

博士論文

リボソームストークと ATP 加水分解酵素 ABCE1 の
機能的相互作用

2019 年 2 月

今井 大達

新潟大学大学院 自然科学研究科

生命・食料科学専攻 基礎生命科学コース

指導教官：内海 利男

目次

目次.....	2
1. Summary.....	4
2. 要旨.....	5
3. 序論.....	6
3-1. タンパク質合成とリボソーム.....	6
3-2. リボソームストーク.....	6
3-3. ATP加水分解酵素 ABCE1 と様々なリボソームの解離反応.....	7
3-4. ABCE1 の作用機構.....	8
3-5. 本研究の目的.....	9
4. 材料と方法.....	10
4-1. 材料.....	10
4-2. 培養.....	10
4-3. タンパク質発現用プラスミドの調製.....	10
4-4. 各種タンパク質の発現と精製.....	11
4-5. 未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動.....	13
4-6. ハイブリッドリボソーム系を用いた ATP 加水分解活性測定.....	13
4-7. プルダウン解析.....	13
4-8. 蛍光偏光度測定.....	14
4-9. 超遠心沈降解析.....	14
4-10. DMS フットプリント.....	14
4-11. aABCE1- Δ N74 \cdot ADP \cdot aP-C18 複合体の X 線結晶構造解析.....	15
4-12. 出芽酵母由来 80S リボソームの調製および生化学解析.....	15
4-13. 解析用プラスミド・出芽酵母株の作製.....	16
4-14. ウェスタンブロットティング.....	17

5. 結果	18
5-1. リボソームストークはリボソームの aABCE1 受容性に関与する	18
5-2. aP1 の C 末端領域は aABCE1 のリボソーム依存の ATP 加水分解に必須である	20
5-3. aP1 の C 末端領域は aABCE1 を翻訳因子結合部位ヘリクルートする	21
5-4. aP-C18 ペプチドと aABCE1 の複合体結晶構造解析	22
5-5. aP1-C 末端領域は保存された疎水性残基を介して aABCE1 の NBD1 に結合する	23
5-6. リボソームストーク・ABCE1 相互作用は出芽酵母の生育に必須である	25
5-7. リボソームストークは Rli1 の ATP 加水分解とサブユニット解離反応を促進する	27
6. 考察	29
6-1. 本研究のまとめ	29
6-2. リボソームリサイクル反応とリボソームストークの進化的関連性	29
6-3. 真核生物・古細菌型リボソームストークと翻訳因子の多様な結合様式	30
6-4. リボソーム上における ABCE1 の ATP 加水分解の誘導機構とその意義、およびリボソームストークの直接的な関与の可能性	32
7. 図表	35
8. 引用文献	61
9. 謝辞	72

1. Summary

After translation termination, the ribosome should be dissociated into large and small subunits for the next round of translation. In eukaryote and archaea, an ATP-binding cassette protein ABCE1 plays a crucial role in dissociation of the post-terminated ribosomal complex to ribosomal subunits in ATP dependent manner. However, the detailed mechanochemistry of its recruitment to the ribosome, ATPase activation, and subunit dissociation remain to be elucidated. Here I show that the ribosomal stalk protein, which is known to participate in the actions of translational GTPase factors, plays an important role in these events. Biochemical and crystal structural data indicate that the intrinsically disordered region at the C-terminus of the archaeal stalk protein aP1 binds to the nucleotide-binding domain 1 of aABCE1, and that this binding is crucial for ATPase activation of aABCE1 on the ribosome. The functional role of the ribosomal stalk•ABCE1 interaction in ATPase activation and the subunit dissociation is also investigated using mutagenesis in a yeast system. These results strongly suggested that the ribosomal stalk protein participates in efficient actions of eukaryotic and archaeal ribosome recycling. In conclusions, I first demonstrate that 1) the eukaryotic and archaeal ribosomal stalks participate in the ABCE1-dependent ribosomal subunit dissociation, and 2) the ribosomal stalk functions with not only with GTPase, but also with the ATPase translation factors.

2. 要旨

タンパク質を合成し終えたりボソームは、2つのリボソームサブユニットに解離し次の翻訳反応に再利用される。ATP加水分解酵素 ABCE1 は真核生物と古細菌に高度に保存されたりボソーム解離因子であり、ATP 依存的にリボソームを解離する。しかしながら、ABCE1 のリボソームへのリクルート機構、ATP 加水分解の活性化機構、ATP 加水分解とサブユニット解離の関連性は不明である。本研究では、GTP 結合性翻訳因子のリボソームへのリクルートとその GTP 加水分解の活性化を担うリボソームストークが、ATP 加水分解酵素 ABCE1 の機能促進に重要であることが明らかとなった。生化学・構造生物学解析により、リボソームストークタンパク質 aP1 の C 末端天然変性領域が aABCE1 のヌクレオチド結合ドメイン 1 (NBD1) に結合することが示された。さらに、リボソームストーク・ABCE1 間相互作用は、ABCE1 の ATP 加水分解とそれに伴うリボソームサブユニットの解離反応に重要であることが生化学的解析および分子遺伝学的解析により明らかとなった。これらの結果から、(1) 真核生物と古細菌のリボソームストークは ABCE1 依存のリボソーム解離反応に寄与すること、(2) リボソームストークは GTP 結合性翻訳因子のみならず ATP 結合性翻訳因子の機能を促進することが明らかになった。

3. 序論

3-1. タンパク質合成とリボソーム

細菌からヒトに至るあらゆる生物において、生命活動に関わるすべてのタンパク質はリボソームにより合成される。リボソームは数種のリボソーム RNA (rRNA) と数十種のリボソームタンパク質から成る RNA-タンパク質複合体であり、大小2つのリボソームサブユニットから構成される。真核生物では 60S サブユニットと 40S サブユニットから 80S リボソームが、古細菌と真正細菌では 50S サブユニットと 30S サブユニットから 70S リボソームがそれぞれ形成される。2つのリボソームサブユニットが mRNA 上で会合した後、アミノアシル tRNA によって運搬されたアミノ酸がリボソーム内で重合されることでタンパク質が合成される。

遺伝情報の翻訳は、mRNA の開始コドン上で2つのリボソームサブユニットが会合する開始反応、アミノアシル tRNA が取り込まれポリペプチド鎖が伸長する伸長反応、合成されたポリペプチド鎖をリボソームから放出する終結反応、そして、リボソームが再び2つのサブユニットに解離し次の翻訳へ移行するリサイクル反応の四段階に分けられる。この内、開始反応から終結反応までの過程は、GTP 結合性翻訳因子と呼ばれる複数の GTP 加水分解酵素により促進される (Kapp *et al.*, 2004; Rodonina *et al.*, 2009; Liljas *et al.*, 2013)。

3-2. リボソームストローク

GTP 結合性翻訳因子の翻訳因子結合部位への効率的なリクルートには、リボソームストロークが重要な役割を担う (Mohr *et al.*, 2002; Diaconu *et al.*, 2005; Liljas *et al.*, 2013)。

リボソームストークはすべての生物のリボソーム大サブユニットに存在し、リボソームの翻訳活性に不可欠なリボソームタンパク質複合体である。古細菌のリボソームストークはリボソームタンパク質 aP0 に aP1 のホモ二量体が三対結合した aP0•(aP1)₂•(aP1)₂•(aP1)₂ 七量体を、真核生物のリボソームストークはリボソームタンパク質 P0 に P1 と P2 のヘテロ二量体が二対結合した P0•(P1-P2)•(P1-P2)五量体をとる。

(Hagiya *et al.*, 2005; Maki *et al.*, 2007)。aP0 (P0) と aP1 (P1 または P2) の C 末端側には約 50 残基から成る天然変性領域が高度に保存されている (Grela *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2013)。リボソームストークは、高度に保存された天然変性領域を介して GTP 結合性翻訳因子 IF5B、EF1A、EF2 と直接結合し、これらの因子を翻訳因子結合部位ヘリクルートするはたらきを持つ (Grela *et al.*, 2007; Nomura *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Imai *et al.*, 2015)。

3-3. ATP 加水分解酵素 ABCE1 と様々なリボソームの解離反応

翻訳終了後のリボソームリサイクル反応の分子機構は、真正細菌と真核生物・古細菌の間で大きく異なることが知られている (Nürenberg *et al.*, 2013)。真正細菌のリボソームリサイクルではリボソームリサイクル因子 RRF と GTP 結合性翻訳因子 EF-G が必要とされることに対し、真核生物と古細菌のリボソームリサイクルでは ATP 加水分解酵素 ABCE1 が重要な役割を担う (Janosi *et al.*, 1996; Pisarev *et al.*, 2010; Barthelme *et al.*, 2011)。ABCE1 は、翻訳終了因子 RF1 が結合した翻訳終了後リボソーム複合体 (pre-TC) に結合し、ATP 依存的にリボソームを 2 つのサブユニットに解離する (Pisarev *et al.*, 2010; Barthelme *et al.*, 2011; Shoemaker *et al.*, 2011)。

近年、真核生物の細胞内の様々な過程において、ABCE1 依存のリボソームの解離反

応が起きることが分かってきた。例えば、栄養飢餓ストレスを受けた真核細胞内では、mRNA を含まない空の 80S リボソームが形成し、タンパク質合成が抑制される。細胞が栄養飢餓から解放されると、空の 80S リボソームは ABCE1 依存的に 60S サブユニットと 40S サブユニットに解離し、タンパク質合成が再開する (van den Elzen *et al.*, 2014)。また、リボソーム生合成の最終段階において、リボソーム生合成因子を複数含んだ 80S-like リボソームが形成される。80S-like リボソームは ABCE1 依存的に 60S サブユニットと 40S サブユニットに解離後、タンパク質合成に利用される。この過程は、新たに合成されたりボソームの品質管理として機能すると考えられている (Strunk *et al.*, 2012)。さらに、何らかの理由により切断を受けた mRNA や二次構造を形成する mRNA を翻訳したりボソームは、翻訳の途中で異常停滞を引き起こす。異常停滞したりボソームが ABCE1 依存的に解離することで、原因となった異常な mRNA と、その mRNA から合成された異常なポリペプチド鎖の分解が誘導され、細胞内の mRNA とプロテオームの品質が保たれる (Pisareva *et al.*, 2011; Shoemaker *et al.*, 2011; Nürenberg *et al.*, 2013; Brandman *et al.*, 2016)。

3-4. ABCE1 の作用機構

その重要性にも関わらず、ABCE1 のリボソーム解離機構は十分に理解されていない。ABCE1 は ABC タンパク質スーパーファミリーに分類され、2 つの $[4Fe-4S]^{2+}$ クラスターを含む鉄硫黄ドメイン (FeS)、2 つのヌクレオチド結合ドメイン (NBD1 および NBD2)、および 2 つのヒンジ領域 (H1 および H2) から構成される (Karcher *et al.*, 2005; Karcher *et al.*, 2008)。他の ABC タンパク質と同様に、ABCE1 の NBD1 と NBD2 は、ATP 結合とその加水分解に伴った開閉運動を示す。すなわち、ATP 結合時には NBD1 と NBD2 が

ATP を介して互いに結合した閉じた構造を、ADP 結合時には NBD1 と NBD2 が解離した開いた構造を形成する。クライオ電子顕微鏡を用いた過去の研究より、ABCE1 は EF1A や EF2 などの他の GTP 結合性翻訳因子と同様にリボソームの翻訳因子結合部位に結合することが明らかとなっている (Becker *et al.*, 2012; Preis *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2015)。このとき、ATP の結合とその加水分解に伴う NBD1 と NBD2 の開閉運動により鉄硫黄ドメインの配置が大きく変化し、RF1 やリボソームタンパク質との立体障害を引き起こすことでリボソームサブユニットの解離が誘導されると考えられている (Karcher *et al.*, 2008; Franckenberg *et al.*, 2012; Heuer *et al.*, 2017)。しかしながら、一連のリボソーム解離反応において、ABCE1 がどのようにリボソームにリクルートされ、どのように ATP 加水分解が促進されるのか、ATP 加水分解がサブユニット解離反応にどのように寄与するのか、それらの分子機構は不明である。

3-5. 本研究の目的

本研究では、ATP 加水分解酵素 ABCE1 のリボソーム解離機構の解明を目的とした。そのために、GTP 結合性翻訳因子の機能促進に関わるリボソームストークに注目し、ABCE1 の機能発現にリボソームストークが及ぼす影響を生化学、構造生物学、分子遺伝学的手法を用いて解析した。

4. 材料と方法

4-1. 材料

本研究では、表1に示すオリゴDNAを用いて各プラスミドを作製した。オリゴDNAはファスマック社またはシグマアルドリッチ社から購入した。出芽酵母の実験に用いたプラスミドおよび出芽酵母株は表2と表3にそれぞれ記載した。

4-2. 培養

大腸菌の培養にはLB培地を用いた。培地中には50 µg/ml アンピシリン、15 µg/ml カナマイシン、34 µg/ml クロラムフェニコールを必要に応じて加えた。出芽酵母の培養にはYP培地 [1% (w/v) Yeast Extract, 2% (w/v) ハイポリペプトン]、SC培地 (6.7 mg/ml Yeast Nitrogen base w/o amino acids, 5 mg/ml Casamino Acids)、S培地 (6.7 mg/ml Yeast Nitrogen base w/o amino acids) を用いた。培地中には2% (w/v) グルコース (D)、2% (w/v) ガラクトース (Gal)、アミノ酸混合物 (2 mg/ml アデニン硫酸塩、2 mg/ml ウラシル、2 mg/ml トリプトファン、2 mg/ml ヒスチジン、3 mg/ml ロイシン、3 mg/ml リジン) を必要に応じて加えた。アミノ酸混合物は、形質転換プラスミドの種類に合わせて適宜アミノ酸を除外したものを使用した。

4-3. タンパク質発現用プラスミドの調製

Pyrococcus horikoshii 由来の aL11、aP0、aP1 およびそれらの各種変異体を発現するプラスミドは、Nomura ら、Naganuma らの方法に従って構築した (Nomura *et al.*, 2006; Naganuma *et al.*, 2010)。MBP-aP1[61-108]発現用プラスミド pMALc4x-aP1[61-108]は、*Pyrococcus furiosus* 由来 aP1 遺伝子の 61-108 アミノ酸コード領域を pMALc4x ベクター

に導入し構築した。pMALc4x-aP1[61-108]プラスミドを鋳型とし、C末端領域から18残基を削除した MBP-aP1[61-90]発現用プラスミド pMALc4x-aP1[61-90]を構築した。aABCE1 発現用プラスミド pET28b-aABCE1 は、*Pyrococcus furiosus* 由来の aABCE1 遺伝子を pET28b ベクターに導入し構築した。pET28b-aABCE1 プラスミドを鋳型に、各種 aABCE1 変異体発現プラスミドを構築した。aPelota 発現プラスミドは、当研究室で過去に構築されたものを使用した。

Rli1 発現用プラスミドは、Johns Hopkins University School of Medicine の Rachel Green 博士より提供された。このプラスミドを鋳型に PCR を行い、Rli1-3S 変異体発現プラスミドを構築した。Dom34 発現プラスミドは、pTOW-p-GFP プラスミド中の yEGFP コード領域を Dom34 コード領域と置換し構築した。pTOW-p-GEP プラスミドは岡山大学の守屋央朗准教授に提供された。Dom34 コード領域は出芽酵母 W303-1A 株より PCR で合成した。eIF6 発現プラスミドは、出芽酵母由来 eIF6 コード領域を PCR で増幅し、pET-28b ベクターに導入し構築した。

4-4. 各種タンパク質の発現と精製

Pyrococcus horikoshii 由来の aL11、aP0、aP1 およびそれらの各種変異体タンパク質は、Nomura らおよび Naganuma らの方法に従って発現と精製を行った (Nomura *et al.*, 2006; Naganuma *et al.*, 2010)。MBP-aP1 ([61-108]および[61-90]) は以下のように発現・精製した。MBP-aP1 発現用プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) codon plus RIL 株に形質転換後、LB 液体培地で 37°C で振盪培養した。OD=0.4 に達した際に 0.5 mM IPTG を添加し、37°C で 3 時間振盪培養した。菌体をペレット化し、超音波破碎、アミロースアフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより MBP-aP1 を精製した。

Pyrococcus furiosus 由来の aABCE1、aPelota および aABCE1 各種変異体は以下のように発現・精製した。タンパク質発現用プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) codon plus RIL 株に形質転換後、LB 液体培地で 37°C で振盪培養した。OD=0.4 に到達後、培地を 18°C に冷却し、0.5 mM IPTG を添加し、18°C で 18 時間振盪培養した。菌体をペレット化し、超音波破碎、アミロースアフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより aABCE1 を精製した。

出芽酵母由来 Rli1 および Rli1-3S 変異体は、Shoemaker らの方法に従って調製した (Shoemaker *et al.*, 2011)。出芽酵母由来 Dom34 は以下のように発現・精製した。Dom34 発現用プラスミドを出芽酵母 INVSc1 株に形質転換後、150 ml の SD-Ura 培地中で 30°C で振盪培養した。OD=8 に達した後に、培地を 6 L の SD-Ura-Leu 液体培地に交換し、30°C で 18 時間振盪培養した。菌体をペレット化し、1 mL の懸濁用 buffer [75 mM HEPES-KOH pH7.6, 300 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM imidazole, 2% (w/v) Tween20, 10% (v/v) glycerol, 7 mM 2-ME] を加え、液体窒素で菌体懸濁液を凍結しビーズ状にした。市販のコーヒーミルを用いて菌体を破碎後、His タグアフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより Dom34 を精製した。出芽酵母由来 eIF6 は以下のように発現・精製した。eIF6 発現用プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) codon plus RIL 株に形質転換後、OD=0.4 に達した際に、液体培地を 18°C に冷却後、18 時間振盪培養した。菌体をペレット化し、超音波破碎、His タグアフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより eIF6 を精製した。

