TrmE、GidA、TrmC という 3 つの酵素によって行われる 3 つのステップから構成され、TrmE は、1st ステップにおいて、5-formyl-THF をウリジン塩基へ付加させる反応を触媒する(図.3B; Scrima *et al*, 2005)。

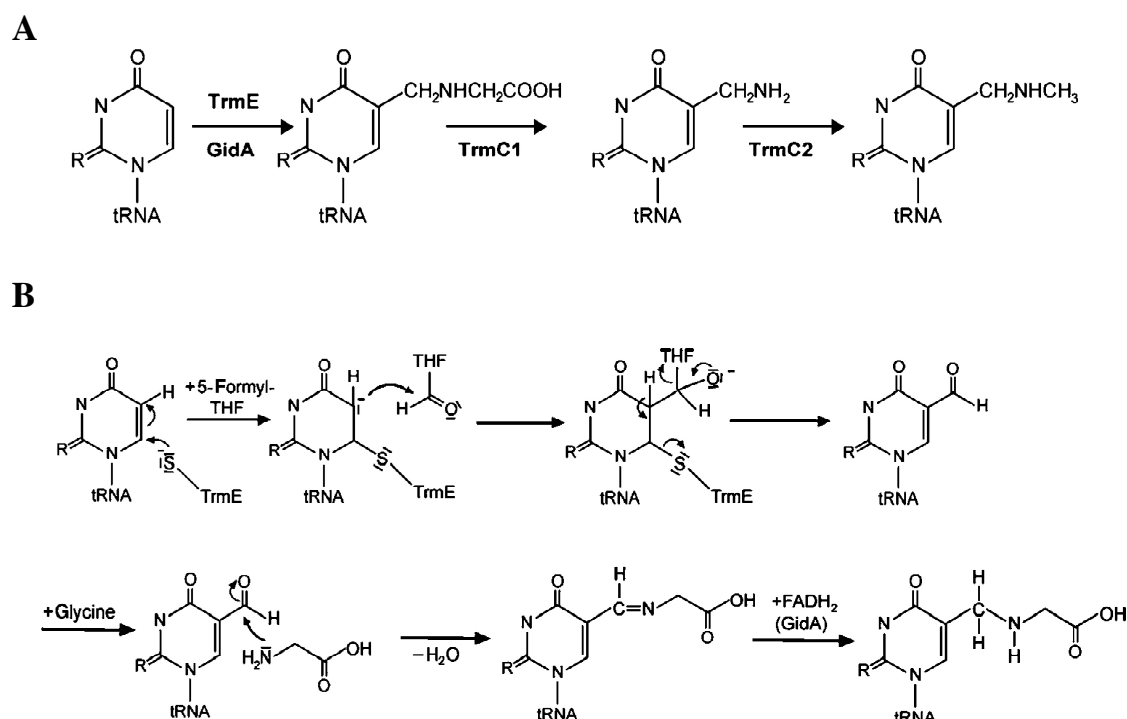


図.3 tRNAのU34の修飾

- A. U34は、TrmEとGidAによって5-carboxymethylaminomethylを付加され、その後、TrmCによって、カルボキシル基の切断とメチル化が行われる。
- B. TrmEとGidAによる5-carboxymethylaminomethylの付加反応を示した。

I-2-6 YlqF ファミリー

YlqF ファミリーには 4 種類のサブファミリー(YlqF、YqeH、YjeQ、MJ1464)が存在し、これらのタンパク質の GTP 結合モチーフは、一般的な GTP 結合タンパク質に見られる G1-G3-G4 とは異なり、G4-G1-G3 という特徴的な構造をもつ

ている(図.2)。YlqF サブファミリーはグラム陽性細菌と真核生物に広く保存され、いくつかのグラム陰性細菌でも保存されており(表.1)、枯草菌の細胞増殖に必須であることが明らかになっている(Morimoto *et al*, 2002)。酵母には Nug1 と Nog2 と呼ばれる 2 種類の YlqF ホモログが存在し、これらのタンパク質は細菌の YlqF と比べると、N 末端側に約 200 アミノ酸の付加がみられる。また、Nug1 と Nog2 は共に酵母の細胞増殖に必須であることや(Fromont-Racine *et al*, 1997)、60S サブユニットの前駆体に結合すること、そして酵母細胞内でそれぞれのタンパク質が減少することで 5.8S と 25S rRNA の前駆体が蓄積することが報告されている(BaBler *et al*, 2001; Saveanu *et al*, 2001)。このことより、Nug1 と Nog2 は 60S サブユニットの生合成に必要な因子であることが示唆されている。一方、細菌の YlqF の解析は全く進んでいない。YjeQ は多くの真性細菌とシロイヌナズナに保存されており(表.1)、大腸菌や枯草菌の細胞増殖に必須である (Arigoni *et al*, 1998; Kobayashi *et al*, 2002)。最近の研究結果では、大腸菌や枯草菌の YjeQ の GTP 加水分解能が 30S サブユニットによって促進されることが報告されている(Daiagle and Brown, 2004; Himeno *et al*, 2004; Campbell *et al*, 2005)。また、Era や Obg と同じ様に、細胞内での YjeQ の枯渇が、70S リボソームの減少と 30S、50S サブユニットの増加を引き起こすことから、YjeQ は 30S サブユニットの生合成に関与していることが示唆されている(Daiagle and Brown, 2004; Himeno *et al*, 2004)。YqeH はいくつかの細菌と真核生物に保存されており(表.1)、枯草菌の細胞増殖に必須であることが知られているが(Morimoto *et al*, 2002)、細胞内での機能は全くわかっていない。MJ1464 は、古細菌に広く保存されているが(表.1)、機能解析は全く行われていない。

Era/Obg スーパーファミリーに所属するタンパク質の多くが細菌の細胞増殖に必須であり、さらに細菌から人などの真核生物にまで広く保存されていることから、これらのタンパク質は、細菌にとどまらず生物に普遍的な機能を担っていると考えられる。現在のところ、Era、Obg や YjeQ はリボソームの生合成に、そして TrmE は tRNA の修飾に必要な因子であることが示唆されている。しかしながら、その他の GTP 結合タンパク質(YsxC, YphC, YqeH, YlqF)ファミリーの機能解析はほとんど進んでいない。

[illegible]

	真性細菌																																																				
	Proteobacteria																																																				
	cor	bhe	bqu	bja	rpa	bme	mlo	atc	sme	rco	rpr	rty	wol	bbr	bpa	bpe	bma	bps	rso	cvi	nme	neu	son	buc	eco	eca	plu	sty	stm	sfl	wbr	ype	yps	bfl	cbu	lfn	mca	hdu	hin	msu	pmu	aci	pae	ppu	pst	ppr	vch	vpa	vvu	xac	xcc	xfa	bba
Era																																																					
Obg																																																					
YyaF																																																					
Ygr210																																																					
Drg																																																					
NogI																																																					
YphC																																																					
YsxC																																																					
ThdF																																																					
YlqF																																																					
YqeH																																																					
YjeQ																																																					
MJ1464																																																					

	真性細菌																								古細菌																	真核生物											
	Proteobacteria							Actinobacteria										Spirochaetes							*5	Crenarchaeota			Euryarchaeota											*6	Fungi			*7	Metazoa								
	dvu	gsu	cje	hhe	hpy	wsu	cdi	cef	cgl	mpa	mle	mbo	mtu	nfa	tws	lxx	pac	sma	sco	blo	sth	lil	bbu	bga	tde	tpa	tma	ape	sso	sto	pai	afu	hal	nth	mja	mmp	mac	rma	mka	pab	pfu	pho	pto	tac	tvo	neq	sce	spo	ecu	ath	cel	dme	has
Era																																																					
Obg																																																					
YyaF																																																					
Ygr210																																																					
Drg																																																					
Nog1																																																					
YphC																																																					
YsxC																																																					
ThdF																																																					
YlqF																																																					
YqeH																																																					
YjeQ																																																					
MJ1464																																																					

表.1 Era/Obgスーパーファミリーの保存性

同源性解析はMicrobial Genome Database (MBGD; <http://mbgd.genome.ad.jp/>)を用いて行った。生物名の表記はMBGDに従っており、正式名称は付録1として記載している。また、ath、cel、dme、hsaはMBGDに含まれていないため、過去の文献を参考にした(Leipe *et al*, 2002)。*1-7はそれぞれ、Fusobacteria、Planctomycetes、Aquificae、Deinococcus-Thermus、Thermotogae、Nanoarchaeota、Plantを表している。

付録1

ape	<i>Aeropyrum pernix</i>	pcu	<i>Parachlamydia</i> sp. UWE25	mge	<i>Mycoplasma genitalium</i>	ypk	<i>Yersinia pestis</i>
sso	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	gvi	<i>Gloeobacter violaceus</i>	mhy	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	ypm	<i>Yersinia pestis</i> biovar <i>Mediaevails</i>
sto	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	syw	<i>Synechococcus</i> sp. WH 8102	mmo	<i>Mycoplasma mobile</i>	yps	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
pai	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	syn	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	mmy	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	cbl	<i>Candidatus Blochmannia floridanus</i>
afu	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	tel	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	mpe	<i>Mycoplasma penetrans</i>	cbu	<i>Coxiella burnetii</i>
hal	<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	ana	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	mpn	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	lpn	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>
mth	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	pmi	<i>Prochlorococcus marinus</i>	mpu	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	mca	<i>Methylococcus capsulatus</i>
mja	<i>Methanococcus jannaschii</i>	pma	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>marinus</i>	uur	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	hdu	<i>Haemophilus ducreyi</i>
mmp	<i>Methanococcus maripaludis</i>	pme	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i>	fnu	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	hin	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd
mac	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	dra	<i>Deinococcus radiodurans</i>	rba	<i>Pirellula</i> sp.	msu	<i>Mannheimia succiniciproducens</i>
mma	<i>Methanosarcina mazei</i>	tth	<i>Thermus thermophilus</i>	ccr	<i>Caulobacter crescentus</i>	pmu	<i>Pasteurella multocida</i>
mka	<i>Methanopyrus kandleri</i>	ban	<i>Bacillus anthracis</i>	bhe	<i>Bartonella henselae</i>	aci	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
pab	<i>Pyrococcus abyssi</i>	bat	<i>Bacillus anthracis</i>	bqu	<i>Bartonella quintana</i>	pae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>	bce	<i>Bacillus cereus</i>	bja	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ppu	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
pho	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	bcz	<i>Bacillus cereus</i> ZK	rpa	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
pto	<i>Picrophilus torridus</i>	btk	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>konkukian</i>	bme	<i>Brucella melitensis</i>	ppr	<i>Photobacterium profundum</i>
tac	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	bha	<i>Bacillus halodurans</i>	bms	<i>Brucella suis</i>	vch	<i>Vibrio cholerae</i>
tvo	<i>Thermoplasma volcanium</i>	bld	<i>Bacillus licheniformis</i>	mlo	<i>Mesorhizobium loti</i>	vpa	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
neq	<i>Nanoarchaeum equitans</i>	bli	<i>Bacillus licheniformis</i>	atc	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	vvu	<i>Vibrio vulnificus</i>
cdi	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	bsu	<i>Bacillus subtilis</i>	sme	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	vyv	<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016
cef	<i>Corynebacterium efficiens</i>	oih	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	reo	<i>Rickettsia conorii</i>	xac	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
cgl	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	lin	<i>Listeria innocua</i>	rpr	<i>Rickettsia prowazekii</i>	xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
mpa	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	lmo	<i>Listeria monocytogenes</i>	rtv	<i>Rickettsia typhi</i>	xfa	<i>Xylella fastidiosa</i>
mle	<i>Mycobacterium leprae</i>	lmf	<i>Listeria monocytogenes</i> str. 4b F2365	wol	<i>Wolbachia pipientis</i>	xft	<i>Xylella fastidiosa</i>
mbo	<i>Mycobacterium bovis</i> subsp. <i>bovis</i>	sar	<i>Staphylococcus aureus</i>	bbr	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	bba	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>
mtu	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	sas	<i>Staphylococcus aureus</i>	bpa	<i>Bordetella parapertussis</i>	dps	<i>Desulfotalea psychrophila</i>
mtc	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	sam	<i>Staphylococcus aureus</i>	bpe	<i>Bordetella pertussis</i>	dvu	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
nfa	<i>Nocardia farcinica</i>	sav	<i>Staphylococcus aureus</i>	bma	<i>Burkholderia mallei</i>	gsu	<i>Geobacter sulfurreducens</i>
twc	<i>Tropheryma whippelii</i>	sau	<i>Staphylococcus aureus</i>	bps	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	cje	<i>Campylobacter jejuni</i>
twl	<i>Tropheryma whippelii</i>	sep	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	rso	<i>Ralstonia solanacearum</i>	hhe	<i>Helicobacter hepaticus</i>
lxx	<i>Leifsonia xyli</i>	efa	<i>Enterococcus faecalis</i>	cvi	<i>Chromobacterium violaceum</i>	hpy	<i>Helicobacter pylori</i>
pac	<i>Propionibacterium acnes</i>	ljo	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	nme	<i>Neisseria meningitidis</i>	hpj	<i>Helicobacter pylori</i>
sma	<i>Streptomyces avermitilis</i>	lpl	<i>Lactobacillus plantarum</i>	nma	<i>Neisseria meningitidis</i>	wsu	<i>Wolinella succinogenes</i>
sco	<i>Streptomyces coelicolor</i>	lla	<i>Lactococcus lactis</i>	neu	<i>Nitrosomonas europaea</i>	lic	<i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Copenhageni</i>
blo	<i>Bifidobacterium longum</i>	sag	<i>Streptococcus agalactiae</i>	son	<i>Shewanella oneidensis</i>	lil	<i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>lai</i>
sth	<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	san	<i>Streptococcus agalactiae</i>	buc	<i>Buchnera</i> sp. APS	bbu	<i>Borrelia burgdorferi</i>
aae	<i>Aquifex aeolicus</i>	smu	<i>Streptococcus mutans</i>	bab	<i>Buchnera aphidicola</i>	bga	<i>Borrelia garinii</i> PBI
bfr	<i>Bacteroides fragilis</i>	spn	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	bas	<i>Buchnera aphidicola</i>	tde	<i>Treponema denticola</i>
bth	<i>Bacteroides thetaotaomicron</i>	spr	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	eco	<i>Escherichia coli</i>	tpa	<i>Treponema pallidum</i>
pgi	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	spy	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ecc	<i>Escherichia coli</i>	tma	<i>Thermotoga maritima</i>
cte	<i>Chlorobium tepidum</i> TLS	spa	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ecs	<i>Escherichia coli</i>	sce	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
cmu	<i>Chlamydia muridarum</i>	spg	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ece	<i>Escherichia coli</i>	spo	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
ctr	<i>Chlamydia trachomatis</i>	spm	<i>Streptococcus pyogenes</i>	eca	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	ecu	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>
cca	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	sps	<i>Streptococcus pyogenes</i>	plu	<i>Photobacterium luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>	ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>
cpn	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	cac	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	sty	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i>	cel	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cpa	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	cpe	<i>Clostridium perfringens</i>	stt	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i>	dme	<i>Drosophila melanogaster</i>
cpj	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	ctc	<i>Clostridium tetani</i> E88	stm	<i>Salmonella typhimurium</i>	has	<i>Homo sapiens</i>
cpt	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	tte	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	sfx	<i>Shigella flexneri</i> 2a		
		poy	<i>Onion yellows phytoplasma</i>	sfl	<i>Shigella flexneri</i> 2a		
		mfl	<i>Mesoplasma florum</i>	wbr	<i>Wigglesworthia brevipalpis</i>		
		mga	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	ype	<i>Yersinia pestis</i>		

I-3 リボソームの生合成

細菌の 70S リボソームは分子量約 2.3MDa という非常に大きな RNP(RNA-タンパク質)複合体であり、30S(小)と 50S(大)の 2 つのサブユニットから構成されている。30S サブユニットは 16S rRNA(約 1600 塩基)と約 20 種類のリボソームタンパク質から構成され、50S サブユニットは 23S rRNA(約 2900 塩基)、5S rRNA(約 120 塩基)と約 30 種類のリボソームタンパク質から構成されている。RNA とタンパク質の重量比は約 2:1 であり、約 7 割が RNA で占められている。リボソームの主要な機能部位はサブユニットの会合面に存在し、RNA の働きを外側からタンパク質が支える構造になっている。30S サブユニット上では、mRNA のコドンと tRNA のアンチコドンが対合することで遺伝情報が解読され、この対合を正確にモニターするために EF-Tu の GTP 加水分解能が必要とされている。一方、50S サブユニットは、アミノ酸を重合する活性と翻訳効率を制御する役割をもっている。

リボソームはタンパク質合成の場として、全ての生物にとって非常に重要な機能を担っており、細胞内で最も多くの量を必要とされている分子マシンの一つである。それ故、細菌では水分を除く全質量のうち 30%以上がリボソームで占められており(Tissieres *et al*, 1959)、さらに、全ての生命エネルギーのうち約 40%がリボソームの生合成に消費されている(Nierhaus, 1991)。リボソームの生合成は 3 種類の rRNA が 1 つの大きな前駆体として合成されることから始まる。その後、この前駆体 rRNA はプロセッシングを受けることで、23S、16S、5S rRNA として成熟する(図.4)。この際のプロセッシングは修飾および切断と余分な領域の除去を示しており、この作業と平行してリボソームタンパク質が取り込まれることが知られている。

I-3-1 rRNA のプロセッシング

細菌の rRNA プロセッシングの研究は、古くから大腸菌を中心に行われてきており、現在知られているメカニズムのほとんどが、大腸菌の研究によるものである。細菌の rRNA は 3 種類の rRNA(16S、23S、5S)といくつかの tRNA を含むオペロン構造をとっており(図.4)、染色体上に複数の *rrn* オペロンとして存在している。例えば、大腸菌は 7 種類、そして枯草菌は 10 種類の *rrn* オペロンを持っている。また、複数種類のオペロンを持つ理由は、rRNA の転写量を増やすためだと考えられている。転写された *rrn* オペロンは、プロセッシングの 1st ス

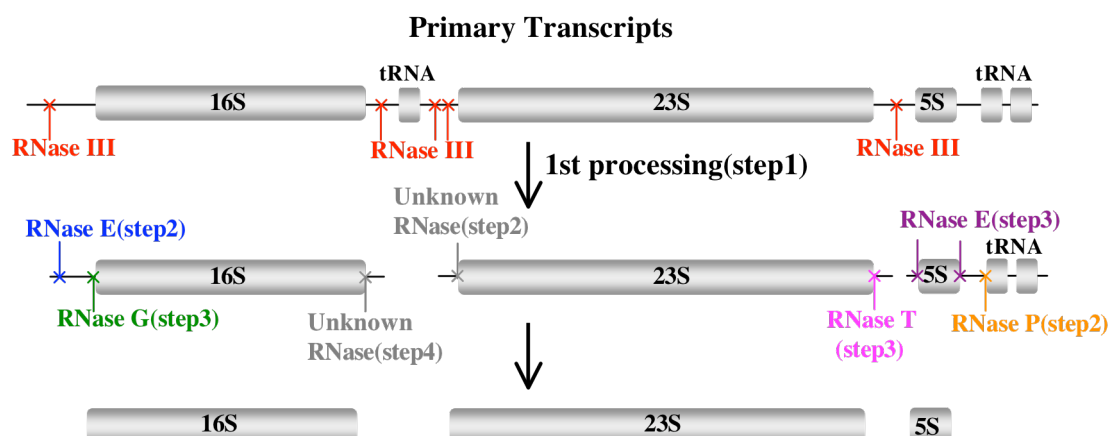


図.4 大腸菌のrRNAのプロセッシング

3種類のrRNA(23S,16S,5S)は、1つの大きな前駆体として転写され、その後、様々なRNaseによるプロセッシングを受けることで成熟したrRNAになる。

テップとして RNaseIII によって pre-16S、pre-23S、pre-5S に分離される(図.4; Srivastava and Schlessinger, 1990)。このステップの反応は非常に早く、*rrn* オペロンの転写が完了する前から始まることが知られており(King *et al*, 1984)、全長の *rrn* オペロンを保持している前駆体は、全体の rRNA の 1-2%程度しか存在していないことが報告されている(King *et al*, 1984)。RNaseIII によって分離された pre-16S rRNA は、その後、RNaseE、RNaseG という順序によって 5' 末端の余分な配列が取り除かれる(図.4; Li *et al*, 1999)。続いて、3' 末端の余分な配列も同様に取り除かれるが、その反応に関わる RNase はまだ不明である(図.4)。pre-23S rRNA は、5' 末端の余分な配列が取り除かれ、続いて RNaseT によって 3' 末端の配列が取り除かれる(図.4 ; Li *et al*, 1999)。pre-5S rRNA は、5S rRNA と tRNA の間の配列を RNaseP(リボザイム)によって切断され(Altman *et al*, 1995)、その後 RNaseE によって 5' および 3' 末端の余分な配列が取り除かれる(図.4; Ghora and Apirion, 1978)。また、プロセッシングは、RNase による切断や余分な配列の排除だけでなく、メチル化などの修飾をする酵素も関わっている。これに対し、枯草菌では、大腸菌の rRNA のプロセッシングに関与する多くの RNase が保存されていないことがわかっている。大腸菌と枯草菌の RNase の保存性を表.2 にまとめた。大腸菌で、16S と 5S rRNA のプロセッシングに関与している RNaseE は枯草菌では保存されていないものの、RNaseE の役割に対応する RNase が発見されている(Condon *et al*, 2001)。この RNase は RNaseM5 と呼ばれており、大腸菌の RNaseE の様に 5S rRNA の 5' および 3' 末端の配列を除去することが報告され

ている(Condon *et al*,2001)。しかしながら、枯草菌の rRNA のプロセッシングに関する研究は、非常に乏しく、その他のメカニズムはほとんど不明である。

表2 rRNAのプロセッシングに関わるRNaseの保存性

Name	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>
RNaseIII	+	+
RNaseP	+	+
RNaseE	+	-
RNaseG	+	-
RNaseT	+	-
RNaseM5	-	+

I-3-2 リボソームタンパク質のアッセムブリー

細胞内における 30S サブユニットの生合成は、 p_130S (p は precursor を意味する) と p_230S と呼ばれる 2 つの前駆体を経て合成され(Nierhaus *et al*,1973)、50S サブユニットの生合成は、 p_150S 、 p_250S と p_350S と呼ばれる 3 つの前駆体を経て合成される(Nierhaus *et al*,1973; Mangiarotti *et al*, 1968; Hayes F and Hayes D, 1971)。 P_230S は全てのリボソームタンパク質を含んでいるが、16S rRNA の 5' と 3' 末端の両方に余分な配列が残っている(Nierhaus *et al*,1973)。また、 p_350S は全てのリボソームタンパク質を含んでいるものの、成熟している 50S とは異なる沈降係数を示しているため、前駆体として同定されている(Hayes F and Hayes D, 1971)。

細菌のリボソームは、細胞内から精製した rRNA とリボソームタンパク質を試験管内で混ぜ合わせることで再構築することが可能である(Traub and Nomura, 1967; Nierhaus and Dohme, 1974)。試験管内での 30S サブユニットの再構築は RI_{30} (Reconstitution intermediate)と呼ばれる 1 つの中間体を経由する 2 つのステップによって行われ、50S サブユニットの再構築は、 $RI_{50}(1)$ と $RI_{50}(2)$ と呼ばれる 2 つの中間体を経由する 3 つのステップによって行われる(図.5, 6; Traub and Nomura, 1967; Nierhaus and Dohme, 1974)。また、これらの反応は完全に自発的に起こるが、そのためには、高いマグネシウム濃度と熱エネルギーを必要としている。試験管内での再構築の実験結果より、30S と 50S サブユニットの 2 種類のアッセムブリーマップが作製されている(図.5, 6; Held *et al*, 1974; Dohme and

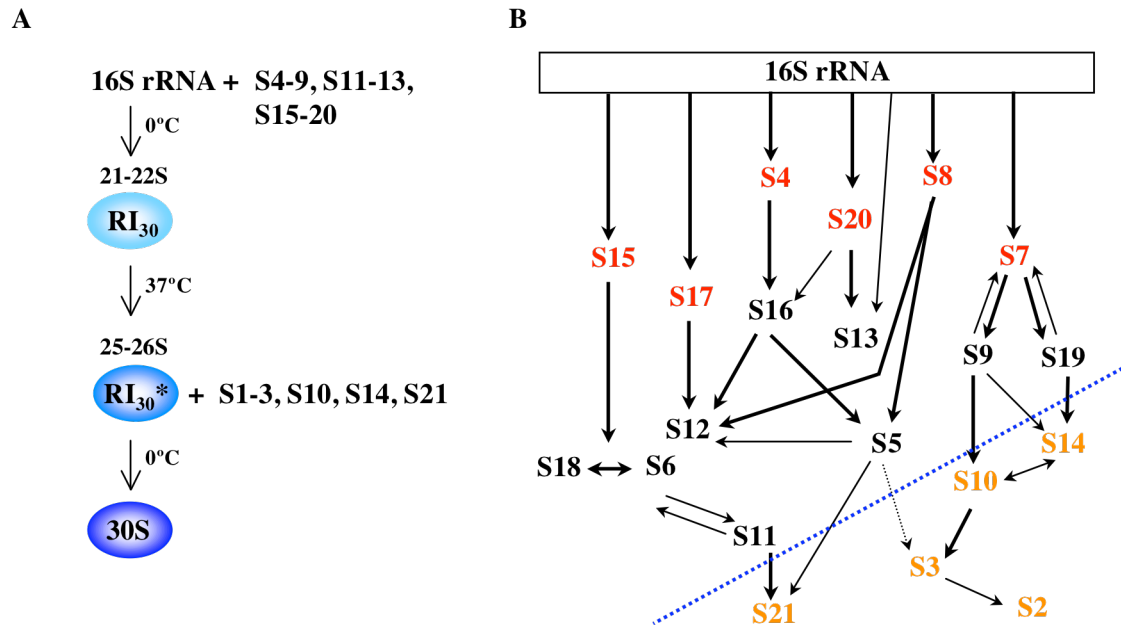


図. 5 in vitroにおける30Sサブユニットのアッセンブリー

A 試験管内での反応過程 *は熱による構造変換を表す。

B Nomuraらによって作製された大腸菌の30Sサブユニットのアッセンブリーマップ

矢印はそれぞれのタンパク質の集合の依存性を示している。また、リボソームタンパク質は3段階に分類されており、赤はprimary、黒はsecondary、オレンジはtertiary binding proteinを示している。青の点線はRI₃₀と30Sサブユニットに含まれるリボソームタンパク質の境界線である。

Nierhaus, 1976)。30S サブユニットのリボソームタンパク質は、6 つの primary binding proteins(S4, S7, S8, S15, S17, S20)、9 つの secondary binding proteins(S5, S6, S9, S11, S12, S13, S16, S18, S19)と 5 つの tertiary binding proteins(S2, S3, S10, S14, S21)にわけられる。再構築系の 1st ステップでは、primary と secondary binding proteins が集合することで RI₃₀ が形成され、2nd ステップでは、熱エネルギーによる RI₃₀ の構造変換の後に、tertiary binding proteins と結合することで 30S サブユニットを形成する(図.5)。50S サブユニットの 1st ステップでは、23S と 5S rRNA、そして early assembly proteins(L1, L2, L3, L4, L5, L7/12, L9, L10, L11, L13, L15, L17, L18, L20, L21, L22, L23, L24, L26, L29, L33, L34)が集合することで RI₅₀(1)が形成される。その後、RI₅₀(1)は、熱エネルギーによって RI₅₀*(1)へと構造変換し、late assembly proteins(L6, L14, L16, L19, L25, L27, L28, L30, L31, L32)と結合することで RI₅₀(2)を形成する。さらに RI₅₀(2)は熱エネルギーによって 50S サブユニットへと変換される(図.6)。

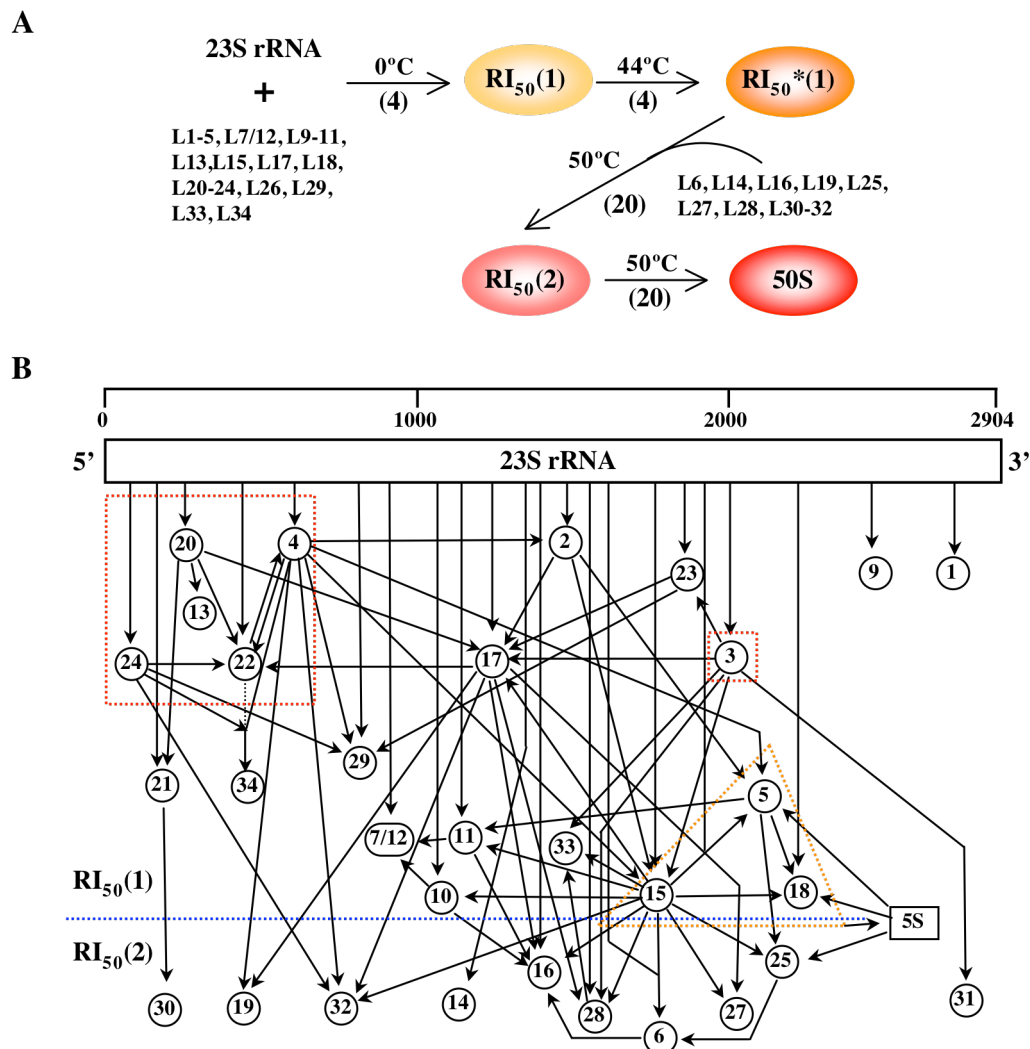


図. 6 in vitroにおける50Sサブユニットのアッセムブリー

- A** 試験管内での反応過程 *は熱による構造変換を表す。()内の数値は必要なマグネシウム濃度を示している。
- B** Nierhausらによって作製された大腸菌の50Sサブユニットのアッセムブリーマップ
矢印はそれぞれのタンパク質の集合の依存性を示している。赤い点線の四角で囲まれた領域に存在するタンパク質はRI₅₀^{*}(1)の形成に必須なタンパク質であり、オレンジの点線の三角で囲まれた領域に存在するタンパク質は5S rRNAの組み込みに必須なタンパク質である。青い点線はRI₅₀(1)とRI₅₀(2)に含まれるタンパク質の境界線である。

