

学 位 論 文 題 名

Structural studies of a protein at ribosome decoding site

(リボソーム解読領域に位置す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。

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り、生物の細胞中に普遍的に存在する。真正細菌や古細菌のリボソームは、50S と 30S の大小各一個ずつのサブユニットから構成されるリボ核酸タンパク質の複合体粒子である。

リボソームサブユニットの構造解析に先行して、これまでに約 4 割のリボソームタンパク質の立体構造が解明された。リボソームタンパク質の多くが RNA 結合タンパク質であり、リボソームの活性中心である RNA の構造形成の役割を担っている。解析されたリボソームタンパク質には、新規あるいは既知の核酸結合モチーフが見られ、核酸結合タンパク質の進化に関して多くの知見が得られた。また、真正細菌のリボソームタンパク質には、リボソームタンパク質オペロンより転写される mRNA と結合することで翻訳を抑制するものがいくつか確認されている。生命維持に必須なリボソームの構成成分であるリボソームタンパク質は、あらゆる生物種間で非常によく保存されている。リボソームは現存生物の共通の祖先の頃から保存された RNA-タンパク質コアを持っていると考えられる。その構成成分であるリボソームタンパク質の構造を解析することは、核酸結合タンパク質の原点、タンパク質—核酸認識の基本的な機構についての知見が得られることが期待できる。

地球上の生命は、真正細菌・古細菌・真核生物と大きく 3 つに分類することができる。古細菌は、全ての生命に共通な祖先に最も近い現存の生物であると考えられている。古細菌由来のリボソームタンパク質の構造を解析することは、核酸結合タンパク質の進化を追う上で必要不可欠である。

S7 はリボソームの 30S サブユニットのヘッドを構成するタンパク質である。16S rRNA の 3'大ドメインと結合することによって、30S サブユニットのヘッド領域の初期段階会合における中心的役割を果たす。また、E サイトに結合した tRNA とコンタクトする位置にあり、遺伝暗号解読にも何らかの役割を果たしていることが期待されている。真正細菌由来 S7 はフレキシブルな N 末領域を中心にして 16S rRNA と結合することがわかっている。しかし、古細菌 S7 では N 末の領域が真正細菌 S7 に比べて約 50 残基長く、また *Pyrococcus horikoshii* 由来 S7 では rRNA 結合ループに 20 残基の挿入があることなど、構造上の重要な違いが存在する。

そこで本研究では、X 線結晶構造解析によって中度好熱細菌 *Bacillus stearothermophilus* および超高度好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来リボソームタンパク質 S7 の立体構造決定を行った。

第1章 中度好熱細菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来 S7 の X 線結晶構造解析

Bacillus stearothermophilus 由来リボソームタンパク質 S7 (BstS7) の構造解析は、セレノメチオニン置換体を用いた多波長異常分散法により行った。最終的に、8.0-2.5Å のデータにおいて R -factor=22.5%, free R -factor=27.3%の構造を得た。構造解析の結果、S7 は 5 本のヘリックスからなる疎水コアドメインと、この疎水コアドメインから突出したβリボンのアームからなる構造をとっていた。進化上保存された塩基性残基、芳香族残基は分子の片面に集中しており、βリボンのアームを中心としたその領域が 16S rRNA との結合部位であると考えられる。

第2章 超高度好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 S7 の X 線結晶構造解析

Pyrococcus horikoshii 由来リボソームタンパク質 S7 (PhoS7) の構造解析は、分子置換法により行った。BstS7 の構造をサーチモデルとして回転および並進関数を計算し、初期位相を得た。構造解析の結果、真正細菌と一次構造の保存性がない N 末 (1-65 残基) のうち、18-42 残基はαヘリックスが形成する疎水コアと疎水コンタクトを保ち、44-62 残基は見えなかった (図 1)。既に解析されている真正細菌由来 30S サブユニット、70S リボソームの構造に重ね合わせることで、真正細菌由来 S7 と古細菌由来 S7 との rRNA 結合様式の違いを明らかにすることができた。

