



HOKKAIDO UNIVERSITY

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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨
Doctoral Dissertation Evaluation Review

博士の専攻分野の名称 Degree requested	博士（生命科学） Doctor of Life Science	氏 名 Applicant name	丹澤 豪人 TANZAWA Takehito
--------------------------------	------------------------------------	-----------------------	---------------------------

審査担当者 Examiners	主査 / Chief examiner	教 授	姚 関
	副査 / Associate examiner	教 授	金城 政孝
	副査 / Associate examiner	准教授	尾瀬 農之
	副査 / Associate examiner	特任准教授	加藤 公児（岡山大）

学 位 論 文 題 名
Title of Doctoral Dissertation

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)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

リボソームの第 3 の機能部位である「GTPase センター」は、タンパク質の合成進行に必須である GTP 加水分解エネルギーを継続的に供給するための GTPases の結合・解離に重要な役割を果たしている。この 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 GTPases をリボソームへ運搬する。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、リボソームの様々な状態の構造が明らかにされてきたが、P ストークの領域を可視化することはできず、GTPases をどのように導入するかは謎に包まれている。古細菌と真核生物では、P ストークが、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。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。興味深いことに、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, 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ある。

丹澤豪人氏は、P ストークの GTPase 運搬機構の解明するために、好高熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来の伸長因子 EF-2 の 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。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 P1 結合領域は、ドメイン G の 6 個の疎水性残基、およびサブドメイン G' の 6 個の残基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。丹澤豪人氏は、これら 12 残基の変異体を作製し、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、今回の構造解析では P1 の L103, L106, F107 の 3 残基以外に G102 も *PhoEF-2* との相互作用に寄与することが初めて分かった。また、構造から P1 結合領域は、*PhoEF-2* の 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 結合の G4 と G5 モチーフと関連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* と 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。また、Native-PAGE および表面プラズモン共鳴法 (SPR) 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、Apo 型が弱い親和性を示した。また、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、丹澤豪人氏は共同研究者の協力をいただき、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、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。

さらに、丹澤豪人氏は GDP 結合型 *PhoEF-1 α* と P1C11 複合体 (*PhoEF-1 α* -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-1 α* -GDP-P1CTD と構造を比較したところ、新たに *PhoEF-1 α* 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-1 α* -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-1 α* -GDP よりも P1 と強く結合していたことが分かった。このような P1 と各 GTPases 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 ストー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。

以上、丹澤豪人氏が翻訳 GTPase である伸長因子 EF-2 をターゲットとした一連の研究によって、翻訳過程におけるリボソーム P ストークの GTPases 運搬機構を提唱することができた。また、本研究を通して、申請者は、リボソーム P ストークと翻訳 GTPases についての X 線構造生物学的な研究において専門知識、技術を有するだけでなく、科学的な思考力にも優秀であることが見受けられた。

本研究は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、丹澤豪人氏が北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格があるものと認めた。