リボソームは、数多くの異なる分子の集合体(3 種類の rRNA と 50 種類以上のタンパク質)であることから、その生合成には構成成分の合成とそれぞれの成分の集合という 2 つの出来事が、同時に、かつ高い協調性を維持し、進行されなければならない。実際に、細胞内で観察される前駆体と in vitro での再構築系で観察される中間体に含まれているタンパク質を比較すると、30S と 50S サブユニットの両方で相違があることがわかる(表.3)。おそらく細胞内では、rRNA のプロセッシングとリボソームタンパク質の取り込みのタイミングをお互いのプロセスが決定しているはずである。しかしながら、現在のところ、その詳細はほとんど明らかになっていない。

表.3 リボソームの前駆体および再構築系でみられるリボソームの中間体に含まれるタンパク質(Nierhaus, 1991)

30S subunit				50S subunit					
Protein	p ₁ 30S	p ₂ 30S	RI ₃₀	Protein	p ₁ 50S	p ₂ 50S	p ₃ 50S	RI ₅₀ (1)	RI ₅₀ (2)
S1	+	+	-	L1	+	+	+	+	+
S2	-	+	-	L2	-	-	+	+	+
S3	-	+	-	L3	+	+	+	+	+
S4	+	+	+	L4	+	+	+	+	+
S5	+	+	+	L5	+	+	+	+	+
S6	-	+	+	L6	-	-	+	-	+
S7	-	+	+	L7/12	+/-	+	+	+	+
S8	+	+	+	L9	+	+	+	+	+
S9	-	+	+	L10	+	+	+	+	+
S10	-	+	-	L11	+/-	+	+	+	+
S11	-	+	+	L13	+	+	+	+	+
S12	-	+	-	L14	-	+	+	-	+
S13	+	+	+	L15	-	+	+	+	+
S14	-	+	-	L16	-	-	+	-	+
S15	+	+	+	L17	+	+	+	+	+
S16	+	+	+	L18	+	+	+	+	+
S17	+	+	+	L19	-	+	+	-	+
S18	-	+	+	L20	+	+	+	+	+
S19	-	+	+	L21	+	+	+	+	+
S20	+	+	+	L22	+	+	+	+	+
S21	+	+	-	L23	+	+	+	+	+
				L24	+	+	+	+	+
				L25	+	+	+	-	+
				L27	+	+	+	-	+
				L28	-	-	+	-	+
				L29	+	+	+	+	+
				L30	+	+	+	-	+
				L31	-	-	+	-	+
				L32	-	-	+	-	+
				L33	-	+	+	+	+

I-3-3 リボソームの生合成に関与する因子

真核生物のリボソームの生合成の研究において、最も研究が進んでいるのは酵母である。酵母のリボソームの生合成は、ほとんど核内で行われることが知られており、リボソームタンパク質の集合には 100 種類近くの因子(タンパク質や RNA)が関与していることが報告されている(Fromont-Racin *et al*, 2003; Fatica and Tollervey, 2002)。一方、細菌では、試験管内での再構築が可能であったことから、長い間、リボソームタンパク質の集合は自発的に起こると考えられてきた。しかしながら、試験管内での再構築は、細胞内に比べて、長い時間、高いマグネシウム濃度と熱エネルギーが必要であることから、細胞内にこの反応を促進する因子が存在するのではないかと考えられるようになってきている。実際に、最近の報告で、シャペロンである DnaK や RNA ヘリカーゼである SrmB や CsdA がリボソームの生合成に関与していることが示唆されている(Charollais *et al*, 2004; Charollais *et al*, 2003; Haga and Alix, 2004; Maki *et al*, 2002)。DnaK の温度感受性変異株(*dnaK756-ts*)を 44°C で生育させると、細胞内に 30S と 50S サブユニットの前駆体の蓄積が観察される(Haga and Alix, 2004)。また、試験管内での 30S サブユニットの再構築は、前述した様に、RI₃₀ から RI₃₀*への構造変換に熱エネルギーを必要としているが、反応系に DnaK が存在すると、熱エネルギーなしに再構築が完了することも報告されている(Maki *et al*, 2002)。*srmB* の欠失変異株は、低温で細胞の増殖速度が低下し、50S サブユニットの前駆体が蓄積する(Charollais *et al*, 2003)。さらに *csdA* の欠失変異株でも同様に、低温での細胞増殖の阻害と 50S サブユニットの前駆体の蓄積が観察されている(Charollais *et al*, 2004)。また、前述した様に、Era、Obg や YjeQ といった GTP 結合タンパク質もリボソームの生合成に関与していることが示唆されている(Inoue *et al*, 2003; Sharma *et al*, 2005; Lin *et al*, 2004; Wout *et al*, 2004; Datta, *et al*, 2004; Sato *et al*, 2005; Daiagle and Brown, 2004; Himeno *et al*, 2004)。

I-4 本研究の目的

Era/Obg スーパーファミリーに所属するタンパク質は、細菌だけでなくヒトなどの高等真核生物にまで広く保存されており、多くのメンバーが細菌の細胞増殖に必須であることもわかっている。最近の研究結果より、Era/Obg スーパーファミリーに所属するいくつかのタンパク質 (Era, Obg, YjeQ)がリボソームの機能に関与していることが示唆された(Inoue *et al*, 2003; Sharma *et al*, 2005; Lin *et al*, 2004; Wout *et al*, 2004; Datta, *et al*, 2004; Sato *et al*, 2005; Daiagle and Brown, 2004;

Himeno *et al*, 2004)。その中でも Era は、生化学的解析や低温電子顕微鏡による構造解析などによってリボソームの生合成に関与していることが示唆されており、さらに 30S サブユニットの生合成の最後に起こる S1 タンパク質による mRNA の誘導を制御しているという仮説が提案されている(Sharma *et al*, 2005)。一方、Obg や YjeQ はリボソームの生合成という大きな枠組みに関わっているということがわかっているだけである。Era/Obg スーパーファミリーには、Era、Obg や YjeQ 以外にも細菌の細胞増殖に必須であるタンパク質が多く存在しており、細菌の細胞増殖の制御システムを理解する上で、これらのタンパク質の機能解明が必要不可欠であるにも関わらず、その機能は未だ不明のままである。そこで本研究では、機能未知であり、かつ枯草菌の細胞増殖に必須である Era/Obg スーパーファミリー(Era, Obg, YphC, YsxC, YlqF, YqeH)の細胞内における機能の解明を目指した。

第 2 章では、GTP 結合タンパク質をカラムに結合させたアフィニティークロマトカラムを用いた複合体解析を行い、YsxC と YlqF がリボソーム粒子と相互作用する可能性を見いだした。さらに、ショ糖密度勾配遠心法を用いた GTP 結合タンパク質とリボソームの結合解析では、すでに報告されている Obg と 50S サブユニットの結合以外に、YlqF と 50S サブユニット、YsxC と 70S リボソームの結合を新たに見いだした。また、YlqF は、GTP の非加水分解類似物(GTP γ S)の存在下でのみ 50S サブユニットと結合でき、粗リボソーム画分によって内在性の GTP 加水分解能が上昇することも見いだした。次に GTP 結合タンパク質をコードする遺伝子(*era*, *obg*, *yphC*, *ysxC*, *ylqF*, *yqeH*)の発現を IPTG で制御できる株(6 種類)をもちいて、それぞれの GTP 結合タンパク質の枯渇条件下におけるリボソームプロファイルを観察した。その結果、全ての GTP 結合タンパク質の枯渇条件下で、70S リボソームの減少と 50S、30S サブユニットの増加が観察された。さらに、それぞれの GTP 結合タンパク質の枯渇による影響を、他の GTP 結合タンパク質の過剰発現が抑圧できるか調べたところ、全てのパターンで抑圧できないことがわかった。このことは 6 種類の GTP 結合タンパク質は、全てリボソームの生合成に関わっているが、各タンパク質が担っている機能は明らかに異なっていることを示唆している。

第 3 章では、YlqF と 50S サブユニットの相互作用を詳細に調べ、50S サブユニットと YlqF の関係を明らかにすることを目的に解析を行った。In vitro における YlqF と 50S サブユニットの結合解析では、YlqF と 50S サブユニットの結合

比が 2 対 1 であることを明らかにし、さらに YlqF は成熟した 50S サブユニットによって内在性の GTP 加水分解能が特異的に促進されることも見いだした。次に、DMS フットプリント法と酵母 2 ハイブリッド法を用いて、リボソーム上における YlqF の結合領域の同定を試みた。その結果、YlqF は、50S サブユニットの会合面である A サイトと P サイトの周辺に結合することが明らかになった。さらに、枯草菌細胞内における YlqF の枯渇条件下では、70S サブユニットが減少し、未成熟な 50S サブユニットが蓄積され、その未成熟な 50S サブユニットはリボソームタンパク質 L16 と L27 を失っていることも見いだした。リボソームタンパク質 L16 と L27 は共に late assembly protein に属しており、DMS フットプリント法で同定した YlqF の結合領域に隣接した領域に結合する。以上の結果より、YlqF は 50S サブユニットの後期生合成ステップにおいて、リボソームタンパク質 L16 と L27 の取り込みに関わっていることが示唆された。

II. GTP 結合タンパク質とリボソームの関係

はじめに

大腸菌の Era や枯草菌の Obg のオルソログを含め、細菌の細胞増殖に必須な Era/Obg スーパーファミリーに所属するタンパク質がこれまでに数多く報告されてきた。枯草菌には、10 種類の Era/Obg スーパーファミリーに所属するタンパク質が存在し、その内 7 種類ものタンパク質が細胞の増殖に必須であることが明らかにされている。これほど多くのパラログタンパク質が細胞の増殖に必須であることは驚くべきことであり、これらのタンパク質の細胞内機能を明らかにすることは、細菌の増殖の制御システムを理解する上で必要不可欠である。また、Era/Obg スーパーファミリーに所属する GTP 結合タンパク質は、高等真核生物にまで保存されていることから、細菌にとどまらず生物に普遍的な機能を担っていると考えられる。これまでに Era/Obg スーパーファミリーのタンパク質に関する研究は数多く報告されてきたが、近年では、これらのタンパク質がリボソームの生合成やタンパク質合成などのリボソーム機能に関わっている可能性を示す報告がなされている。しかしながら、これまでの報告では、これらのタンパク質の細胞内機能を分子生物学レベルで証明するにはまだ不十分であり、より詳細な解析が必要とされている。

この章では、枯草菌の細胞増殖に必須であり、Era/Obg スーパーファミリーに所属する 6 種類の GTP 結合タンパク質を同時に解析することで、それぞれのタンパク質の相違点を比較した。

II-1. 材料と方法

II-1-1. 菌株と培養条件

第2章で使用した菌株を表4にまとめた。枯草菌株の培養は、特に記載がない場合はLB培地(10g/L Bactotryptone、5g/L Bacto yeast extract、10g/L NaCl)を用い、37°Cで行った。また、CRK6000およびその株をベースとした菌株の培養には、最終濃度20μg/mlのadenineとguanosine、50μg/mlのmethionineとhistidineを加えた培地を使用した。また、必要に応じて以下の最終濃度になるように抗生物質を加えた:0.5μg/ml エリスロマイシン、10μg/ml テトラサイクリン、5μg/ml クロラムフェニコール、100μg/ml スペクチノマイシン、5μg/mlのカナマイシン。大腸菌株の培養は、LB培地で37°Cもしくは30°Cで行い、必要に応じて以下の最終濃度になるように抗生物質を加えた:50μg/ml アンピシリン、30μg/ml カナマイシン。

II-1-2. プラスミドとその作製

2章で使用したプラスミドを図.7および表.5に示した。また、各プラスミドの作製に使用したプライマーの配列を表.6に示した。プラスミドの作製に使用したPCRキット、制限酵素、ライゲーションキットはTAKARAのものを使用した。pDONORとpNO41GWをベクターとして作製したプラスミドは、Gateway technology(後述)を利用し、それぞれのベクターへのインサートの組み込みには、invitrogen社のBPクロナーゼとLRクロナーゼを使用した。

大腸菌にはエレクトロポレーション法もしくはHanahan法(Hanahan *et al*, 1983)を用いてプラスミドDNAを導入し、抗生物質を含むLB寒天培地で形質転換体を選択した。これを抗生物質を含むLB培地10ml中で一晚培養し、アルカリSDS法(Sambrook *et al*, 1989)でプラスミドDNAを抽出した。また、目的とする断片がクローニングされたことを確認するために、PCRにより増幅し、それを鋳型にABI社のBigDyeTMterminator Cycle sequencing Ready Reactionを用いて付属のマニュアルに従い反応し、ABI3100型シーケンサーで塩基配列を決定した。

表.4 第2章で使した菌株

菌株	遺伝子型	参考文献と構築
<i>B.subtilis</i>		
168	trpC2	研究室ストック
CRK6000	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB</i>	研究室ストック
TMO101	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, bex::pTM101(Pspac-bex erm)</i>	Morimoto <i>et al.</i> ,2002
TMO102	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, obg::pTM102(Pspac-obg erm)</i>	Morimoto <i>et al.</i> ,2002
TMO303	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yphC::tet, amyE::Pspac-yphC cat</i>	Morimoto <i>et al.</i> ,2002
TMO104	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yxxC::pTM104(Pspac-yxxC erm)</i>	Morimoto <i>et al.</i> ,2002
TMO208	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, ylfF::pTM208(Pspac-ylfF erm)</i>	Morimoto <i>et al.</i> ,2002
TMO309	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yqeH::tet, aprE::Pspac-yqeH spec</i>	Morimoto <i>et al.</i> ,2002
TMO101C	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, bex::pTM101(Pspac-bex erm), pNO41</i>	本研究
TMO101B	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, bex::pTM101(Pspac-bex erm), pNOB</i>	本研究
TMO101O	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, bex::pTM101(Pspac-bex erm), pNOO</i>	本研究
TMO101P	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, bex::pTM101(Pspac-bex erm), pNOP</i>	本研究
TMO101S	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, bex::pTM101(Pspac-bex erm), pNOS</i>	本研究
TMO101L	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, bex::pTM101(Pspac-bex erm), pNOL</i>	本研究
TMO101Q	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, bex::pTM101(Pspac-bex erm), pNOQ</i>	本研究
TMO102C	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, obg::pTM102(Pspac-obg erm), pNO41</i>	本研究
TMO102B	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, obg::pTM102(Pspac-obg erm), pNOB</i>	本研究
TMO102O	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, obg::pTM102(Pspac-obg erm), pNOO</i>	本研究
TMO102P	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, obg::pTM102(Pspac-obg erm), pNOP</i>	本研究
TMO102S	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, obg::pTM102(Pspac-obg erm), pNOS</i>	本研究
TMO102L	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, obg::pTM102(Pspac-obg erm), pNOL</i>	本研究
TMO102Q	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, obg::pTM102(Pspac-obg erm), pNOQ</i>	本研究
TMO303C	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yphC::tet, amyE::Pspac-yphC cat, pNO41</i>	本研究
TMO303B	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yphC::tet, amyE::Pspac-yphC cat, pNOB</i>	本研究
TMO303O	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yphC::tet, amyE::Pspac-yphC cat, pNOO</i>	本研究
TMO303P	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yphC::tet, amyE::Pspac-yphC cat, pNOP</i>	本研究
TMO303S	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yphC::tet, amyE::Pspac-yphC cat, pNOS</i>	本研究
TMO303L	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yphC::tet, amyE::Pspac-yphC cat, pNOL</i>	本研究
TMO303Q	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yphC::tet, amyE::Pspac-yphC cat, pNOQ</i>	本研究
TMO104C	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yxxC::pTM104(Pspac-yxxC erm), pNO41</i>	本研究
TMO104B	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yxxC::pTM104(Pspac-yxxC erm), pNOB</i>	本研究
TMO104O	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yxxC::pTM104(Pspac-yxxC erm), pNOO</i>	本研究
TMO104P	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yxxC::pTM104(Pspac-yxxC erm), pNOP</i>	本研究
TMO104S	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yxxC::pTM104(Pspac-yxxC erm), pNOS</i>	本研究
TMO104L	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yxxC::pTM104(Pspac-yxxC erm), pNOL</i>	本研究
TMO104Q	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yxxC::pTM104(Pspac-yxxC erm), pNOQ</i>	本研究
TMO208C	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, ylfF::pTM208(Pspac-ylfF erm), pNO41</i>	本研究
TMO208B	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, ylfF::pTM208(Pspac-ylfF erm), pNOB</i>	本研究
TMO208O	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, ylfF::pTM208(Pspac-ylfF erm), pNOO</i>	本研究
TMO208P	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, ylfF::pTM208(Pspac-ylfF erm), pNOP</i>	本研究
TMO208S	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, ylfF::pTM208(Pspac-ylfF erm), pNOS</i>	本研究
TMO208L	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, ylfF::pTM208(Pspac-ylfF erm), pNOL</i>	本研究
TMO208Q	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, ylfF::pTM208(Pspac-ylfF erm), pNOQ</i>	本研究
TMO309C	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yqeH::tet, aprE::Pspac-yqeH spec, pNO41</i>	本研究
TMO309B	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yqeH::tet, aprE::Pspac-yqeH spec, pNOB</i>	本研究
TMO309O	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yqeH::tet, aprE::Pspac-yqeH spec, pNOO</i>	本研究
TMO309P	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yqeH::tet, aprE::Pspac-yqeH spec, pNOP</i>	本研究
TMO309S	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yqeH::tet, aprE::Pspac-yqeH spec, pNOS</i>	本研究
TMO309L	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yqeH::tet, aprE::Pspac-yqeH spec, pNOL</i>	本研究
TMO309Q	<i>purA16, metB5, hisA3, guaB, yqeH::tet, aprE::Pspac-yqeH spec, pNOQ</i>	本研究
<i>E.coli</i>		
C600	<i>supE44 hsdR thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21</i>	研究室ストック
DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169(ϕ80 lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1 gyrA96, thi-1, relA1</i>	研究室ストック
DB3.1	F-, <i>gyrA462ebdA1Δ(srI-recA), mcrB, mrr, hsd, S20(r_Bm_B), supE44, ara-14, galK2, lacY1, proA2, rpsL20(Smr), xyl-5, leu</i>	研究室ストック
BL21(DE3)pLysS	F- <i>ompT hsdSB(r_Bm_B) gal dcm D(srl-recA)306::Tn10(DE3) pLysS</i>	Novagen

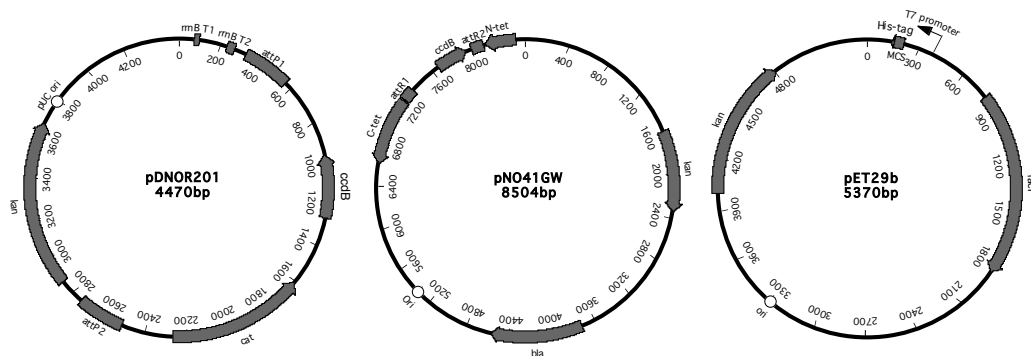


図.7 プラスミドベクター

<i>kan</i>	カナマイシン耐性遺伝子	<i>rrnT1</i>	<i>rrnB</i> 由来のターミネーター
<i>bla</i>	アンピシリン耐性遺伝子	<i>rrnT2</i>	<i>rrnB</i> 由来のターミネーター
<i>C-tet</i>	テトラサイクリン耐性遺伝子のC末端領域	<i>attP1</i>	BPクローナーゼの組み換え反応に必要な配列
<i>C-tet</i>	テトラサイクリン耐性遺伝子のC末端領域	<i>attP2</i>	BPクローナーゼの組み換え反応に必要な配列
<i>lacI</i>	ラクトースオペロンのリプレッサー遺伝子	<i>attR1</i>	LRクローナーゼの組み換え反応に必要な配列
<i>cat</i>	カナマイシン耐性遺伝子	<i>attR2</i>	LRクローナーゼの組み換え反応に必要な配列
<i>ccdB</i>	DNAジャイレースを不活化する遺伝子	<i>MCS</i>	マルチクローニングサイト
<i>pUC ori</i>	大腸菌の複製起点	<i>ori</i>	大腸菌の複製起点

表.5 第2章で使したプラスミド

プラスミド	ベクター	インサート	由来(参考文献)
pDONRE	pDONOR201	SD領域を含む <i>era</i> の全長領域 (903bp)	本研究
pDONRO	pDONOR201	SD領域を含む <i>obg</i> の全長領域 (1284bp)	本研究
pDONRP	pDONOR201	SD領域を含む <i>yphC</i> の全長領域 (1308bp)	本研究
pDONRS	pDONOR201	SD領域を含む <i>ysxC</i> の全長領域 (585bp)	本研究
pDONRLQ	pDONOR201	SD領域を含む <i>ylqF</i> の全長領域 (846bp)	本研究
pDONRQ	pDONOR201	SD領域を含む <i>yqeH</i> の全長領域 (1098bp)	本研究
pNOE	pNO41GW	SD領域を含む <i>era</i> の全長領域 (903bp)	本研究
pNOO	pNO41GW	SD領域を含む <i>obg</i> の全長領域 (1284bp)	本研究
pNOP	pNO41GW	SD領域を含む <i>yphC</i> の全長領域 (1308bp)	本研究
pNOS	pNO41GW	SD領域を含む <i>ysxC</i> の全長領域 (585bp)	本研究
pNOL	pNO41GW	SD領域を含む <i>ylqF</i> の全長領域 (846bp)	本研究
pNOQ	pNO41GW	SD領域を含む <i>yqeH</i> の全長領域 (1098bp)	本研究
pETE	pET29b	<i>era</i> の全長領域 (903bp)	Morimoto <i>et al</i> , 2002
pETO	pET28b	<i>obg</i> の全長領域 (1284bp)	Morimoto <i>et al</i> , 2002
pETP	pET29b	<i>yphC</i> の全長領域 (1308bp)	本研究
pETS	pET29b	<i>ysxC</i> の全長領域 (585bp)	本研究
pETL	pET29b	<i>ylqF</i> の全長領域 (846bp)	本研究
pETQ	pET29b	<i>yqeH</i> の全長領域 (1098bp)	Morimoto <i>et al</i> , 2002

表.6 第2章で使したプライマー

プライマー	配列
SD.era-GWF	<u>AAAAAGCAGGCTCG</u> GGCGCATTTTCATCGGAGGA
era-gwR	<u>AGAAAGCTGGGTC</u> AGAGATTAATATTCGTCCTC
SD.obg-GWF	<u>AAAAAGCAGGCTCG</u> GGTTTAGAACGGAGGACATT
obg-gwR	<u>AGAAAGCTGGGTC</u> TGATTAATCAATAAAATTCAAATTC
SD.yphC-GWF	<u>AAAAAGCAGGCTCG</u> GGATTGAAAGGAAGGGTACT
yphC-gwR	<u>AGAAAGCTGGGTC</u> CTTTTATTTTCTAGCTCTTGC
SD.ysxC-GWF	<u>AAAAAGCAGGCTCG</u> GCCTTAGTAGGAGAGAAGAA
ysxC-gwR	<u>AGAAAGCTGGGTC</u> CCTCTACCGGTTTATCATTT
SD.ylqF-GWF	<u>AAAAAGCAGGCTCG</u> AAAGGCGGTGTTTCGTGTCAC
ylqF-gwR	<u>AGAAAGCTGGGTC</u> TTACATCGTCGGCTGTTCAA
SD.yqeH-GWF	<u>AAAAAGCAGGCTCG</u> TTCAGTGGGAGGAGTAAGAA
yqeH-gwR	<u>AGAAAGCTGGGTC</u> TTCTTAAATTAATGAACGCCG
yphC-F	aaggagggtcat <u>ATGGGTAAACCTGTCGTAGCC</u>
yphC-R	agaagatc <u>TTTTCTAGCTCTTGCAAATATTTTG</u>
ysxC-F	taggagagaacat <u>ATGAAAGTCACAAAGTCAGAAATCG</u>
ysxC-R	ggaggatc <u>CCGGTTTATCATTTTTTTGATCGC</u>
ylqF-F	tgatcat <u>ATGACAATTCAATGGTTCCCGGGCCATATGGC</u>
ylqF-R	agaagatctatCATCGTCGGCTGTTCAAATGACAGCC
attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCG
attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC
pDONOR-F	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC
pDONOR-R	GTGTCTCAAAATCTCTGATGTTAC
pNO41GW-F	CGGCGACGATAGTCATGC
pNO41GW-R	TCCTGCTCGCTTCGCTAC
pET-F	GTGCTCAACGGCCTCAACCTACT
pET-R	CCACTGAGATCCGGCTGCTA

大文字の下線はattBの配列の一部を示し、小文字の下線は制限酵素の認識配列を示す。

II-1-3. Gateway テクノロジー

Gateway テクノロジーはλファージの部位特異的な組み換え (Landy, 1989) を利用したクローニング技術である (図.8)。

まず目的の遺伝子の 5' -末端と 3' -末端にそれぞれ attB1 の 3' -末端から 14 塩基、attB2 の 5' -末端から 8 塩基を加えたプライマー (SD.era-GWF, era-gwR, SD.obg-GWF, obg-gwR, SD.yphC-GWF, yphC-gwR, SD.ysxC-GWF, ysxC-gwR, SD.ylqF-GWF, ylqF-gwR, SD.yqeH-GWF, yqeH-gwR) を作製し、枯草菌 168 の染色体を鋳型にそのプライマーを用いて目的断片を PCR で増幅した。次に増幅さ

れた断片を鋳型に、プライマー attB1、attB2 を使用し、両端に attB1、attB2 の配列をもった目的断片を増幅した。その後、目的断片を BP Clonase Enzyme mix (Invitrogen)によって donor vector に組み換え、entry clone を作製した。entry clone を大腸菌 DH5 α 株に導入し増幅後、さらに目的遺伝子を LR Clonase Enzyme mix(Invitrogen)を用いて destination vector に組み換え、expression clone を作製した。

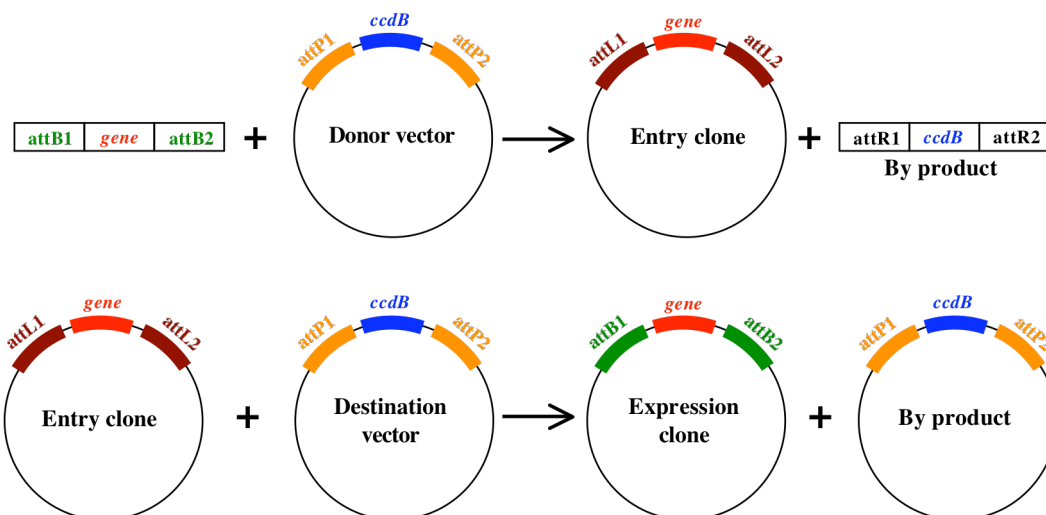


図.8 Gateway テクノロジーを用いたサブクローニング

donor vector、entry clone、destination vector、expression cloneはそれぞれ、pDONOR201、pDONOR201-gene、pNO41GW、pNO41-geneを示す。また、*ccdB*遺伝子が存在するdonor vectorもしくはdestination vectorをもつ大腸菌株(DH5 α)は生育することができないため、donor vectorとdestination vectorを大腸菌細胞内で増幅するときにはDB3.1株(*ccdB*耐性)を宿主細胞として用いた。

