



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 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

審査担当者	主 査	教 授	姚 関
	副 査	教 授	出村 誠
	副 査	教 授	小布施力史
	副 査	准 教 授	田中 良和
	副 査	助 教	加藤 公児
	副 査	特任教授	田中 勲（先端生命科学研究院）

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)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

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 rRNA（25S、18S、5.8S、5S）から構成されている。そ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。

Rpf2 と Rrs1 は 3 つのリボソーム構成因子（5S rRNA、RpL5、RpL11）を 90S へと取り込み、90S の成熟チェックポイントの働きをもち、これらは五者複合体 Rpf2-subcomplex を形成している。本研究では Rpf2-Rrs1 二者複合体の構造解析および結合実験を行うことで、Rpf2-Rrs1 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。

Rpf2-Rrs1 複合体を大腸菌にて共発現し、様々な方法を用いて、Rpf2 と Rrs1 N 末端領域からなる複合体（N 末ドメイン複合体）の結晶化に成功し、Se-SAD 法により構造を決定した。この構造では Rpf2 は half- β バレルを 4 本の α ヘリックスが囲っており、N 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 シートと長い 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。また、Rrs1 の C 末側の長いループが、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、Rrs1 α ヘリックス、二者間 β シート）で相互作用し、まるで一つの分子のようなタイトな複合体を形成していた。また、結合実験により、この N 末ドメイン複合体が Rpf2-Rrs1 全長と同程度の 5S rRNA 結合能を持つことが分かった。さらに、5S rRNA と結合する領域を推測し、変異体を用いて 5S rRNA 結合能を検討した結果、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。

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ているが、Rrs1 の C 末側ループ（全長の中央部分）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ループは、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。得られた構造および生化学実験を元に、Rpf2-subcomplex、更にリボソームとの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。以上の結果から 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もち、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。

SBDS と EFL1（翻訳伸長因子 EF-2 のホモログ）は、リボソーム前駆体同士の早期会合を阻害する Tif6 を前駆体上から乖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 GTP の加水分解によって Tif6 がリボソームから解離する。本研究では、SBDS と EFL1 の相互作用解析を行い、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。

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）の結合実験によって SBDS-EFL1 間の相互作用を解析した結果、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。さらに、EFL1 の 160 残基の挿入配列（EF-2 に対する）、SBDS のドメイン（I、II、III）欠損変異体を用いた結合実験を行い、EFL1 の挿入配列と SBDS ドメイン II-III が二者間の相互作用に重要であることが明らかになった。また、SBDS ドメイン II-III の残基を変異させると、EFL1 の GTPase 活性が低下することが示されていることから、EFL1 の挿入配列と SBDS ドメイン II-III 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、Tif6 がリボソームから乖離すると考えられる。

以上、本研究では 90S の成熟に関わる Rpf2-Rrs1 複合体の構造解析および 5S rRNA との結合実験により、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の機能をもち、90S 上で他の生合成関連因子の取り込みを行う足場であると提案することができた。また、60S 成熟過程における SBDS と EFL1 について、SBDS ドメイン II-III と EFL1 の挿入配列の相互作用は Tif6 の乖離に重要であることを明らかにした。

本研究が生命科学に及ぼす貢献には多大なものがあり、よって審査員一同は、申請者が北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格があるものと認めた。