4-5. 未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Hagiya らの方法に従い、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とカゼインキナーゼ II (New England Biolabs) を用いて、*Pyrococcus horikoshii* 由来の aP1 を放射性同位体標識した (Hagiya *et al.*, 2005)。 ^{32}P -aP1 と aABCE1 を混合後 70°C で 10 分間保温し、Nomura らの方法に従い電気泳動を行った (Nomura *et al.*, 2012)。

4-6. ハイブリッドリボソーム系を用いた ATP 加水分解活性測定

aABCE1 (100 pmol)、aPelota (100 pmol)、ハイブリッド 70S リボソーム (10 pmol)、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1,000 pmol) を 37°C で 20 分間、100 μl の ATPase buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM NH_4Cl , 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT) 中で保温した。ハイブリッド 70S リボソームは Nomura らの方法に従い調製した (Nomura *et al.*, 2006)。溶液中の無機リン酸の放射活性を Frolova らの方法に従い測定し (Frolova *et al.*, 1996)、ATP の加水分解量を算出した。

4-7. プルダウン解析

100 μl の PD buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 200 mM NaCl, 7 mM 2-ME) 中で、aABCE1 (1,000 pmol) と MBP-aP1 (1,000 pmol) を混合した。20 μl のアミロースレジン (New England Biolabs) を加え、4°C で 90 分間、5 rpm の速度で転倒混和しながら溶液を攪拌した。500 μl の PD buffer でレジンを 2 度洗浄し、40 μl の Elution buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 200 mM NaCl, 7 mM 2-ME, 50 mM maltose) でタンパク質を溶出した。溶出した試料を SDS-PAGE で解析した。

4-8. 蛍光偏光度測定

N 末端側を fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した aP1-C 末端 18 残基ペプチド (アミノ酸配列: EEEVSEEEALAGLSALG) は、北海道システムサイエンス社から購入した。FITC 標識ペプチド (5 nmol) を、aABCE1 の濃度が 0–160 μM になるように調製した 100 μl の FP buffer (20 mM HEPES-KOH pH 7.6, 10 mM MgCl_2 , 200 mM KCl, 7 mM 2-ME, 0.1 mg/ml BSA) 中に加え、反応溶液とした。Pan Vera Beacon 2000 fluorescence polarization instrument (インビトロジェン) を用いて、25°C で蛍光偏光度を測定した。GraphPad Prism6 for MacOS (GraphPad Software, San Diego California USA) の非線形回帰モデルを用いて、解離定数を算出した。

4-9. 超遠心沈降解析

ハイブリッド 70S リボソーム (50 pmol)、aABCE1 (50 pmol)、aPelota (50 pmol) を 37°C で 10 分間、50 μl の PL buffer (56 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM KCl, 80 mM NH_4Cl , 50 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0.5 mM spermin, 2 mM AMP-PNP) 中で保温後、950 μl の 34.2% スクロースを含む PL buffer 上に充填した。S100AT4-580 ローター (日立) を用いて 189,000 g で 30 分間、4°C で遠心した。TCA 沈殿によりペレット画分 (P) と上清画分 (S) をそれぞれ回収し、SDS-PAGE で解析した。

4-10. DMS フットプリント

ハイブリッド 70S リボソーム (20 pmol)、aABCE1 (200 pmol)、aPelota (200 pmol) を 50 μl の CM buffer (100 mM potassium cacodylate pH 7.2, 50 mM NH_4Cl , 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0.5 mM spermin, 2 mM AMP-PNP) 中で 10 分間、37°C で保温した。2 μl の dimethyl sulfate (100%エタノールで 5 倍に希釈したもの) を添加後、さらに 37°C で 10

分間保温し rRNA を dimethyl sulfate (DMS) 修飾した。フェノール・クロロホルムにより rRNA を抽出後、Miyoshi らの方法に従ってプライマー伸長を行い、rRNA の DMS 修飾と aABCE1 結合による DMS 修飾保護効果をゲル電気泳動により解析した (Miyoshi and Uchiyumi, 2008)。

4-11. aABCE1- Δ N74 \cdot ADP \cdot aP-C18 複合体の X 線結晶構造解析

aABCE1- Δ N74 \cdot ADP \cdot aP-C18 複合体の結晶化には、シッティングドロップ蒸気拡散法を用いた。1 μ l のタンパク質溶液 (10 mg/ml aABCE1- Δ N74, 2 mg/ml aP-C18 peptide, 1 mM ADP, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl) と 1 μ l のリザーバー溶液 [100 mM HEPES pH 7.0, 15% (w/v) PEG4000, 10% (v/v) 2-propanol] を混合後、20°C で 1 週間静置しタンパク質結晶を得た。Rigaku MicroMAX-007F および Rigaku R-Axis IV⁺⁺を用いて、100 K で 1.54 Å 波長の X 線を結晶に照射し、回折データを取得した。得られた回折データを XDS (Kabsch, 2010) で処理後、BALBES (Long *et al.*, 2008) を用いて分子置換を行い、初期位相を求めた。その後、Refmac5 (Emsley and Cowtan, 2004) と COOT (Murshudov, 2011) を用いて立体構造モデルの精密化を行った。X 線結晶構造解析の統計値は表 4. に示した。本論文中で使用した立体構造の図は CueMol2 (<http://www.cuemol.org/en/>) を用いて作製した。

4-12. 出芽酵母由来 80S リボソームの調製および生化学解析

出芽酵母の 80S リボソームは、Shin らの方法に従って調製した (Shin and Dever, 2007)。Rli1 依存の ATP 加水分解活性測定は以下のように行った。Rli1 (10 pmol)、Dom34 (10 pmol)、80S リボソーム (1 pmol) を 30°C で 10 分間、20 μ l の ATPase buffer (20 mM Tris-

HCl pH 7.6, 5 mM MgOAc, 100 mM KOAc, 0.5 mM spermine, 1 mM DTT) 中で保温した。溶液中の無機リン酸の放射活性を Frolova らの方法に従い測定し (Frolova *et al.*, 1996)、ATP の加水分解量を算出した。サブユニット解離実験は以下のように行った。Rli1 (50 pmol)、Dom34 (50 pmol)、eIF6 (50 pmol)、80S リボソーム (10 pmol) を 30°C で 5 分間、50 μ l の SP buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 2.5 mM MgOAc, 100 mM KOAc, 0.5 mM spermine, 1 mM DTT, 1 mM ATP または AMP-PNP) 中で保温した。試料を 15–30% のスクロース密度勾配を含む SP buffer 上に充填し、S100AT4-580 ローター (日立) を用いて 163,000 g で 150 分間、4°C で遠心した。遠心後、BIO-MINI UV MONITOR AC-5200 (アトー) を用いて、リボソームの UV プロファイル (254 nm) を取得した。サブユニット解離効率、Peltz らの方法に従って算出した (Peltz *et al.*, 1992)。

4-13. 解析用プラスミド・出芽酵母株の作製

本研究で使用した解析用プラスミドと出芽酵母株は、テーブル S3 と S4 にまとめた。pTU1002 プラスミドは、*GALI* プロモーター (*P_{GALI}*)、C 末端側にアルギニンを付加したユビキチン (*UBI-R*)、N 末端側に FLAG タグを付加した Rli1 (*FLAG-RLII*) をそれぞれコードする DNA 断片を PCR で増幅・連結後、YCplac111 ベクターに導入することで構築した。*P_{GALI}* の DNA 断片は pYES2 ベクターを鋳型にして合成した。*UBI-R*、*FLAG-RLII* の DNA 断片は、出芽酵母 W303-1A 株のゲノムを鋳型にして合成した。*P_{GALI}-UBI-R-FLAG-RLII* 断片の YCplac111 ベクターへの導入には、SLiCE 法を利用した (Motohashi, 2015)。pTU1004 プラスミドは、pTU1002 プラスミドから増幅した *P_{GALI}-UBI-R* 断片を pFA6-kanMX (addgene) ベクターへ導入し構築した。pTU2001 プラスミドは、上流 662 bp および下流 400 bp を含んだ *RLII* コード領域を YCplac22 ベクターへ導入し構築した。

pTU2002 プラスミドは、3xHA タグ (*3HA*) をコードする DNA 断片を pTU2001 プラスミドへ導入し構築した。*3HA* の DNA 断片は、pFA6-kanMX-P_{GAL1}-3HA ベクター (addgene) を鋳型に合成した。

出芽酵母 YTU2001 株は、pTU1004 プラスミドから増幅した *kanMX-P_{GAL1}-UBI-R-FLAG-RLII* の DNA 断片を W303-1A 株に形質転換し作製した。

4-14. ウェスタンブロッティング

YTU2001 株を 50 ml の YPGal 培地に植菌し、30°C で OD₆₀₀ が 1.0–1.5 に達するまで培養した後、遠心分離により集菌した。ペレットを 2 ml の YPD 培地で 2 回洗浄した後、OD₆₀₀=0.01 になるように 500 ml の YPD 培地に植菌し 30°C で培養した。植菌後、2、4、6、8、16 時間毎に 5 OD 分の酵母を遠心分離により回収し、液体窒素で菌体を凍結保存した。Kushnirov らの方法に従って細胞抽出液を調製し、BCA 法でタンパク質濃度を定量後、15 µg 分の総タンパク質を SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングで解析した (Kushnirov, 2000)。抗 FLAG モノクローナル抗体は、MBL より購入した。抗 Tom40 モノクローナル抗体は、京都産業大学の遠藤斗志也教授より提供された。

5. 結果

5-1. リボソームストークはリボソームの aABCE1 受容性に関与する

古細菌のリボソームストークタンパク質 aP1 は GTP 結合性翻訳因子 aIF5B、aEF2、aEF1A と直接相互作用する (Nomura *et al.*, 2012)。この知見に基づき、まず古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来の試料を用いて、aP1 と aABCE1 の間に分子間相互作用が存在するかどうかを検討した。Hagiya らの方法に従い、95 番目のセリンを放射性標識した [³²P]-aP1 を調製し (Ballesta *et al.*, 1999; Hagiya *et al.*, 2005)、未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により aP1 と aABCE1 の分子間相互作用を解析した (図 1A)。その結果、aABCE1 依存的な aP1 のバンドシフトが観察され (図 1A、レーン 2-5)、aP1 が aABCE1 と相互作用することが示された。

aP1・aABCE1 間相互作用の意義を解析するため、リボソームストークを改変した 70S リボソームを調製し、aABCE1 の ATP 加水分解活性の測定を試みた。一般に、リボソームストークへの変異導入は細胞の致死を引き起こすため、リボソームストーク変異型 70S リボソームを細胞から精製することは困難である。私の所属研究室は、大腸菌 70S リボソームのストークタンパク質 bL12、bL10、bL11 を古細菌の aP1、aP0、aL11 または真核生物の P1、P2、P0、eL12 にそれぞれ置換したハイブリッド 70S リボソームを試験管内で再構成し、この系を用いて、リボソームストークが (1) リボソームの GTP 結合性翻訳因子受容の生物ドメイン特異性を決定づけること、(2) 翻訳伸長因子 EF1A、EF2 を 23S/28S rRNA の SRL に結合させることで翻訳因子の GTP 加水分解反応およびペプチド鎖伸長反応を促進することを報告している (Uchiumi *et al.*, 2002a; Uchiumi *et al.*, 2002b; Nomura *et al.*, 2006, Nomura *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2014; Imai *et al.*, 2015)。これらの背景から、aABCE1 の ATP 加水分解反応におけるリボソームストークの生化学的機能

解析を行う上で、ハイブリッドリボソーム系は有効な実験系であると考えた。

大腸菌 70S リボソーム上の bL10、bL12、bL11 を、古細菌 *Pyrococcus furiosus* の aP0、aP1、aL11 にそれぞれ置換したハイブリッドリボソーム系を用いて、70S リボソーム存在下での aABCE1 の ATP 加水分解活性がリボソームストックに依存するかどうかを検討した (図 1B)。このとき、aABCE1 のコファクターとして aPelota を用いた。その結果、aABCE1 の ATP 加水分解活性は、リボソーム非存在下では 0.16 pmol/min (図 1B、レーン 1)、大腸菌 70S リボソーム存在下では 1.20 pmol/min (図 1B、レーン 2)、リボソームストック欠損型 70S リボソーム存在下で 0.60 pmol/min (図 1B、レーン 3) であった。一方で、ハイブリッド 70S リボソーム存在下で検出された aABCE1 の ATP 加水分解活性は 9.69 pmol/min であり (図 1B、レーン 4)、大腸菌 70S リボソーム存在下の約 8.08 倍であった。この結果から、70S リボソーム存在下での aABCE1 の ATP 加水分解活性は、リボソームストックに依存することが示された。

aABCE1 は 74 残基からなる鉄硫黄ドメインを N 末端側に持つ (図 6A 参照)。鉄硫黄ドメインは aABCE1 のリボソームへの結合に必須であり、リボソーム上で aRF1/aPelota と相互作用することが報告されている (Barthelme *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2012; Preis *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2015)。ここでは、図 1B で検出されたハイブリッド 70S リボソーム存在下での aABCE1 の ATP 加水分解活性が、aABCE1 の鉄硫黄ドメインに依存的であるかどうかを検証した。その結果、ハイブリッド 70S リボソーム存在下で検出された aABCE1- Δ N74 変異体の ATP 加水分解活性は 1.85 pmol/min であり、野生型の 0.19 倍であった (図 2、レーン 4 および 5)。したがって、ハイブリッド 70S リボソーム存在下での aABCE1 の ATP 加水分解活性は aABCE1 の鉄硫黄ドメインに依存することが明らかとなった。得られた結果は、野生型リボソームを用いた先行研究の実験結果と一致して

おり、ハイブリッドリボソーム系を用いて検出した aABCE1 の ATP 加水分解活性が、野生型リボソームを用いて検出した ATP 加水分解活性を機能的に反映していることを示している。

5-2. aP1 の C 末端領域は aABCE1 のリボソーム依存の ATP 加水分解に必須である

古細菌/真核生物のストークタンパク質の C 末端 50 残基程度は高度に保存された末端部分を含む天然変性領域であり、GTP 結合性翻訳因子のリボソームへのリクルートおよびその後の GTP 加水分解に必須である (Grela *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2013, Imai *et al.*, 2015)。ここでは、図 1B で観察された aP1•aABCE1 相互作用および ATP 加水分解活性に対する aP1-C 末端天然変性領域の関与を検討した。まず、マルトース結合タンパク質 (maltose binding protein: MBP) と aP1 の 61–108 残基 (C 末端 48 残基に相当) を融合した MBP-aP1[61-108]、MBP と aP1 の 61–90 残基を融合した MBP-aP1[61-90]を調製した (図 3A)。アミロースレジンを用いて、MBP-aP1 と aABCE1 のプルダウン実験を行ったところ、MBP-aP1[61-108]と aABCE1 の結合性が検出された (図 3B、レーン 8)。一方で、MBP-aP1[61-90]は aABCE1 と結合しなかった (図 3B、レーン 10)。この結果から、aP1 の C 末端 18 残基は aABCE1 との結合に必須であることが明らかとなった。続いて、aP1-C 末端 18 残基のみが aABCE1 と結合可能であるかどうかを検討した。N 末端側を蛍光標識した aP1-C 末端 18 残基ペプチド (FITC-aP-C18) に対して aABCE1 を添加すると、aABCE1 の濃度に依存した蛍光偏光度の上昇が確認された (図 3C)。ネガティブコントロールとして MBP を添加した際には、蛍光偏光度の上昇は検出されなかった。以上の結果から、aP1 の C 末端 18 残基は aABCE1 と直接結合可能な最小単位であると結論づけた。なお、aP-C18 ペプチドと aABCE1 の結合比を 1:1 としたとき、両者の

解離定数は 3.9 μM と算出された (表 5.)。

次に、リボソームストークの C 末端天然変性領域の欠如が aABCE1 の ATP 加水分解活性に与える影響を、ハイブリッドリボソーム系を用いて解析した (図 4)。野生型リボソームストークを再構成したハイブリッドリボソーム存在下において、aABCE1 の ATP 加水分解活性は 9.69 pmol/min であった (図 4A、レーン 2)。これに対して、aP0 の C 末端領域を欠損したものでは 8.75 pmol/min (図 4A、レーン 3)、aP1 の C 末端領域を欠損したものでは 1.38 pmol/min (図 4A、レーン 4)、aP0 と aP1 両方の C 末端領域を欠損したものでは 0.80 pmol/min (図 4A、レーン 5) の ATP 加水分解活性がそれぞれ検出された。これらの結果から、aABCE1 の ATP 加水分解活性は、リボソームストークの C 末端領域、特に aP1 の C 末端領域に依存することが示された。次に、リボソームストーク C 末端領域に依存した aABCE1 の ATP 加水分解活性の時間依存性 (図 4B) と aABCE1 濃度依存性 (図 4C) について検討した。このとき、aP0 と aP1 両方の C 末端領域を欠損したハイブリッドリボソームでは、aABCE1 依存の ATP 加水分解反応が検出されなかった。以上の結果から、aP1 の C 末端領域は aABCE1 のリボソーム依存の ATP 加水分解に必須であることが明らかとなった。

5-3. aP1 の C 末端領域は aABCE1 を翻訳因子結合部位へリクルートする

過去の研究により、aP1 の C 末端領域は、GTP 結合性翻訳因子を翻訳因子結合部位にリクルートする働きを持つことが明らかとなっている (Uchiyama *et al.*, 2002a; Imai *et al.*, 2015)。aABCE1 とリボソーム間の結合に対する aP1 の C 末端領域の役割を超速心沈降分析により解析した。aABCE1 と aPelota がリボソームに結合する際の aP1-C 末端領域の影響を、ハイブリッドリボソーム系を用いて解析した (図 5A)。aPelota は aP1-C 末端