II-1-4 第2章で使用した緩衝液

第2章で使用した緩衝液を以下に示した。

Buffer A, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, 100 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 6 mM β -mercaptoethanol, and 2 mM PMSF

Buffer B, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 15 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, 1 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 6 mM β -mercaptoethanol, and 2 mM PMSF

buffer C, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, 100 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 6 mM β -mercaptoethanol, and 2 mM PMSF

Binding buffer, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole

Washing buffer, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole

II-1-5 枯草菌の形質転換

枯草菌 CRK6000 株または 168 株を Kunst らの方法に従って形質転換し、抗生物質を含む LB 寒天培地で形質転換体を選択した(Kunst *et al*, 1994)。

II-1-6 GTP 結合タンパク質の精製

大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株に、各遺伝子の全長を組み込んだプラスミド (pET29b シリーズ) を導入し、30 $\mu\text{g/ml}$ の Kanamycin を含む LB 培地 500 ml 中で 30 $^{\circ}\text{C}$ 、280 rpm の条件で培養した。OD₆₀₀ が 0.6 に達した時点で終濃度 1 mM となるように IPTG を添加し、3 時間後に集菌した。PET SYSTEM (Novagen) のマニュアルに従い、得られた細胞から C 末端に His₆ タグを付加したタンパク質を精製した (Obg は N 末端)。まず、細胞を Binding Buffer (0.5 M NaCl, 5 mM Imidazole, 20 mM Tris/HCl pH7.9) で洗浄した後、10 ml の Binding Buffer に懸濁し、氷上で超音波による細胞破碎を行った。得られた細胞破碎液を 4 $^{\circ}\text{C}$ 、39000 g で 30 分遠心し、その上清から Ni-agarose resin (Novagen) を充填したカラムを用いて、His₆ タグ付のタンパク質の精製を試みた。GTP 結合タンパク質が結合したカラムは 10 ml の Binding Buffer で 3 回洗浄した後、10~60 mM Imidazole を含む Binding Buffer で目的タンパク質を溶出した。解析には 60 mM Imidazole を含む Binding Buffer で溶出させた画分を、Buffer A で透析したものを使用した。精製タンパク質を含む画分は終濃度 10 % となるグリセロールを加え -80 $^{\circ}\text{C}$ で保存し、試料中のタンパク質濃度の測定は、Protein Assay Reagent (Bio Rad) を用いて行った。

II-1-7 複合体解析

複合体解析は、GTP 結合タンパク質をカラムに結合させたアフィニティークロマトカラムを利用した。アフィニティークロマトカラムは、His₆ タグ付きの GTP 結合タンパク質を大腸菌 (BL21 (DE3) pLysS) 内で過剰発現させ、GTP 結合タンパク質の精製法と同じ手法を利用して Ni-agarose resin に結合させることで作製した (II-1-6 参照)。次に、枯草菌 168 株を LB 培地 500ml 中で培養し、OD₆₀₀ が 0.6 に達したところで集菌した。この細胞を Binding buffer に懸濁し、フレンチプレス (8000psi) を用いて破碎することで細胞抽出液を調整した。その後、アフィニティークロマトカラムをもちいて、塩化ナトリウムの濃度勾配により細胞抽出液から GTP 結合タンパク質と複合体を形成する因子を分離精製した。得られ

た複合体は、SDS-PAGE で分離し、それぞれのタンパク質をトリプシン消化後、質量分析計で同定した。

II-1-8 質量分析計によるタンパク質の同定

タンパク質のゲル内トリプシン消化は Shevchenko らの方法(Shevchenko *et al*, 1996)をもとに改変を加えて行った。アフィニティーカラムの溶出画分を 4-20% の SDS-PAGE にて分離後、タンパク質のバンドを切り出した。ゲル片はアセトニトリルで脱水し、その後、10mM DTT を含む重炭酸アンモニウムを加え、56°C で 45 分間インキュベートすることで還元化した。次に室温にて 55mM ヨード酢酸を含む 100mM 重炭酸アンモニウムを加え、暗条件下で 30 分反応させることでアルキル化を行った。得られた試料は、アセトニトリルを添加して脱水し、100mM 重炭酸アンモニウムで膨潤させた後、12.5 μ g/ml トリプシンを含む 50mM 重炭酸アンモニウム溶液中にて、37°C で一晩インキュベートした。その後、室温にてゲル内にあるペプチドを、25mM 重炭酸アンモニウムで 1 回、5%ギ酸を含むアセトニトリルで 2 回抽出し、スピードバックコンセンレーターで乾燥させ 5%ギ酸に溶解した。この試料を ESI-イオントラップ型質量分析装置 (LC/MS; Thermo Electron, Michrom Bioresousis)に導入し、得られた解析結果から、検索ソフト Mascot を用いてデータベース検索を行った。

II-1-9 リボソームプロファイルの観察

リボソームプロファイルの観察は、シヨ糖密度勾配遠心法を利用して行った。対数増殖期の細胞をフレンチプレス(8000psi)で破碎し、得られた細胞抽出液を 10-40%のシヨ糖密度勾配の上に乗せ、90000 g で 14 時間遠心した。その後、得られたシヨ糖密度勾配を Gradient station (BIOCOMP)にセットし、254nm の吸光度を測定した。全ての過程を 4°C で行い、使用した緩衝液は、全て DEPC で処理することによって RNase を不活化したものを使用した。

II-1-10 ウェスタンブロット法

ウェスタンブロットに使用した His 融合タンパク質に対するウサギ抗体は研究室にあるものを使用した(Morimoto *et al*, 2002)。枯草菌のタンパク質の調整は Hassan らの方法に従った(Hassan *et al*, 1997)。枯草菌の全タンパク質、もしくはシヨ糖密度勾配遠心法によって分画した画分に含まれる全タンパク質を

SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜 Hybond-P(Amersham Pharmacia)にブロットした。このメンブランをブロッキング溶液(5% skim milk, 30mM Tris/HCl pH 7.4, 200mM NaCl)で処理し、1 次抗体 (抗 GTP 結合タンパク質ウサギ抗体) と HRP 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体(Bio-Rad)を反応させ、ECL-Plus system (Amersham Pharmacia)によりシグナルを検出した。

II-1-11 粗リボソーム画分の調整

粗リボソーム画分の精製は Nanamiya らの方法に従った(Nanamiya *et al*, 2004)。枯草菌 168 株を 37°C の LB 培地中で OD₆₀₀ が 0.6 に達するまで培養し、その後、細胞を集菌した。細胞は、Buffer A に懸濁し、フレンチプレス(8000psi)を用いて破碎した。得られた細胞抽出液を 8000 g で 10 分間遠心後、上清をさらに 240000 g で 100 分間超遠心した。次に超遠心後の沈殿を、Buffer B に懸濁し、再び 40000 g で 1 時間超遠心した。得られた上清の 2ml を 30% のショ糖を含む 2ml の Buffer B の上に乗せ、240000 g で 3.5 時間超遠心し、沈殿を Buffer A で懸濁したものを粗リボソーム画分とした。粗リボソーム画分は使用するまで -80°C で保存した。また、培養以外の過程は全て 4°C で行い、使用した緩衝液は、全て DEPC で処理することによって RNase を不活化したものを使用した。

II-1-12 GTP 加水分解能の測定

GTP 加水分解能の測定は Welsh らの方法を少し改変した方法を用いた(Welsh *et al*, 1994)。Buffer A 中に 0.7 μ M GTP 結合タンパク質、2 μ M GTP、0.1 μ M 粗リボソーム画分、1.2pmol (0.27x10⁵Bq) [γ -³²P]GTP (2.22x10¹⁴Bq/mmol ; Perkin Elmer)を加え、37°C にて 30 分間反応を行った。反応開始を 0 分とし、10 分間隔でサンプリングした反応液に氷冷した 6% の活性炭を含む Buffer A を 100 μ l 加え、反応を停止させた。この反応液をよく攪拌することで、活性炭に未分解の GTP を吸着させた。その後、遠心分離によって活性炭を沈殿化させた後、50 μ l の上清中に含まれる ³²P を液体シンチレーションカウンター (BECKMAN)で測定した。使用した緩衝液は、全て DEPC で処理することによって RNase を不活化したものを使用した。

II-2. 結果

II-2-1. Era/Obg スーパーファミリーの複合体解析

単量体GTP結合タンパク質は自身の持つ内在性のGTP加水分解能を調節する因子やエフェクター分子など、様々な因子と相互作用することが知られている。つまり、Era/Obg スーパーファミリーに所属するタンパク質と相互作用する因子を同定することができれば、今後の解析の大きな手がかりになるはずである。そこで初めに、枯草菌の細胞増殖に必須な6種類のGTP結合タンパク質(YsxC、YlqF、YphC、YqeH、Era、Obg)と相互作用する因子を同定するために、それぞれのGTP結合タンパク質をカラムに結合させたアフィニティークロマトカラムを用いた複合体解析を行った。まず、PET SYSTEM を利用し、各GTP結合タンパク質のC末端領域にHis₆タグを融合させたもの(Obg だけはN末端)を大腸菌内で過剰発現させ、Ni-カラムを用いて精製した。得られた精製タンパク質の純度は、全て98%以上であった(図.9)。アフィニティークロマトカラムは、精製したHis₆タグ付きのGTP結合タンパク質をNi-アガロースに吸着させることで作製した。このカラムに枯草菌の細胞抽出液を通し、塩化ナトリウムの濃度勾配を利用して、GTP結合タンパク質と特異的に複合体を形成する因子を分離精製した。その後、得られたフラクションをSDS-PAGEで分離し、それぞれのバンドに含まれるタンパク質をトリプシン消化後、質量分析計で同定した(図.10A)。その結果、YsxCとYlqFを吸着させたカラムからの溶出パターンは、精製したリボソーム粒子のパターンに非常に良く似ていることが明らかになった(図.10B, C)。また、実際にバンドに含まれるタンパク質を質量分析計で同定したところ、多くのリボソームタンパク質が同定された(図.10B, C)。このことは、YsxCとYlqFがリボソーム粒子と複合体を形成していることを示唆している。一方、残りの4種類のGTP結合タンパク質(Era, Obg, YqeH, YphC)を吸着させたカラムからは、YsxCやYlqFのカラムから得られたパターンとは異なり、いくつかのリボソームタンパク質のバンドだけが得られた(図.10A, D-G)。このことは、Era, Obg, YqeH, YphCがリボソーム粒子ではなく、特定のリボソームタンパク質に結合すること、もしくは、YsxCやYlqFよりもリボソームとの親和性が低いため、精製段階で解離してしまったことを示しているのではないだろうか？

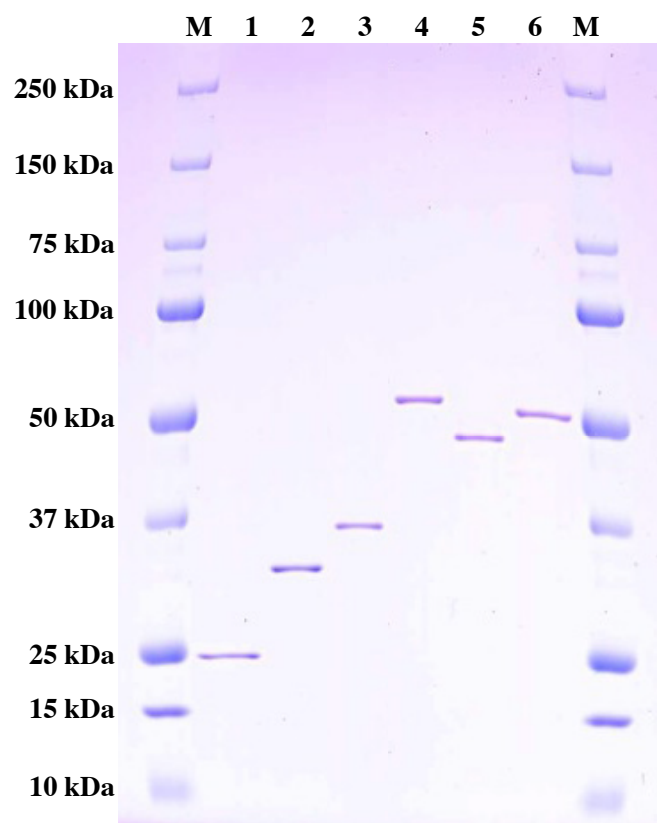


図.9 精製したGTP結合タンパク質のSDS-PAGE

精製した各GTPタンパク質(1 μ g)をSDS-PAGE後、CBB染色にて検出した。Lane M,1, 2, 3, 4, 5, 6はそれぞれ、タンパク質マーカー, YsxC, YlqF, Era, YphC, YqeH, Obgを示す。

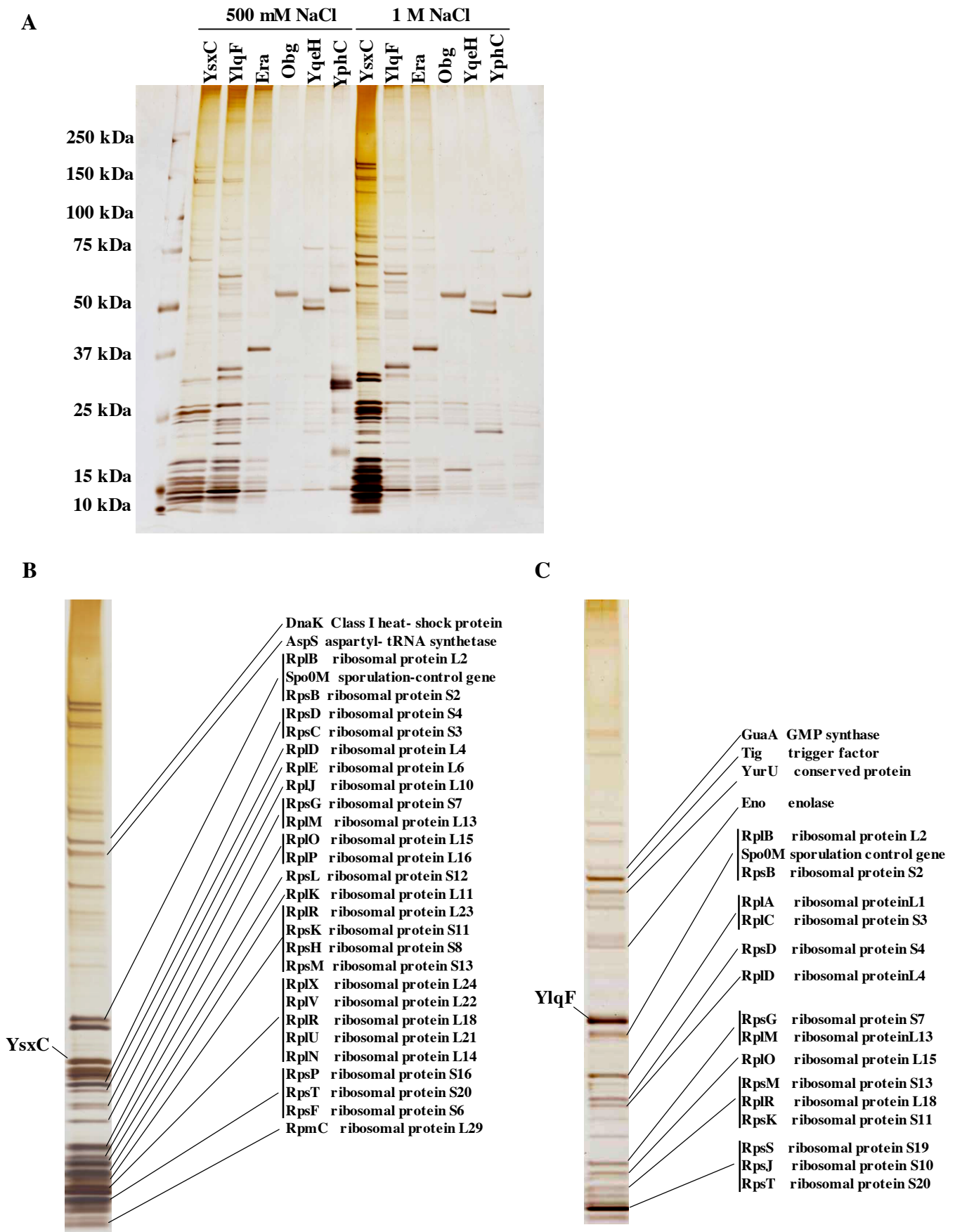
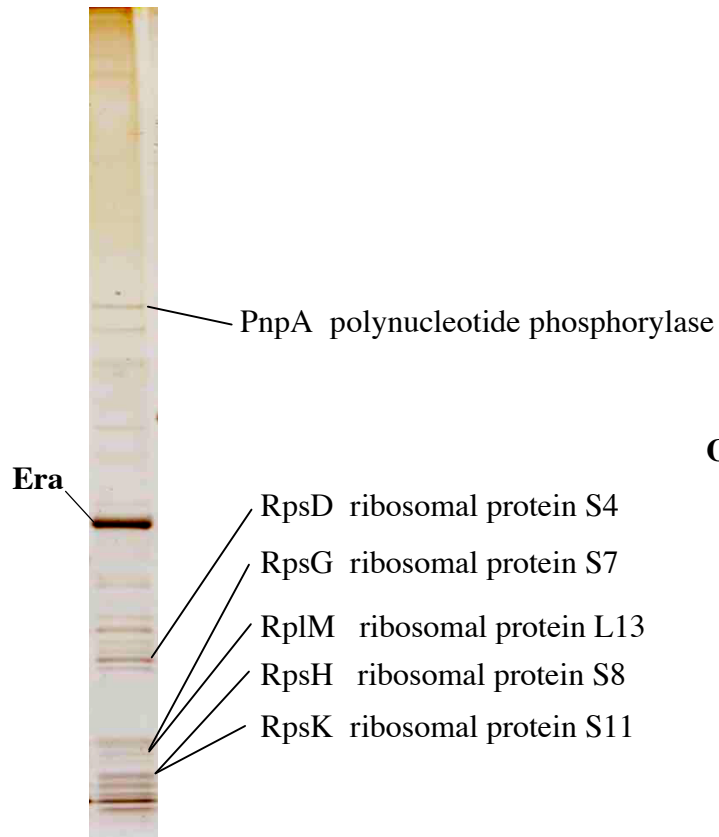
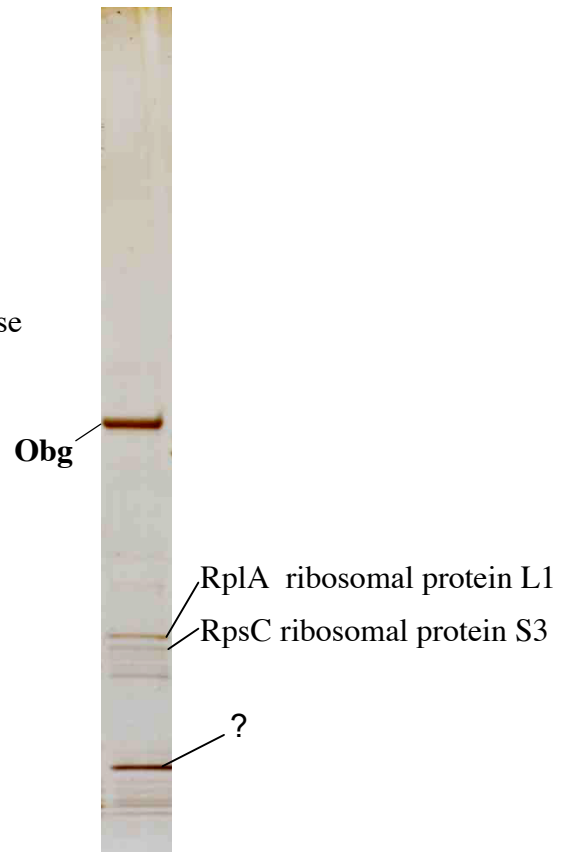
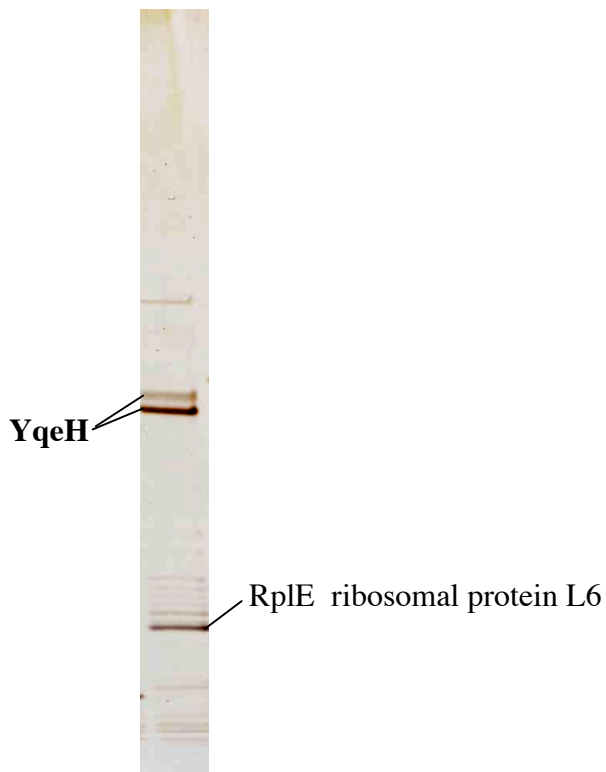
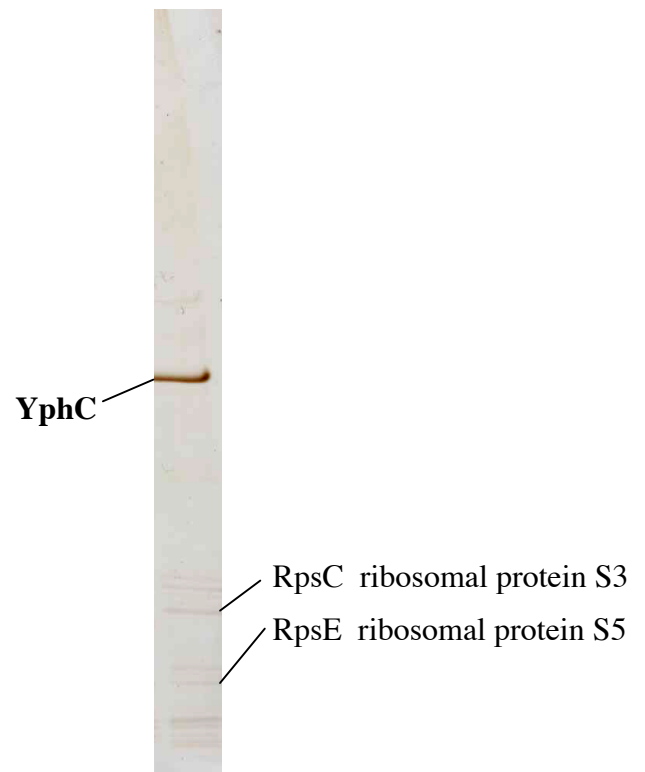


図.10 GTP結合タンパク質の複合体解析

A.アフィニティーカラムにより分画した溶出画分を集め、SDS-PAGEを行い、銀染色で検出した。B, C, D, E, F, Gでは、それぞれ、YsxC, YlqF, Era, Obg, YqeH, YphCの溶出画分に含まれるタンパク質を質量分析計で同定した。

D, E, F, Gは次のページに示してある。

D**E****F****G**

II-2-2. Era/Obg スーパーファミリーとリボソームの結合

複合体解析において、YsxC と YlqF は、リボソーム粒子と結合することが示唆された(図.8)。一方で、Era, Obg, YphC および YqeH とリボソームの結合は確認できていない。これまでに、大腸菌の Era は 30S サブユニットの 16S rRNA に結合することが報告されており (Meier *et al*, 1999; Sayed *et al*, 1999; Hang & Zhao, 2003; Sharma *et al*, 2005)、Obg は出芽細胞や大腸菌、そして枯草菌でも 50S サブユニットに結合することが報告されている (Scott *et al*, 2000; Lin *et al*, 2003; Wout *et al*, 2004)。そこで次にショ糖密度勾配遠心法を用いて Era/Obg スーパーファミリーに所属する GTP 結合タンパク質とリボソームの結合を確認した。ショ糖密度勾配遠心法は、タンパク質や核酸を分子量によって分離することが可能である。リボソームは 2.5MDa という大きな複合体であるのに対し、GTP 結合タンパク質はいずれも 50kDa 以下のタンパク質であることから、リボソームと結合する場合は、上清付近の画分ではなくリボソームと同じ画分に共沈降するはずである。枯草菌 168 株を LB 培地中にて 37°C で培養し、OD₆₀₀ が 0.6 に達した時点で集菌した。この細胞を、フレンチプレス(8000psi)を用いて破碎し、得られた細胞抽出液に含まれる 70S リボソームおよび 50S、30S サブユニットをショ糖密度勾配遠心法によって分離した。次にそれぞれの画分に含まれる GTP 結合タンパク質を各 GTP 結合タンパク質の抗体を用いて検出した。その結果、YsxC は 70S リボソームと同じ画分に、そして YlqF と Obg は 50S サブユニットと同じ画分に共沈降することが明らかになった(図.11)。また、YlqF と Obg は緩衝液中に GTP の非加水分解類似物である GTP γ S が存在する条件下では、安定に 50S サブユニットと共沈降するが、GDP が存在する条件下では上清付近に存在していることから(図.11)、GTP 型の YlqF と GTP 型の Obg が 50S サブユニットに結合することが示唆された。一方、YsxC と 70S リボソームの結合は、緩衝液中に含まれるヌクレオチド(GTP γ S もしくは GDP)の違いによって変化することはいなかった。このことから、YsxC は GTP 型と GDP 型の両方の構造で 70S リボソームに結合することが示唆された。また、ショ糖密度勾配遠心法では、複合体解析では見られなかった Obg と 50S サブユニットの結合を確認することができた。一方、報告されている 30S サブユニットと Era の結合は今回の条件下では観察されず、YqeH と YphC もリボソームに結合しなかった(図.11)。

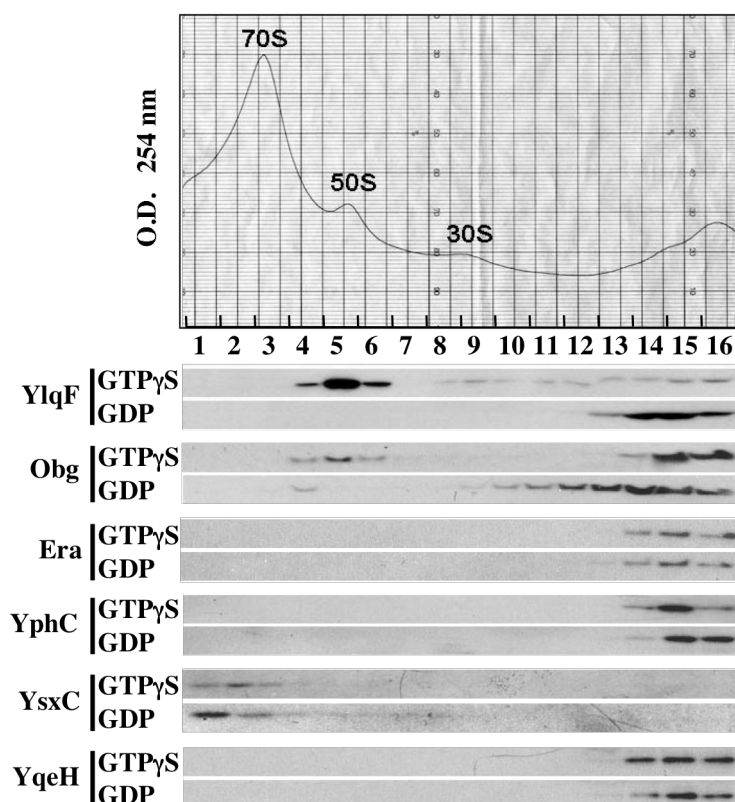


図.11 ショ糖密度勾配遠心法を用いたGTP結合タンパク質とリボソームの結合解析
対数増殖期の枯草菌の細胞抽出液に含まれる70Sリボソームと50S、30Sサブユニットをショ糖密度勾配遠心法で分離し、それぞれの画分に含まれるGTP結合タンパク質をウェスタンブロット法にて検出した。

II-2-3. リボソームが与える GTP 結合タンパク質の GTP 加水分解能への影響

翻訳因子である EF-Tu や EF-G は、リボソームによって自身の持つ GTP 加水分解能が大きく促進されることが古くから知られている(Rodnina *et al*, 2000)。最近、Era/Obg スーパーファミリーに所属する大腸菌の YjeQ (YloQ ホモログ)も、30S サブユニットによって GTP 加水分解能が促進されることが報告されている(Daiagle and Brown, 2004; Himeno *et al*, 2004)。そこで、本研究で解析対象としている 6 種類の GTP 結合タンパク質の加水分解能がリボソームによって制御されているか調べた。解析に用いた各 GTP 結合タンパク質は、II-2-1.で精製したものを使用した(図.9)。リボソームは、Nanamiya らの手法を用いて精製した粗リボソーム画分を使用した (Nanamiya *et al*, 2004)。なお、粗リボソーム画分の精製度は、リボソーム画分の指標として L11 タンパク質、細胞質画分の指標として SigA

