

学位論文(要約)

**tRNA 擬態によって翻訳を調節するタンパク質に関する
構造生物学的研究**

**(Structural study of tRNA-mimicry proteins involved in
translation regulation)**

平成 25 年 12 月 博士 (理学)

申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

小林 幹

略号, 記号.....	4
要旨.....	7
Abstract.....	8
第 1 章 序論.....	9
1.1 遺伝暗号の翻訳.....	9
1.2 翻訳伸長機構.....	10
1.3 翻訳終結機構.....	11
1.3.1 真正細菌と真核生物における翻訳終結機構.....	11
1.3.2 eRF1・eRF3 複合体.....	12
1.3.3 古細菌における翻訳終結機構.....	12
1.4 リボソームレスキュー機構.....	13
1.4.1 真核生物におけるリボソームレスキュー機構.....	13
1.4.2 No-go decay (NGD).....	13
1.4.3 Nonstop decay (NSD).....	13
1.4.4 Dom34・Hbs1 複合体.....	14
1.4.5 Dom34 の構造.....	15
1.4.6 古細菌におけるリボソームレスキュー機構.....	15
1.5 古細菌由来翻訳伸長因子 aEF1 α の三重の特異性.....	15
1.6 本研究の目的 1.....	16
1.7 真正細菌におけるリボソームレスキュー.....	16
1.7.1 tmRNA によるリボソームレスキュー機構.....	16
1.7.2 EF-P によるリボソームレスキュー機構.....	17
1.7.3 バクテリア由来伸長因子 EF-P.....	18
1.7.4 EF-P の水酸化酵素 YfcM.....	19
1.8 本研究の目的 2.....	20
1.9 本研究の概要.....	21
第 1 章の表.....	23
第 1 章の図.....	25
第 2 章 aRF1・aEF1 α ・GTP 複合体の構造機能解析.....	44
2.1 実験材料と方法.....	44
2.1.1 <i>Aeropyrum pernix</i> aEF1 α の調製.....	44
2.1.2 <i>Aeropyrum pernix</i> aRF1 の調製.....	44
2.1.3 aRF1・aEF1 α ・GTP 複合体の結晶化.....	45
2.1.4 X 線回折実験.....	46
2.1.5 プロテアーゼ存在下での aRF1・aEF1 α ・GTP 複合体の結晶化.....	46

2.1.6	X 線回折実験とデータ処理	46
2.1.7	aRF1・aEF1 α ・GTP 複合体の構造解析	47
2.1	の表	48
2.2	結果	50
2.2.1	<i>Aeropyrum pernix</i> aRF1 の調製	50
2.2.2	aRF1・aEF1 α ・GTP 複合体の結晶化	50
2.2.2.1	結晶化条件のスクリーニングと X 線回折データの測定	50
2.2.2.2	結晶化条件の最適化	50
2.2.3	プロテアーゼ存在下での aRF1・aEF1 α ・GTP 複合体の結晶化と X 線回折データの測定	51
2.2.4	結晶化条件の最適化, X 線回折データの測定, 及び回折データの処理	51
2.2.5	aRF1・aEF1 α ・GTP 複合体の構造解析	51
2.2	の表	52
2.2	の図	56
2.3	考察	65
第 3 章	aPelota・aEF1 α ・GTP 複合体の構造機能解析	66
3.1	実験材料と方法	66
3.1.1	<i>Aeropyrum pernix</i> aEF1 α の調製	66
3.1.2	<i>Aeropyrum pernix</i> aPelota の調製	67
3.1.3	aPelota・aEF1 α ・GTP 複合体の結晶化	68
3.1.4	aPelota・aEF1 α ・GTP 複合体結晶を用いた X 線回折実験とデータ処理	68
3.1.5	セレノメチオニン置換体 aEF1 α (SeMet-aEF1 α)の調製と結晶化	69
3.1.5.1	SeMet-aEF1 α の調製	69
3.1.5.2	aPelota・SeMet-aEF1 α ・GTP 複合体の結晶化	69
3.1.6	aPelota・SeMet-aEF1 α ・GTP 複合体結晶を用いた X 線回折実験とデータ処理	69
3.1.7	aPelota・aEF1 α ・GTP 複合体の構造解析	70
3.1.7.1	セレン原子の位置決定・位相計算	70
3.1.7.2	aPelota・aEF1 α ・GTP 複合体のモデル構築と精密化	70
3.1.8	aEF1 α 変異体と aPelota, aRF1 との <i>in vitro</i> での結合実験	70
3.1.8.1	結合実験に用いるタンパク質の調製	70
3.1.8.2	His-タグプルダウンアッセイ	71
3.1	の表	72
3.2	結果	75
3.2.1	<i>Aeropyrum pernix</i> aEF1 α の調製	75
3.2.2	<i>Aeropyrum pernix</i> aPelota の調製	75
3.2.3	aPelota・aEF1 α ・GTP 複合体の結晶化	76

3.2.4	aPelota・aEF1 α ・GTP 複合体結晶の X 線回折実験とデータ処理	76
3.2.5	SeMet-aEF1 α の調製と aPelota・SeMet-aEF1 α ・GTP 複合体の結晶化	76
3.2.6	aPelota・SeMet-aEF1 α ・GTP 複合体結晶の X 線回折実験とデータ処理	77
3.2.7	aPelota・aEF1 α ・GTP 複合体の構造解析	77
3.2.7.1	セレン原子の位置決定・位相計算	77
3.2.7.2	aPelota・aEF1 α ・GTP 複合体のモデル構築・精密化	77
3.2	の表	79
3.2	の図	83
3.3	考察	97
第 4 章	YfcM の構造機能解析	98
第 5 章	研究成果と総合討論	99
5.1	本研究の成果	99
5.1.1	aRF1・aEF1 α ・GTP 複合体の構造・機能解析	99
5.1.2	aPelota・aEF1 α ・GTP 複合体の構造・機能解析	99
5.1.3	YfcM の構造・機能解析	100
5.2	総合討論	100
5.2.1	翻訳終結研究における今後の課題	100
5.2.2	Dom34・Hbs1・GTP/aPelota・aEF1 α ・GTP 複合体によるリボソームレスキュー機 構	101
5.2.3	リボソーム解離因子 Rli1	102
5.2.4	Dom34・Rli1・リボソーム/aPelota・aABCE1・リボソーム複合体の構造	103
5.2.5	NGD と翻訳終結の相同性・相違性	104
5.2.6	NGD 研究における今後の課題	105
5.2.7	tRNA 擬態について	106
5.2.8	EF-P の研究における今後の課題	107
5.2.9	翻訳因子の分子進化	108
5.2	の図	110
	参考文献	125
	受賞	135
	謝辞	136

略号, 記号

アミノ酸の略号

A, Ala	alanine	アラニン
C, Cys	cysteine	システイン
D, Asp	aspartic acid	アスパラギン酸
E, Glu	glutamic acid	グルタミン酸
F, Phe	phenylalanine	フェニルアラニン
G, Gly	glycine	グリシン
H, His	histidine	ヒスチジン
I, Ile	isoleucine	イソロイシン
K, Lys	lysine	リシン
L, Leu	leucine	ロイシン
M, Met	methionine	メチオニン
N, Asn	asparagine	アスパラギン
P, Pro	proline	プロリン
Q, Gln	glutamine	グルタミン
R, Arg	arginine	アルギニン
S, Ser	serine	セリン
T, Thr	threonine	スレオニン
V, Val	valine	バリン
Q, Trp	tryptophan	トリプトファン
Y, Tyr	tyrosine	チロシン
fM, fMet	<i>N</i> -formylmethionine	<i>N</i> -ホルミルメチオニン
SeMet	Selenomethionine	セレノメチオニン

核酸の略号

A	adenosine	アデノシン
C	cytidine	シチジン
G	guanosine	グアノシン
U	uridine	ウリジン

その他の略号

aa-tRNA	aminoacyl-tRNA	アミノアシル転移 RNA
APS	ammonium persulfate	ペルオキシ二硫酸アンモニウム
ABC	ATP binding cassette	
ADP	adenosine diphosphate	
ATP	adenosine triphosphate	
AMPPNP	adenylyl imidodiphosphate	
β-ME	2-mercaptoethanol	2-メルカプトエタノール
CBB	coomassie brilliant blue	クマシーブリリアントブルー
DC	decoding center	
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
DTT	dithiothreitol	ジチオスレイトール
EF	elongation factor	伸長因子
FAD	flavin adenine dinucleotide	フラビンアデニンジヌクレオチド
GDP	guanosine diphosphate	グアノシン二リン酸
GDPNP	guanylyl imidodiphosphate	グアニリルイミド二リン酸
GTP	guanosine triphosphate	グアノシン三リン酸
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	
LB	Luria-Bertani	
MAD	multi-wavelength anomalous dispersion	
mRNA	messenger RNA	伝令 RNA
NGD	No-go decay	
NSD	Nonstop decay	
PAGE	polyacrylamide electrophoresis	ポリアクリルアミド電気泳動
PEG	polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
PLP	Pyridoxal phosphate	ピリドキサルリン酸
PTC	peptidyl transferase center	
PMSF	phenyl-methylsulfonyl fluoride	フッ化フェニルメチルスルホニル
RF	release factor	終結因子
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
rRNA	ribosomal RNA	リボソーム RNA
SAD	single-wavelength anomalous dispersion	単一波長異常分散
SDS	sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
TEMED	tetramethylethylenediamine	テトラメチルエチレンジアミン

Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane	
tRNA	transfer RNA	転移 RNA
tmRNA	transfer-messenger RNA	転移-伝令 RNA
WT	wild tpe	野生型

要旨

DNA から mRNA へと転写された遺伝情報を翻訳する過程では、伸長因子がアミノ酸を結合した tRNA (aa-tRNA) をリボソームの A site に運び込み、コドンを実アミノ酸へと翻訳する。するとリボソームは mRNA 上のコドンを 1 つ移動し、A site には新たな aa-tRNA が運び込まれる。これを繰り返すことでリボソームは tRNA を介して特定のアミノ酸を取り込み、mRNA の塩基配列を正しく反映したタンパク質を合成する。リボソームは最終的に終止コドンに達し、A site の終止コドンに終結因子が相互作用することで完成したタンパク質が放出される。また、二次構造や終止コドンの欠失などの異常を含む mRNA を翻訳することでリボソームが mRNA 上で動けなくなった場合には、リボソームレスキュー因子が A site と相互作用してリボソームを異常 mRNA から解離させる。真核生物では eRF3 が eRF1 を終止コドンに達したリボソームの A site に運び込むことで翻訳を終結させ、Hbs1 が異常 mRNA 上で動けなくなったリボソームの A site に Dom34 を運び込むことでリボソームをレスキューすることが分かっている。eRF3 と Hbs1 は真核生物由来伸長因子 eEF1 α と同様 eEF1 α -like GTPase family タンパク質であり、GTP 依存的にそれぞれの反応を行うと考えられている。一方古細菌では eRF3 と Hbs1 のオーソログは存在しないが、その代わり古細菌由来伸長因子 aEF1 α が tRNA だけでなく eRF1, Dom34 それぞれの古細菌ホモログである aRF1, aPelota とともに GTP 依存的に結合し、伸長、終結、リボソームレスキューの全てに関わっていることを以前に我々は報告した。そこで本研究では aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体及び aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造を X 線結晶構造解析によって決定した。これらの構造において aRF1 と aPelota は tRNA の形状を擬態することで aEF1 α の tRNA 認識部位と結合しており、この tRNA 擬態によって翻訳終結及びリボソームレスキューを引き起こすことが明らかとなった。

また、リボソームレスキュー機構は真正細菌にも存在する。真正細菌においてリボソームが異常 mRNA によって動けなくなった場合には tmRNA と呼ばれる RNA がそのレスキューを行う。しかし連続したポリプロリン配列を合成する時にもリボソームの停止が起こる。これはリボソーム中でプロリンがタンパク質に取り込まれる速度が極端に遅いためであると考えられている。このような場合にはバクテリア由来伸長因子 EF-P がリボソームに作用し、タンパク質へのプロリンの取り込みを促進することで翻訳を再開させる。EF-P も aRF1 や aPelota と同様に tRNA の形状を擬態したタンパク質であり、翻訳後修飾としてリシル化と水酸化を受ける。本研究では EF-P のヒドロキシル化を行うタンパク質である YfcM の構造を X 線結晶構造解析によって決定し、YfcM が EF-P をヒドロキシル化する機構の解明を目指した。

Abstract

In the translation of mRNA transcribed from DNA into protein, elongation factors deliver aminoacyl-tRNAs (aa-tRNAs) to the ribosomal A site, where aa-tRNAs translate one codon into one amino acid. Subsequently, ribosomes move on mRNA by one codon and incorporate another aa-tRNA. By repeating this cycle, ribosomes move on mRNA, incorporate specific amino acid via tRNA, and synthesize proteins reflecting mRNA sequence correctly. Translating ribosomes finally reach stop codons and proteins are released by release factors recognizing stop codons in the ribosomal A site. However, when ribosomes translate aberrant mRNAs containing secondary structure, lacking stop codons, and so on, ribosomes stall on mRNA. Then, ribosome rescue factors enter the ribosomal A site and dissociate stalled ribosomes from aberrant mRNAs. In eukaryotes, translation termination is facilitated by eRF3 delivering eRF1 into ribosomal A site containing the stop codon, while ribosome rescue is done by Hbs1 delivering Dom34 into the A site of stalled ribosomes. Both eRF3 and Hbs1 are eEF1 α -like GTPase family proteins, and are considered to facilitate their functions in a GTP-dependent manner. On the other hand, in archaea, archaeal counterparts of eRF3 and Hbs1 do not exist in archaeal genome. We reported that archaeal elongation factor, aEF1 α , interacts in a GTP-dependent manner not only with tRNA but also with aRF1 and aPelota, which is the archaeal counterpart of eRF1 and Dom34, respectively. Therefore, aEF1 α is considered to perform three different functions: translation elongation, termination, and ribosome rescue. In this study, we determined crystal structures of aRF1·aEF1 α ·GTP complex and aPelota·aEF1 α ·GTP complex. These structures revealed that aPelota and aRF1 bind to tRNA-recognition site of aEF1 α by mimicking the shape of tRNA, which enables them to facilitate translation termination and ribosome rescue, respectively.

The ribosome rescue pathway exists also in bacteria. In bacterial ribosome rescue, tmRNAs rescue stalled ribosomes on aberrant mRNAs. In addition, translating ribosomes stall when they synthesize polyproline sequences. This is considered to be because proline renders peptide bond formation in ribosomes extremely slow. In this case, bacterial elongation factor, EF-P, detects stalled ribosomes and enhances the incorporation of prolines into proteins being synthesized, which allows stalled ribosomes to resume translation. EF-P is a tRNA-mimicry protein as well as aRF1 and aPelota, and is lysylated and hydroxylated post-translationally. In this study, we determined the crystal structure of YfcM, which is responsible for the hydroxylation of EF-P, and tried to determine the hydroxylation mechanism of YfcM by EF-P.

第1章 序論

1.1 遺伝暗号の翻訳

遺伝情報は DNA にコードされており，mRNA への転写を経てタンパク質に翻訳されることで発現する (図 1.1). タンパク質は 20 種類のアミノ酸がペプチド結合によって多数重合した高分子化合物であり，固有のアミノ酸配列と立体構造をもつことでそれぞれに特有の機能を獲得し，生命現象を支えている．そのため，正しく機能するタンパク質を合成するためには，DNA から転写された mRNA を遺伝暗号表 (表 1.1) に則して正確に翻訳しなければならない．mRNA の塩基配列は，リボソーム中でアミノ酸を結合した tRNA (aa-tRNA) を介してタンパク質のアミノ酸配列へと変換される．

tRNA は mRNA 上の連続する 3 つのヌクレオチドを 1 コドンとしてそれを 1 つのアミノ酸に変換するアダプター分子である．tRNA は 73-94 個ほどのヌクレオチドが図 1.2A に示すようなクローバーリーフ型に並んだ 2 次構造をとっており，アクセプターステム，D アーム，アンチコドンアーム，可変アーム，T アームの 5 つの領域に分類される．そしてこれが塩基のスタッキング相互作用によってさらに折りたたまれて図 1.2B に示すような L 字型の 3 次元構造をとる¹．アンチコドンアームの先端には 3 つのヌクレオチドから成るアンチコドンが存在し，これがリボソーム中で mRNA 上の相補的なコドンと結合する．また 3' 末端は全ての tRNA で CCA となっており，この 3' 末端の A76 にそれぞれの tRNA に特有のアミノ酸が aa-tRNA 合成酵素によって付加される．このため tRNA は mRNA のコドンとアミノ酸の間に遺伝暗号表に基づく対応関係を作っている．

リボソームは RNA とタンパク質の巨大な複合体であり，小サブユニットと大サブユニットが 1:1 で結合し総分子量は数 MDa に達する (表 1.2). リボソームと tRNA と mRNA の複合体構造を図 1.3 に示す．小サブユニットは Decoding Center (DC) を形成し，mRNA のコドンと正しく対合するアンチコドンをもつ tRNA のみを選択的に取り込むことでコドン表に則した正しいアミノ酸を取り込む．50S サブユニットは Peptidyl Transferase Center (PTC) を形成し，合成途中のタンパク質と新たに取り込まれたアミノ酸とのペプチド結合の形成を触媒する．リボソームには A site, P site, E site という 3 箇所の tRNA 結合部位が存在する．

リボソームによるコドンの翻訳反応は開始コドン AUG から始まり，tRNA を介してアミノ酸を取り込みながら mRNA 上を移動し，ペプチドを伸長させる．そして通常は最終的に終止コドンに達し，翻訳終結反応によって完成したタンパク質を放出する．しかし，伸長過程のリボソームが mRNA の異常構造や特定アミノ酸の連続配列を含むペプチド

の合成などによって動けなくなり、翻訳が異常中断することもある。このような事態を解消するために、生体内には mRNA 上で動けなくなったリボソームをレスキューする機構も存在する (図 1.4)。翻訳伸長機構、翻訳終結機構、リボソームレスキュー機構の詳細について以下で述べる。

1.2 翻訳伸長機構

翻訳伸長の機構は真核生物も真正細菌も古細菌も本質的に同じであると考えられており、真正細菌における翻訳伸長の過程を図 1.5, 1.6 に示す。翻訳の開始過程が終了した段階ではリボソームは P site に開始コドン AUG を含み、それに tRNA がコドン-アンチコドン対合を形成している。その tRNA の 3' 末端には真正細菌では *N*-ホルミルメチオニン (fMet)、真核生物と古細菌ではメチオニン (Met) が結合している。ここから翻訳伸長反応が始まるのだが、この反応では伸長因子 Elongation Factor (EF) が中心的な役割を果たし、その中でも特に真正細菌では EF-Tu と EF-G、真核生物と古細菌では eukaryotic/archaeal EF1 α (e/aEF1 α) と eukaryotic/archaeal EF2 (e/aEF2) が翻訳伸長機構に直接的に関わっている²。これらはグアニンヌクレオチド結合タンパク質 (G タンパク質) であり、GTP の結合によって活性化し、それが GDP へと加水分解されることで不活性化する。GTP と結合した EF-Tu, e/aEF1 α はアミノアシル化された tRNA (aa-tRNA) と結合してそれを翻訳伸長過程のリボソームの A site に挿入する。そして A site 中の DC で aa-tRNA と mRNA が正しいコドン-アンチコドン対合を形成した場合にリボソームと tRNA の大きなコンホメーション変化が起こり、EF-Tu, e/aEF1 α の GTPase 活性を刺激する^{3,4}。GTP が加水分解されて GDP 型となった EF-Tu, e/aEF1 α はリボソームから遊離し aa-tRNA が A site に完全に収納される。A site に収納された aa-tRNA の 3' 末端 (A76) に結合したアミノ酸はリボソームの PTC に入る。ここで P site の tRNA に結合した fMet または Met が A site の aa-tRNA のアミノ基に転移し、A site の tRNA の 3' 末端にジペプチドが形成される⁵。すると次に GTP と結合した EF-G, EF2 がリボソームの A site と相互作用する⁶⁻¹¹。そして GTP の加水分解に伴って A site, P site の tRNA はそれぞれ P site, E site に移り、GDP 型となった EF-G, EF2 はリボソームから遊離する。また tRNA は mRNA とコドン-アンチコドン対合を形成しているため、tRNA の移動に引きずられて mRNA はコドン 1 つぶん移動する。これによって A site には次のコドンが入り、新たなアミノアシル tRNA が挿入されるとともに E site の tRNA はリボソームから遊離する。このサイクルを繰り返すことで遺伝暗号表に基づいて mRNA からポリペプチド鎖が合成される。eEF1 α , EF-Tu, aEF1 α は eEF1 α -like GTPase family に属する¹²。

1.3 翻訳終結機構

1.3.1 真正細菌と真核生物における翻訳終結機構

リボソームが翻訳伸長を終えて最終的に終止コドンと呼ばれる UAA, UAG, UGA コドンのいずれかに達した時、翻訳終結反応が起こる。この反応は終止コドンの認識と完成させたポリペプチド鎖の放出を伴い、class I 翻訳終結因子と class II 翻訳終結因子によって制御されている¹³⁻¹⁷ (表 1.3)。

終止コドンに達したリボソームの A site に入って終止コドンの認識とポリペプチド鎖の放出を行うのは class I 翻訳終結因子であり、真正細菌には RF1 と RF2 (Release Factor 1, 2)、真核生物には eRF1 (eukaryotic Release Factor 1)が存在する¹⁸ (表 1.3, 1.4)。class I 翻訳終結因子はそれぞれに保存された配列モチーフ (RF1 では PxT, RF2 では SPF, eRF1 では NIKS/L, YxCxxxF など)を介して終止コドンを認識し、全ての class I 翻訳終結因子に保存された GGQ モチーフによってリボソームの PTC において P site tRNA とポリペプチド鎖をつなぐエステル結合を加水分解する¹⁹⁻²⁶。リボソームと RF2 の複合体構造によると、GGQ モチーフは PTC においてグルタミン残基の主鎖の α -NH 基がタンパク質を結合した tRNA と相互作用してそれを安定化するとともに、側鎖がタンパク質と tRNA をつなぐエステル結合を加水分解するための水分子を配置していると考えられる²⁷ (図 1.7, 1.8)。RF1 は UAG と UAA, RF2 は UGA と UAA を認識するのに対して、eRF1 は 3 つの終止コドン全てを認識することができる²⁸ (表 1.3)。

一方 class II 翻訳終結因子は class I 翻訳終結因子と特異的に相互作用する G タンパク質であり、その働きは真正細菌と真核生物では大きく異なる。真正細菌由来の class II 翻訳終結因子 RF3 は RF1, RF2 によるポリペプチド鎖の遊離が起きた後にリボソームに結合し、GTP 依存的にそれを遊離させることで class I 翻訳終結因子のリサイクルを行う²⁹ (表 1.3)。それに対して真核生物由来の class II 翻訳終結因子 eRF3 は、eRF1 と安定な複合体を形成してそれを終止コドンに達したリボソームの A site に運び、そこで eRF3 に結合した GTP を加水分解することで eRF1 による終止コドンの認識とペプチジル tRNA の加水分解を共役させると考えられている³⁰⁻³⁴ (表 1.3)。eRF3 は eEF1 α -like GTPase family に属し、酵素活性を司るとされる C 端の約 400 残基は EF-Tu, aEF1 α の全長とアミノ酸配列の相同性が高い³⁵ (図 1.9)。

1.3.2 eRF1・eRF3 複合体

eRF1 は3つのドメイン (N 端からドメイン A, B, C)から成る構造が既に報告されており, ドメイン A はアンチコドンアーム, ドメイン B はアクセプターステム, ドメイン C はT アームに相当する³⁶ (図 1.10A). また, eRF1 のドメイン 1 には NIKS/L などの終止コドン認識モチーフがあり, ドメイン 2 の先端は tRNA のアクセプターステムの末端と同様にリボソームの PTC でペプチジル tRNA のエステル結合に求核攻撃する GGQ モチーフを含む. 一方, eRF1 と安定な複合体を形成する eRF3 は3つドメイン (N 端からドメイン 1, 2, 3)から成る EF-Tu とよく似た構造が既に報告されており, eRF1 とドメイン 1 を削った eRF3 の複合体構造 (eRF1・eRF3 Δ domain 1)から eRF1 のドメイン C と eRF3 の相互作用様式は tRNA の T アームと EF-Tu の結合様式とよく似ていることも分かっている^{34,37} (図 1.10B, C). このように eRF1 の各ドメインは tRNA の各部位と構造的, 機能的関があり, これによって eRF1 は EF-Tu と構造がよく似た eRF3 と相互作用し, tRNA と同様にリボソームの A site に運ばれ, 翻訳伸長と同様リボソーム中での GTP 加水分解によって翻訳終結反応を行うと考えられている. このことは, eRF3・GTP 複合体の存在下ではその非存在下よりも翻訳終結効率が高いことで裏付けられている^{30,33}. リボソームの A site に入った eRF1 はドメイン A の終止コドン認識モチーフで終止コドンと相互作用し, その際のコンホメーション変化によって eRF3 の GTPase 活性を刺激して GTP を加水分解させることでさらにコンホメーションを変化させ, GGQ モチーフによるポリペプチド鎖の遊離を行うと考えられている³³ (図 1.11).

1.3.3 古細菌における翻訳終結機構

古細菌には class I 翻訳終結因子として aRF1 (archaeal Release Factor 1)が存在する. aRF1 は真正細菌の RF1, RF2 よりも真核生物の eRF1 とアミノ酸配列の相同性が高く, また eRF1 特有の終止コドン認識配列である NIKS/L モチーフや YxCxxxF 配列をもち, eRF1 と同様に3つの終止コドン全てを認識すると考えられている^{12,38}. さらに aRF1 の単体構造における各ドメインの形は eRF1 のそれらと非常によく似ていることが分かった¹² (図 1.12). これらのことから古細菌における翻訳終結機構は真核生物と似ていると考えられているが, 古細菌には class II 翻訳終結因子としての「aRF3」が存在しないことがゲノム解析によって示されており, 古細菌における翻訳終結機構はよく理解されていなかった³⁵.

1.4 リボソームレスキュー機構

1.4.1 真核生物におけるリボソームレスキュー機構

伸長過程のリボソームがなんらかの理由で mRNA 上で動けなくなった場合には、リボソームを mRNA から解離させ、さらにその原因となった mRNA を分解する必要がある。そのために、真核生物には Non-go decay や Nonstop decay といったリボソームレスキュー機構が存在する^{39,40}。

1.4.2 No-go decay (NGD)

No-go decay (NGD)は、*Saccharomyces cerevisiae* において mRNA 中のステムループやシェードノットなどの異常構造やレアコドンによって伸長過程のリボソームが動けなくなった場合に、そのような mRNA を切断・分解してリボソームを mRNA からレスキューする機構として 2006 年に同定された⁴¹ (図 1.13)。また、酵母の体内で脱プリン化された塩基を含む mRNA も NGD によって切断・分解される⁴²。mRNA の切断は、5'キャップやポリ A 鎖に保護されていない RNA 末端を露出させることでエキソリボヌクレアーゼに分解を促進するためであると考えられる。切断された mRNA は Dcp1・Dcp2 複合体による 5'キャップの除去、CCR4・NOT 複合体による 3'ポリ A 鎖の除去、エキソソームと Ski タンパク質による 3'→5'分解、Xrn1 による 5'→3'分解によって分解される³⁹。そして NGD による mRNA の切断に必要な因子として Dom34 と Hbs1 が同定されたが、後にこれらの因子は mRNA の切断のために重要ではあるが必須ではないことが明らかとなった⁴³。

1.4.3 Nonstop decay (NSD)

Nonstop decay (NSD)は、*Saccharomyces cerevisiae* において終止コドンに欠失した mRNA が速やかに分解される機構として 2002 年に同定され、またこの分解にはエキソソームと相互作用するタンパク質 Ski7 が必要であることが報告された^{44,45}。Ski7 の C 端ドメインは eEF1α や eRF3 といった eEF1α-like GTPase family タンパク質と相溶性が高いため、NSD は当初、終止コドンに欠失した mRNA を翻訳することでその 3'末端に達して動けなくなったリボソームの A site に Ski7 が相互作用してエキソソームをリクルートすることで起こると考えられていた⁴⁵。しかし後に、リボソームがポリ A 鎖を翻訳してポリリシンを合成した場合、リボソームが途中で動けなくなり、mRNA の切断が起こることが明らかとなった⁴³。ポリリシンによるリボソームの停止には RACK1 や Hel2 と呼ばれるタンパク質が関わっていることが分かっているが、詳しい機構は未解明である

^{43,46}. そしてポリリシンの合成によるリボソーム停止と mRNA の切断はリボソームに 36 個のポリ A を含む mRNA を翻訳させた時、既に起こっている ⁴³. 酵母の mRNA の 3' 末端のポリ A 鎖は通常 70-80 個ほどの A をもつため、このことを考慮すると、終止コドン を欠失した mRNA を翻訳したりリボソームがポリ A 鎖を全て通過してその 3' 末端に到達 するとは考えにくい ⁴⁷. さらに、ポリ A の翻訳に伴う mRNA の切断には Dom34 と Hbs1 が関与していることも明らかとなった ⁴³. このため NSD はリボソームがポリ A 鎖の途 中で動けなくなった場合の NGD であり、その分子メカニズムは NGD と本質的には同じ であると考えられている.

1.4.4 Dom34・Hbs1 複合体

Dom34 と Hbs1 は安定な複合体を形成するため、Dom34・Hbs1 複合体が NGD を引き起 こすと考えられる ⁴⁸. Dom34・Hbs1 複合体はこれまで NGD のみに関わるとされていたが、 NSD にも関わること、また機能不全の 18S rRNA を含むリボソームが翻訳伸長中に mRNA 上で停止した場合にそれを排除する 18S NRD (nonfunctional rRNA decay)にも関 与することも解明された ^{43,49,50}. さらに、Dom34 を欠損させると NGD によって切断され た mRNA のうちの 5' 側の切断産物が安定化することが報告されている ⁴³. これは、 Dom34 の非存在下では切断された mRNA の 5' 側の切断産物の 3' 末端で動けなくなった リボソームが mRNA から解離せず、切断 mRNA のエキソソームによる 3'→5' 分解が阻 害されるためであると考えられている. これらのことから、Dom34・Hbs1 複合体は mRNA 上で動けなくなったリボソームを mRNA から解離させてレスキューすること一 般に関わっていると考えられている. Dom34 は翻訳終結因子 eRF1 と類縁であることか ら、Dom34 は eRF1 と同様にリボソームの A site に入ると考えられている. Hbs1 は、翻訳 終結反応において eRF1 をリボソームの A site に運ぶ eRF3 と同じ eEF1 α -like GTPase family に属する G タンパク質であり、C 端の約 400 残基は eRF3 の翻訳終結を担う C 端 の約 400 残基とアミノ酸配列の相同性が高いことが分かっている ³⁵ (図 1.9). このことか ら Hbs1 は、停止したりリボソームの A site に Dom34 を運ぶと考えられている ⁵¹.

1.4.5 Dom34 の構造

S. cerevisiae 由来の Dom34 の構造を図 1.14A に示す. Dom34 は 3 つのドメイン A, B, C から成り, ドメイン B, C は eRF1 のドメイン B, C と形が似ている⁵². eRF1 のドメイン B, C は eRF3 の認識部位であるため, Dom34 もドメイン B, C で Hbs1 と結合すると考えられる. しかし eRF1 の GGQ モチーフを含むループに相当する Dom34 のループ C は eRF1 と比べると短い (図 1.10A, 1.14A). また Dom34 のドメイン B には高度に保存された PGF/Q モチーフが存在する (図 1.14A). ループ C と PGF/Q モチーフは NGD における mRNA の切断に重要な役割を果たすことが報告されている⁵¹. また, ドメイン A の構造は eRF1 と Dom34 で大きく異なる (図 1.10A, 1.14A). eRF1 はドメイン A に存在する終止コドン認識モチーフで終止コドン进行を認識すると考えられているため, このドメイン A の構造の違いが終止コドン进行を認識して翻訳を終結させる eRF1 と動けなくなったリボソームを認識してリボソームレスキューを行う Dom34 の機能の違いを反映していると考えられる. 実際, Dom34 のドメイン A 先端の 2 つのループ (ループ A とループ C) は NGD による mRNA の切断に重要な役割を果たすことが報告されている⁵¹.

1.4.6 古細菌におけるリボソームレスキュー機構

古細菌には Dom34 のオーソログである aPelota が存在し, その構造は yeast 由来の Dom34 とよく似ている⁵³ (図 1.14A, 1.14B). しかし古細菌には Hbs1 のオーソログが存在しないことが分かっており, このため古細菌におけるリボソームレスキュー機構はほとんど理解されていなかった³⁵.

1.5 古細菌由来翻訳伸長因子 aEF1 α の三重の特異性

以上のように古細菌には eRF1, Dom34 のオーソログである aRF1, aPelota が存在するにも関わらず, それぞれのパートナーである Hbs1, eRF3 のオーソログが存在しないことがわかっており, このことが古細菌における翻訳終結機構と NGD 機構における大きな謎であった. しかし我々は, 古細菌に存在する唯一の eEF1 α -like GTPase family タンパク質として同定されている aEF1 α が, aa-tRNA だけでなく aRF1, aPelota と相互作用することを我々は解明した¹². このことは, 真核生物の翻訳終結と NGD に似た機構が古細菌にも存在し, 古細菌では aEF1 α が aa-tRNA と結合してタンパク質合成を司るだけでなく aRF1 と結合して翻訳終結を行い, さらには aPelota と結合して NGD をも行う可能性を強く示唆する (表 1.4). (図 1.15)

1.6 本研究の目的 1

翻訳伸長因子による翻訳伸長反応に関しては、tRNA と EF-Tu の複合体構造が報告されて以来現在ではそのリボソーム内での挙動まで研究が進んでおり、詳細な反応メカニズムが既に解明されている^{1,3,4}。しかし、古細菌由来 aEF1 α がどのようにして tRNA だけでなく aRF1 や aPelota と結合して翻訳伸長の他に翻訳終結や NGD にも関与しうのかを説明する構造的根拠はこれまで得られておらず、aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体と aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造決定が待ち望まれている。さらに、aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体と aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造決定の意義は、単に古細菌由来翻訳伸長因子の特殊性を解明することにとどまらない。真核生物における翻訳終結も NGD も、それぞれの機構に中心的な役割を果たす eRF1·eRF3·GTP 複合体と Dom34·Hbs1·GTP 複合体の構造が決定されていないためにそれらの詳細な反応メカニズムは未解明である。そのため eRF1·eRF3·GTP 複合体と Dom34·Hbs1·GTP 複合体それぞれと似た機構で翻訳終結と NGD を行うと考えられる古細菌由来の aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体及び aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造決定は、真核生物の翻訳終結と NGD のメカニズムの解明を大きく前進させることが期待できる。そこで本研究では aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体及び aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造を X 線結晶構造解析により決定する。そして決定した構造をバクテリア由来 tRNA·EF-Tu 複合体構造と比較することで aEF1 α の三重の特異性の根拠を解明し、さらにこれらの複合体がリボソームレスキューと翻訳終結それぞれに関与するメカニズムを解明することを目指した。

1.7 真正細菌におけるリボソームレスキュー

1.7.1 tmRNA によるリボソームレスキュー機構

一方真正細菌において終止コドンに欠失した mRNA を翻訳した場合、リボソームはポリ A も通過してその 3'末端で動けなくなると考えられている。これは真核生物と違って真正細菌には伸長過程のリボソームを停止させる Hel2 などタンパク質が存在しないためであると考えられる。また、レアコドンによってリボソームが mRNA 上で動けなくなった場合はリボソームの A site で mRNA の切断が起こるため、この場合もリボソームは結果的に mRNA の 3'末端で動けなくなる⁴⁰。真正細菌には Dom34 も Hbs1 も存在しないが、*ssrA* 遺伝子から合成される tmRNA (トランス・メッセンジャーRNA)と呼ばれる tRNA と mRNA の両方の機能を備えた特殊な RNA が、動けなくなったリボソームのレスキューに関与する⁵⁴。tmRNA の二次構造と、それがリボソームをレスキューする

trans-translation と呼ばれる機構の概要を図 1.16, 1.17 に示す. tmRNA は 3'末端, 5'末端近傍の領域に tRNA-like domain をもち, この領域がアラニル tRNA 合成酵素と相互作用することでその 3'末端にアラニンが結合する. このようにしてアラニル化された tmRNA は EF-Tu や SmpB によって 3'末端で動けなくなったリボソームの A site に運ばれる. ここで tmRNA は P site の tRNA に結合したペプチドを tmRNA の 3'末端のアラニンに転移させるとともに, P site へと転移する. するとリボソームは翻訳の対象をそれまでの mRNA から tmRNA の coding region へと移すことで翻訳を再開し, それまでに合成されたペプチドに 11 残基のアミノ酸を付加した後に tmRNA 上の終止コドンに達し, 通常の機構で翻訳を終結させる. 異常 mRNA は RNase R などによって分解され, また合成された異常タンパク質は tmRNA によって付加されたタグ配列を目印として ClpP などによって分解される. このため tmRNA によるリボソームレスキューは真核生物や古細菌の NGD に相当する機構である.

