

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 出芽酵母におけるリボソーム生合成調節機構に関する研究

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学専攻

学生番号: D101254

氏 名: 万 堃

【背景と目的】

リボソームは生体内で蛋白質を合成する翻訳装置であり、知られている地球上の全ての生物において、遺伝情報の発現に不可欠な役割を果たしている。したがって、リボソーム生合成の調節機構を解明することは生命科学における重要な課題である。出芽酵母をモデル生物として、約 200 種類の調節タンパク質が、rRNA 前駆体のプロセッシングや、60S と 40S サブユニットへの組立てに関与することが見出されている。しかし、これら調節タンパク質がどのように関わってリボソームタンパク質をリクルートし、2 つのリボソームサブユニットを組立てるのかについては、不明な点が多く残されている。当研究室では、リボソーム生合成調節蛋白質 Ebp2 がおもに核小体に局在してリボソームの生合成調節に機能を持つことを明らかにしてきた。Ebp2 のさらに詳細な機能を知るために、*EBP2* と関連している遺伝子を探索する目的で、温度感受性 *ebp2-14* 変異と合成的な生育障害を示す変異株が取得された。これらは 3 つの相補性グループ (A 群、B 群と C 群) に分類された。当研究室の下地らは、完全な合成致死性を示す A 群の変異遺伝子が *BRX1* であることを示し、Ebp2 と Brx1 が協調的に 60S リボソームサブユニットの生合成に機能していることを明らかにした。本研究では、条件的な合成致死性を示す B 群と C 群の変異遺伝子を同定し、*ebp2-14* 変異と合成的な生育障害を示す原因を調べた。また、その過程で、Ebp2 と機能的に関連するリボソームタンパク質を見出し、それをコードする重複遺伝子の生育への影響の違いについて解析した。

【結果】

ebp2-14 変異と合成的な生育障害を示す B 群 (*m1* 株) と C 群 (*m4* と *m8* 株) における変異遺伝子を同定した。それらは、N 末端アセチルトランスフェラーゼ NatA の触媒サブユニット Ard1 をコードする *ARD1* と、調節サブユニット Nat1 をコードする *NAT1* であった。これら変異株における生育障害は、NatA 複合体としての機能を失うためであることを示した。真核細胞において多くのタンパク質の N 末端のメチオニン残基が翻訳の途中で切断され、さらに新

たな N 末端アミノ酸残基が N 末端アセチルトランスフェラーゼ (Nat) によってアセチル化される。NatA は、酵母において同定されている 5 種類の Nat のうち、最も主要な N 末端アセチルトランスフェラーゼである。

ポリソームパターンの解析結果から、これら変異株における生育障害は 60S リボソームサブユニット合成の欠陥により生じていることが示唆された。さらに、*ard1* 変異との合成的な生育障害は、リボソーム生合成に欠陥のある変異に共通して見られる表現型ではなく、*ebp2* 変異に特異的であることを示した。

次に、*ebp2* 変異と、*ard1* 変異、*nat1* 変異が合成的な生育障害を示す原因について、NatA が機能しないことによって、ある特定のタンパク質がアセチル化されなくなり、*ebp2-14* 変異と重なったためであると推定した。そこで NatA の標的タンパク質として、Ebp2 自身、Ebp2 と深く関連して機能する Brx1 及び *ebp2-14* 変異株の温度感受性を過剰発現で抑圧する遺伝子の産物 Rp136a/b (リボソームタンパク質 L36) に絞って検討した。N 末端アセチルトランスフェラーゼはプロリンをアセチル化できないので、これらのタンパク質の N 末端から 2 番目 (メチオニンの隣) のアミノ酸残基をプロリンに置換した。*ebp2-A2P*、*rp136a-T2P* 及び *rp136b-A2P* はいずれも *ebp2-14* との合成的な生育障害を示さなかったのに対して、*brx1-S2P* は *ebp2-14* との合成致死性を示した。一方、Brx1 の N 末端から 2 番目のアミノ酸残基を、NatA によってアセチル化されるアラニンに置換しても、*ebp2-14* 変異との合成的な生育障害を示さなかった。これらの結果は、Brx1 の N 末端から 2 番目のアミノ酸残基がセリンであることが重要なのではなく、2 番目のアミノ酸残基がアセチル化されることが重要であることを示唆する。

【考察】

本研究では、タンパク質の N 末端アセチル化が、リボソーム生合成に重要であることを初めて見出した。N 末端アセチルトランスフェラーゼ NatA は、Brx1 をアセチル化することによって、リボソーム生合成に協調的に機能する Ebp2 と Brx1 の連携に影響を及ぼすと推定する。そして、過剰発現で *ebp2-14* の温度感受性を抑圧する重複遺伝子によりコードされているリボソームタンパク質 Rp136a と Rp136b が、それぞれリボソーム生合成における貢献度が異なることがわかり、その原因についても検討した。Ebp2 との親和性の違いが、リボソーム生合成における Rp136a と Rp136b の貢献度の違いを引き起こしていると推定する。これらの知見は、リボソーム生合成調節機構の理解に役立つと考える。

60S リボソームサブユニットに含まれる 25S rRNA の前駆体、27S pre-rRNA のプロセッシングに関与する調節因子 Ebp2、Brx1 は、リボソームタンパク質 Rp18 と Rp115 とともに、調節因子 Pwp1 の TAP 精製により同定されている。また、本研究で過剰発現の *RPL36* は、*ebp2-14* の温度感受性を抑圧することが分かった。60S リボソームサブユニットの立体構造を見ると、Rp18、Rp115 と Rp136 は互いに近接し、5. 8S rRNA の 3' 領域に存在する。そこで、Ebp2、Brx1、Pwp1 が協調して、Rp18、Rp115 及び Rp136 と機能的に関連しながら、27S pre-rRNA のプロセッシングに機能すると推定した。

Ebp2 と Brx1 などのリボソーム生合成調節タンパク質および NatA は、酵母からヒトにまで保存されているので、高等真核生物においても N 末端アセチル化がリボソーム生合成に関わ

る可能性がある。最近、*ARD1* の欠損によって引き起こされる X 染色体連鎖遺伝性疾患が報告されている。また Ard1 と癌化との関連を示唆する報告がある。しかしいずれの場合も、NatA の標的タンパク質は不明である。酵母における Ard1 の研究はこれら病気の原因を解明するのに役立つことが期待される。