領域に依存せずハイブリッドリボソームに結合した (図 5A、レーン 14 および 16)。一方で、aABCE1 は aP1-C 末端領域に依存してハイブリッドリボソームに結合した (図 5A、レーン 14 および 16)。このとき、aABCE1 が翻訳因子結合部位に結合しているかどうかを確認するため、aABCE1 とリボソーム RNA 間の結合を DMS フットプリント法により解析した (図 5B)。その結果、翻訳因子結合領域の一部である 16S リボソーム RNA の 344 番目のアデニン (A344) に aABCE1 および aPelota 依存の化学修飾保護が検出された (図 5B、レーン 7)。*Pyrococcus furiosus* 70S リボソーム・aABCE1・aPelota 複合体において、aABCE1 のヒンジ 1 が 16S リボソーム RNA の 341 番目のアデニン (大腸菌 16S リボソーム RNA の A344 と相同) と接触していたことから (Becker *et al.*, 2012)、この化学修飾保護は aABCE1 と 16S リボソーム RNA の結合に由来すると判断した。aABCE1 依存の A344 の化学修飾保護は aP0 と aP1 両方の C 末端領域を欠損したハイブリッドリボソームでは検出されなかったことから (図 5B、レーン 9)、aP1 の C 末端領域は aABCE1 を翻訳因子結合部位にリクルートする働きを持つことが明らかとなった。

5-4. aP-C18 ペプチドと aABCE1 の複合体結晶構造解析

これまでの解析により、aP1 の C 末端領域は ATP 加水分解酵素 aABCE1 と直接結合し、リボソーム依存の ATP 加水分解活性を促進することが示された。一方、aP1 の C 末端領域は GTP 結合性翻訳因子 aIF5B、aEF1A、aEF2 とそれぞれ結合することが明らかとなっている (Nomura *et al.*, 2012)。aABCE1 と各 GTP 結合性翻訳因子間には、一次構造および三次構造の類似性は見られず、aP1-C 末端領域が aABCE1 を認識し結合するための構造基盤は不明である。そこで、aP1-C 末端領域による aABCE1 の認識・結合機構を明らかにするため、aP1-C 末端領域 18 残基のペプチド (aP-C18) ・aABCE1 複合体

の X 線結晶構造解析を行った。

はじめに、完全長の *Pyrococcus furiosus* aABCE1 を用いて aABCE1•ADP•aP-C18 複合体の結晶化スクリーニングを行ったが、良質なタンパク質結晶は得られなかった。aABCE1 の鉄硫黄ドメイン (1-74 残基) は酸化を受けやすく不安定であると考え、N 末端 74 残基を削除した aABCE1- Δ N74 を結晶化に用いた (Karchar *et al.*, 2005; Karchar *et al.*, 2008)。このとき、aABCE1- Δ N74 が完全長の aABCE1 と同程度の親和性で aP-C18 ペプチドに結合することを蛍光偏光度測定法により確認した (図 6A)。aABCE1- Δ N74 を用いた結晶化スクリーニングの結果、直径 750 μ m 程度のタンパク質結晶が得られ、aABCE1- Δ N74•ADP•aP-C18 複合体の結晶構造を最大分解能 2.1 Å で決定した (図 6B および図 6C)。

5-5. aP1-C 末端領域は保存された疎水性残基を介して aABCE1 の NBD1 に結合する

aABCE1- Δ N74•ADP•aP-C18 複合体結晶構造中において、aP1-C 末端ペプチドは α -ヘリックスを形成し、aABCE1 のヌクレオチド結合ドメイン 1 (NBD 1) に結合していた (図 7A)。aP1-C 末端ペプチドと aABCE1 間の 4 Å 以下の相互作用に注目すると、aP1 の 3 つの疎水性残基 (L103、L106、F107) が、aABCE1 の多くのアミノ酸残基と相互作用していた (図 7B-E)。具体的には、aP1-L103 は aABCE1-P164、Y166、L169、I170、A173 と、aP1-L106 は aABCE1-V161、V162、P164、A220、A223、A224、R227 と、aP1-F107 は aABCE1-V170、V174、V219、A223 とそれぞれ疎水性相互作用を形成していた。また、aP1-L106、F107、G108 は aABCE1-R227 と水素結合を形成していた。立体構造情報に基づき、相互作用が見られた aP1 の 4 つのアミノ酸残基 (L103、L106、F107、G108) の重要性をハイブリッドリボソーム系により解析した。このとき、aP0 の C 末端領域の

影響を除外するため aP0- Δ C58 変異体を用いた。その結果、aP1-L103S、aP1-L106S、aP1-F107S、aP1- Δ G108 を用いて再構成したハイブリッドリボソームにおいて、0.73 pmol/min、2.00 pmol/min、0.66 pmol/min、9.04 pmol/min の aABCE1 の ATP 加水分解活性がそれぞれ検出された (図 8、レーン 4-6)。これらの値は、それぞれ野生型の 0.08 倍 (L103S)、0.22 倍 (L106S)、0.07 倍 (F107S)、1.03 倍 (Δ G108) であったことから、結晶構造中で aABCE1 と相互作用していた aP-C18 のアミノ酸残基のうち、3 つの疎水性アミノ酸残基 (L103、L106、F107) が特に重要であることが明らかとなった。

次に、aP1 との結合に重要な aABCE1 のアミノ酸残基の同定を試みた。ここでは、図 8 の ATP 加水分解活性測定において、変異導入により最も活性が低下した aP1 の F107 に注目した。aP1-F107 と結合していた aABCE1 のアミノ酸残基 (I170、V174、V219、A223、R227) の内、疎水性アミノ酸残基を親水性のセリンに置換した I170S、V174S、V219S、A223S 変異体、および親水性のアルギニンを疎水性のアラニンに置換した R227A 変異体を調製し、aP-C18 ペプチドとの結合性を蛍光偏光度測定により解析した (図 9A-F)。その結果、aP-C18 ペプチドに対する野生型 aABCE1 の解離定数が 3.9 μ M であるのに対し、I170S、V174S、V219S、A223S 変異体の解離定数はそれぞれ 68.1 μ M、83.0 μ M、6.3 μ M、46.3 μ M、30.8 μ M であった。これらの値は、それぞれ野生型の 17.5 倍 (I170S)、21.3 倍 (V174S)、1.6 倍 (V219S)、11.9 倍 (A223S)、7.9 倍 (R227A) であった。aP-C18 ペプチドに対する解離定数が野生型の 10 倍以上に増加した変異体 (I170S、V174S、A223S) に着目し、aABCE1 の 3 つのアミノ酸残基 (I170、V174、A223) は aP1 との結合に特に重要であると結論づけた。

aABCE1 の NBD1 と NBD2 は、アミノ酸配列上および立体構造上で類似性がみられる。aABCE1- Δ N74•ADP•aP-C18 複合体結晶構造において、aP-C18 に相当する電子密度

は NBD1 にのみ観察された。NBD1 と NBD2 の間で aP-C18 結合部位を比較すると、以下に示す構造的特徴の違いが見られた。すなわち、NBD1 の aP-C18 結合部位（170–180 アミノ酸領域）がヘリックス構造を形成することに対し、NBD2 の相同部位（404–415 アミノ酸）はループ構造を形成していた（図 10A 右側、点線のサークル）。この構造的特徴の違いが、NBD1 と NBD2 がそれぞれ異なる aP1 結合性を持つことの要因であると考えた。また、NBD1 の I170、V174、R227 アミノ酸に相同する NBD2 の I408、Y412、R470 に変異を導入した I408S/Y412S、R470A 変異体を調製し、aP-C18 ペプチドとの結合性を蛍光偏光度測定により解析した（図 10B および図 10C）。その結果、aP-C18 ペプチドと I408S/Y412S、R470A 変異体の解離定数はそれぞれ 9.4 μ M、5.1 μ M であり、I170S 変異体や V174 変異体に比べ、変異導入の効果による aP-C18 ペプチドとの結合性の低下は見られなかった。以上の結果から、aP1 は aABCE1 の NBD1 に優先的に結合することが示された。

5-6. リボソームストーク・ABCE1 相互作用は出芽酵母の生育に重要である

ここまでの解析は超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来の試料を用いて試験管内で行ったものである。したがって、細胞におけるリボソームストーク・ABCE1 間相互作用の重要性は不明である。しかしながら、*Pyrococcus furiosus* の細胞内遺伝子操作法が確立されていないことや、その生育条件が 90°C 以上の高温、高圧、嫌気条件下であり培養が困難であることから、同生物種を用いた細胞内での機能解析は困難であった。aABCE1 のストーク結合部位のアミノ酸配列アライメント解析を行うと、aP1 との結合に重要な aABCE1 の I170、V174、A223 は、古細菌・真核生物間において疎水性残基として保存されていた（図 11）。そこで以降の解析では、真核生物のモデル生物の 1 種で

ある出芽酵母を用いて、リボソームストーク・ABCE1 相互作用の細胞内における機能的意義を検証した。出芽酵母において、*RLII* 遺伝子（出芽酵母の *eABCE1* 遺伝子）は必須であるため、Young ら、Serdar らの方法を参考に相同組換え法を用いて染色体上の *RLII* 周辺領域を改変し、その発現を培地中の炭素源の種類により制御する出芽酵母 *rli1-deg*ron 株を作製した（Young *et al.*, 2015; Serdar *et al.*, 2016）。*rli1-deg*ron 株では、N 末端側にユビキチン配列-アルギニン-FLAG タグを付加された内在性 Rli1 (UBI-R-FLAG-Rli1) が、*GALI* プロモーター (P_{GALI}) により発現誘導される（図 12A）。UBI-R-FLAG-Rli1 が翻訳されると、N 末端側のユビキチン (UBI) がユビキチン特異的プロテアーゼにより除かれる。タンパク質の N 末端ルールにより、N 末端のアミノ酸がアルギニンである R-FLAG-Rli1 の半減期は約 2 分以下となる（Bachmair *et al.*, 1986）。そのため、*GALI* プロモーターの転写活性を阻害することで、R-FLAG-Rli1 は細胞内から速やかに分解される。実際に、ガラクトース培地で前培養した *rli1-deg*ron 株をグルコース培地に植菌し、ウェスタンブロッティングで内在性 Rli1 の存在量を確認した。その結果、グルコース培地植菌後、約 4 時間で内在性 Rli1 が検出されなくなり、R-FLAG-Rli1 が分解されていることが確認された（図 12B）。

リボソームストーク・ABCE1 相互作用の生物学的意義を探求するため、Rli1 の I176、I180、M234（古細菌 aABCE1 の I170、V174、A223 にそれぞれ対応）をセリンに置換した Rli1-3S 変異体発現プラスミドを *rli1-deg*ron 株に形質転換し、ガラクトースおよびグルコース培地上で生育を観察した。ガラクトース培地では、導入したプラスミドの種類によらず *rli1-deg*ron 株は正常に生育した。一方、グルコース培地では、空ベクターを導入した *rli1-deg*ron 株の生育は完全に阻害され、野生型 Rli1 発現プラスミドを導入したものは正常に生育した。この結果は、*RLII* 遺伝子が必須であることと一致する。このと

き、Rli1-3S 変異体発現プラスミドを導入したものでは野生型に比べ生育の遅れが見られたことから (図 12C および図 12D)、リボソームストーク・ABCE1 相互作用は出芽酵母の生育に重要であることが示された。

5-7. リボソームストークは Rli1 の ATP 加水分解とサブユニット解離反応を促進する

図 12D において出芽酵母の生育が阻害されたことから、3S 変異により Rli1 のリボソームサブユニット解離機能が低下していることが予想される。そこで、Rli1、Dom34 (出芽酵母の aPelota のオルソログ)、eIF6 (後述) を調製し、Rli1 のリボソーム依存 ATP 加水分解活性およびリボソームのサブユニット解離活性に対する 3S 変異の効果を試験管内で解析した。出芽酵母の 80S リボソームは、Shin らの方法に従って調製した (Shin and Dever, 2007 : 図 13A)。

まず、80S リボソーム非存在下または存在下において Rli1 の ATP 加水分解活性を測定した (図 13B)。80S リボソーム非存在下において、Rli1-WT と Rli1-3S 変異体の内在の ATP 加水分解活性はそれぞれ 2.26 pmol/min、2.11 pmol/min であり、3S 変異は Rli1 の内在性 ATP 加水分解活性に影響を与えないことが明らかとなった (図 13B、レーン 1 および 2)。一方で、80S リボソーム存在下における Rli1-WT と Rli1-3S 変異体の ATP 加水分解活性はそれぞれ 22.90 pmol/min、13.59 pmol/min であり、3S 変異によって ATP 加水分解活性が WT と比べ 59%まで低下した (図 13B、レーン 4 および 5)。従って 3S 変異は、Rli1 の三次元構造には影響を与えずにリボソーム依存の ATP 加水分解活性を低下させることが示された。これらの結果は、3S 変異によって Rli1 とリボソームストークとの親和性が低下していることを反映していると考えられる。

次に、Rli1 のリボソームサブユニット解離活性に対する 3S 変異の影響を検証した。

過去の報告に従い、80S リボソーム解離後の 60S サブユニットと 40S サブユニットの再会合を抑制するために翻訳開始因子 eIF6 存在下ですべての実験を行った (Pisarev *et al.*, 2010; Shoemaker *et al.*, 2011; Pisareva *et al.*, 2011)。サブユニットの解離は、ショ糖密度勾配遠心により検出した。まず、過去の報告と同様に、Rli1、Dom34、eIF6 そして ATP 依存的に 80S リボソームが 60S サブユニットと 40S サブユニットに解離することを確認した (図 13C)。サブユニット解離反応は Rli1 の濃度に依存的であり、最大 40%の効率で検出された (図 13D)。Pisareva らにより、eABCE1 と ePelota は、A サイトが mRNA に占有された 80S リボソームを試験管内で解離できないことが示されている (Pisareva *et al.*, 2011)。サブユニット解離効率が最大で 40%であった理由として、精製した酵母 80S リボソーム試料中に、A サイトが mRNA に占有された翻訳伸長途中の 80S リボソームが混在していたためと考えた。次に、構築した 80S サブユニット解離反応系を用いて、Rli1 依存の 80S リボソームの解離反応に対する ATP 加水分解反応と 3S 変異の効果を検証した (図 13E)。解離前の 80S リボソームのピークと解離後の 40S および 60S リボソームのピーク比からサブユニット解離量 (Subunits/Monosome) を算出すると、Rli1 および Dom34 非存在下および存在下におけるサブユニット解離量はそれぞれ 0.12 と 0.71 であった (図 13F、レーン 1 および 3)。ATP の代わりに非加水分解性 ATP アナログである AMP-PNP を加えた場合のサブユニット解離量は 0.15 であったことから、Rli1 依存のサブユニット解離反応には Rli1 の ATP 加水分解が必須であることが示された (図 13F、レーン 2)。重要なことに、Rli1-3S 変異体存在下でのサブユニット解離量は 0.43 であり、これは Rli1-WT と比べ 0.60 倍の値であった (図 13F、レーン 4)。以上の結果より、リボソームストックは Rli1 の ATP 加水分解活性およびリボソームのサブユニット解離活性を促進することが示された。

6. 考察

6-1. 本研究のまとめ

本研究により、真核生物・古細菌型のリボソームストークが ATP 加水分解酵素 ABCE1 と直接結合し、リボソーム上での ABCE1 の ATP 加水分解およびリボソームサブユニット解離活性を促進することが示された。これにより、リボソームストークが翻訳の開始、伸長、終結段階のみならず、リサイクル反応の促進にも寄与することが明らかとなった。この発見により、リボソームストークは翻訳の全般にわたり GTP/ATP 結合性翻訳因子をリボソーム周辺にリクルートすることで、リボソーム上のエネルギーを要する各反応に関与し効率的なタンパク質合成に寄与することが示された。

6-2. リボソームリサイクル反応とリボソームストークの進化的関連性

翻訳終結後にリボソームがサブユニットに解離し次の翻訳の開始を可能とするリボソームリサイクル機構には、RRF と EF-G により駆動する真正細菌型と、RF1 と ABCE1 により駆動する真核生物・古細菌型が存在する (Schmeing *et al.*, 2009; Rodonina *et al.*, 2010; Nürenberg *et al.*, 2013)。一方で、リボソームストークも進化的視点から真正細菌型と真核生物・古細菌型の二系統に分類される (Grela *et al.*, 2008)。真正細菌のリボソームストークタンパク質 bL12 と、真核生物の P1 (または P2) および古細菌の aP1 の一次構造を比較すると、特にその C 末端側に大きな違いがみられる。すなわち、真正細菌 bL12 は C 末端側に安定な球状ドメインを持つことに対し、真核生物 P1 (または P2) および古細菌 aP1 は C 末端側に約 50 残基から成る天然変性領域を持つ (Leijonmarck *et al.*, 1987; Bocharov *et al.*, 2004; Grela *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2013)。この天然変性領域の C 末

端部位には、ロイシン（またはグリシン）-X-X-ロイシン-フェニルアラニンからなる一次構造が高度に保存されている（Xは任意のアミノ酸であり、以後、この一次構造をL/GXXLFモチーフと呼ぶ）。L/GXXLFモチーフは古細菌において（そしておそらく真核生物においても）GTP結合性翻訳因子IF5B、EF1A、EF2との主要な結合部位である（Nomura *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2014; Tanzawa *et al.*, 2018; Murakami *et al.*, 2018）。本研究により、古細菌 *Pyrococcus furiosus* aP1 の L103、L106、F107 が aABCE1 との結合およびその後の ATP 加水分解の促進に重要であることが明らかとなった（図 7B、図 8）。*Pyrococcus furiosus* aP1 の L103、L106、F107 は L₁/GXXL₂F モチーフの L₁、L₂、F にそれぞれ相当することから、真核生物・古細菌型リボソームストークは L/GXXLF モチーフを介して ABCE1 と結合しリボソームリサイクル反応を促進することが示された。これらの結果は、真核生物と古細菌におけるリボソームリサイクル機構が、リボソームストークの一次構造の進化（すなわち L/GXXLF モチーフの獲得）に伴って確立されてきたことを反映していると考えられる。