1.7.2 EF-P によるリボソームレスキュー機構

また, 真正細菌において伸長過程で停止したリボソームをレスキューする新たな機構が発見された. リボソームによるアミノ酸の取り込み速度は A site の tRNA に結合したアミノ酸や P site の tRNA に結合したペプチド中のアミノ酸の種類に影響を受けることが知られている. 例えば aa-tRNA を擬態することでリボソームの A site に入って合成途中のペプチドの転移を受けることで翻訳を阻害する抗生物質であるピューロマイシンを用いて, P site 中の fMet-X-tRNA^X (X = Ala, Arg, Asp, Lys, Phe, Pro, Ser, Val) からピューロマイシンへのペプチジル転移の速度を測定した実験によると, X = Pro の場合ペプチジル転移の速度定数は 0.14 s^{-1} であり, 他のアミノ酸と比べると 10-1000 倍遅いことが分かった⁵⁵. また *in vitro* 翻訳によって fMet-Phe, fMet-Ala, fMet-Pro といったジペプチドが合成される時間を測定した実験によると, tRNA によるコドン認識に伴う EF-Tu の GTP 加水分解にかかる時間には大差がなかったものの, ジペプチドの合成には fMet-Pro は fMet-Phe や fMet-Ala と比べて 10 倍以上の時間がかかることが分かった⁵⁶. このようにプロリンは P site の tRNA に結合していても A site の tRNA に結合していてもリボソームの伸長速度を低下させる. この理由は明らかになっていないが, 1 つの可能性としてはプロリンのアミノ基は 5 環構造を形成してイミノ基となっているためフレキシビリティが低く, PTC においてペプチジル転移反応に有利なコンホメーションを取りにくいためであると考えられている. そのためプロリンのコドンが連続して 3 つ以上並んだ場合, リボソームは 2 番目のプロリンのコドン上で停止する^{57,58}.

しかし, 連続したプロリンのコドンによって停止したリボソームにはバクテリア由来

翻訳伸長因子の 1 つである EF-P が作用することが明らかとなった。P site 中の fMet-X-tRNA^X (X = Gly, Pro, Phe, Val, Trp, Lys, Arg, Gln, Glu, Asp) とピューロマイシンの反応速度は X = Pro 以外の場合は EF-P が存在しても 2 倍以下にしかならないが, X = Pro の場合は EF-P によって反応速度は 90 倍となる⁵⁸。また, EF-P は fMet-Pro-Gly の合成速度を 8 倍, fMet-Pro-Pro の合成速度を 16 倍に促進する⁵⁸。さらに EF-P は大腸菌の体内で, CadC という pH 依存的に働く転写因子のプロリンが連続した領域の翻訳を助けることでその合成を促進し, 活性を調節していることも明らかとなった⁵⁹。大腸菌にはプロリンが連続した領域を含むタンパク質が 100 個程度存在するため, EF-P は広くそれらのタンパク質の合成を助けている可能性が高い。

このように tmRNA がレアコドンや mRNA の 3'末端で停止したリボソームを mRNA から解離させることでレスキューするのに対して, EF-P は連続したプロリンのコドンによって停止したリボソームの翻訳を再開させるという異なる形でのリボソームレスキューを行う。

1.7.3 バクテリア由来伸長因子 EF-P

EF-P は 1975 年に発見された 21 kDa 程度のタンパク質である。バクテリアに広く保存されており, 真核生物/古細菌に存在する e/aiF5A (eukaryotic/archaeal initiation factor 5A) のオーソログでもある。その構造は tRNA とよく似ており, ドメイン I, II, III がそれぞれ tRNA のアクセプターステム, T アーム, アンチコドンアームに相当する⁶⁰ (図 1.18)。当初 EF-P は翻訳の開始過程においてリボソームと相互作用し, P site の開始 tRNA に結合した N-ホルミルメチオニンと A site の tRNA に結合したアミノ酸との間でのペプチド結合の形成を助ける因子として同定された⁶¹⁻⁶³。

しかし, EF-P が機能をもつためには高度に保存された Lys34 (大腸菌由来 EF-P での残基番号) に翻訳後修飾を受けることが必要である⁶⁴。この修飾には 3 つの酵素 YjeK, YjeA, YfcM が関わっている。YjeK はリシンのアミノ基を α 位から β 位に転移させる lysine 2, 3 aminomutase のホモログである。YjeA (PoxA, GenX と呼ばれる) は tRNA^{Lys} にリシンを結合させる lysyl-tRNA synthetase のパラログであるが, tRNA への結合に重要なアンチコドン結合ドメインは欠失しておりまた (S)- α -Lys との相互作用が非常に弱いため, tRNA にリシンを結合させる活性をもたない⁶⁵。一方 YfcM には既知のタンパク質との相同性はない。これらの修飾酵素による EF-P の翻訳後修飾経路を図 1.19 に示す。まず YjeK が生体内の (S)- α -Lys を (R)- β -Lys に変換する。次に, YjeA が (R)- β -Lys を EF-P の Lys34 の ϵ -アミノ基に付加する⁶⁶。EF-P は tRNA を擬態した構造をとっており, その Lys34 は tRNA の CCA 末端のアデニンに相当する。そのため YjeA は, lysyl-tRNA synthetase が tRNA^{Lys}

の CCA 末端のアデニンに(S)- α -Lys を付加するのと同じ機構で EF-P の Lys34 に(R)- β -Lys を ATP 依存的に付加する⁶⁶. そして最後に Lys34 の δ 炭素が YfcM によって NADPH 依存的に水酸化される⁶⁷. (R)- β -Lys の付加は特に重要であり, この修飾を受けた EF-P は修飾を受けていない EF-P と比べてリボソームへの親和性が 30 倍, fMet-Pro-Pro-Gly の配列を合成する最高速度が 4 倍上昇する⁵⁸.

eIF5A も EF-P の Lys34 に対応する Lys51 (*S. cerevisiae* 由来 eIF5A での残基番号)に翻訳後修飾を受けるが, その機構は EF-P とは大きく異なっている⁶⁴ (図 1.19). eIF5A では deoxyhypusine synthase (DHS) と deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) が Lys51 の修飾を行う. まず DHS が NAD 依存的にスペルミジンのアミノブチル基を eIF5A の Lys51 に付加する. 続いて DOHH が付加されたアミノブチル基の水酸化を行う. 修飾された eIF5A は EF-P と同様連続したプロリンのコドンによって停止したリボソームの翻訳を再開させる⁶⁸. aIF5A もスペルミジン修飾を受けることが知られているため, EF-P や e/aIF5A による連続したプロリンのコドンの翻訳促進機構は生物種を超えて自然界に広く保存されていると考えられる⁶⁴.

EF-P とリボソームと開始 tRNA の複合体構造によると EF-P はリボソームの P site と E site の間に結合し, P site の開始 tRNA の側面と相互作用している⁶⁹ (図 1.20A). また Lys34 はリボソームの PTC に向いているため, 翻訳後修飾によって付加されたリシンは PTC や P site の tRNA の 3'末端と直接相互作用できると考えられる^{64,69} (図 1.20B). このことから EF-P は P site の tRNA や PTC との相互作用によって P site の tRNA に結合したペプチドや fMet が A site の tRNA へのペプチジル転移を起こすために適した配向をとることを助けると考えられている.

1.7.4 EF-P の水酸化酵素 YfcM

YfcM は 21 kDa ほどの機能未知のタンパク質であったが, EF-P の Lys34 の水酸化に関わっていることが 2012 年に明らかとなった⁶⁷. しかし YjeK と YjeA による(R)- β -Lys 修飾によって EF-P による連続したプロリンコドンの翻訳効率が大きく上昇するのに対して, YfcM による水酸化は Lys-EF-P の活性にほとんど影響を与えない^{58,70}. また, *yjeA* や *yjeK* を欠損した大腸菌やサルモネラ菌株は *efp* の欠損株と似た表現形を示すのに対して *yfcM* の欠損株にはあまり影響は見られない⁷⁰. ただし Lys-EF-P と比べると, 水酸化を受けた Lys-EF-P はリボソーム中で *N*-ホルミルメチオニンをピューロマイシンに転移させる活性が上昇している⁷⁰. これらのことから, YfcM による水酸化は EF-P の活性に対して補助的な役割を果たしていると考えられている. Lys34 に付加されたヒドロキシル基の役割の 1 つとして, PTC でヒドロキシル基の水素が P site の tRNA の CCA 末端の

リン酸と水素結合を形成することで CCA 末端がペプチジル転移に適した配向をとることを助ける可能性が提唱されている⁶⁷.

しかし, YfcM は現在知られているいかなる水酸化酵素や他のタンパク質ともアミノ酸配列の相同性が低く, NADPH によって活性が上昇すること以外にそれが EF-P を水酸化する機構は不明である.

1.8 本研究の目的 2

現在までの研究によると YfcM による Lys-EF-P の水酸化は Lys-EF-P の活性にはあまり影響を与えず, また *yfcM* を欠損させても特徴的な表現形は現れないため, YfcM は生体における重要なタンパク質とは考えられていない. しかし YfcM は, スプライシング因子 U2AF65 のリシン残基を水酸化する JMJD6 や eIF5A のハイパーシニン化修飾において水酸化を行う DOHH を含む他の水酸化酵素とはアミノ酸配列が明らかに異なるため, 独自の機構で EF-P の Lys34 を水酸化していると考えられる. そのため YfcM が EF-P を水酸化する機構は酵素学的に非常に興味深い. 本研究では YfcM の構造を X 線結晶構造解析によって決定することで YfcM の活性部位を同定するとともに YfcM が EF-P を水酸化する機構を解明することを目指した.

1.9 本研究の概要

第2章の概要

第2章では古細菌における翻訳終結因子複合体である aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の構造機能解析について述べる。まず古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来 aRF1 と aEF1 α を、大腸菌タンパク質発現系を用いて大量発現させ、その後カラムクロマトグラフィーによって精製した。そして精製サンプルを 5 mM GTP, 5 mM MgCl₂ 存在下で混合し、さらにプロテアーゼを加えて結晶化を阻害するフレキシブルな領域を切断しながら結晶化を行った所、最高で 2.3 Å まで回折する結晶を得ることができた。そして得られた回折データを用いて分子置換法を行い、その後のモデル構築と精密化によって最終的に aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の構造を 2.3 Å の分解能で決定することに成功した。aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の構造はバクテリア由来翻訳伸長因子 EF-Tu の、tRNA と、GTP の非水解アナログである GDPNP の複合体構造とよく似ており、aRF1 が tRNA の形状を擬態することで aEF1 α の tRNA 認識部位と結合することが明らかとなった。また tRNA のアンチコドン は aRF1 の終止コドン認識モチーフ、アミノ酸を結合する CCA 末端は aRF1 では P site tRNA からタンパク質を放出させる GGQ モチーフに相当する位置にあることが分かった。そしてこれらの発見に基づいて、aRF1 が終止コドンを認識する機構と P site tRNA からタンパク質を放出させる機構を考察した。

第3章の概要

第3章では古細菌において NGD を行う複合体である aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造機能解析について述べる。まず古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来 aPelota と aEF1 α を、大腸菌タンパク質発現系を用いて大量発現させ、その後カラムクロマトグラフィーによって精製した。そして精製サンプルを 5 mM GTP, 5 mM MgCl₂ 存在下で混合して結晶化を行った結果、最高で 2.3 Å まで回折する結晶を得ることができた。次に、aPelota とセレノメチオニンで標識した aEF1 α の複合体結晶を調製して同様に X 線回折実験を行い、単一波長異常分散法による位相決定を行った。その後のモデル構築と精密化を経て、最終的に aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造を 2.3 Å の分解能で決定することに成功した。決定した aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造中では aPelota は aRF1 と同様 tRNA の形状を擬態することで aEF1 α の tRNA 認識部位と結合していた。しかし aPelota は遊離型の tRNA よりもリボソーム A site でコドンと対合した状態の tRNA をより擬態していた。そしてこの複合体とリボソームのドッキングモデルを構築した所、aPelota はコドンと対合した状態の tRNA の構造を予め擬態することでリボソームの DC と直接相互作用していた。これらの構造的知見とそれに基づいた機能解析により NGD の分子機構について多面的な討論を展開した。

第 4 章の概要

第 4 章では真性細菌において連続するプロリンコドンの翻訳を助けるタンパク質である EF-P の高度に保存された Lys34 を水酸化修飾するタンパク質 YfcM の構造機能解析について述べる。まず *Escherichia coli* 由来 YfcM を、大腸菌タンパク質発現系を用いて大量発現させ、その後カラムクロマトグラフィーによって精製した。そして精製サンプルをプロテアーゼ存在下で結晶化した所、最高で 1.45 Å まで回折する結晶を得ることができた。次に、セレノメチオニンで標識した YfcM 結晶を調製して同様に X 線回折実験を行い、多波長異常分散法による位相決定を行った。その後のモデル構築と精密化によって最終的に YfcM の構造を 1.45 Å の分解能で決定することに成功した。決定した YfcM の構造は先行研究で報告されたいかなるアミノ酸水酸化酵素とも異なる構造であったが、2 価金属イオン依存的に RNA を分解するエキソリボヌクレアーゼである YbeY の構造と似ていた。また YfcM は水酸化酵素の活性部位に特徴的な Fe(II)イオン配位モチーフである 2-His-1-carboxylate モチーフを持っていたが、興味深いことにこのモチーフは YbeY の活性部位において 2 価金属イオンを配位する 3 つのヒスチジン残基モチーフと同じ位置にあることが分かった。そしてこれらの発見とそれに基づいた機能解析により、YfcM が EF-P の Lys34 を水酸化修飾する機構を考察した。

第 5 章の概要

第 5 章では本研究での成果をまとめるとともに翻訳終結や NGD や EF-P の作用機構におけるその後の報告について触れ、現在までに分かっているこれらの反応の分子機構の詳細や今後解明すべき事柄について総合的に議論する。また翻訳因子の分子進化についても触れる。

第 1 章の表

		2 nd letter					
		U	C	A	G		
1 st letter	U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U	3 rd letter
		UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C	
		UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A	
		UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G	
	C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Ser	U	
		CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Ser	C	
		CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A	
		CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G	
	A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U	
		AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C	
		AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A	
		AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G	
	G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U	
		GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C	
		GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A	
		GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G	

表 1.1 遺伝暗号表

	粒子構成	rRNA	タンパク質の数
Bacteria (70S)	50S	5S, 23S	34
	30S	16S	23
Archaea (70S)	50S	5S, 23S	40
	30S	16S	28
Eukaryotes (80S)	60S	28S, 5.8S, 5S	46
	40S	18S	32

表 1.2 リボソームの粒子構成⁷¹

	Bacteria	Eukaryotes	Archaea
Class I	RF1 (UAA, UAG)	eRF1 (UAA, UAG, UGA)	aRF1 (UAA, UAG, UGA)
	RF2 (UAA, UGA)		
Class II	RF3	eRF3	-

表 1.3 翻訳終結因子 (RF)

	Elongation		Termination		No-go decay		Ribosome recycling
	GTPase	Partner	GTPase	Partner	GTPase	Partner	
Eukaryotes (Yeast)	eEF1 α	aa-tRNA	eRF3	eRF1	Hbs1	Pelota (Dom34)	ABCE1 (Rli1)
Archaea	aEF1 α	aa-tRNA	aEF1 α	aRF1	aEF1 α	aPelota	aABCE1
Bacteria*	EF-Tu	aa-tRNA	-	-	-	-	-

*In bacterial, factors for elongation only are shown because the reaction mechanisms of other processes are different from those in eukaryotes and archaea.

表 1.4 伸長, 終結, NGD, リボソームリサイクルに関わる因子⁷²

第 1 章の図

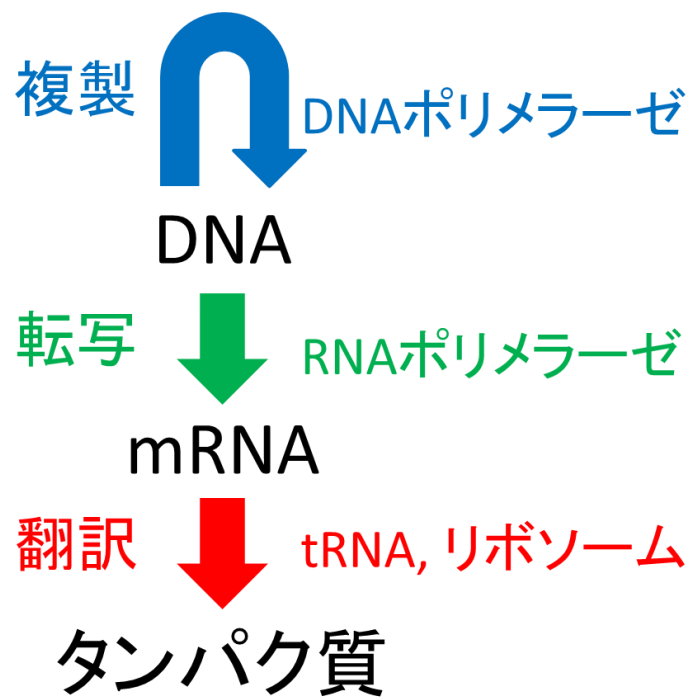
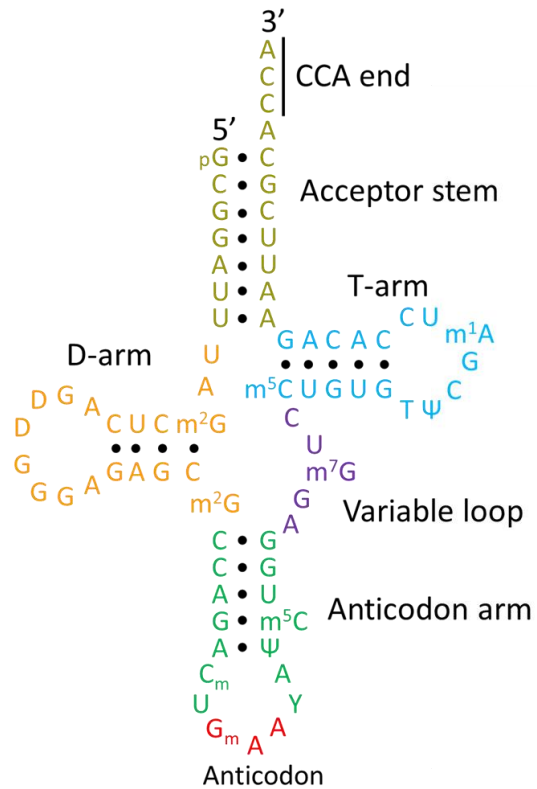


図 1.1 遺伝情報の流れ

A



B

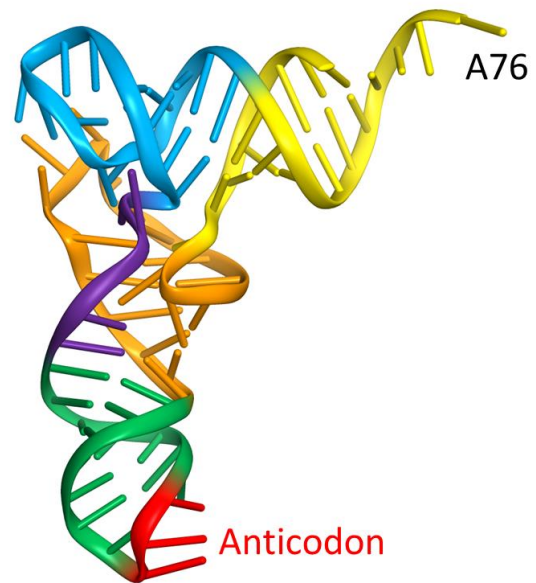


図 1.2 tRNA の形状

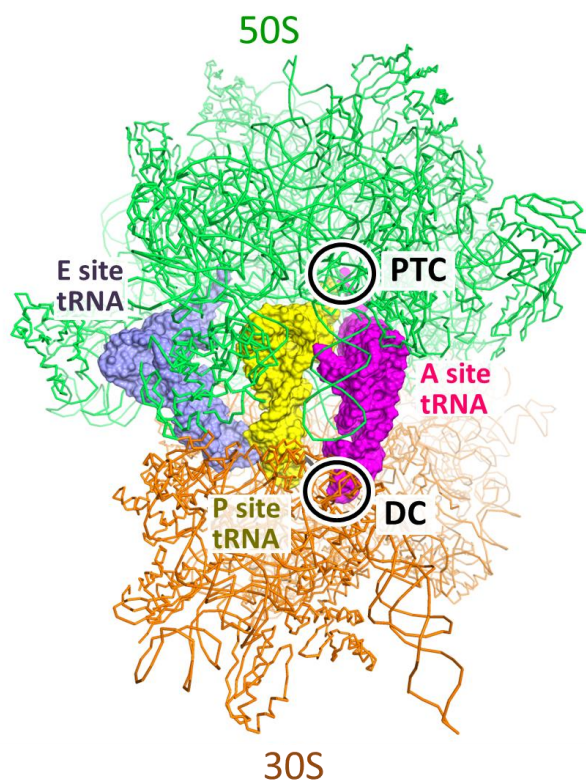
(A) tRNA の二次構造.

Acceptor stem は黄色, T-arm は水色, Variable loop は紫色, Anticodon arm は緑色, Anticodon は赤, D-arm は橙色で表している

(B) tRNA の立体構造 (PDB ID: 1TTT)

配色は A と同様

A



B

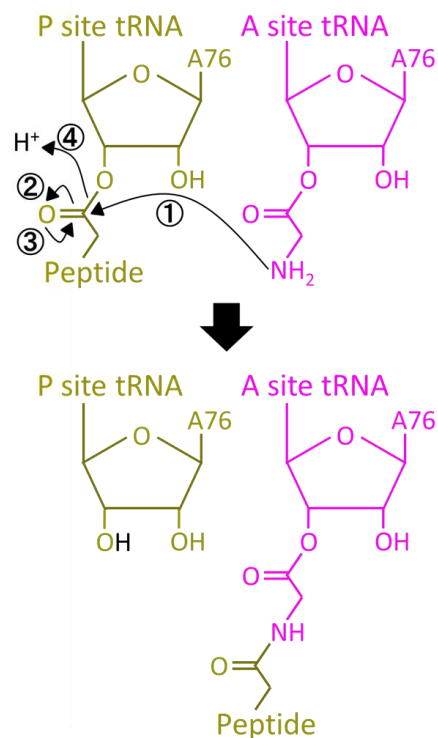


図 1.3 リボソームによるペプチジル転移反応

(A) *Thermus thermophilus* 由来リボソームの mRNA, tRNA との複合体構造 (PDB ID: 2WDK, 2WDL)

リボソームの 30S サブユニットは茶色, 50S サブユニットは緑で示されている. tRNA は表面図で表されており, A site tRNA は紫色, P site tRNA は黄色, E site tRNA は青で示してある. DC (Decoding center) と PTC (Peptidyl transferase center) が黒丸で囲ってある

(B) PTC におけるペプチジル転移反応の分子機構²

配色は A と同様. 電子の動きを矢印で示す.

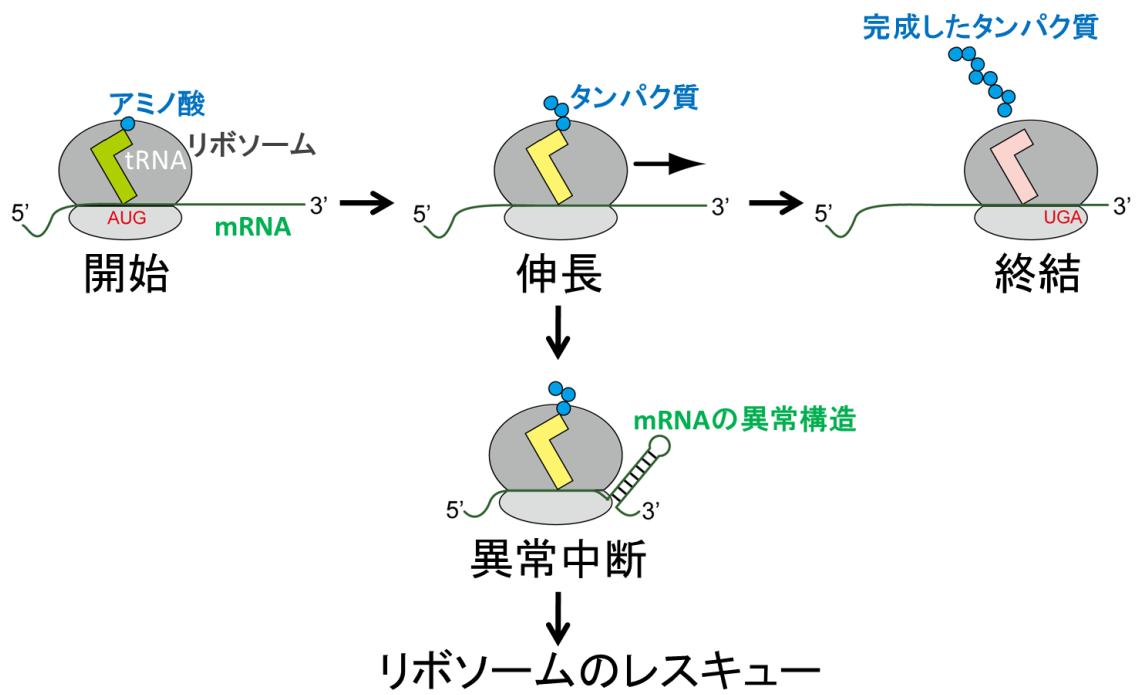


図 1.4 翻訳における制御機構

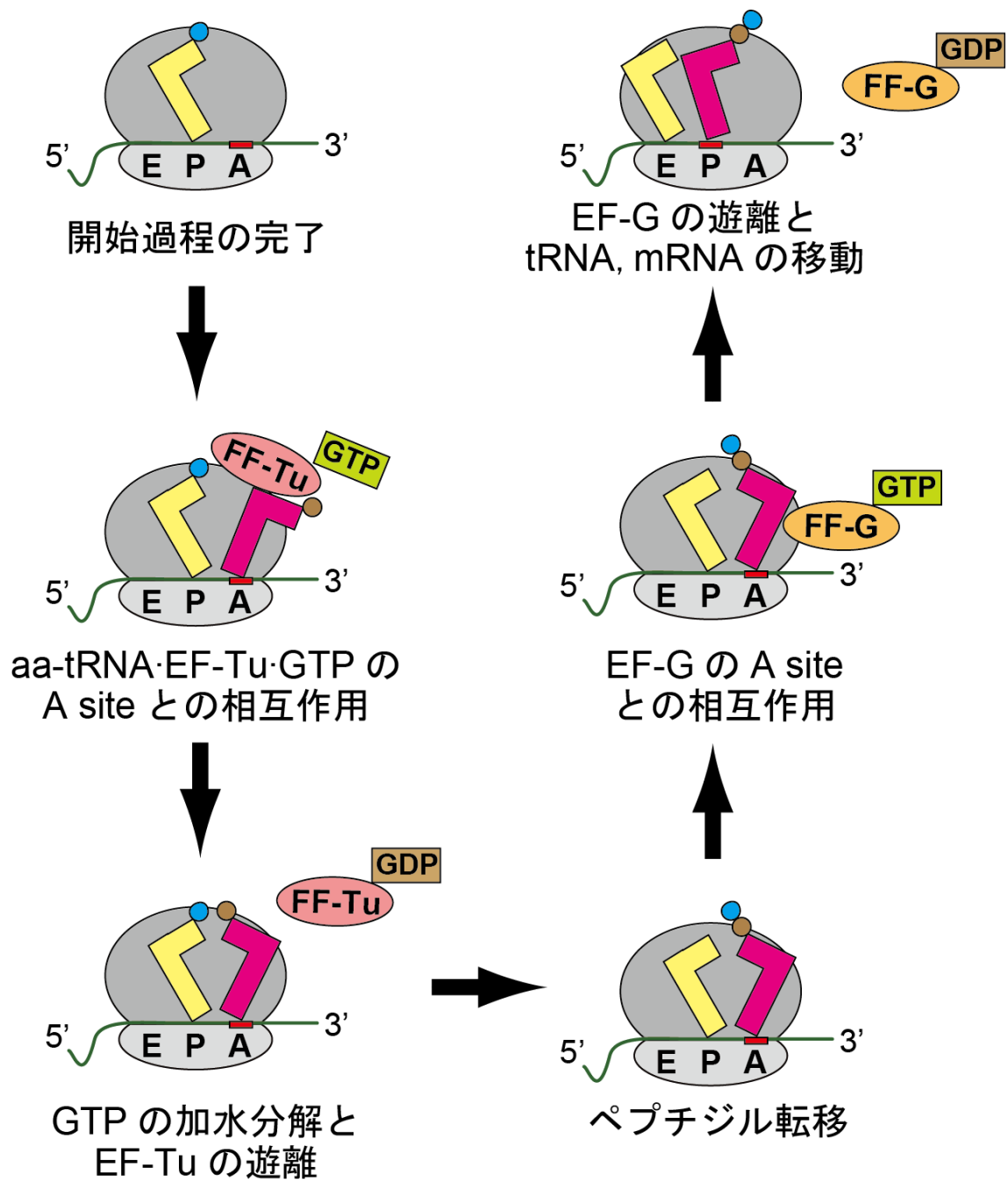


図 1.5 翻訳伸長機構

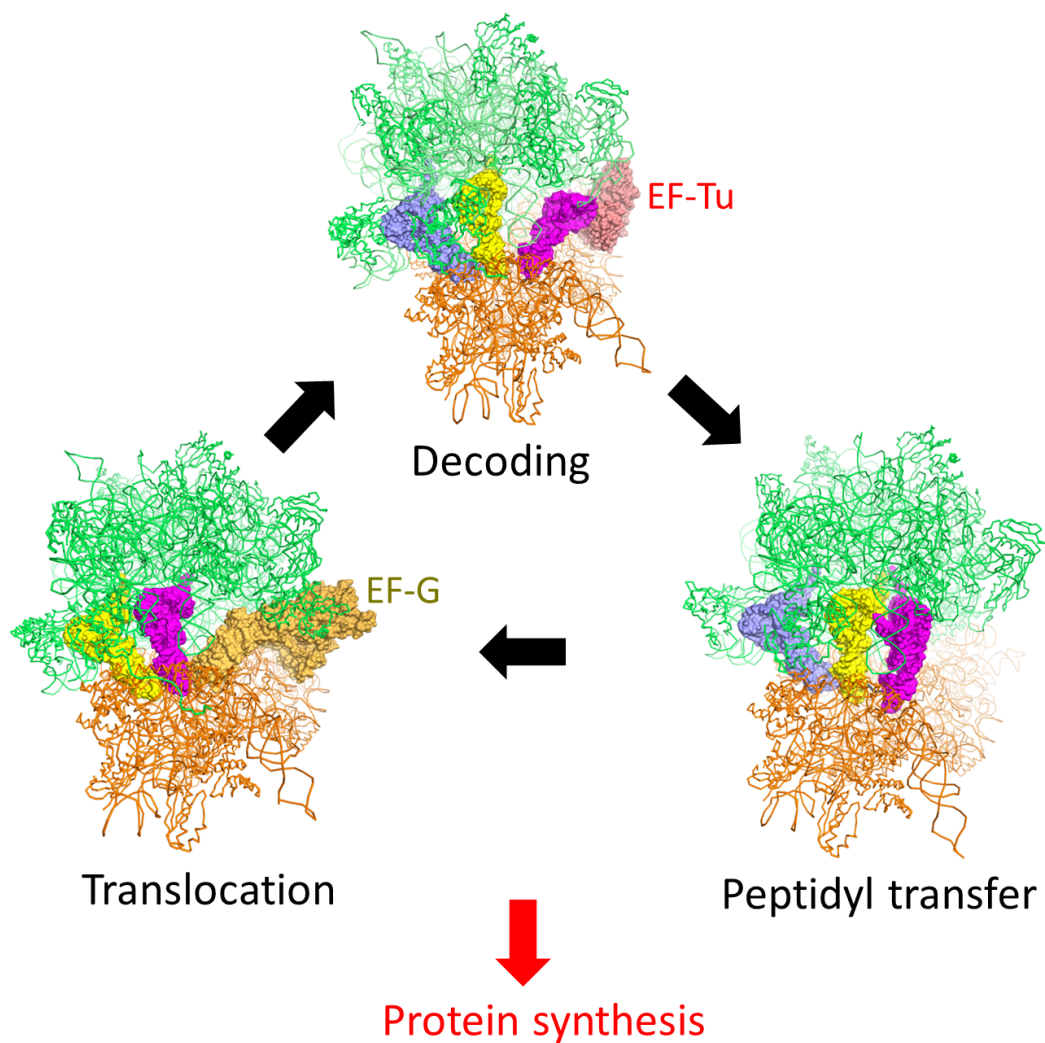


図 1.6 翻訳伸長における Decoding (PDB ID: 2WRQ, 2WRR), Peptidyl transfer (PDB ID: 2WDK, 2WDL), Translocation (PDB ID: 2WRI, 2WRJ)状態を捉えた構造. 配色は図 1.3 と同じ. EF-Tu は赤, EF-G は茶色で示してある.

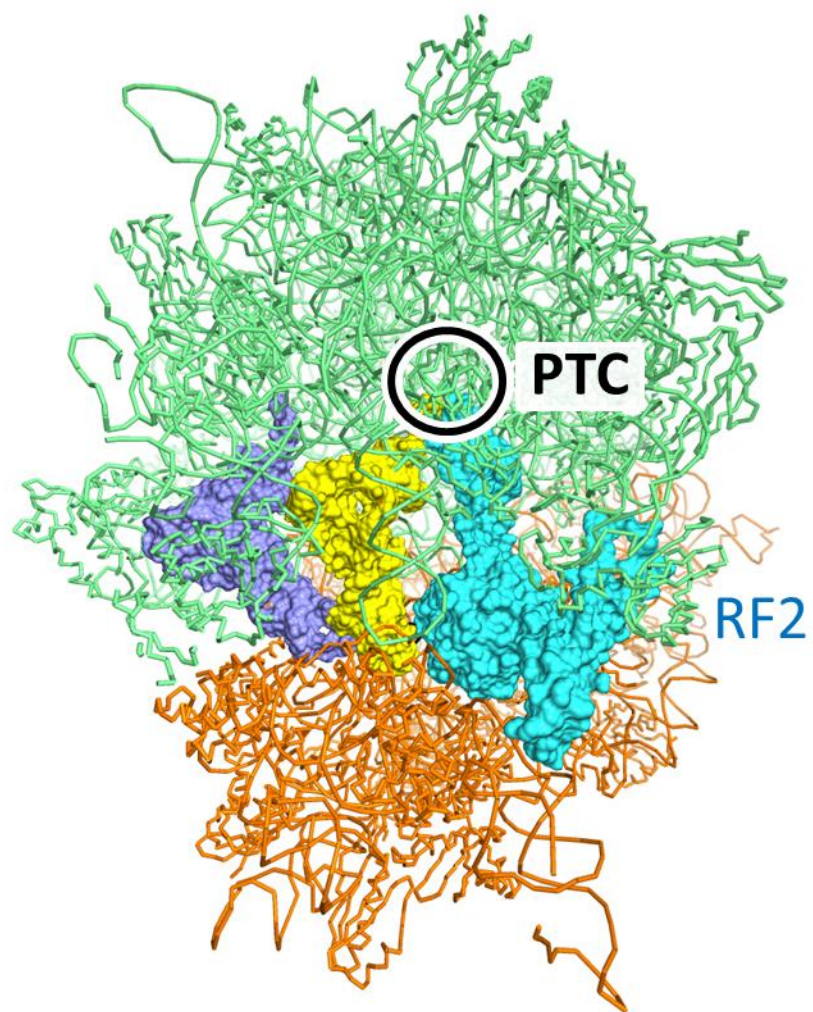


図 1.7 *Thermus thermophilus* 由来リボソームの RF2 との複合体構造 (PDB ID: 2WH1, 2WH2). 配色は図 1.3 と同じ. RF2 は青緑色で示してある.