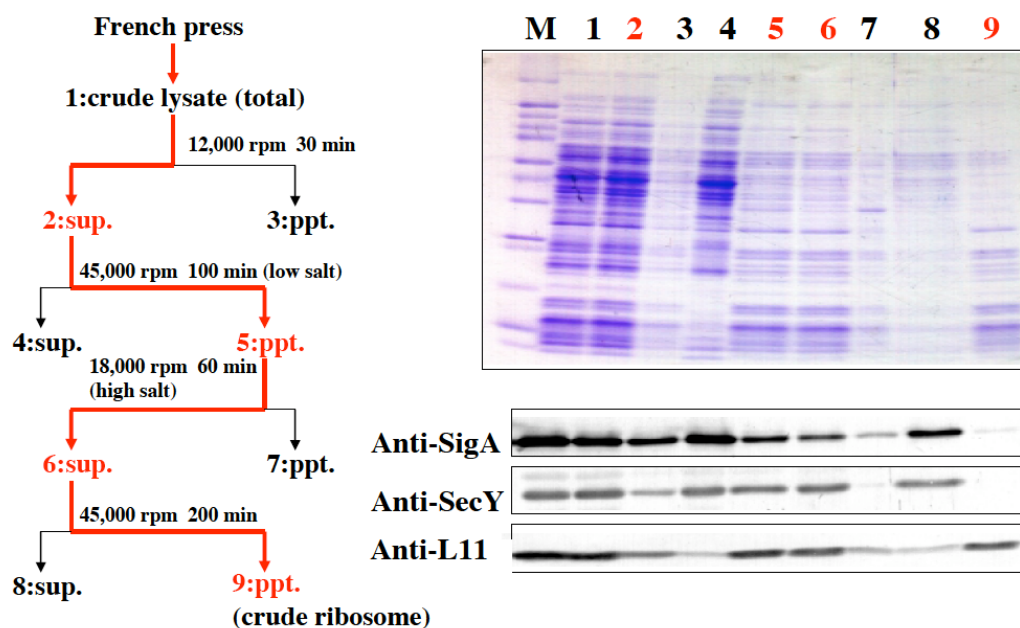


図.12 粗リボソーム画分の調整

調整方法は、主に超遠心分離にて行い、得られた各分画についてL11蛋白質をウェスタンブロット解析で検出する一方、細胞質画分の指標としてSigA蛋白質、膜画分の指標としてSecY蛋白質を検出することで精製の指標とした。

タンパク質、膜画分の指標として SecY タンパク質をそれぞれの抗体で検出することで確認した(図.12)。粗リボソーム画分の有無による各 GTP 結合タンパク質の GTP 加水分解能を比較した結果、YlqF の GTP 加水分解能は、粗リボソーム画分の存在によって大きく促進されることが明らかになった(図.13)。また、本研究では、YlqF が 50S サブユニットに結合することを見いだしており、YlqF の GTP の加水分解能は、50S サブユニットによって促進されることが推測された。一方、Era の GTP 加水分解能も粗リボソーム画分によって促進されるが、その活性化は YlqF に比べ、非常に弱いものであった(図.13)。YphC と YqeH の GTP 加水分解能は、単独で非常に強い活性を持っており、粗リボソーム画分による影響は観察されなかった(図.13)。Obg と YsxC の GTP 加水分解能は YlqF と同じ様に非常に弱い活性であったが、粗リボソーム画分によって促進されなかった(図.13)。

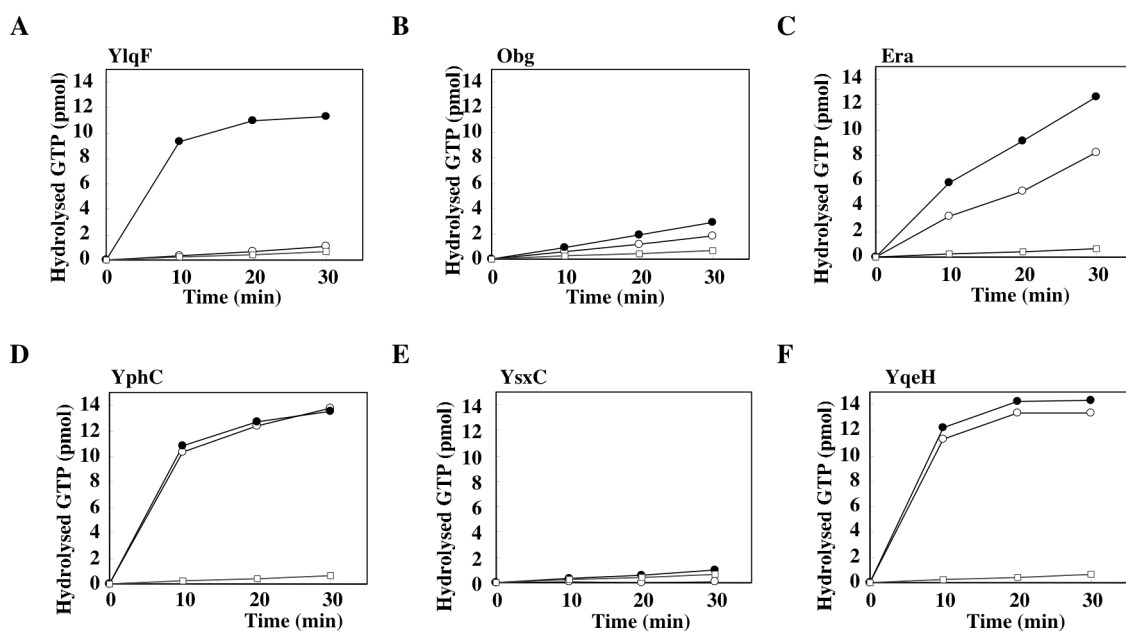


図.13 粗リボソーム画分が与える各GTP結合タンパク質のGTP加水分解能への影響
 反応液中に0.7 μ MのGTP結合タンパク質と0.1 μ Mの粗リボソーム画分(●)もしくは0.7 μ MのGTP結合タンパク質(○)、0.1 μ Mの粗リボソーム画分(□)を加え、時間経過に伴うGTPの加水分解量を測定した。A, B, C, D, E, Fは、それぞれYlqF, Obg, Era, YphC, YsxC, YqeHによるGTPの加水分解を示した。

II-2-4. Era/Obg スーパーファミリーの枯渇による枯草菌への影響

これまでに、大腸菌の Era や出芽細菌の Obg が細胞内で枯渇すると、いずれの場合も 70S リボソームが減少し、50S と 30S サブユニットが増加するという現象が観察されることが報告されている(Inoue *et al*, 2003; Lin *et al*, 2004)。そこで、本研究で解析対象としている 6 種類の GTP 結合タンパク質(Era、Obg を含む)の枯渇条件下における、枯草菌のリボソームプロファイルを観察した。また、解析には各 GTP 結合タンパク質をコードする遺伝子の発現を、IPTG で制御できる株を使用した(Morimoto *et al*, 2002)。これらの変異株は、100 μ M の IPTG を含む LB 培地中で培養すると、野生株と同様の生育速度を示す(Morimoto *et al*, 2002)。

まず、100 μ M IPTG を含む LB 培地中にて培養した対数増殖期の細胞を集菌し、さらに IPTG を含まない LB 培地中で培養した。IPTG を含まない LB 培地で培養後、約 1 世代から 3 世代の細胞をサンプリングした(図.14A-19A)。その後、得られた細胞はフレンチプレス(8000psi)を用いて破碎し、ショ糖密度勾配遠心法により、リボソームプロファイルを観察した。すると驚いたことに、6 種類全ての変異株で、70S リボソームの減少と 50S、30S サブユニットの増加が観察された

(図.14-19)。また、染色体の分配に関わり、細胞の増殖に必須である ParC の枯渇条件下ではこのような現象は観察されなかった（データは記載しない）。このことは、Era, Obg, YsxC, YlqF, YphC と YqeH はリボソームの生合成やタンパク質合成の開始やリボソームのリサイクリングに関与していることを示唆している。また、各 GTP 結合タンパク質の枯渇条件下におけるリボソームプロファイルを注意深く比較すると、Obg, YlqF, YphC, YsxC の枯渇条件下では、50S サブユニットのピークのずれが観察された(図.15-18)。このことは、これらのタンパク質の枯渇が、50S サブユニットの安定性もしくは生合成に影響を与えていることを示唆している。一方、Era の枯渇した条件下ではこのずれは全く観察されず(図.14)、YqeH の枯渇した条件でも、ピークのずれはほとんど観察されなかった(図.19)。

6 種類の GTP 結合タンパク質の枯渇条件下におけるそれぞれのリボソームプロファイルの解析結果は、いずれの枯渇条件下でも同じような変化が見られ、非常に類似性が高いことから、各 GTP 結合タンパク質も細胞内で重複した役割を担っているのではないか？という疑問を抱かせる。もし 6 種類の GTP 結合タンパク質が、リボソームの生合成や安定性に対して重複した役割を持っているならば、特定の GTP 結合タンパク質の枯渇による影響を他の GTP 結合タンパク質の過剰発現によって抑圧できるはずである。そこで、それぞれの GTP 結合タンパク質の枯渇による細胞増殖の阻害を、他の 5 種類の GTP 結合タンパク質の過剰発現が抑圧するか調べた。まず、IPTG によって各 GTP 結合タンパク質遺伝子の発現を誘導できる変異株(6 種類; TMO101, TMO102, TMO104, TMO309, TMO208, TMO303)を、各 GTP 結合タンパク質を過剰発現させるマルチコピープラスミド(6 種類 ; pNOE, pNOO, pNOS, pNOL, pNOP, pNOQ)で形質転換し、得られた形質転換体が IPTG の非存在下で増殖可能か否か確認した。その結果、全てのパターンで抑圧できないことが明らかになり(図.20)、それぞれの GTP 結合タンパク質が、細胞内において異なる役割を担っていることが示唆された。

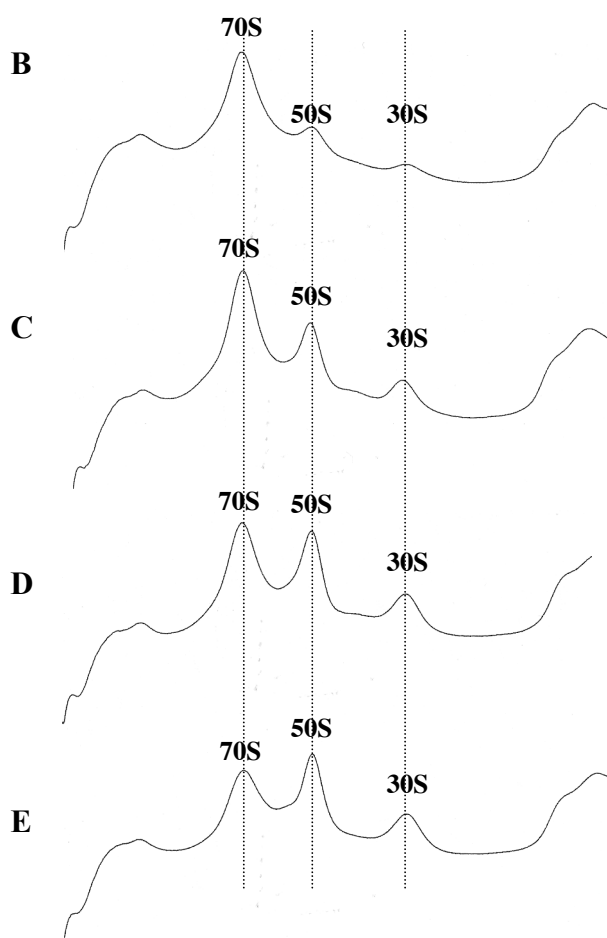
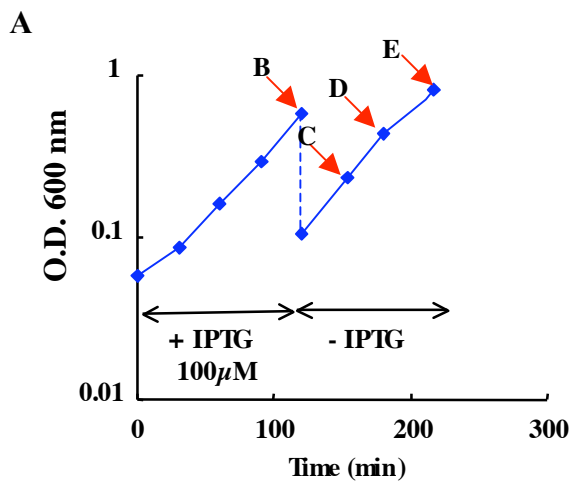


図.14 Eraの枯渇条件下におけるリボソームプロファイル
TMO101株をIPTGの存在下で培養し、その後IPTGの非存在下で培養することで細胞内のEraタンパク質を枯渇させた。Aは生育速度を示しており、B-Eのポイントでサンプリングを行った。B-EはAで示されたポイントのリボソームプロファイルを示した。

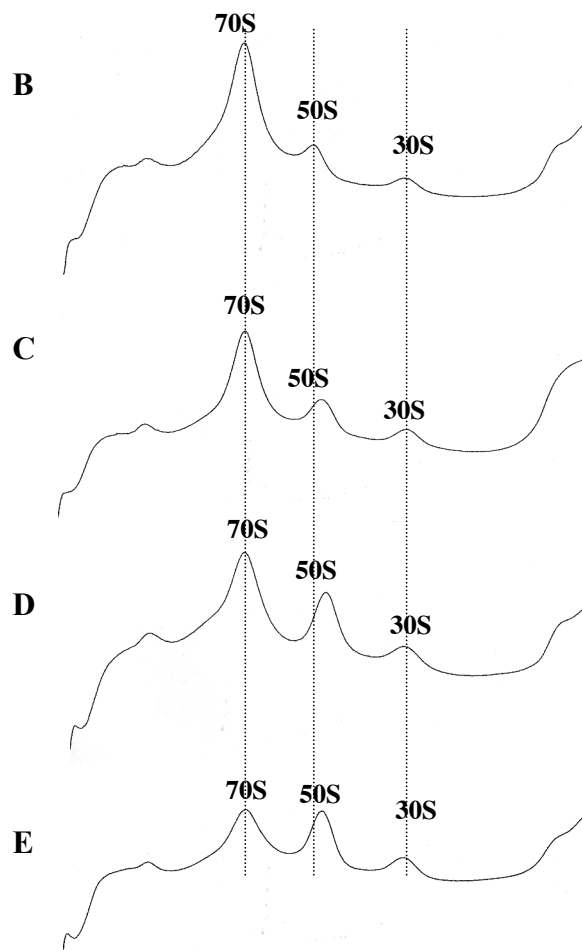
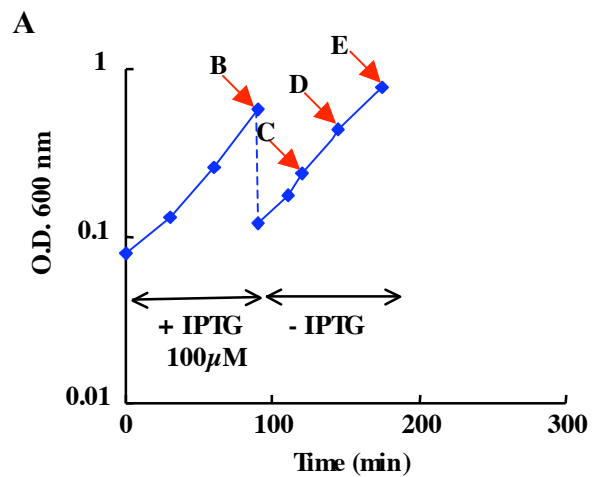


図.15 Obgの枯渇条件下におけるリボソームプロファイル
TMO102株をIPTGの存在下で培養し、その後IPTGの非存在下で培養することで細胞内のObgタンパク質を枯渇させた。Aは生育速度を示しており、B-Eのポイントでサンプリングを行った。B-EはAで示されたポイントのリボソームプロファイルを示した。

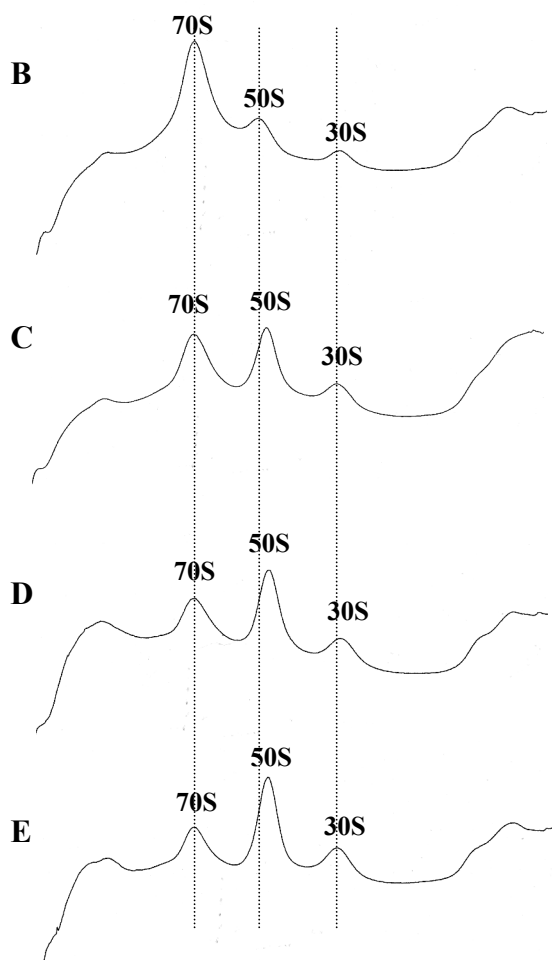
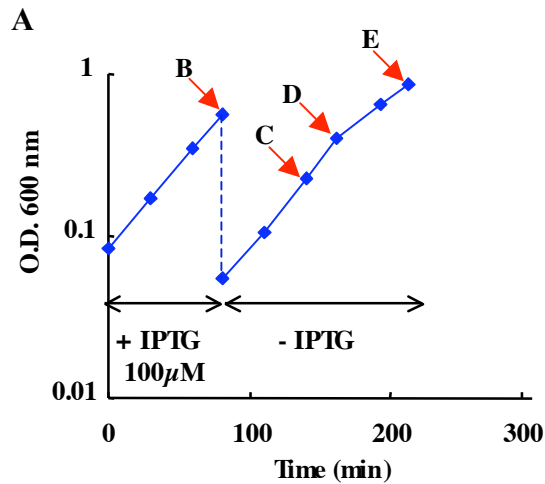


図.16 Y1qFの枯渇条件下におけるリボソームプロファイル
TMO208株をIPTGの存在下で培養し、その後IPTGの非存在下で培養することで細胞内のY1qFタンパク質を枯渇させた。Aは生育速度を示しており、B-Eのポイントでサンプリングを行った。B-EはAで示されたポイントのリボソームプロファイルを示した。

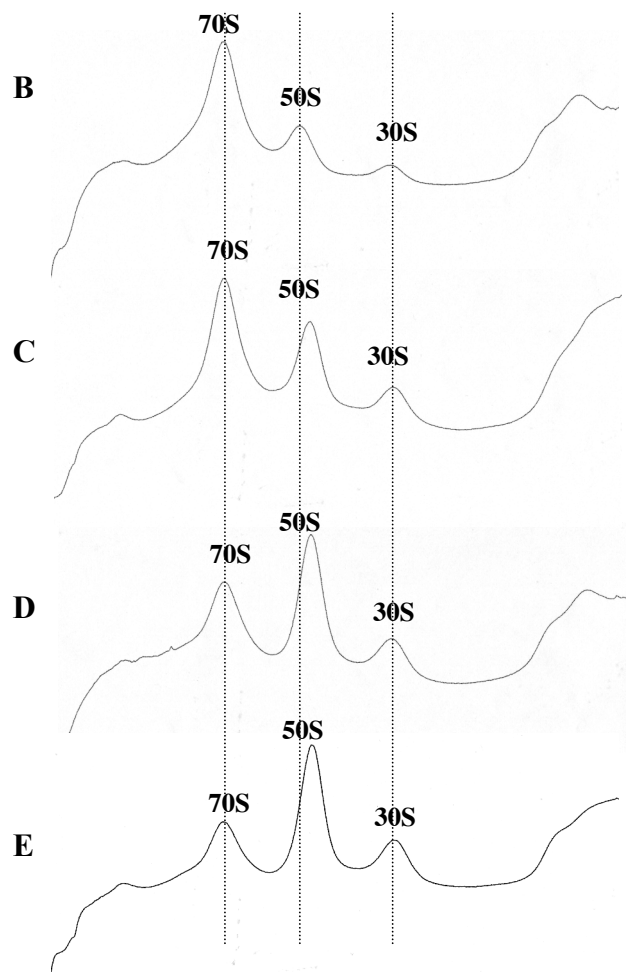
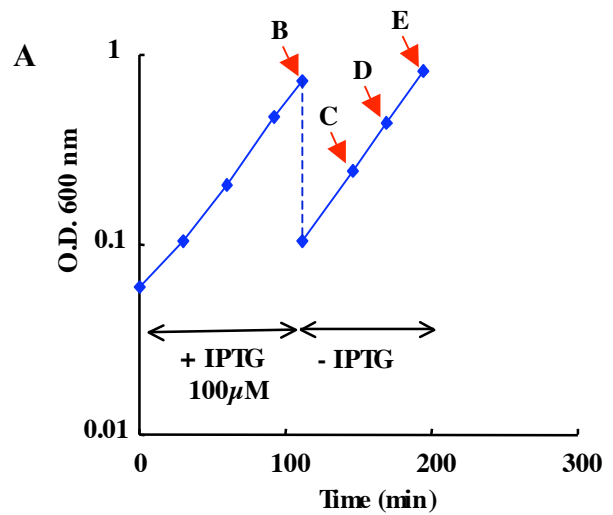


図.17 YphCの枯渇条件下におけるリボソームプロファイル
TMO303株をIPTGの存在下で培養し、その後IPTGの非存在下で培養することで細胞内のYphCタンパク質を枯渇させた。Aは生育速度を示しており、B-Eのポイントでサンプリングを行った。B-EはAで示されたポイントのリボソームプロファイルを示した。

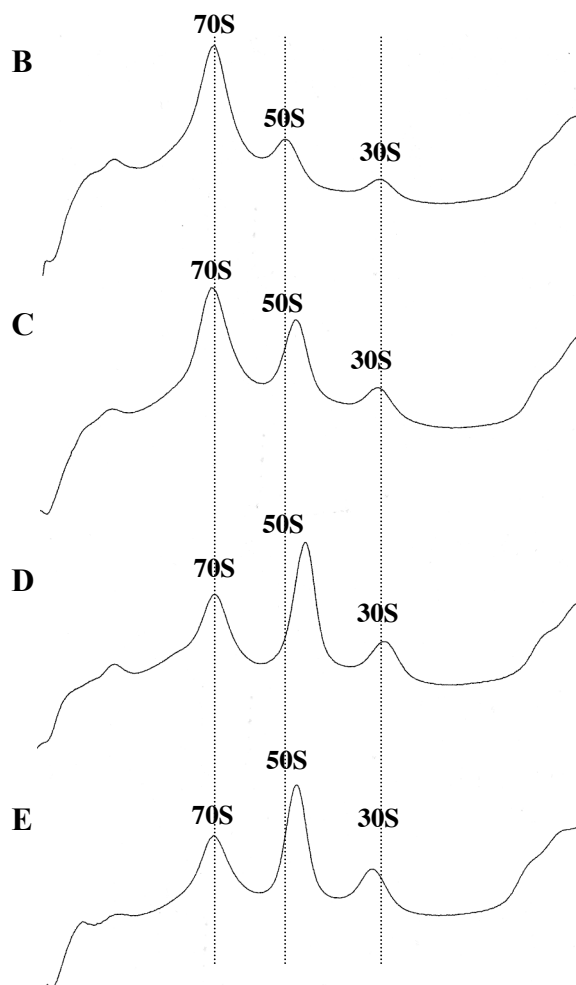
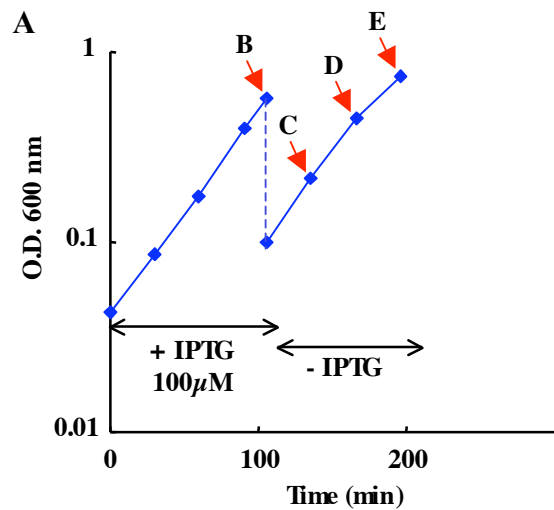


図.18 YsxCの枯渇条件下におけるリボソームプロファイル
TMO104株をIPTGの存在下で培養し、その後IPTGの非存在下で培養することで細胞内のYsxCタンパク質を枯渇させた。Aは生育速度を示しており、B-Eのポイントでサンプリングを行った。B-EはAで示されたポイントのリボソームプロファイルを示した。

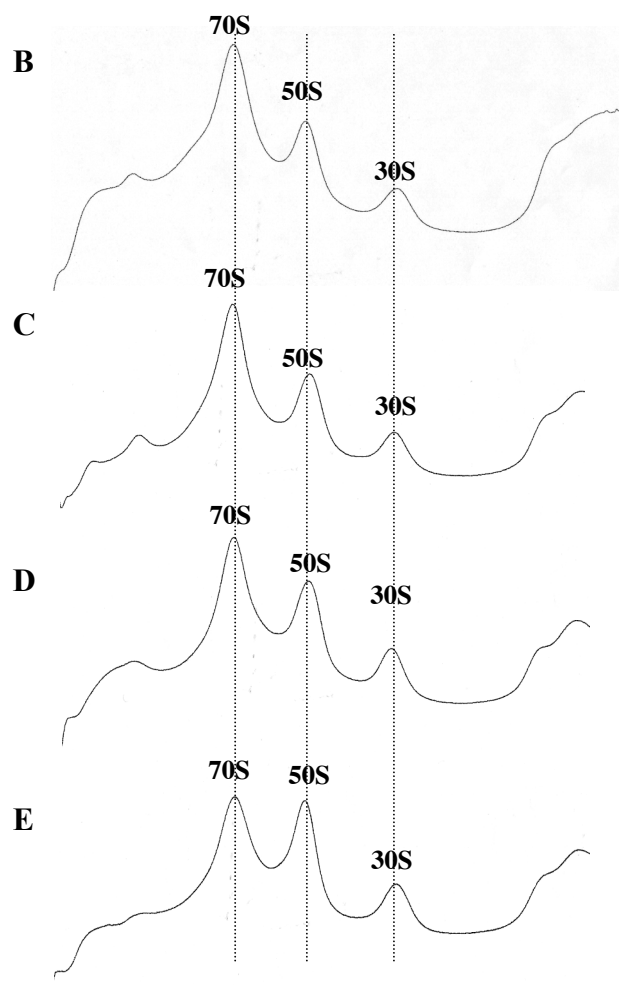
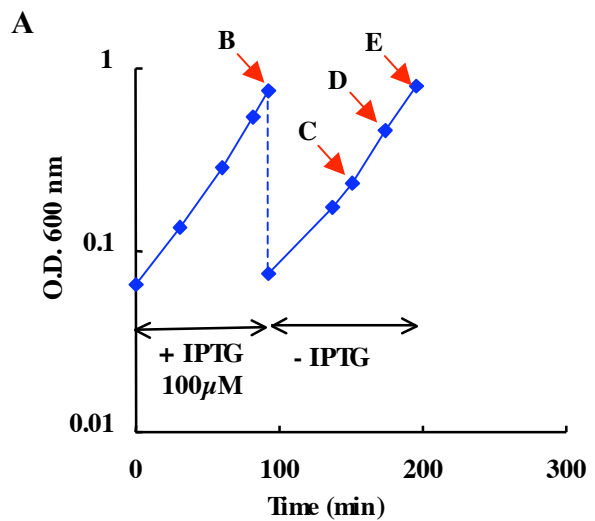


図.19 YqeHの枯渇条件下におけるリボソームプロファイル
TMO309株をIPTGの存在下で培養し、その後IPTGの非存在下で培養することで細胞内のYqeHタンパク質を枯渇させた。Aは生育速度を示しており、B-Eのポイントでサンプリングを行った。B-EはAで示されたポイントのリボソームプロファイルを示した。

