

学位論文題名

Structural studies of ribosomal proteins essential
for the assembly of the large ribosomal subunit

(リボソーム大サブユニット会合に関わるタンパク質の構造学的研究)

学位論文内容の要旨

生体内において生命維持に必須であるタンパク質を合成する機構は、多くの反応段階から成り立っている。この一連の反応には数多くの生体高分子が関与しているが、中心的な役割を担っているのはリボソームである。生物の細胞中に普遍的に存在するリボソームは mRNA を介して DNA の遺伝情報の翻訳を行い、アミノ酸を重合させてタンパク質を合成する細胞内小器官である。リボソームは大小各一個ずつのサブユニットから構成される分子量約 300 万のリボ核酸タンパク質複合体粒子である。構成する約 50 種類のタンパク質の多くが RNA 結合タンパク質であり、3~4 種類の RNA に協調的に会合して機能的なリボソーム RNA (rRNA) の構造形成に関与している。リボソームのもつ興味ある素反応の一つであるペプチド結合形成 (ペプチド転移) 反応を司るのは、大サブユニットで、真核生物では約 30 種類のリボソームタンパク質と約 3000 ヌクレオチドの 23S rRNA、および約 120 ヌクレオチドの 5S rRNA から構成される。中でも最も高分子量で、重要な機能部位を含む 23S rRNA がどのようにして機能的な RNA 構造へと折り畳まれているのかを明らかにするためには、タンパク質と RNA との RNA 相互作用を原子レベルで明らかにすることが必要である。これまでに、サブユニットの結晶構造解析と並行して約 4 割の構成タンパク質の立体構造が解析されてきた。最近では大小各サブユニットの結晶構造も明らかにされた。

本研究ではリボソームの構造形成に重要なリボソームタンパク質の RNA 相互作用を詳細に明らかにすることを目的として、X 線結晶構造解析により 50S サブユニット会合に関係するタンパク質であるタンパク質 L2, L5 および L13 の立体構造を決定した。また、本研究進行中に最近報告された古細菌リボソーム大サブユニットの結晶構造との比較をおこない、RNA 相互作用に関して考察した。

第1章 5S rRNA 結合リボソームタンパク質 L5 の結晶構造解析

リボソームタンパク質 L5 はリボソームの 50S サブユニットの中央突起に位置する 5S rRNA 結合タンパク質である。5S rRNA は 23S rRNA のペプチド基転移活性中心の構造を形成するのに関与すると考えられている。5S rRNA-タンパク質複合体ドメインがリボソームサブユニットの構造形成へどのように影響しているか解明するため、中度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来の 5S

rRNA結合リボソームタンパク質L5の結晶構造を解析した。その結果、タンパク質L5はくぼんだ逆平行 β シートとフレキシブルなループ構造をもつことが明らかとなった。他のタンパク質立体構造と比較したところ、L5の全体構造のもつトポロジーはRNA認識に関わるRRMドメインに類似していた。この構造モチーフはスプライセオソームタンパク質U1Aで最もよく知られているが、S6やL30などのいくつかのリボソームタンパク質にも見られることが見いだされた。これらのタンパク質の間で1次構造の相同性は全くなかったが、立体構造の類似性が見いだされた。一方、これらの構造類似タンパク質の認識RNA構造及びRNA結合様式は異なっており、核酸結合タンパク質の間での多様な分子進化を示唆させた。