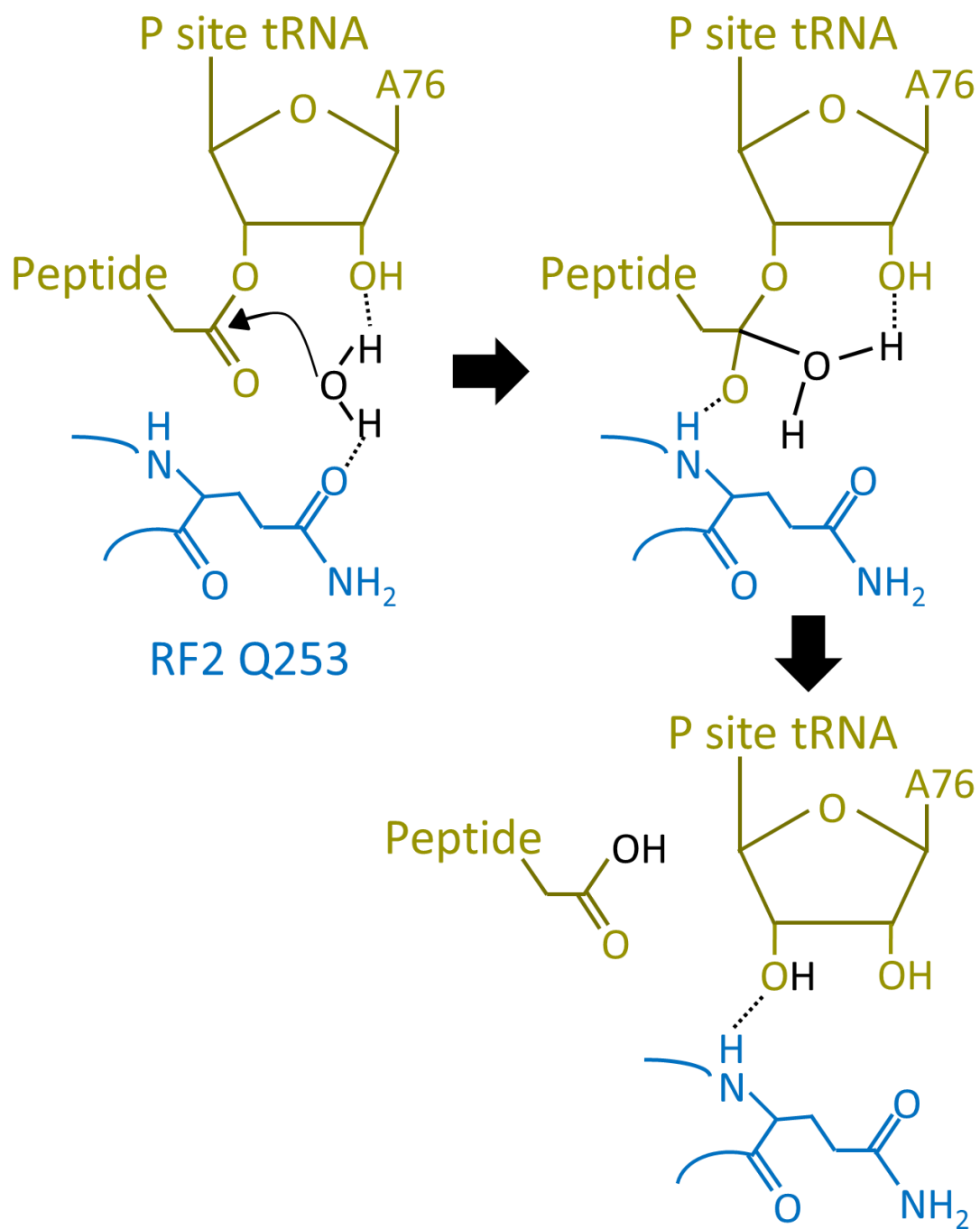


図 1.8 RF2 の GGQ モチーフがタンパク質を P site tRNA から放出させる分子機構⁷³

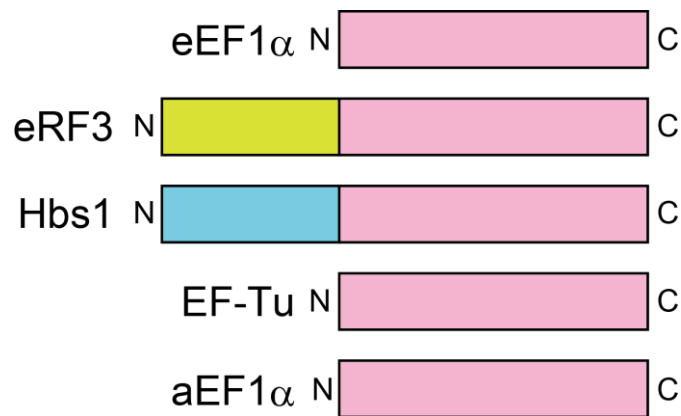


図 1.9 eEF1 α , eRF3, Hbs1, EF-Tu, aEF1 α の配列相同性

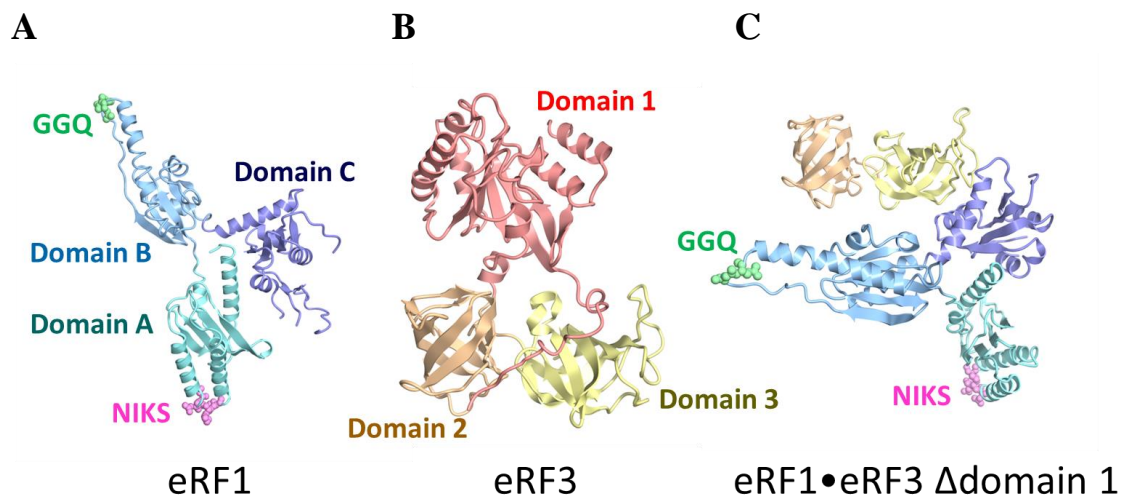


図 1.10 eRF1, eRF3 の構造

- (A) *Human* 由来 eRF1 の構造 (PDB ID: 1DT9). ドメイン A を青緑色, ドメイン B を水色, ドメイン C を紫色で示してある. GGQ モチーフと NIKS モチーフは anisou モデルでそれぞれ緑色, 桃色で示してある.
- (B) *Schizosaccharomyces pombe* 由来 eRF3 の構造 (PDB ID: 1R5O). ドメイン 1 を赤, ドメイン 2 を茶色, ドメイン 3 を黄色で示してある.
- (C) *Human* 由来 eRF1•eRF3 Δ domain 1 の構造 (PDB ID: 3E1Y). 配色は A, B と同じ.

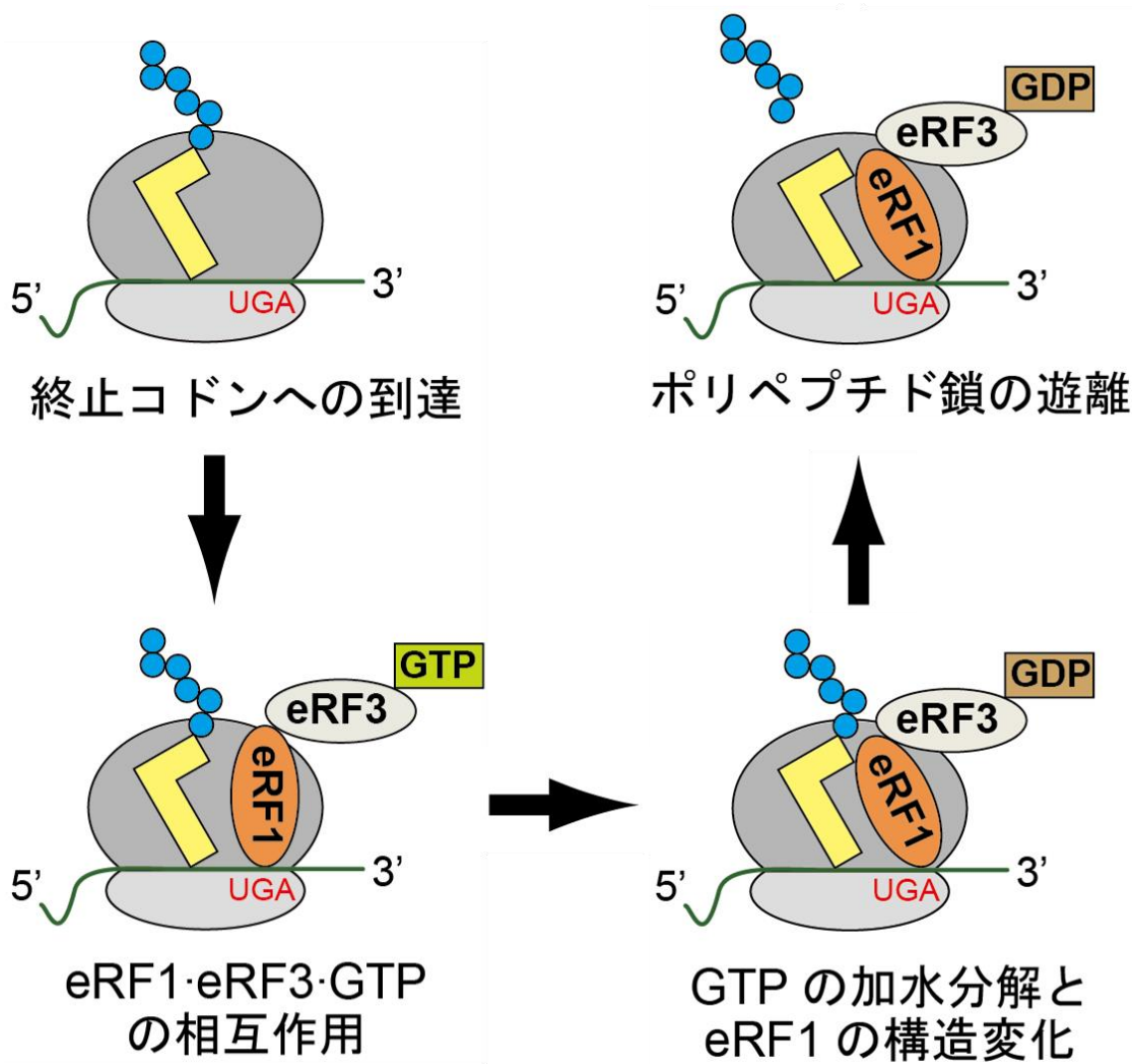


図 1.11 eRF1・eRF3・GTP 複合体による翻訳終結機構

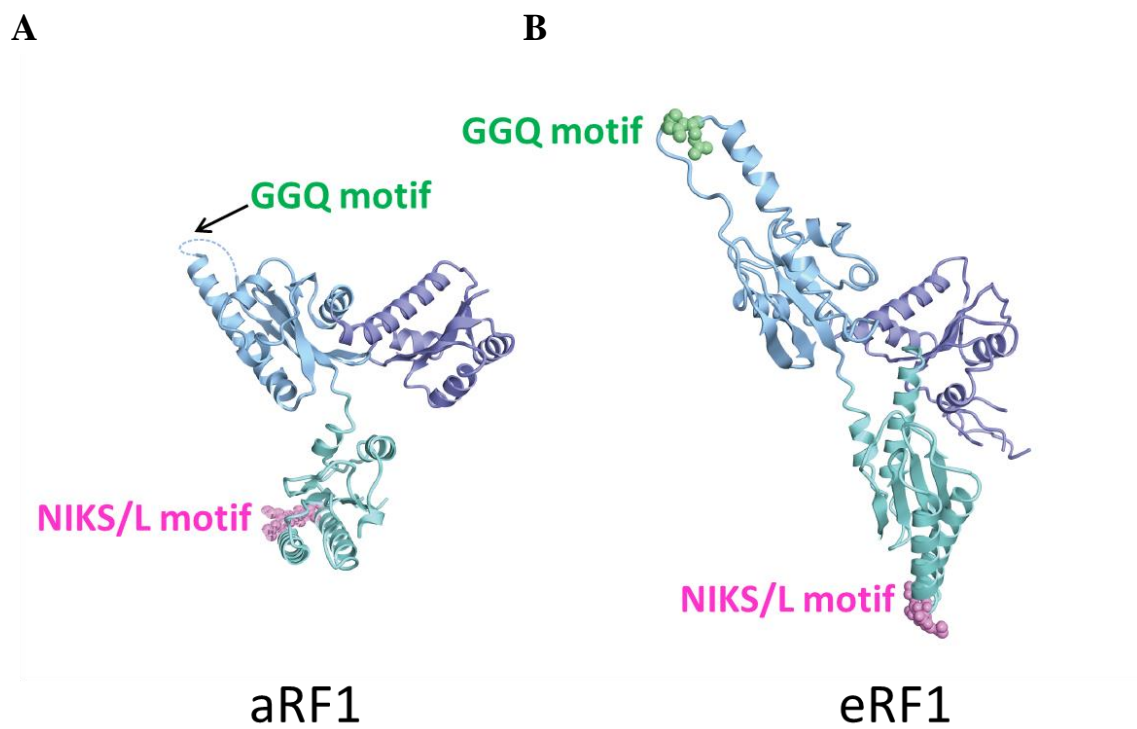


図 1.12 aRF1 と eRF1 の構造比較

(A) *Aeropyrum pernix* 由来 aRF1 の構造 (PDB ID: 3AGK). 配色は図 1.10A と同じ.

(B) *Human* 由来 eRF1 の構造. 配色は図 1.10A と同じ.

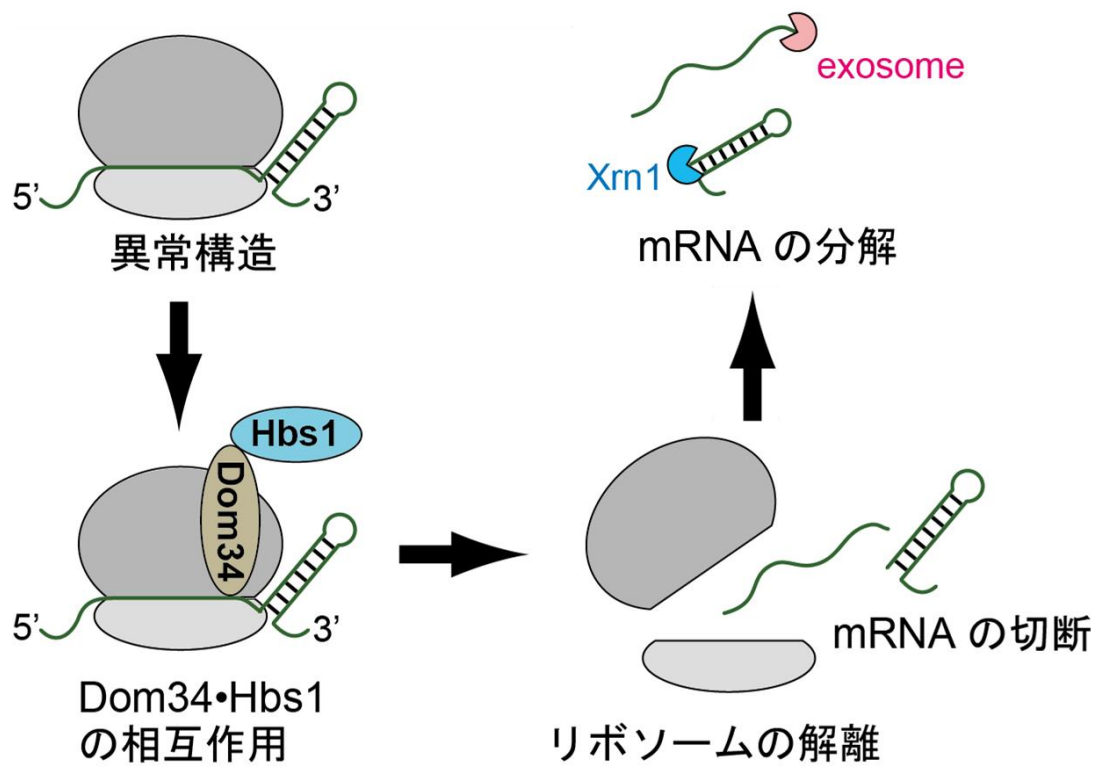


図 1.13 Dom34・Hbs1 複合体による NGD の機構

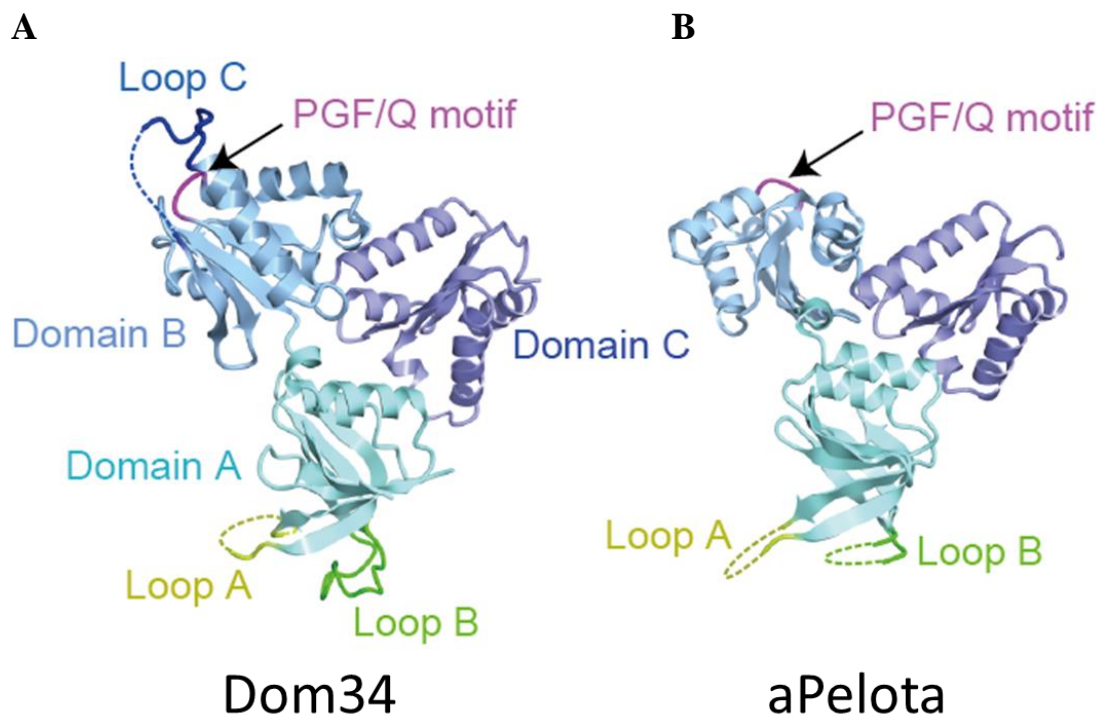


図 1.14 Dom34 と aPelota の構造比較

(A) *Saccharomyces cerevisiae* 由来 Dom34 の構造 (PDB ID: 2VGM). 配色は図 1.10A と同じ

(B) *Thermoplasma acidophilum* 由来 aPelota の構造 (PDB ID: 2QI2). 配色は図 1.10A と同じ.

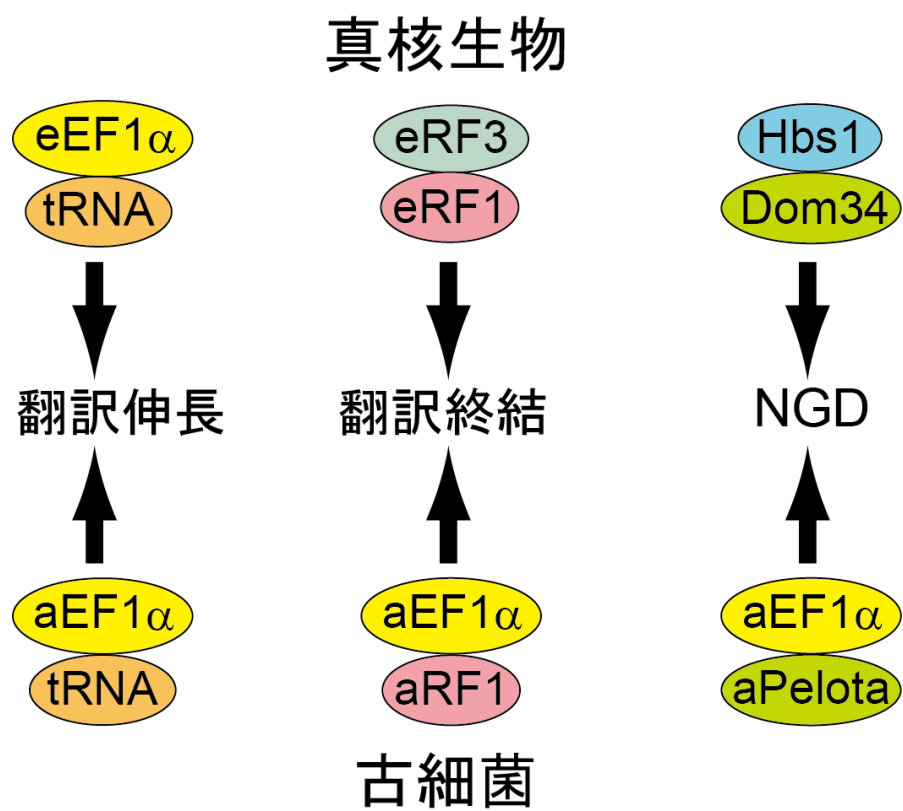


図 1.15 古細菌 aEF1αの 3 つの役割

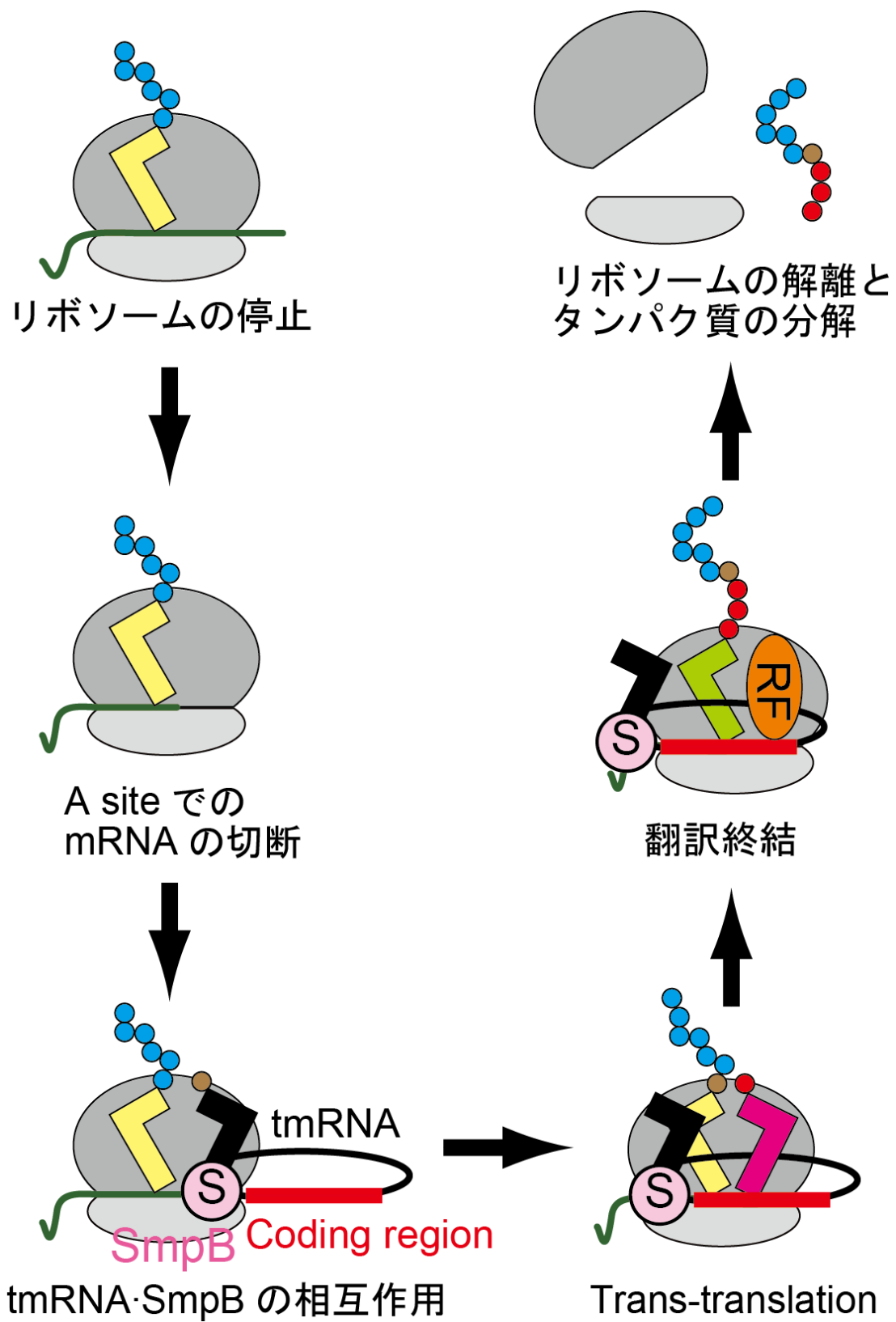


図 1.17 tmRNA による trans-translation の機構

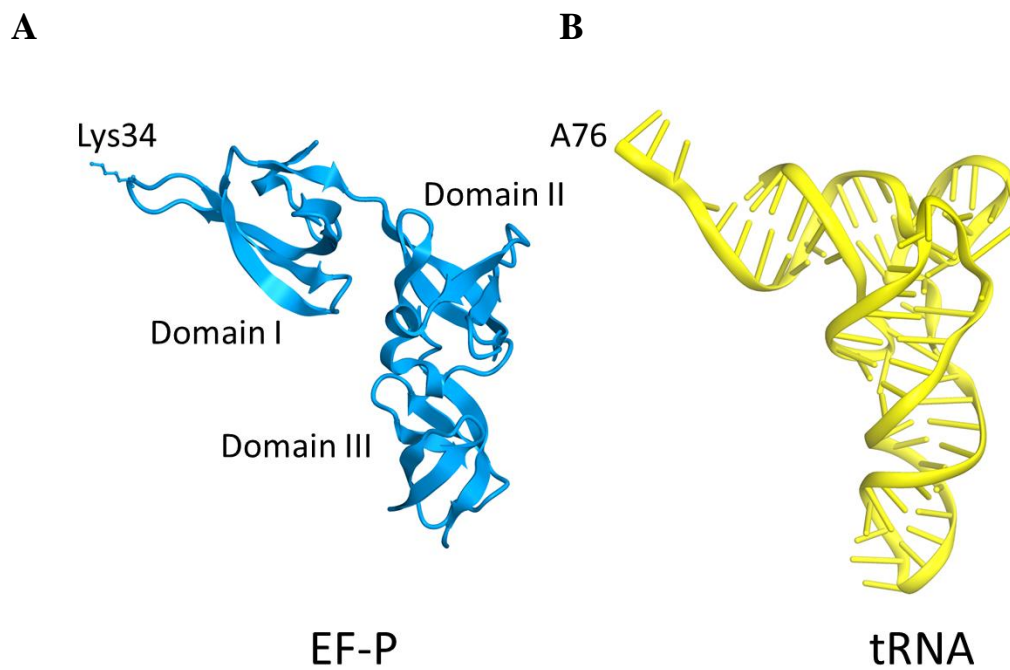


図 1.18 EF-P と tRNA の構造比較

(A) *Escherichia coli* 由来 EF-P の構造 (PDB ID: 3A5Z)

(B) tRNA の構造 (PDB ID: 3HUY)

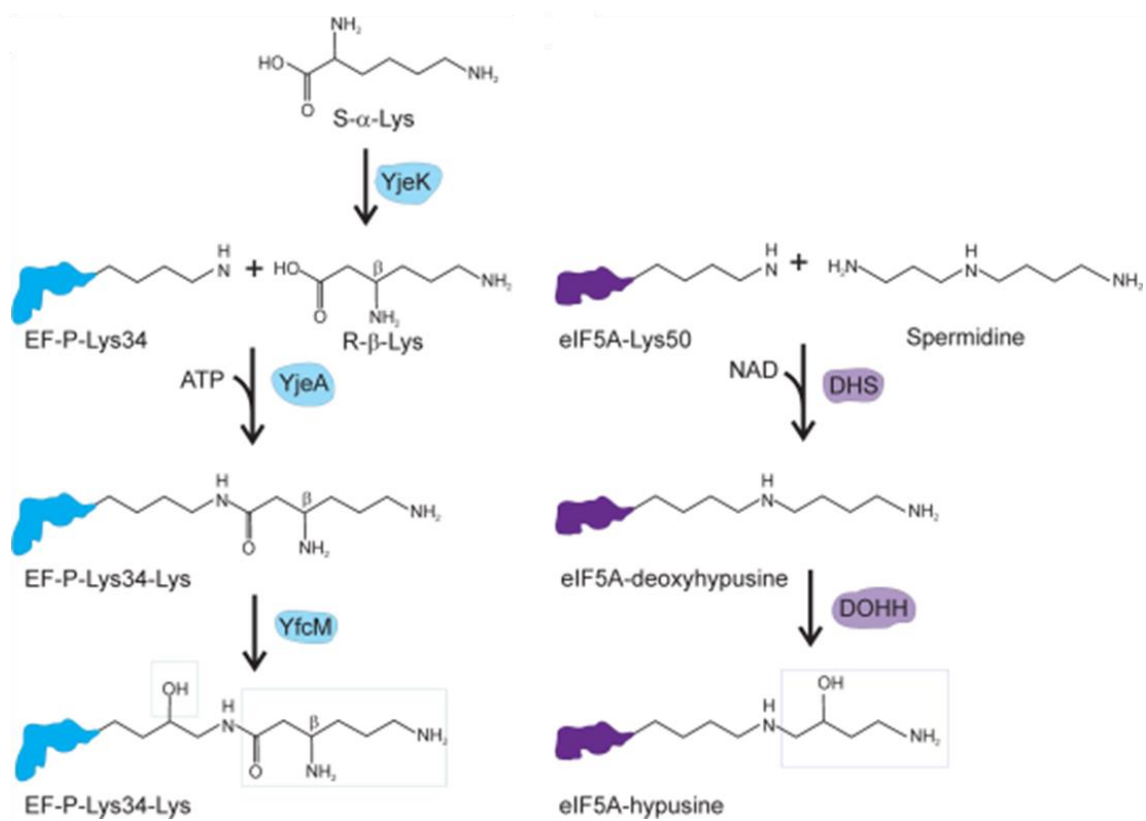


図 1.19 EF-P と eIF5A の翻訳後修飾機構⁶⁴

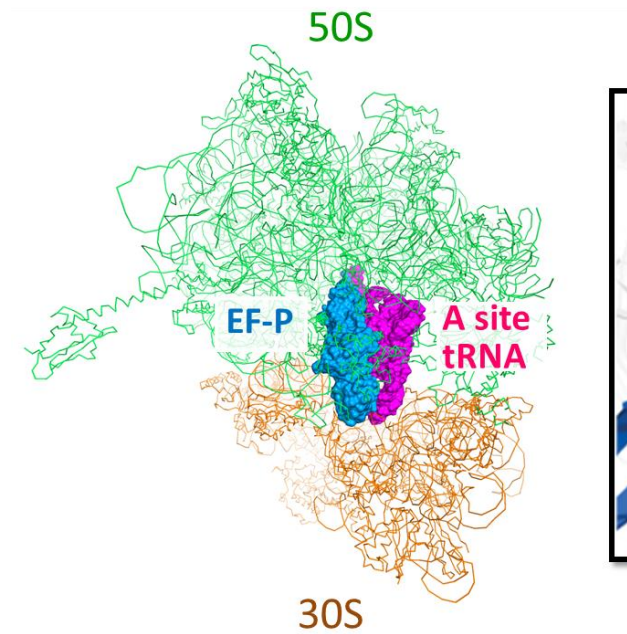
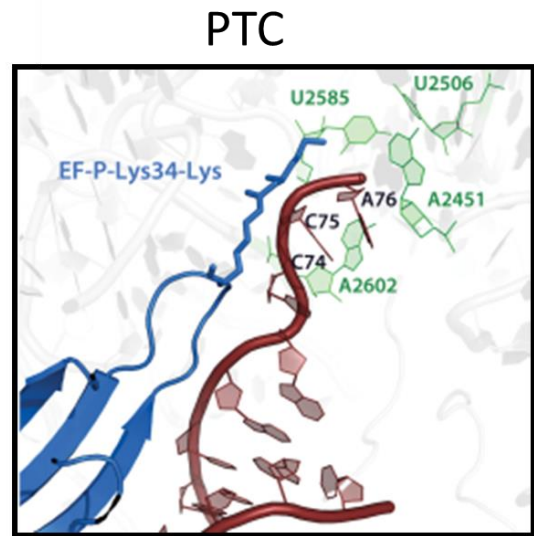
A**B**

図 1.20 リボソーム中での EF-P の挙動

(A) *Thermus thermophilus* 由来リボソームの EF-P との複合体構造(PDB ID: 3HUY, 3HUZ)

(B) 修飾を受けた EF-P の Lys34 のリボソームとの複合体モデルの PTC 周辺 ⁶⁴

第2章 aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の構造機能解析

2.1 実験材料と方法

2.1.1 *Aeropyrum pernix* aEF1 α の調製

aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体における aEF1 α の構造決定は, aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造解析において決定した構造に基づいて行った. そのため aEF1 α の調製方法は第3章にて述べる.

2.1.2 *Aeropyrum pernix* aRF1 の調製

aRF1 の発現系は, 古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来 aRF1 遺伝子をプラスミド pET15b に組み込んだものである. このプラスミドを含んだ *E.coli* BL21(DE3)Codon Plus を用いて aRF1 を発現させた.

プラスミドを含んだ大腸菌を 25 mg/L カナマイシンを含む LB 培地中で 37°C にて培養した. 濁度が OD₆₀₀ = 0.6 に達した時点で培養液を氷冷し, その後終濃度が 0.5 mM になるように IPTG を添加して aRF1 の発現を誘導した. 発現誘導後は培養温度を 20°C に下げ, 一晚培養した. その後, 菌体を遠心 (4500 rpm, 10min) により回収した.

回収した菌体を懸濁緩衝液に懸濁し, 氷上にて超音波破碎した. 以下の作業は特に断りのない限り, 4°C にて行った. この懸濁液を遠心 (13500 rpm, 40 min) し, 不溶性画分を沈殿させた. この上清を回収し, 低速で振とうしながら, 70°C で 30 分間熱処理することで大腸菌由来のタンパク質を変性・沈殿させた. これを氷上で急冷した後, 再び遠心 (13500rpm, 40min) を行うことで不溶性画分を沈殿させた. aRF1 は低塩濃度では溶解度が低下するが, イオン交換樹脂に吸着させる為には低塩濃度にすることが必須なため, 得られた aRF1 を含む上清を透析膜に注入し, 透析緩衝液 1 を用いて 4°C にて一晚透析した. 透析後, 沈殿が観察されたため透析産物を遠心し (13500 rpm, 40 min), 得られた上清を透析緩衝液で平衡化した 40 mL の Q-Sepharose 樹脂 (GE Healthcare) にロードした. 次に, 5 カラム容量の透析緩衝液にて樹脂の洗浄を行った. その後, グラジエント作成装置と Q-Sepharose A, B 緩衝液を用いて 100 mM から 1050 mM の NaCl の直線濃度勾配により aRF1 の溶出を行った. 素通り画分および洗い画分について SDS-PAGE を行い, aRF1 が含まれることを確認した. 以下, 特に断りがない場合, アクリルアミド濃度は 12.5% とする. なお, SDS-PAGE のアクリルアミドゲルの組成については表 2.1.1 に示す. また, アクリルアミドゲルの染色には CBB を用いた.