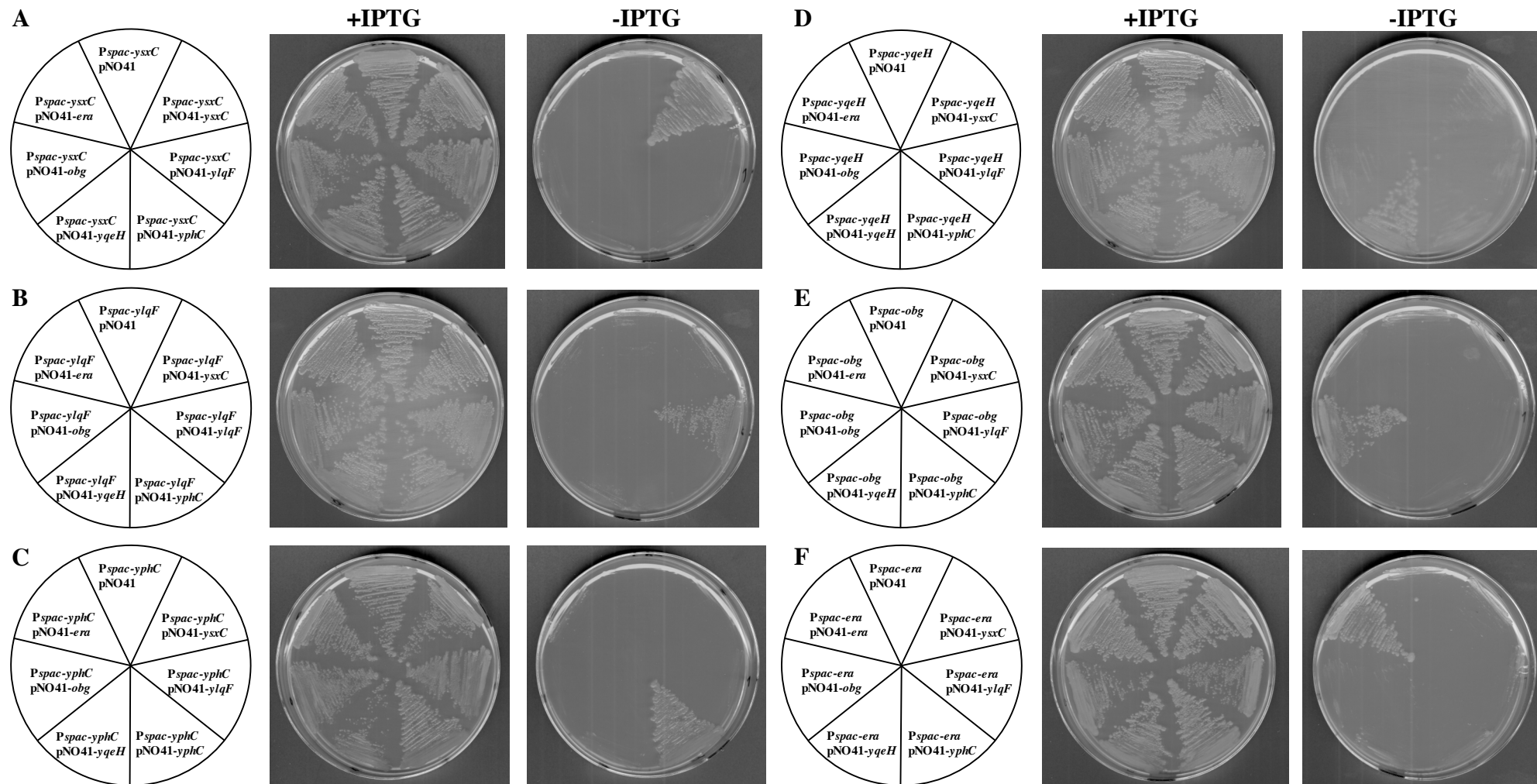


図.20 各GTP結合タンパク質の枯渇条件下における他のGTP結合タンパク質の過剰発現の影響

A, B, C, D, E, Fでは、それぞれ*ysxC*, *ylqF*, *yphC*, *yqeH*, *obg*, *era*の発現をIPTGで誘導できる変異株のバックグラウンドで、各GTP結合タンパク質遺伝子をマルチコピープラスミド上より過剰発現させ、IPTG存在下および非存在下における細胞の増殖を観察した。pNO41は空のベクターであり、ネガティブコントロールとして用いた。

II-3. 考察

第2章では、枯草菌の細胞増殖に必須である6種類のGTP結合タンパク質(Era, Obg, YphC, YsxC, YlqF, YqeH)の解析を同時に行った。複合体解析とショ糖密度勾配遠心法では、既に報告されているObgと50Sサブユニットの結合以外に、新たにYlqFと50Sサブユニット、YsxCと70Sサブユニットの結合を見だし、YlqFと50Sサブユニットの結合は、GTPの非加水分解類似物(GTP γ S)の存在に依存していることも見だした(図.10, 11)。さらに、YlqFのGTP加水分解能は粗リボソーム画分によって大きく促進されることも明らかになった(図.13)。枯草菌細胞内での各GTP結合タンパク質の枯渇条件下におけるリボソームプロファイルの観察では、全てのGTP結合タンパク質の枯渇条件下で、70Sリボソームの減少と30S、50Sサブユニットの増加が観察され、さらにObg, YphC, YsxC, YlqFの枯渇した細胞では、成熟した50Sサブユニットよりも分子量が小さい50Sサブユニットの蓄積が観察されている(図.14-19)。そのため、Era/Obgスーパーファミリーに所属する6種類のGTP結合タンパク質(Era, Obg, YphC, YsxC, YlqF, YqeH)は、リボソームの生合成において重複した役割を担っている可能性が考えられた。しかしながら、個々のGTP結合タンパク質の枯渇による影響を、その他のGTP結合タンパク質の過剰発現が抑圧することができないことから(図.20)、それぞれのGTP結合タンパク質は異なる機能を持っており、他のGTP結合タンパク質の代わりに成り得ないことが推測された。つまり、6種類のGTP結合タンパク質(Era, Obg, YphC, YsxC, YlqF, YqeH)がリボソームの生合成に関与しているものの、リボソームの生合成において、異なるステップで機能を遂行していることが示唆された。

以上の結果とこれまでの知見をふまえ、各GTP結合タンパク質とリボソームの関係について考察した。

II-3-1. YlqF とリボソームの関係

YlqFはグラム陽性細菌と真核生物に広く保存されているが、細菌のYlqFの解析は今のところ全く行われていない。第2章では、GTP結合型のYlqFが50Sサブユニットに結合すること(図.11)、そしてYlqFのGTP加水分解能は粗リボソーム画分によって大きく促進されることを明らかにした(図.13)。このことはGTP型のYlqFは50Sサブユニットに結合し、自分の役割を終えると内在性の加水分

解能が上昇し、GDP 型へと変換されることで 50S サブユニットから解離することを推測させる。EF-Tu や EF-G のような伸長因子もリボソームによって GTP 加水分解能が促進されることが知られている(Rodnina *et al*, 2000)。そこで YlqF がリボソームの機能にどのように関わっているか考察した。まず、ショ糖密度勾配遠心法を用いた YlqF とリボソームの結合解析では、YlqF は 50S サブユニットのみに結合しており、70S リボソームや 30S サブユニットには結合していない。また、1 細胞内に存在する YlqF の分子数は約 1000 分子であるのに対し(Morimoto *et al*, 2002)、リボソームの分子数は約 20000 分子、さらに伸長因子である EF-Tu や EF-G の分子数はリボソームの分子数より多いことから(Eymann *et al*, 2004)、YlqF がタンパク質合成の伸長反応に参加することは考えにくい。例えば、YlqF がタンパク質合成の伸長過程に必要な因子ならば、YlqF が枯渇した細胞では、ポリソーム上で停止したリボソームが増加し、70S リボソームや 50S、30S サブユニットが減少するはずである。しかしながら、細胞内で YlqF が枯渇すると、70S サブユニットが減少し、50S と 30S サブユニットが増加しており(図.16)、蓄積された 50S サブユニットは、野生株で観察される 50S サブユニットよりも、わずかではあるが小さな分子量であることも観察されている(図.16)。このことは YlqF の枯渇によって 50S サブユニットの生合成が阻害されている可能性を示しており、YlqF がリボソームの生合成に関与している可能性が高いのではないかと考えられる。

酵母の YlqF ホモログである Nug1(YER006w)と Nog2(YNR053c)はともに酵母の細胞増殖に必須なタンパク質であり、60S サブユニットの前駆体に結合することが報告されている(Saveanu *et al*, 2001; Babler *et al*, 2001)。また、Nog2 の枯渇した細胞では、未成熟な rRNA の蓄積が観察され(Saveanu *et al*, 2001)、Nog2 と Nug1 の温度感受性変異株を 37°C で培養した場合も同様に未成熟な rRNA の蓄積が観察されている(Babler *et al*, 2001)。以上のことより、Nug1 と Nog2 は 60S サブユニットの生合成に必要な因子であることが示唆されている。この結果は、ここで明らかにした枯草菌 YlqF の機能と一致する。

II-3-2. Era とリボソームの関係

大腸菌の Era は、ゲルシフト法や 16S rRNA を結合させたアフィニティーカラムによる結合解析などの様々な手法によって、30S サブユニットの 16S rRNA に結合することが証明されている(Meier *et al*, 1999; Sayed *et al*, 1999; Johnston *et al*,

1999; Sharma *et al*, 2005)。しかしながら、Era と 30S サブユニットの結合をショ糖密度勾配遠心法によって証明した例はなく、本研究で行ったショ糖密度勾配遠心法によるリボソームとの結合解析でも、Era と 30S サブユニットの結合を確認することができなかった(図.11)。また、Era の GTP 加水分解能は粗リボソーム画分によって促進されるものの、その活性化は約 2 倍程度のものではあった(図.13)。

最近の報告で、Sharma らは低温電子顕微鏡による Era-30S 複合体の立体構造解析で、Era が 30S サブユニットの S1 タンパク質と同じ領域に結合することを報告しており、Era と S1 タンパク質が同時に 30S サブユニット上に結合することができないことを示している(Sharma *et al*, 2005)。このことから、大腸菌では、ショ糖密度勾配遠心法で Era と 30S サブユニットの結合を観察できない理由として、30S サブユニット上に S1 タンパク質が結合していることが推測できる。実際に、大腸菌から精製した 30S サブユニットには S1 タンパク質が含まれていることが知られている(Nierhaus, 1991)。しかしながら、枯草菌では精製した 30S サブユニットに S1 タンパク質(YpfD)は含まれていないため(Nanamiya *et al*, 2004)、今回の解析で Era が 30S サブユニットに結合できない理由を、S1 タンパク質と 30S サブユニットの結合では説明することはできない。ではなぜ枯草菌の Era と 30S サブユニットの結合もショ糖密度勾配遠心法では観察できないのだろうか？大腸菌の S1 タンパク質は 30S サブユニットに mRNA を誘導することが知られており、細胞の増殖に必須なタンパク質であるが(Sengupta *et al*, 2001; Sorensen *et al*, 1998)、枯草菌の S1 タンパク質(YpfD)は細胞の増殖に必須ではなく、現在のところその機能は明らかになっていない。このことは、枯草菌では、大腸菌の S1 タンパク質の役割を持つ他の因子が存在しているのか、もしくは大腸菌とは異なるメカニズムで mRNA の誘導が行われていることを示している。本研究で行った複合体解析やショ糖密度勾配遠心法によるリボソームとの結合解析で、Era と 30S サブユニットの結合を確認できなかった可能性の一つとして、恐らく、枯草菌の 30S サブユニットの Era 結合領域(大腸菌の S1 タンパク質の結合領域に対応する)も大腸菌の S1 タンパク質のような他の因子に覆い隠されていることが考えられるのではないだろうか。大腸菌では、Era が 30S サブユニットの生合成の最後に起こる S1 タンパク質による mRNA の誘導を制御する機能を持っているのではないかと予想されていることから、枯草菌における大腸菌の S1 タンパク質に対応する因子の同定は、枯草菌 Era の機能解明を行う上で今後

の課題の一つと考えられる。

枯草菌細胞内で Era を枯渇させると、70S リボソームの減少と 30S、50S サブユニットの増加が観察される(図.13)。この現象は大腸菌で報告された現象と一致する(Inoue *et al*, 2003)。また、Obg, YlqF, YphC, YsxC の枯渇した細胞のリボソームプロファイルでは、50S サブユニットのピークのずれが観察されたが(図.14-17)、Era の枯渇した細胞のリボソームプロファイルではその様なピークのずれは観察されなかった(図.13)。このことは、Era が 50S サブユニットの生合成に必要な因子ではないことを示している。また、Era の枯渇した細胞のリボソームプロファイルでは、30S サブユニットのピークのずれも観察されなかったことから(図.13)、Era が 30S サブユニットの生合成に関与していたとしても、成熟化がほぼ終了している様な後期のステップであることが示唆された。これらの結果は、Era が 30S サブユニットの生合成の最後に起こる mRNA の誘導を制御するという Sharma らによって提案されたモデルに当てはまるのではないだろうか(Sharma *et al*, 2005)。

II-3-3. Obg, YphC, YsxC, YqeH とリボソームの関係

シヨ糖密度勾配遠心法によるリボソームとの結合解析の結果より、Obg と YsxC はそれぞれ 50S サブユニットと 70S リボソームに結合することが明らかになっているが、YphC と YqeH はリボソームとの結合を確認できていない(図.9)。しかしながら、Obg と YsxC だけでなく YphC と YqeH が枯渇した細胞でも 70S リボソームの減少と 30S、50S サブユニットの増加が観察されている(図.14, 16-18)。この現象は、少なくとも、これらのタンパク質がリボソームの生合成やタンパク質合成の開始、およびリボソームのリサイクリングのいずれかに関与している可能性を示している。

そこでまず、これらのタンパク質がリボソームの生合成、タンパク質合成の開始、リボソームのリサイクリングのいずれの過程に必要な因子であるのか考えてみる。Obg, YphC, YsxC の枯渇した細胞では、蓄積した 50S サブユニットのピークのずれが観察されていることから、この蓄積された 50S サブユニットがいくつかのリボソームタンパク質を失っている可能性や正確な立体構造を構築できていない可能性などが予想できる。それ故、これらのタンパク質は 50S サブユニットの生合成に必要な因子であることが考えられる(図.14, 16, 17)。また、YsxC は 50S サブユニットだけでなく 30S サブユニットのずれも観察されており、

30S サブユニットの生合成にも関与している可能性が示唆される(図.17)。一方、YqeH の枯渇した細胞では、70S リボソームの減少と 30S、50S サブユニットの増加は観察されるものの 50S や 30S サブユニットのピークのずれは観察されなかった(図.18)。そのため、YqeH は、Era の様に 30S サブユニットの生合成に関与している可能性や、タンパク質合成の開始およびリボソームのリサイクリングに関与している可能性全てが残されている。YqeH がリボソームの生合成に関与しているならば、蓄積された 50S や 30S サブユニットのいずれか、もしくは両方が未成熟なために開始複合体の形成が阻害されたことが考えられ、タンパク質合成の開始反応に関わっているならば、開始複合体の形成を促進する役割をもっている可能性が考えられる。また、リサイクリングに関与しているならば、リサイクリング反応を負に制御するはずであり、YqeH はタンパク質合成が完了したリボソームの構造や活性をチェックする役割を有している可能性が考えられるのかもしれない。しかしながら、現段階ではこれらの可能性を結論づけることはできないため、今後より詳細な解析を行う必要がある。

次に、YphC および YqeH とリボソームの結合が観察されない理由を考えてみる。Era は S1 タンパク質が 30S サブユニットに結合した状態では、30S サブユニットに結合することができない(Sharma *et al*, 2005)。また、50S サブユニットの生合成に関与する RNA ヘリカーゼである SrmB や CsdA は成熟した 50S サブユニットには結合せず、未成熟な 50S サブユニットにのみ結合することが報告されている(Charollais *et al*, 2003; Charollais *et al*, 2004)。これらのことを考えると、もし YphC や YqeH がリボソームの生合成に関与しているならば、それぞれの結合領域が覆われていない様な未成熟な 30S や 50S サブユニットに結合することができるかもしれない。

II-3-4. 第 2 章のまとめ

第 2 章では、すでに報告されている Era や Obg に加え、今までほとんど解析が行われていなかった 4 種類の GTP 結合タンパク質(YlqF, YphC, YsxC, YqeH) もリボソームの機能に関与している可能性を見いだした。しかしながら、これら 4 種類のうち、実際にリボソームとの相互作用が確認されたものは、YlqF と YsxC だけであり、YqeH や YphC はリボソームとの相互作用を確認できていない。また、70S リボソームと相互作用が確認された YsxC は、GTP γ S の存在下でも GDP の存在下でも相互作用が確認されており、GTP 加水分解能も粗リボソ-

ム画分の存在によって変化が見られないことから、今回行ったショ糖密度勾配遠心法での相互作用は、凝集した YsxC を観察している可能性もあり、その相互作用が細胞内機能において重要な役割をもっていると結論づけることはできない。一方、YlqF は GTP γ S を結合させた状態でなければ 50S サブユニットに結合することができず、さらに粗リボソーム画分によって GTP 加水分解能が大きく促進されていることから、少なくとも YlqF と 50S サブユニットの結合は、リボソームの機能において、重要な役割をもっていることが予測できる。そこで第 3 章では、YlqF と 50S サブユニットの関係に注目して解析を行うことにした。

III. リボソームの生合成における YlqF の役割の追求

はじめに

細菌のリボソームは、細胞内から精製した rRNA とリボソームタンパク質を試験管内で混ぜ合わせることで再構成することが可能である。この反応は、完全に自発的に起こるが、そのためには、高いマグネシウム濃度と熱エネルギー、そして長い時間が必要である。しかし、細胞内ではこのような条件は整っていないことから、リボソームの生合成を促進する因子の存在が推測されている。真核生物では、100 種類以上もの因子がリボソームの生合成に関与していることが報告されているが、細菌では、その様な因子はほとんど見いだされていない。

第 2 章では、6 種類の GTP 結合タンパク質(Era, Obg, YphC, YsxC, YlqF, YqeH)の解析を行った結果、それら全てのタンパク質がリボソームの生合成に必須な因子である可能性が示唆された。なかでも YlqF は GTP γ S の存在に依存して 50S サブユニットに結合でき、さらにその結合によって内在性の GTP 加水分解能が大きく促進されることが明らかになった。また、YlqF の枯渇した細胞では、70S リボソームの減少と 50S、30S サブユニットの増加、および蓄積した 50S サブユニットの分子量の減少が観察されている。以上の結果より、YlqF は 50S サブユニットの生合成に必要な因子であることが推測された。そこで第 3 章では、YlqF と 50S サブユニットの相互作用をより詳細に解析することで 50S サブユニットの生合成における YlqF の役割を追求した。

III-1. 材料と方法

III-1-1. 菌株と培養条件

第 3 章で使用した大腸菌と枯草菌の菌株および培養条件は、第 2 章と同じである。酵母の培養条件と菌株は、酵母 2 ハイブリッド法の段落に後述した。

III-1-2. プラスミドとその作製

酵母 2 ハイブリッド法と *in vitro* における YlqF と Ctc の相互作用解析に使用したプラスミドを除いて、第 3 章で使用したプラスミドおよびプラスミドの作製法は第 2 章と同じである。また、酵母 2 ハイブリッド法に使用したプラスミドは、以前、本研究室の Kaido らによって作製されたものを使用した(Kaido 修士論文)。GST-YlqF と His₆-Ctc を大腸菌内で発現させるプラスミドは Gate-way technology を利用して作製した。YlqF と Ctc のコード領域を PCR で増幅後、目的断片を BP Clonase Enzyme mix (Invitrogen)によって pDONOR201 に組み替え、それぞれ pDONORLQ と pDONORCTC を作製した。次に、pDONORLQ と pDONORCTC に含まれる目的断片を、LR Clonase Enzyme mix (Invitrogen)を使用して、それぞれ pDEST15(Invitrogen)と pDEST17(Invitrogen)に組み替え、pDEST15L と pDEST17C を作製した。GST を大腸菌内で発現させるプラスミドは pGEX2T (Novagen)を使用した。

III-1-3. 50S および 30S サブユニットの精製

第 2 章で使用した粗リボソーム画分を Buffer C に懸濁し、10-40%のショ糖密度勾配の上にのせ、90000 g で 14 時間遠心した。得られたショ糖密度勾配を分画し、254nm の吸光度を指標に、30S と 50S サブユニットを含む画分を回収した。次に、30S と 50S サブユニットを含む画分に、等量の 100%エタノールと、1M の酢酸マグネシウムを最終濃度 20mM になるように加え、-20°C で 1 時間インキュベートした。その後、10000 g で 30 分間遠心し、得られた沈殿を少量の Buffer A で懸濁した。得られた 30S および 50S サブユニットは、使用するまで -80°C で保存した。また、全ての過程を 4°C で行い、使用した緩衝液は、全て DEPC で処理することによって RNase を不活化したものを使用した。

III-1-4. *in vitro* における 50S サブユニットと YlqF の結合解析

10–160 pmol の YlqF を 30°C の 100 μ M GTP γ S を含む Buffer A (40 μ l) 中で 10 分間反応させた後、この反応液に 8 pmol の 50S サブユニットを加え、さらに 30 °C で 30 分間反応させた。その後、この反応液を Microcon100 (Millipore)にのせ、3000 g で 5 分間遠心し、さらに、100 μ M GTP γ S を含む Buffer A を 2 度通過させることでカラムを洗浄した。得られた 50S-YlqF 複合体に含まれる YlqF と 50S サブユニットは、それぞれ、抗 YlqF 抗体と抗 L3 タンパク質抗体 (立教大学の河村研究室からいただいた) を用いたウエスタンブロット法によって検出した。YlqF と 50S サブユニットの濃度は、定量したそれぞれのタンパク質のバンドの強度から作製した検量線を使用し、ウエスタンブロット法で得られた YlqF と L3 タンパク質のバンドの強度から求めた。また、各バンドの強度は、NIH image で測定した。また、YlqF と 50S サブユニットの結合反応に使用した緩衝液は、全て DEPC で処理することによって RNase を不活化したものを使用した。

III-1-5. YlqF の GTP 加水分解能の測定

GTP 加水分解能の測定は、YlqF や 50S サブユニット、そして抗生物質の濃度以外は、第 2 章で行った方法とほぼ同じである。また、使用した緩衝液は、全て DEPC で処理することによって RNase を不活化したものを使用した。

III-1-5-a. 50S サブユニットによる YlqF の GTP 加水分解能への影響

Buffer A 中に 1 μ M YlqF、0.025 μ M 50S サブユニット、20 μ M GTP、12pmol (0.27x10⁶Bq) [γ -³²P]GTP (2.22x10¹⁴Bq/mmol ; Perkin Elmer)を加え、37°C にて 30 分間反応を行った。反応開始を 0 分とし、3 分間隔でサンプリングした反応液に氷冷した 6%の活性炭を含む Buffer A を 100 μ l 加え、反応を停止させた。この反応液をよく攪拌することで、活性炭に未分解の GTP を吸着させた。その後、遠心分離によって活性炭を沈殿化させた後、50 μ l の上清中に含まれる ³²P を液体シンチレーションカウンター (BECKMAN)で測定した。また、50S サブユニットの濃度変化に伴う YlqF による GTP の加水分解の測定は、Buffer A 中に 0.01~1 μ M の 50S サブユニット、1 μ M YlqF 20 μ M GTP、12pmol (0.27x10⁶Bq) [γ -³²P]GTP (2.22x10¹⁴Bq/mmol ; Perkin Elmer)を加え、37°C にて 10 分間反応させることで行った。

III-1-5-b. 抗生物質による 50S サブユニット依存的な YlqF の GTP 加水分解能の促進への影響

Buffer A 中に $1\mu\text{M}$ YlqF、 $0.025\mu\text{M}$ 50S サブユニット、 $10\mu\text{M}$ 抗生物質 (Lincomycin, Tylosin, Chloramphenicol, Erythromycin, Thiostrepton)、 $20\mu\text{M}$ GTP、 12pmol ($0.27 \times 10^6 \text{Bq}$) $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ ($2.22 \times 10^{14} \text{Bq/mmol}$; Perkin Elmer)を加え、 37°C にて 30 分間反応を行った。反応開始を 0 分とし、5 分間隔でサンプリングした反応液に氷冷した 6%の活性炭を含む Buffer A を $100\mu\text{l}$ 加え、反応を停止させた。この反応液をよく攪拌することで、活性炭に未分解の GTP を吸着させた。その後、遠心分離によって活性炭を沈殿化させた後、 $50\mu\text{l}$ の上清中に含まれる ^{32}P を液体シンチレーションカウンター (BECKMAN)で測定した。

III-1-6. DMS フットプリント法

DMS フットプリント法は Uchiyama らや Pettie らの手法を改変して行った (Uchiyama *et al*, 1999; Pettie *et al*, 1979)。

III-1-6-a. DMS による修飾

8pmol の 50S サブユニットを $25\mu\text{l}$ の Buffer A に加え、 40°C で 10 分間インキュベートしたもの(反応液 A)と、 80pmol の YlqF を $100\mu\text{M}$ の $\text{GTP}\gamma\text{S}$ を含む $50\mu\text{l}$ の Buffer A に加え、 37°C で 10 分間インキュベートしたもの(反応液 B)を混合し、 30°C で 10 分間反応させた。その後、この反応液に $1\mu\text{l}$ の DMS(100%エタノールで 1/4 に希釈したもの)を加え、 30°C で 15 分間反応させることで、rRNA をメチル化させた。DMS によるメチル化反応は、氷冷した 2 倍量の 100%エタノールを加えることで停止させた。その後、修飾された 50S サブユニットは、 15000g で 20 分間遠心することで沈殿化させ、さらに、リボソームタンパク質を除去するために、PCI (phenol / chloroform / isoamyl alcohol ; 25:24:1)で 2 度処理した。修飾された rRNA はエタノール沈殿によって回収し、Buffer A に懸濁した。DMS によって修飾された領域の同定はプライマー伸長法で同定した。また、使用した緩衝液は、全て DEPC で処理することによって RNase を不活化したものを使用した。

III-1-6-b. プライマー伸長法

逆転写反応に使用したプライマーを表.7 に示した。これらのプライマーの 5'

末端を[γ - 32 P]ATP (Amersham Pharmacia)と T4 polynucleotide kinase (TAKARA Bio Inc)で放射性標識した。標識されたプライマー (0.2pmol)と DMS で修飾された rRNA(0.5pmol)を 20 μ l の Hybridization Buffer (20mM Tris-HCl, pH 8.3, 30mM NaCl)に加え、90°C で 3 分間加熱した後、ゆっくりと 45 分間かけて 42°C まで温度を下げることでハイブリダイゼーションさせた。その後、AMV reverse transcriptase XL (TAKARA Bio Inc)を用いて、42°C で 60 分間反応させることで逆転写反応を行った。また、逆転写反応に使用した DNA プライマーを表.8 に示す。得られた cDNA はシーケンスゲル (8% polyacrylamide, 8M urea, 89mM Tris-borate, pH8.3, 24mM EDTA)で分離し、泳動後のゲルを乾燥させ、Imaging Plate (Fuji Film)に 16 時間露光させた。シグナルは BAS2500 (Fuji Film)を用いて検出した。

表. 7 逆転写反応に使用したプライマー

Primer	Sequence	Location in 23S rRNA (<i>rrnB</i>) in <i>Bacillus subtilis</i>
<i>rrnB</i> -R1	TTTCAGTTCCTCCCGGGTCTGCCTTCTC	175-200
<i>rrnB</i> -R2	GAGAACGAAGTTTTGACTACAGGGCT	375-400
<i>rrnB</i> -R3	CATCACCGTTAACGGGCTCTGACTAC	575-600
<i>rrnB</i> -R4	CACTTTTCAACGTGCGTGGGTTTCGGG	775-800
<i>rrnB</i> -R5	CACTCGCAGTCTGACTCCCAAGGATA	975-1000
<i>rrnB</i> -R6	TTCGGTGATACGTTTAGCCCCGGTAC	1175-1200
<i>rrnB</i> -R7	GGCCTCGGCTTAGGTCCCGACTAACC	1375-1400
<i>rrnB</i> -R8	ATCAGGAACTTCGCTACTATATTTTCG	1575-1600
<i>rrnB</i> -R9	TCGCCTGGGCCTATTCCTGCGGCTC	1775-1800
<i>rrnB</i> -R10	CCTTTTCGTGCGGGTCGGAACCTTACCC	1975-2000
<i>rrnB</i> -R11	TATCCCACCGATGCCTCCACCGAAGC	2175-2200
<i>rrnB</i> -R12	TCCCTGCTCGACTTGTAAGGTCTCGCA	2375-2400
<i>rrnB</i> -R13	TACCGCTTTAATGGGCGAACAGCCCA	2575-2600
<i>rrnB</i> -R14	GGGGGGCTTCATGCTTAGATGCTTTC	2775-2800
<i>rrnB</i> -R15	ATGGTTAAGTCCTCGATCG	2908-2927

III-1-7. 酵母 2 ハイブリッド法

酵母 2 ハイブリッド法に使用した株を以下に示した。

Saccharomyces cerevisiae

PJ69-4A	<i>MATa</i> , <i>trp-1901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112ura3-52</i> , <i>his-200</i> , <i>gal4D</i> , <i>gal80D</i> , <i>Lys2::GAL1-His3</i> , <i>GAL2-ADE2</i> , <i>met2::GAL7-lacZ</i>
PJ69-4 α	<i>MATα</i> , <i>trp-1901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112ura3-52</i> , <i>his-200</i> , <i>gal4D</i> , <i>gal80D</i> , <i>Lys2::GAL1-His3</i> , <i>GAL2-ADE2</i> , <i>met2::GAL7-lacZ</i>

III-1-7-a. 酵母の培養条件

酵母の培養は、特に記載がない場合は、YPDA 培地 (20g/L Difco peptone, 10g/L Yeast extract, 50ml/L 40% Glucose(W/V), 20mg/L L-adenine) もしくは SD 培地 (6.7g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 100ml/L 10 x DO(drop out) solution, 50ml/L 40% Glucose (W/V))を用い、30°C で行った。また、SD 培地に使用した 10 x DO(drop out) solution (300mg/L L-Isoleucine, 1500mg/L L-Valine, 200mg/L L-Adenine hemisulfate salt, 200mg/L L-Arginine HCl, 200mg/L L-Histidine HCl monohydrate, 1000mg/L L-Leucine, 300mg/L L-Lysine HCl, 200mg/L L-Methionine, 500mg/L L-Phenylalanine, 2000mg/L L-Threonine, 200mg/L L-Tryptophan, 300mg/L L-Tyrosine, 200mg/L L-Uracil) は必要に応じて、L-Leucine, L-Tryptophan, L-Histidin HCl monohydrate, L-Adenine hemisulfate salt を除いて使用した。

III-1-7-b. 酵母の形質転換

酵母への形質転換は、CLONTECH の Yeast protocols handbook に従って行った。pGAD424-*gene* は酵母 PJ69-4 α 株に、pGBT9-*gene* は酵母 PJ69-4A 株にそれぞれ導入した。