6-3. 真核生物・古細菌型リボソームストークと翻訳因子の多様な結合様式

本研究で明らかとなった aABCE1 のリボソームストーク結合部位と、Ito らが報告した aEF1A のリボソームストーク結合部位を比較すると、その一次構造および三次構造は大きく異なっていた（図 14）。aABCE1-ΔN74•ADP•aP-C18 複合体において、aP1 の C 末端ペプチドは aABCE1 の NBD1 表面に存在する疎水性ポケットに結合していた（図 7A）。一方で、aEF1A•GDP•aP-C32 複合体において、aP1 の C 末端ペプチドは aEF1A のドメイン 1-ドメイン 3 間に形成される疎水性ポケットに結合していた（Ito *et al.*, 2014）。aABCE1 と aEF1A•GDP のリボソームストーク結合部位は疎水性度が高いという点では

共通の性質を持つが、その立体構造を重ねて比較すると、両結合部位の間に構造的な類似性は見られない (図 14)。また、GTP 結合性翻訳因子である aIF5B および aEF2 においても、aABCE1 や aEF1A のものと構造が異なる独自のリボソームストーク結合部位が存在することが X 線結晶構造解析により明らかとなっている (Murakami *et al.*, 2018; Tanzawa *et al.*, 2018)。したがって、真核生物・古細菌型のリボソームストークは、少なくとも 4 種類以上の、三次構造が異なる GTP/ATP 結合性翻訳因子と、L/GXXLF モチーフを介して結合可能であることが推察される。

NMR 解析によると、ヒト P1 および P2 の天然変性領域は翻訳因子非存在下の溶液中において完全にアンフォールドし、特定の二次構造を形成していない (Lee *et al.*, 2013)。アミノ酸配列の相同性から、この特徴は古細菌 aP1 にも当てはまると推察される。一方で、各種翻訳因子と aP1 ペプチドの複合体結晶構造において aP1 ペプチドは、aEF1A•GDP 結合時には 22 残基から成る α -ヘリックスを、aEF2•GMPPCP 結合時には 4 残基から成る α -ヘリックスを、aIF5B•GDP 結合時には 4 残基から成る 3_{10} -ヘリックスと 2 残基から成る 2 つの β -ターンを、aABCE1 結合時には 11 残基から成る α -ヘリックスをそれぞれ形成していた (図 15)。このことから、真核生物・古細菌型リボソームストークは、天然変性領域中の L/GXXLF モチーフを介して各種 GTP/ATP 結合性翻訳因子と誘導適合的に結合し、多様な相互作用様式をとることが考えられる。このような、L/GXXLF モチーフを介した多様な相互作用基盤は、進化の過程で生物が新たな翻訳因子を獲得する際、新規翻訳因子がリボソームストークに結合するための構造的制約を緩和するという点で有利にはたらく可能性がある。また、この性質を利用し、リボソームストークの L/GXXLF モチーフと結合するタンパク質を網羅的に探索することで、一次構造や三次構造のホモロジー検索からは見つけることのできない新たなリボソーム結

合因子を今後発見できる可能性があると考えられる。このような誘導適合型相互作用の研究は分子間相互作用の新たな研究領域であり、特に真核生物の複雑な翻訳制御機構の解明に向けて重要な分野と思われる。今後の展開が期待される。

6-4. リボソーム上における ABCE1 の ATP 加水分解の誘導機構とその意義、およびリボソームストークの直接的な関与の可能性

現在、リボソーム上における ABCE1 の ATP 加水分解の誘導機構は解明されていない。一方で、EF1A や EF2 などの GTP 結合性翻訳因子については、リボソーム結合後の GTP 加水分解誘導機構が詳細に研究されている。GTP 結合性翻訳因子の GTP 加水分解には、23S/28S rRNA に高度に保存された sarcin/ricin loop (SRL) が重要な役割を果たす。SRL の A2660-A2662 (大腸菌塩基番号) は、リボソームに結合した GTP 結合性翻訳因子の GTP 結合ドメイン中に存在する Switch 2 モチーフと接触し、GTP 加水分解を誘導する (Moazed *et al.*, 1988; Clementi *et al.*, 2010; Voorhees *et al.*, 2010)。GTP 結合性翻訳因子間において Switch 2 モチーフは高度に保存されていることから、おそらくすべての GTP 結合性翻訳因子において、SRL が GTP 加水分解の誘導を担うと考えられる。そこで、リボソーム結合後の ABCE1 の ATP 加水分解機構を考えるにあたり、まず SRL の関与を考察する。クライオ電子顕微鏡を用いた Becker らの報告では、出芽酵母 80S リボソーム・Rli1・Dom34 複合体、および古細菌 70S リボソーム・aABCE1・aPelota 複合体において、SRL と Rli1 または aABCE1 の直接的な接触は観察されていない (Becker *et al.*, 2012)。またこの点に関して、GTP 結合性翻訳因子 aEF1A、aEF2 と SRL の接触を直接検出可能であるハイブリッドリボソーム系-DMS フットプリント法を用いて、aABCE1 と SRL の接触の有無を検証した (図 16)。その結果、aABCE1-SRL 間の接触を

示す aABCE1 依存の SRL の DMS 修飾保護は検出されなかった (図 16、レーン 9)。これらのことから、リボソーム上での ABCE1 の ATP 加水分解は、SRL に依存しない別のメカニズムにより誘導されると考えられる。

ABCE1 の NBD1 および NBD2 のそれぞれには、Walker A モチーフと Walker B モチーフから成るヘッドサブドメインと、ABC タンパク質スーパーファミリーに特有の LSGGQ モチーフが存在する。2 つの NBD はそれぞれのヘッドサブドメインと他方の LSGGQ モチーフが向かい合った形で配位し、その接合面には 2 箇所のヌクレオチド結合サイト (NBS1 および NBS2) が形成される (図 17A)。LSGGE モチーフは、NBS に結合した ATP の γ -リン酸を認識し結合することで、NBD1 と NBD2 を閉じた構造に誘導する。Walker B モチーフには、NBD1 と NBD2 が閉じた後に ATP を加水分解するための catalytic base を供与するグルタミン酸が保存されている。したがって、ABCE1 の 2 つの NBD は、他の ABC タンパク質スーパーファミリーと同様に、ATP の結合とその加水分解に伴った開閉運動を起こすことが推察できる (Chen *et al.*, 2003; Hopfner, 2016)。

Barthelme らは、NBD2 の Walker B モチーフに変異を導入した古細菌 *Sulfolobus solfataricus* 由来 aABCE1-E485Q 変異体を用いて、NBS2 に ATP が結合した状態では NBS1 の ATP 加水分解活性が約 8 倍に増加することを明らかにしている (Barthelme *et al.*, 2011)。また、Nürnberg-Goloub らは同様の変異体を用いて、NBS1 の ATP 加水分解がリボソームのサブユニット解離反応に特に重要であることを最近報告している (Nürnberg-Goloub *et al.*, 2018)。したがって、ABCE1 の NBS1 および NBS2 におけるそれぞれの ATP 結合機構および加水分解機構とその機能的意義は等価ではないことが考えられる。Nürnberg-Goloub らは、ABCE1 の作業仮説として、まず NBS2 に優先的に ATP が結合し、それにより NBS1 の ATP 結合とその加水分解が促進されることでリボ

ソームサブユニットの解離が誘導される作業仮説を提唱している (図 17B、Nürenberg-Goloub *et al.*, 2018)。この仮説は、これまでの先行研究の結果と一致しており妥当であると考えられる一方で、ABCE1 の NBS2 に優先的に ATP が結合する分子機構については触れられていない。最後に、私は、ABCE1 の NBS2 と ATP の結合にリボソームストークが関与する可能性について考察する。aABCE1- Δ N74•ADP•aP-C18 複合体とヒト 80S リボソーム•Pelota•ABCE1 複合体をもとにドッキングモデルを構築すると、aABCE1 のリボソームストーク結合部位は溶液側に露出していた (図 18)。このことからリボソームストークは、リボソーム上においても立体障害を起こさずに ABCE1 と結合可能であると考えられる。このとき、aP1 結合部位と LSGGE モチーフが近接していることから、以下の仮説を考えた。すなわち、リボソームストークはリボソーム上において ABCE1 に結合し続け、LSGGE モチーフの構造変化を誘導することで NBS2 の ATP 結合を促進し、NBS1 の ATP 加水分解が促進されるのではないだろうか。この仮説の検証には、今後さらなる解析が必要である。

7. 図表

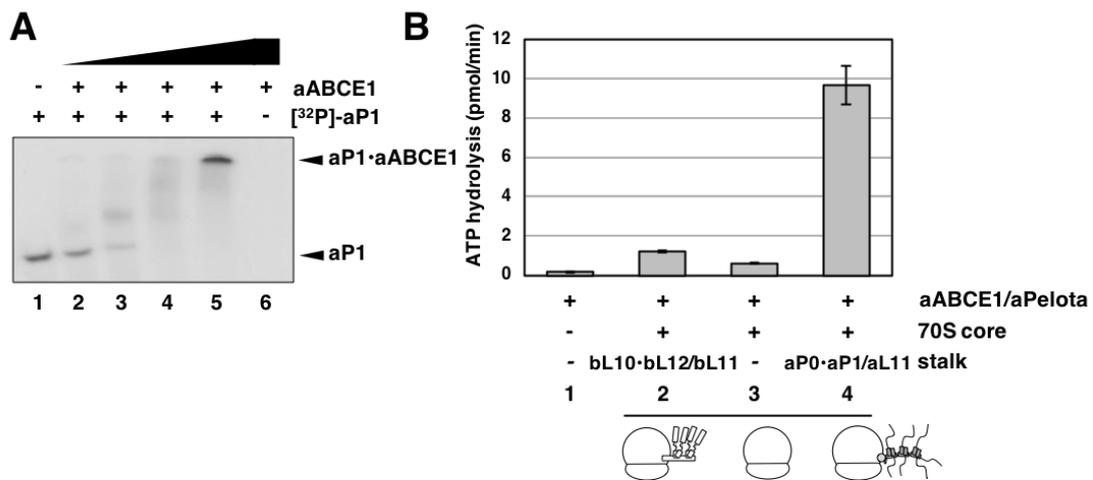


図 1. リボソームストーク・ABCE1 間相互作用の検出と ATP 加水分解への寄与

(A) ³²P 標識 aP1 を単独 (レーン 1) または 10、20、40、80 µg の aABCE1 と混合し (レーン 2-5)、Native-PAGE 後、オートラジオグラフィーで検出した。(B) リボソーム非存在下 (レーン 1) またはリボソーム存在下 (レーン 2-4) における aABCE1 と aPelota の ATP 加水分解活性。リボソーム試料は、70S コアリボソームに大腸菌 bL10·bL12/bL11 を再構成したもの (レーン 2)、70S コアリボソーム (レーン 3)、70S コアリボソームに古細菌 aP0·aP1/aL11 を再構成したもの (レーン 4) を使用した。

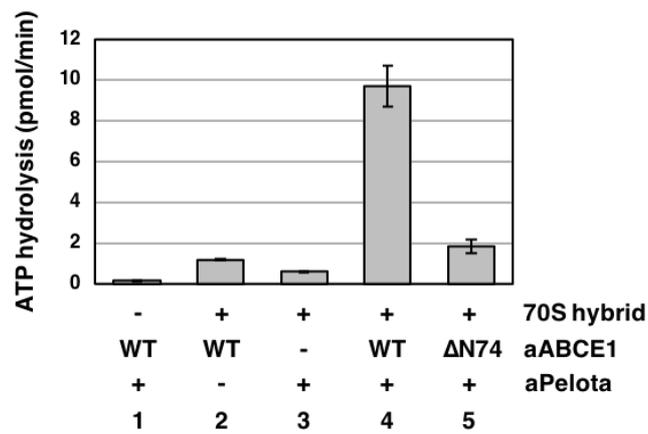


図 2. aABCE1 の ATP 加水分解には aPelota と aABCE1 の FeS ドメインが重要

aABCE1 の ATP 加水分解活性に対する aPelota と aABCE1-FeS ドメインの影響。古細菌 aP0•aP1/aL11 を再構成したハイブリッド 70S リボソームに対し、aABCE1 (レーン 2)、aPelota (レーン 3)、aABCE1 と aPelota (レーン 4)、aABCE1- $\Delta N74$ と aPelota (レーン 5) をそれぞれ加え、ATP 加水分解活性を測定した。

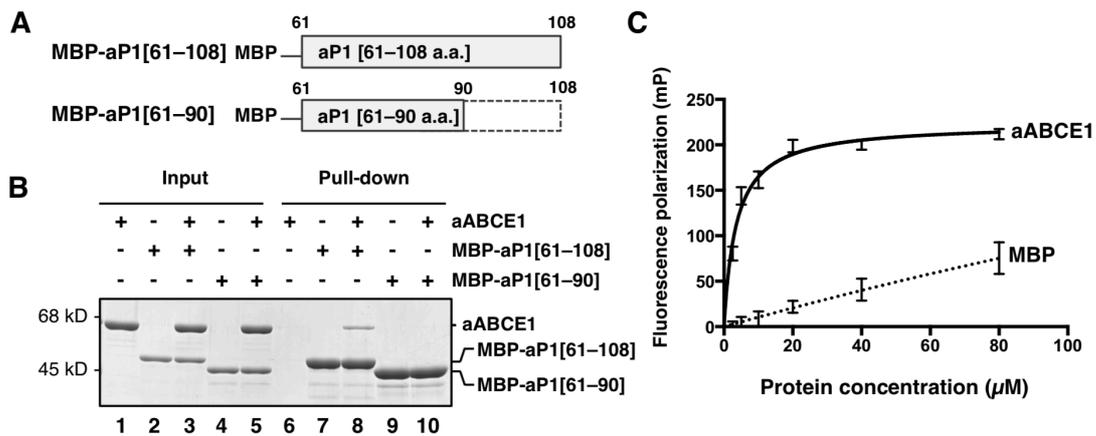


図 3. aP1-C 末端領域は aABCE1 と直接結合する

(A) MBP-aP1[61-108]および MBP-aP1[61-90]の模式図。(B) aABCE1 と MBP-aP1 のプルダウン解析。aABCE1 および MBP-aP1 をアミロースレジンと混合し、溶出前（レーン 1-5）と溶出後（レーン 6-10）の試料を SDS-PAGE で分析した。タンパク質は CBB 染色で検出した。(C) 蛍光偏光度測定。FITC 標識 aP-C18 ペプチドを aABCE1（実線）または MBP（点線）と混合し、蛍光偏光度（mP）を測定した。

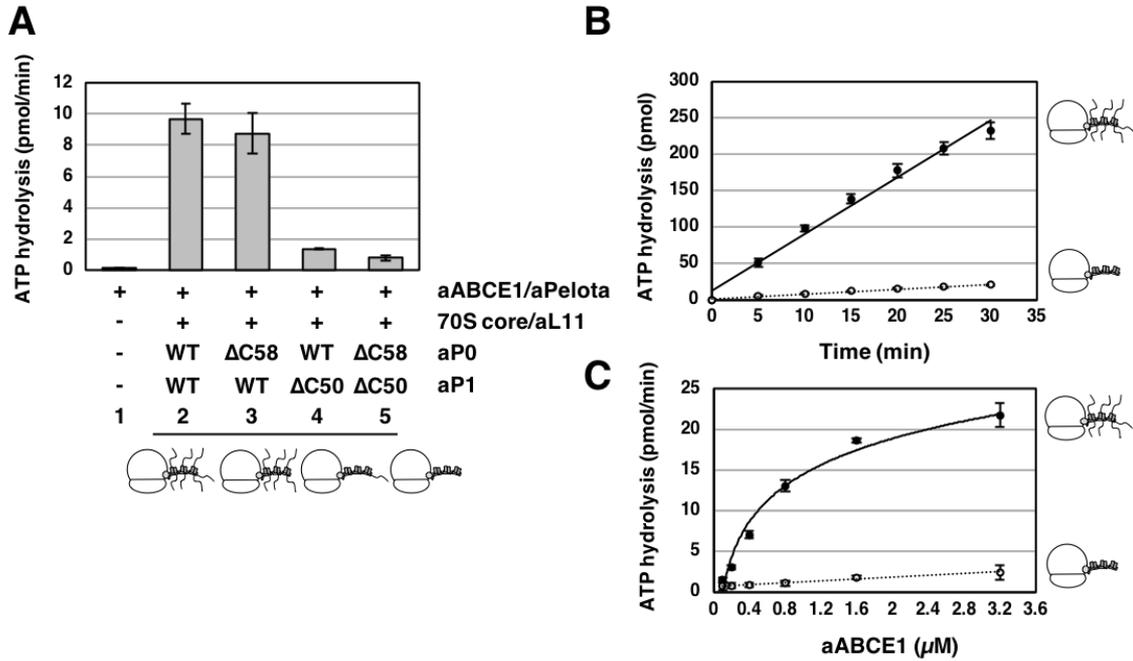


図 4. aP1-C 末端領域は aABCE1 のリボソーム依存の ATP 加水分解に必須

(A) 古細菌ハイブリッド 70S リボソームと aABCE1 の ATP 加水分解活性。リボソーム非存在下 (レーン 1) またはリボソーム存在下 (レーン 2-5) において aABCE1 と aPelota の ATP 加水分解活性を測定した。リボソーム試料は、70S コアリボソームに aP0・aP1/aL11 (レーン 2)、aP0-ΔC58・aP1/aL11 (レーン 3)、aP0・aP1-ΔC50/aL11 (レーン 4)、aP0-ΔC58・aP1-ΔC50/aL11 (レーン 5) をそれぞれ再構成したものを使用した。(B, C) aABCE1 依存 ATP 加水分解の時間依存性 (B) および aABCE1 濃度依存性 (C) の検証。aP0・aP1/aL11 (実線) または aP0-ΔC58・aP1-ΔC50/aL11 (点線) を再構成した古細菌ハイブリッド 70S リボソームを用いて、aABCE1 の ATP 加水分解活性を測定した。

