

Title	NMR Studies on Structure and Dynamics of Ribosome Recycling Factor
Author(s)	Yoshida, Takuya
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/44732
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	吉 田 卓 也
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 1 8 8 7 9 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	NMR Studies on Structure and Dynamics of Ribosome Recycling Factor (NMR で観たリボソーム再生因子の立体構造とダイナミクス)
論文審査委員	(主査) 教授 小林 祐次 (副査) 教授 今西 武 教授 小林 資正 教授 高木 達也

論 文 内 容 の 要 旨

リボソーム上でのタンパク質合成反応は、開始、伸長、および終止の3つの段階で説明されることが多い。しかし、終止反応後にはリボソーム、mRNA、および脱アシル tRNA からなる複合体 (ポストターミネーション複合体) が生成しており、タンパク質合成を円滑に進行させるにはポストターミネーション複合体を分解し、再生する第4の段階が不可欠である。リボソーム再生因子 (Ribosome Recycling Factor ; RRF) はポストターミネーション複合体を解離させるために必須な分子量 21 kDa のタンパク質因子であり、その作用には EF-G および GTP を必要とする。しかし、RRF およびリボソーム再生過程についての研究は少なく、その詳細なメカニズムの解明が待たれている。また RRF は真性細菌においてのみその存在が必須であると示唆されていることから、新規抗菌剤のターゲット分子としての関心も集めている。そこで、本研究では RRF の作用メカニズムについて知見を得るため、主に多核多次元 NMR 法を用いて RRF 分子をその構造・ダイナミクスを中心に解析した。

まず様々な菌種由来の RRF 分子について主鎖原子核の帰属をおこなうことで、それぞれの RRF について構造・物性の違いを比較検討する手段を手にすることにした。本研究では緑膿菌 *P. aeruginosa* 由来 RRF、大腸菌 *E. coli* 由来 RRF、高度好熱菌 *A. aeolicus* 由来 RRF、*T. maritima* 由来 RRF、及び *T. thermophilus* 由来 RRF の帰属をおこない何れもほとんど全ての主鎖原子核を帰属することに成功した。また帰属結果を元に RRF の 2 次構造を解析した結果、いずれの RRF にも 3 本の長いヘリックス、及び 2 本の短いヘリックスと 6 本のベータ鎖が存在することが明らかとなった。このことは、RRF の全体構造が高度に保存されており、それが RRF の活性に重要であることを示唆するものであった。そこで、さらに RRF の構造活性相関について知見を得るため、主鎖原子核を帰属した RRF のうち最も変性温度が高く安定であると考えられる *A. aeolicus* RRF を選んでその立体構造を決定することを試みた。

構造解析の過程で RRF が 2 ドメイン構造からなることが明らかとなった。一般的に NMR による構造決定に用いられる NOE や J は局所的な情報であるため、ドメインの相対配置に関しては精度良く決定することが困難であった。そこで緩和時間の異方性を用いて全体的な構造情報を得る手法を用いた。最終結果として得られた構造では 2 つのドメインが L 字型に配置されており、全体的な形・大きさは tRNA と非常に類似していた。L の縦線に相当するドメイン I は 3 本の α ヘリックスからなるバンドル構造であった。ドメイン I の側面には RRF 間でよく保存されているアルギニン残基のクラスターが存在していた。この部位に変異を持つ RRF はリボソームと結合できないことが示されていることから rRNA のリン酸骨格との相互作用に関与していることが示唆される。L の横線に相当するドメイン II は一本の α ヘリックスを 2 枚の逆平行 β シートで上下から挟んでいる $\beta/\alpha/\beta$ サンドイッチ構造をとっていた。ドメ

インIIの役割には不明な点が多いが、構造的には先端部に芳香環が露出しており、他分子との相互作用に関与している可能性が示唆された。

得られた構造アンサンブルをそれぞれのドメインのみについて重ねあわせた場合、ドメインIおよびドメインIIのいずれの場合にもその主鎖原子のrmsdは0.7Åであった。一方分子全体を重ね合わせた場合そのrmsdは1.4Åとなった。つまり、各ドメインの立体構造はよく収束しているものの、ドメイン間の配置にはある程度揺らぎがあった。アンサンブル中の構造間でドメインIの長軸とドメインIIの長軸との角度を解析すると、どの構造も90度付近であり、全体的なL字型を保っている一方で、ドメインIの長軸を回転軸とするような向きには分布が見られた。