まず、PJ69-4 α と PJ69-4A を YPDA 寒天培地で 1 日培養し、それらのコロニーをそれぞれ 10ml の YPDA 培地に OD600 が 0.3 になるように植菌した後、30°C で 3 時間培養した。これを集菌し、滅菌水で洗浄することで、コンピテントセルとした。次に、1ml の TE/LiAC 溶液に懸濁した酵母のコンピテントセルに、200 μ g の Carrier DNA(CLONECH)を加え vortex により混和した。これを 100 μ l ずつ 1.5ml チューブに分注し、200ng のプラスミドを加え vortex で混和した。次に、PEG/LiAc 溶液を 600 μ l 加え、vortex で攪拌後、30°C で 30 分間インキュベートし、70 μ l の DMSO を加えた。その後、サンプルを 42°C で 15 分間加熱し、即座に氷上で 1~2 分間急冷した。形質転換体の選択は、適当なアミノ酸を除いた SD 培地で行った。例えば、pGAD424-*gene* を酵母 PJ69-4 α 株に導入した株と pGBT9-*gene* を酵母 PJ69-4A 株に導入したものは、それぞれ SD(-Leu)と SD(-Trp)培地で選択した。

III-1-7-c. 酵母の接合

酵母の接合は、CLONTECH の Yeast protocols handbook に従って行った。pGAD424-*gene* をもつ酵母 PJ69-4 α 株と pGBT9-*gene* をもつ酵母 PJ69-4A 株を

YPDA 培地で、それぞれ 1 晩培養し、それぞれの培養液を混合させ、さらに 8 時間培養した。その後、SD(-Trp, -Leu)培地で形質転換体を選択し、得られた形質転換体を相互作用解析に用いた。

III-1-8. *in vitro* における YlqF と Ctc(L25 タンパク質)の相互作用解析

His₆-Ctc の精製は第 2 章で記述した GTP 結合タンパク質の精製と同じ手法で行った。

III-1-8-a. GST-YlqF および GST の精製

GST-YlqF と GST は、PET SYSTEM に従い、Grutathione-カラム (Novagen)を用いて精製した。大腸菌 BL21(DE3)pLysS に pDEST15L と pGEX2T を導入し、30°C で培養し、50 µg/ml のアンピシリンを含む LB 培地 500 ml 中で培養した。OD₆₀₀ が 0.6 に達した時点で終濃度 1 mM となるように IPTG を添加し、3 時間後に集菌した。得られた細胞を PBS Buffer (4.3mM Na₂HPO₄, 1.4mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 27mM KCl, pH7.3)で洗浄した後、10 ml の PBS Buffer に懸濁し、氷上で超音波による細胞破碎を行った。得られた細胞破碎液を 4 °C、39000 g で 30 分遠心し、その上清から Grutathione-agarose (Novagen) を充填したカラムを用いて、GST-YlqF および GST の精製を試みた。GST-YlqF および GST が結合したカラムは 10 ml の PBS Buffer で洗浄した後、GST elution buffer (50mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM glutathione)で GST-YlqF もしくは GST を溶出させた。GST-YlqF および GST を含む画分は終濃度 10 %となるグリセロールを加え-80°C で保存し、試料中のタンパク質濃度の測定は、Protein Assay Reagent (Bio Rad)を用いて行った。

III-1-8-b. Grutathione-カラムを用いた Pull-down assay

PBS Buffer (4.3mM Na₂HPO₄, 1.4mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 27mM KCl, pH7.3)中に GST-YlqF と His₆-Ctc (反応液 I), GST と His₆-Ctc(反応液 II)、His₆-Ctc(反応液 III)を混合し、30°C で 15 分間インキュベーションした。その後、それぞれの反応を Grutathione-カラム (Novagen)に通し、GST-YlqF もしくは GST をカラムに結合させた。その後、このカラムを 10 ml の PBS Buffer で洗浄した後、GST elution buffer (50mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM glutathione)を用いて、GST-YlqF もしくは GST を溶出させた。得られた画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE によって分離し、銀染色で検出した。

III-2. 結果

III-2-1. *in vitro* における YlqF とリボソームの結合解析

第2章では、ショ糖密度勾配遠心法による解析の結果、YlqF が GTP γ S の存在に依存して 50S サブユニットに結合することが明らかになった。そこで、*in vitro* において、精製した YlqF と 50S サブユニットを結合させ、その結合比の決定を試みた。

解析に使用した 50S サブユニットは、第2章で使用した粗リボソーム画分から調整した。まず、粗リボソーム画分をマグネシウム濃度の低い Buffer C に懸濁することで、粗リボソーム画分中に存在する 70S サブユニットを完全に 50S と 30S サブユニットに解離させ、それらをショ糖密度勾配遠心法で分離した。得られたショ糖密度勾配を分画し、50S と 30S サブユニットを含む画分を回収することで各サブユニットを調整した。精製した 50S および 30S サブユニットの SDS-PAGE を図.21B に示した。

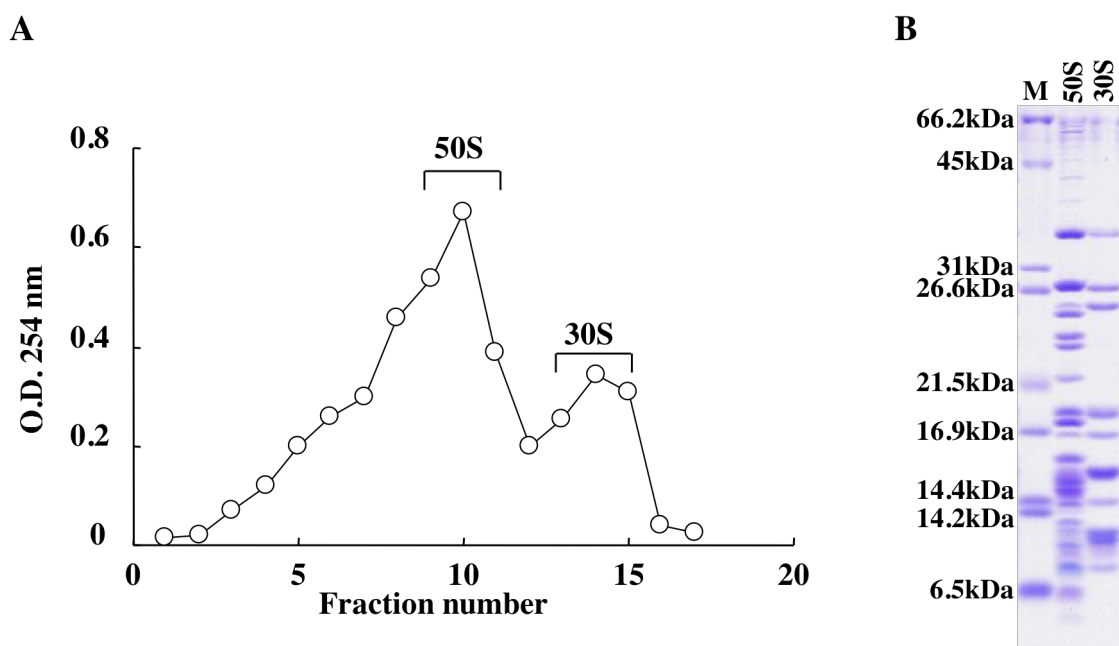


図.21 50S および30Sサブユニットの精製

粗リボソーム画分に含まれる50Sと30Sサブユニットをショ糖密度勾配遠心法により分離し、得られたショ糖密度勾配を分画した。30Sと50Sサブユニットが含まれる画分を、254nmの吸光度を指標に特定し、エタノール沈殿にて50Sおよび30Sサブユニットを回収した。Aはショ糖密度勾配を254nmの吸光度でモニターしたものを示した。Bは精製後の30Sと50SサブユニットのSDS-PAGEを示した。

まず、*in vitro* において YlqF と GTP γ S を結合させ、その後、50S サブユニットと GTP γ S-YlqF を結合させた。次に、この反応液中の 50S-YlqF 複合体を Microcon100 (Millipore)を用いて回収した。得られた 50S-YlqF 複合体に含まれる YlqF と 50S サブユニットは、それぞれ、抗 YlqF 抗体と抗 L3 タンパク質抗体を用いたウエスタンブロット法によって検出し、YlqF と 50S サブユニットの濃度は、YlqF と L3 タンパク質のバンドの強度を NIH image にて測定することで決定した。その結果、反応液中に 50S サブユニットが存在すると、YlqF がフィルター上に回収されることが明らかになった (図.22A)。一方、YlqF のみを Microcon100 に通した場合(図.22B, Lane1)、および T7 RNA polymerase で合成させた 23S rRNA と YlqF を反応させたものを Microcon100 に通した場合(図.22B, Lane2)では、YlqF はフィルター上に回収されなかった。このことは、*in vitro* においても、YlqF が 50S サブユニットに特異的に結合することを示している。さらに、結合した YlqF は反応液中に存在する 50S サブユニットの約 2 倍量で飽和していることから(図.22C)、1 分子の 50S サブユニットに対して、2 分子の YlqF が結合することも示唆された。

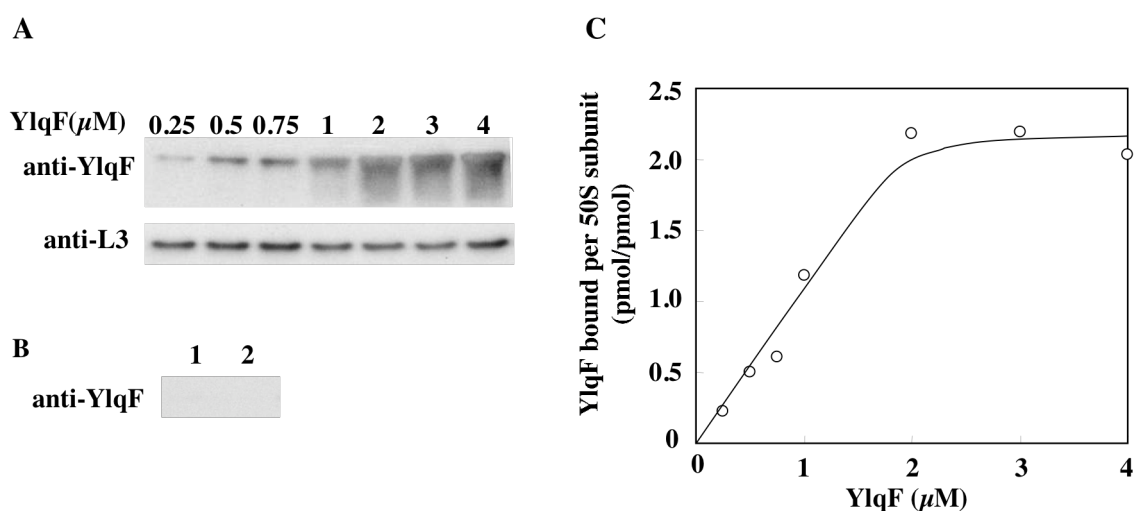


図.22 YlqFは1分子の50Sサブユニットに対して2分子結合する

YlqFと50Sサブユニットの結合比を求めるために、*in vitro*におけるYlqFと50Sサブユニットの結合解析を行った。様々な濃度のYlqF(0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4 μ M)と0.2 μ M 50Sサブユニットを、30 $^{\circ}$ Cで10分間反応させ、Microcon 100を用いて、50S-YlqF複合体を回収した。得られた50Sサブユニットに含まれるYlqFと50Sサブユニットを、それぞれ、抗YlqF抗体と抗L3タンパク質抗体で検出したものをAに示した。Bはネガティブコントロールを示した。Lane 1 は、2 μ M YlqFのみをMicrocon 100に通し、フィルター上に得られたものを抗YlqF抗体で検出したもの。Lane 2は、T7 RNA polymeraseで合成した0.2 μ M 23S rRNAと2 μ M YlqFを30 $^{\circ}$ Cで10分間反応させ、Microcon 100に通し、フィルター上に得られたものを抗YlqF抗体で検出したもの。Cは、Aの各バンドの強度をNIH imageで求め、YlqFと50Sサブユニットの結合比を示した。

III-2-2. 50S サブユニットが与える YlqF の GTP 加水分解能への影響

第2章では、粗リボソーム画分によって YlqF の GTP 加水分解能が大きく促進されることを示し、ショ糖密度勾配遠心法を用いた結合解析では、YlqF は 50S サブユニットに結合することが明らかになっている。そこで、YlqF の GTP 加水分解能が 50S サブユニットに制御されているか調べた。

まず、YlqF の GTP 加水分解能が 50S サブユニットによって促進されるか調べたところ、予想通り、50S サブユニットの濃度に依存して、GTP 加水分解能が上昇することが明らかになった(図.23A)。次に、この活性化が 50S サブユニットによって特異的に引き起こされているか調べるために、反応液中に、50S、30S、RNase で処理した 50S サブユニットのいずれかを加え、それぞれの条件下における YlqF の GTP 加水分解能を比較した。その結果、50S サブユニットの存在下では YlqF の GTP 加水分解能は大きく促進されるものの、30S サブユニットや 50S サブユニットを RNase で処理したものでは、GTP 加水分解能の活性化は見られなかった(図.23B)。これらの結果より、YlqF の GTP 加水分解能の活性化は、50S サブユニットによって特異的に促進されることが明らかになった。

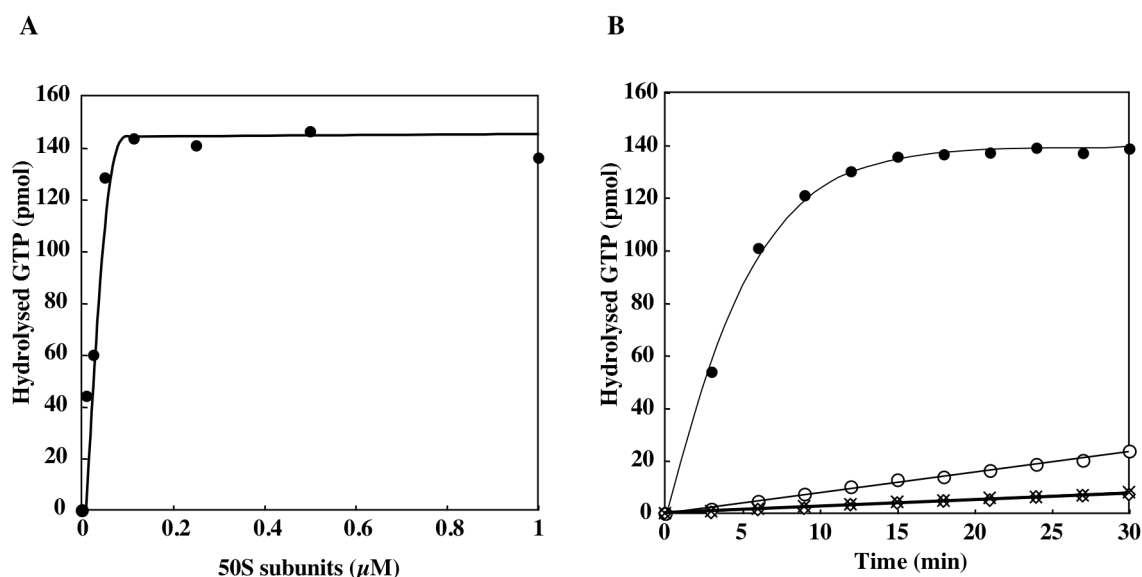


図.23 50SサブユニットによるYlqFのGTP加水分解能の促進

- A 1 μ M YlqFを含む反応液に、様々な濃度(0, 0.01, 0.025, 0.1, 0.25, 0.5, 1 μ M)の50Sサブユニットを加え、37°Cで10分間反応させた。グラフには各反応液中に含まれる加水分解されたGTPの量を示した。
- B 1 μ M YlqFを含む反応液に、なにも加えないもの($\times$)と、0.025 μ M 50S($\bullet$)、0.025 μ M 30S($\circ$)、0.025 μ M RNaseで処理した50Sサブユニット($\diamond$)を加えたものを、37°Cで30分間反応させ、3分間ごとに加水分解されたGTPを測定し、プロットした。

翻訳因子である EF-Tu や EF-G は、50S サブユニットの GTPase センターや sarcin/ricin loop と相互作用することで GTP 加水分解能が促進されることが知られている(Wimberly *et al*, 1999; Correll *et al*, 1999)。YlqF も 50S サブユニットに結合し、自身の持つ GTP 加水分解能が大きく促進されることから、EF-Tu や EF-G と同じ様に、GTPase センターや sarcin/ricin loop と相互作用するのではないかと、という疑問が生じてくる。EF-Tu や EF-G のリボソームに依存した GTP 加水分解能の促進は、Thiostrepton (抗生物質)と α -sarcin (タンパク質)によって阻害されることが知られている。Thiostrepton は GTPase センターと結合することで(Wimberly *et al*, 1999)、 α -sarcin は sarcin/ricin loop を切断すること(Correll *et al*, 1999)で EF-Tu や EF-G のリボソーム依存的な GTP 加水分解能の促進を阻害する。また、最近の報告では、Era/Obg スーパーファミリーのメンバーである YjeQ の GTP 加水分解能が 30S サブユニットによって促進されることが報告されており、さらにその活性化を A-site の周辺に結合する aminoglycoside 系の抗生物質(neomycin, paromomycin, gentamycin, kanamycin など)や spreptomycin、tetracyclin などが阻害することも報告されている(Himeno *et al*, 2004; Denis *et al*, 2004)。そこで、YlqF の 50S サブユニット依存的な GTP 加水分解能の促進も抗生物質や α -sarcin によって阻害されるのではないかと考え、いくつかの抗生物質と α -sarcin による GTP 加水分解能の促進への影響を調べた。しかしながら、図.24 で見られる様に、いずれの場合でも、50S サブユニット依存的な YlqF の GTP 加水分解能の促進は阻害されなかった。このことは、YlqF が EF-Tu や EF-G が結合する領域とは異なる部位に結合することを示唆している。

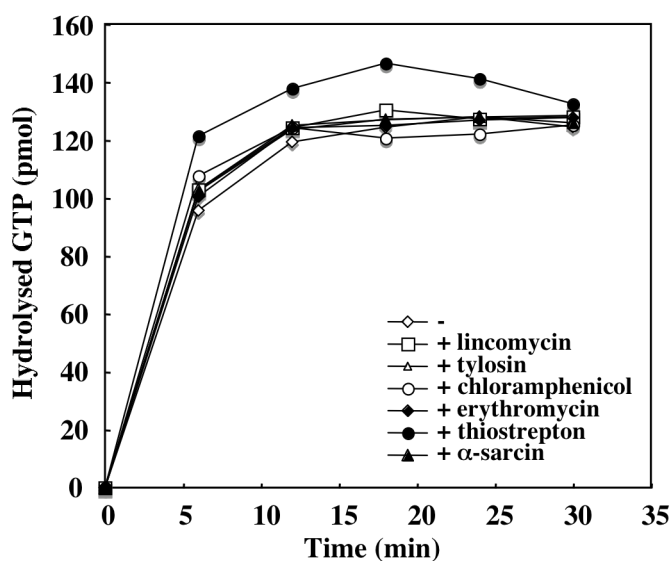


図.24 抗生物質や α -sarcinが与える50Sサブユニット依存的なYlqFのGTP加水分解能の促進への影響

1 μ M YlqFと0.025 μ M 50Sサブユニットを含む反応液に、何も加えないもの($\diamond$)と10 μ Mの抗生物質[lincomycin ($\square$), tylosin($\triangle$), chloramphenicol ($\circ$), erythromycin ($\blacklozenge$), thiostrepton($\bullet$)]および25 μ Mの α -sarcin($\blacktriangle$)を加えたものを、37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させ、5分間ごとに加水分解されたGTPを測定し、プロットした。

III-2-3. DMS フットプリント法によるリボソームの YlqF 結合領域の決定

50S サブユニットによる YlqF の GTP 加水分解能の促進は Thiostrepton や α -sarcin、そしてその他の抗生物質に阻害されないことから、翻訳因子などの GTP 結合タンパク質とは異なる領域に結合することが予想される。そこで、YlqF がリボソーム上のどの領域に結合するのか調べるために、DMS フットプリント法を行った。DMS フットプリント法は、DMS が RNA をメチル化することを利用して、RNA とタンパク質の結合領域を同定する方法である。RNA 上にタンパク質が結合すると、DMS によるその領域のメチル化が阻害される。そのため、プライマー伸長法の逆転写反応で阻害が起こらず、電気泳動後のイメージでは、タンパク質が結合した領域が白抜きになることになる。

まず、GTP γ S を結合させた YlqF と 50S サブユニットを 30°C で 10 分間反応させ、さらに、DMS を加えて 30°C で 15 分間反応させることで RNA のメチル化を行った。その後、修飾された rRNA を鋳型に、逆転写反応を行い、得られたサンプルをシーケンスゲルによる電気泳動で分離した。また、逆転写反応に使用した DNA プライマーは、23S rRNA の全長をカバーできるように 15 本作製した(表.7)。

その結果、YlqF の存在によって DMS のメチル化が阻害された領域は、23S rRNA の Helix 38 に位置する C928 と C942、Helix 81 に位置する A2301、Helix85 に位置する A2354 であった(図.25)。これらの領域は、23S rRNA の 2 次構造上では、全く異なる領域に位置しているが(図.30)、*Deinococcus radiodurans* の 50S サブユニットの立体構造上 (PDB code 1NKW, Harms *et al*, 2001)にマッピングすると、非常に隣接していることがわかる(図.29)。Helix 38 は、リボソームの A サイトに結合する tRNA の elbow と相互作用することが知られおり、Helix81 と Helix85 は、P サイトの tRNA の elbow と相互作用するリボソームタンパク質 L5 の近傍に位置することから、YlqF は A サイトと P サイトの近傍に位置する 23S rRNA に結合することが示唆された(Yusupova *et al*, 2001; Harms *et al*, 2001)。

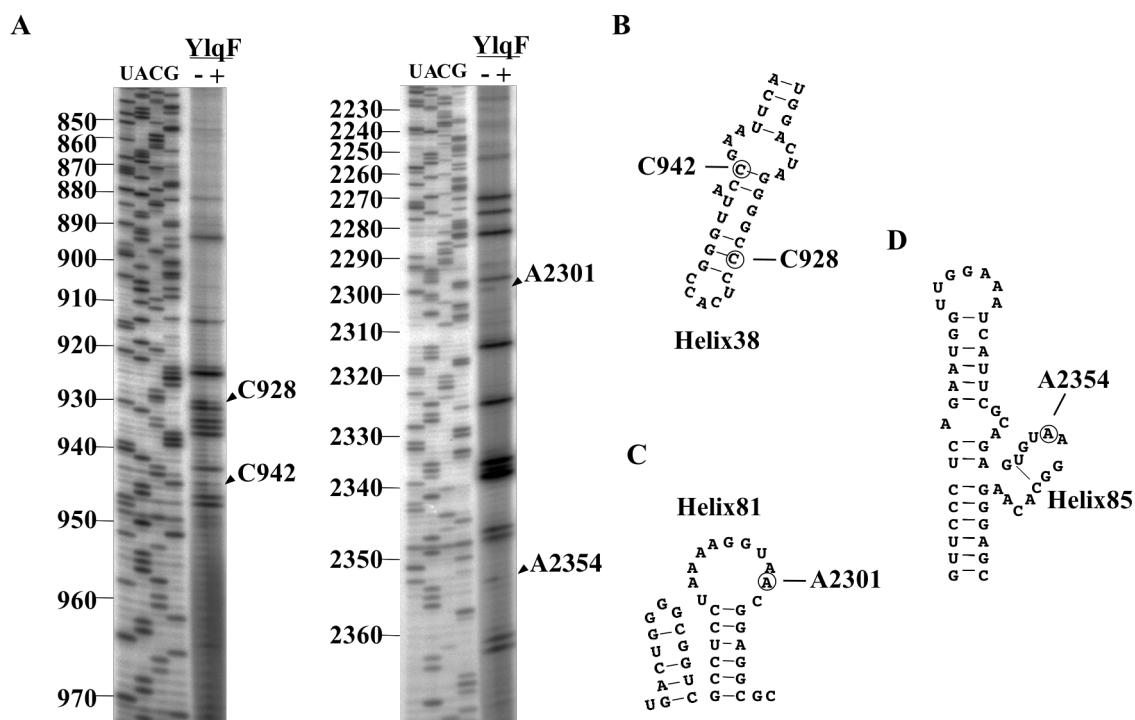


図.25 DMSフットプリント法による50Sサブユニット上のYlqFの結合領域の同定

A. 50SサブユニットをYlqF存在下(Lane 1)と非存在下(Lane 2)でDMS処理し、修飾されたrRNAを鋳型に逆転写酵素によるプライマー伸長反応を行った。得られたサンプルはシーケンスゲルを用いた電気泳動で分離した。ここにはYlqFの結合が観察された2つの領域を示した。左のパネルはプライマー $rrnB$ -R5(975-1000 in *B.subtilis* 23S rRNA)、右のパネルはプライマー $rrnB$ -R12(2375-2400 in *B.subtilis* 23S rRNA)を使用した。Lane U, A, C, Gは同じプライマーを使用したシーケンスラダーを示した。

B,C,DはそれぞれHelix 38, 81, 85の2次構造を示し、YlqFの存在によってDMSのメチル化が阻害された塩基を示した。

III-2-4. YlqF とリボソームタンパク質の相互作用解析

DMS フットプリント法では、RNA との結合しか検出できないため、リボソームタンパク質との相互作用は、酵母2ハイブリッド法を利用した。

本研究の酵母ツーハイブリッド法は、転写因子 Gal4 のシステムを利用した。酵母2ハイブリッド法に使用したプラスミドベクターである pGBT9 と pGAD424 は、それぞれ、転写因子 Gal4 の DNA 結合領域と転写活性化領域をもっており、目的遺伝子を各プラスミドにクローニングすることで各領域と融合したタンパク質を酵母細胞内で発現させることが可能である。DNA 結合領域と融合させたタンパク質 (Bait) と転写活性化領域と融合させたタンパク質 (Prey) が酵母細胞内で相互作用すると、Gal4 の両方の領域が接近し、転写因子としての活性が回復する。その結果、Gal4 プロモーターの下流にコードされたレポーター遺伝

子が発現し、これを指標に目的タンパク質間の相互作用を確認することができる。本研究で用いたシステムではレポーター遺伝子としてヒスチジンの合成系 *HIS3* が使用されているため、ヒスチジンを含まない SD 培地によって相互作用を確認することができる。また本研究では、偽りの相互作用を抑えるために、ヒスチジン合成系の阻害剤である 3-amino-1,2,4-triazole (3AT) を、終濃度 5mM になる様に SD 培地に加えた。

まず、*ylqF* を Bait として発現するプラスミド(pGBT-*ylqF*)を A 型の酵母細胞(PJ69-4A 株)に導入し、50S サブユニットを構築する全てのリボソームタンパク質(35 種; L-protein)をそれぞれ Prey として発現するプラスミド(pGADT7-*L-protein*)を α 型の酵母細胞(PJ69-4 α)に導入した。次に、*ylqF* を Bait として発現するプラスミド(pGBT-*ylqF*)をもつ A 型の酵母細胞と *L-protein* を Prey として発現するプラスミド(pGAD424- *L-protein*)をもつ α 型の酵母細胞を接合させることで、Bait と Prey を発現する酵母細胞を得た。得られた酵母細胞を、ヒスチジンを含まない SD 寒天培地に植菌し、生育を観察することで、35 パターン(YlqF と全ての L-protein)の相互作用を調べた。その結果、YlqF と Ctc(リボソームタンパク質 L25)の相互作用を見いだした(図.26)。また、その他の L-protein とは相互作用しないことも確認した(データは記載しない)。

そこで次に、YlqF と L25 タンパク質の相互作用を *in vitro* の結合解析で確認することにした。まず、PET SYSTEM を利用し、N 末端に GST タグを融合させた YlqF と N 末端に His₆ タグを融合させた Ctc(L25 タンパク質)を大腸菌内で過剰発現させ、それぞれ、Glutathione-カラムと Ni-カラムを用いて精製した(図.27)。

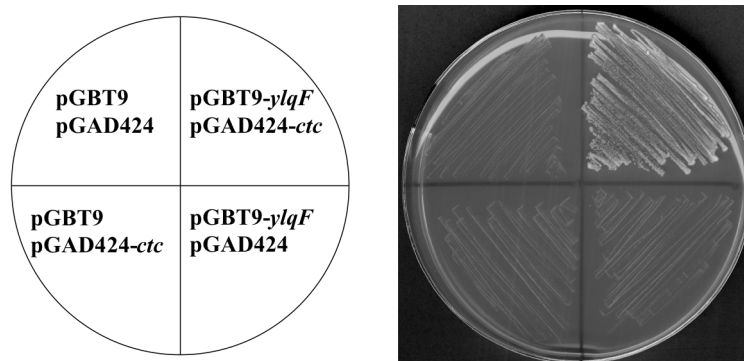


図.26 YlqFはリボソームタンパク質L25と相互作用する

ylqF と *ctc* はそれぞれ pGBT9 と pGAD424 に組み込まれており、pGBT9 と pGAD424 はネガティブコントロールとして使用した。pGBT7-*ylqF* を A 型の酵母細胞(PJ69-4A 株)に導入し、pGAD424-*ctc* を α 型の酵母細胞(PJ69-4 α)に導入した。それぞれの細胞を接合させることで、2倍体の酵母細胞を獲得した。この2倍体の細胞をSD培地(-Trp, -Leu, -His, +5mM 3AT)にストリークした。

得られた精製タンパク質(GST-YlqF と His₆-Ctc)を PBS Buffer (4.3mM Na₂HPO₄, 1.4mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 27mM KCl, pH7.3)中に混合し、30℃で15分間インキュベーションした。その後、反応液中に含まれる GST-YlqF を Gultathione-カラムによって回収し、得られた画分に His₆-Ctc が共精製されるか確認した。また、コントロールとしては、GST と His₆-Ctc を含む反応液と His₆-Ctc のみを含む反応液を Gultathione-カラムで回収したものを使用した。その結果、GST と His₆-Ctc を反応液中に含むものや His₆-Ctc だけを反応液中に含むものでは His₆-Ctc は共精製されないが、GST-YlqF を含む反応液では、His₆-Ctc が GST-YlqF と共精製されることが明らかになった(図.27)。このことから、in vitro でも YlqF が Ctc(L25 タンパク質)と相互作用することが確認できた。