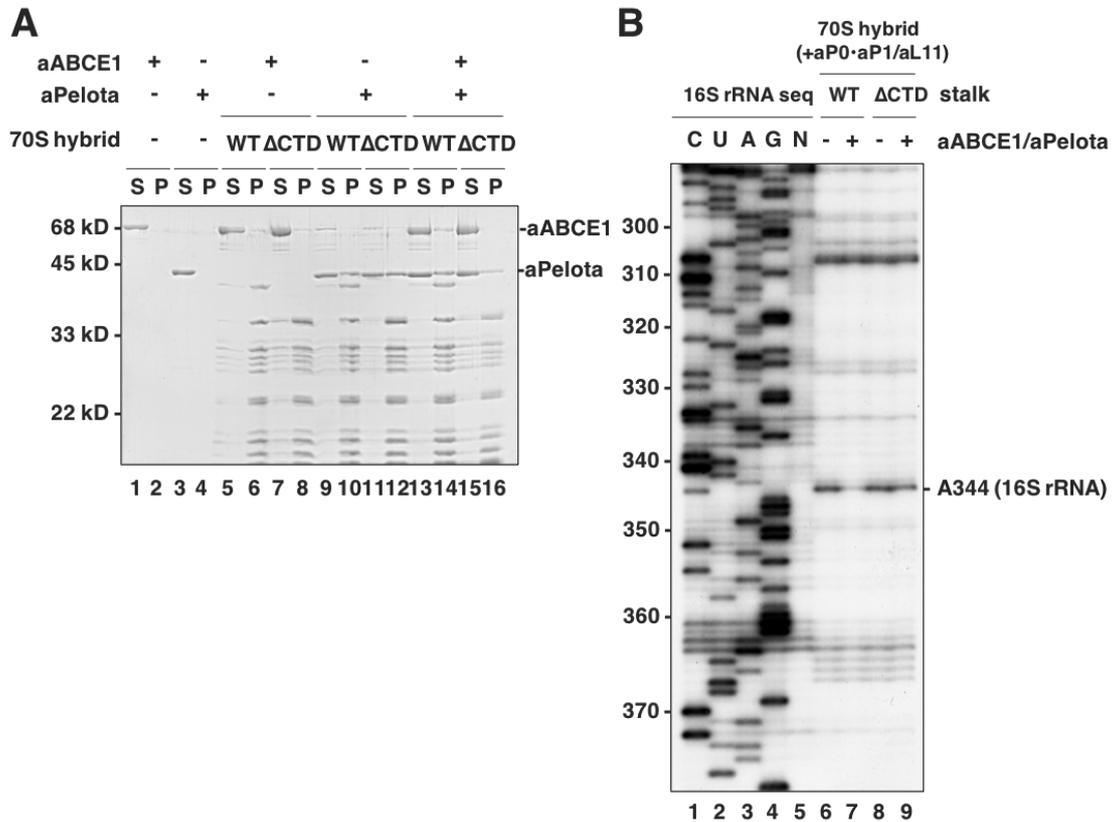


図 5. aP1-C 末端領域は aABCE1 とリボソーム RNA 間の結合に重要

(A) aABCE1 および aPelota をリボソーム非存在下 (レーン 1-4) または存在下 (レーン 5-16) で保温後、スクロースクッション上に充填し 189,000 g で超遠心した。リボソーム試料として、aP0·aP1/aL11 (WT) または aP0- Δ C58·aP1- Δ C50/aL11 (Δ CTD) を再構成したハイブリッド 70S リボソームを用いた。上清画分 (S) と沈殿画分 (P) を回収し、SDS-PAGE で分析した。(B) aABCE1 および aPelota を aP0·aP1/aL11 (WT) または aP0- Δ C58·aP1- Δ C50/aL11 (Δ CTD) を再構成したハイブリッド 70S リボソームと保温後、DMS 修飾した。DMS 修飾はプライマー伸長法で検出した (レーン 6-9)。コントロールとして、DMS 未処理のリボソームに対してもプライマー伸長を行った (レーン 1-5)。rRNA の配列を確認するため、C、U、A、G はジデオキシヌクレオチドでそれぞれ伸長を停止させた (レーン 1-4)。

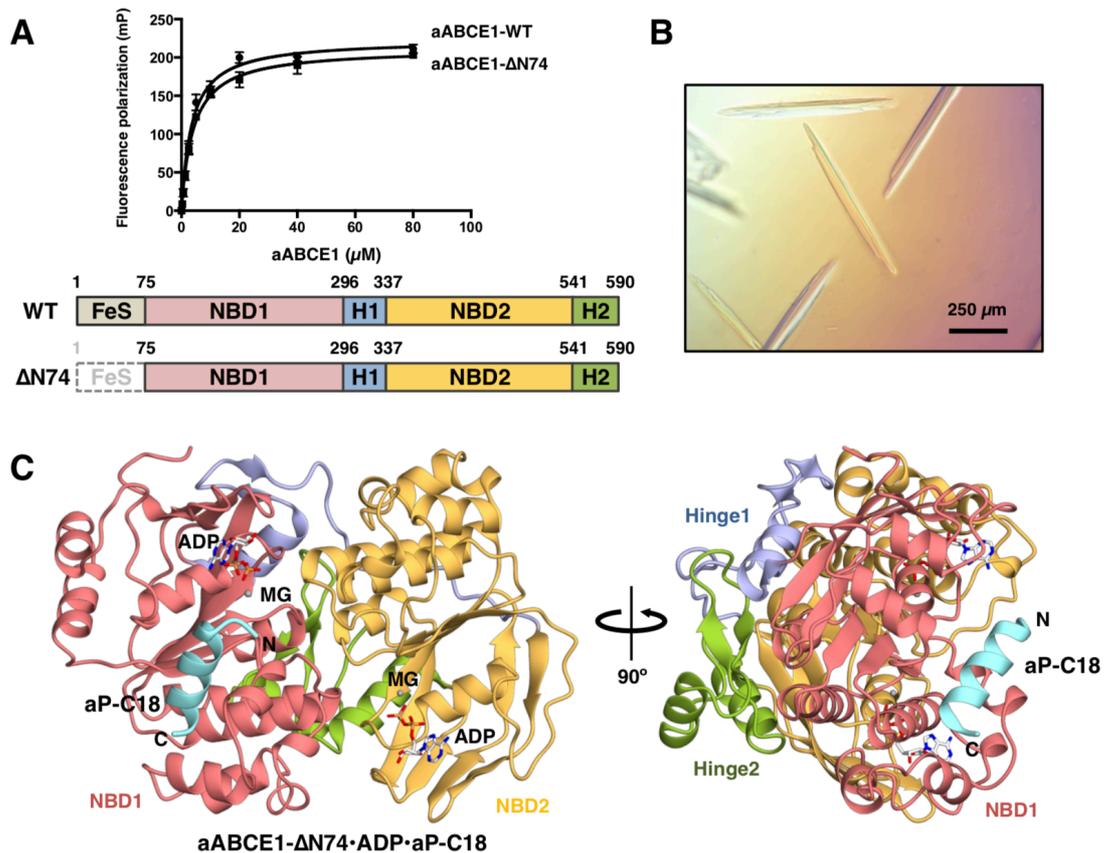


図 6. aABCE1-ΔN74·ADP·aP-C18 ペプチド複合体の結晶構造

(A) FITC 標識 aP-C18 ペプチドを aABCE1 (●) または aABCE1-ΔN74 (■) と混合し、蛍光偏光度 (mP) を測定した。(B) aABCE1-ΔN74·ADP·aP-C18 複合体の結晶。(C) aABCE1-ΔN74·ADP·aP-C18 複合体の結晶構造 (最大分解能 2.1 Å)。aABCE1-ΔN74 (NBD1 : 赤、ヒンジ 1 : 青、NBD2 : 黄、ヒンジ 2 : 緑) と aP-C18 (水色) はリボンモデルで表示。ADP はスティックモデルで表示。マグネシウムイオン (グレー) はドット表示。

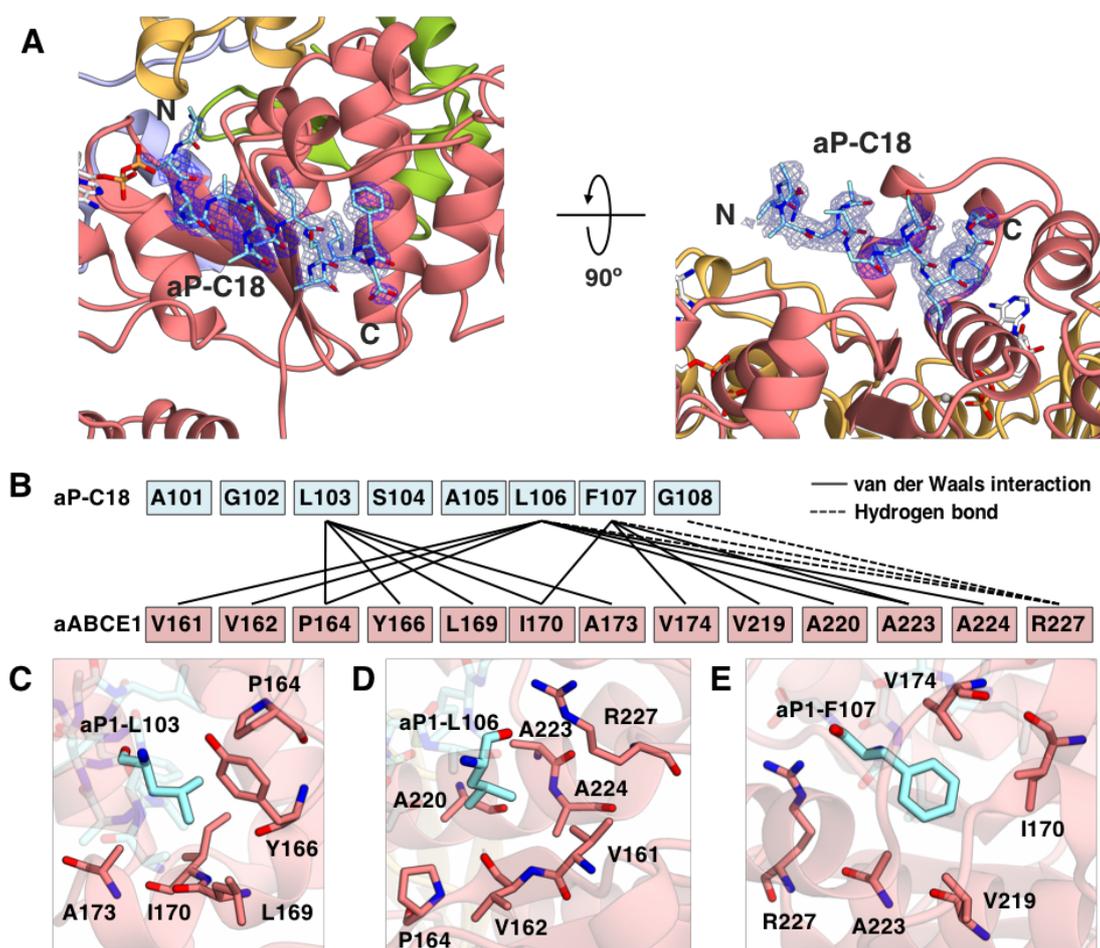


図 7. aP-C18 ペプチドと aABCE1 の結合様式

(A) aP-C18 ペプチドの $2Fo-Fc$ 電子密度マップ (カウンター: 1σ) はメッシュ表示 (青色)。aP-C18、ADP はスティックモデルで表示。aABCE1- Δ N74 はリボンモデルで表示。(B) aABCE1 と aP-C18 の相互作用マップ。4 Å 以下のファンデルワールス相互作用 (実線) と水素結合 (点線) を表示。(C-E) aP1-L103 (C)、aP1-L106 (D)、aP1-F107 (E) と aABCE1 の結合部位。各アミノ酸残基はスティックモデルで表示。

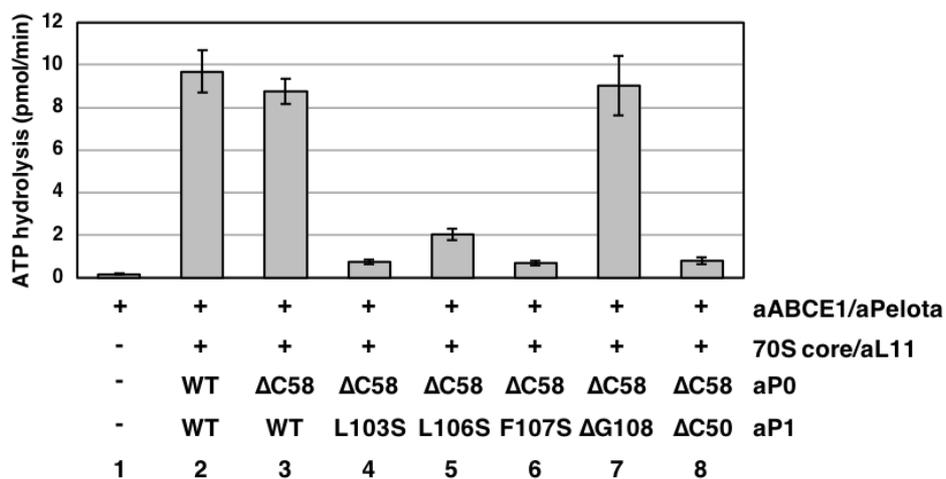


図 8. aP1-C 末端の疎水性残基は aABCE1 のリボソーム依存の ATP 加水分解に重要

リボソーム非存在下（レーン 1）またはリボソーム存在下（レーン 2-8）における aABCE1、aPelota 依存の ATP 加水分解活性。リボソーム試料は、70S コアリボソームに aP0•aP1/aL11（レーン 2）、aP0-ΔC58•aP1/aL11（レーン 3）、aP0-ΔC58•aP1-L103S/aL11（レーン 4）、aP0-ΔC58•aP1-L106S/aL11（レーン 5）、aP0-ΔC58•aP1-F107S/aL11（レーン 6）、aP0-ΔC58•aP1-ΔG108/aL11（レーン 7）、aP0-ΔC58•aP1-ΔC50/aL11（レーン 8）をそれぞれ再構成したものを使用した。

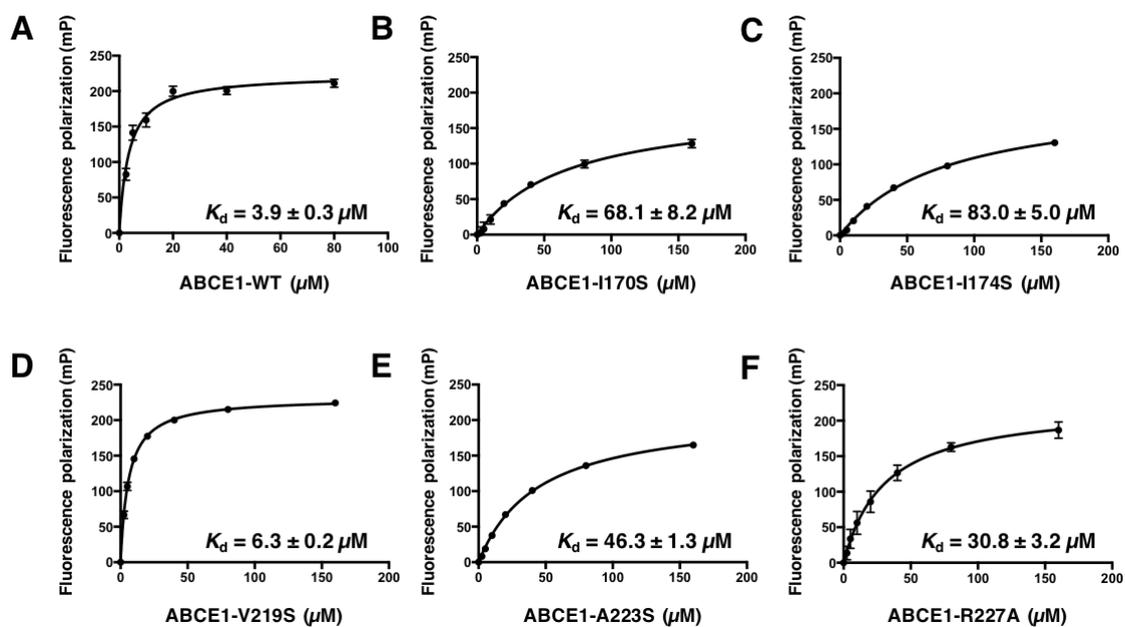


図 9. 各種 aABCE1 変異体と aP-C18 ペプチドの相互作用解析

aABCE1-NBD1 への変異導入が aP1 との結合に及ぼす影響。FITC 標識 aP-C18 ペプチドを aABCE1-WT (A)、I170S (B)、I174S (C)、V219S (D)、A223S (E)、R227A (F) とそれぞれ混合し、蛍光偏光度 (mP) を測定した。

