



Title	Structure and functional implication of ribosome recycling factor
Author(s)	中野, 博明
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43361
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	なかのひろあき 中野博明
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 16954 号
学 位 授 与 年 月 日	平成14年3月25日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科分子薬科学
学 位 論 文 名	Structure and functional implication of ribosome recycling factor (リボソーム再生因子 (RRF) の立体構造と機能)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小林 祐次 (副査) 教 授 前田 正知 教 授 大森 秀信 教 授 今西 武

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質合成は開始、伸長、終止の3つの段階からなる。このうち終結段階においては、リボソームのA部位にある終止コドンを終結因子(RF)1 或いは RF2が認識してP部位の tRNA からポリペプチド鎖を加水分解により遊離する。その後、RF1や2は、RF3の働きによりリボソームのA部位から遊離する。その結果、リボソーム、脱アミノアシル tRNA、mRNA から構成されるポストターミネーション複合体が残される。リボソーム再生因子 (RRF) は伸長因子 (EF-G) と GTP 存在下においてポストターミネーション複合体を70S リボソーム、tRNA、mRNA へと分解する分子量約21kDa のタンパク質である。

RRF 非存在下では、リボソームは終止コドン下流の mRNA を誤って翻訳したり、或いは翻訳エラーの割合が増加することが *in vivo* 並びに *in vitro* の実験で報告されている。また RRF は原核生物のみに必須であることから RRF 阻害剤が新規な抗生物質として理想的であると考えられる。しかし RRF が機能するメカニズムに関する知見はほとんど得られていない。そこで、RRF によるリボソーム再生のメカニズムに関する構造生物学的な知見を得るため、また立体構造を基に RRF を阻害する新規薬物を設計することを目的として、2種類の RRF について立体構造決定を行った。また、それを基にリボソームとの結合モデルを作製し、RRF の機能メカニズムの解明を試みた。

まず、新規抗菌剤としての RRF 阻害剤の合理的設計という観点からは、病原菌由来の RRF の立体構造解析が必須である。そこで大腸菌と類縁関係にある腸炎ビブリオ RRF の立体構造決定を試みた。腸炎ビブリオ全ゲノム並びにその RRF の遺伝子配列は報告されていない。そこで大腸菌 RRF の13Met から179Glu をコードするオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、腸炎ビブリオ KXV237 (O3:K6) 株全ゲノム中より RRF 遺伝子のスクリーニングを行った。得られたポジティブクローンの DNA 配列決定の結果、腸炎ビブリオ RRF は他のほとんどの RRF と同様に185アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしており大腸菌 RRF とアミノ酸レベルで70%の相同性を有していた。腸炎ビブリオ RRF 遺伝子を大腸菌内で大量に発現させ、得られたタンパク質のポリソーム解離活性を測定した。その結果、腸炎ビブリオ RRF は大腸菌 RRF に比較して約80%の活性を有していた。結晶化条件のスクリーニングの結果、フシジン酸と GDP を加えることで約0.2×0.2×0.2mm の結晶が得られ、分解能2.2Åの回折強度データを収集した。位相決定は後述の R132G 変異体の結晶構造を用いた分子置換法により行い、 $R=20.3\%$ 、 $R_{\text{free}}=27.3\%$ の立体構造を決定した。

大腸菌 RRF については変異体の解析から Arg132が RRF の活性発現に必須であることが示されている。そこで

Arg132の役割を明らかにするために、Arg132を Gly に変えた R132G 変異体の立体構造決定を試みた。得られた結晶から分解能2.2Åの回折強度データを収集し、既に報告されている高度好熱菌*Thermotoga maritima*由来 RRF のドメイン I の立体構造を基にした分子置換法により $R=23.9\%$ 、 $R_{free}=29.7\%$ の立体構造を決定した。

これら2つの RRF はいずれも2つのドメインから構成されるL型構造をとっていた。ドメイン I (residues 1-26, 106-185) は約65Åの長い α -ヘリックス3本からなるバンドル構造をとっていた。このヘリックスバンドルは一般に見られるものとは少し異なり、各ヘリックスはねじれずに平行に並んでいた。一方、ドメイン II (residues 27-105) は3層からなる $\beta/\alpha/\beta$ サンドウィッチ構造をとっていた。この立体構造は既に報告されている好熱菌由来 RRF のものとほぼ同一であり、RRF はその由来に関わらず特徴的なL型構造をとることを明らかにすることができた。