これまでも分子生物学的な研究から、RRFの活性には適度な分子のフレキシビリティが必要であることが示唆されていたが、実際にRRFのダイナミクスを観測するような研究はなされていなかった。そこで本研究ではさらに溶液中におけるRRFの構造揺らぎの程度を分子動力学計算とNMR緩和時間解析によって明らかにすることを試みた。

残基ごとの主鎖アミド¹⁵N核の緩和時間 T_1 、 T_2 およびアミド¹Hとの異核NOEを測定して解析した。通常の球状タンパク質であれば、これらの値は、分子の回転相関時間 τ_c と、局所的な分子内運動の振幅を表すオーダーパラメータ S^2 によってうまく表現できることが知られている。しかし、RRFの場合、通常観測される局所的な速い分子内運動に加えて、ドメイン配置の揺らぎに相当する比較的ゆっくりした運動が存在しており、それがRRFの作用メカニズムの観点からは重要であると考えられる。そこで新たな運動モデル式を考案して解析に用いた。このモデルでは、分子の異方性を表現するために、複数個の回転相関時間 τ_j を用いるとともに、¹⁵N-¹Hベクトルの方向による寄与を考慮するための係数 A_j を導入した。また、それぞれのドメインは全体として τ_c で表されるタイムスケールで運動していると考えた。局所的な速い運動に関するオーダーパラメータ S^2 の値は分子動力学計算から求めた。その結果ドメイン運動に関するオーダーパラメータ S^2 の平均値はドメインIについては0.89であった。これはドメインIが分子全体に対してほとんど固定されていることを示している。一方ドメインIIでは S^2 は0.73となり、ドメインIと比較して小さい値を示した。つまりドメインIIはドメインIに比べて動きやすいことがわかった。これはドメインの可動範囲の差としては約30°となる。このように本研究によって初めてRRFのドメイン配置の揺らぎを実際に見積もることが可能となった。

論文審査の結果の要旨

リボソームで行われる蛋白質合成は生命にとって本質的な反応であり、その一連の機構を解明することは非常に重要である。特にリボソーム再生段階には不明な点が多くその解明が待たれている。細菌のリボソーム再生段階に必須であるリボソーム再生因子(Ribosome Recycling Factor; RRF)は、また新規抗菌剤のターゲット分子として重要であると考えられている蛋白質因子であるが、その構造・機能については不明な点が多く残されていた。そのような状況のなか吉田君はNMR法を用いてRRF分子をその構造・分子内運動を中心に解析した。吉田君は、まず幾つかの菌種由来のRRF分子についてNMR信号の帰属を行った。その結果RRFの全体構造が由来によらず高度に保存されており、それがRRFの活性に重要であることを見出し、RRFと相互作用する分子の探索・結合様式の解析を可能とした。吉田君はさらに緩和時間の異方性の情報を採り入れる事により、溶液中でのRRFの立体構造を決定することに初めて成功し、RRFが、2つのドメインがtRNA様のL字型に配置されている特長的な形状を持つことを示した。この実験事実より、RRFの構造機能相関及び、構造安定化機構を考察し多くの知見を得た。続いて吉田君は分子動力学計算とNMR緩和時間解析によって溶液中におけるRRFの構造揺らぎを解析した。その結果RRFにはドメイン配置の揺らぎに相当する比較的ゆっくりした分子内運動の存在を示した。この過程で、吉田君が構築したそのような運動を定量的に解析する手法は、RRFの活性とダイナミクスとの相関の研究を可能としたことに止まらず、多くの場合生体物質の活性発現に必須でありながら、今まで蔑ろにされていたドメイン間の相対位置が変化する分子内運動の解析法を提出したことになる。以上の成果はRRFの分子生物学に重要な知見を提供するとともに、広くRRFや多くの生理活性物質を標的分子とした薬剤設計に重要な足がかりを与えたと云える。従って本論文は、博士(薬学)の学位を授与するに相応しいと考える。