次に, 疎水性カラムクロマトグラフィーによる精製を行った. カラムは Resource PHE

6 mL (GE Healthcare)を用いた。まず、Q-Sepharose カラムで精製したサンプルに硫酸アンモニウムの終濃度が 0.8 M になるように Resource PHE A 緩衝液を加えた後に 0.22 μ m のフィルターに通し、0.8 M 硫酸アンモニウムを含む Resource PHE B 緩衝液で平衡化したカラムにロードした。同じ緩衝液にて 2 カラム容量分の洗浄を行った後、Resource PHE A, B 緩衝液を用いて 0.8 M から 0 M の硫酸アンモニウムの直線濃度勾配により aRF1 を溶出した。aRF1 の溶出を SDS-PAGE にて確認し、Q-Sepharose A 緩衝液を用いて 4 °C にて一晩透析した。

そして、さらにアフィニティークロマトグラフィーによる精製を行った。カラムは Heparin 5 mL (GE Healthcare)を用いた。透析後回収したサンプルを 0.22 μ m のフィルターにかけ、100 mM NaCl を含む Heparin A 緩衝液で平衡化したカラムにロードした。同じ緩衝液にて 2 カラム容量分の洗浄を行った後、Heparin A, B 緩衝液を用いて 100 mM から 1000 mM への NaCl の直線濃度勾配により aRF1 を溶出した。aRF1 の溶出を SDS-PAGE にて確認し、透析緩衝液 2 を用いて 4 °C にて一晩透析した。透析後、回収したサンプルの波長 280 nm における吸光度を測定し、モル吸光係数 $\epsilon_{280\text{nm}} = 31525$ としてタンパク質濃度を見積もった。このサンプルを Amicon Ultra-4 (M.W.C.O 10 kDa)を用いた限外ろ過法により 20.0 mg/mL まで濃縮した。緩衝液の組成を表 2.1.2 に示す。

2.1.3 aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶化

aRF1 と aEF1 α のモル比が等しくなるように両者を混合し、さらに GTP と MgCl₂を終濃度 5 mM になるように加えることで、aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体を調製した。aRF1 と aEF1 α の終濃度はそれぞれ 14.9 mg/mL と 17.3 mg/mL となった。そしてこれを 10000 g で 10 分遠心した上清を結晶化サンプルとした。結晶化は自動結晶化装置 Hydra II plus One (Matrix)と Mosquito (BioLab)を用い、シッティングドロップ蒸気拡散法により 20 °C にて行った。結晶化条件の初期スクリーニングには Crystal Screen I/II, Natrix, PEG/ION Screen, Index I/II, Salt RxTM (以上 Hampton Research), PACT, JCSG+ (以上 QIAGEN), JB Screen Classic 1, 2, 4, 5 (Jena Bioscience), Wizard I/II (Emerald BioSystems)を用いた。

そして初期スクリーニングで結晶が得られた条件について、沈殿剤濃度、pH、結晶化の温度を変化させることで結晶化条件の最適化を行った。また、Additive Screen (Hampton Research)を用いて添加剤のスクリーニングを行った。

2.1.4 X線回折実験

得られた結晶を用いて、X線回折実験を行った。回折データの測定はX線による結晶の損傷を最小限に抑えるために 100 K の窒素ガスのクライオストリーム中にて行うため、結晶を予め抗凍結剤に浸しておく必要がある。これを行わないと結晶が凍結し、氷の反射が出てしまうからである。結晶の溶解を防ぐために、結晶化条件の溶質の濃度を濃くしたハーベスト溶液と、ハーベスト溶液に抗凍結剤として 20% グリセロールを加えたクライオ溶液を用意し、まず結晶をハーベスト溶液に移した。次にハーベスト溶液とクライオ溶液を 1:1 で混合した溶液に結晶を移し、最後にクライオ溶液に移すことで結晶を徐々にクライオ溶液に慣らしていった。その後結晶を液体窒素で瞬間冷却し、大型放射光施設 SPring-8 BL41XU にて 1.0 Å の波長の X 線を用いて X 線回折実験を行った。

2.1.5 プロテアーゼ存在下での aRF1・aEF1 α ・GTP 複合体の結晶化

次に、結晶化を阻害するフレキシブルな領域をプロテアーゼで切断しながら結晶化することでより良質な結晶を得ることを試みた⁷⁴。aRF1 と aEF1 α のモル比が等しくなるように両者を混合し、8.7 mg/mL aRF1, 9.9 mg/mL aEF1 α , 5 mM GTP, 5 mM MgCl₂ とした結晶化サンプルにタンパク質の質量の 1/100 倍量のトリプシンまたは 1/1000 倍量のキモトリプシンを加えた後に結晶化条件のスクリーニングを行った。結晶化は自動結晶化装置 mosquito を用い、結晶化試料 0.1 μ l に対して等量のレーザーバー溶液と混合してシッティングドロップ蒸気拡散法により 20°C にて行った。結晶化条件の初期スクリーニングには Crystal Screen I/II, Salt RxTM, Natrix, PEG/ION Screen (以上 Hampton Research), JB Screen Classic 1, 2, 4, 5 (Jena Bioscience), PACT, JCSG+ (以上 QIAGEN) を用いた。

初期スクリーニングで結晶が得られた条件について、2.1.3 に準じて結晶化条件の最適化を行った。なお、結晶化はピペットマンで結晶化試料 1 μ l に対して等量のレーザーバー溶液と混合してハンギングドロップ蒸気拡散法により 20°C にて行った。

2.1.6 X線回折実験とデータ処理

得られた結晶を用いて、2.1.4 に準じて X 線回折実験を行った。クライオ溶液の抗凍結剤としては 20% エチレングリコールを用いた。データ測定は、大型放射光施設 SPring-8 BL41XU, BL32XU, KEK PF-AR NW12A にて行った。そして得られた回折像に対してプログラム HKL2000 (HKL Research) を用いて結晶のブラベ格子と格子定数を決定後、回折データの各反射スポットに対して指数付けと強度測定を行い、その後スケールリング、データリダクションを行って空間群の決定、および各指数に対する回折強度の算出を

行った.

2.1.7 aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の構造解析

処理した回折データを用いて, CCP4 program suite の molrep により分子置換を行った⁷⁵. サーチモデルとしては単体の aRF1 と, aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体中の aEF1 α の原子座標を用いた⁷⁶. その後プログラム COOT による手動でのモデルを修正とプログラム PHENIX によるモデルの精密化を繰り返した^{77,78}. COOT による手動でのモデル修正では各残基モデルを電子密度に当てはめるとともに, Ramachandran プロットの disallowed region に入る残基数を最小することを目指した. また, PHENIX による精密化では, 剛体精密化を一度行った後にエネルギーの最小化, 原子座標の精密化や温度因子の精密化を行い, 温度因子の精密化には, 等法的な温度因子を仮定した.

2.1 の表

	分離ゲル (7 mL)	濃縮ゲル (3 mL)
アクリルアミド濃度	12.5%	4.0%
30% アクリルアミド	2.917 mL	0.400 mL
1.5 M Tris-HCl pH8.8	1.750 mL	—
0.5 M Tris-HCl pH6.8	—	0.756 mL
10% SDS	0.070 mL	0.030 mL
TEMED	7.000 μ l	3.000 μ l
APS	少量	少量

表 2.1.1 アクリルアミドゲルの組成

懸濁緩衝液	25 mM Tris·HCl pH 8.0 500 mM NaCl 10 mM β-ME 1 mM PMSF
透析緩衝液 1	20 mM Tris·HCl pH 8.0 100 mM NaCl 10 mM β-ME
Q-Sepharose A 緩衝液	25 mM Tris·HCl pH 8.0 100 mM NaCl 10 mM β-ME
Q-Sepharose B 緩衝液	25 mM Tris·HCl pH 8.0 2 M NaCl 10 mM β-ME
Resource PHE A 緩衝液	20 mM Tris·HCl pH 8.0 3.5 M Ammonium sulfate 1 mM β-ME
Resource PHE B 緩衝液	20 mM Tris·HCl pH 8.0 1 mM β-ME
Heparin A 緩衝液	20 mM Tris·HCl pH 8.0 1 mM β-ME
Heparin B 緩衝液	20 mM Tris·HCl pH 8.0 2 M NaCl 1 mM β-ME
透析緩衝液 2	25 mM Tris·HCl pH 8.0 500 mM NaCl 5 mM β-ME

表 2.1.2 aRF1 の精製に用いた緩衝液の組成

2.2 結果

2.2.1 *Aeropyrum pernix* aRF1 の調製

aRF1 を発現させた菌体を超音波破碎し、遠心後の上清を 70°C で 30 分間熱処理を行うことで大腸菌由来のタンパク質の多くが変性し不溶化することが SDS-PAGE (図 2.2.1A)により確認された。これを氷上で急冷した後遠心により不溶性画分を沈殿させ、得られた aRF1 を含む上清を一晩透析することで脱塩した。翌日 aRF1 の沈殿が確認されたので、これを遠心により取り除いた。次にこの遠心上清を Q-Sepharose にロードし陰イオン交換クロマトグラフィーを行ったところ、aRF1 は素通り画分および Wash 画分に存在することが SDS-PAGE によりわかった (図 2.2.1A)。

次に疎水性相互作用カラムにより Q-Sepharose の素通り画分および洗浄画分から aRF1 を精製した。aRF1 は Resource PHE カラムにておよそ 500 mM 硫酸アンモニウムにて溶出された。クロマトグラフィーのパターンを図 2.2.1B, その際の SDS-PAGE の結果を図 2.2.1C に示す。

そして aRF1 を含む ResourcePHE の溶出画分を透析することで脱塩し、さらに Heparin カラムによって aRF1 を精製した。aRF1 は Heparin カラムにておよそ 400 mM NaCl にて溶出された。クロマトグラフィーのパターンを図 2.2.1D, その際の SDS-PAGE の結果を図 2.2.1E に示す。溶出された aRF1 をさらに一晩透析した後に回収し、20.0 mg/mL に濃縮した。

2.2.2 aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶化

2.2.2.1 結晶化条件のスクリーニングと X 線回折データの測定

aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶化サンプルを用いて結晶化条件のスクリーニングを行い、表 2.2.1 の結晶化条件で図 2.2.2A のような結晶を得ることができた。

この結晶を用いて、SPring-8 BL41XUにてX線回折実験を行った。しかし、得られた回折像の最大分解能は 8.0 Å と低かった (図 2.2.2B)。ハーベスト溶液、クライオ溶液の組成を表 2.2.2 に示す。

2.2.2.2 結晶化条件の最適化

そこで、より高分解能の結晶を得るために結晶化条件の最適化を行った。そして得られた結晶を用いて SPring-8 BL41XU にて再び X 線回折実験を行ったが回折像の分解能は改善しなかった。得られた結晶を図 2.2.3A, 2.2.3B に示す。

2.2.3 プロテアーゼ存在下での aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶化と X 線回折データの測定

8.7 mg/mL aRF1, 9.9 mg/mL aEF1 α , 5 mM GTP, 5 mM MgCl₂ とした結晶化サンプルにタンパク質の質量の 1/100 倍量のトリプシンまたは 1/1000 倍量のキモトリプシンを加えた後に結晶化条件のスクリーニングを行ったところ、キモトリプシン存在下で図 2.2.4A のような結晶を得ることができた。結晶化条件を表 2.2.3 に示す。

この結晶を用いて KEK PF-AR NW12A にて X 線回折実験を行ったところ図 2.2.4B のような最大分解能 4.0 Å の X 線回折像が得られた。ハーベスト溶液およびクライオ溶液の組成を表 2.2.4 に示す。

2.2.4 結晶化条件の最適化, X 線回折データの測定, 及び回折データの処理

そこで、より高分解能の結晶を得るために結晶化条件の最適化を行った。その結果表 2.2.3 に示す結晶化条件で図 2.2.5A のような結晶が得られた。

この結晶を用いて SPring-8 BL32XU にて X 線回折実験を行ったところ、図 2.2.5B のような最大分解能 2.3 Å の X 線回折像が得られた。ハーベスト溶液およびクライオ溶液の組成を表 2.2.4 に示す。

X 線回折データをプログラム HKL2000 で処理したところ、この aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶は空間群 C2 に属し、格子定数は $a = 176.6$ Å, $b = 55.2$ Å, $c = 90.7$ Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 101.6^\circ$ であった。回折データの統計値を表 2.2.5 に示す。また、この結晶の Matthews 係数、及び溶媒含量は表 2.2.6 のようになった。

2.2.5 aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の構造解析

処理した回折データに対し、単体の aRF1 と、aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体中の aEF1 α の構造をサーチモデルとした分子置換法により非対称単位中 1 分子の aRF1·aEF1 α 複合体の解釈可能な電子密度マップを得ることに成功した。そしてモデル構築と精密化を繰り返し、最終的には $R_{\text{free}} = 26.1$ %, $R_{\text{work}} = 20.1$ % まで精密化することができた。aEF1 α の N 端の 3 残基と C 端の 7 残基、及び aRF1 の N 端の 8 残基、176-187 番目の残基、及び C 端の 3 残基はディスオーダーしており、モデルを構築することができなかった。構造精密化の統計値を表 2.2.7 に、精密化完了後の aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の構造モデルと $2F_o - F_c$ マップを図 2.2.6 に、各残基の主鎖二面角をプロットした Ramachandran プロットを図 2.2.7 に示す。

2.2 の表

結晶化条件 (Salt RX TM #37)	1.0 M MgSO ₄ 100 mM CH ₃ COONa pH 4.6
--------------------------------------	--

表 2.2.1 初期スクリーニングで結晶が得られた条件

ハーベスト溶液	1.2 M MgSO ₄ 120 mM CH ₃ COONa pH 4.6
クライオ溶液	1.2 M MgSO ₄ 120 mM CH ₃ COONa pH 4.6 20% Glycerol

表 2.2.2 初期スクリーニングで得られた結晶に対するハーベスト溶液とクライオ溶液の組成

初期の結晶化条件 (JCSG+ #91)	25% PEG3350 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 100 mM Bis Tris pH 5.5
最適化後の結晶化条件	23% PEG4000 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 100 mM Bis Tris pH 5.5 10 mM L-Proline

表 2.2.3 プロテアーゼ存在下の初期スクリーニングで結晶が得られた条件
とその後最適化された結晶化条件

初期結晶の ハーベスト溶液	30% PEG3350 240 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 120 mM Bis Tris pH 5.5
初期結晶の クライオ溶液	30% PEG3350 240 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 120 mM Bis Tris pH 5.5 20% Ethylene glycol
最適化した結晶の ハーベスト溶液	27.6% PEG3350 240 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 120 mM Bis Tris pH 5.5 12 mM L-Prolin
最適化した結晶の クライオ溶液	27.6% PEG3350 240 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 120 mM Bis Tris pH 5.5 12 mM L-Prolin 20% Ethylene glycol

表 2.2.4 プロテアーゼ存在下の初期スクリーニングで得られた結晶に対するハーベスト、クライオ溶液の組成とその後最適化された結晶に対するハーベスト、クライオ溶液の組成

Data collection statistics	Native
X-ray source	SPring-8 BL32XU
Wavelength (Å)	1.0
Space group	<i>C2</i>
Unit cell dimensions (Å, °)	$a = 176.6, b = 55.2, c = 90.7$ $\alpha = \gamma = 90, \beta = 101.6$
Resolution (Å)	50–2.30 (2.34–2.30)
Unique reflections	38,192 (1,866)
Redundancy	5.7 (3.9)
Completeness (%)	98.9 (97.2)
$I/\sigma(I)$	37.7 (3.82)
R_{sym}	0.063 (0.282)

The numbers in parentheses are for the last shell.

表 2.2.5 aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体結晶の回折データの統計値

非対称単位中の分子数	Mw[kDa]	Vm[Å ³ /Da]	溶媒含量[%]
1	91	2.39	48.54

表 2.2.6 aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体結晶の Matthews 係数 (Vm) および溶媒含量

Refinement statistics	
Resolution (Å)	46.498–2.30
No. of reflections (all/test)	37988/1906
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.2013/0.2606
No. of atoms	
Protein	5961
Ligand	33
Water	162
RMSD of	
Bond length (Å)	0.009
Bond angle (°)	1.202
Average B factor (Å ²)	
Protein	50.9
Ligand	40.9
Ion	61.6
Water	46.7
Ramachandran plot	
Favored region (%)	98.6
Outliers (%)	0.0

The numbers in parentheses are for the last shell.

表 2.2.7 aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の構造精密化の統計値

2.2 の図

A

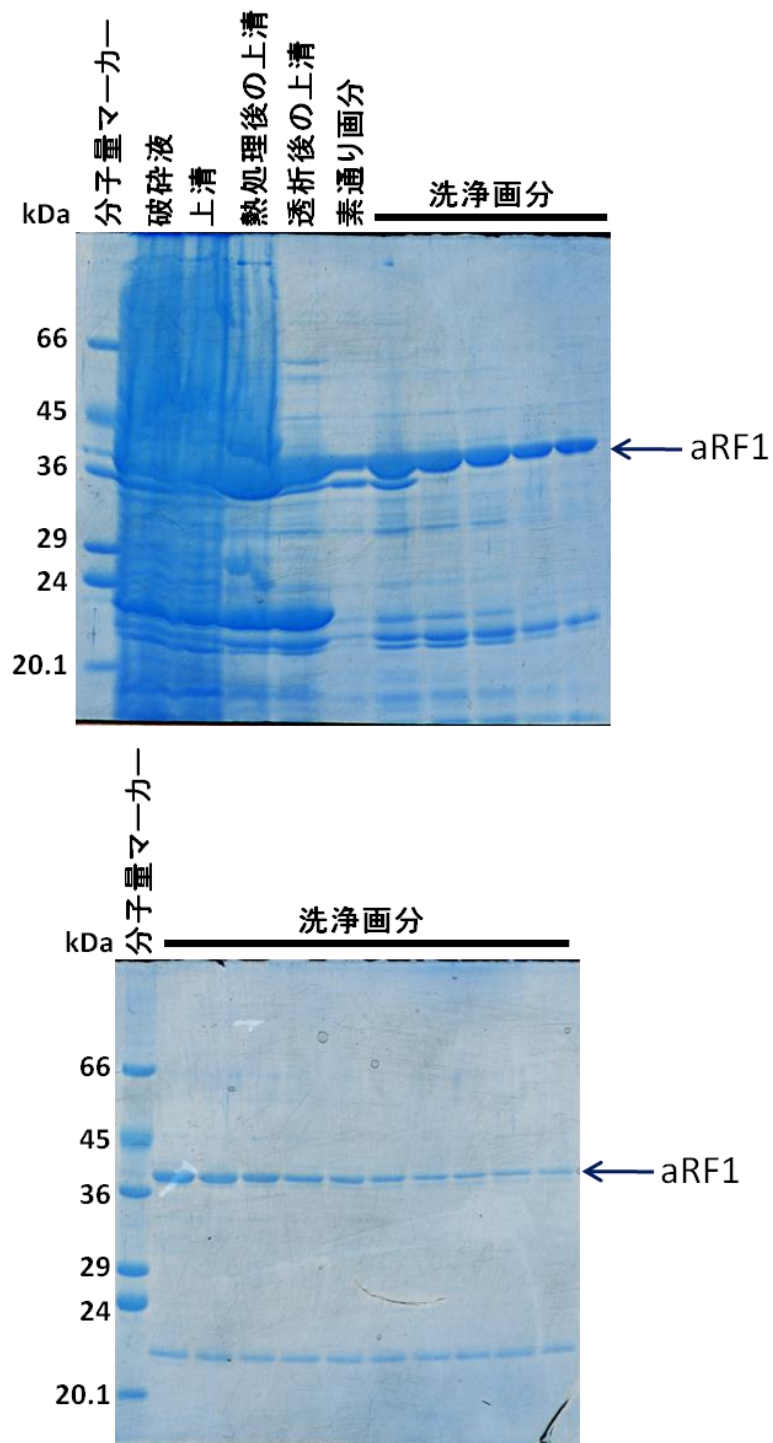
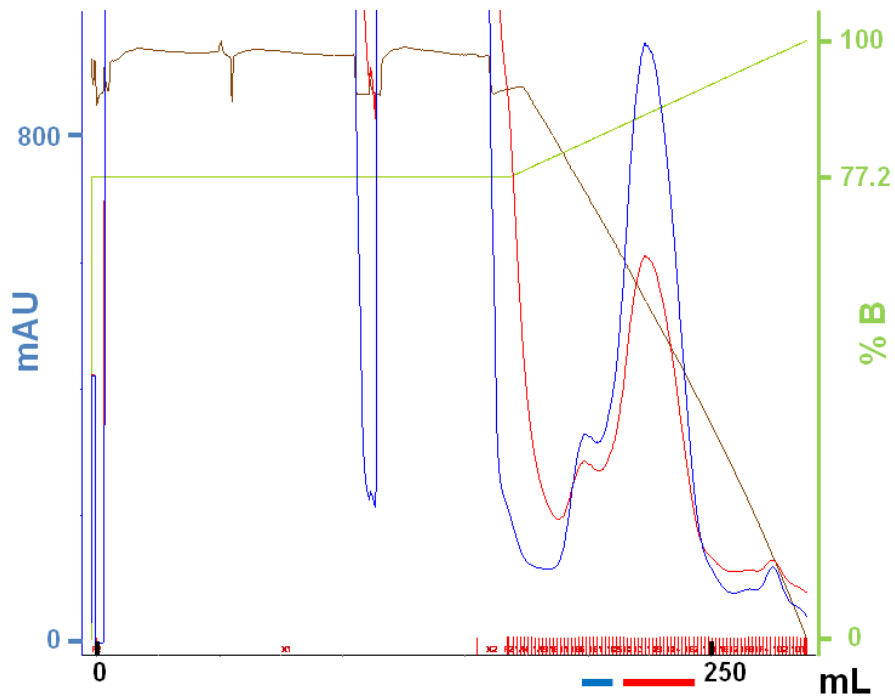


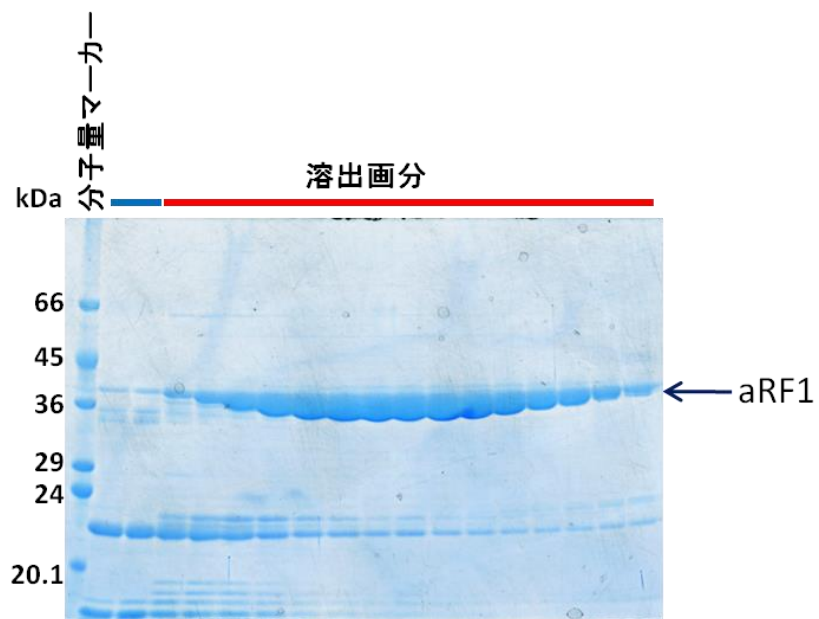
図 2.2.1 aRF1 の精製

A 粗精製における SDS-PAGE

B



C

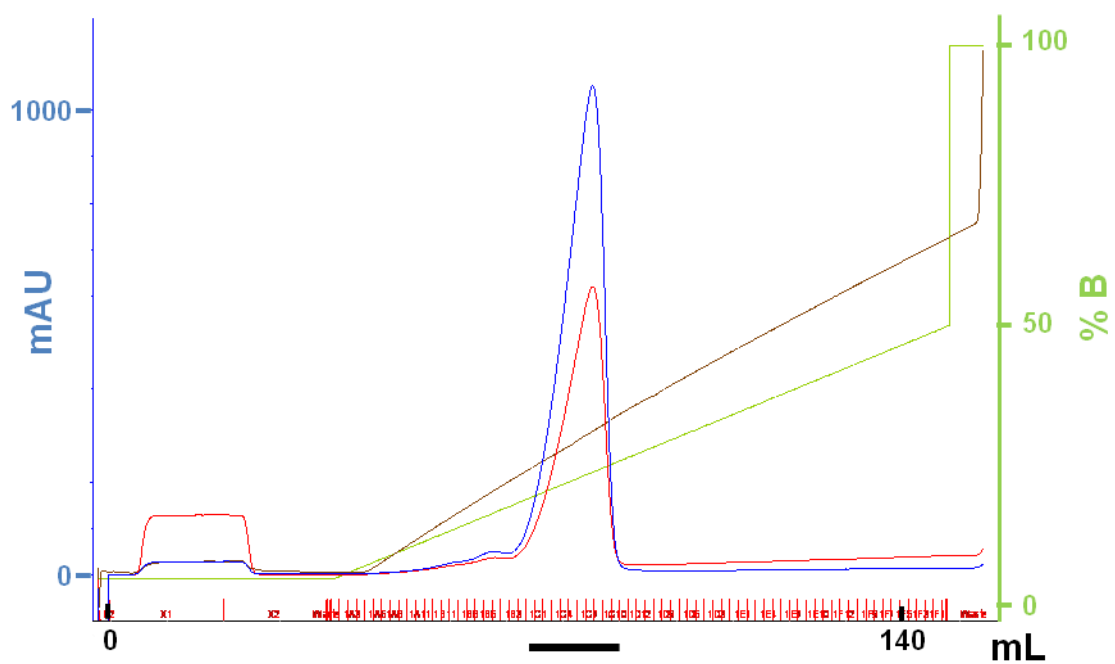


B Resource PHE カラムクロマトグラフィーのパターン

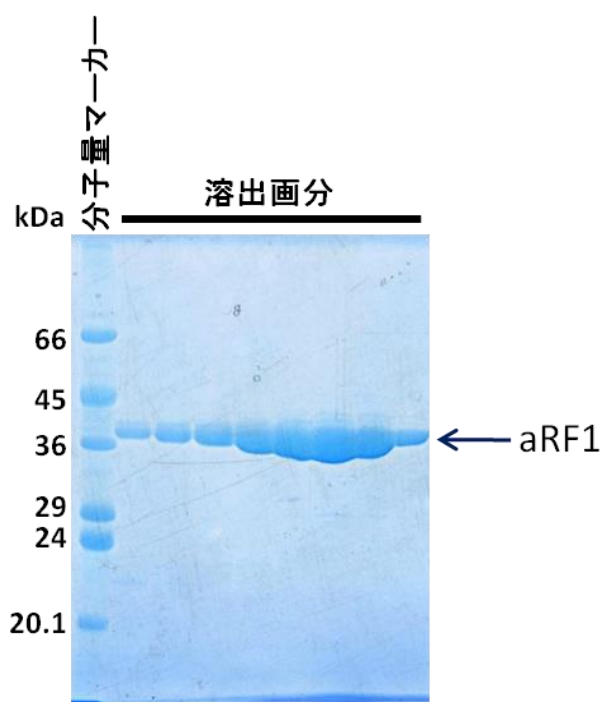
C Resource PHE カラムからの溶出液の SDS-PAGE

クロマトグラフィーのパターンは青線が 280 nm における吸光度, 赤線が 260 nm における吸光度, 茶線がイオン強度, 緑線が B 緩衝液の濃度をプロットしたものである.これ以降の図でも同様とする.

D



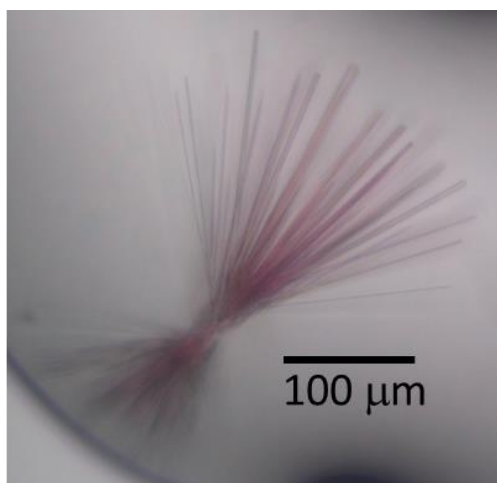
E



D Heparin カラムクロマトグラフィーのパターン

E Heparin カラムからの溶出液の SDS-PAGE

A



B

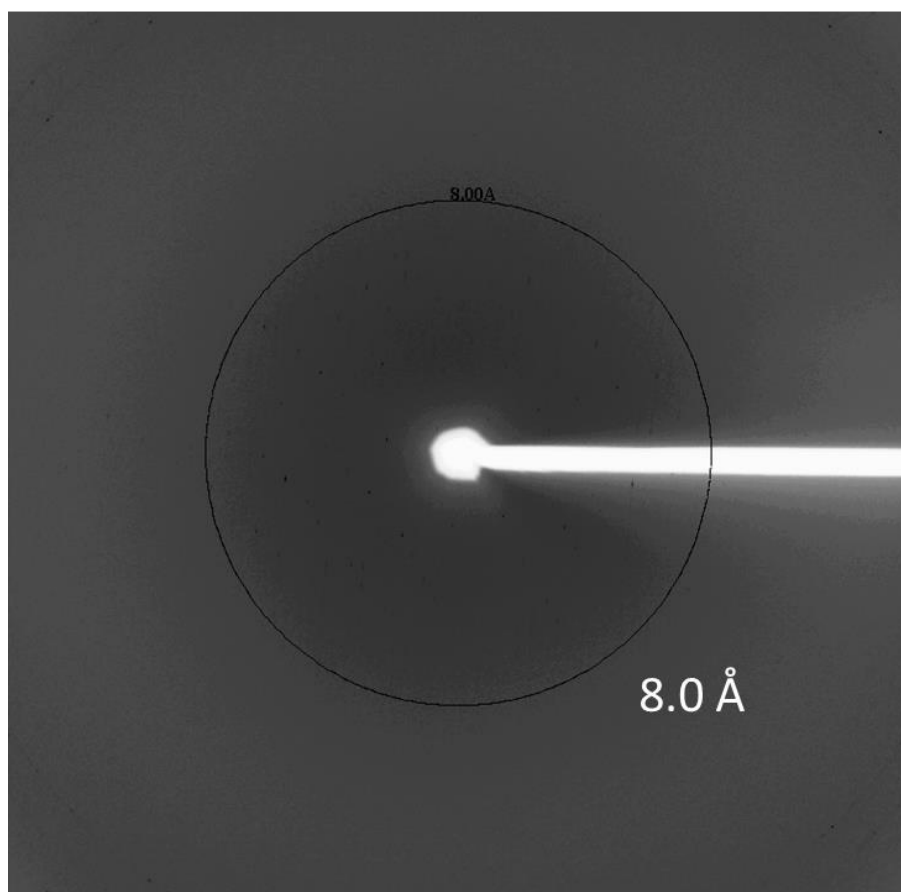
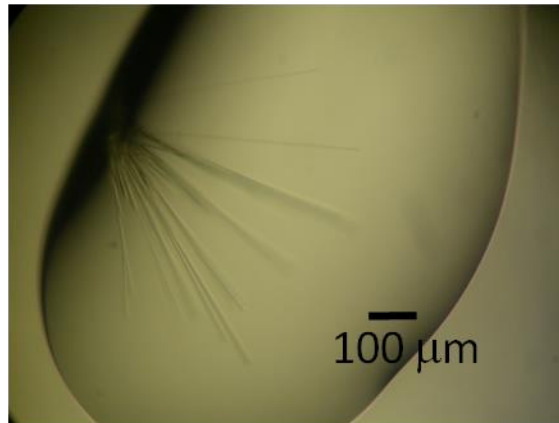


図 2.2.2 aRF1·aEF1α·GTP 複合体の結晶化と X 線回折像

A 初期スクリーニングによって得られた aRF1·aEF1α·GTP 複合体の結晶

B A の結晶から得られた X 線回折像

A



B

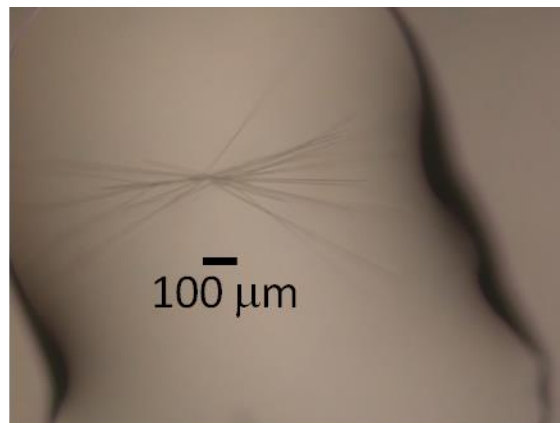
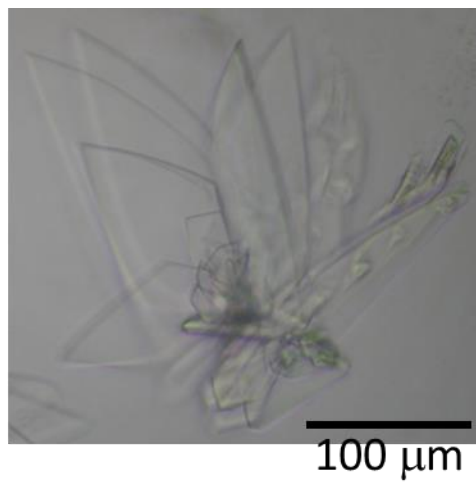


図 2.2.3 結晶化条件の最適化によって得られた結晶

A 添加剤のスクリーニングによって得られた結晶

B 4°Cでの結晶化によって得られた結晶

A



B

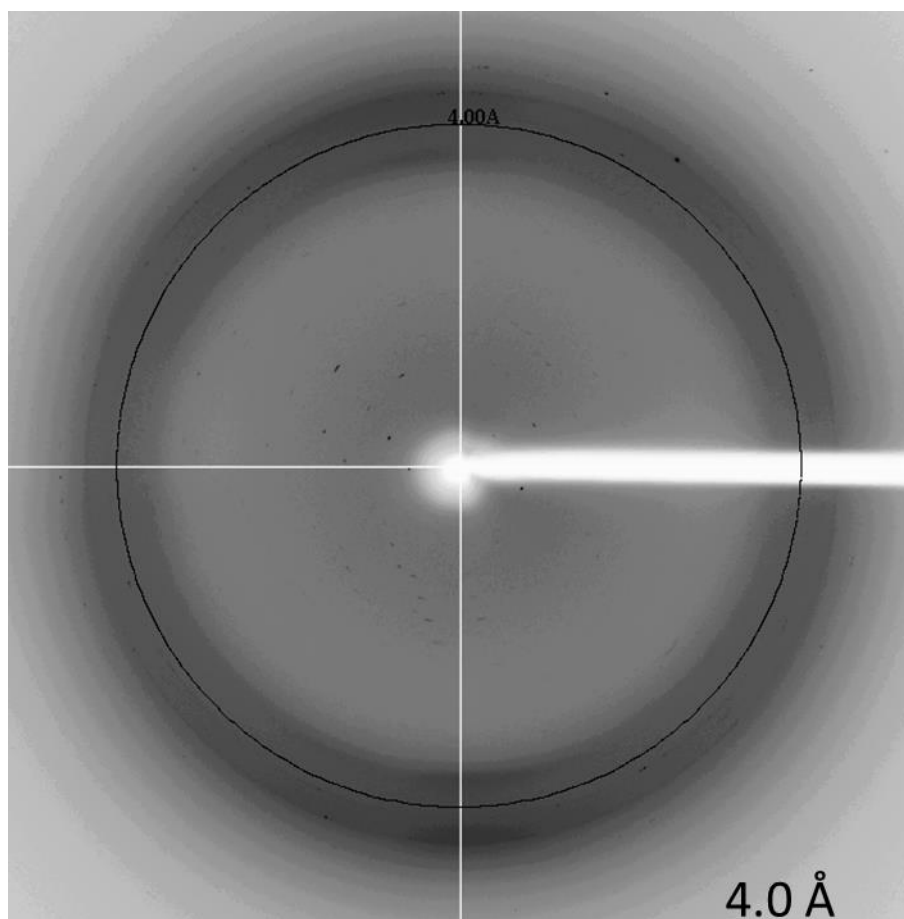
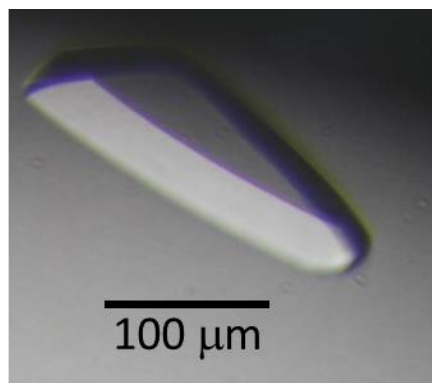