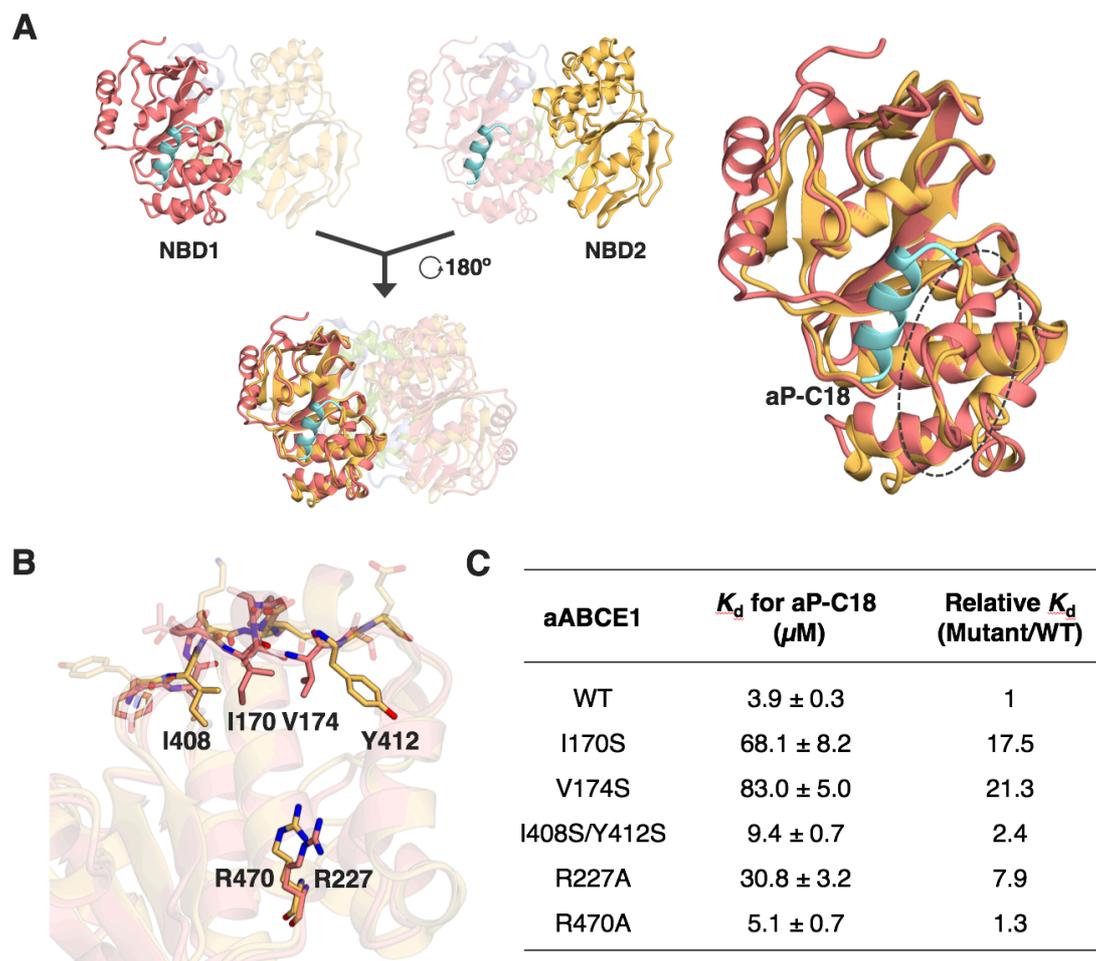


図 10. aABCE1-NBD1 と NBD2 の三次構造比較

(A) NBD1 (赤) と NBD2 (黄) を重ね合わせ、aP1 (水色) 結合部位の構造を比較した。ストーク結合領域の二次構造に違いが見られた部位は点線で示した。(B) NBD1 の I170、I174、R227 および、それらのアミノ酸残基にそれぞれ相当する NBD2 の I408、Y412、R470 をスティックモデルで表示した。(C) NBD2 への変異導入が aP1 との結合に及ぼす影響。FITC 標識 aP-C18 ペプチドを aABCE1-WT、I170S、I174S、I408S/Y412S、R227A、R470A とそれぞれ混合し、蛍光偏光度 (mP) を測定した。Relative K_d は変異体 (I170S、I174S、I408S/Y412S、R227A、R470A) の K_d 値を野生型 (WT) の K_d 値で割ることで算出した。

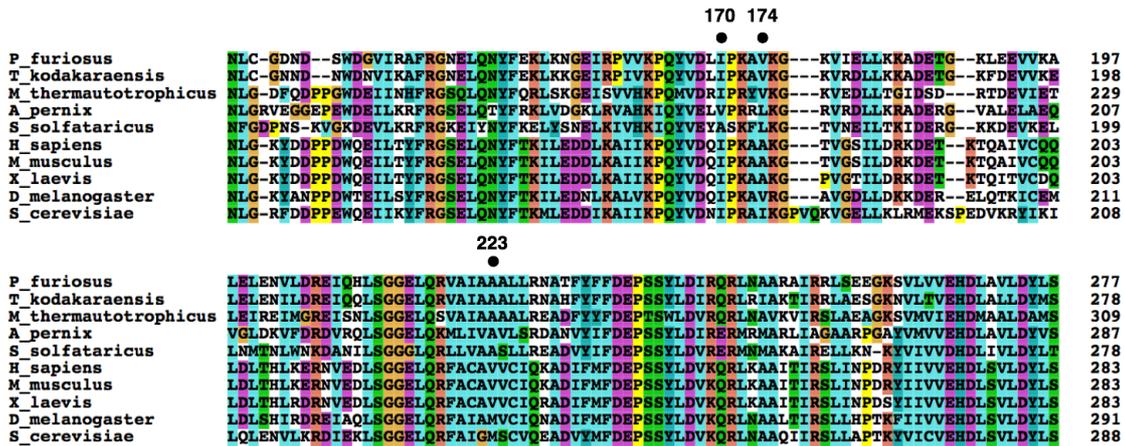


図 11. ABCE1 のリボソームストーク結合部位 (NBD1) の一次構造比較

古細菌 (*Pyrococcus furiosus*: P_furiosus, *Thermococcus kodakaraensis*: T_kodakaraensis, *Methanothermobacter thermotrophicus*: M_thermotrophicus, *Aeropyrum pernix*: A_pernix, *Sulfolobus solfataricus*: S_solfataricus) および真核生物 (*Homo sapiens*: H_sapiens, *Mus musculus*: M_musculus, *Xenopus laevis*: X_laevis, *Drosophila melanogaster*: D_melanogaster, *Saccharomyces cerevisiae*: S_cerevisiae) の ABCE1-NBD1 のアミノ酸配列を Clustal W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を用いて比較した。図の作製には Clustal X (Larkin *et al.*, 2007) を用いた。*Pyrococcus furiosus* の aABCE1 において aP1-F107 と相互作用していたアミノ酸残基 (I170、V174、A223) は黒点 (●) で示した。

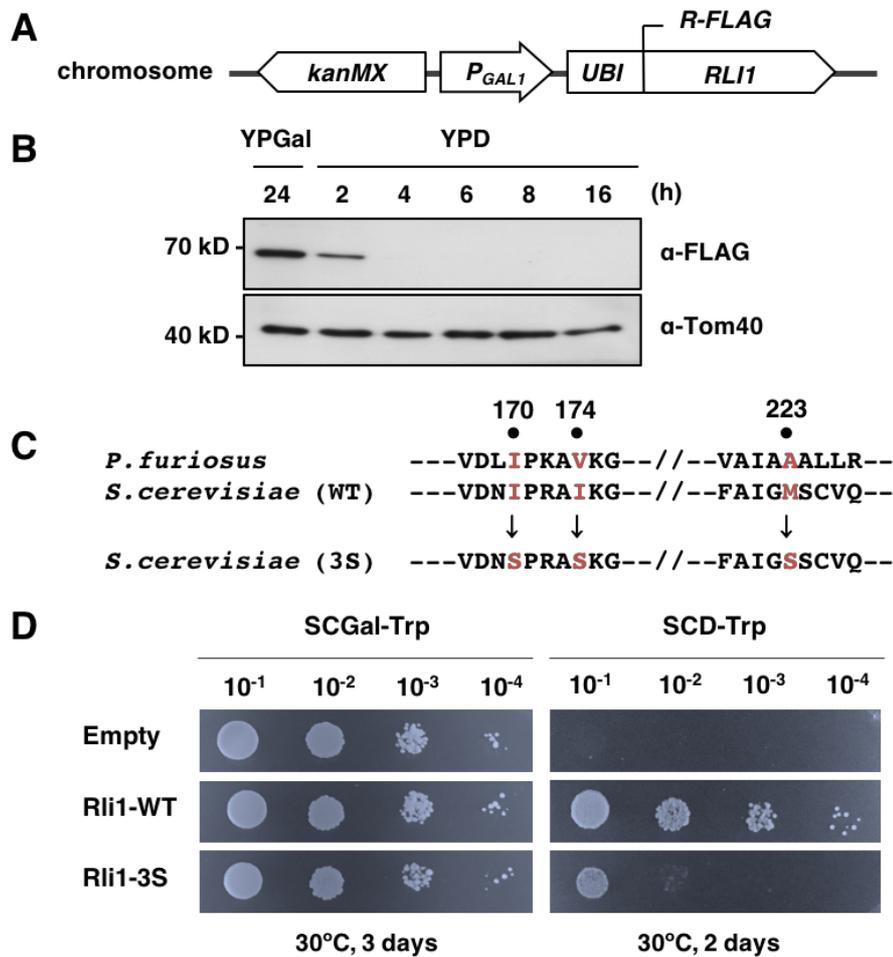


図 12. リボソームストーク・Rli1 間相互作用は出芽酵母の生育に重要

(A) 出芽酵母 *rli1*-degtron 株のゲノムコンストラクション。N 末端側にユビキチン配列-アルギニン-FLAG タグ (*UBI-R-FLAG*) が付加された内在性 *RLI1* が、*GAL1* プロモーター (*P_{GAL1}*) により発現制御を受ける。

(B) ガラクトース培地およびグルコース培地での内在性 Rli1 の存在量。ガラクトース培地で 24 時間培養した *rli1*-degtron 株をグルコース培地に植菌後、2、4、6、8、16 時間ごとに回収しウェスタンブロッティングを行った。検出には α-FLAG モノクローナル抗体および α-Tom40 モノクローナル抗体を用いた。

(C) *Pyrococcus furiosus* aABCE1 と出芽酵母 Rli1 のストーク結合部位のアミノ酸配列比較 (上側)。aP1-F107 と相互作用する aABCE1 のアミノ酸残基 (I170、V174、A223) は黒丸 (●) で示した。Rli1-3S 変異体の変異導入部位は下側のアミノ酸配列に示した。

(D) 3S 変異が出芽酵母の生育に与える影響。YCplac22 プラスミド (レーン 1)、YCplac22-Rli1-WT (レーン 2)、YCplac22-Rli1 (レーン 3) を形質転換した *rli1*-degtron 株を SCGal-Trp 液体培地で培養し、5 μl の培養液 (OD₆₀₀=0.5) およびその 10 倍希釈系列 (OD₆₀₀=0.05, 0.005, 0.0005) を SCGal-Trp プレートおよび SCD-Trp プレートに滴下後、30°C で 3 日または 2 日それぞれ培養した。

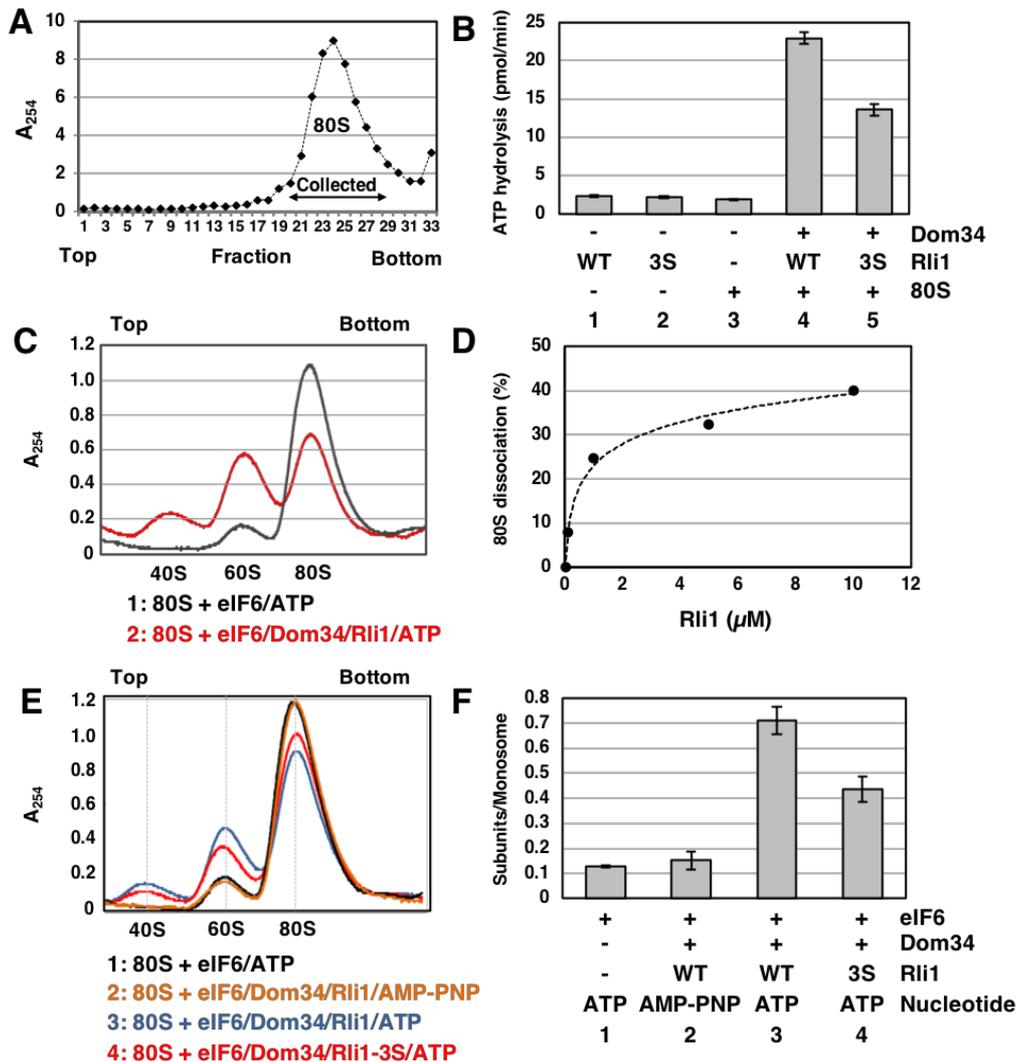


図 13. リボソームストックは Rli1 の ATP 加水分解とサブユニット解離反応を促進する

(A) 出芽酵母の粗粒 80S リボソームの回収。細胞抽出液をシヨ糖密度勾配遠心後、254 nm の吸光プロファイルを測定し、フラクション 21-28 を回収した。(B) Rli1 (レーン 1)、Rli1 (レーン 2)、80S リボソーム (レーン 3)、Rli1-WT/Dom34/80S リボソーム (レーン 4)、Rli1/Dom34/80S リボソーム (レーン 5) 存在下での ATP 加水分解活性。(C) Rli1 (500 pmol)、Dom34 (500 pmol)、eIF6 (50 pmol) 非存在下 (黒) および存在下 (赤) における 80S リボソーム (10 pmol) のサブユニット解離反応。シヨ糖密度勾配遠心後、254 nm の吸光プロファイルを測定した。(D) サブユニット解離反応の Rli1 の濃度依存性 (0.02, 0.1, 1, 5, 10 μ M) の検討。解離効率 (%) は 80S リボソームの 254 nm の吸光プロファイル面積をもとに算出した。(E, F) サブユニット解離反応に対する ATP 加水分解とリボソームストックの影響。80S リボソームと eIF6 に ATP (ピーク 1)、Rli1/Dom34/AMP-PNP (ピーク 2)、Rli1/Dom34/ATP (ピーク 3)、Rli1-3S/Dom34/AMP-PNP (ピーク 2) を加えサブユニット解離を観察した。40S と 60S のピークを 80S のピークで割ることでサブユニット解離効率を算出した。

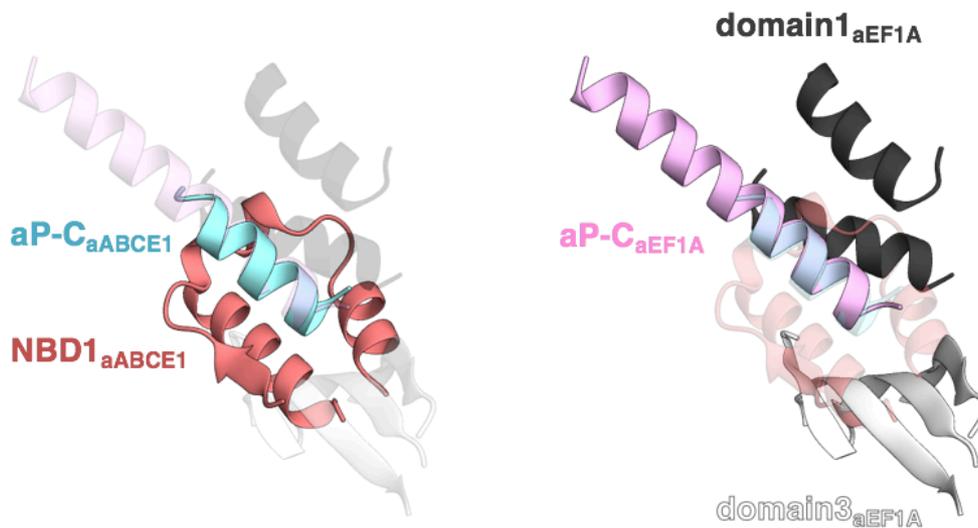


図 14. aABCE1 と aEF1A の aP1 結合部位の構造比較

aABCE1 (左) と aEF1A (右) の aP1 結合部位。aP1 の三次構造を元に、aABCE1- Δ N74•ADP•aP1 複合体および aEF1A•GDP•aP1 複合体 [PDB code: 3WY9] (Ito *et al.*, 2014) の立体構造モデルをそれぞれ重ね合わせた。aABCE1 (NBD1 : 赤) と aEF1A (domain1 : 黒, domain2 : グレー, domain3 : 白)、aP-C ペプチド (aABCE1 : 水色, aEF1A : ピンク) をリボンモデルで表示。ADP と GDP はスティックモデルで表示。aABCE1- Δ N74•ADP•aP1 複合体において、aP-C ペプチド (水色) は aABCE1 の NBD1 (赤) の疎水性ポケットに結合している。一方、aEF1A•GDP•aP1 複合体において、aP-C ペプチド (ピンク) は aEF1A の domain1 (黒) と domain3 (白) から成る疎水性ポケットに結合している。aABCE1 と aEF1A の疎水性ポケットには、構造的類似性は見られない。

