

Title	バクテリア、古細菌、真核生物にわたるリボソーム蛋白質L16/L10eの立体構造に基づく比較解析
Author(s)	西村, 光広
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47237
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	にしむらみつひろ 西村光広
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 21094 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 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専攻
学位論文名	細菌、古細菌、真核生物にわたるリボソーム蛋白質 L16/L10e の立体構造に基づく比較解析
論文審査委員	(主査) 教授 宇野 公之 (副査) 教授 今西 武 教授 小林 資正 教授 村上 啓寿 助教授 大久保忠恭

論文内容の要旨

リボソーム蛋白質 L16/L10e はすべての生物に共通なリボソーム構成因子であり、リボソーム大サブユニットの要となるアミノアシル tRNA 結合部位の立体構造維持に関わっている。この研究では細菌 L16 と真核生物 L10e について立体構造を解明することで、それぞれの特徴と機能に関する知見を得るとともに、既知である古細菌 L10e の立体構造を合わせて比較を行い、その共通性と差異について検証することでリボソーム蛋白質 L16/L10e の起源と分化過程について考察した。

細菌 L16 については高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 由来 L16 蛋白質を精製し NMR スペクトルの解析によりその立体構造を決定した。L16 の中心部分となる Tyr26-Tyr74、Gly82-Tyr137 では構造が収束し、主鎖重原子および全重原子の root mean square deviation (RMSD) はそれぞれ 0.40Å および 1.15Å であった。一方、それ以外の N 末端領域、C 末端領域、中央ループ領域では構造が収束せず、¹⁵N-¹H 異核 NOE 実験ではこれらの領域で運動性が高いことが示された。L16 の中心部分は二次構造 β1-β2-α1-β3-β4-β5-β6-β7-α2-β8 を持っており、四本鎖逆平行 β シートに 2 つの α ヘリックスが並んだ α/β 二層構造に 2 つの β シートが組み合わさった構造をとっていた。L16 構造を Harms らによって報告されたリボソーム大サブユニット結晶構造に当てはめることでモデル構造を構築し、L16 と周囲の rRNA 構造との近接箇所を調べたところ、L16 は 6 つの rRNA ステムに対して相互作用することが示され、リボソーム構造への影響の大きさが裏付けられた。同様のモデル構造を Yusupov らによって報告されたリボソーム-tRNA 複合体結晶構造を用いて作成し、L16 と tRNA の近接箇所を調べたところ、Arg56 側鎖が tRNA の t ループ部位と近接することが示された。抗生物質アヴィラマイシンおよびエヴァニマイシンに対する関連部位である Arg51、Val52、Arg56 について調べたところ、それらは全て tRNA の結合部位となる空間へ露出する構造をとっており、その位置は隣接する rRNA ステム上の同抗生物質関連部位の延長線上であった。したがって同抗生物質は L16 と隣接する rRNA ステムを覆うように結合することが予想される。この部位は上述の Arg56 を含んでいることから、同抗生物質の結合により tRNA の結合が阻害されることが示唆される。古細菌 L10e との構造比較では中心となる構造部分での高い共通性が示された。構造の一致を基にしたアミノ酸配列解析により L16 と L10e に共通の保存性箇所が明らかとなり、立体構造上でも類似性が確認された。この事は L16 と L10e に共通の祖先蛋白質が存在することを

明示している。一方で N 末端領域と中央ループ領域では配列保存性の不一致がみられ、特に N 末端領域では大きく異なる立体構造をとることが示された。これらの領域は L16 と L10e の区別が生じた後に付加された事が予想される。

真核生物 L10e に関してはヒト由来 L10e について X 線結晶構造解析により立体構造を解明した。全長 214 残基のヒト L10e 蛋白質は精製が困難であったため、一定の立体構造をとらないと考えられる N 末端領域と C 末端領域を除いた Phe34-Glu182 をヒト L10e コアドメイン (HsaL10eCD) として立体構造解析に用いた。結晶化実験では板状結晶と六角柱状の結晶が得られ、放射光を用いた回折測定によってそれぞれ 3.5 Å と 2.5 Å までの回折データを得た。そのうち 2.5 Å のデータを用い、古細菌 L10e 構造をサーチモデルとした分子置換法により HsaL10eCD の立体構造を決定した。HsaL10eCD は二次構造 $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\beta 4-\alpha 2-\beta 5-\beta 6$ を持ち、古細菌 L10e およびバクテリア L16 と同一の α/β 二層構造をとっていた。 $\alpha 2-\beta 6$ 間のループ部分ではカリウムイオンを含むターン構造が見られ、真核生物で保存性の高い Gln163 側鎖の関与が古細菌 L10e との違いとなっていた。このループ部分では酵母 L10e の研究でリボソーム大小サブユニットの会合や大サブユニットの核外輸送に異常をもたらす変異が複数報告されており、このターン構造が機能上の要所である事が示唆される。 α/β 二層構造部分より C 末端側の C 末端領域は、 β シートの表面に折れ返る構造をとっており、古細菌 L10e の相当部分とは大きく異なっていた。ここでは C 末端領域の Trp171 側鎖が β シート表面側の Arg90、Arg139 側鎖に挟まれるように位置しており、カチオン π 相互作用と水素結合によって C 末端領域が β シート表面側に固定されることが示された。HsaL10eCD 構造を Ban らが報告した古細菌リボソームの結晶構造に当てはめ、リボソーム上での C 末端領域の位置を調べたところ、サブユニットの会合面とは逆の外表面側に向けられることが示され、真核生物 L10e に特有の C 末端領域はリボソームの外表面側に位置することが示唆された。Spahn らが報告した酵母リボソームのクライオ電子顕微鏡像で L10e の β シート表面側に古細菌リボソームにはない体積が確認されていることから、この C 末端領域の位置に関する考察は支持され、同時にこの体積の少なくとも一部が酵母 L10e の C 末端領域である事が示唆された。酵母 L10e の研究では C 末端領域がリボソームの核外輸送機構に関与することが示されており、その位置がリボソームの外表面側に向けられることから、リボソームの外表面側がこの機能に関わることが示唆された。

以上のバクテリア、古細菌、真核生物にわたる L16/L10e の立体構造比較では、共通部分を維持したまま構造上の特徴が付け加えられていることが示され、リボソームの複雑化や分化に応じたリボソーム蛋白質の分子進化について一つの形式を示すことができた。

論文審査の結果の要旨

本研究で申請者は構造生物学的アプローチにより抗生物質の主要ターゲットであるリボソームのアミノアシル tRNA 結合部位の立体構造維持に関与する様々な種由来のリボソーム蛋白質 L16/L10e の比較解析を行った。バクテリア由来の L16 に関しては NMR を用いて溶液中の立体構造を決定しリボソームとの複合体のモデルを構築し rRNA 及び tRNA との相互作用様式の解明を行った。さらに数種の抗生物質との複合体のモデルも構築し抗生物質の阻害活性作用機構についてモデルを提唱した。真核生物由来 L10e に関しては X 線結晶構造解析により立体構造を決定しリボソームの核外輸送機構のモデルを提唱した。さらにバクテリア、古細菌、真核生物由来の L16/L10e の立体構造にもとづく比較解析からリボソーム蛋白質の分子進化による立体構造への寄与を明らかにした。

このような成果はリボソームの種特異的活性の違いを明らかにし新規抗生物質の開発に関して有用な知見を与えるものと考えられ博士 (薬学) の学位論文として相応しいものと認める。