

ふ り が な      みよし ともひろ  
氏                名      三好 智博  
学                位      博 士 (理学)  
学 位 記 番 号      新大院博 ( 理 ) 第285号  
学位授与の日付      平成 20年 3月 24日  
学位授与の要件      学位規則第 4 条第 1 項該当  
博 士 論 文 名      Analyses of the functional structure of the GTPase-associated center in *Escherichia coli* ribosomes by site-directed mutagenesis.

(部位特異的変異導入による大腸菌リボソーム GTPase センターの機能構造解析)

論文審査委員      主査 教授 内海 利男  
                         副査 教授 小谷 昌司  
                         副査 教授 細野 正道  
                         副査 准教授 前野 貢

#### 博士論文の要旨

生体内のすべてのタンパク質は、リボソームと呼ばれる rRNA とタンパク質から成る構成される巨大分子集合体によって合成される。リボソームには様々な機能部位があり、それらが協調的に機能して複雑なタンパク質合成機構が成立している。本論文は、大腸菌リボソームを研究対象として、機能部位の一つで、GTP 結合性翻訳因子の作用部位となり、かつ GTP 加水分解に機能する“GTPase センター”(ファクター結合領域)と呼ばれ部位の構造、機能、動態面に関する生化学的研究内容である。大腸菌などの真正細菌では、リボソーム GTPase センターは一部の rRNA 部位と 3 種のタンパク質成分(L10, L11, L12)で構成されているが、これら成分の詳細なはたらきはなお明確にされていない。申請者は第 1 章で、リボソーム GTPase センターを構成する rRNA 成分に焦点をあて、また第 2 章ではタンパク質成分に着目し、それぞれ部位特異的変異を導入する手法により行った研究結果が報告されている。その研究成果の概略は以下のようなものである。

#### 大腸菌リボソーム GTPase センターを構成する二つの rRNA ドメイン間相互作用に関する研究(第 1 章)

最近報告された大腸菌リボソームの X 線結晶構造解析では GTPase センターを構成する 23S rRNA の 2 つのドメイン (GAR と SRL) が塩基 C1049 と G2751 間で相互作用していることを示している。申請者は、水溶液中のリボソームでこの C1049・G2751 間相互作用があることを部位特異的変異導入と化学修飾実験によって明確に示している。さらに、各種塩基置換により、この塩基間相互作用を改変させることでリボソームの伸長因子 EF-G/EF-Tu 受容性の機能面が変化することを証明し、この塩基間相互作用がリボソーム機能面で重要であることを示した。また、この塩基間相互作用が翻訳関連因子の作用によりどのように変化するかを G2751 の化学修飾が増強した C1049G 変異体を用いて解析を行った。その結果、①この塩基間相互作用がリボソームと EF-G・GDP・フシジン酸 (GTP 加水分解後) の結合により強まり、逆に、リボソームに EF-G・GMP-PNP (GTP 加水分解前) の結合では弱まること、②tRNA がリボソームの P/E サイトに結合したときにも強まることを示した。これらの結果より、1049-2751 塩基周辺の相互作用が、翻訳反応中の様々な段階で変化しているという新しい見解を導き

出している。

#### EF-G-依存 GTPase 活性に寄与するリボソーム L12 タンパク質の構造因子の同定 (第2章)

L12 タンパク質は L10 タンパク質と複合体を形成しリボソーム GTPase センターの主要成分となっている。大腸菌リボソームでは、L10-L12 複合体は  $L10(L12)_2(L12)_2$  の 5 量体を形成して存在することが知られており、この分子集合の性質は他の生物でも共通であることが推察されてきた。しかし近年、好熱性細菌 *T. thermophilus* で、 $L10(L12)_2(L12)_2(L12)_2$  の 7 量体で存在することが示され、このタンパク質複合体構造とリボソーム機能との関係は興味深い研究対象となって残されている。本研究で申請者は、*T. thermophilus* の L10-L12 複合体の機能面の特性を *in vitro* で解析し、驚くべきことに *T. thermophilus* L10-L12 の 7 量体は、大腸菌の 5 量体に比べて 2 倍以上の高い EF-G 依存 GTPase 活性を保持することを示している。この高い活性の要因が *T. thermophilus* のユニークな 7 量体構造にあるのか、それともこの生物種のタンパク質自体の特徴的構造因子にあるのかを、大腸菌の L10 と L12 を基盤としてタンパク質の一部を *T. thermophilus* タンパク質のアミノ酸配列に置換したキメラ型タンパク質を各種作成することで解析している。研究の結果、高い GTPase 活性は L10-L12 の 7 量体構造に関係するのではなく L12 の C 末端が *T. thermophilus* 型であることに起因することを明確に示している。さらに、その C 末端の特に Helix 6 が活性促進に寄与すること、この部位がリボソームから EF-G•GDP 複合体の解離を促進することで GTPase の代謝回転を促進していることを示す結果も提示している。

以上の実験から、リボソーム GTPase センターを構成する 2 つの rRNA 部位間の相互作用とその部位に結合するタンパク質の機能面に直結する構造因子に関して共に新しい知見を提供している。リボソーム中でこれら rRNA とタンパク質構造因子は翻訳因子依存の反応で協調的に機能しているという見解を導き出している。

#### 審査結果の要旨

本論文は、リボソーム中の機能部位の一つ、GTPase センターを構成する rRNA 成分とタンパク質成分のはたらきに関して部位特異的変異導入を行い生化学的に解析した研究内容で、得られた成果は、次のような意義がある。

- 1) リボソーム GTPase センターで二つの rRNA 部位間相互作用を立証し、これがリボソーム上の動的翻訳反応に密接に関係することを初めて明らかにしている。
- 2) リボソーム GTPase センターに存在するタンパク質複合体の 5 量体構造と 7 量体構造の機能構造解析系を構築し、解析を初めて可能にした。
- 3) リボソーム GTPase センターの主要タンパク質 L12 の C 末端部位の一部がリボソームからの翻訳因子の解離に寄与することを新たに証明した。

得られた研究成果の一部は、権威ある国際学術雑誌に採択されている。以上のことから、本論文は博士（理学）の学位論文として十分な価値があると認定した。