R132G 変異体は、wild-type RRF と比較するとドメイン間の配向を除いてほぼ同一の立体構造をとっていた。しかし、R132G 変異体は *in vivo* 並びに *in vitro* の両方の実験で活性がないこと、また *in vitro* ではリボソームに結合しないことが報告されている。これらの結果は Arg132がリボソーム50S サブユニットとの結合に重要な役割を果たすことを示唆していた。今回得られた構造では R132G 変異体の立体構造は維持されており、静電ポテンシャルのみが変化していた。このことから、Arg132のもつ正電荷が50S サブユニットとの結合に重要な役割を果たすと結論づけた。また、Arg132は全ての RRF において保存されており、さらにその周辺にある Arg125、Arg129、Arg133等の正に荷電したアミノ酸残基も高く保存されている。ドメイン I の表面でこれらの残基はクラスタを形成しており、このクラスタは50S サブユニットとの相互作用表面として必須であると推測される。

Selmer らは RRF と tRNA の立体構造が類似していることから、RRF が tRNA の分子擬態として働くモデルを提案している。そのモデルは RRF のドメイン I を tRNA のアンチコドンステムに、ドメイン II を CCA end に対応させたもので、広く受け入れられている。しかし、このモデルにおいては Arg132が50S サブユニットとは相互作用せず、Arg132が50S サブユニットとの結合に重要であるという実験結果を説明できない。そこで、RRF のドメイン I のみを発現させ、その機能を解明することを試みた。ドメイン I は2つのポリペプチドセグメントに分かれているため、これら2つのセグメントを、R132G 変異体の立体構造を基に3残基の Gly からなるリンカーで連結することにより、ドメイン I を単独で発現させることに成功した。ドメイン I とリボソームとの結合並びにリボソーム解離活性を測定した結果、ドメイン I は50S サブユニット及び70S リボソームと特異的に結合し、30S サブユニットとは結合しなかった。またドメイン I は wild-type RRF を競争阻害したことから、ドメイン I はそれ自身で RRF と同じ様式で50S サブユニットと結合することが明らかとなった。またドメイン I のみではリボソーム解離活性を示さなかった。このことから RRF の機能はドメイン毎に独立しており、ドメイン I はリボソームとの結合に、ドメイン II はポスターミネーション複合体の解離に、それぞれ機能することが明らかとなった。

以上のことから著者は、従来とは逆に RRF のドメイン I は tRNA の CCA end に、ドメイン II はアンチコドンステムに対応することを結論づけた。この RRF と tRNA の間の分子擬態に関する概念は、生化学の知見により良く適合するものである。これに基づいてリボソームとの結合モデルを作製したところ、少なくとも3つのリボソームタンパク質 (S13、L5、L16) と相互作用可能な距離に RRF が存在することが明らかとなった。このタンパク質-タンパク質相互作用は RRF 阻害剤を設計する上で、貴重な情報となると考えられる。

論文審査の結果の要旨

中野博明君は原核生物における蛋白質の生合成の最終段階で重要な働きを司るリボソーム再生因子 (RRF) を X線結晶解析により研究した。腸炎ビブリオ菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 由来の RRF および大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来の RRF の一残基変異体 R132G の結晶化に成功し界面活性剤などの添加物を含まない組晶構造解析を行なった。これら常温菌由来の RRF の構造と、既に報告されている好熱菌由来の RRF の構造を比較し活性発現における2つのドメイン間の相対配置の重要性を指摘した。さらに RRF とリボソームの相互作用様式についての解析を行ない三本鎖ヘリックスバンドル構造を持つドメイン I とリボソームの50S サブユニットが相互作用することを見出した。これらの知見は生命科学の重要問題である生合成の機構解明に大きく寄与すると同時に、新規抗生剤の合理的設計に貢献するところ大と考えられる。よって本研究は学位に値するものと認める。