図 2.2.4 キモトリプシン存在下での結晶化と X 線回折像

A 初期スクリーニングによって得られた aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶

B A の結晶から得られた X 線回折像

A



B

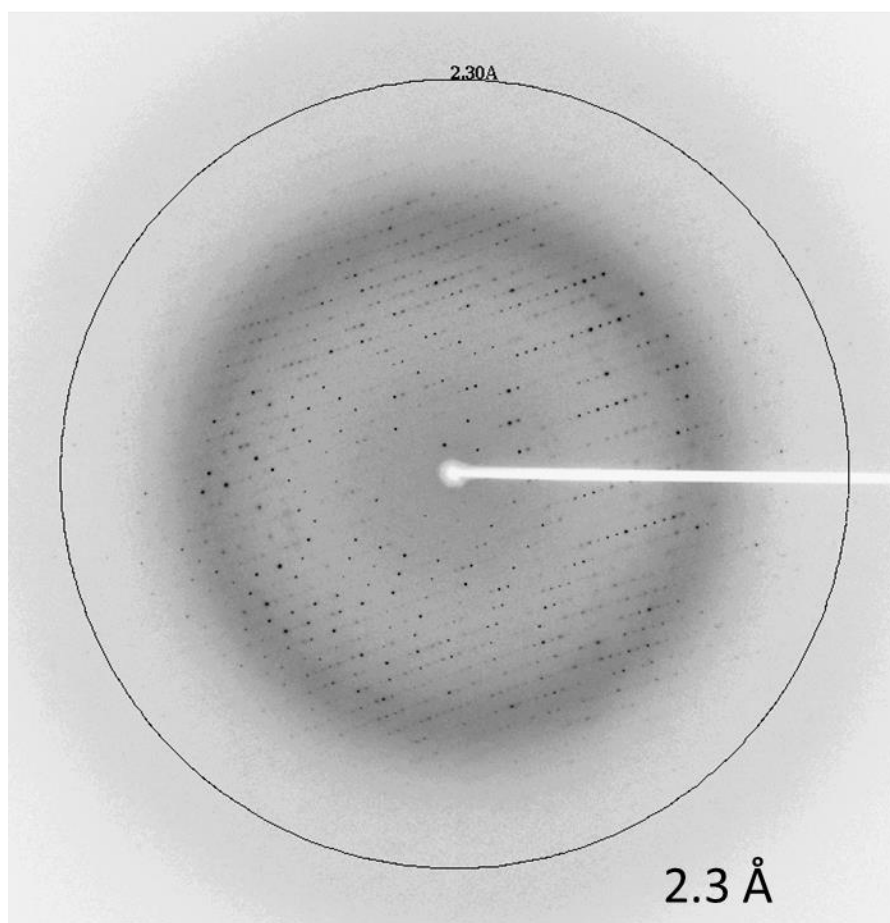


図 2.2.5 結晶化条件の最適化によって得られた結晶と X 線回折像

A aRF1·aEF1α·GTP 複合体の結晶

B A の結晶から得られた X 線回折像

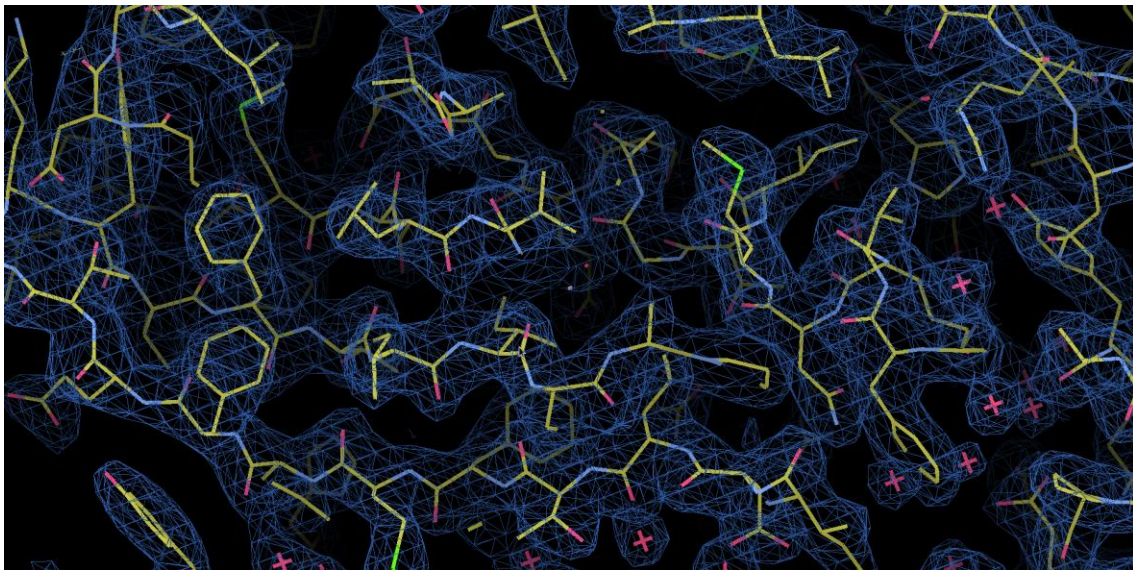
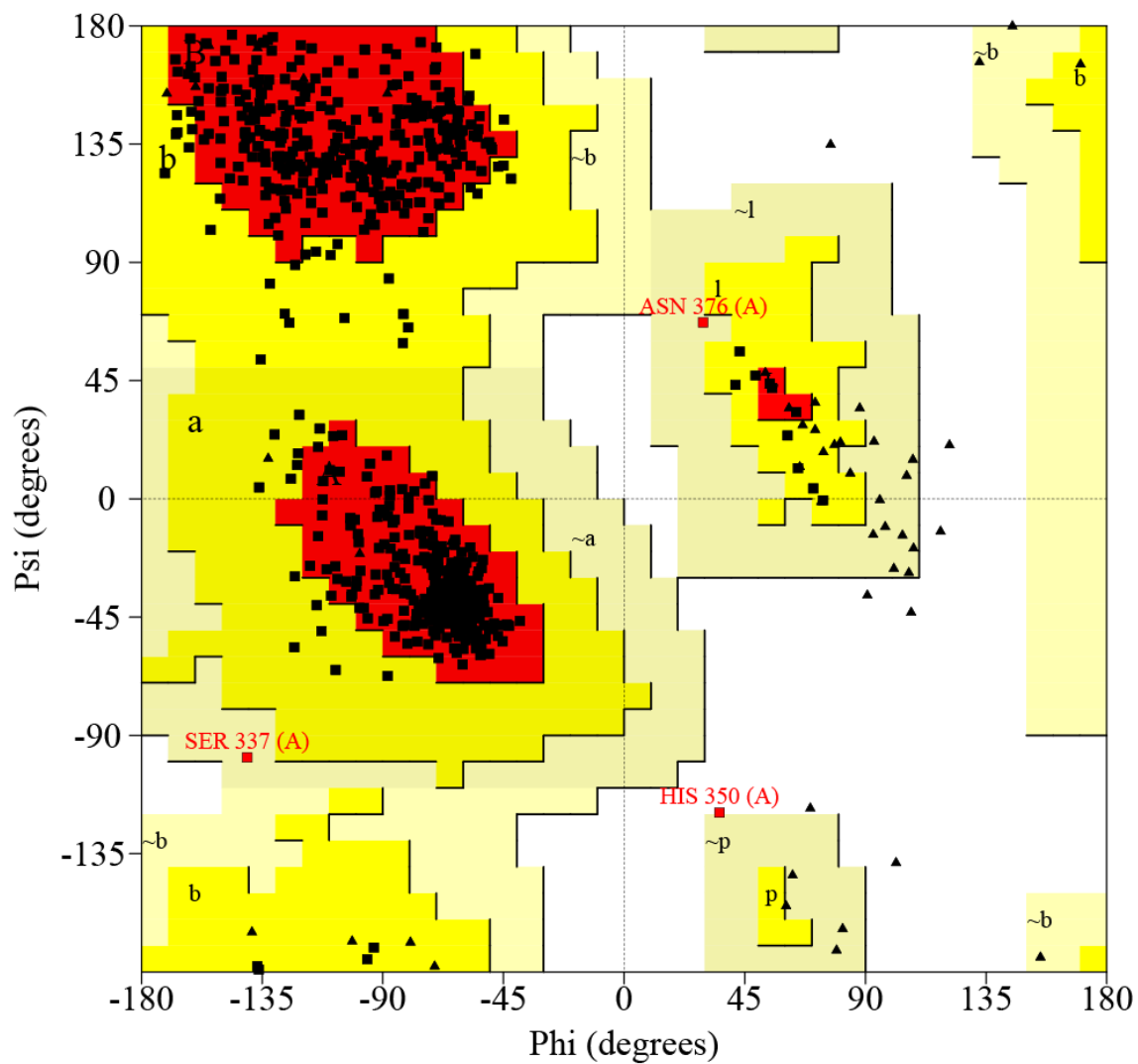


図 2.2.6 精密化完了後の aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の構造モデルと 1.0 σ で表示された $2F_o-F_c$ マップ



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	618	92.0%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	51	7.6%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	2	0.3%
Residues in disallowed regions	1	0.1%
-----		-----
Number of non-glycine and non-proline residues	672	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	5	
Number of glycine residues (shown as triangles)	59	
Number of proline residues	42	
-----		-----
Total number of residues	778	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

図 2.2.7 aRF1·aEF1α·GTP 複合体構造の Ramachandran プロット

2.3 考察

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本節については非公開

第3章 aPelota・aEF1 α ・GTP 複合体の構造機能解析

3.1 実験材料と方法

3.1.1 *Aeropyrum pernix* aEF1 α の調製

古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来 aEF1 α の発現系は、その遺伝子をプラスミド pET15b に組み込んだものを東京大学大学院新領域創成科学研究科の伊藤耕一教授から供与して頂いた。このプラスミドを含んだ *E.coli* BL21(DE3)Codon Plus を用いて、N 端にヒスチジンタグ (His タグ)を融合させた aEF1 α を発現させる。

プラスミドを含んだ大腸菌を 50 mg/L アンピシリンを含む LB 培地中で 37°C にて培養した。濁度が OD₆₀₀ = 0.5 に達した時点で培養液を氷冷し、その後終濃度が 0.5 mM になるように IPTG を添加して aEF1 α の発現を誘導した。発現誘導後は培養温度を 20°C に下げ、一晩培養した。その後、菌体を遠心 (4500 rpm, 10min)により回収した。

回収した菌体を懸濁緩衝液に懸濁し、氷上にて超音波破碎した。以下の作業は特に断りのない限り、4°C にて行った。この懸濁液を遠心 (13500 rpm, 40 min)し、不溶性画分を沈殿させた。この上清を回収し、低速で振とうしながら、70°C で 30 分間熱処理することで大腸菌由来のタンパク質を変性・沈殿させた。これを氷上で急冷した後、再び遠心 (13500rpm, 40min)を行うことで不溶性画分を沈殿させ、得られた aEF1 α を含む上清を Ni キレーティングカラムクロマトグラフィーによって室温で精製した。まず洗浄緩衝液 1 で平衡化した 5 mL の Ni-NTA SuperFlow 樹脂 (Qiagen)を充填したカラムにサンプルをロードして aEF1 α を樹脂に吸着させ、次に 30 カラム容量の洗浄緩衝液 1 にて洗浄を行った。さらに洗浄緩衝液 2, 3 で 3 カラム容量ずつ洗浄した後、5 カラム容量の溶出緩衝液を用いて樹脂に吸着した aEF1 α の溶出を行った。そして SDS-PAGE を行い、ゲルを CBB により染色し、該当する分子量位置にバンドが存在することで溶出画分に aEF1 α が含まれていることを確認した。

次に、aEF1 α に融合させている His タグの切断を行った。Ni-NTA SuperFlow 樹脂からの溶出液にスロンビン (Haematologic Technologies Inc.)を加えた後に透析緩衝液に対して室温にて一晩透析した。翌日、透析緩衝液で平衡化した 2 mL の Ni-NTA SuperFlow 樹脂を充填したカラムに透析後のサンプルをロードし、次に 3 カラム容量の洗浄緩衝液 1 にて樹脂を洗浄した。そして素通りと洗浄画分に His タグが切断された aEF1 α が含まれていることを SDS-PAGE にて確認した。

続いて陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。カラムは Resource S 6 mL (GE Healthcare)を用いた。His タグを切断した aEF1 α の粗精製サンプルを

Amicon Ultra-4 (M.W.C.O 10 kDa, Millipore)を用いた限外ろ過法で濃縮した後に Resource S A 緩衝液を用いて NaCl 濃度を 10 mM に希釈して 0.22 μ m のフィルターにかけ, 10 mM NaCl を含む Resource S A 緩衝液で平衡化したカラムにロードした. 同じ緩衝液で 2 カラム容量分の洗浄を行った後, Resource S A, B 緩衝液を用いて 10 mM から 300 mM への NaCl の直線濃度勾配により aEF1 α を溶出した. aEF1 α の溶出を SDS-PAGE にて確認した.

最後に,ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製を行った. カラムは Superdex 200 HiLoad 120 mL (GE Healthcare)を用いた. 陽イオン交換カラムからの溶出液を Amicon Ultra-4 (M.W.C.O 10 kDa)を用いた限外ろ過法により濃縮した後に 0.22 μ m のフィルターにかけ, ゲルろ過緩衝液で平衡化したカラムにロードし, aEF1 α を溶出した. aEF1 α の溶出を SDS-PAGE にて確認し, 回収したサンプルの波長 280 nm における吸光度を測定し, モル吸光係数 $\epsilon_{280\text{nm}} = 36900$ としてタンパク質濃度を見積もった. このサンプルを Amicon Ultra-4 (M.W.C.O 10 kDa)を用いた限外ろ過法により 28.0 mg/mL まで濃縮した. 用いた緩衝液の組成を表 3.1.1 に示す.

3.1.2 *Aeropyrum pernix* aPelota の調製

古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来 aPelota の発現系は, その遺伝子をプラスミド pET15b に組み込んだものを東京大学 大学院新領域創成科学研究科の伊藤耕一教授より供与して頂いた. このプラスミドを含んだ *E.coli* BL21(DE3)Codon Plus を用いて, N 端に His タグを融合させた aPelota を発現させる.

プラスミドを含んだ大腸菌を 50 mg/L アンピシリンを含む LB 培地中で 37°C にて培養した. 濁度が $\text{OD}_{600} = 0.7$ に達した時点で培養液を氷冷し, その後終濃度が 0.5 mM になるように IPTG を添加して aEF1 α の発現を誘導した. 発現誘導後は培養温度を 20°C に下げ, 一晚培養した. その後, 菌体を遠心 (4000 g, 10min)により回収した.

回収した菌体を懸濁緩衝液に懸濁し, 氷上にて超音波破碎した. 以下の作業は特に断りのない限り, 4°C にて行った. 用いた緩衝液の組成を表に示す. この懸濁液を遠心 (13500 rpm, 40 min)し, 不溶性画分を沈殿させた. この上清を回収し, 低速で振とうしながら, 70°C で 30 分間熱処理することで大腸菌由来のタンパク質を変性・沈殿させた. これを氷上で急冷した後, 再び遠心 (13500rpm, 40min)を行うことで不溶性画分を沈殿させ, 得られた aPelota を含む上清を Ni キレートリングカラムクロマトグラフィーによって精製した. まず平衡化緩衝液で平衡化した 10 mL の Ni-NTA SuperFlow 樹脂を充填したカラムにサンプルをロードして aPelota を樹脂に吸着させ, 次に 20 カラム容量の洗浄緩衝液にて洗浄を行った後, 10 カラム容量の溶出緩衝液を用いて樹脂に吸着した

aPelota の溶出を行った。そして溶出画分に aPelota が含まれていることを SDS-PAGE に
よって確認し、溶出画分を透析緩衝液 1 に対して一晩透析した。

次に HPLC にて陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。カラムは
Resource S 6 mL を用いた。aPelota の粗精製サンプルを Resource S A 緩衝液を用いて NaCl
濃度を 10 mM に希釈して 0.22 μ m のフィルターにかけ、10 mM NaCl を含む Resource S
A 緩衝液で平衡化したカラムに数回に分けてロードした。同じ緩衝液で 2 カラム容量分
の洗浄を行った後、Resource S A, B 緩衝液を用いて 10 mM から 1.2 M への NaCl の直線
濃度勾配により aPelota を溶出した。aPelota の溶出を SDS-PAGE にて確認し、透析緩衝液
2 を用いて一晩透析した。透析後、回収したサンプルの波長 280 nm における吸光度を測
定し、モル吸光係数 $\epsilon_{280\text{nm}} = 22460$ としてタンパク質濃度を見積もった。このサンプルを
Amicon Ultra-4 (M.W.C.O 10 kDa) を用いた限外ろ過法により 20°C にて 38.67 mg/mL まで
濃縮した。用いた緩衝液の組成を表 3.1.2 に示す。

3.1.3 aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶化

aPelota と aEF1 α のモル比が等しくなるように両者を混合し、さらに GTP と MgCl₂ を
終濃度 5 mM になるように加えることで、aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体を調製した。aPelota
と aEF1 α の終濃度はそれぞれ 14.5 mg/mL と 18.0 mg/mL となり、自動結晶化装置
mosquito (BioLab) を用いてシッティングドロップ蒸気拡散法により 20°C にて結晶化を
行った。結晶化条件の初期スクリーニングには Crystal Screen I/II, Natrix, PEG/ION
Screen, Index I/II (以上 Hampton Research), JB Screen Classic 1, 2, 4, 5 (Jena Bioscience),
Wizard I/II (Emerald BioSystems) を用いた。

そして初期スクリーニングで結晶が得られた条件について、2.1.3 に準じて結晶化条件
の最適化を行った。また、Additive Screen (Hampton Research) を用いて添加剤のスクリー
ニングを行った。

3.1.4 aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体結晶を用いた X 線回折実験とデータ処理

得られた結晶を用いて、2.1.4, 2.1.6 に準じて X 線回折実験と回折データの処理を行っ
た。抗凍結剤としては 20% エチレングリコールを用いた。その後結晶をクライオスト
ームで瞬間冷却し、大型放射光施設 SPring-8 BL41XU, 高エネルギー加速器研究機構
(KEK) PF-AR NW12A, NE3A にて X 線回折実験を行った。

3.1.5 セレノメチオニン置換体 aEF1 α (SeMet-aEF1 α)の調製と結晶化

3.1.5.1 SeMet-aEF1 α の調製

続いてセレン原子の異常散乱効果を利用した構造決定のために、すべてのメチオニン残基をセレノメチオニンに置換したサンプルを調製した。まず、aEF1 α 発現プラスミドでエレクトロポレーション法によりメチオニン要求性株 *E.coli* B834(DE3)Codon Plus 株を形質転換した。この形質転換株を 50 mg/L アンピシリン, 50 mg/L L-セレノメチオニン, 10 mg/L グルコース, 250 mg/L 硫酸マグネシウム七水和物, 4.2 mg/L 硫酸鉄七水和物, 1x vitamin solution を含む Core 培地 (和光純薬工業)で OD₆₀₀ = 0.6 まで 37°C で培養し、終濃度が 0.5 mM になるように IPTG を添加して SeMet-aEF1 α の発現を誘導した。発現誘導後は培養温度を 20°C に下げ、一晚培養した。SeMet-aEF1 α の精製は基本的に aEF1 α の精製に準じ、緩衝液も同じものを用いた。しかし、Ni-NTA SuperFlow 樹脂の緩衝液 2, 3 による洗浄, スロンビンによる His タグの切断, ゲルろ過による最終精製は行わず、Resource S からの溶出液のうち SeMet-aEF1 α を含む画分をゲルろ過緩衝液で一晩透析した。そしてその透析サンプルを Amicon Ultra-4 (M.W.C.O 10 kDa) を用いた限外ろ過法により 27.9 mg/mL まで濃縮した。

3.1.5.2 aPelota·SeMet-aEF1 α ·GTP 複合体の結晶化

3.1.3 に準じて、aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶が得られている条件の周辺で aPelota·SeMet-aEF1 α ·GTP 複合体の結晶化を行った。aPelota と SeMet-aEF1 α の終濃度はそれぞれ 12.8 mg/mL と 15.9 mg/mL になった。

そして得られた結晶を改良するために、シーディングによる結晶化を行った。aPelota·SeMet-aEF1 α ·GTP 複合体の結晶化サンプルと結晶化条件のレザーバー溶液を手動で 1.0 μ l ずつ混合し、ドロップを作った。そして aPelota·SeMet-aEF1 α ·GTP 複合体の結晶の表面をプローブ (猫のひげ)でやさしくなぞり、微小な種結晶を付着させた。そしてプローブを新たに作成したドロップの中に入れ、まっすぐな線を描くように移動させることで種結晶を移し、ハンギングドロップ蒸気拡散法による結晶化を行った。

3.1.6 aPelota·SeMet-aEF1 α ·GTP 複合体結晶を用いた X 線回折実験とデータ処理

aPelota·SeMet-aEF1 α ·GTP 複合体結晶を用いて、2.1.4, 2.1.6に準じて X 線回折実験と回折データの処理を行った。データ測定はKEK PF-AR NW12A にて行い、データ測定はセレン原子の peak 波長である 0.97913 Å にて行った。

3.1.7 aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造解析

3.1.7.1 セレン原子の位置決定・位相計算

HKL2000 で処理した aPelota·SeMet-aEF1 α ·GTP 複合体結晶の X 線回折データを用いて、非対称単位中に存在するセレン原子の位置をプログラム SnB によって直接法で同定した⁷⁹。そして得られたセレン原子の位置情報から、プログラム SHARP を用いて重原子位置の精密化と単一波長異常分散法 (SAD 法)による初期位相の計算を行った⁸⁰。さらにこの初期位相から計算された電子密度中の溶媒を、プログラム SOLOMON によって平滑化した⁸¹。

3.1.7.2 aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体のモデル構築と精密化

得られた電子密度マップに対してプログラム DM によって density modification を行った後にプログラム RESOLVE による aPelota と aEF1 α の自動モデル構築を行った^{82,83}。そしてその後プログラム COOT による手動でのモデルを修正とプログラム PHENIX によるモデルの精密化を繰り返した^{77,78}。PHENIX による精密化では、剛体精密化を一度行った後にエネルギーの最小化、原子座標の精密化や温度因子の精密化を行った。温度因子の精密化には、等法的な温度因子を仮定した。そして得られた構造の原子座標をサーチモデルとして、3.14 で処理した回折データに対して CCP4 program suite の molrep により分子置換を行った⁷⁵。そしてその後 PHENIX と COOT によるモデルの精密化をさらに繰り返した。

3.1.8 aEF1 α 変異体と aPelota, aRF1 との *in vitro* での結合実験

解明された aEF1 α による aPelota, aRF1 の認識機構を確かめるために、aEF1 α 変異体と aPelota, aRF1 との *in vitro* での結合実験を行った。この実験では aPelota の認識には関わるが aRF1 の認識には関わっていない aEF1 α の残基をアラニンに置換した aEF1 α 変異体を作製し、それと aPelota 及び aRF1 との相互作用を His-タグプルダウンアッセイによって検出した。

3.1.8.1 結合実験に用いるタンパク質の調製

野生型と PCR 法によって調整した変異型の aEF1 α (7-437)の遺伝子を pET26b (Novagen) に組み込み、*E. coli* Rosetta2(DE3)を用いて C 末端に His-タグを融合させた aEF1 α を発現させた。発現、精製方法は、スロニンビンによって His-タグを切断しない事以外は結晶化に用いる aEF1 α の調製方法と同じである。また、最終精製サンプルは aRF1 の精製に用いた透析緩衝液 2 に対して一晩透析を行った。そして透析産物を回収し Amicon Ultra-4

(M.W.C.O 10 kDa)によって濃縮した。野生型, 変異型の aEF1 α の最終濃度はそれぞれ 6.5 mg/mL, 2.5 mg/mL だった。

aPelota は結晶化に用いる aPelota の調製と同様の方法で Ni-NTA SuperFlow 樹脂で精製するところまで行い, その後溶出液にスロンビンを加え, aRF1 の精製に用いた透析緩衝液 2 に対して一晩透析を行うことで His-タグを切断した。そして透析産物を Ni-NTA SuperFlow 樹脂に再び通し樹脂の洗浄と溶出を行い, 素通り画分と洗浄画分を回収して Amicon Ultra-4 (M.W.C.O 10 kDa)によって濃縮し, 16.3 mg/mL まで濃縮した。

aRF1 に関しては結晶化に用いたサンプルをそのまま使った。

3.1.8.2 His-タグプルダウンアッセイ

aEF1 α と aPelota 及び aRF1 との相互作用は, MagneHis Protein Purification System (Promega)を用いた His-タグプルダウンアッセイによって検出した。まず, His タグ融合 aEF1 α とタグを含まない aPelota または aRF1 をモル比が 1:3 となるように混合し, 5mM GTP, 5mM MgCl₂ とした。このサンプルを 70°C にて 1 分間プレヒートした後 7 μ l の MagneHis を加えて氷上で 2 分間静置した。その後上清を除き, 70 μ l の洗浄緩衝液で 3 回 MagneHis を洗浄し, 10 μ l の溶出緩衝液 (表 3.1.1 の溶出緩衝液と同じ組成)で溶出した。そして各サンプル由来の溶出液に対して SDS-PAGE を行った。

3.1 の表

懸濁緩衝液	20 mM Tris·HCl pH 8.0 200 mM NaCl 20 mM Imidazole·HCl pH 8.0 5 mM β -ME 0.1 mM PMSF
洗浄緩衝液 1	20 mM Tris·HCl pH 8.0 200 mM NaCl 20 mM Imidazole·HCl pH 8.0 5 mM β -ME
洗浄緩衝液 2	20 mM Tris·HCl pH 8.0 200 mM NaCl 40 mM Imidazole·HCl pH 8.0 5 mM β -ME
洗浄緩衝液 3	20 mM Tris·HCl pH 8.0 200 mM NaCl 60 mM Imidazole·HCl pH 8.0 5 mM β -ME
溶出緩衝液	20 mM Tris·HCl pH 8.0 200 mM NaCl 300 mM Imidazole·HCl pH 8.0 5 mM β -ME
透析緩衝液	20 mM Tris·HCl pH 8.0 200 mM NaCl 5 mM β -ME

Resource S A 緩衝液	50 mM Tris·HCl pH 8.0 1 mM DTT
Resource S B 緩衝液	50 mM Tris·HCl pH 8.0 2 M NaCl 1 mM DTT
ゲルろ過緩衝液	25 mM Tris·HCl pH 8.0 500 mM NaCl 1 mM DTT

表 3.1.1 aEF1 α の精製に用いた緩衝液の組成

懸濁緩衝液	20 mM Tris·HCl pH 8.0 200 mM NaCl 10 mM Imidazole·HCl pH 8.0 1 mM β -ME 0.1 mM PMSF
平衡化緩衝液	20 mM Tris·HCl pH 8.0 200 mM NaCl 1 mM β -ME 0.1 mM PMSF
洗浄緩衝液	20 mM Tris·HCl pH 8.0 200 mM NaCl 20 mM Imidazole·HCl pH 8.0 1 mM β -ME 0.1 mM PMSF
溶出緩衝液	20 mM Tris·HCl pH 8.0 200 mM NaCl 250 mM Imidazole·HCl pH 8.0 1 mM β -ME 0.1 mM PMSF
透析緩衝液 1	50 mM Tris·HCl pH 8.0 100 mM NaCl
Resource S A 緩衝液	50 mM Tris·HCl pH 8.0 1 mM DTT
Resource S B 緩衝液	50 mM Tris·HCl pH 8.0 2 M NaCl 1 mM DTT
透析緩衝液 2	25 mM Tris·HCl pH 8.0 500 mM NaCl 5 mM β -ME

表 3.1.2 aPelota の精製に用いた緩衝液の組成

3.2 結果

3.2.1 *Aeropyrum pernix* aEF1 α の調製

aEF1 α を発現させた菌体を超音波破碎し、遠心後の上清を 70°C で 30 分間熱処理を行うことで大腸菌由来のタンパク質の多くが変性し不溶化することが SDS-PAGE (図 2.1A)により確認された。これを氷上で急冷した後、遠心により不溶性画分を沈殿させ、aEF1 α を含む上清を Ni キレーティングカラムクロマトグラフィーで精製した。aEF1 α は Ni-NTA SuperFlow 樹脂に吸着した後、洗浄緩衝液 1, 2, 3 によるカラムの洗いを経て溶出緩衝液にて高濃度で溶出された (図 3.2.1A)。

Ni-NTA SuperFlow 樹脂からの溶出液中の aEF1 α に融合した His タグはスロンビンを加えて透析することで切断され、この透析産物を再度 Ni-NTA SuperFlow 樹脂を充填したカラムにロードすることで His タグの切断された aEF1 α を精製した。素通りと洗浄の画分に His タグの切断された aEF1 α が存在することを SDS-PAGE により確認した (図 3.2.1B)。

さらに、His タグを切断した aEF1 α を陽イオン交換カラム Resource S により精製した。この時のクロマトグラフィーのパターンを図 3.2.1C, SDS-PAGE の結果を図 3.2.1D に示す。aEF1 α はおよそ 100 mM NaCl で溶出されたが、全長の aEF1 α のバンドの下に aEF1 α の切断物と思われるバンドが観察されたため、これを除くべくさらなる精製を行った。Resource S からの aEF1 α の溶出画分を回収し、これを HiLoad Superdex 200 にロードしてゲルろ過による精製を行った。この時のクロマトグラフィーのパターンを図 3.2.1E, SDS-PAGE の結果を図 3.2.1F に示す。全長の aEF1 α は 85 mL 付近に溶出されたが、切断物を除くことはできなかった。しかし、ピークの形は左右対称の単分散になっておりサンプルの状態は均一であると考えられるため、この溶出画分を回収して濃縮し、結晶化に用いることにした。

3.2.2 *Aeropyrum pernix* aPelota の調製

aPelota を発現させた菌体を超音波破碎し、遠心後の上清を 70°C で 30 分間熱処理を行うことで大腸菌由来のタンパク質の多くが変性し不溶化することが SDS-PAGE (図 2.2A)により確認された。これを氷上で急冷した後、遠心により不溶性画分を沈殿させ、aPelota を含む上清を Ni キレーティングカラムクロマトグラフィーで精製した。aPelota は Ni-NTA SuperFlow 樹脂に吸着した後、洗浄緩衝液によるカラムの洗いを経て溶出緩衝液にて高濃度で溶出された (図 3.2.2A)。

さらに、粗精製した aPelota を陽イオン交換カラム Resource S により精製した。この時

のクロマトグラフィーのパターンを図 3.2.2B, SDS-PAGE の結果を図 3.2.2C に示す. aPelota はおよそ 240 mM NaCl で溶出された. aPelota は 4°C における溶解度が低いため, 高濃度で溶出されないように数回に分けてサンプルをカラムにロードした. また, 同様の理由により 4°C では濃縮できないため, aPelota については 20°C にて濃縮した.

3.2.3 aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶化

aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶化サンプルを用いて結晶化条件のスクリーニングを行い, 図 3.2.3 のような結晶を得ることができた. 結晶化条件を表 3.2.1 に示す.

そこで, より高分解能の結晶を得るために結晶化条件の最適化を行った. その結果以下のような結晶化条件で 20°C にて図 3.2.4A の結晶が得られた. 結晶化条件を表 3.2.1 に示す.

3.2.4 aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体結晶の X 線回折実験とデータ処理

上記の結晶について, KEK PF-AR NW12A にて X 線回折実験を行い, 図 3.2.4B のような最大分解能 2.3 Å の X 線回折像が得られた. ハーベスト溶液およびクライオ溶液の組成を表 3.2.2 に示す.

X 線回折データをプログラム HKL2000 で処理したところ, この aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶は空間群 $C222_1$ に属し, 格子定数は $a = 148.9$ Å, $b = 158.9$ Å, $c = 427.2$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ であった. 回折データの統計値を表 3.2.3 に示す. また, この結晶の Matthews 係数, 及び溶媒含量は表 3.2.4 のようになった.

3.2.5 SeMet-aEF1 α の調製と aPelota·SeMet-aEF1 α ·GTP 複合体の結晶化

粗精製した SeMet-aEF1 α の SDS-PAGE の結果を図 3.2.5A に, さらにそれを Resource S で精製した際のクロマトグラフィーのパターンを図 3.2.5B に, SDS-PAGE の結果を図 3.2.5C に示す.

aPelota·SeMet-aEF1 α ·GTP 複合体の結晶化サンプルを用いて結晶化を行い, 最適化後の aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶化条件と同じ条件で 3 日後に図 3.2.6 のような結晶を得ることができた.

そして得られた結晶を用いたシーディングによる結晶化を行った結果, 最適化後の aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶化条件と同じ条件で図 3.2.7A のような結晶が得られた.

3.2.6 aPelota·SeMet-aEF1 α ·GTP 複合体結晶の X 線回折実験とデータ処理

上記の結晶について KEK PF-AR NW12A にて X 線回折実験を行い、図 3.2.7B のような最大分解能 2.8 Å の X 線回折像が得られた。測定波長は、セレン原子の K 殻吸収端における peak 波長である 0.97913 Å とした。ハーベスト溶液およびクライオ溶液の組成は aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体結晶に用いたものと同じである。

aPelota·SeMet-aEF1 α ·GTP 複合体結晶の回折データをプログラム HKL2000 で処理したところ、aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体結晶と同様に、空間群は C222₁ に属し、格子定数は $a = 149$ Å, $b = 159$ Å, $c = 427$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ であった。なお、回折データの統計値を表 3.2.3 に示す。

3.2.7 aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造解析

3.2.7.1 セレン原子の位置決定・位相計算

セレノメチオニン置換体の peak 波長のデータについて、プログラム SnB による 10000 回の試行によって重原子の位置を探索した所、他と比べて R 値が有為に低い解を 1 つ得ることができた (図 3.2.8)。そしてこの解において同定されていたセレン原子のうちサイトごとの占有率が高く妥当であると考えられる 50 個のセレン原子の位置情報と 3.2 Å までの回折データを用いてプログラム SHARP によって位相計算を行った。そしてその後のプログラム SOLOMON による溶媒平滑化によって非対称単位当たり 4 分子の aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の解釈可能な電子密度マップが得られた。位相計算の統計値を表 3.2.3 に示す。

3.2.7.2 aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体のモデル構築・精密化

得られた電子密度マップに対してプログラム RESOLVE による aPelota と aEF1 α の自動モデル構築を試みたが、マップの分解能が低かったため正しくモデルを置くことができなかった。そこで既に報告されている *Thermoplasma acidophilum* 由来 aPelota と *Sulfolobus solfataricus* 由来 aEF1 α の構造を 1 つの複合体のマップに当てはめ、さらにこのモデルを非対称単位中の他の 3 つの複合体マップに移すマトリックスを決定した。そしてこのマトリックスに基づいてプログラム DM によって 4 分子の複合体マップを重ね合わせて平均化することで位相が改良され、分解能は 2.8 Å に向上した。そしてこれによってプログラム RESOLVE による自動モデル構築が可能になった。自動構築された aPelota·aEF1 α 複合体モデルに対してプログラム COOT を用いた手動でのモデル構築とプログラム PHENIX によるモデルの精密化を繰り返した。こうして得られたモデルを用いて 3.2.4 で得られた最大分解能 2.3 Å の native 結晶由来の回折データに対して CCP4

program suite の molrep で分子置換を行い, さらに手動でのモデル構築と精密化を繰り返した. aEF1 α の N 端の 3 残基と C 端の 2 残基, 及び aPelota の C 端 1 残基はディスオーダーしておりモデルを構築することができなかったが, 最終的には $R_{\text{free}} = 26.5 \%$, $R_{\text{work}} = 20.7 \%$ まで精密化することができた. 構造精密化の統計値を表 3.2.5 に, 精密化完了後の aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造モデルと $2F_o - F_c$ マップを図 3.2.9 に, 各残基の主鎖二面角をプロットした Ramachandran プロットを図 3.2.10 に示す. 非対称単位中に含まれる 4 分子の aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体はほぼ同じ構造をとっていた.

3.2 の表

初期の結晶化条件 (Wizard #37)	2.5 M NaCl 100 mM Imidazole pH 8.0
最適化後の結晶化条件	2.2 M NaCl 100 mM Imidazole pH 8.0

表 3.2.1 aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶化条件

ハーベスト溶液	2.64 M NaCl 120 mM Imidazole pH 8.0
クライオ溶液	2.64 M NaCl 120 mM Imidazole pH 8.0 20% Ethylene glycol

表 3.2.2 結晶に対するハーベスト溶液とクライオ溶液の組成

Data collection statistics	SeMet	Native
X-ray source	PF-AR NW12A	PF-AR NW12A
Wavelength (Å)	0.97913 (peak)	1.0
Space group	$C222_1$	$C222_1$
Unit cell dimensions (Å, °)	$a = 149.2, b = 158.9, c = 427.0$ $\alpha = \beta = \gamma = 90$	$a = 148.9, b = 158.9, c = 427.2$ $\alpha = \beta = \gamma = 90$
Resolution (Å)	50–2.80 (2.85–2.80)	50–2.30 (2.34–2.30)
Unique reflections	122,732 (5,835)	214,047 (9,995)
Redundancy	7.5 (3.2)	4.9 (2.7)
Completeness (%)	98.6 (95.1)	95.9 (90.2)
$I/\sigma(I)$	16.6 (2.12)	18.5 (2.25)
R_{sym}	0.111 (0.444)	0.079 (0.360)
Phasing statistics		
No. of Se sites	50	
Phasing power (Ano)*	0.878	
R_{cullis} (Ano)*	0.856	
Mean FOM*	0.26	

The numbers in parentheses are for the last shell.

