



Title	The study on GTPase delivery mechanism of ribosomal P stalk during translation process [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	丹澤, 豪人
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第13269号
Issue Date	2018-06-29
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71167
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takehito_Tanzawa_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 丹 澤 豪 人

学 位 論 文 題 名

The study on GTPase delivery mechanism of ribosomal P stalk during translation process
(翻訳過程におけるリボソーム P ストークの GTPase 運搬機構の解明)

地球上すべての生物に存在するリボソームは、タンパク質を生合成、すなわち翻訳を司る超分子複合体の分子機械である。翻訳過程において、リボソーム第3の機能部位である「GTPase センター」は、翻訳の進行に必須である GTP 加水分解エネルギーを継続的に供給するための GTPase の結合・解離に重要な役割を果たしている。GTPase センターには、全生物で機能的に保存されている柔軟性の高い隆起状タンパク質複合体「リボソーム P ストーク」が存在し、様々な翻訳 GTPase をリボソームの GTPase 結合サイトであるサルシン・リシンループ (SRL)へ運搬する役割を担う。この十数年間に、X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡法により、リボソームやリボソーム-翻訳因子複合体の様々な構造が明らかにされてきたが、その領域を可視化することはできず、どのように GTPase を導入するかは謎に包まれている。

古細菌と真核生物では、リボソーム P ストークは、アンカータンパク質 P0 と P1 ホモダイマー (古細菌)、P1・P2 ヘテロダイマー (真核生物)で構成される。近年、私たちのグループが古細菌由来の P0-[P1]₂[P1]₂[P1]₂の結晶構造解析に成功したが、結晶化のために P0 の C 末端 58 残基と P1 の C 末端 50 残基を切断したため、P ストークの C 末端領域は可視化できていない。また私たちの先行研究から、P1 の C 末端 L103, L106, F107 の 3 残基が GTPase との相互作用に重要であることが示されている。さらに、P ストークの C 末端領域が選択的・特異的に認識する GTPase (翻訳開始因子 (IF5B), 伸長因子 (EF-2/EF-G および EF-1 α /EF-Tu), 終結因子 (RF3))では、P1 の結合領域が保存されていないことは特徴的で興味深い。

そこで本研究では、P ストークの GTPase 運搬機構を解明するために、好高熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来の翻訳伸長 EF-2 (*PhoEF-2*) を用いて、Apo 型 (*PhoEF-2*-Apo), GDP 結合型 (*PhoEF-2*-D2-GDP), GMPPCP 結合型 (*PhoEF-2*-GMPPCP), および *PhoEF-2*-GMPPCP と P1 の C 末端 11 残基との複合体 (*PhoEF-2*-GMPPCP-P1C11)の構造を決定した。構造から、P1C11 は 1 本の α ヘリックス構造を形成し、*PhoEF-2* の GTP 結合サイトの反対側に位置するドメイン G とサブドメイン G'の間の疎水性の溝で相互作用していた。この P1 結合領域は、*PhoEF-1 α* の P1 結合領域とは結合位置と配列の両方について完全に異なっていたが、溝の形は一致していた。この *PhoEF-2* の疎水性の P1 結合領域は、ドメイン G の P164, M167, M168, F171, V198, F205, およびサブドメイン G'の L214, V216, M219, K225, F226, N227 によって形成されていた。特に F226 は π スタッキングで P1 の F107 と結合している。私たちは、これら 12 残基につい

て、それぞれ点変異体を作製し、GMPPCP 結合型および GDP 結合型の両方について、Native-PAGE を用いた結合実験を行った。その結果、M167 と F205 (ドメイン G)、F226 (サブドメイン G') の 3 残基が P1 の C 末端領域との相互作用に重要であることが示された。一方で、先行研究および今回の構造解析から L103, L106, F107 の 3 残基が *PhoEF-2* との相互作用に関与していたが、G102 も相互作用に寄与することを今回初めて示した。また、構造から P1 結合領域は、GTP 結合サイトの反対側に位置していたが、構造を詳細に観察すると、いくつかの P1 結合残基が GTP 結合モチーフのうち G4 モチーフの V153 と疎水コアを形成し、G5 モチーフと F205 が同一ループ上に存在することが明らかになった。これらの構造的な関係性は *PhoEF-2* への P1 の相互作用が核酸 (GTP/GDP) の結合によって影響を受ける可能性を示唆している。

さらに、私たちは、Native-PAGE および表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いた定量的な手法により、GMPPCP 結合型、GDP 結合型、Apo 型について、それぞれ P1 との結合実験を行った。その結果、GDP 結合型と P1 の結合親和性は GMPPCP 結合型のそれに匹敵したが、GMPPCP 結合型と GDP 結合型は Apo 型より少し強い親和性を示した。さらに、GDP 結合型が P1 とどう相互作用するかを明らかにするために、私たちは、分子動力学シミュレーションを用いて *PhoEF-2*-GDP と P1C11 複合体 (*PhoEF-2*-GDP-P1C11) とのドッキングモデルを構築した。このモデルは、*PhoEF-2* が GTP 加水分解後におそらくリボソームから解離した状態を仮定している。これら 5 種類 (*PhoEF-2*-Apo, *PhoEF-2*-D2-GDP, *PhoEF-2*-GMPPCP, *PhoEF-2*-GMPPCP-P1C11, *PhoEF-2*-GDP-P1C11) の *PhoEF-2* の構造比較から、各型における P1C11 結合領域が異なるコンフォメーションを取っていることを発見した。これらすべての結果をまとめると、私たちは、翻訳過程に応じて、*PhoEF-2* の P1 結合領域が、“closed”、“open”、“release”の 3 状態を取ることを提案した。

一方、私たちは、GDP 結合型 *PhoEF-1α* と P1C11 複合体 (*PhoEF-1α*-GDP-P1C11) の結晶構造も決定した。先行研究で明らかにされた *PhoEF-1α*-GDP-P1CTD と構造を比較したところ、新たに *PhoEF-1α* のドメイン III に存在する I369 が P1 の L106 と F107 と相互作用することを発見し、Native-PAGE を用いた定性的な結合実験により I369 が P1 との結合に重要であることを初めて示した。最後に、P1 に対する *PhoEF-2* と *PhoEF-1α*-GDP の競合実験の結果、*PhoEF-2* の GMPPCP 結合型・GDP 結合型のいずれについても *PhoEF-1α*-GDP よりも P1 と強く結合していた。このような P1 と各 GTPase との結合の強さおよび結合場所が異なることは、それら因子の運搬頻度とリボソーム上での働きに関連すると考えられる。つまり、P ストックがパートナー機能依存的な認識機構を持っていると言える。