D.radiodurans のリボソームタンパク質 L25 は、5S rRNA と DMS フットプリント法で同定した YlqF の結合領域である 23S rRNA の Helix 38 に結合することが報告されている(Yusupova *et al*, 2001; Lu *et al*, 2000)。これらの結果と DMS フットプリント法の結果は一致しており、YlqF が 50S サブユニットの A サイトと P サイトの近傍に結合することが強く示唆された。

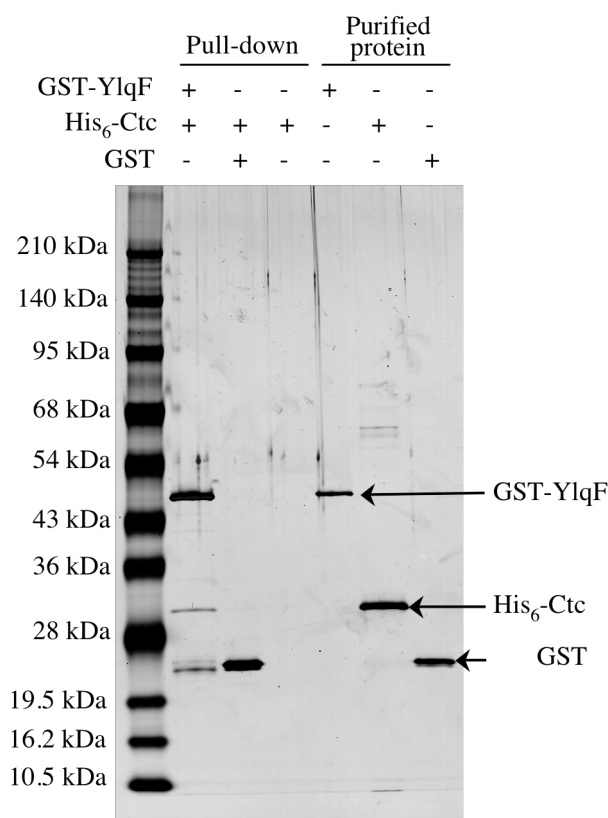


図.27 in vitroにおけるYlqFとCtc(L25タンパク質)の相互作用解析

精製した GST-YlqF と His₆-Ctc 、 GST と His₆-Ctc 、 His₆-Ctc を PBS Buffer 中に混合し、30℃で15分間インキュベーションした。その後、反応液中に含まれる GST-YlqF を Gultathione-カラムによって回収し、得られた画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で分離し、銀染色によって検出した。また、コントロールには、精製した GST-YlqF、His₆-Ctc、GST を用いた。

III-2-5. YlqF の枯渇によるリボソームへの影響

第2章では、枯草菌細胞内で YlqF が枯渇すると、70S リボソームの減少と 50S、30S サブユニットの増加が観察された。また、この蓄積された 50S サブユニットの分子量が野生株の 50S サブユニットより小さいことから、YlqF が 50S サブユニットの生合成に関与している可能性が示唆された。そこで、50S サブユニットの生合成における YlqF の役割を解明するために、YlqF の枯渇条件下に蓄積される未成熟な 50S サブユニットの構成タンパク質を調べた。

第2章では、TMO208 株を IPTG の存在下から非存在下に移行することで、*ylqF* の発現を完全に抑制した。YlqF は細胞の増殖に必須であることから、その転写を完全に抑制することは、YlqF と無関係な表現型を生み出す恐れがある。そこで今回は、TMO208 株が生育できる条件下で解析を行った。この変異株は、100 μ M IPTG を含む LB 培地中では、野生株と同等の生育速度を示すが、5 μ M IPTG の条件下では、生育速度が約 1/2 に減少する(図.28A)。そして、5 μ M IPTG の条件下でも、70S リボソームの減少と 50S、30S サブユニットの増加が観察され、さらに未成熟な 50S サブユニットの蓄積もはっきりと観察された(図.28B)。そこでこの未成熟な 50S サブユニットを精製し、野生株の 50S サブユニットに含まれる構成タンパク質と未成熟な 50S サブユニットに含まれる構成タンパク質を SDS-PAGE によって比較した結果、YlqF の枯渇した細胞の 50S サブユニットでは、2つのバンドが失われており、野生株のパターンとは、明らかな違いが観察された(図.28C)。これらの失われたバンドを質量分析計で同定したところ、リボソームタンパク質 L16 と L27 であることが明らかになった。リボソームタンパク質 L16 と L27 は、図.29 に示した様に、本研究で同定した YlqF の結合領域に隣接している。また、これらのタンパク質は、共に late assembly protein に所属していることから(図.5; Nierhaus, 1976)、YlqF は 50S サブユニットの後期生合成ステップに必要な因子であることが示唆された。

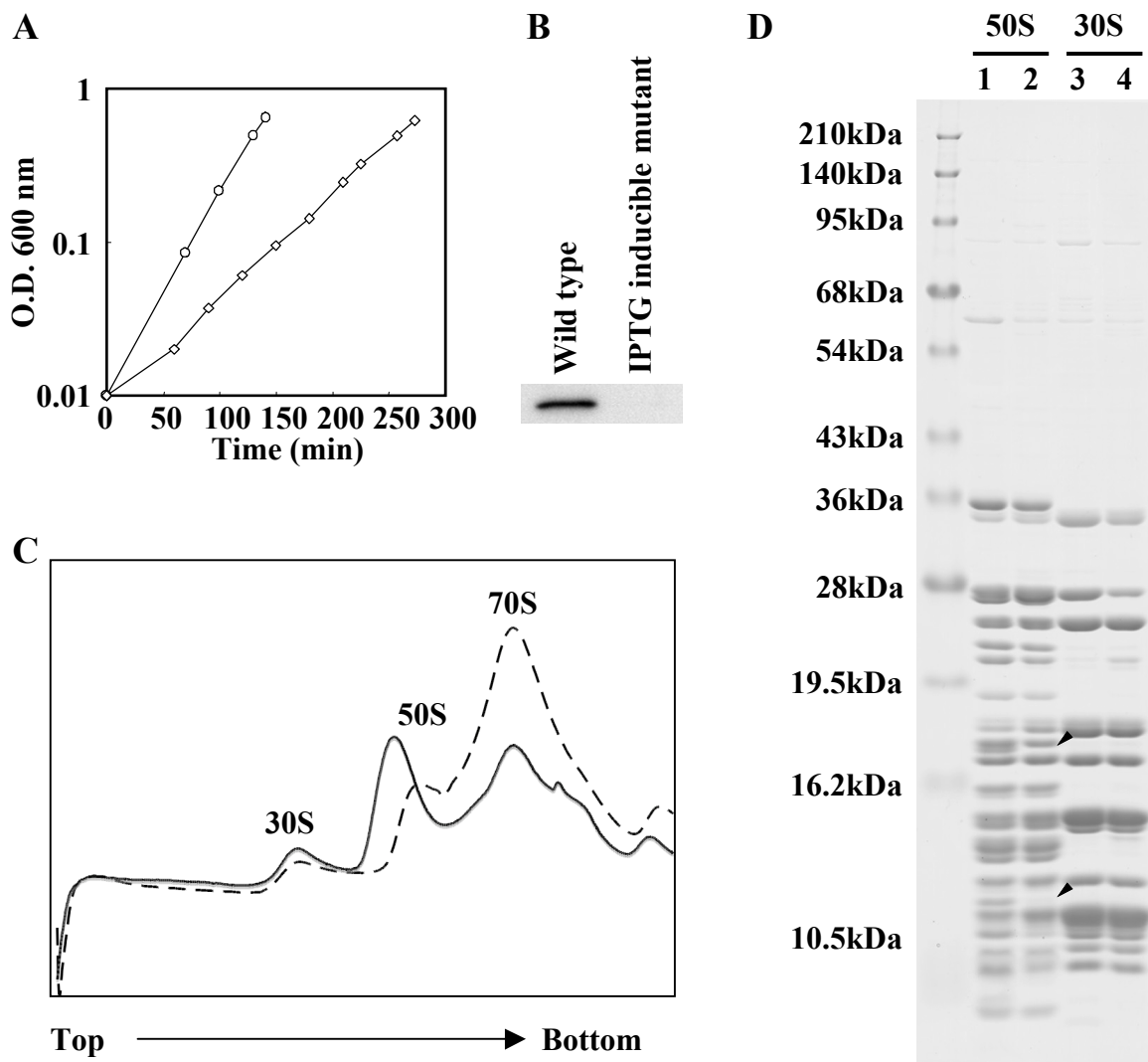


図.28 細胞内におけるYlqFの枯渇による枯草菌への影響
 野生株とIPTGでYlqFの発現を誘導できる変異株を、37°Cで培養した。野生株の培養はLB培地中、変異株の培養は、5 μ M IPTGを含むLB培地中で行った。

A. 野生株(○)と変異株(◇)の増殖曲線を示した。

B. 野生株と変異株の細胞抽出液中に含まれるYlqFを抗YlqF抗体で検出し、その量を比較した。

C. 野生株(----)と変異株(—)におけるリボソームプロファイルを示した。

D. 野生株の50S(Lane 1)と30Sサブユニット(Lane 3)、および変異株の未成熟な50S(Lane 2)と30Sサブユニット(Lane 4)のSDS-PAGEを行い、それぞれのサブユニットを構成するタンパク質を比較した。▲で示したバンドを質量分析計で同定した結果、リボソームタンパク質L16とL27であることが明らかになった。

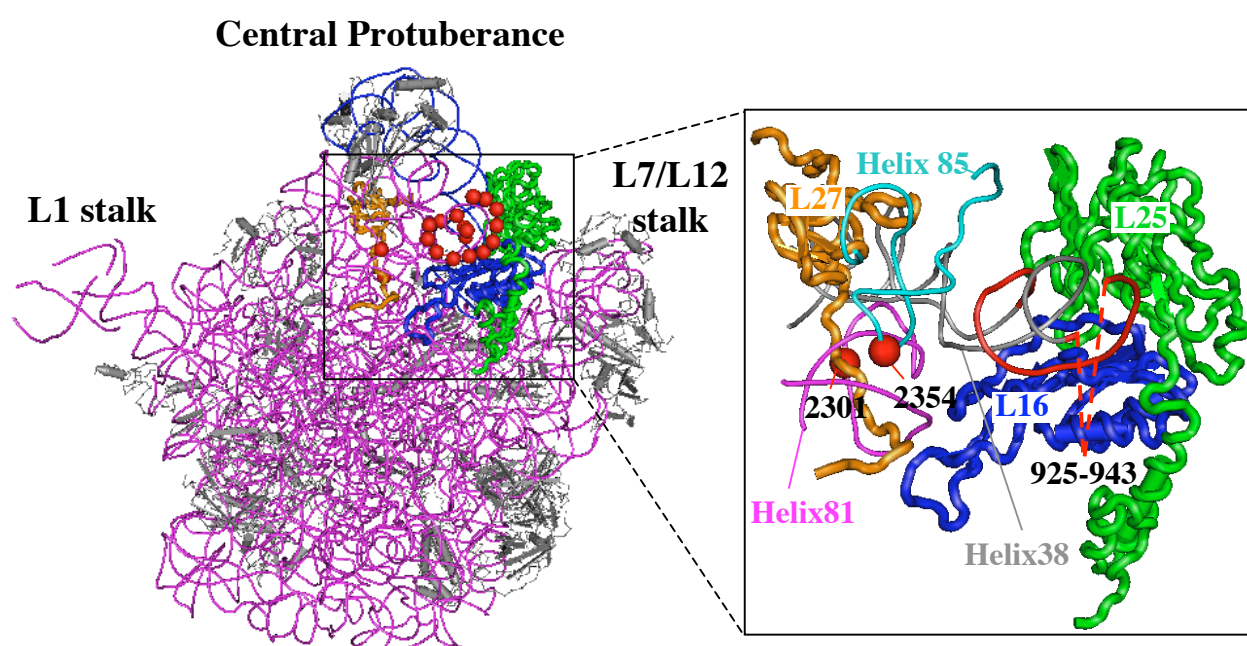


図.29 *Deinococcus radiodurans*の50Sサブユニット上におけるYlqF結合領域とリボソームタンパク質L16およびL27のマッピング

DMSフットプリント法と酵母2ハイブリッド法で同定したYlqFの結合領域を*Deinococcus radiodurans*の50Sサブユニットの立体構造上(PDB code 1NKW)にマッピングした。またYlqFの枯渇した細胞で、50Sサブユニットへの取り込みが阻害されるリボソームタンパク質L16とL27も同様にマッピングした。マッピングはCN3D (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>)を使用して行った。また、23S rRNAのHelix 81とHelix 85にそれぞれ位置する、2301と2354 (*D.radiodurans*ではそれぞれ2253,2306)もマッピングした。Helix 38に位置する928と942 (*D.radiodurans*ではそれぞれ895, 909)は、*D.radiodurans*の50Sサブユニットの立体構造では925-943の領域が決定されていないため、マッピングすることができなかった。

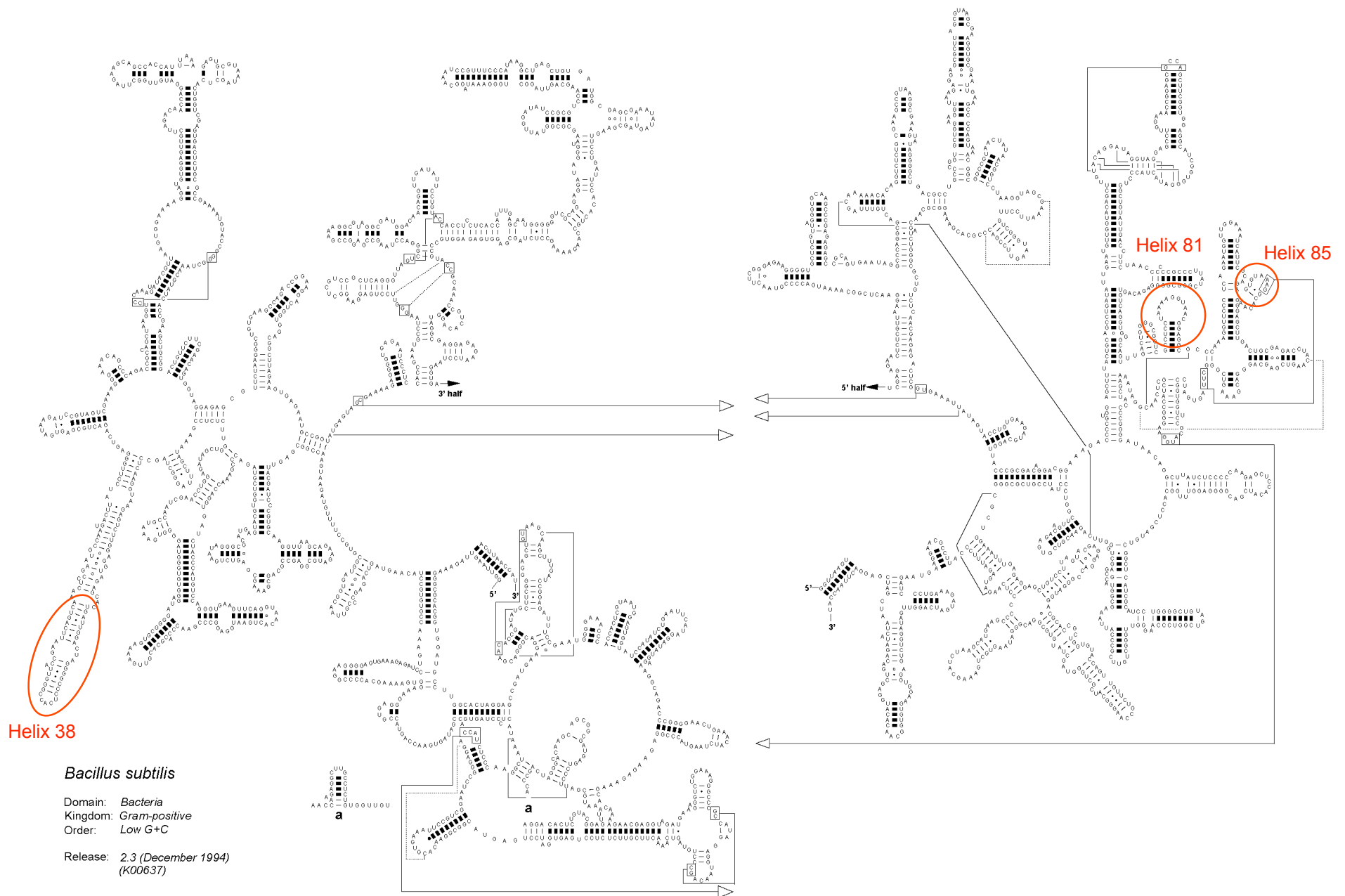


図.30 枯草菌の23S rRNAの2次構造
 枯草菌の23S rRNAの2次構造上にYlqFの結合領域であるHelix 38, 81, 85を示した。

III-3. 考察

第3章では、YlqFと50Sサブユニットの相互作用を詳細に解析することで50Sサブユニットの生合成におけるYlqFの役割を追求した。

In vitroでのYlqFと50Sサブユニットの結合解析では、2分子のYlqFが1分子の50Sサブユニットに特異的に結合することを明らかにした。また、YlqFのGTP加水分解能は、50Sサブユニットによって特異的に促進されることも明らかにした。DMSフットプリント法と酵母2ハイブリッド法では、YlqFが50Sサブユニットの会合面であるAサイトとPサイトの周辺に結合することを見いだした。さらにYlqFの枯渇した細胞では、70Sサブユニットの減少と未成熟な50Sサブユニットの蓄積が観察され、その未成熟な50Sサブユニットはリボソームタンパク質L16とL27を失っていることを見いだした。リボソームタンパク質L16とL27は共にlate assembly proteinに属しており、DMSフットプリント法と酵母2ハイブリッド法で同定したYlqFの結合領域に隣接した領域に結合する。以上の結果と第2章の結果をふまえ、YlqFと50Sサブユニットの関係について考察する。

III-3-1. YlqFのGTP加水分解能の役割について

単量体GTP結合タンパク質は、GTP型とGDP型という2つの構造をもっており、この構造の相互転換がGTP結合タンパク質の細胞内機能において重要な役割を担っている。例えば、EF-TuのGTP型からGDP型への変換は、tRNAのアンチコドンとmRNAのコドンの対合をモニターし、誤ったtRNAが取り込まれるのを防ぐ役割をもっており、EF-Gによるトランスロケーションの誘導は、EF-GのGTP型とGDP型の相互転換によって行われる(Rodnina *et al*, 2000; Zavialov *et al*, 2003)。

第3章ではYlqFのGTP加水分解能が50Sサブユニットによって促進されることを見いだしており(図.23)、さらに第2章において、YlqFは加水分解されないGTP γ Sの存在下では、50Sサブユニットと安定に結合するが、GDPの存在下では結合できないことも明らかにしている(図.11)。このことは、GTP型のYlqFが50Sサブユニットに結合し、内在性のGTP加水分解能の上昇によってGDP型になることで50Sサブユニットから解離することを推測させる。実際に、GTP

の存在下において、YlqF が 50S サブユニットと安定に複合体を形成しないことも確認している(データは記載しない)。また、YlqF の枯渇した細胞では、未成熟な 50S サブユニットの蓄積と、50S サブユニットへのリボソームタンパク質 L16、L27 の取り込みの阻害が観察されている(図.28)。リボソームタンパク質 L16 と L27 は Late assembly protein に所属しており、50S サブユニットの後期生合成ステップで取り込まれることが知られている(図.6; Nierhaus, 1976)。このことから、GTP 型の YlqF は未成熟な 50S サブユニットに結合し、その後、成熟化が完了した 50S サブユニットによって内在性の GTP 加水分解能が促進され、その結果、GDP 型へと変換されることで 50S サブユニットから解離することが示唆される。Era/Obg ファミリーの他のメンバーである Era は、30S サブユニットの会合面に結合することから、30S サブユニットと 50S サブユニットの会合を阻害することが報告されている(Sharma *et al*, 2005)。YlqF も 50S サブユニットの会合面に結合することから、30S サブユニットとの会合を阻害することが予想される。つまり、YlqF の GTP 加水分解能の促進による GDP 型への変換によって引き起こされる 50S サブユニットからの解離は、50S サブユニットと 30S サブユニットの会合開始の合図に成っているかもしれない。

以上のことをまとめると、YlqF の GTP 加水分解能は、50S サブユニットが正確に成熟化されたことをモニターする役割を持っている可能性が考えられるのではないだろうか。

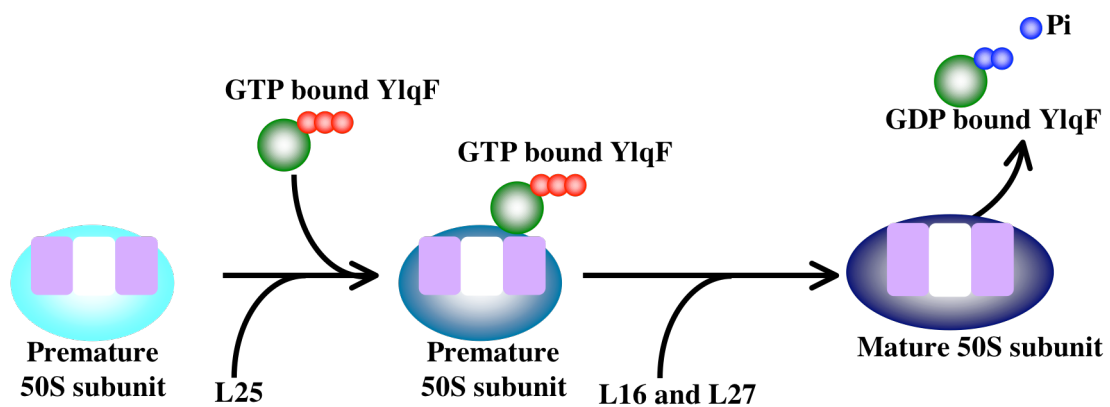
III-3-2. 50S サブユニットの生合成における YlqF の役割

第 3 章では、YlqF が 23S rRNA の Helix 38, 81, 85 および L25 タンパク質に結合すること (図.25, 26, 27)、さらに、YlqF が枯渇した細胞では、50S サブユニットへの L16 と L27 タンパク質の取り込みが阻害されることを見いだした(図.28)。そこで、YlqF の結合領域 (Helix 38, 81, 85 および L25) と L16 および L27 タンパク質の関係を考えてみる。

L16 と L27 タンパク質は、共に枯草菌の細胞増殖に必須なタンパク質であり、L16 タンパク質は、YlqF が結合する Helix 38 と相互作用し、L27 タンパク質は、Helix 81, 85 の近傍に位置している(図.29; Harms *et al*, 2001; Nishimura *et al*, 2004; Wilson *et al*, 2005)。また、これらのタンパク質は、成熟した 50S サブユニット上ではクロスリンカーによってクロスリンクされるほど隣接している(Walleczek *et al*, 1989)。L16 タンパク質を失った 50S サブユニットは、ペプチジルトランス

フェラーゼ活性(Moore *et al*, 1975; Hampl *et al*, 1981)やペプチジル tRNA の加水分解能(Tate *et al*, 1983)、30S サブユニットとの会合能(Kazemie, 1975)、アミノアシル tRNA の結合活性(kazemie, 1976)などが失われていることが報告されている。それ故、L16 タンパク質の取り込みは、50S サブユニットの機能部位の構造を構築するために必須であると考えられている(Teraoka & Nierhaus, 1978)。一方、L27 タンパク質が枯渇した大腸菌では、L16, L20, L21, L27 タンパク質が欠けている未成熟な 50S サブユニットが蓄積され、さらに 70S リボソームのペプチジルトランスフェラーゼ活性が阻害されることが報告されている(Wower *et al*, 1998)。図.29 で示した様に、YlqF の結合領域は、L16 と L27 タンパク質によって左右から挟み込まれるように位置しており、さらに、YlqF の枯渇が L16 と L27 タンパク質の 50S サブユニットへの取り込みを阻害することから、YlqF の 50S サブユニットへの結合が、L16 と L27 タンパク質の取り込みを助けていることが示唆される。L16 と L27 タンパク質の取り込みを助ける方法としては、YlqF がこれらのタンパク質の結合領域を構造変換させることやL16とL27タンパク質を 50S サブユニット上に運搬することなどが考えられる。しかしながら、酵母 2 ハイブリッド法の解析結果より、YlqF は L16 および L27 タンパク質とは相互作用しないことがわかっているため(データは記載しない)、後者のモデルは考えにくく、YlqF による 50S サブユニットの会合面の構造変換が、L16 と L27 タンパク質の取り込みを助けている可能性が高いのではないだろうか。

Era は、30S サブユニットの会合面に存在する S1 タンパク質と同じ領域に結合し、30S サブユニットの構造変換を引き起こすことが、低温電子顕微鏡を用いた構造解析から明らかになっている(Sharma *et al*, 2005)。また、この構造変換によって、30S サブユニットは 50S サブユニットと会合できなくなることが示唆されており、実際に、*in vitro* における再会合解析では、Era が結合した 30S サブユニットが 50S サブユニットと会合できないことが証明されている(Sharma *et al*, 2005)。それ故、Era は 30S サブユニットの成熟化が完了するまで、30S と 50S サブユニットが会合することを防ぐ役割を持っていることが推測されている。しかしながら、Era が細胞内で枯渇すると、70S リボソームの減少と、50S、30S サブユニットの増加が観察されており、この現象は、30S と 50S サブユニットの会合を阻害するという Era の役割とは矛盾する。そのため、Era は 30S サブユニットの生合成が正確に行われていることをモニターするだけでなく、その反応過程を促進する役割も持っていることが予想されている。Sharma らは、その可



Late assembly stage

図.31 50Sサブユニットの生合成におけるYlqFの役割のモデル

50Sサブユニットの後期生合成ステップにおけるYlqFの役割を示した。GTP型のYlqFは未成熟な50Sサブユニットに結合し、30Sサブユニットとの会合面の構造を変換させ、L16およびL27タンパク質の取り込みを誘導する。L16とL27タンパク質が取り込まれ、さらに50Sサブユニットの成熟化が完了すると、YlqFのGTP加水分解能が上昇し、YlqFはGTP型からGDP型へと変換される。その後GDP型となったYlqFが50Sサブユニットから解離することで、50Sと30Sサブユニットの会合が可能になり、タンパク質の合成が開始される。

能性として、Eraによる30Sサブユニットの構造変換が、リボソームタンパク質の取り込みを助けているのではないかと推測している(Sharma *et al*, 2005)。YlqFも50Sサブユニットの会合面に結合し、L16とL27タンパク質の取り込みに関与していることから、Eraと同じ様に、50Sサブユニットの構造変換によってL16とL27タンパク質の取り込みを、間接的に助けているのではないだろうか？

以上のことをふまえ、50Sサブユニットの生合成におけるYlqFの役割のモデルを図.31に示した。GTP型のYlqFは50Sサブユニットの後期生合成ステップにおいてA、Pサイト周辺の構造を変換させる。この50Sサブユニットの構造変換によってL16およびL27タンパク質の取り込みが可能となり、L16とL27タンパク質が取り込まれる。さらに、50Sサブユニットの成熟化が完了すると、YlqFのGTP加水分解能が上昇し、YlqFはGTP型からGDP型へと変換される。その後GDP型となったYlqFが50Sサブユニットから解離することで、50Sと30Sサブユニットの会合が可能になり、タンパク質の合成が開始される。

```

E.coli      MFTINAEVRKEQGKGASRRRLRAANKFPAAIYGGKEAPLAIELDHDKVMNMQAKAEFYSEV
B.subtilis  MATLTAKERTDFTRSSLRNIRTSGHVPGLIYGKDTGNKPVSLDSVELIKT-LRDEGKNAV
            * *:.*: *: :.: *:.*:..*.*** . . .:.* :::: : * . *

E.coli      LTIVVDGKEIKVKAQDVQRHPYKPKLQHIDFVRA-----
B.subtilis  ITLEVSGEKHSVMVTDLQTDPLKNEITHADFQVVMMSIEDIEVEVPIHLTGEAIGVKNNGV
            **: *.*: :.* . *: * . * : : * ** .

E.coli      -----
B.subtilis  LQQPLYALTVKAKPKAIPQTIEADISSLDVNEVLTIAADLPAGGDYSFNHESDEVVASILP

E.coli      -----
B.subtilis  PQQQEAAEVDEEESADAQPEGENEQ

```

図.32 枯草菌L25タンパク質と大腸菌L25タンパク質のアライメント
 BSORF(<http://bacillus.genome.jp/>) から得た 枯草菌 L25 タンパク質のアミノ酸配列と
 Pec(<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/index.jsp>)から得た大腸菌L25タンパク質のアミノ酸
 配列をClustalW(<http://align.genome.jp/>)を用いてアライメントした。

III-3-3. 枯草菌の L25 タンパク質

枯草菌の L25 タンパク質(Ctc)と大腸菌の L25 タンパク質のペアワイズアライメントを図.32 に示した。この図からわかる様に、枯草菌の L25 タンパク質は、N 末端ドメインと C 末端ドメインの 2 つのドメインから形成されるが、大腸菌の L25 タンパク質は、枯草菌の N 末端ドメインに相当する領域しか持っていない。大腸菌の L25 タンパク質は、細胞の増殖に必須であり、L25 タンパク質をコードする *rplY* は恒常的に強く発現している (Karlin *et al*, 2001)。一方で、枯草菌の L25 タンパク質は、細胞の増殖に必須ではなく、さらに対数増殖期では非常に弱い発現しかしていないが、ストレス条件下では σ^B によって強く発現が誘導されることが知られている(Benson & Haldenwang, 1993)。実際に、枯草菌の L25 タンパク質は対数増殖期のリボソーム内には存在していないが、ストレス条件下ではリボソームに取り込まれることが報告されている(Schmalisch *et al*, 2001)。それではなぜ、枯草菌の細胞増殖に必須である YlqF が、対数増殖期に存在しない L25 タンパク質と相互作用するのだろうか？ YlqF は対数増殖期とは異なるストレス条件下特有の機能を持っているのかもしれない。例えば、ストレス条件下において発現された L25 タンパク質を 50S サブユニットに組み込む役割などが考えられる。しかしながら、現段階では、そのメカニズムは不明であり、YlqF と L25 タンパク質の関係を解析していく必要がある。