*For acentric reflections

表 3.2.3 aPelota•aEF1 α •GTP 複合体の回折データと位相計算の統計値

非対称単位中の分子数	Mw[kDa]	Vm[Å ³ /Da]	溶媒含量[%]
1	88	14.38	91.44
2	176	7.19	82.89
3	264	4.79	74.33
4	352	3.59	65.78
5	439	2.88	57.22
6	527	2.40	48.67
7	615	2.05	40.11
8	703	1.80	31.56
9	791	1.60	23.00
10	879	1.44	14.45

表 3.2.4 aPelota・aEF1 α 複合体結晶の Matthews 係数 (Vm) および溶媒含量

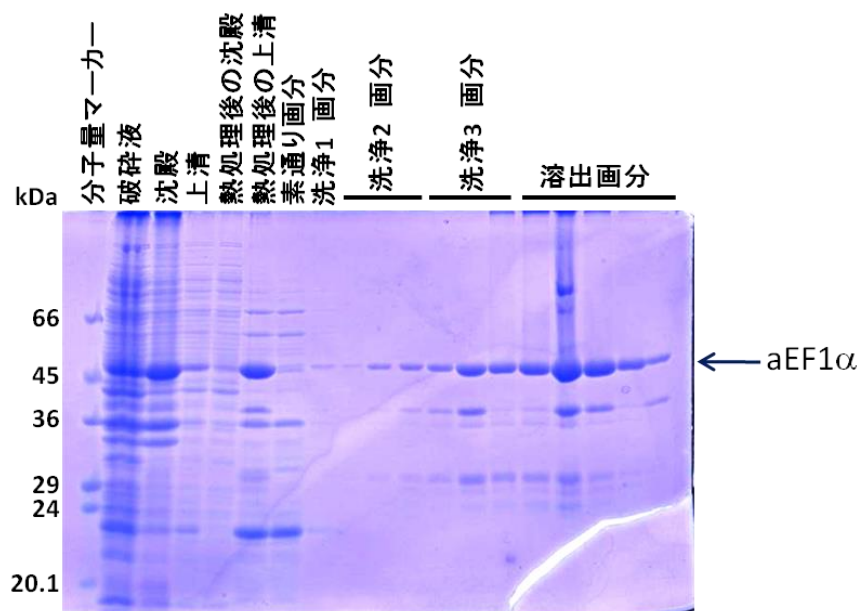
Refinement statistics	
Resolution (Å)	32.433–2.30
No. of reflections (all/test)	216119/10902
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.2070/0.2649
No. of atoms	
Protein	24212
Ligand	132
Water	1349
RMSD of	
Bond length (Å)	0.009
Bond angle (°)	1.288
Average B factor (Å ²)	
Protein	49.1
Ligand	50.0
Water	46.3
Ramachandran plot	
Favored region (%)	94.0
Outliers (%)	0.6

The numbers in parentheses are for the last shell.

表 3.2.5 aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造精密化の統計値

3.2 の図

A



B

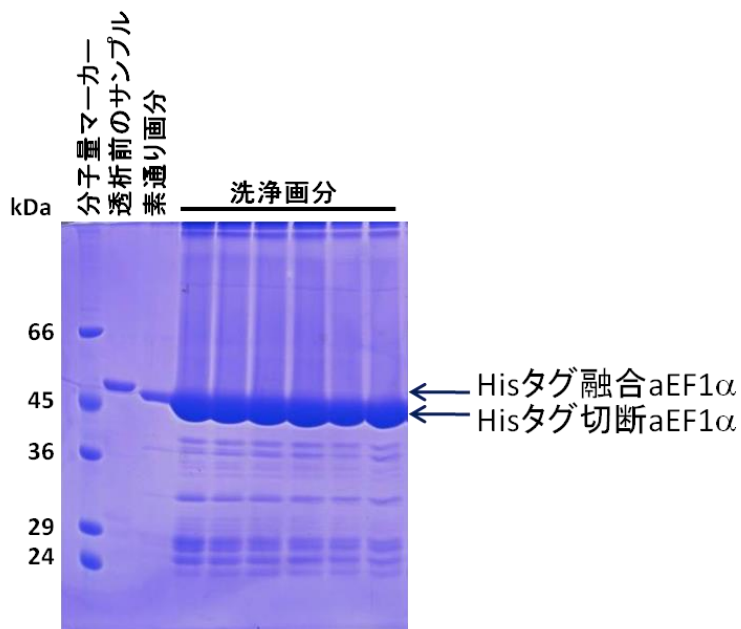
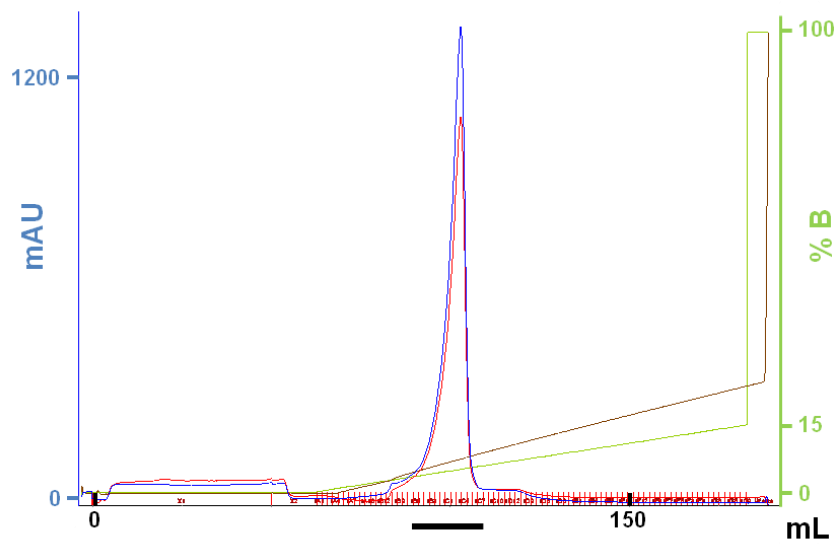


図 3.2.1 aEF1αの精製

A 粗精製における SDS-PAGE

B His-tag の切断における SDS-PAGE

C



D

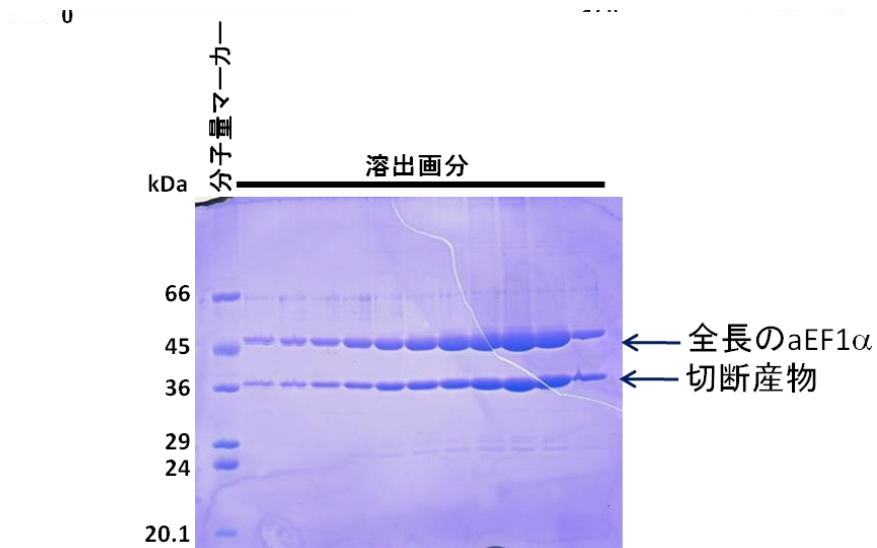
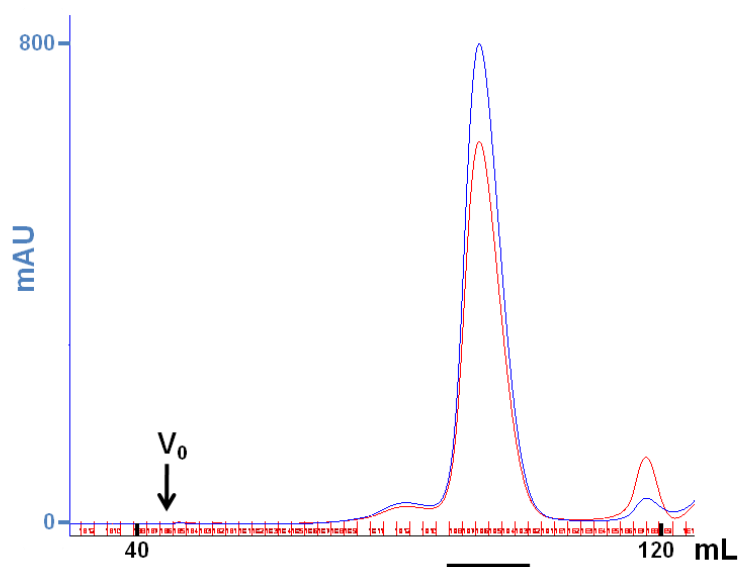


図 3.2.1 aEF1αの精製

C Resource S カラムクロマトグラフィーのパターン

D Resource S カラムからの溶出液の SDS-PAGE

E



F

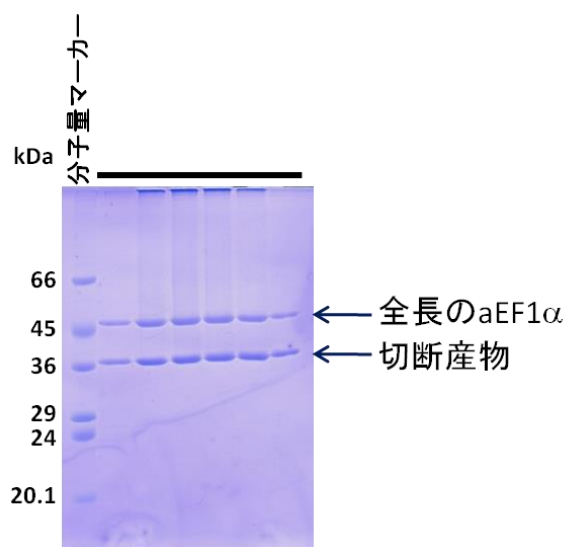


図 3.2.1 aEF1αの精製

E HiLoad Superdex 200 によるゲルろ過クロマトグラフィーのパターン

F HiLoad Superdex 200 からの溶出液の SDS-PAGE

A

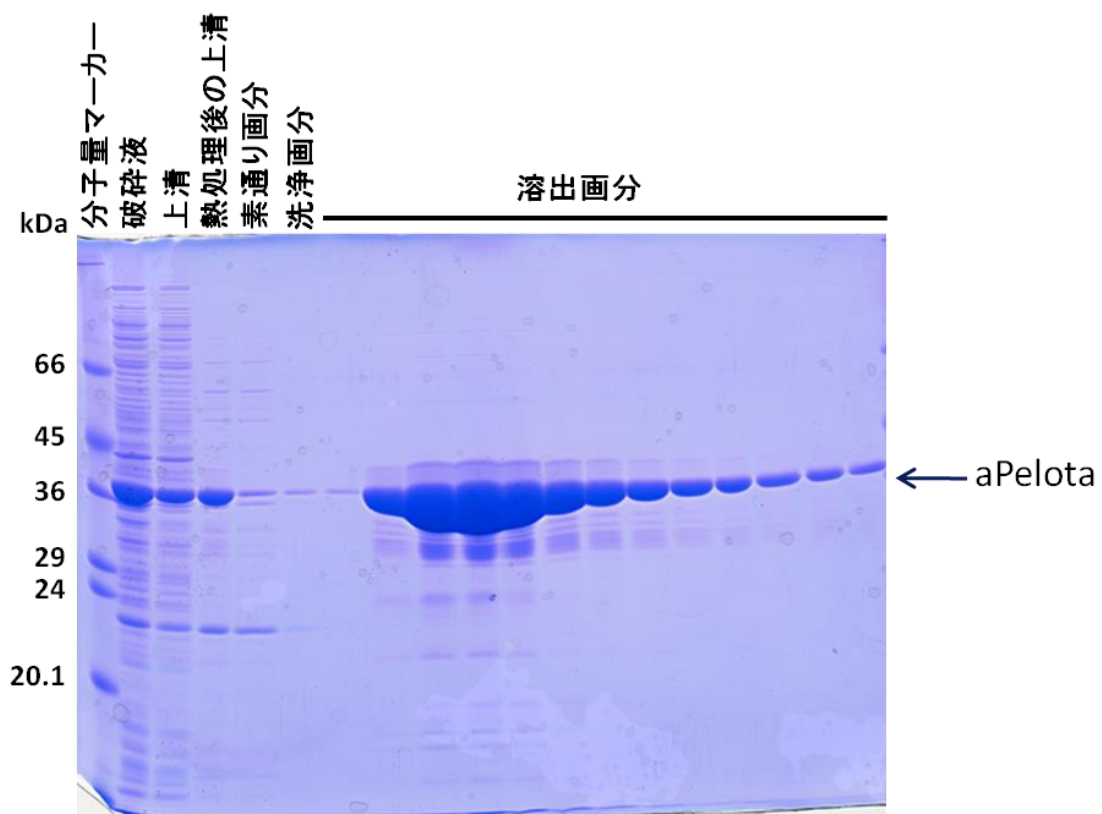
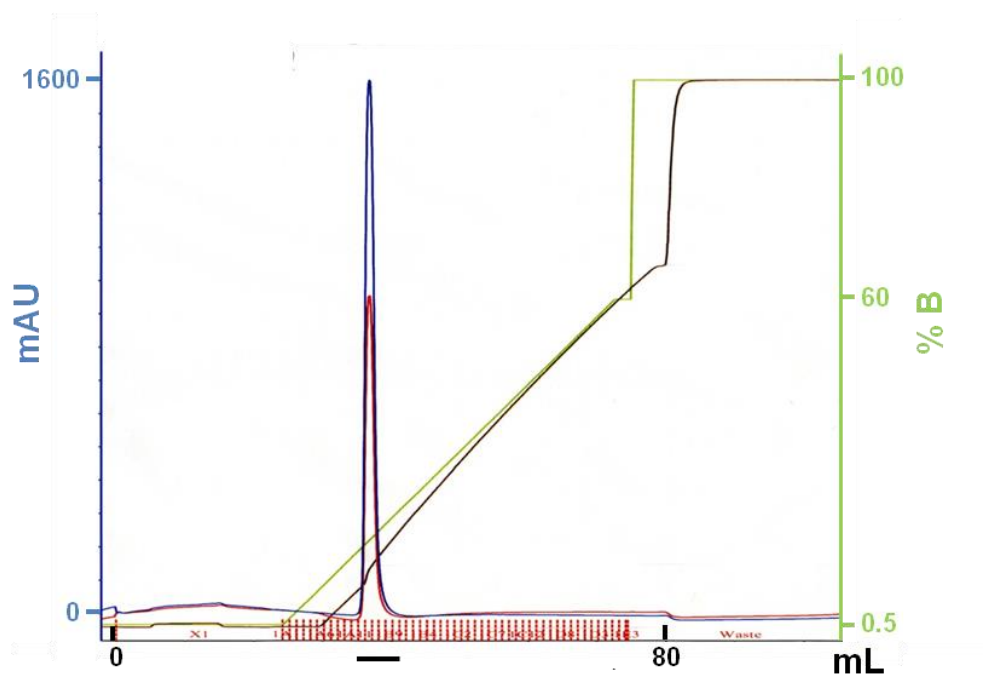


図 3.2.2 aPelota の精製

A 粗精製における SDS-PAGE

B



C

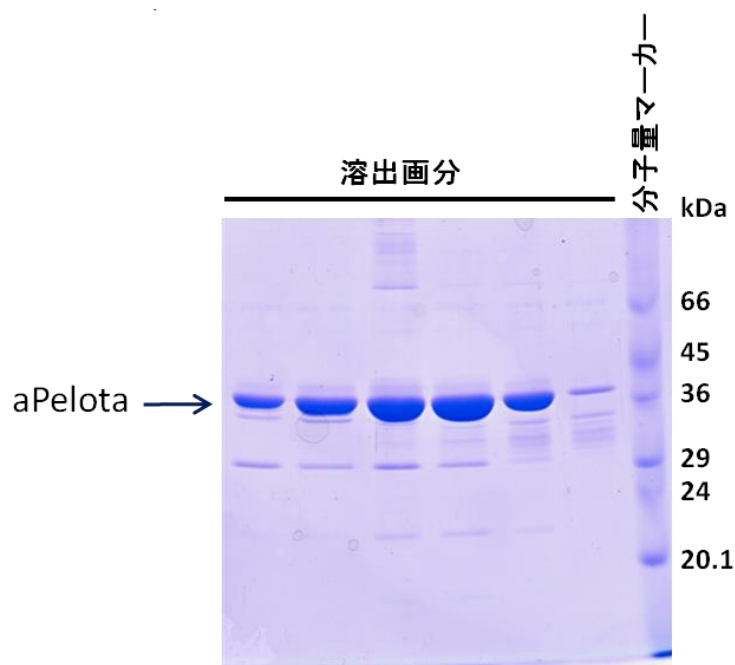


図 3.2.2 aPelota の精製

B Resource S カラムクロマトグラフィーのパターン

C Resource S カラムからの溶出液の SDS-PAGE

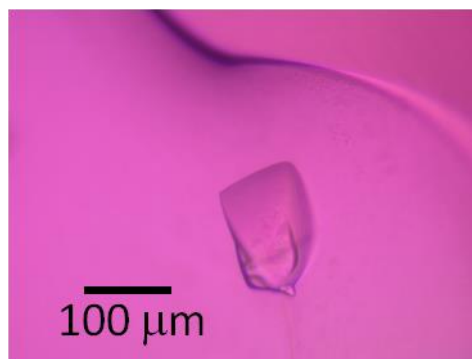
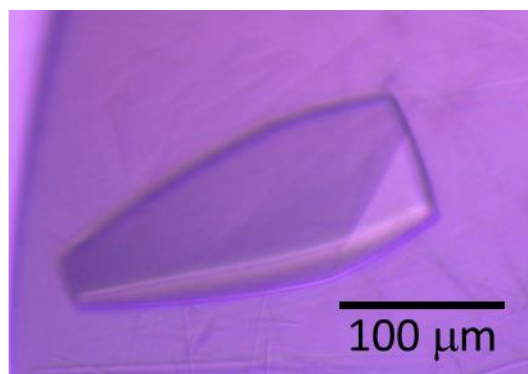


図 3.2.3 初期スクリーニングによって得られた aPelota·aEF1α·GTP 複合体の結晶

A



B

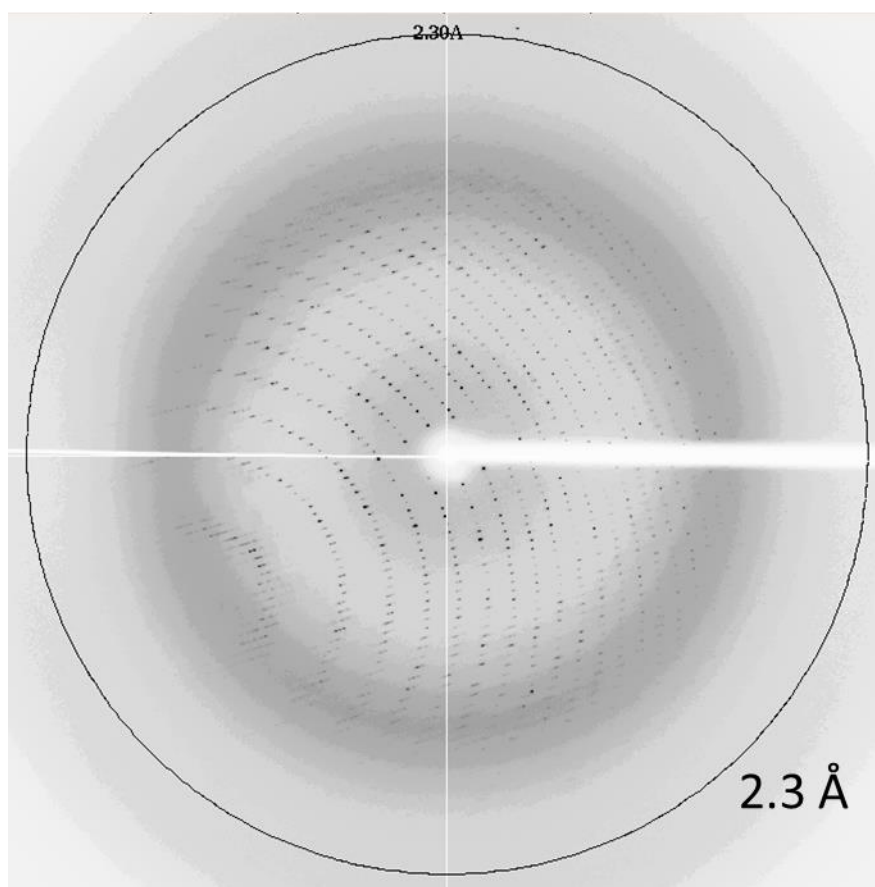


図 3.2.4 aPelota·aEF1α·GTP 複合体の結晶化と X 線回折像

A 結晶化条件の最適化によって得られた aPelota·aEF1α·GTP 複合体の結晶

B A の結晶から得られた X 線回折像

A

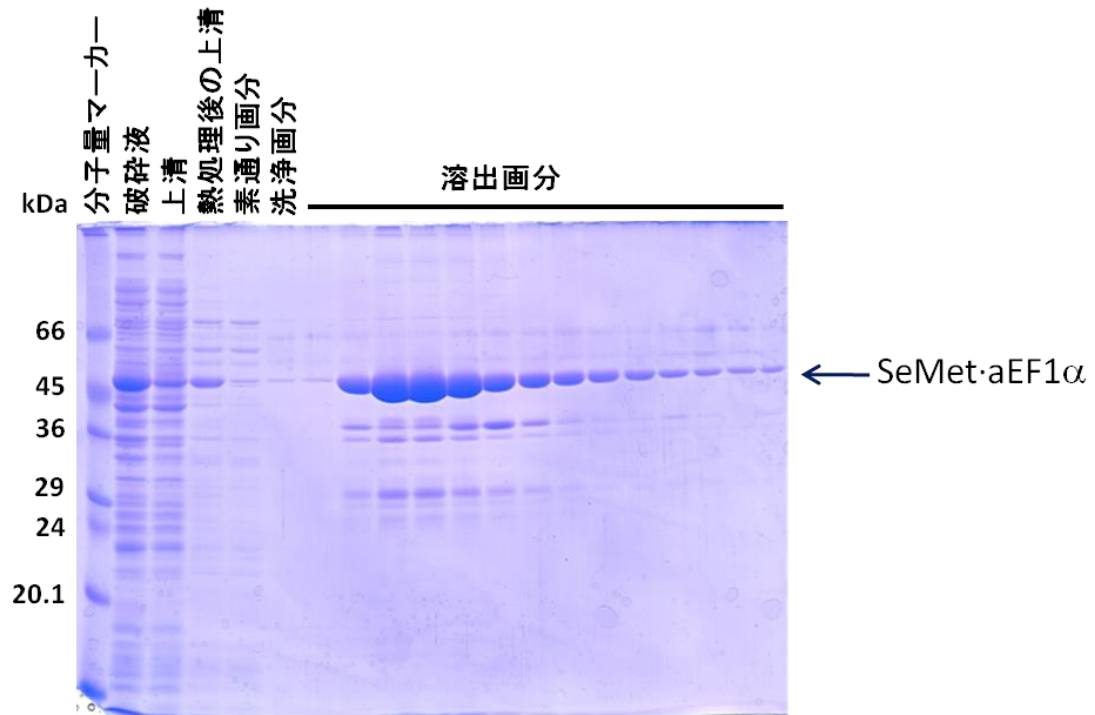
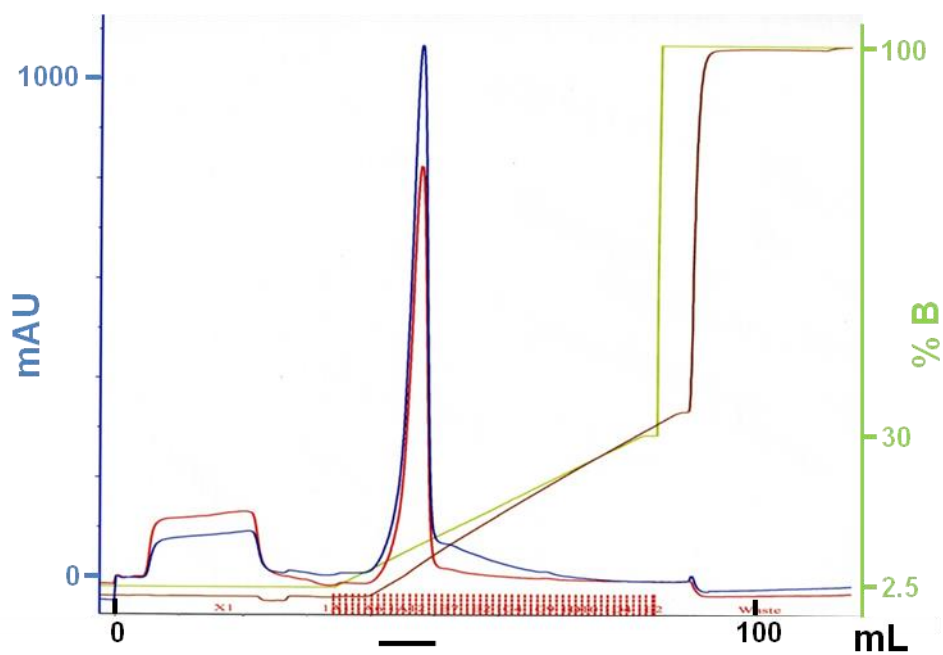


図 3.2.5 SeMet-aEF1αの精製

A：粗精製における SDS-PAGE

A



B

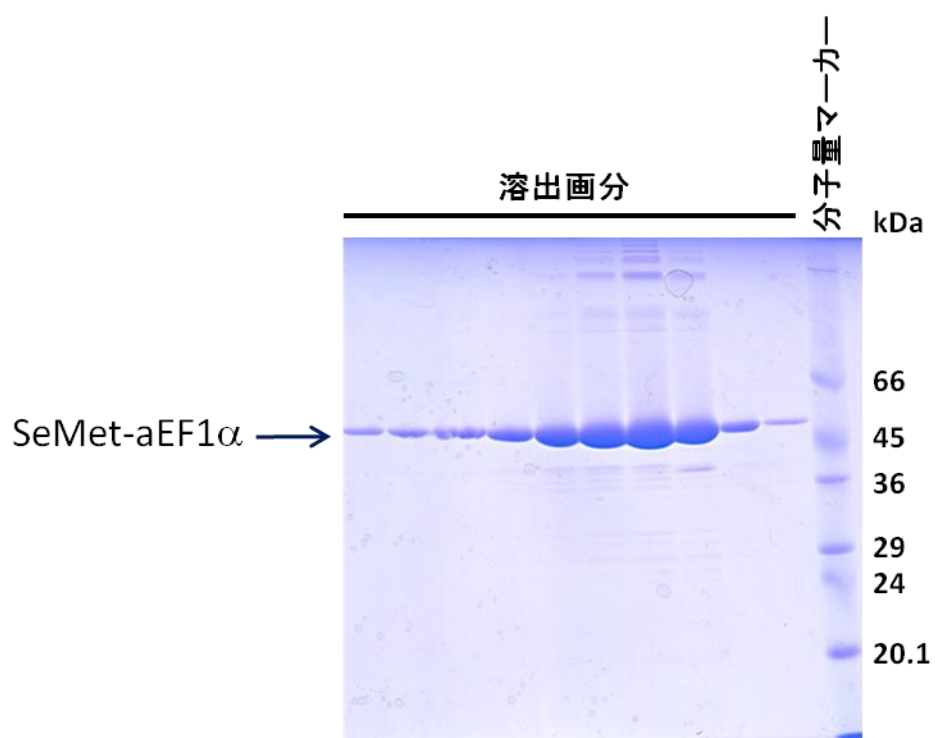


図 3.2.5 SeMet-aEF1αの精製

B Resource S カラムクロマトグラフィーのパターン

C Resource S カラムからの溶出液の SDS-PAGE

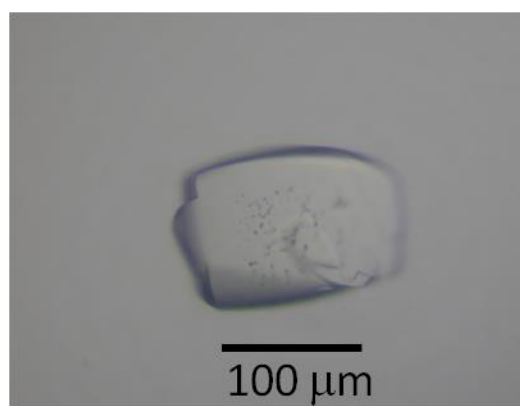
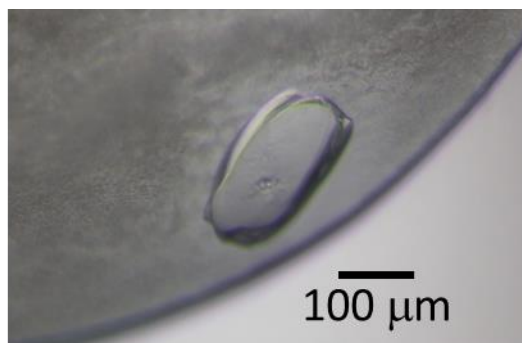


図 3.2.6 aPelota·SeMet-aEF1 α ·GTP 複合体の結晶

A



B

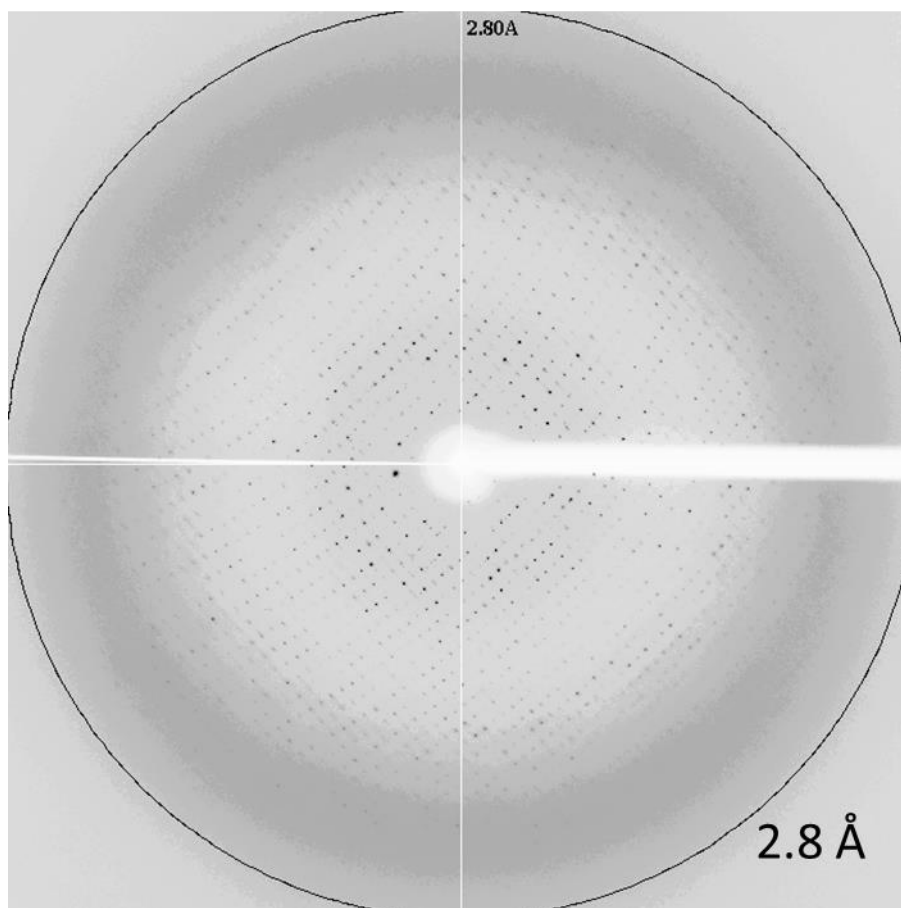


図 3.2.7 aPelota·SeMet-aEF1α·GTP 複合体の結晶化と X 線回折像

A シーディングによって得られた aPelota·SeMet-aEF1α·GTP 複合体の結晶

B A の結晶から得られた X 線回折像

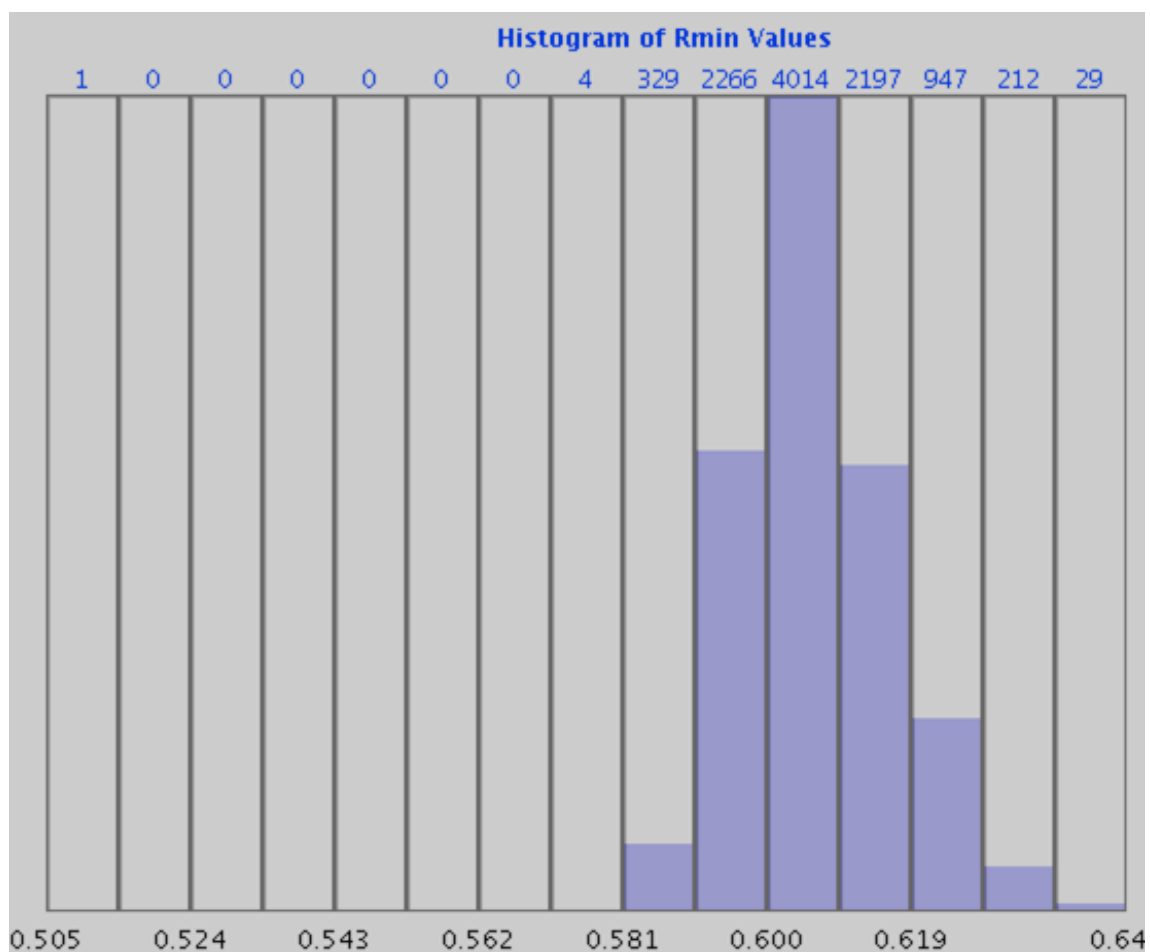


図 3.2.8 SnB による Se 原子位置の 探索結果
左端に R 値が有為に低い解が1つ見える.