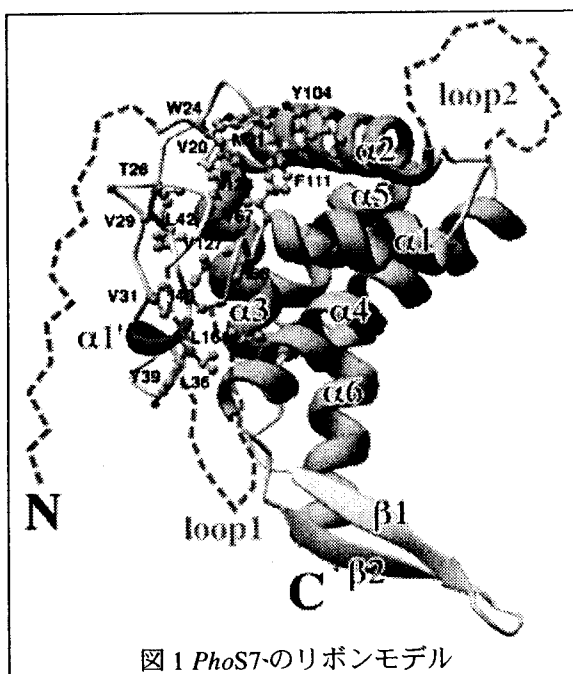


図 1 PhoS7 のリボンモデル

第3章 ribosomal protein S7 と RNA の複合体結晶解析に向けた研究

S7 は翻訳制御を行うリボソームタンパク質の一つであり、自分自身をコードする遺伝子を含む *str* オペロンに結合し、翻訳を抑制する。S7 の mRNA における結合部位は生化学的研究により明らかになっている。結合領域である mRNA フラグメントと S7 との複合体の結晶構造を解析することを目的とし、その前段階として、結晶化に適した mRNA フラグメントの調製及び mRNA フラグメントと S7 の結合能の確認を行った。RNA は一般的に run off *in vitro* transcription により合成する。しかし、この方法で合成される RNA は末端の長さが不揃いとなり結晶化には適さない。従ってセルフプライミング活性をもつ ribozyme を目的 RNA の両端にもつ RNA を合成することで、両端の揃った均一なサンプルを調製した。

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 助教授 渡 邊 信 久

副 査 教 授 木 村 誠 (九州大学大学院農学研究院)

学 位 論 文 題 名

Structural studies of a protein at ribosome decoding site

(リボソーム解読領域に位置するタンパク質の構造学的研究)

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。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り、生物の細胞中に普遍的に存在する。真正細菌や古細菌のリボソームは、50S と 30S の大小各一個ずつのサブユニットから構成されるリボ核酸タンパク質の複合体粒子であり、両方のサブユニットを合計すれば、計 3 種の RNA と約 50 個のタンパク質から構成されている。

リボソームタンパク質 S7 は 30S サブユニットのヘッドを構成するタンパク質である。16S rRNA の 3' 大ドメインと結合することによって、30S サブユニットのヘッド領域の初期会合において中心的役割を果たす。また、E サイトに結合した tRNA とコンタクトする位置にあり、遺伝暗号解読部位に唯一存在するタンパク質であり、遺伝暗号解読にも何らかの役割を果たしていることが期待されている。真正細菌由来 S7 と比べて古細菌 S7 では N 末の領域が約 50 残基長く、また rRNA 結合ループに挿入があることなど、構造上の重要な違いが存在する。本研究では、X 線結晶構造解析によって中度好熱真正細菌 *Bacillus stearothermophilus* および超高度好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来リボソームタンパク質 S7 の立体構造解析を、それぞれ 2.5Å, 2.1Å で行った。

Bacillus stearothermophilus 由来リボソームタンパク質 S7 (BstS7) は 5 本のヘリックスからなる疎水コアドメインと、その疎水コアドメインから突き出た β アームからなる構造をとっていた。進化上保存された塩基性残基、芳香族残基は分子の片面に集中しており、その領域が 16S rRNA との結合部位であると推定された。*Pyrococcus horikoshii* 由来リボソームタンパク質 S7 (PhoS7) の構造解析では、真正細菌と一次構造の保存性がない N 末 (1-65 残基) のうち、

18-42 残基は α ヘリックスが形成する疎水コアと疎水コンタクトを保ち、疎水コアの安定化に寄与すること、44-62 残基はフレキシブルな構造をとることが示された。また、両タンパク質と 70S リボソームの構造を重ね合わせることで、真正細菌由来 S7 と古細菌由来 S7 との rRNA 結合様式の違いを明らかにし、リボソームの進化とタンパク質の役割について重要な知見を得た。

以上、本研究は、リボソームの解読領域にあるタンパク質の構造を原子分解能ではじめて明らかにし、翻訳粒子であるリボソームの中でのタンパク質の働きについて重要な知見を与えた。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。