また、YlqF は主にグラム陽性細菌と真核生物に保存されており、グラム陰性菌である大腸菌には保存されていない。この理由を考える上で、大腸菌の L25 タンパク質の機能が重要になってくるかもしれない。

本研究のまとめ

枯草菌には、10 種類の Era/Obg スーパーファミリーに所属するタンパク質が存在し、その内 7 種類ものタンパク質が細胞の増殖に必須であることが明らかにされている。これほど多くのパラログタンパク質が細胞の増殖に必須であることは驚くべきことであり、これらのタンパク質の細胞内機能を明らかにすることは、細菌の増殖の制御システムを理解する上で必要不可欠である。また、Era/Obg スーパーファミリーに所属する GTP 結合タンパク質は、細菌から高等真核生物にまで保存されていることから、細菌にとどまらず生物に普遍的な機能を担っていると考えられる。しかしながら、これらのタンパク質の細胞内機能はほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、Era/Obg スーパーファミリーに所属し、枯草菌の細胞増殖に必須である 6 種類の GTP 結合タンパク質の解析を行い、これらのタンパク質の細胞内機能の解明を試みた。

まず、6 種類の GTP 結合タンパク質(Era, Obg, YphC, YsxC, YlqF, YqeH)の枯渇条件下におけるリボソームプロファイルを観察した結果、全ての GTP 結合タンパク質の枯渇条件下で、70S リボソームの減少と 50S、30S サブユニットの増加が観察され、Era/Obg スーパーファミリーに所属する GTP 結合タンパク質が、リボソームの生合成に関与している可能性が見いだされた。次に、これらの GTP 結合タンパク質とリボソームの結合を調べた結果、すでに報告されている Obg と 50S サブユニットの結合以外に、YlqF と 50S サブユニット、YsxC と 70S リボソームの結合を新たに見いだした。また、YlqF は、GTP の非加水分解類似物 (GTP γ S) の存在下でのみ 50S サブユニットと結合でき、成熟した 50S サブユニットによって内在性の GTP 加水分解能が上昇することも見いだした。また、DMS フットプリント法と酵母 2 ハイブリッド法では、YlqF が 50S サブユニットの会合面である A サイトと P サイトの周辺に結合することを明らかにした。さらに、枯草菌細胞内における YlqF の枯渇条件下では、70S サブユニットが減少し、未成熟な 50S サブユニットが蓄積され、その未成熟な 50S サブユニットはリボソームタンパク質 L16 と L27 を失っていることも見いだした。リボソームタンパク質 L16 と L27 は共に late assembly protein に属しており、DMS フットプリント法で同定した YlqF の結合領域に隣接した領域に結合する。以上の結果より、本研究では、50S サブユニットの後期生合成ステップにおいて、YlqF がリボソ-

ムタンパク質 L16 と L27 の取り込みを助け、さらに 50S サブユニットが正確に成熟化されたことをモニターしているというモデルを提案する。

今後の展望としては、YlqF 以外の Era/Obg スーパーファミリーの機能解析を行い、細胞内における Era/Obg スーパーファミリーの役割を解明することで、リボソームの生合成メカニズムを知る助けになるのではないかと期待している。

V. 参考文献

Arigoni F, Talabot F, Peitsch M, Edgerton MD, Meldrum E, Allet E, Fish R, Jamotte T, Curchod ML, Loferer H (1998) A genome-based approach for the identification of essential bacterial genes. *Nat Biotechnol* **16**: 851-856

Ahnn J, March PE, Takiff HE, Inouye M (1986) A GTP-binding protein of *Escherichia coli* has homology to yeast RAS proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8849-8853

Altman S, Kirsebom L, Talbot S (1995) Recent studies of RNase P. In Soll D & Rajabhandary UL (eds), *tRNA: Structure, Biosynthesis and Function*. American Society of Microbiology, Washington, 67-78

Andarson PE, Matsunaga J, Simons EL, Simons RW (1996) Structure and regulation of the *Salmonella typhimurium rnc-era-recO* operon. *Biochimie* **78**: 1025-1034

Arigoni F, Talabot F, Peitsch M, Edgerton MD, Meldrum E, Allet E, Fish R, Jamotte T, Curchod ML, Loferer H (1998) A genome-based approach for the identification of essential bacterial genes. *Nat Biotechnol* **16**: 851-856

BaBler J, Grandi P, Gadal O, LeBmann T, Petfalski E, Tollervey D, Lechner J, Hurt E (2001) Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol Cell* **8**: 517-529

Benson AK & Haldenwang WG (1993) The σ^B -Dependent promoter of the *Bacillus subtilis sibB* operon is induced by heat shock. *J Bacteriol* **175**: 1929-1935

Bjork GR (1987) Modification of stable RNA. In: *Escherichia coli and salmonella typhillum* (Neidhardt FC, ed) American Society for Microbiology, Washington, 719p

Bongiorni C, Ishikawa S, Stephenson S, Ogasawara N, Perego M (2005) Synergistic regulation of competence development in *Bacillus subtilis* by two Rap-Phr systems. *J*

Bacteriol **187**: 4353-4361.

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**: 117-127.

Britton RA & Lupski JR (1997) Isolation and characterization of suppressors of two *Escherichia coli* *dnaG* mutations, *dnaG2093* and *parB*. *Genetics* **145**: 867-875

Cabedo H, Macian F, Villarroya M, Escudero JC, Martinez-Vicente M, Knecht E, Armengod ME (1999) The *Escherichia coli* *trmE* (*mnme*) gene, involved in tRNA modification, codes for an evolutionarily conserved GTPase with unusual biochemical properties. *EMBO J* **18**: 7063-7076

Caldon CE, Yoong P, March PE (2001) Evolution of molecular switch: universal bacterial GTPases regulate ribosome function. *Mol Microbiol* **41**: 289-297

Campbell TL, Daigle DM, Brown ED (2005) Characterization of the *Bacillus subtilis* GTPase YloQ and its role in ribosome function. *Biochem J* **389**: 843-852

Charollais J, Dreyfus M, Iost I (2004) CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res* **32**: 2751-2759

Charollais J, Pflieger D, Vinh J, Dreyfus M, Iost I (2003) The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**: 1253-1265

Chen SM, Takiff HE, Barber AM, Dudois GC, Bradwell JC, Court DL (1990) Expression and characterization of RNase III and Era proteins. Products of the *rnc* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **265**: 2888-2895

Codon C, Brechemier-Baey D, Beltchev B, Grunberg-Manago M, Putzer H (2001) Identification of the gene encoding the 5S ribosomal RNA maturase in *Bacillus subtilis*:

Mature 5S rRNA is dispensable for ribosome function. *RNA* **7**: 242-253

Correll CC, Wool IG, Munishkin A (1999) The two faces of the *Escherichia coli* 23S rRNA sarcin/riccin domain: the structure at 1.11Å resolution. *J Mol Biol* **292**: 275-287

Czyz A & Wegrzyn G (2005) The Obg subfamily of bacterial GTP-binding proteins: essential protein of largely unknown function that are evolutionarily conserved from bacteria to human. *Acta Biochim Pol* **52**: 35-43

Daigle DM & Brown ED (2004) Studies of the interaction of *Escherichia coli* YjeQ with the ribosome in vitro. *J Bacteriol* **186**: 1381-1387

Dammel CS & Noller HF (1995) Suppression of a cold-sensitive mutation in 16S rRNA by overexpression of a novel ribosome-binding factor, RbfA. *Genes Dev* **9**: 626-637

Dassain M, Leroy A, Colosetti L, Carole S, Bouche JP (1999) A new essential gene of the 'minimal genome' affecting cell division. *Biochimie* **81**: 889-895

Datta K, Skidmore JM, Pu k, Maddock JR (2004) The *Caurobacter crescentus* GTPase CgtAc is required for progression through the cell cycle and for maintaining 50S ribosomal subunit levels. *Mol Microbiol* **54**: 1379-1392

Decoster E, Vassal A, Faye G (1993) MSS1, a nuclear-encoded mitochondrial GTPase involved in the expression of COX1 subunit of cytochrome c oxidase. *J Mol Biol* **232**: 79-88

Dohme K & Nierhaus KH (1976) Total reconstitution and assembly of 50 S subunits from *Escherichia coli* Ribosomes in vitro. *J Mol Biol* **107** : 585-599

Elseviers D, Petruccio LA, Gallagher P (1984) Novel *E.coli* mutants deficient in biosynthesis of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine. *Nucleic Acids Res* **12**: 3521-3534

Eymann C, Dreisbach A, Albrecht D, Bernhardt J, Becher D, Gentner S, Tam le T, Buttner K, Buurman G, Scharf C, Venz S, Volker U, Hecker M (2004) A comprehensive proteome map of growing *Bacillus subtilis* cells. *Proteomics* **4**: 2849-2876

Fatica A & Tollervey D (2002) Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 313-318

Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nature Genet* **16**: 277-282

Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F (2003) Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* **313**: 17-42

Gohra BK & Apirion D (1978) Structural analysis and in vitro processing to p5 rRNA of a 9S RNA module isolated from an rne mutant of *E.coli*. *Cell* **15**: 1055-1066

Gollop N & March PE (1991) A GTP-binding protein (Era) has an essential role in growth rate and cell cycle control in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**: 2265-2270

Haga AE & Alix JH (2004) Authentic precursors to ribosomal subunits accumulated in *Escherichia coli* in the absence of functional DnaK chaperone. *Mol Microbiol* **51**: 189-201

Hampl H, Schulze H, Nierhaus KH (1981) Ribosomal components from *Escherichia coli* 50 S subunits involved in the reconstitution of peptidyltransferase activity. *J Biol Chem* **256**: 2284-2288

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580

Hang JQ and Zhao G (2003) Characterization of the 16S rRNA- and membrane-binding domains of *Streptococcus pneumoniae* Era GTPase: structural and functional implications. *Eur J Biochem* **270**: 4164-4172

Harms J, Schlutzen F, Zaeivach R, Bashan A, Gat S, Agmon I, Bartels H, Franceschi F, Yonath A (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**: 679-688

Hassan AK, Moriya S, Ogura M, Tanaka T, Kawamura F, Ogasawara N (1997) Suppression of initiation defects of chromosome replication in *Bacillus subtilis* *dnaA* and *oriC*-deleted mutants by integration of a plasmid replicon into the chromosomes. *J Bacteriol* **179**: 2494-2502

Hayes F & Hayes D (1971) Biosynthesis of ribosomes in *E.coli*. Properties of ribosomal precursor particles and their RNA components. *Biochimie* **53**: 369-382

Held WA, Ballou B, Mizushima S, Nomura M (1974) Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *E.coli*: further studies. *J Biol Chem* **249**: 3103-3111

Herold M & Nierhaus KH (1987) Incorporation of six additional proteins to complete the assembly map of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *J Biol Chem* **262**: 8826-8833

Himeno H, Hanawa-Suetsugu K, Kimura T, Takagi K, Sugiyama W, Shirata S, Mikami T, Odagiri F, Osanai Y, Watanabe D, Goto S, Kalachnyuk L, Ushida C, Muto A (2004) A novel GTPase activated by the small subunit of ribosome. *Nucleic Acids Res* **32**: 5303-5309

Hwang J, Inouye M (2001) An essential GTPase, *der*, containing double GTP-binding domains from *Escherichia coli* and *Thermotoga maritima*. *J Biol Chem* **276**: 31415-31421

Inoue K, Alsina J, Chen J, Inouye M (2003) Suppression of defective ribosome assembly in a *rbfA* deletion mutant by overexpression of Era, an essential GTPase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**: 1005-1016

Ishikawa K, Azuma S, Ikawa S, Morishita Y, Gohda J, Akiyama T, Semba K, Inoue J (2003) Cloning and characterization of *Xenopus laevis* *drg2*, a member of the developmentally regulated GTP-binding protein subfamily. *Gene* **322**: 105-112

James P, Halladay J, Craig EA. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436

Johnstone BH, Handler AA, Chao DK, Nguyen V, Smith M, Ryu SY, Simons EL, Anderson PE, Simons RW (1999) The widely conserved Era G-protein contains an RNA-binding domain required for Era function in vivo. *Mol Microbiol* **33**: 1118-1131

Kazemie M (1975) The importance of *Escherichia coli* ribosomal protein L1, L11 and L16 for the association of ribosomal subunits and the formation of the 70-S initiation complex. *Eur J Biochem* **58**: 501-510

Kazemie M (1976) Binding of aminoacyl-tRNA to reconstituted subparticles of *Escherichia coli* large ribosomal subunits. *Eur J Biochem* **67**: 373-378.

King TC, Sirdeshmukh D, Schlessinger D (1984) RNase III cleavage is obligate for maturation but not for functional of *Escherichia coli* pre-23S rRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 185-188

Kobayashi G, Moriya S, Wada C (2001) Deficiency of essential GTP-binding protein ObgE in *Escherichia coli* inhibits chromosome partition. *Mol Microbiol* **41**: 1037-1051

Kobayashi K *et al.* (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 4678-4683

Kumar S, Tomooka Y, Noda M (1992) Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* **185**: 1155-1161

- Kunst F & Rapoport G (1994) Signal transduction network controlling degradative enzyme synthesis and competence in *Bacillus subtilis*. In *regulation of bacterial differentiation*, PJ Piggot, CP Moran Jr, P Youngmann eds. 1-20
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I et al. (1997) The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256
- Landy A (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* **58**: 913-949
- Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol* **317**: 41-72
- Lerner CG & Inouye M (1991) Pleiotropic changes resulting from depletion of Era, an essential GTP-binding protein in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 951-957
- Li Z, Pandit S, Deutscher MP (1999) Maturation of 23S ribosomal RNA requires the exoribonuclease RNase T. *RNA* **5**: 139-146
- Li Z, Pandit S, Deutscher MP (1999) RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J* **18**: 2878-2885
- Lin B, Thayer DA, Maddock JR (2003) The *Caulobacter crescentus* CgtAC protein cosediments with the free 50S ribosomal subunit. *J Bacteriol* **186**: 481-489
- Lotti M, Stoffler-Meilicke M, Stoffler G (1987) Localization of ribosomal protein L27 at the peptidyl transferase centre of the 50 S subunit, as determined by immuno-electron microscopy. *Mol Gen Genet* **210**: 498-503
- Lu M & Steitz TA (2000) Structure of *Escherichia coli* ribosomal protein L25 complexed with a 5S rRNA fragment at 1.8-A resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 2023-2028

- Maddock J, Bhatt A, Koch M, Skidmore J (1997) Identification of an essential *Caulobacter crescentus* gene encoding a member of the Obg family of GTP-binding proteins. *J Bacteriol* **179**: 6426-6431
- Maki JA & Culver GM (2005) Recent developments in factor-facilitated ribosome assembly. *Methods* **36**: 313-320
- Maki JA, Schnobrich DJ, Culver GM (2002) The DnaK chaperone system facilitates 30S ribosomal subunit assembly. *Mol Cell* **10**: 129-138
- Mangiarotti G, Apiron D, Schlessinger D, Silengo L (1968) Biosynthetic precursors of 30S and 50S ribosomal particles in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **7**: 456-472
- March PE, Lerner CG, Ahnn J, Cui X, Inouye M (1988) The *Escherichia coli* Ras-like protein (Era) has GTPase activity and is essential for cell growth. *Oncogene* **2**: 539-544
- Mehr IJ, Long CD, Serkin CD, Seifer HS (2000) A homologue of the recombination-dependent growth gene, *rdgC*, is involved in *gonococcal pilin* antigenic variation. *Genetics* **154**: 523-532
- Meier TI, Peery RB, Jaskunas SR, Zhao G (1999) 16S rRNA is bound to *era* of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **181**: 5242-5249
- Micheline FR, Bruno S, Cosmin S, Franco F (2003) Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* **313**: 17-42
- Mittenhuber G (2001) Comparative genomics of prokaryotic GTP-binding proteins (the Era, Obg, EngA, ThdF (TrmE), YchF and YihA families) and their relationship to eukaryotic GTP-binding proteins (the DRG, ARF, RAB, RAN, RAS and RHO families). *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 21-25
- Moore VG, Atchison RE, Thomas G (1975) Identification of a ribosomal protein essential for peptidyl transferase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 844-848

- Morimoto M, Loh PC, Hirai T, Asai K, Kobayashi K, Moriya S, Ogasawara N (2002) Six GTP-binding protein of the Era/Obg family are essential for cell growth in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **148**: 3539-3552
- Nanamiya H, Akanuma G, Natori Y, Murayama R, Kosono S, Kudo T, Kobayashi K, Ogasawara N, Park SM, Ochi K, Kawamura F (2004) Zinc is a key factor in controlling alternation of two types of L31 protein in the *Bacillus subtilis* ribosome. *Mol Microbiol* **52**: 273-283
- Nierhaus KH & Dohme F (1974) Total reconstitution of functionally active 50S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 4713-4717
- Nierhaus KH (1991) The assembly of procaryotic ribosomes. *Biochimie* **73**: 739-755
- Nierhaus KH, Bordasch K, Homann HE (1973) In vivo assembly of *Escherichia coli* ribosomes. *J Mol Biol* **74**: 587-597
- Nishimura M, Yoshida T, Shirouzu M, Terada T, Kuramitsu S, Yokoyama S, Ohkubo T, Kobayashi Y (2004) Solution structure of ribosomal protein L16 from *Thermus thermophilus* HB8. *J Mol Biol* **344**: 1369-1383
- Okamoto S & Ochi K (1998) An essential GTP-binding protein functions as a regulator for differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **30**: 107-119
- Okamoto S, Itoh M, Ochi K (1997) Molecular cloning and characterization of the *obg* gene of *Streptomyces griseus* in relation to the onset of morphological differentiation. *J Bacteriol* **179**: 170-179
- Park JH, Jensen BC, Kifer CT, Parsons M (2000) A novel nuclear G-protein conserved in eukaryotes *J Cell Science* **114**: 173-185
- Peattie DA (1979) Direct chemical method for sequencing RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1760-1764

Rodnina MV, Stark H, Savelsbergh A, Wieden HJ, Mohr D, Matassova NB, Peske F, Daviter T, Gualerzi CO, Wintermeyer W.(2000) GTPases mechanisms and functions of translation factors on the ribosome. *J Biol Chem* **381**:377-87"

Rohl R & Nierhaus KH (1982) Assembly map of the large subunit (50S) of *Escherichia coli* ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 729-733

Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning* : Alaboratory Manual. 2nd edn. Cold spring Harbor, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. 1, 1.21-1.39

Sato A, Kobayashi G, Hayashi H, Yoshida H, Wada A, Maeda M, Hiraga S, Takeyasu K, Wada C (2005) The GTP binding protein Obg homolog ObgE is involved in ribosome maturation. *Genes cells* **10**: 393-408

Sato T, Wu J, Kuramitsu H (1998) The *sgp* gene modulates stress responses of *Streptococcus matans*: utilization of an antisense RNA strategy to investigate essential gene functions. *FEMS Microbiol Lett* **159**: 241-245

Savaenu C, Bienvenu D, Namane A, Gleizes PE, Gas N, Jacquier A, Front-Racine M (2001) Nog2P, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *EMBO J* **20**: 6475-6484

Sayed A, Matsuyam S, Inouye, M. (1999) Era, an essential *Escherichia coli* small G-protein, binds to the 30S ribosomal subunit. *Biochem Biophy Res Commun* **264**: 51-54.

Schmalisch M, Langbein I, Stulke J (2002) The general stress protein Ctc of *Bacillus subtilis* is a ribosomal protein. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 495-501

Scott JM & Haldenwang WG (1999) Obg, an essential GTP binding proteins of *Bacillus subtilis*, is necessary for stress activation of transcription factor σ^B . *J Bacteriol* **181**: 4653-4660

Scott JM, Ju J, Mitchell T, Haldenwang WG (2000) The *Bacillus subtilis* GTP binding protein *obg* and regulators of the sigma(B) stress response transcription factor cofractionate with ribosomes. *J Bacteriol* **182**: 2771-2777

Scrima A, Vetter IR, Armengod ME, Wittinghofer A (2005) The structure of the TrmE GTP-binding protein and its implications for tRNA modification. *EMBO J* **24**: 23-33

Sengupta J, Agrawal RK, Frank J (2001) Visualization of protein S1 within the 30S ribosomal subunit and its interaction with messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 11991-11996

Sharma MR, Barat C, Wilson DN, Booth TM, Kawazoe M, Hori-Takemoto C, Shirouzu M, Yokoyama S, Fucini P, Agrawal RK (2005) Interaction of Era with the 30S ribosomal subunit implications for 30S subunit assembly. *Mol Cell* **18**: 319-29

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**: 850-858

Sikora-Borgula A, Slominska M, Tronkowski P, Zielka R, Mysliwski A, Wegrzyn G, Czyz A (2002) A role for the common GTP-binding protein in coupling of chromosome replication to cell growth and cell division. *Biochem Biophys Res Commun* **292**: 333-338

Slominska M, Konopa G, Wegrzyn G, Czyz A (2002) Impaired chromosome partitioning and synchronization of DNA replication initiation in an insertional mutant in the *Vibrio harveyi* *cgtA* gene coding for a common GTP-binding protein. *Biochem J* **362**: 579-584

Sorensen MA, Fricke J, Pedersen S (1998) Ribosomal protein S1 is required for translation of most, if not all, natural mRNAs in *Escherichia coli* in vivo. *J Mol Biol* **280**: 561-569

Srivastava AK & Schlessinger D (1990) Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. *Annu Rev Microbiol* **44**: 105-129

Takahashi N, Yanagida M, Fujiyama S, Hayano T, Isobe T (2003) Proteomic snapshot analyses of preribosomal ribonucleoprotein complexes formed at various stages of ribosome biogenesis in yeast and mammalian cells. *Mass Spectrometry Review* **22**: 287-317

Takiff HE, Chen SM, Court DL (1989) Genetic analysis of the *rnc* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**: 2581-2590

Tan J, Jakob U, Bardwell JCA (2002) Overexpression of two different GTPases rescues a null mutation in a heat-induced rRNA methyltransferase. *J Bacteriol* **184**: 2692-2698

Tate WP, Schulze H, Nierhaus KH (1983) The importance of the *Escherichia coli* ribosomal protein L16 for the reconstitution of the peptidyl-tRNA hydrolysis activity of peptide chain termination. *J Biol Chem* **258**: 12810-12815

Tepljakov A, Obmolova G, Chu SY, Toedt J, Eisenstein E, Howard AJ, Gilliland GL (2003) Crystal structure of the YchF protein reveals binding sites for GTP and nucleic acid. *J Bacteriol* **185**: 4031-4037

Teraoka H & Nierhaus KH (1978) Protein L16 induces a conformational change when incorporated into an L16-deficient core derived from *Escherichia coli* ribosomes. *FEBS Letters* **88**: 223-226

Tissieres A, Watson JD, Schlessinger D, Hollingworth BR (1959) Ribonucleoprotein particles from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **1**: 221-233

Trach K & Hoch JA (1989) The *Bacillus subtilis* *spo0B* stage 0 sporulation operon encodes an essential GTP-binding protein. *J Bacteriol* **172**: 1362-1371

Traub P & Nomura M (1968) Structure and function of *E.coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **59**: 777-784

Uchiyama T, Sato N, Wada A, Hachimori A (1999) Interaction of the sarcin/ricin domain of 23S ribosomal RNA with proteins L3 and L6. *J Biol Chem* **274**: 681-686

Vidwans SJ, Ireton K, Grossman AD (1995) Possible role for the essential GTP-binding protein Obg in regulating the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**: 3308-3311

Walleczek J, Martin T, Redl B, Stoffler-Meilicke M, Stoffler G (1989) Comparative cross-linking study on the 50S ribosomal subunit from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **28**: 4099-4105

Walleczek J, Redl B, Stoffler-Meilicke M, Stoffler G (1989) Protein-protein cross-linking of the 50 S ribosomal subunit of *Escherichia coli* using 2-iminothiolane. Identification of cross-links by immunoblotting techniques. *J Biol Chem* **264**: 4231-4237

Welsh KM, Trach KA, Folger C, Hoch JA (1994) Biochemical characterization of the essential GTP-binding protein Obg of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**: 7161-7168

Wilson DN, Schlueder F, Harms JM, Yoshida T, Ohkubo T, Albrecht R, Buerger J, Kobayashi Y, Fucini P (2005) X-ray crystallography study on ribosome recycling: the mechanism of binding and action of RRF on the 50S ribosomal subunit. *EMBO J* **24**: 251-260

Wimberly BT, Guymon R, McCutcheon JP, White SW, Ramakrishnan V (1999) A detailed view of a ribosomal active site : the structure of the L11-RNA complex. *Cell* **97**: 491-502

Wolf YI, Aravind L, Grishin NV, Koonin EV (1999) Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases analysis of unique domain architectures and phylogenetic tree reveals a complex history of horizontal gene transfer events. *Genome Res* **9**: 689-710

Wout P, Pu K, Sullivan M, Reese V, Zhou S, Lin B, Maddock JR (2004) The *Escherichia coli* GTPase CgtAE cofractionates with the 50S ribosomal subunit and interacts with SpoT, a ppGpp synthetase/hydrolase. *J Bacteriol* **186**: 5249-5257

Wower I, Wower J, Zimmermann RA (1998) Ribosomal protein L27 participates in both 50S subunit assembly and the peptidyl transferase reaction. *J Biol Chem* **273**: 19847-19852

Yusupova GZ, Yusupov MM, Cate JH, Noller HF (2001) The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell* **106**: 233-241

Zalacain M, Biswas S, Ingraham KA, Ambrad J, Bryant A, Chalker AF, Iordanescu S, Fan J, Fan F, Lunsford RD, O'Dwyer K, Palmer LM, So C, Sylvester D, Volker C, Warren P, McDevitt D, Brown JR, Holmes DJ, Burnham MK (2003) A global approach to identify novel broad-spectrum antibacterial targets among proteins of unknown function. *J Mol Microbiol Biotechnol* **6**: 109-126

Zavialov AV & Ehrenberg M (2003) Peptidyl-tRNA regulates the GTPase activity of translation factors. *Cell* **114**: 113-122

海堂剛央 (2003) 酵母 2 ハイブリッド法による枯草菌必須タンパク質間の相互作用解析 奈良先端大 修士論文

IV. 謝辞

本研究を行うにあたって、小笠原直毅教授には非常に丁寧なご指導およびとても有意義な討論を賜り、さらに研究以外の面においてもいつもあたたかく見守っていただいたことを心より感謝致します。

大島拓助手には、日々の討論や有意義な助言をいただき、心より感謝致します。立教大学の河村富士男教授、七宮英晃助手、ならびに名古屋大学稲田利文助教授には、大変有意義な助言をいただいたことを心から感謝いたします。

また、様々な形で研究活動と研究生活の両面に渡り様々な面でご支援していただいた、システム細胞学のスタッフならびに学生の皆様に心から感謝致します。

最後に、ここまで支援してくれた両親に心から感謝致します。

平成 18 年 2 月 2 日 松尾芳隆

VI. 業績リスト

学術論文

Yoshitaka Matsuo, Takuya Morimoto, Masayoshi Kuwano, Pek chin Loh, Taku Oshima and Naotake Ogasawara. The GTP-binding protein, YlqF, participates in the late step of 50S ribosomal subunit assembly in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* published January 23, 2006 as doi:10.1074/jbc.M512556200

国際会議

1. Yoshitaka Matsuo, Takuya Morimoto, Masayoshi Kuwano, Pek chin Loh and Naotake Ogasawara. Screening of interacting proteins with essential GTP-binding proteins of Era/Obg family in *Bacillus subtilis*. *The 5th SLB-KRIBB-NAIST Joint Symposium. Signal Transduction Networks*. Korea. November, 2003
2. Yoshitaka Matsuo, Takuya Morimoto, Masayoshi Kuwano, Pek chin Loh and Naotake Ogasawara. Functional analysis of the essential GTP-binding proteins in *Bacillus subtilis*. *Naist 21st Century COE Program International Symposium*. Nara. January 2005.
3. Yoshitaka Matsuo, Takuya Morimoto, Loh Pek Chin and Naotake Ogasawara. Studies of the interaction of GTP-binding protein (Era/Obg family) with the ribosome in *Bacillus subtilis*. *Joint meeting of the 3 divisions of the international union of microbiological societies 2005*. San Francisco. July, 2005
4. Yoshitaka Matsuo, Takuya Morimoto, Taku Oshima and Naotake Ogasawara. The GTP-binding protein, YlqF, participates in the late step of 50S ribosomal subunit assembly in *Bacillus subtilis*. *4th Naist Bio-COE International Symposium. International Student Symposium on Molecular Cell Biology*. Nara. December 2005.

その他の業績

1. 松尾芳隆、森本拓也、桑野晶喜、Loh Pek Chin, 小笠原直毅 枯草菌の GTP 結合タンパク質 (Era/Obg ファミリー) と相互作用するタンパク質の探索 第 26 回日本分子生物学会年会、神戸 2003 年 12 月
2. 松尾芳隆、森本拓也、桑野晶喜、Loh Pek Chin、小笠原直毅 枯草菌の GTP 結合タンパク質(Era/Obg ファミリー)の機能解析 第 27 回日本分子生物学会年会、神戸 2004 年 12 月
3. 松尾芳隆、森本拓也、桑野晶喜、Loh Pek Chin、大島拓、小笠原直毅 リボソームの 50S サブユニットの生合成における枯草菌 GTP 結合タンパク質 YlqF の役割 第 28 回日本分子生物学会年会、福岡 2005 年 12 月