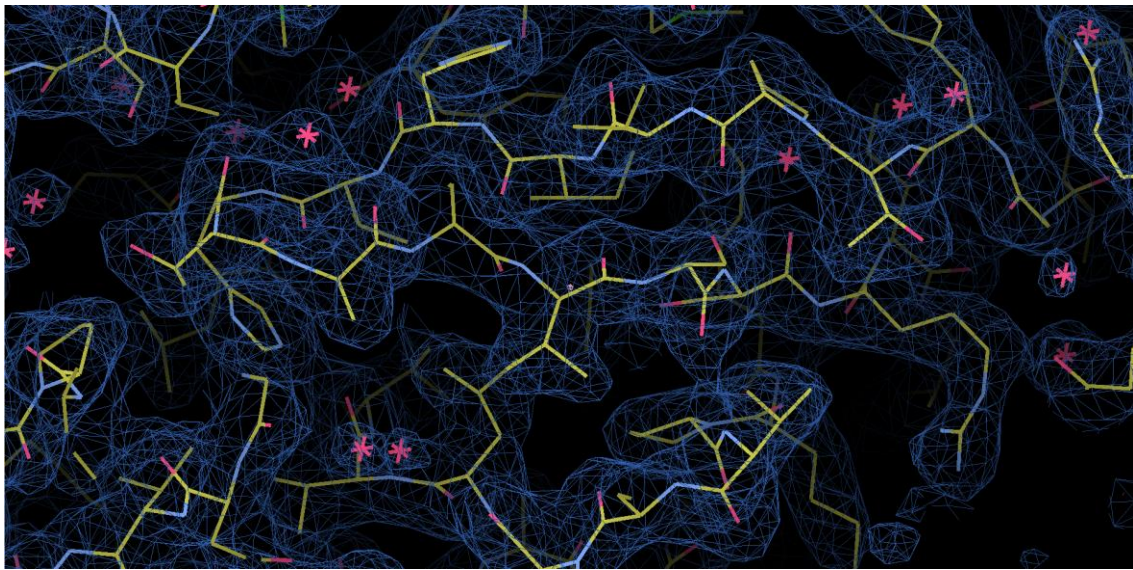


図 3.2.9 精密化完了後の aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造モデルと 1.0 σ で表示された 2F₀-F_c マップ

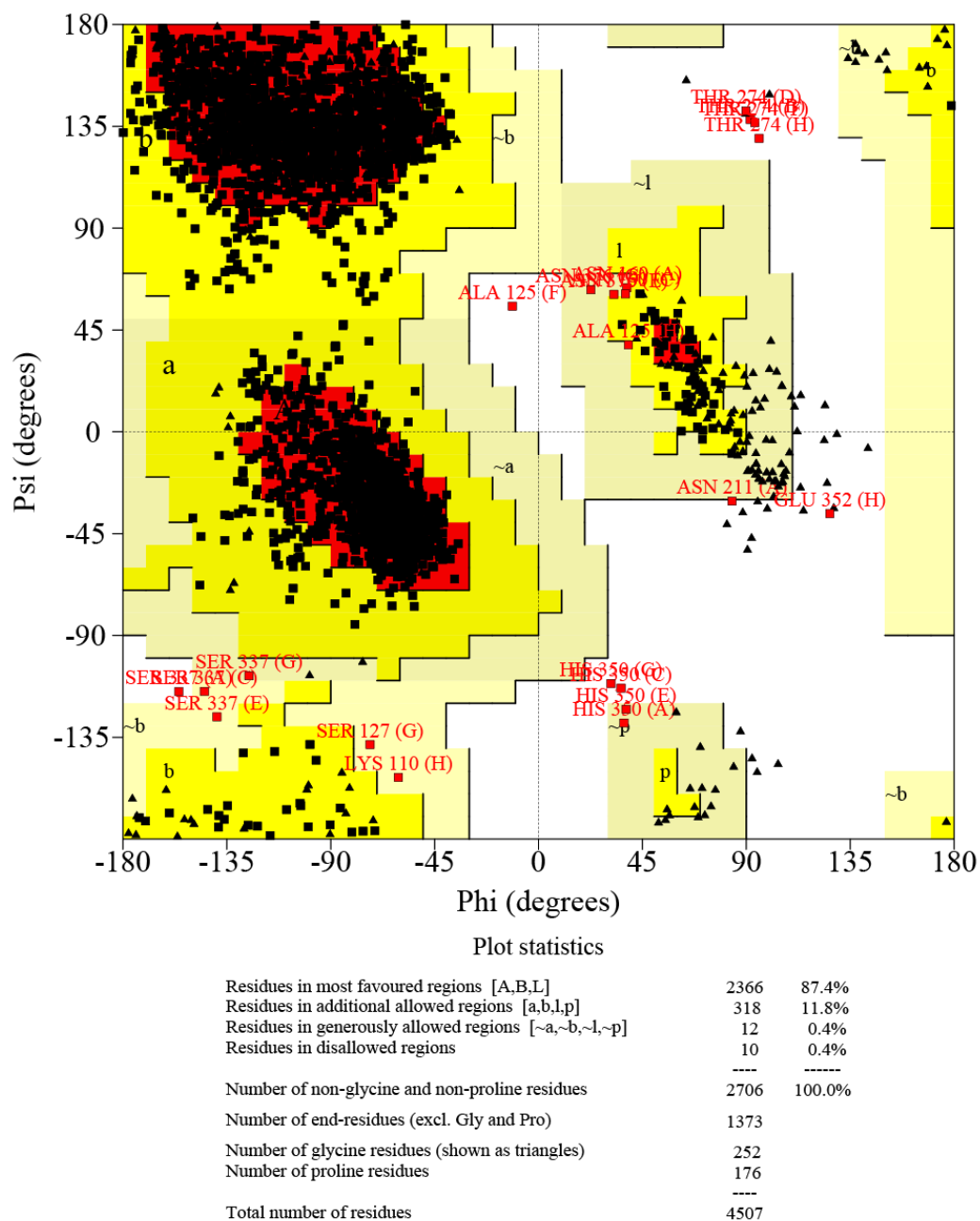


図 3.2.10 Pelota·aEF1α·GTP 複合体構造の Ramachandran プロット

3.3 考察

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本節については非公開

第4章 YfcM の構造機能解析

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため，本章については非公開

第5章 研究成果と総合討論

5.1 本研究の成果

5.1.1 aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の構造・機能解析

- (1) 古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来の aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶構造を 2.3 Å の分解能で決定した.
- (2) aRF1 の認識に関わる aEF1 α の残基を同定し, それらの残基の重要性を Yeast two hybrid assay で確認した.
- (3) aRF1 が, GTP を認識した aEF1 α の Switch I, II 領域と相互作用することで aEF1 α への GTP の結合を安定化することを解明した.
- (4) aRF1 は tRNA の形状を擬態することで aEF1 α の tRNA 認識部位と相互作用し, 終止コドンの認識に関わる aRF1 の NIKS/L モチーフは tRNA のアンチコドン, ポリペプチドを放出させる GGQ モチーフは tRNA ではアミノ酸を付加する CCA 末端に構造上対応することが明らかとなった.
- (5) aRF1 がリボソーム中でフレキシブルなドメイン A を動かすことで tRNA によるコドン認識と同様の機構で終止コドンを認識することを提唱した.
- (6) GTP の加水分解と aEF1 α の遊離によってリボソームに収納された aRF1 はドメイン B をドメイン C に対して動かすことで GGQ モチーフを PTC で P site の tRNA の CCA 末端と相互作用させ, タンパク質を放出させることを提唱した.

5.1.2 aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造・機能解析

- (1) 古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来の aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の結晶構造を 2.3 Å の分解能で決定した.
- (2) aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体中では aPelota は tRNA の形状と 5' 端周辺領域のリン酸の負電荷を擬態することで aEF1 α の tRNA 認識部位と相互作用することを解明した.
- (3) aPelota/Dom34/Pelota に高度に保存された PGF モチーフは aEF1 α の GTP 加水分解を司る His94 と相互作用することで aEF1 α を GTP 型に維持することを解明した.
- (4) aRF1 と aPelota の aEF1 α との相互作用機構の違いに基づき, aRF1 とは結合するが aPelota とは結合しない aEF1 α を作製した.
- (5) aPelota が遊離型の tRNA よりもリボソームの A site でアンチコドンと対合した A/T tRNA をより擬態していることを解明した.
- (6) リボソームの tRNA·EF-Tu との複合体構造に基づいて aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の

リボソームとのドッキングモデルを構築した。

- (7) ドッキングモデルで得られた知見と変異体解析の結果に基づき, Dom34 がドメイン A でリボソームの DC と直接相互作用し, Hbs1 による GTP 加水分解によってリボソームを解離させるという新規の NGD メカニズムを提唱した。

5.1.3 YfcM の構造・機能解析

- (1) *Escherichia coli* 由来の YfcM の結晶構造を 1.45 Å の分解能で決定した。
- (2) YfcM が UPF0054 family タンパク質と似た構造をもつことを解明した。
- (3) YfcM は UPF0054 family タンパク質の 1 つである YbeY の活性部位を形成する Zn(II) イオンを配位する 3 つのヒスチジン残基モチーフとほぼ同じ位置に 2-His-1-carboxylate モチーフをもち, このモチーフで Fe(II)イオンを配位していることを解明した。
- (4) YfcM の 2-His-1-carboxylate モチーフやそれと相互作用する残基, 及び $\alpha 2$ と $\alpha 3$ を結ぶ長いループが EF-P の水酸化に重要な役割を果たしていることを変異体解析によって解明した。

5.2 総合討論

5.2.1 翻訳終結研究における今後の課題

翻訳終結に関しては, 2012 年にリボソームと結合した eRF1·eRF3·GDPNP 複合体の電子顕微鏡による構造が報告された⁸⁴ (図5.2.1)。この構造中では eRF1 のドメイン A はリボソーム A site に奥深く入り, DC の近傍に達している。またリボソームと結合した eRF1·eRF3·GDPNP 複合体の構造はリボソームに結合した tRNA·EF-Tu 複合体や後述する Dom34·Hbs1·GDPNP 複合体の構造とよく似ており, eRF1 も eRF3 によってリボソームの A site へ運ばれることが明らかとなった (図5.2.2)。eRF1·eRF3·GDPNP 複合体によるリボソームの認識機構は tRNA·EF-Tu 複合体や Dom34·Hbs1·GDPNP 複合体によるリボソームの認識機構とよく似ているのだが, eRF1 はドメイン C 中の minidomain を介してリボソームと特異的な相互作用を形成している (図5.2.2)。この minidomain は Dom34 には存在しないため, 翻訳終結におけるこの特異的相互作用の意味を今後解明することが必要である。また, この構造の分解能は 17 Å と低いため, 今後高分解能での構造を決定することで eRF1 の NIKS/L モチーフや YxCxxxF モチーフが 3 つの終止コドンを認識する機構を解明する必要がある。

5.2.2 Dom34·Hbs1·GTP/aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体によるリボソームレスキュー機構

我々が aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造を発表した後 2010 年に *S. pombe* 由来の Dom34·Hbs1 複合体の結晶構造が報告された⁸⁵ (図 5.2.3A). この構造は Hbs1 のドメイン 1 が GTP と結合していないため Switch I, II 領域が Dom34 とは相互作用していないが, その他は我々の aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体構造とよく似ていた. また, Dom34 は Hbs1 に結合した GTP の解離を防いでいることが *in vitro* での結合実験によって明らかとなった⁸⁵. このことは aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体構造において aPelota が GTP を結合した aEF1 α の Switch I, II 領域を安定化していたことと一致する. これらのことから, Dom34·Hbs1·GTP 複合体も aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体も作用機構は本質的には同じであると考えられる. ただし aEF1 α とは違って Hbs1 にはドメイン 1 よりも N 端側に約 240 残基から成る N 端ドメインが存在する. この N 端ドメインの役割は定かではないが, Dom34 と結合した Hbs1 の構造を安定化すると考えられている⁸⁵.

また, *in vitro* での実験により, Dom34·Hbs1·GTP 複合体がコドン非依存的にリボソームの A site と相互作用し, GTP 加水分解によってリボソームのサブユニットへの解離とポリペプチドを結合した P site tRNA の放出を引き起こすことが証明された⁸⁶. P site の tRNA に結合したポリペプチドが tRNA から放出されない理由は, eRF1 の GGQ モチーフを含むループに対応する Dom34 のループ C が eRF1 のループより短いために P site tRNA の CCA 末端と相互作用できず, またループ C が GGQ モチーフを持っていないためであると考えられる. さらに Dom34·Hbs1·GTP 複合体が mRNA の 3' 末端で停止したリボソームを解離させることでエキソソームによる mRNA の分解を促進することも報告された⁸⁷.

さらに 2011 年にリボソームと結合した Dom34·Hbs1·GDPNP 複合体の電子顕微鏡による構造が報告された⁸⁸ (図 5.2.3B). この構造中の Dom34·Hbs1·GDPNP 複合体は aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体とほぼ同じ構造をとっており, Dom34 のドメイン A は A/T tRNA の形状を擬態することでリボソームの A site に入り, ループ A やループ B を介して mRNA を押しのけてリボソームの DC と直接相互作用していた. そしてその影響で mRNA は不安定化して P site と A site 中ではほとんどディスオーダーしていた. 一方 Hbs1 はリボソーム上で eEF1 α などの翻訳伸長因子の結合部位とほぼ同じ領域に結合していたが, その N 端ドメインは mRNA のリボソームへの入り口を形成する mRNA entry site 近傍でリボソームタンパク質 rpS と相互作用していた. rpS3 は mRNA entry site から A site 近傍まで伸びているため, Hbs1 の N 端ドメインと rpS3 との相互作用の影響が A site まで伝わり, そこでの mRNA の安定性にさらに影響を与える可能性もある. また,

Hbs1 が翻訳伸長因子と同じ領域に結合していることは, Hbs1 による GTP の加水分解が EF-Tu による翻訳伸長の時と同様に DC の構造変化によって引き起こされることを示唆する.

これらの報告は, 3.3.10 で論じた NGD における Dom34-Hbs1-GTP 複合体の作用機構を支持する.

5.2.3 リボソーム解離因子 Rli1

しかし, Dom34-Hbs1-GTP 複合体だけでは *in vitro* におけるリボソームの解離効率は低いため, NGD において十分な効率でリボソームを解離させるためには他の因子も必要があることが示唆された⁸⁸. そしてそのような因子として Rli1 (他の真核生物では ABCE1, 古細菌では aABCE1 と呼ばれる)が同定された^{89,90}.

Rli1 は ATP-binding cassette (ABC) family に属するタンパク質である. この family のタンパク質は 2 つの ATP 結合ドメイン (NBD1 と NBD2) をもち 2 分子の ATP と結合する. これらの ATP は NBD1 と NBD2 の間に結合しその双方と相互作用するため, ATP 条件下では NBD1 と NBD2 は ATP を介して近接した構造をとる⁹¹ (閉状態). 片方の NBD は Walker A モチーフを介して ATP 全体を認識し, もう片方の NBD は LSGGQ モチーフを介して主に ATP の γ リン酸と相互作用する. 一方 ATP が加水分解されると LSGGQ モチーフが ATP と相互作用できなくなるため, NBD1 と NBD2 は遠ざかる⁹² (開状態). ABC family のタンパク質はこの ATP 依存的な構造変化を駆動力として生体膜を介した物質の輸送を行う.

Rli1 は 2 つの [4Fe-4S] クラスターをもつ FeS ドメイン, ABC family タンパク質に特徴的な NBD1, NBD2 と 2 つの Hinge 領域から成る⁹³ (図 5.2.4A, B). しかし Rli1 は膜タンパク質ではないため他の ABC family タンパク質のような生体膜を介した物質の輸送は行わず, その代わり翻訳終結反応においてリボソームのサブユニットへの解離を行うことが報告されている^{94,95}. 開状態の Rli1 は翻訳終結が完了した後にリボソームや A site の e/aRF1 と相互作用する. そして ATP との結合による閉状態への構造変化と ATP の加水分解によってリボソームを解離させると考えられている (図 5.2.4C). この反応には Rli1 の FeS ドメインが重要な役割を果たすことも分かっている⁹⁴. そしてこの Rli1 が, Dom34-Hbs1-GTP 複合体による NGD においてリボソームをサブユニットへと解離させる効率を約 19 倍上昇させ, またその反応が ATP 依存的であることが明らかとなった⁹⁰ (図 5.2.5A, B).

5.2.4 Dom34・Rli1・リボソーム/aPelota・aABCE1・リボソーム複合体の構造

さらに2012年に、Dom34・Rli1・リボソーム複合体及びaPelota・aABCE1・リボソーム複合体の電子顕微鏡による構造が報告された⁹⁶ (図 5.2.6B)。この構造では Rli1/aABCE1 はリボソームのサブユニット間で eEF1 α や Hbs1 などの翻訳因子の結合部位とほぼ同じ領域に結合しており、リボソームの両方のサブユニットにまたがった相互作用を形成していた (図 5.2.6A, B)。このことから、Rli1/aABCE1 のリボソームとの結合は Hbs1/aEF1 α が GTP の加水分解によってリボソームから遊離した後に起こると考えられる。また、Rli1/aABCE1 によるリボソームのサブユニットへの解離に重要な役割を果たす FeS ドメインは Dom34/aPelota のドメイン C と相互作用していた。一方 Dom34/aPelota には大きな構造変化が観察された。Hbs1/aEF1 α に結合した状態の構造と比べると、ドメイン B が P site の方向へ約 140°回転し、Loop C を介して P site の tRNA のアクセプターステムと相互作用していた (図 5.2.6C, D)。これらのことを考えると、ATP の結合や加水分解に伴う Rli1/aABCE1 の構造変化はリボソームのサブユニット間の相互作用ネットワークを乱すとともに FeS ドメインを通じて Dom34/aPelota や P site の tRNA を不安定化することでリボソームをサブユニットへと解離させることが考えられる。

以上のことから、NGD においてリボソームがサブユニットに解離するより詳細な機構が提唱された⁹⁶ (図 5.2.7)。まず GTP を結合した Hbs1/aEF1 α が停止したリボソームの A site に Dom34/aPelota を挿入する。次に Hbs1/aEF1 α は GTP を加水分解し、リボソームから遊離する。そして Dom34/aPelota はドメイン B を動かして P site の tRNA と相互作用するとともに開状態の Rli1/aABCE1 が Dom34/aPelota のドメイン C と結合する。最後に Rli1/aABCE1 は ATP の結合と加水分解に伴う構造変化によってリボソームを不安定化し、サブユニットへと解離させる。

さらに、Dom34 と Rli1 によるリボソームのサブユニットへの解離は NGD 以外の過程でも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。リボソームの 40S サブユニットが成熟する過程において、18S rRNA の前駆体である 20S rRNA を含む pre-40S サブユニットは一度 60S サブユニットと結合して 80S-like リボソームとなる。そしてその後 80S-like リボソームは 60S サブユニットと成熟した 40S サブユニットに解離することで 40S サブユニットが翻訳開始反応を引き起こすのだが、Dom34 と Rli1 がこの 80S-like リボソームのサブユニットへの解離を引き起こすことが報告された (ただし、40S サブユニットの成熟とサブユニット解離の順序は逆でもよい)⁹⁷。そのため Rli1 が欠乏した株や Dom34 が欠損した株では成熟した 40S サブユニットが 60S サブユニットから解離できないため翻訳の開始が阻害される⁹⁷⁻⁹⁹。このように、Dom34 と Rli1 は翻訳の開始に必要な成熟した 40S サブユニットを供給する上でも重要な役割を担っている。

5.2.5 NGD と翻訳終結の相同性・相違性

NGD と翻訳終結の機構はよく似ている (図 5.2.8). NGD では GTP を結合した Hbs1/aEF1 α がリボソームの A site に Dom34/aPelota を挿入し, 翻訳終結では eRF3/aEF1 α がリボソームの A site に e/aRF1 を挿入する. 続いて Dom34/eRF3 はリボソーム上で GTP を加水分解し, リボソームから遊離する. 最後に Rli1/aABCE1 が NGD では Dom34/aPelota, 翻訳終結では e/aRF1 と相互作用することでリボソームをサブユニットへと解離させる.

一方, NGD と翻訳終結には大きな相違点が4つある. 1つ目は, NGD では停止したリボソームが認識されるのに対して, 翻訳終結では終止コドンが認識されることである. この違いは, Dom34/aPelota と e/aRF1 のドメイン A の違いによって説明できる. リボソームの奥深くに入る Dom34/aPelota と e/aRF1 のドメイン A は構造とフレキシビリティが大きく異なる. Dom34/aPelota のドメイン A はドメイン C との相互作用によって固定されており, コドン・アンチコドン対合を形成した A/T tRNA の形状を擬態することでループ A やループ B を介してリボソームの DC を直接認識する⁸⁸ (図 5.2.9, 5.2.10). 一方 e/aRF1 のドメイン A は tRNA のアンチコドンアームのフレキシビリティを擬態しており, tRNA によるコドン認識と同様にこのフレキシブルなドメイン A を動かすことで NIKS/L などの配列モチーフを介して終止コドンを認識し, 終止コドン依存的に DC を認識すると考えられる (図 5.2.10). また aRF1 と aPelota のドメイン A の表面電荷を比較してみると, NGD においてリボソームの DC を形成するヌクレオチドのリン酸と相互作用すると考えられる塩基性領域は aRF1 には見られない (図 5.2.11).

2つ目は, NGD では mRNA の分子内切断が起こるという点である. Dom34·Hbs1·GTP 複合体はこの切断を促進するが必須ではないためこの機構は未だ明らかとなっていない⁴³. また最近の報告によると NGD によるリボソームの解離効率はその停止位置より下流の mRNA の長さが長くなるほど低くなる^{89,90}. このことから NGD における mRNA の切断は, mRNA の保護されていない末端を露出させることでその分解を促進する他にリボソームの停止位置より下流の mRNA の長さを短くすることでリボソームの解離を促進する意味もあると考えられる.

3つ目は, 翻訳終結においては eRF3/aEF1 α による GTP 加水分解の後に e/aRF1 によって P site の tRNA に結合したタンパク質が放出されることである. e/aRF1 はドメイン B に存在する GGQ モチーフを介して P site tRNA とポリペプチド鎖をつなぐエステル結合を加水分解する. そのため eRF3/aEF1 α がリボソームから遊離した後に e/aRF1 は GGQ モチーフを P site tRNA の CCA 末端に近づける必要がある. Dom34·Rli1·リボソーム複合体及び aPelota·aABCE1·リボソーム複合体の構造によると, Dom34/aPelota はドメイン B

をドメイン C に対して動かすことでループ C を P site tRNA に近づけてそのアクセプターステムと相互作用している⁹⁶. Dom34/aPelota と e/aRF1 のドメイン B, C の相同性を考えると, e/aRF1 のドメイン B もリボソーム中で同様の動きをする可能性が高い. さらに, 先述した e/aRF1 のドメイン B のフレキシビリティもこの説を支持する (図 2.3.14). そして e/aRF1 のドメイン B がリボソーム中で同様に動いた場合, GGQ モチーフを含む e/aRF1 のループは対応する Dom34/aPelota のループ C よりも長いので, PTC で P site tRNA の CCA 末端と相互作用してエステル結合を加水分解できると考えられる⁹⁶ (図 5.2.12). 一方 eRF1 によるエステル結合の加水分解が Rli1 によって促進されるという報告もあり, この促進は ATP の代わりに ATP の非水解アナログである ADPNP を用いた場合でも起こる⁹⁰. このことから, Rli1/aABCE1 の結合は Dom34/aPelota や e/aRF1 のドメイン B のこの動きを促進するか動いた後の構造を安定化していると考えられる.

4 つ目は, リボソームがサブユニットへと解離した後の P site tRNA の挙動である (図 5.2.13). 翻訳終結では, P site tRNA からのタンパク質の放出を経てリボソームがサブユニットに解離した後も P site tRNA は 40S サブユニットの P site で mRNA と結合し続けている⁹⁵. そしてその後翻訳開始因子によって 40S サブユニットから遊離する⁹⁵. 一方 NGD では Dom34 によって P site tRNA のコドン・アンチコドン対合が不安定化されるため, P site の tRNA は mRNA から遊離する^{86,88}. さらに NGD の場合タンパク質の放出が起こらないため, tRNA に結合したタンパク質は 60S サブユニットの peptide exit tunnel を通って外に出て, 部分的に折りたたまれている. このため tRNA は結合したタンパク質に引っ張られて 60S サブユニットと共局在する⁴⁰. その後このタンパク質は 60S サブユニット上で Ltn1 や Not4 などによってユビキチン化を受ける後にプロテアソームで分解される^{46,100}. このように NGD は, 異常 mRNA から合成された異常タンパク質を分解する機構をも備えている.

5.2.6 NGD 研究における今後の課題

NSD と NGD は 2002 年と 2006 年に発見されて以来現在まで精力的に研究され, 多くのことが解明された. しかし, 少なくとも 3 つのことが未だ未解明である. 1 つ目は, mRNA が切断される機構である. Dom34・Hbs1・GTP 複合体はこの切断を促進するが必須ではない⁴³. RACK1 や Hel2 などの因子によるリボソームの停止がこの切断に重要な役割を果たすことは分かっているが, その切断の機構は未解明である^{43,46}. また exosome のエンドリボヌクレアーゼ活性は終止コドンを含まない mRNA の分解には重要な役割を果たすが, ステムループを含む mRNA の切断には関わっていないことが報告されている¹⁰¹.

2 つ目は、NGD においてリボソームがサブユニットへと解離する効率がリボソームの停止位置より下流の mRNA の長さに依存することである。哺乳動物では停止したリボソームの P site より下流に 13 ヌクレオチド以上、酵母では 30 ヌクレオチド以上 mRNA が延びている場合、NGD によるリボソームのサブユニットへの解離効率は大きく減少する^{89,90} (図 5.2.14)。このことから NGD における mRNA の切断は、リボソームから下流に延びる mRNA を短くすることでそのサブユニットへの解離を可能にするためであると考えられる。また、この性質のために、停止していない伸長過程のリボソームに Dom34・Hbs1・GTP 複合体が作用して伸長過程の途中でリボソームを解離させることが防がれていると考えられる。リボソームと結合した Dom34・Hbs1・GDPNP 複合体の構造によると Hbs1 の N 端ドメインは mRNA のリボソームへの入り口を形成する mRNA entry site 近傍に結合していることから、この N 端ドメインがリボソームの P site より下流の mRNA の長さに影響を受けると考えられている⁸⁸。実際 Hbs1 の非存在下では NGD におけるリボソームのサブユニットへの解離効率が P site より下流の mRNA の長さに依存しなくなることが報告されているが、Hbs1 がどのようにして下流の mRNA の長さを認識しているのかは未解明である⁹⁰。

3 つ目は、異常 mRNA から合成された異常タンパク質を分解する機構である。リボソームのサブユニットへの解離が起きた後に、tRNA から 60S サブユニットの peptide exit tunnel を通って外に出てきた異常タンパク質は Ltn1 や Not4 などの E3 ユビキチンリガーゼや Rqc1, Tae2 によってユビキチン化され、その後 Cdc48 がユビキチン化された異常タンパク質を peptide exit tunnel から引っ張り出してプロテアソームで分解すると考えられているが、その機構は未解明である^{46,100}。

5.2.7 tRNA 擬態について

タンパク質による tRNA 擬態は、1995 年に Jens Nyborg らによって初めて発見された¹。彼らが決定した tRNA・EF-Tu・GDPNP の結晶構造が、EF-G の構造とよく似ていたのである。その後 RF1/2 や eRF1 などの翻訳終結因子も tRNA の形状と似ていることが報告された^{27,36,102,103}。そのため翻訳因子が tRNA の形状を擬態することでリボソームの A site と相互作用し、翻訳を制御するという tRNA 擬態が提唱された。また本研究によって aRF1 や aPelota も tRNA の形状を擬態することで aEF1 α によってリボソームの A site に運ばれて翻訳終結や NGD を行うことが示唆された。tRNA のアンチコドンアームに対応するドメイン A でのリボソーム認識と共役した GTP 加水分解によってそれぞれの反応を行うという機構も、tRNA による翻訳伸長機構に倣っている。

一方で、EF-P は tRNA の形状を擬態しているにも関わらず、リボソームの A site では

なく P site と E site の間で相互作用している⁶⁹ (図 1.1.19). これは連続したプロリンのコードンによって停止したリボソームの A site には tRNA が既に詰まっているためであると考えられる. バクテリアにおいてリボソームが mRNA の 3' 末端で停止した場合や, レアコードンで停止した結果 A site で mRNA が切断された場合は A site には tRNA は相互作用できず, A site は空いていると考えられる. このため tmRNA・SmpB 複合体は A site に入って trans-translation によってリボソームをレスキューする. しかし連続したプロリンのコードンによるリボソームの停止は, A site に Pro-tRNA が入っているにも関わらずペプチジル転移が起こらないために発生する. この場合は EF-P は A site と相互作用することができない. そのため EF-P は P site と E site の間で相互作用し, そこから Lys34 に付加されたリシンを PTC へと伸ばして P site tRNA の 3' 末端領域と相互作用することでリボソームをレスキューすると考えられる.

このことを考えると, EF-P による tRNA 擬態の意義はリボソームと相互作用することではなくむしろ Lys34 に修飾を受けるためであると考えられる. EF-P の Lys34 は tRNA の 3' 末端の A76 に対応する位置にあり, リシル tRNA 合成酵素のパラログによってリシル化修飾を受ける. しかもこのリシル化修飾は EF-P の機能に重要な役割を担うことが示されている^{58,59,70}. このように EF-P による tRNA 擬態は, tRNA 擬態が従来知られていたようなリボソームの A site と相互作用する手段というだけではなくアミノアシル tRNA 合成酵素によって修飾される戦略としても機能することを示している.

5.2.8 EF-P の研究における今後の課題

EF-P は高度に保存された Lys34 にリシル化と水酸化を受け後にリボソームに作用して連続したプロリンコードンの翻訳を助ける. リシル化に関しては YjeA と EF-P の複合体構造の決定により, リシル tRNA 合成酵素のオーソログである YjeA が tRNA を擬態した EF-P の 3' 末端に対応する Lys34 に, リシル tRNA 合成酵素が tRNA^{Lys} にリシンを付加させるのと同じ機構で (R)- β -Lys を付加する機構が解明されている⁶⁶. 一方 YfcM による水酸化に関しては, 本研究によって YfcM の活性部位が同定されたものの YfcM が EF-P とどのように相互作用してその Lys34 を NADPH 依存的に水酸化するのかは不明である. これを明らかにするためには EF-P と YfcM と NADPH の複合体構造の決定が必要である. さらに, 修飾を受けた EF-P がリボソームの PTC と相互作用して連続したプロリンコードンの翻訳を助ける機構を解明するためには, 連続したプロリンコードン上で停止したリボソームと修飾を受けた EF-P の複合体構造を決定する必要がある.

5.2.9 翻訳因子の分子進化

tmRNA が真正細菌に高度に保存されており NGD が真核生物と古細菌にのみ存在することを考えると, tmRNA は真正細菌の祖先が真核生物と古細菌の共通祖先から分岐した後に獲得し, NGD は真正細菌の祖先から分岐した真核生物と古細菌の共通祖先が獲得したと考えられる. そしてその後真核生物と古細菌が分岐した結果, 真核生物の翻訳体系では伸長, 終結, NGD が eEF1 α , eRF3, Hbs1 に分業されたのに対して, 古細菌では Hbs1 や eRF3 のオーソログが存在せず aEF1 α が伸長, 終結, NGD の全てを行っている (図 5.2.15). この理由は明らかではないが, 可能性の 1 つとして以下のことが考えられる¹² (図 5.2.16). 真正細菌の祖先から分岐した真核生物と古細菌の共通祖先は aEF1 α のように伸長, 終結, NGD の全てを行う翻訳因子をもっていた. 古細菌は真核生物から分岐した後もその因子の多機能性を保持し, aEF1 α となった. 一方真核生物では古細菌から分岐した後にその因子の遺伝子に重複が起こり, その後の進化の過程でそれぞれの遺伝子が固有の進化を遂げて機能分化した結果伸長, 終結, NGD のそれぞれに特化した eEF1 α , eRF3, Hbs1 が現れた.

さらに注目すべき点として, 進化によって生命システムが複雑化するにつれて翻訳因子もより高度な機能を備えるに至っていることが挙げられる. 例えば eRF3 には a/eEF1 α や EF-Tu には見られない約 200 残基から成る N 端ドメインが存在する¹⁰⁴ (図 1.9). この N 端ドメインは PAM2 と呼ばれる配列をもち, eRF3 は翻訳終結を行いながら PAM2 で PABP (Poly A binding protein) と相互作用することで Pan2・Pan3 複合体や CCR4・NOT 複合体による poly A の分解を調節する¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. このことから eRF3 は翻訳終結と mRNA の分解を共役させていると考えられる. さらに, 真核生物では翻訳因子は本来の役割である翻訳制御を超えた機能をも担っている. 例えば eEF1 α は翻訳伸長の他にアクチン繊維と相互作用してその組織化や切断を行うことや, アポトーシスの制御を行うことが報告されている¹⁰⁷. また EF-P の真核生物のオーソログである eIF5A も, 連続したプロリンコドンの翻訳を助ける他に, *Arabidopsis thaliana* において植物ホルモンの 1 つであるサイトカイニンの受容体と相互作用してサイトカイニンによるシグナル伝達を制御することで根の形成に関わっていることが報告されている. このように生物が進化しより高度で複雑な生命システムを獲得する上で翻訳因子の分子進化は重要な役割を果たしていると考えられる.

そして遺伝子重複と機能分化による翻訳因子の分子進化は現在でも続いている. 例えば哺乳動物の eRF3 には eRF3a と eRF3b の 2 種類が存在する. eRF3a と eRF3b は 87% のアミノ酸配列の相同性を有し, どちらも翻訳終結活性を備えている¹⁰⁸. しかし eRF3a が多くの組織に発現しているのに対し, eRF3b は脳などの一部の組織に発現するのみで

あり、N 端ドメインの配列も異なる¹⁰⁸。また、哺乳動物には eEF1 α も eEF1 α -1 と eEF1 α -2 の 2 種類が存在する。eEF1 α -1 と eEF1 α -2 は 92%のアミノ酸配列の相同性を有し、どちらもタンパク質合成の活性を備えている^{109,110}。しかし eEF1 α -1 は多くの組織に発現しているのに対し、eEF1 α -2 は心臓や脳や骨格筋などでしか発現していない¹¹⁰。さらに筋管細胞において eEF1 α -1 はアポトーシスを促進するのに対して eEF1 α -2 はそれを抑制する¹¹⁰。これらのことを考えると、遺伝子重複によって生じた翻訳因子のアイソフォームは機能分化を進めていることが分かる。今後も進化の過程で翻訳因子の遺伝子重複とそれによって生じたアイソフォームの機能分化が進めば、新しい機能を備えた因子が誕生して生命システムがより複雑化することが考えられる。

5.2 の図

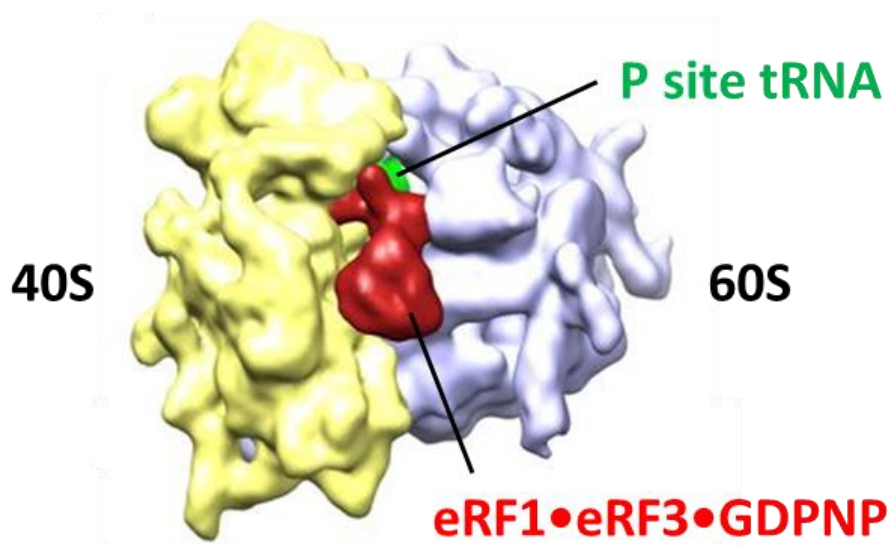
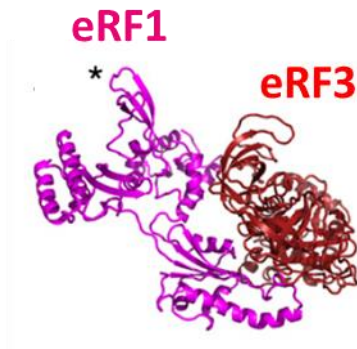
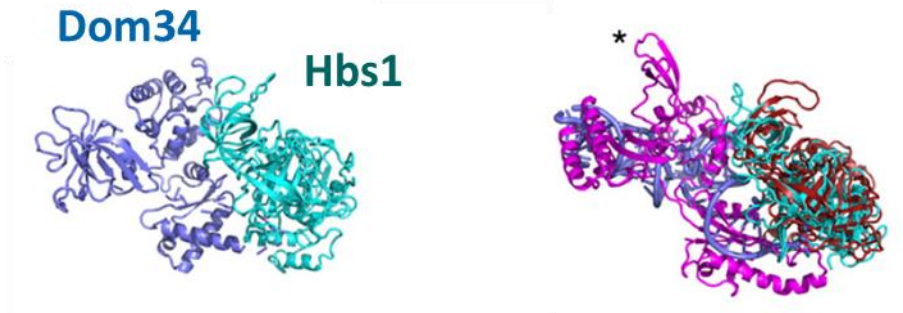


図 5.2.1 リボソーム・eRF1・eRF3・GDPNP 複合体の構造⁸⁴

A



B



C

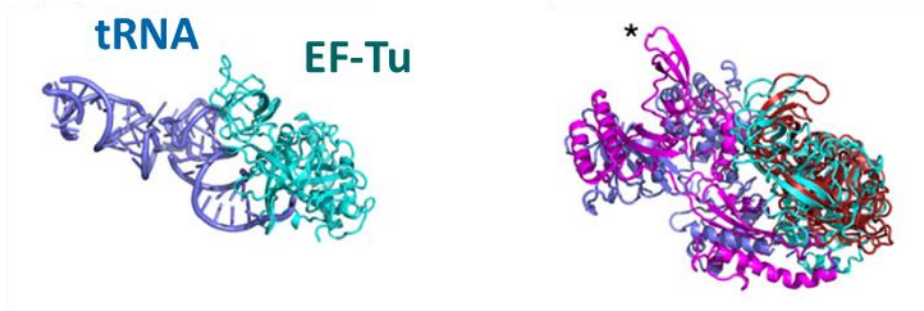


図5.2.2 リボソーム中のeRF1・eRF3・GDPNP複合体の構造と他の構造の比較⁸⁴.