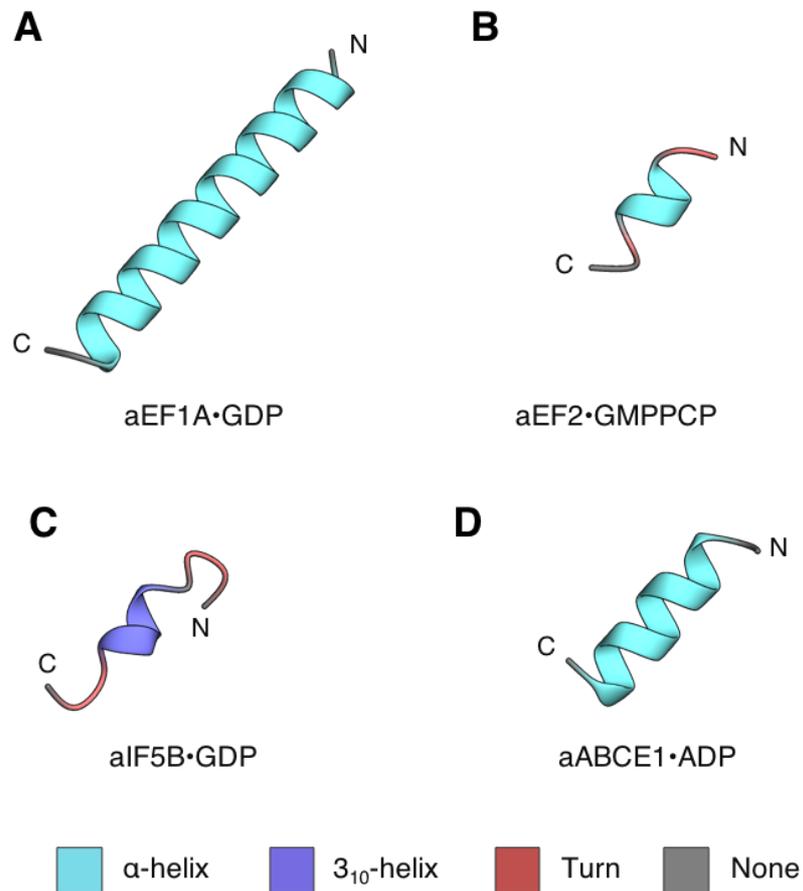


図 15. 各種 GTP/ATP 結合性翻訳因子結合時の aP1-C 末端の構造変化

aEF1A•GDP (A) [PDB code: 3WY9] (Ito *et al.*, 2014)、aEF2•GMP-PCP (B) [PDB code: 5H7L] (Tanzawa *et al.*, 2018)、aIF5B•GDP (C) [PDB code: 5YT0] (Murakami *et al.*, 2018)、(D) aABCE1•ADP にそれぞれ結合した際の aP1-C 末端ペプチドをリボンモデルで表示 (N: N 末端側、C: C 末端側)。二次構造を元に着色した (α -ヘリックス: 水色、 3_{10} -ヘリックス: 青、 β -ターン: 赤、二次構造なし: 黒)。二次構造の割り当てには DSSP アルゴリズムを用いた (Kabsch *et al.*, 1983)。

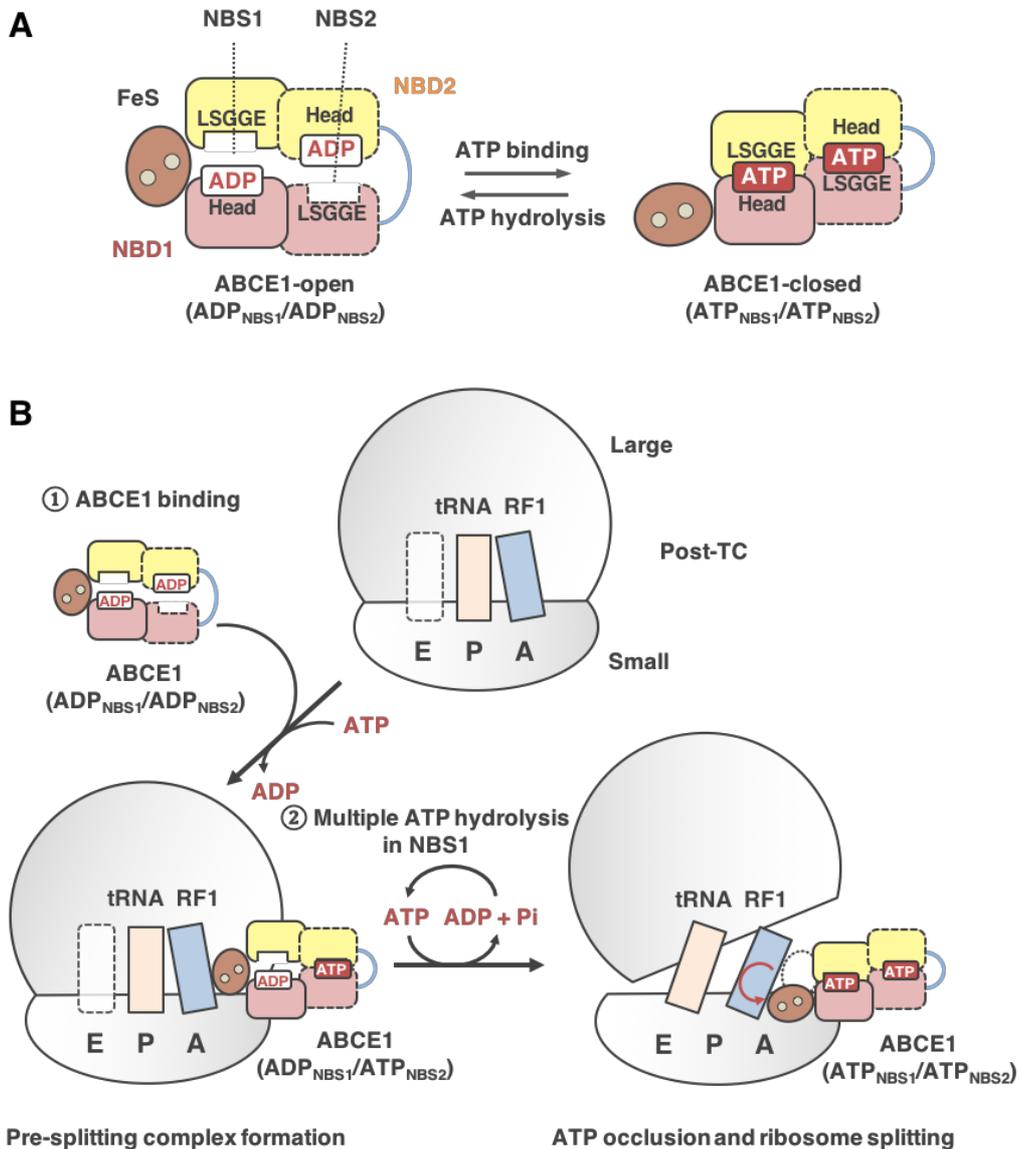


図 17. サブユニット解離反応における ABCE1 と ATP の結合とその加水分解のモデル図

(A) ATP 結合による ABCE1 の構造変化のモデル (FeS: 鉄硫黄ドメイン、NBD1/2: ヌクレオチド結合ドメイン、NBS1/2: ヌクレオチド結合サイト)。ヘッドサブドメイン (Head) は Walker A モチーフと WalkerB モチーフから形成される。(B) サブユニット解離反応における各 NBS への ATP の結合とその加水分解のモデル (post-TC: 翻訳終了後のリボソーム、A:A サイト、P:P サイト、E:E サイト)。Nürenberg-Goloub らの論文を元に作成 (Nürenberg-Goloub *et al.*, 2018)。

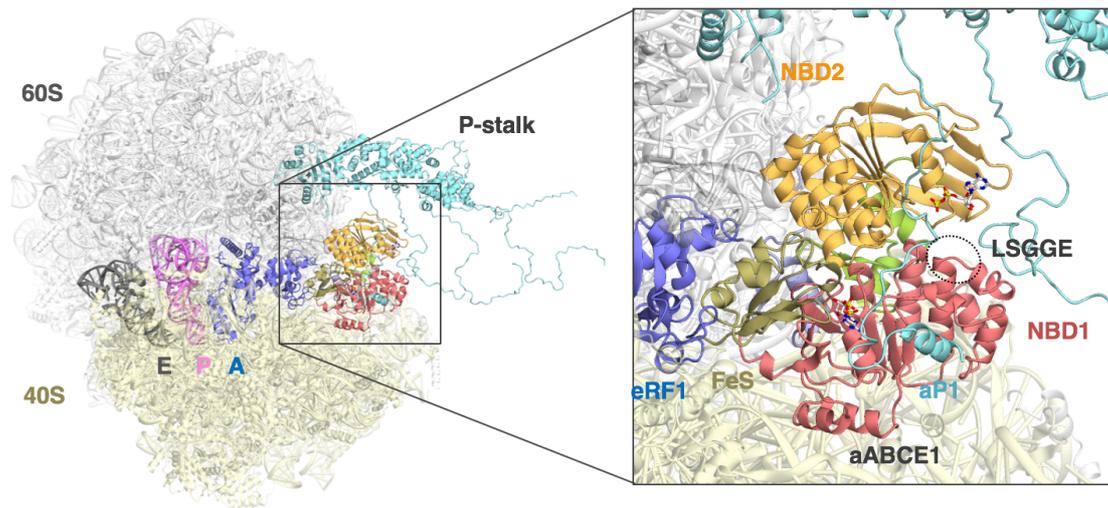


図 18. aABCE1·aP-C18 複合体と pre-splitting 80S リボソームの構造ドッキングモデル

aABCE1 (FeS ドメイン：褐色、NBD1：赤、ヒンジ1：青、NBD2：黄、ヒンジ2：緑)、リボソームストーク複合体 (水色)、RF1 (青)、P-site tRNA (マゼンダ)、E-site tRNA (黒)、60S リボソーム (白)、40S リボソーム (淡黄) をリボンモデルで表示。ADP はスティックモデルで表示。 *Pyrococcus abyssi* aABCE1 の結晶構造 [PDB code: 3BK7] (Karcher *et al.*, 2008) を元に作製した完全長 aABCE1·aP-C18 の構造モデルを、哺乳動物由来の 80S pre-splitting 複合体 [PDB code: 5LZV] (Brown *et al.*, 2015) に重ね合わせた。リボソームストーク複合体は、 *Pyrococcus horikoshii* aP0·aP1 複合体の結晶構造 [PDB code: 3A1Y] (Naganuma *et al.*, 2010) を元に作製した。aP0 および aP1 のヒンジ領域は任意のモデルを作製した。aABCE1-NBD1 の LAGGE モチーフを点線の円で示した。

表 1. 使用したオリゴ DNA

Name	Sequence	Notes	Reference
oHI185	GAGAGAGAATTCGTTGCAGTTGCTGC AGCCCCAG	Forward cloning primer for <i>Pfu</i> aP1(61–108)	This study
oHI186	GAGAGAAAGCTTTTATCCAAAGAGTGC GCTGAGTCC	Reverse cloning primer for <i>Pfu</i> aP1(61–108)	This study
oHI79	GAAGGAAGAAGAGGAGAAGTAAGAAG AAGAGGTCTCCGAAGAG	Forward mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aP1(61–90)	This study
oHI80	CTCTTCGGAGACCTCTTCTTCTTACTT CTCCTCTTCTTCCTTC	Reverse mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aP1(61–90)	This study
oHI174	AGAGACATATGAGGATTGCGGTCATCG ATTACGACAAATG	Forward cloning primer for <i>Pfu</i> aABCE1	This study
oHI175	GAGAGGATCCTTAGGCAATATAGTAGT ATTCACCTTTCTC	Reverse cloning primer for <i>Pfu</i> aABCE1	This study
oHI183	AGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCC ATATGCTCGAAGAGGACTGTGTGCATA GG	Forward mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aABCE1-ΔN74	This study
oHI184	CCTATGCACACAGTCCTCTTCGAGCAT ATGGCTGCCGCGCGGCACCAGGCCG CT	Reverse mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aABCE1-ΔN74	This study
oTA49	GCCACAATACGTGGACTTGAGCCCAA GGCCGTAAAAGGGAAG	Forward mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aABCE1-I170S	This study
oTA50	CTTCCCTTTTACGGCCTTTGGGCTCAA GTCCACGTATTGTGGC	Reverse mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aABCE1-I170S	This study
oTA53	GTGGACTTGATTCCAAAGGCCAGCAA AGGGAAGGTCATAGAGCTG	Forward mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aABCE1-V174S	This study
oTA54	CAGCTCTATGACCTTCCCTTTGCTGGC	Reverse mutagenesis primer	This study

	CTTTGGAATCAAGTCCAC	for <i>Pfu</i> aABCE1-V174S	
oTA73	TTCAAAGGTCTGCAATAGCCGCAGCTC TGCTGAG	Forward mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aABCE1-V219S	This study
oTA74	GGCTATTGCAGACCTTTGAAGCTCTCC ACCAGAGAGG	Reverse mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aABCE1-V219S	This study
oTA77	AATAGCCTCAGCTCTGCTGAGAAATGC AACGTTC	Forward mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aABCE1-A223S	This study
oTA78	TCAGCAGAGCTGAGGCTATTGCAACC CTTTGAAGC	Reverse mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aABCE1-A223S	This study
oTA65	CAATAGCCGCAGCTCTGCTGGCGAAT GCAACGTTCTATTTCTTTG	Forward mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aABCE1-R227A	This study
oTA66	CAAAGAAATAGAACGTTGCATTCGCCA GCAGAGCTGCGGCTATTG	Reverse mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aABCE1-R227A	This study
oTA20	AGCAAGGCCGATAGCGAAGGAACTGT TTATGAGCTG	Forward mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aABCE1-I408S/Y412S	This study
oTA21	GCTATCGGCCTTGCTGTACTGGGGTTT ATAAGCTAC	Reverse mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aABCE1- I408S/Y412S	This study
oTA15	CTACACTCCTTGCGGATGCCGATATTTA C	Forward mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aABCE1-R470A	This study
oTA16	GTAATATCGGCACGCCTAAGGAGTGT AG	Reverse mutagenesis primer for <i>Pfu</i> aABCE1-R470A	This study
oHI31	GAGAGACATATGGAGATATTGGAAGAA AAACC	Forward cloning primer for <i>Pfu</i> aPelota	This study
oHI32	GAGAGAGGATCCTTACTTGATTTTAAA CCTCAACAG	Reverse cloning primer for <i>Pfu</i> aPelota	This study
oHI283	CTTTACAACCCGAAGGCCTTC	Analysis primer for <i>Eco</i> 16S rRNA footprinting	This study

oHI349	GAGAGACATATGGCTACCAGGACTCAA TTTG	Forward cloning primer for <i>Sce</i> eIF6	This study
oHI350	GAGAGAGGATCCTTATGAGTAGGTTTC AATCAAAG	Reverse cloning primer for <i>Sce</i> eIF6	This study
oHI351	AATCCAGCTCGGTACCCGGGGATCC ACGGATTAGAAGCCGCCGAG	Forward amplifying primer for <i>P_{GAL1}</i>	This study
oHI352	CGAAAATCTGCATTTTTCCGATCCGGG GTTTTTCTC	Reverse amplifying primer for <i>P_{GAL1}</i>	This study
oHI353	GGAAAAATGCAGATTTTCGTCAAGAC	Forward amplifying primer for <i>UBI-R</i>	This study
oHI355	TTTGTCATCGTCATCTTTGTAGTCACGA CCACCTCTTAGCCTTAGCACAAG	Reverse amplifying primer for <i>UBI-R</i>	This study
oHI356	GACTACAAAGATGACGATGACAAAATG AGTGATAAAAACAGTCGTATC	Forward amplifying primer for <i>FLAG-RLI1</i>	This study
oHI357	ATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATC CTTAAATACCGGTGTTATCCAAG	Reverse amplifying primer for <i>FLAG-RLI1</i>	This study
oHI359	GAATAAACACACATAAACAAACAAAATG AAGGTTATTAGTCTGAAAAAGG	Forward cloning primer for <i>Sce</i> Dom34	This study
oHI360	AATGCAAGATTTAAAGTAAATCACTTA ATGGTGATGGTGATGATGCTCCTCACC ATCGTCTTCATCAAGATCGGG	Reverse cloning primer for <i>Sce</i> Dom34	This study
oTA126	GGCGCGCCTTAATTAACCCGGGACGG ATTAGAAGCCGCCGAGC	Forward cloning primer for <i>P_{GAL1}-UBI-R-FLAG</i>	This study
oTA127	TGCAGGTCGACGGATCCCCGGGTTTG TCATCGTCATCTTTGTAG	Reverse cloning primer for <i>P_{GAL1}-UBI-R-FLAG</i>	This study
oTA134	AGTTTTGCAACTGAAAAATTTTCTATT TTTTTCTCAATCGCATCGCTCCAGTAT AGCGACCAGCATTC	Forward PCR primer for <i>kanMX-P_{GAL1}-UBI-R-FLAG</i> from pTU1004	This study

oTA135	TTACATTTATCAGCGCTAACGATAGCGA TACGACTGTTTTTATCACTCATTTTGTC ATCGTCATCTTTG	Reverse PCR primer for <i>kanMX-P_{GAL1}-UBI-R-FLAG</i> from pTU1004	This study
oTA87	CTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCAG TTTTGTTTCTTGGTTTTTT	Forward cloning primer for <i>RLI1</i> (+ 662 bp 5'UTR, + 400 bp 3'UTR)	This study
oTA88	TTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCAT GCAGCAAATGCTTATCATG	Reverse cloning primer for <i>RLI1</i> (+ 662 bp 5'UTR, + 400 bp 3'UTR)	This study
oTA154	CTTGGATAACACCGGTATTAACATCTTT TACCCATACG	Forward cloning primer for 3HA	This study
oTA155	GGTTCTCCGAATCCCAAGATGCTCAGC ACTGAGCAGCGTAATC	Reverse cloning primer for 3HA	This study
oTA170	GATAACAGTCCTCGTGCTAGTAAAGGT CCGGTTCAAAAAGTTGG	Forward mutagenesis primer for RLI1-I176S/I180S	This study
oTA171	CCTTTACTAGCACGAGGACTGTTATCA ACATATTGAGGTTTG	Reverse mutagenesis primer for RLI1-I176S/I180S	This study
oTA112	GCCATTGGTTCGTCATGTGTTCAAGAG GCTGATG	Forward mutagenesis primer for RLI1-M234S	This study
oTA113	AACACATGACGAACCAATGGCAAATCT TTGCAG	Reverse mutagenesis primer for RLI1-M234S	This study

