



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on eukaryotic ribosome biogenesis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	朝野, 希美
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11832号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59020
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Nozomi_Asano_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 朝野 希美

学 位 論 文 題 名

Study on eukaryotic ribosome biogenesis

(真核生物リボソーム生合成についての研究)

真核生物のリボソームは大小 2 つのサブユニット (60S、40S) からなり、約 80 個のリボソームタンパク質と 4 個のリボソーム RNA (25S、18S、5.8S、5S rRNA) から構成されている。真核生物リボソームの生合成は核内で始まり、リボソーム前駆体 (90S) が形成される。その後、2 つのサブユニット前駆体 (pre-60S、pre-40S) へと分かれ、核外へと輸送される。そして、細胞質での最終成熟を経てリボソームサブユニットが完成する。本研究では 60S の成熟に関係する 2 種類のプロセスに着目した。

Chapter I

Rpf2 と Rrs1 は 3 つのリボソーム構成因子 (5S rRNA、RpL5、RpL11) を 90S へと取り込む働きをもち、これら 5 つの因子は五者複合体 Rpf2-subcomplex 形成することが知られている。Rpf2 と Rrs1 は複合体として機能すると予測されているが、その構造情報がないため機能の詳細は明らかになっていない。また、Rpf2 は RNA 結合タンパク質として知られているが、5S rRNA との結合の有無は不明である。そこで本研究では Rpf2-Rrs1 二者複合体の構造解析および Rpf2-Rrs1 二者複合体と 5S rRNA との結合実験を行うことで、Rpf2-Rrs1 二者複合体の機能や Rpf2-subcomplex を介した 3 つのリボソーム構成因子の 90S への取り込み機構を解明することを目的とした。

実験では、まず、Rpf2-Rrs1 二者複合体を大腸菌にて共発現し、各種精製によって高純度に調製し、結晶を得た。この結晶を用いて SDS-PAGE、質量分析及び N 末端アミノ酸配列解析を行うことで、結晶中には Rpf2、Rrs1 の N 末端領域からなる複合体が含まれていることが明らかになった。更に、精製した Rpf2-Rrs1 二者複合体を用いてプロテアーゼによる限定分解を行ったところ、結晶中と同じ分子量をもつ分子が得られたことから、Rpf2、Rrs1 の N 末領域が安定なコア領域複合体を形成しているといえる。同定した配列をもとに Rpf2-Rrs1 N 末端領域複合体を作成し、Se-SAD 法を用いて Rpf2 と Rrs1 N 末端領域からなる二者複合体 (N 末ドメイン複合体) の構造を決定した。この構造では Rpf2 は中央に位置する half- β バレルを 4 本の α ヘリックスが囲っており、N 末側と C 末側で相同なトポロジーをもっていた。その C 末側には Rrs1 の β シートが連なり、更に長い α ヘリックスが配置することで、複合体は擬似の対称性をもつような構造をとっていた。このコア構造に加え、Rrs1 の C 末側にはループがあり、Rpf2 に沿うように位置していた。Rpf2 と Rrs1 は 3 つの領域 (Rrs1 C 末端ループ領域、Rrs1 α ヘリックス領域、二者間 β シート) で相互作用しており、タイトな複合体を形成していた。

次に、5S rRNA と Rpf2-Rrs1 複合体の相互作用を調べるために、ゲルシフトアッセイを行った。まず、Rpf2-Rrs1 全長複合体を用いた解析によって、5S rRNA-Rpf2-Rrs1 三者複合体の形成が確認された。また、構造決定に成功した N 末ドメイン複合体を用いて同様の実験

を行ったところ N 末ドメイン複合体と 5S rRNA の三者複合体の形成が確認された。次に、5S rRNA 結合領域の詳細を明らかにするために、N 末ドメイン複合体の構造を元に結合領域の予測を行った。真核生物での保存残基のマッピングと表面電荷分布から 5S rRNA 結合領域である可能性の高い 4 つの領域を推測した。そこで、この 4 つの領域に対し、それぞれのアラニン置換変異体を作製し、結合実験によって 5S rRNA 結合能を検討した。その結果、Rpf2 N 末ドメイン上の 3 つの領域が 5S rRNA との結合に重要であることが明らかになった。

本研究によって Rpf2-Rrs1 N 末ドメイン複合体はリジッドなボディーを形成し、複合体として機能すると考えられる。Rrs1 の中央に位置するリンカーは、Rrs1 全長の中で最も保存性が高い領域であり、保存されたプロリンが数多く存在している。この保存されたプロリンリッチリンカーは、Rpf2 に沿うように位置し、Rrs1 C 末ドメインをある一定の位置に配置する重要な働きをもつと考えられる。得られた構造を元に、Rpf2-subcomplex モデルの作製を行ったところ、5S rRNA の湾曲した内側に Rpf2-Rrs1 複合体が位置すると予測された。更に、Rpf2-subcomplex リボソーム結合モデルを作製したところ、Rpf2-Rrs1 複合体はリボソーム前駆体と 5S rRNA の間に位置すると考えられた。以上のモデルから Rpf2-Rrs1N 末ドメイン複合体は 90S と 5S rRNA、RpL5、RpL11 をつなぐアダプターとしての機能を持ち、90S 上で他の生合成関連因子の取り込みを行う、足場タンパク質複合体であると考えられる。

Chapter II

SBDS と EFL1 はリボソーム前駆体同士の早期会合を阻害する Tif6 を前駆体上から解離させる働きをもつ。SBDS が EFL1 の GTP 加水分解活性を高め、この EFL1 による GTP の加水分解によって Tif6 がリボソームから解離するということが明らかになっている。しかしながら、SBDS と EFL1 がどのような相互作用により機能するかは明らかになっていない。そこで本研究では、SBDS と EFL1 の相互作用解析を行うことにより、60S 成熟過程における二つのタンパク質の構造・機能相関を解明することを目的とした。

そこでまず、SBDS-EFL1 間の直接的な相互作用を調べるために、SBDS と EFL1 を用いてゲルろ過分析、ゲルシフトアッセイ、等温滴定型熱量測定 (ITC) による結合実験を行った。その結果、SBDS と EFL1 が化学量論比 1:1 で複合体を形成し、強く結合していることが確認された。次に、SBDS-EFL1 間の結合様式を調べるために、両者の結合領域の特定を行った。EFL1 は翻訳伸長因子 EF-2 のホモログであると同時に、EF-2 には存在しない 160 残基の挿入配列を有している。一方、SBDS は 3 つのドメイン (ドメイン I、II、III) から構成されている。いくつかの欠損変異体を用いた ITC による結合実験の結果、EFL1 の挿入配列と SBDS ドメイン II-III が二者間相互作用に重要であることが明らかになった。

上記の実験結果に加え、SBDS と EFL1 は Tif6 と直接的な相互作用をもたないことが今回示されたことから、これら 2 つは間接的に Tif6 をリボソームから解離させると考えられる。また、これまでに SBDS ドメイン II-III 上のアミノ酸を変異させると、EFL1 の GTPase 活性が低下することが示されていることから、SBDS ドメイン II-III と EFL1 の挿入配列との結合が、EFL1 の GTPase 活性を高めると考えられる。以上をまとめると、①SBDS ドメイン II-III と EFL1 の挿入配列が結合し複合体を形成することで、EFL1 の GTPase 活性が高まる、②GTP の加水分解によって EFL1 は自身の構造を変える、③この変化が、リボソームの構造変化を引き起こし、間接的に Tif6 がリボソームから解離すると考えられる。