第2章 リボソームタンパク質 L13 の結晶構造解析

タンパク質 L13 は大腸菌においてサブユニットの合成初期の会合に関与することが知られている。超高度好熱古細菌由来 *Pyrococcus. horikoshii* のリボソームタンパク質 L13 の結晶構造は多波長異常分散法により決定された。L13 は 5 本の α ヘリックスと平行 β シート ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 4$) からなる疎水コアドメインとヘリックスターンヘリックスおよび電子密度図では見えないループ (残基 54-67) 構造から構成されていた。最近、側鎖構造まで公開された好塩古細菌リボソームサブユニットの L13 と比較したところ、L13 の広く正荷電を帯びた α ヘリカルな領域が形成する溝が RNA のドメイン II の翻訳伸長に関わっている領域に近い pseudoknot 構造に結合していた。L13 の RNA 接触面とこの相互作用しているドメイン II 領域の形はよく似ており、とくに突き出したループまでも RNA の形によく合っている。この突起したループは種間の保存性の低い、近接した RNA ドメインの間に突き出していることから、RNA のアダプタとして機能していると推定される。PhoL13 の結晶構造からこのループは flexibility が高いため見えなかった。進化の過程で、核酸に比べ、立体構造的に自由度が高いタンパク質がリボソームの構造形成の維持に関与してきたことを示唆している。

第3章 リボソームタンパク質 L2 の結晶構造解析

タンパク質 L2 は 50S サブユニットの構成タンパク質で、ペプチジルトランスフェラーゼ活性をもつ 23S rRNA の IV ドメインに直接結合する RNA 結合タンパク質である。L2 は 23S rRNA のもつペプチジルトランスフェラーゼ活性中心の構造形成に重要な役割を果たしていると考えられている。23S rRNA-L2 複合体に対するペプチダーゼ消化で保護される領域 (60-201) を L2-RNA binding domain (L2-RBD) とし、N 末 (60 残基) と C 末 (74 残基) を切除した変異体をクローニング、結晶化を行ったところ結晶化に成功した。結晶構造解析を行った結果、L2 の構造は 2 つのドメインからなり、N 末ドメインは OB-fold、C 末ドメインは SH3-like barrel と類似していた。共に核酸結合タンパク質によく見られるモチーフである。興味深いことに、構造既知のタンパク質に L2-RBD と同様に OB-fold と SH3-like barrel をもつものに真核生物翻訳因子 EIF-5A がある。ただし、L2-RBD とは異なり N 末ドメインが SH3-like barrel、C 末ドメインが OB-fold からなる。一次構造に保存性が見られないが、このように構造の類似性はこの 2 つのタンパク質の生命活動に重要な翻訳に関わる機能から、各ドメインの共通の分子進化が示唆される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 勲
副 査 教 授 新 田 勝 利
副 査 教 授 木 村 誠 (九州大学大学院農学研究院)
副 査 助 教 授 渡 邊 信 久

学 位 論 文 題 名

Structural studies of ribosomal proteins essential for the assembly of the large ribosomal subunit

(リボソーム大サブユニット会合に関わるタンパク質の構造学的研究)

タンパク質の生合成反応の主役であるリボソームは、大小サブユニットから構成される分子量300万のリボ核酸タンパク質複合体粒子である。本論文は、大サブユニットの会合に関与するリボソームタンパク質L2、L5、L13の立体構造を決定し、それらのRNA認識機構と分子進化について考察したものである。

まず、5S rRNA結合タンパク質L5は、窪んだ逆平行ベータシートと不安定なループ構造を持つことを明らかにし、その折りたたみ構造が他のリボソームタンパク質S6やL30と同様、RNA認識に関与するRRMドメインに類似していることを見出した。次に、タンパク質L13は5本のアルファヘリックスと平行ベータシートからなる疎水コアドメインとヘリックス-ターン-ヘリックスからなっていることを決定し、ヘリックスが形成する溝がRNAとの相互作用に重要であることを示唆した。

続いて、タンパク質L2のRNA結合ドメインがOBフォールドを持つN末端ドメインと、SH3様バレル構造を持つC末端ドメインからなっていることを明らかにし、L2のRNA結合ドメインは進化過程で2つの祖先型RNA結合タンパク質が融合したことを示唆した。

以上、本論文は、リボソーム大サブユニットの会合に関与するタンパク質の構造、機能、および分子進化を明らかにしたものであり、本研究が生物科学に及ぼす貢献には多大なものがあると考えられ、よって審査員一同は申請者が博士(理学)の学位を得る十分な資格があるものと認めた。