表 2. 使用した出芽酵母用プラスミド

Plasmid	Plasmid	Notes	Source
YCplac22	<i>TRP1, CEN</i>		Gietz & Sugino 1998
YCplac111	<i>URA3, CEN</i>		Gietz & Sugino 1998
pFA6a-kanMX6	<i>kanMX</i>		Bähler <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-kanMX6- P _{GAL1} -3HA	<i>kanMX6-P_{GAL1}-3HA</i>		Longtine <i>et al.</i> , 1998
pYES2-Rli1-His	<i>URA3, P_{GAL1}-RLI1(WT)-HIS, 2μ</i>	Plasmid for expression <i>Sce Rli1 (WT)</i> in yeast	Shoemaker <i>et al.</i> , 2011
pTOW-p-GFP	<i>URA3, leu2d, PYK1-yEGFP, 2μ</i>		Makanae <i>et al.</i> , 2013
pTU1002	<i>URA3, P_{GAL1}-UBI-R-FLAG- RLI1, CEN</i>	PCR template for plasmid pTU1004 construction	This study
pTU1004	<i>kanMX-P_{GAL1}-UBI-R-FLAG</i>	PCR template for yeast YTU2001 construction	This study
pTU2001	<i>TRP1, RLI1, CEN</i>	RLI1	This study
pTU2002	<i>TRP1, RLI1-3HA, CEN</i>	RLI1-3HA (Wild type)	This study
pTU2003	<i>TRP1, RLI1(I176S/I180S/M234S)- 3HA, CEN</i>	RLI1-3HA (3S mutant)	This study
pTU3001	<i>URA3, P_{GAL1}-RLI1(3S)-HIS, 2μ</i>	Plasmid for expression <i>Sce Rli1 (3S)</i> in yeast	This study
pTU3002	<i>URA3, leu2d, PYK1-DOM34- HIS, 2μ</i>	Plasmid for expression <i>Sce Dom34</i> in yeast	This study

表 3. 使用した出芽酵母株

Strain	Genotype	Notes	Source
W303-1A	MATa, <i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ade2-1 his3-11,15 ura3-1</i>	Wild Type	Wallis <i>et al.</i> , 1989
YTU2001	MATa, <i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ade2-1 his3-11,15 ura3-1, KanMX4-P_{GAL1}-UBI-R-FLAG-RLI1</i>	<i>rli1-deg</i>	This study

表 4. aABCE1-ΔN74·ADP·aP-C18 複合体結晶構造解析の統計値

Data collection		Refinement	
X-ray generator/Detector	Rigaku Micromax-007HF/ RAXIS IV++	$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}^{\text{c}}$ (%)	19.4/24.4 (20.7/28.0) ^a
Wavelength (Å)	1.5418	No. of complex	1
Space group	$P2_12_12_1$	No. of atoms	
Unit-cell parameters (Å, °)	a = 60.0, b = 64.7, c = 147.1 ($\alpha = 90.0$, $\beta = 90.0$, $\gamma = 90.0$)	Protein	4117
		Peptide	82
Resolution range (Å)	19.98–2.10 (2.22–2.10) ^a	Ligand	54
No. of measured reflections	119314 (11412) ^a	Solvent	294
No. of unique reflections	33402 (4655) ^a	Average B-factors (Å²)	
Redundancy	3.18 (2.19) ^a	Protein	28.9
Completeness (%)	97.2 (85.1) ^a	Peptide	61.3
Average I/σ(I)	21.03 (6.01) ^a	Ligand	22.5
$R_{\text{merge}}^{\text{b}}$ (%)	4.5 (17.3) ^a	Solvent	33.3
		RMS deviations	
		Bond lengths (Å)	0.006
		Bond angles (°)	1.128
		Ramachandran plot	
		Favored region (%)	96.96
		Allowed region (%)	2.66
		Outlier region (%)	0.38

^a Values in parentheses are for the highest resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the i -th intensity

measurement of reflection hkl , including symmetry-related reflections, and $\langle I(hkl) \rangle$ is its average.

^c R_{free} was calculated by using 5% of randomly selected reflections that were excluded from the refinement.

表5. aP-C18ペプチドと各種aABCE1の解離定数

aABCE1	K_d for aP-C18 (μM) ¹	K_d ratio ²
WT	3.9 ± 0.3	1
ΔN74	4.4 ± 0.2	1.1
I170S	68.1 ± 8.2	17.5
V174S	83.0 ± 5.0	21.3
V219S	6.3 ± 0.2	1.6
A223S	46.3 ± 1.3	11.9
R227A	30.8 ± 3.2	7.9

1. Errors are SD of values calculated from three independent experimental replicates.

2. K_d ratio = K_d (mutant) / K_d (WT) for FITC-labeled aP-C18.

8. 引用文献

- Bachmair A, Finley D, Varshavsky A (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234: 179–186
- Bähler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A, Steever AB, Wach A, Philippsen P, Pringle JR (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 14: 943–951
- Ballesta JP, Rodriguez-Gabriel MA, Bou G, Briones E, Zambrano R, Remacha M (1999) Phosphorylation of the yeast ribosomal stalk. Functional effects and enzymes involved in the process. *FEMS Microbiol Rev* 23: 537–550
- Barthelme D, Dinkelaker S, Albers SV, Londei P, Ermler U, Tampé R (2011) Ribosome recycling depends on a mechanistic link between the FeS cluster domain and a conformational switch of the twin-ATPase ABCE1. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 3228–3233
- Becker T, Franckenberg S, Wickles S, Shoemaker CJ, Anger AM, Armache JP, Sieber H, Ungewickell C, Berninghausen O, Daberkow I, Karcher A, Thomm M, Hopfner KP, Green R, Beckmann R (2012) Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Nature* 482: 501–506

- Bocharov EV, Sobol AG, Pavlov KV, Korzhnev DM, Jaravine VA, Gudkov AT, Arseniev AS (2004) From structure and dynamics of protein L7/L12 to molecular switching in ribosome. *J Biol Chem* 279: 17697–17706
- Brandman O, Hegde RS (2016) Ribosome-associated quality control. *Nat Struct Mol Biol* 23: 7–15
- Brown A, Shao S, Murray J, Hegde RS, Ramakrishnan V (2015) Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes. *Nature* 524: 493–496
- Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL, Quijcho FA (2003) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell* 12: 651–661
- Clementi N, Chirkova A, Puffer B, Micura R, Polacek N (2010) Atomic mutagenesis reveals A2660 of 23S ribosomal RNA as key to EF-G GTPase activation. *Nat Chem Biol* 6: 344–351
- Diaconu M, Kothe U, Schlünzen F, Fischer N, Harms JM, Tonevitsky AG, Stark H, Rodnina MV, Wahl MC (2005) Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell* 121:991–1004
- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr*

D Biol Crystallogr 60: 2126–2132

Franckenberg S, Becker T, Beckmann R (2012) Structural view on recycling of archaeal and eukaryotic ribosomes after canonical termination and ribosome rescue. *Curr Opin Struct Biol.* 22: 786–789

Frolova L, Le Goff X, Zhouravleva G, Davydova E, Philippe M, Kisselev L (1996) Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA* 2: 334–341

Gietz RD, Sugino A (1998) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, 74: 527–534

Grela P, Bernadó P, Svergun D, Kwiatowski J, Abramczyk D, Grankowski N, Tchórzewski M (2008) Structural relationships among the ribosomal stalk proteins from the three domains of life. *J Mol Evol* 67: 154–167

Hagiya A, Naganuma T, Maki Y, Ohta J, Tohkairin Y, Shimizu T, Nomura T, Hachimori A, Uchiumi T (2005) A mode of assembly of P0, P1, and P2 proteins at the GTPase-associated center in animal ribosome: *in vitro* analysis with P0 truncation mutants. *J Biol Chem* 280: 39193–39199

- Heuer A, Gerovac M, Schmidt C, Trowitzsch S, Preis A, Kötter P, Berninghausen O, Becker T, Beckmann R, Tampé R. (2017) Structure of the 40S-ABCE1 post-splitting complex in ribosome recycling and translation initiation. *Nat Struct Mol Biol* 24: 453–460
- Hopfner KP (2016) Invited review: Architectures and mechanisms of ATP binding cassette proteins. *Biopolymers* 105: 492–504
- Imai H, Miyoshi T, Murakami R, Ito K, Ishino Y, Uchiumi T. (2015) Functional role of the C-terminal tail of the archaeal ribosomal stalk in recruitment of two elongation factors to the sarcin/ricin loop of 23S rRNA. *Genes Cells* 20: 613–624
- Ito K, Honda T, Suzuki T, Miyoshi T, Murakami R, Yao M, Uchiumi T (2014) Molecular insights into the interaction of the ribosomal stalk protein with elongation factor 1 α . *Nucleic Acids Res* 42: 14042–14052
- Janosi L, Hara H, Zhang S, Kaji A (1996) Ribosome recycling by ribosome recycling factor (RRF) — an important but overlooked step of protein synthesis. *Adv Biophys* 32: 121–201
- Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 125–132
- Kabsch W, Sander C (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22: 2577–2637

Kapp LD, Lorsch JR (2004) The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* 73: 657–704

Karcher A, Büttner K, Märten B, Jansen RP, Hopfner KP. (2005) X-ray structure of RLI, an essential twin cassette ABC ATPase involved in ribosome biogenesis and HIV capsid assembly. *Structure* 13: 649–659.

Karcher A, Schele A, Hopfner KP (2008) X-ray structure of the complete ABC enzyme ABCE1 from *Pyrococcus abyssi*. *J Biol Chem* 283: 7962–7971

Kushnirov VV (2000) Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* 16: 857–860

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettingan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948

Lee KM, Yusa K, Chu LO, Yu CW, Oono M, Miyoshi T, Ito K, Shaw PC, Wong KB, Uchiumi T (2013) Solution structure of human P1•P2 heterodimer provides insights into the role of eukaryotic stalk in recruiting the ribosome-inactivating protein trichosanthin to the ribosome. *Nucleic Acids Res* 41: 8776–8787

Leijonmarck M, Liljas A (1987) Structure of the C-terminal domain of the ribosomal protein

L7/L12 from *Escherichia coli* at 1.7 Å. *J Mol Biol* 195: 555–579

Liljas A, Ehrenberg M (2013) The catalysts—translation factors. Structural Aspects of Protein

Synthesis, 2nd edn. World Scientific, Singapore, pp 149–228

Long F, Vagin AA, Young P, Murshudov GN (2008) BALBES: a molecular-replacement pipeline.

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 64: 125–132

Longtine MS, McKenzie A, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR

(1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14: 953–961

Makanee K, Kintaka R, Makino T, Kitano H, Moriya H (2013) Identification of dosage-sensitive

genes in *Saccharomyces cerevisiae* using the genetic tug-of-war method. *Genome Res*, 23: 300–311

Maki Y, Hashimoto T, Zhou M, Naganuma T, Ohta J, Nomura T, Robinson CV, Uchiumi T (2007)

Three binding sites for stalk protein dimers are generally present in ribosomes from archaeal organism. *J Biol Chem* 282: 32827–32833

Miyoshi T, Toshio Uchiumi (2008) Functional interaction between bases C1049 in domain II and

G2751 in domain VI of 23S rRNA in *Escherichia coli* ribosomes. *Nucleic Acids Res* 36: 1783–1791

Moazed D, Robertson JM, Noller HF (1988) Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA. *Nature* 334: 362–364

Mohr D, Wintermeyer W, Rodnina MV (2002) GTPase activation of elongation factors Tu and G on the ribosome. *Biochemistry* 41: 12520–12528

Motohashi K (2015) A simple and efficient seamless DNA cloning method using SLiCE from *Escherichia coli* laboratory strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis. *BMC Biotechnol* 15: 47

Murakami R, Singh CR, Morris J, Tang L, Harmon I, Takasu A, Miyoshi T, Ito K, Asano K, Uchiumi T (2018) The interaction between the ribosomal stalk proteins and translation initiation factor 5B promotes translation initiation. *Mol Cell Biol* 38: e00067–18

Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, Winn MD, Long F, Vagin AA (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67: 355–367

Naganuma T, Nomura N, Yao M, Mochizuki M, Uchiumi T, Tanaka I (2010) Structural basis for

translation factor recruitment to the eukaryotic/archaeal ribosomes. *J Biol Chem* 285: 4747–4756

Nomura N, Honda T, Baba K, Naganuma T, Tanzawa T, Arisaka F, Noda M, Uchiyama S, Tanaka I, Yao M, Uchiumi T (2012) Archaeal ribosomal stalk protein interacts with translation factors in a nucleotide-independent manner via its conserved C terminus. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 3748–3753

Nomura T, Nakano K, Maki Y, Naganuma T, Nakashima T, Tanaka I, Kimura M, Hachimori A, Uchiumi T (2006) *In vitro* reconstitution of the GTPase-associated centre of the archaebacterial ribosome: the functional features observed in a hybrid form with *Escherichia coli* 50S subunits. *Biochem J* 396: 565–571

Nürenberg E, Tampé R (2013) Tying up loose ends: ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Trends Biochem Sci* 38:64–74

Nürenberg-Goloub E, Heinemann H, Gerovac M, Tampé R (2018) Ribosome recycling is coordinated by processive events in two asymmetric ATP sites of ABCE1. *Life Sci Alliance* 1: e201800095

Peltz SW, Donahue JL, Jacobson A (1992) A mutation in the tRNA nucleotidyltransferase gene promotes stabilization of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12: 5778–5784

Pisarev AV, Skabkin MA, Pisareva VP, Skabkina OV, Rakotondrafara AM, Hentze MW, Hellen CU, Pestova TV (2010) The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol Cell* 37: 196–210

Pisareva VP, Skabkin MA, Hellen CU, Pestova TV, Pisarev AV (2011) Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *EMBO J* 30: 1804–1817

Preis A, Heuer A, Barrio-Garcia C, Hauser A, Eyler DE, Berninghausen O, Green R, Becker T, Beckmann R (2014) Cryoelectron microscopic structures of eukaryotic translation termination complexes containing eRF1-eRF3 or eRF1-ABCE1. *Cell Rep* 8: 59–65

Rodnina MV, Wintermeyer W (2009) Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* 21: 435–443

Schmeing TM, Ramakrishnan V (2009) What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* 461: 1234–1242

Serdar LD, Whiteside DL, Baker KE (2016) ATP hydrolysis by UPF1 is required for efficient translation termination at premature stop codons. *Nat Commun* 7: 14021

- Shin BS, Dever TE (2007) Molecular genetic structure-function analysis of translation initiation factor eIF5B. *Methods Enzymol* 429: 185–201
- Shoemaker CJ, Green R (2011) Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: E1392–1398
- Strunk BS, Novak MN, Young CL, Karbstein K (2012) A translation-like cycle is a quality control checkpoint for maturing 40S ribosome subunits. *Cell* 150: 111–121
- Tanzawa T, Kato K, Girodat D, Ose T, Kumakura Y, Wieden HJ, Uchiumi T, Tanaka I, Yao M (2018) The C-terminal helix of ribosomal P stalk recognizes a hydrophobic groove of elongation factor 2 in a novel fashion. *Nucleic Acids Res* 46: 3232–3244
- Uchiumi T, Honma S, Endo Y, Hachimori A (2002a) Ribosomal proteins at the stalk region modulate functional rRNA structures in the GTPase center. *J Biol Chem* 277: 41401–41409
- Uchiumi T, Honma S, Nomura T, Dabbs ER, Hachimori A (2002b) Translation elongation by a hybrid ribosome in which proteins at the GTPase center of the *Escherichia coli* ribosome are replaced with rat counterparts. *J Biol Chem* 277: 3857–3862
- van den Elzen AM, Schuller A, Green R, Séraphin B (2014) Dom34-Hbs1 mediated dissociation of inactive 80S ribosomes promotes restart of translation after stress. *EMBO J* 33: 265–276

Voorhees RM, Schmeing TM, Kelley AC, Ramakrishnan V (2010) The mechanism for activation of GTP hydrolysis on the ribosome. *Science* 330: 835–838

Wallis JW, Chrebet G, Brodsky G, Rolfe M, Rothstein R (1989) A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell*, 28: 409–419

Young DJ, Gydosh NR, Zhang F, Hinnebusch AG, Green R (2015) Rli1/ABCE1 recycles terminating ribosomes and controls translation reinitiation in 3'UTRs in vivo. *Cell* 162: 872–884

9. 謝辞

本研究を何不自由なく遂行する機会を与えていただただけでなく、様々な面で未熟な私を手厚くご指導して下さった内海利男教授に深く感謝しお礼申し上げます。また、多くのご助言、ご指導を賜りました伊東孝祐助教、三好智博助教、西川周一教授をはじめ、生物学の幅広い教養を授けてくださいました新潟大学理学部生物学科の教員の方々に感謝申し上げます。実験手法の細部にわたるご指導、研究室生活に関する数多くのご助言を頂きました村上僚先輩、鈴木隆寛先輩にお礼申し上げます。また、研究室に所属以来お世話になりました内海・伊東研究室の皆様にお礼申し上げます。

Johns Hopkins University School of Medicine の Rachel Green 博士には出芽酵母 Rli1 の発現プラスミドを分譲して頂きました。同大学の Anthony P. Shuller 博士には Rli1 の発現・精製に関して多くのご助言を頂きました。岡山大学の守屋央朗准教授には pTOW プラスミドを分譲して頂きました。京都産業大学の遠藤斗志也教授には α -Tom40 モノクローナル抗体を分譲して頂きました。この場をお借りして深くお礼申し上げます。

最後に、大学生活を支障なく過ごし研究に一心に励むことができたのも両親の支えがあったためです。心より感謝しお礼申し上げます。