*は eRF1 のドメイン C に特異的に存在する mimidomain.

A リボソーム中の eRF1・eRF3・GDPNP 複合体の構造

B リボソーム中の Dom34・Hbs1・GDPNP 複合体の構造と図Aとの重ね合わせ

C リボソーム中の tRNA・EF-Tu 複合体の構造と図Aとの重ね合わせ

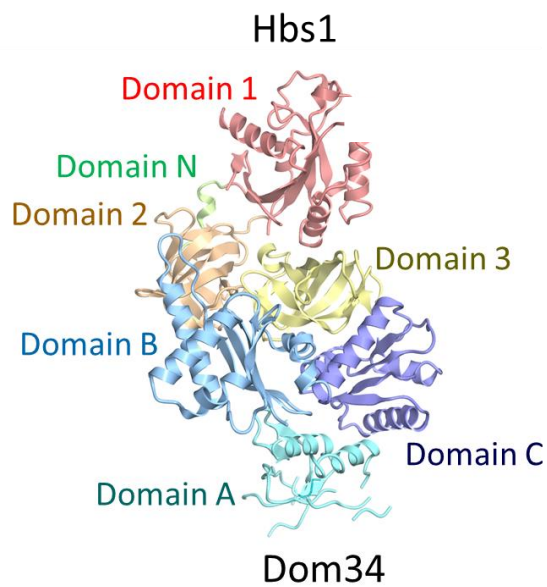
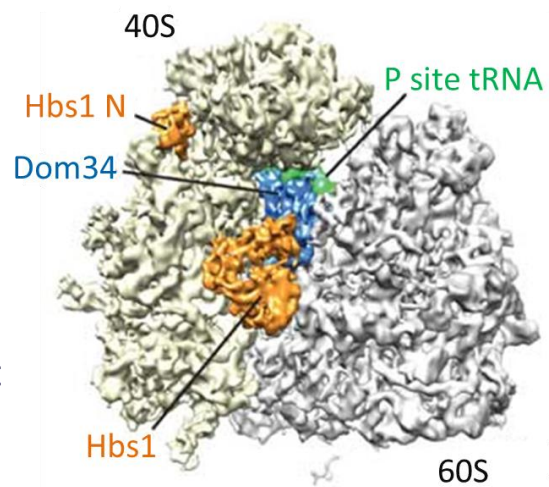
A**B**

図 5.2.3 Dom34 と Hbs1 の複合体構造

A *Schizosaccharomyces pombe* 由来 Dom34-Hbs1 複合体の構造 (PDB ID: 3MCA). 配色は図 2.3.1 と同様だが, Hbs1 のドメイン N を緑で示してある.

B リボソーム-Dom34-Hbs1-GDPNP 複合体の構造⁸⁸

A

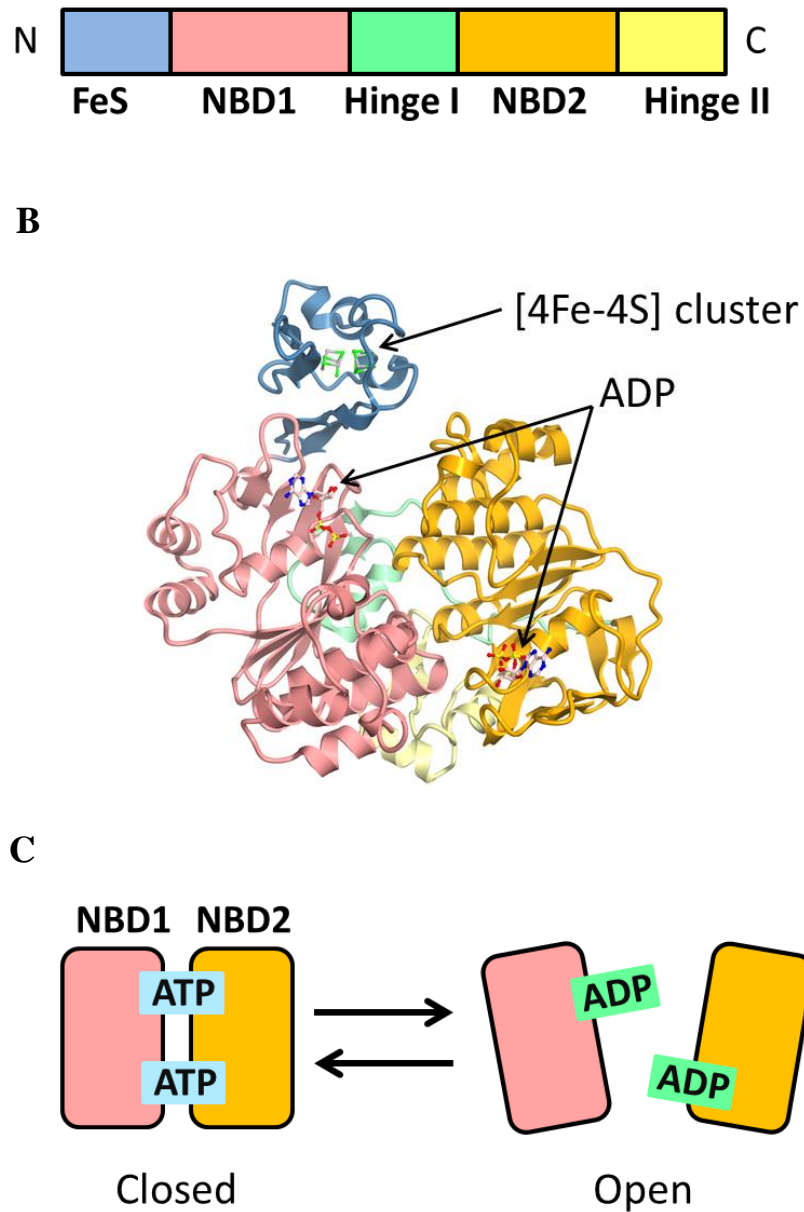


図 5.2.4 リボソーム解離因子 Rli1

A Rli1 のドメイン構成.

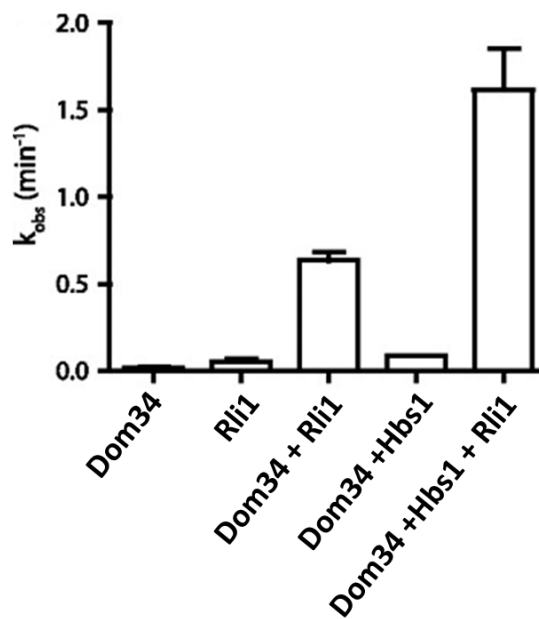
B *Pyrococcus abyssi* 由来 Rli1 (aABCE1) の構造 (PDB ID: 3BK7)

[4Fe-4S] cluster と ADP を ball-and-stick モデルで示してある.

ドメインの配色は図 A に依る.

C ヌクレオチド状態に依存した NBD1, NBD2 の構造変化

A



B

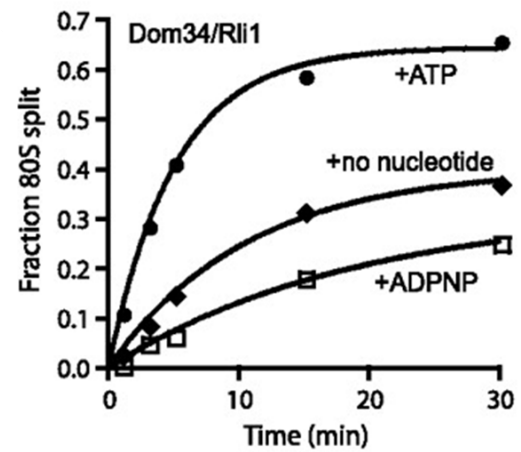


図 5.2.5 Rli1 によるリボソームの解離⁹⁰

A NGD において Dom34, Hbs1, Rli1 がリボソームの解離速度に与える影響

B Dom34/Rli1 によるリボソームの解離にヌクレオチドが与える影響

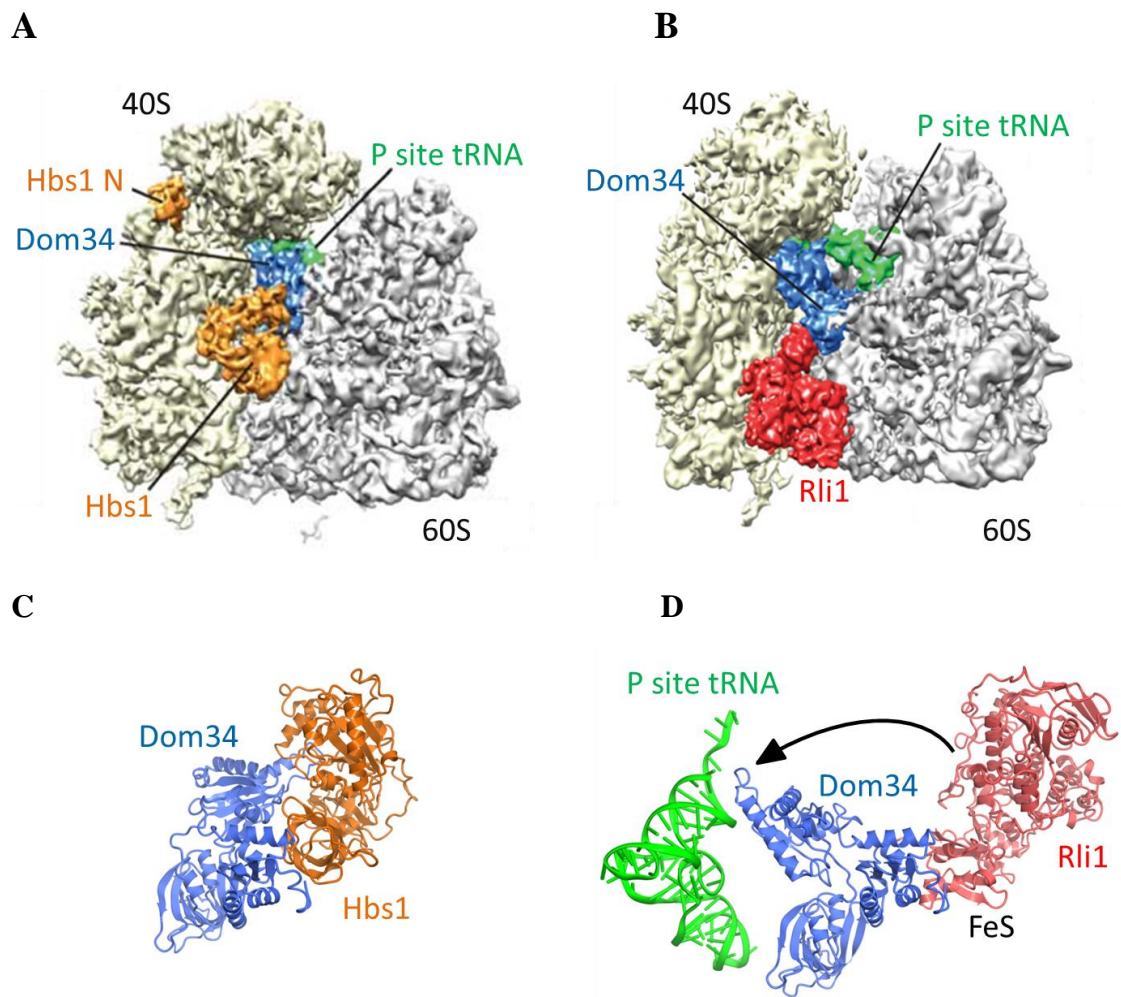


図 5.2.6 Rli1 によるリボソームの解離

A リボソーム・Dom34・Hbs1・GDPNP 複合体の構造⁸⁸

B リボソーム・Dom34・Rli1 複合体の構造⁹⁶

C リボソーム中の Dom34・Hbs1・GDPNP 複合体の構造

D リボソーム中の Dom34・Rli1 複合体の構造

図 C からの Dom34 のドメイン B の動きが矢印で示されている。

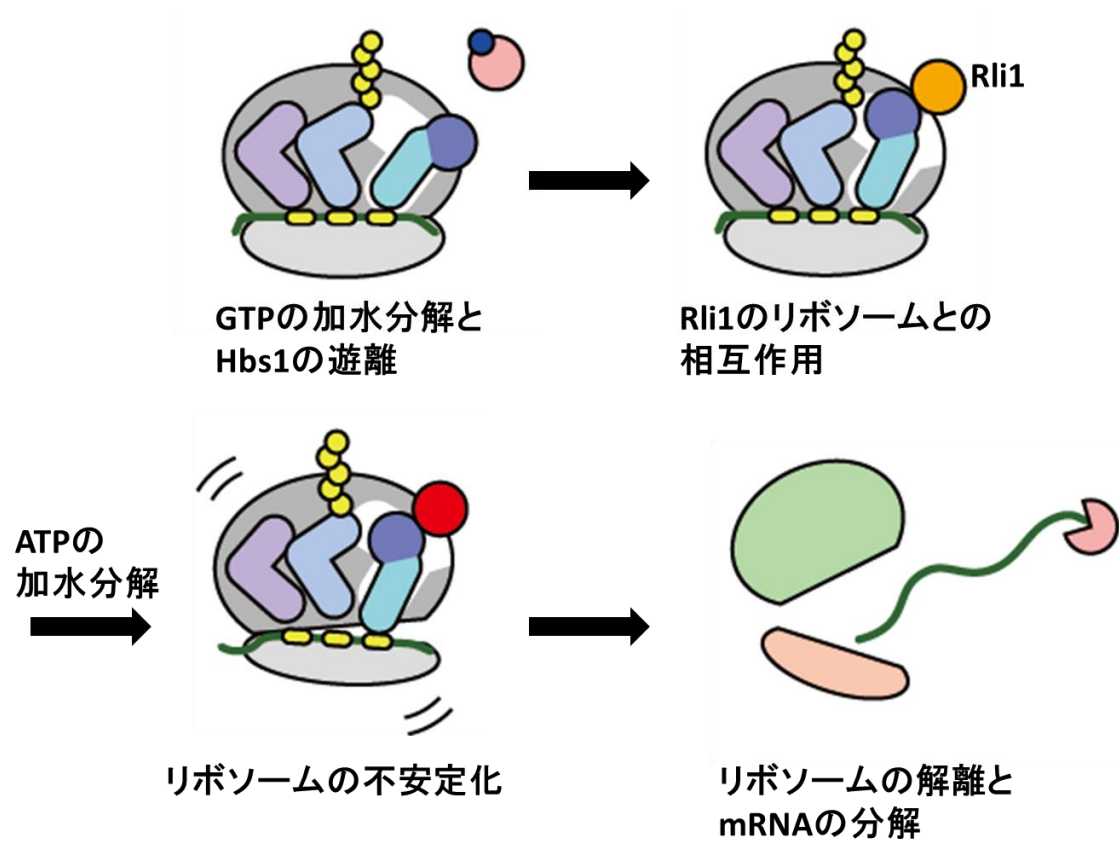


図 5.2.7 NGD におけるリボソームの解離機構

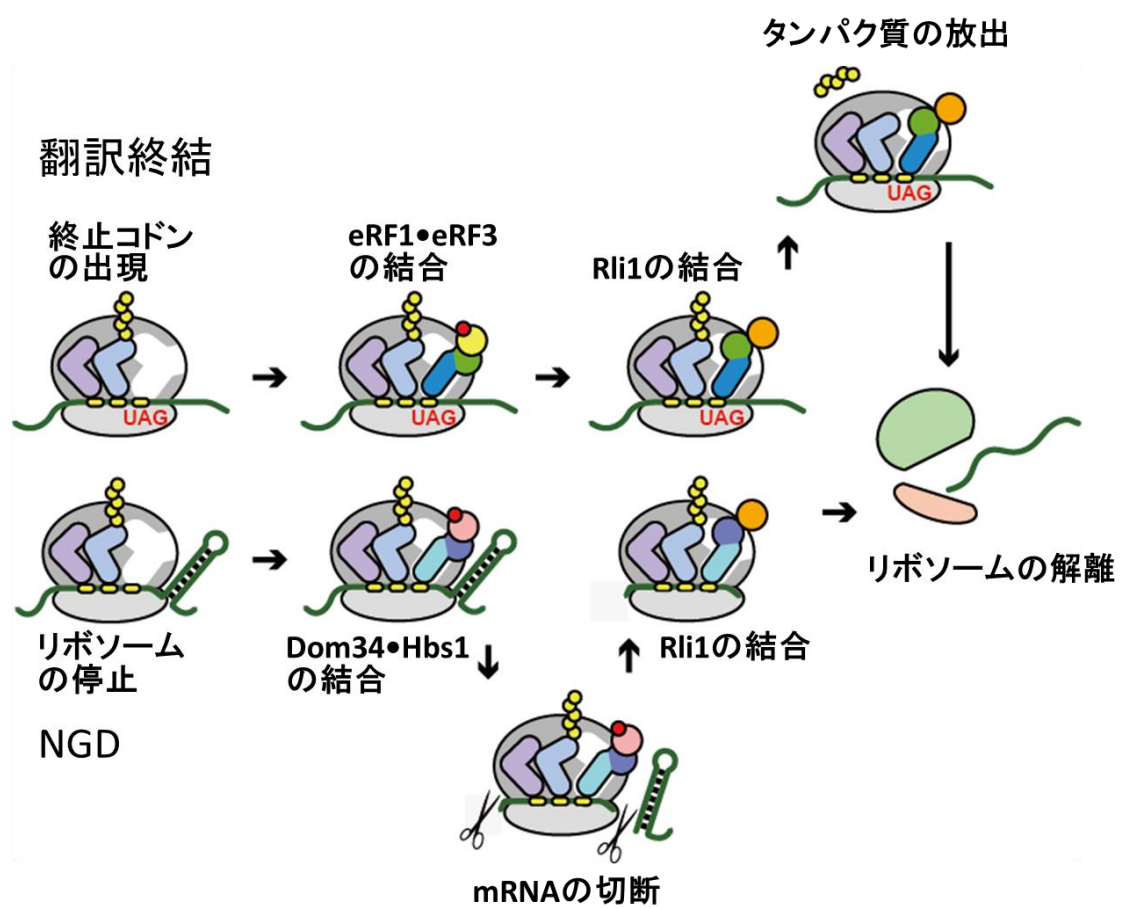


図 5.2.8 翻訳翻訳と NGD の類似性と相違性

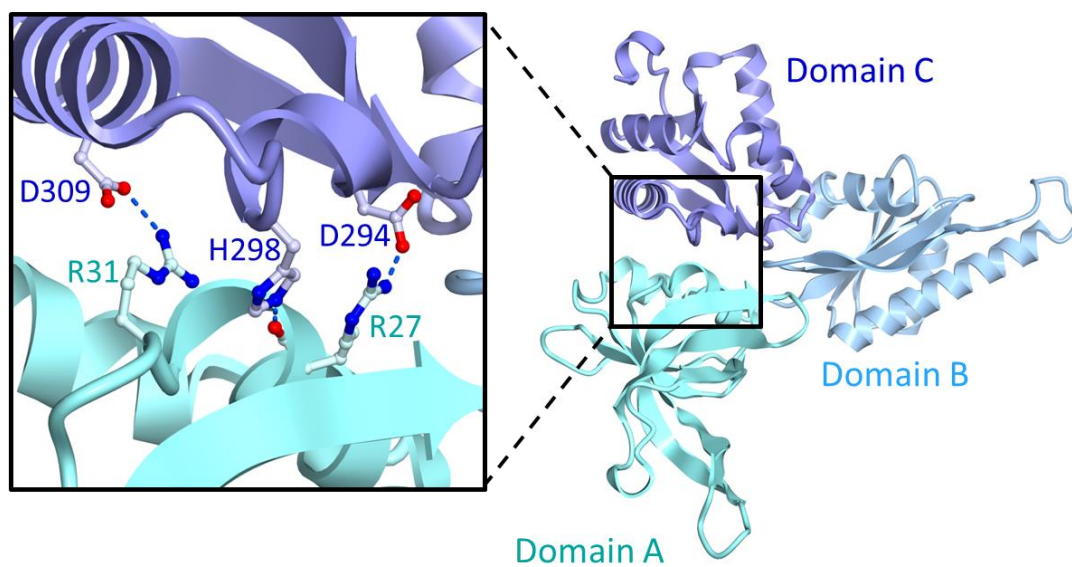


図 5.2.9 aPelota のドメイン A とドメイン C の相互作用

A

B

C

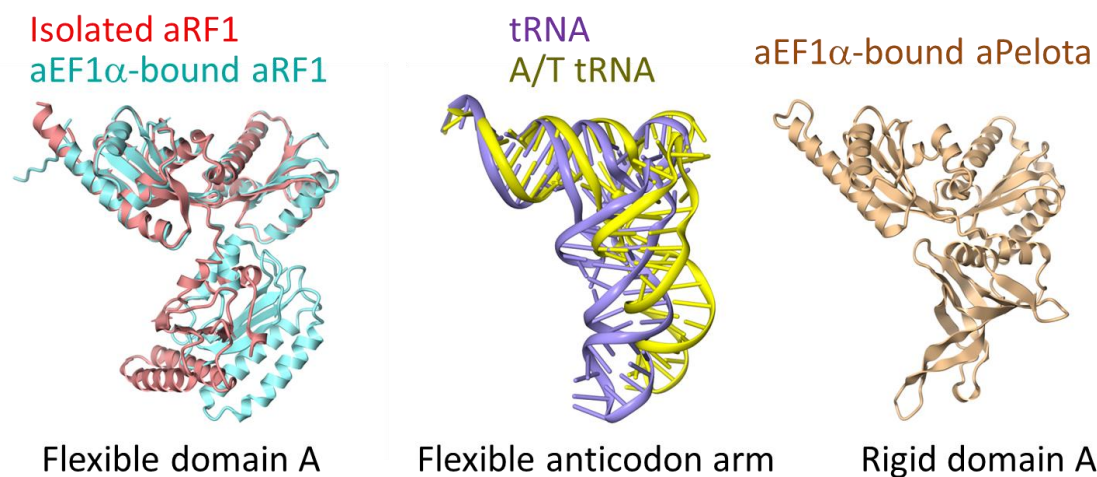


図 5.2.10 tRNA のアンチコドンアームと aRF1, aPelota のドメイン A の比較
 A tRNA (紫) (PDB ID: 1TTT)と A/T tRNA (黄) (PDB ID: 2XQD)の重ね合わせ.
 B 遊離型の aRF1 (赤) (PDB ID: 3AGK)と aEF1αに結合した aRF1 (薄緑) の重ね合わせ.
 C aEF1αに結合した aPelota の構造

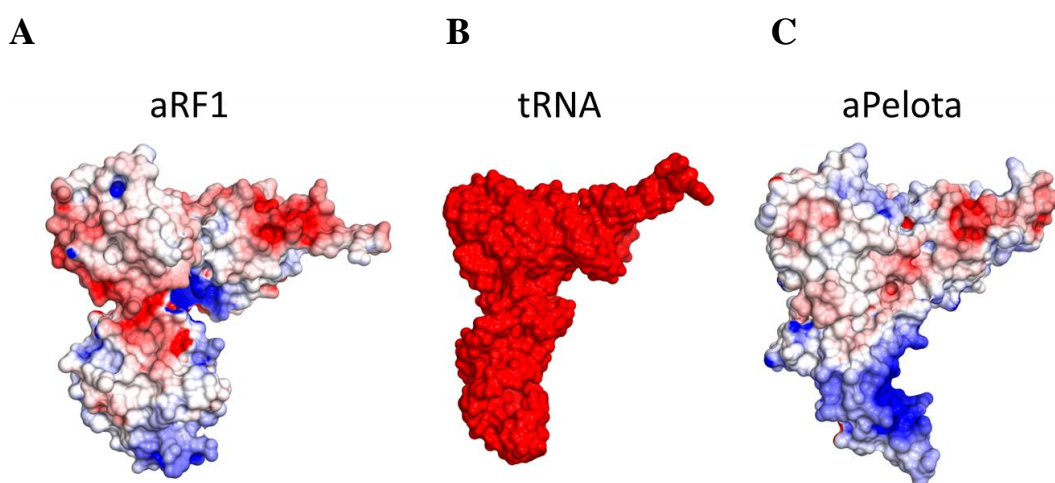
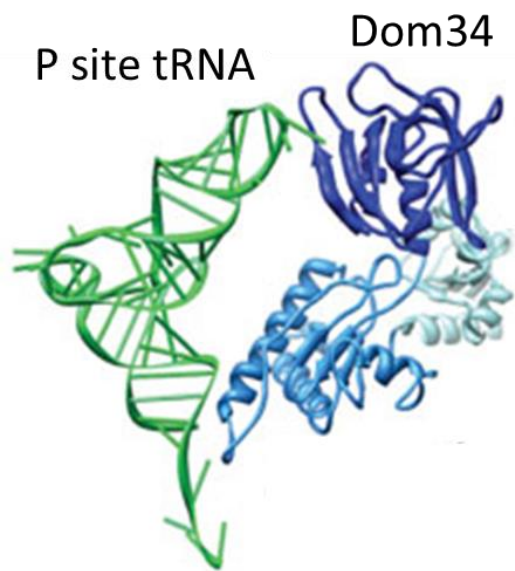


図 5.2.11 aRF1, tRNA, aPelota の表面構造と電荷の比較

- A aRF1 の表面構造と表面電荷
 B tRNA の表面構造と表面電荷
 C aPelota の表面構造と電荷

表面電荷は-7 kT/e から+7 kT/e の範囲でプログラム APBS によって計算された¹¹¹. 配色は図 3.3.6 と同様.

A



B

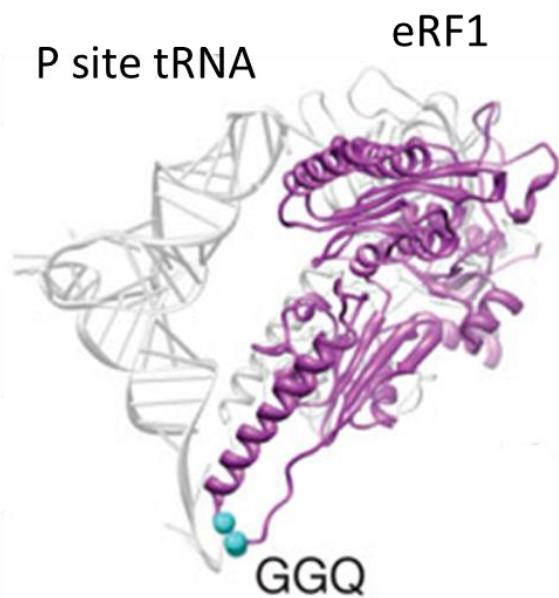


図 5.2.12 リボソーム中の Dom34 の構造に基づいた、リボソーム中の eRF1 の構造モデル⁹⁶

- A** リボソーム・Dom34・Rli1 複合体中の Dom34 の構造. P site tRNA が緑で示されている. Dom34 の配色は図 1.14 と同じ.
- B** 図 A の Dom34 の構造に基いて構築された、リボソーム中での eRF1 の構造モデル. 図 A の P site tRNA と Dom34 が灰色で示されている. GGQ モチーフの位置が水色で示されている.

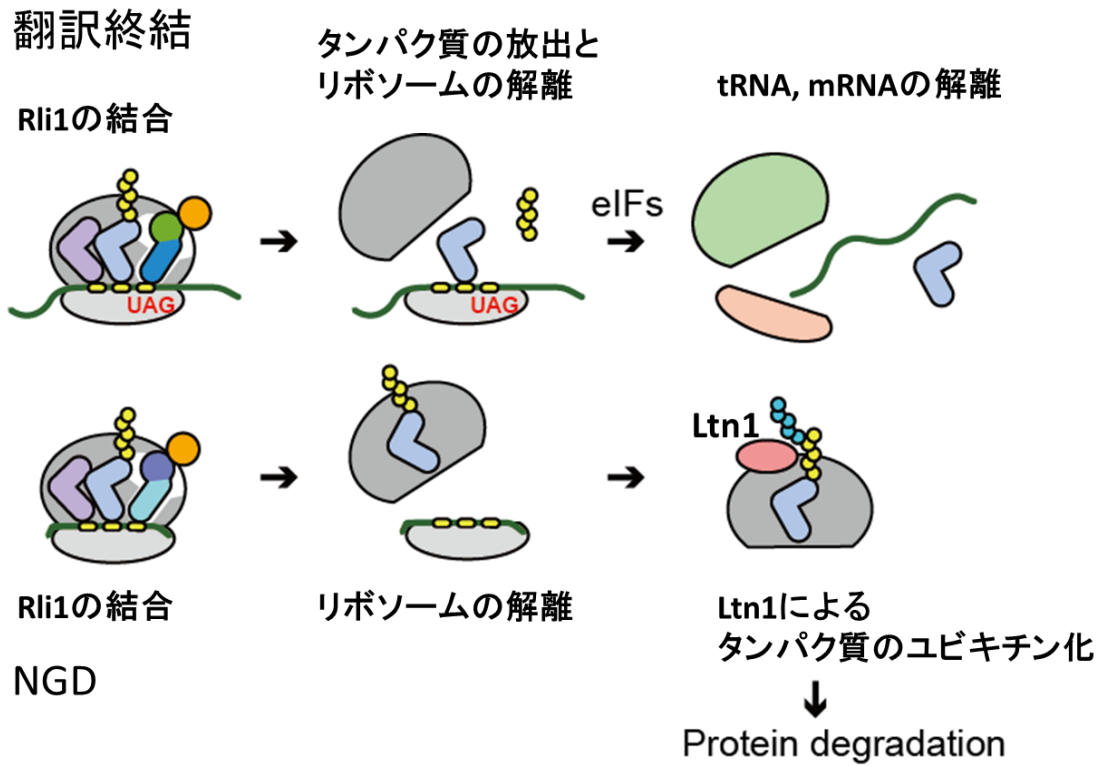


図 5.2.13 翻訳終結と NGD における，リボソームの解離後の P site tRNA の挙動

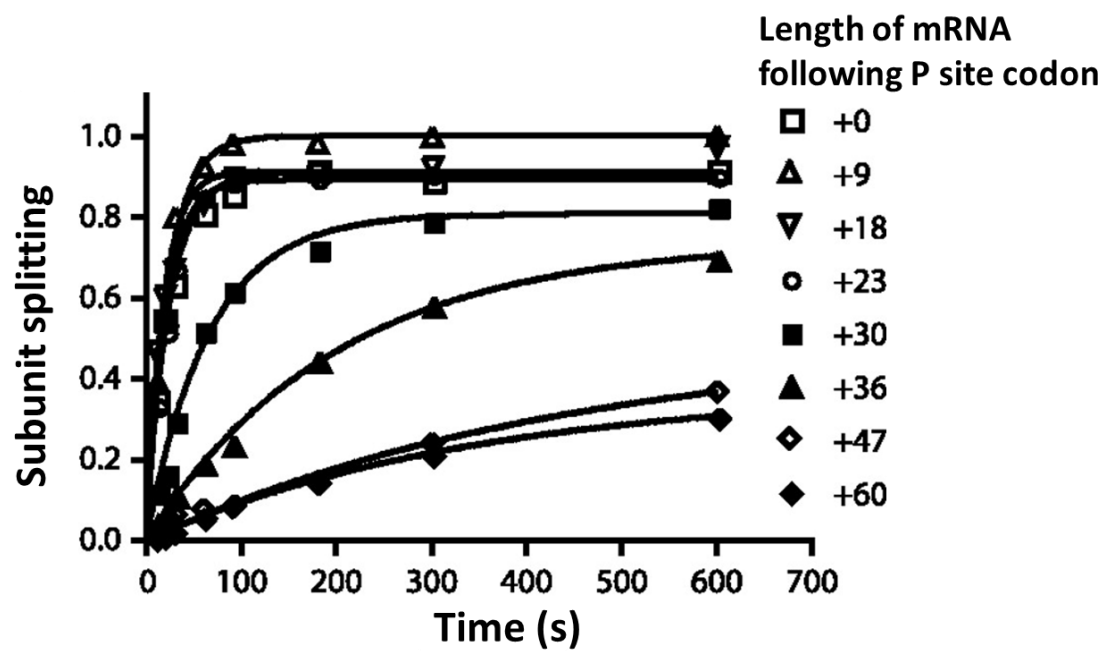


図 5.2.14 P site より下流の mRNA の長さが Dom34, Hbs1, Rli1 によるリボソーム解離の効率に与える影響⁹⁰

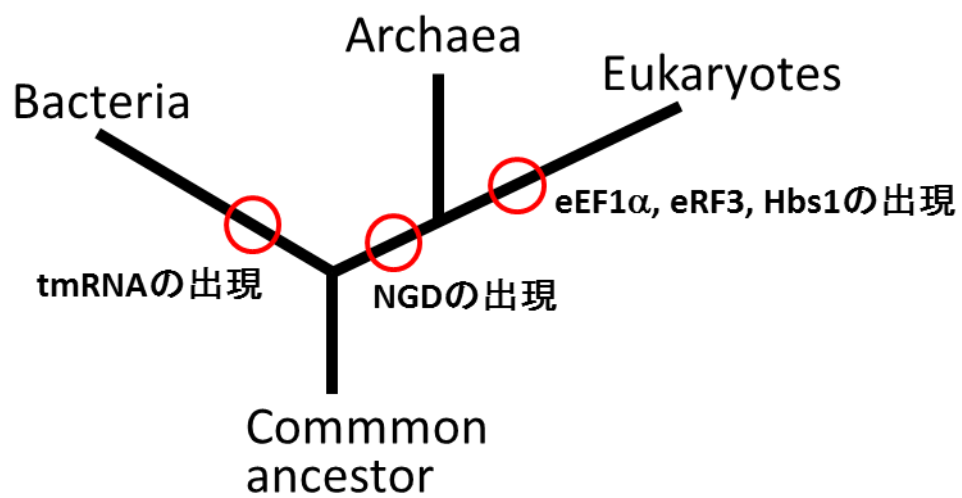


図 5.2.15 生物の進化と、その過程で tmRNA, NGD, eEF1α, Hbs1, eRF3 が出現した時期

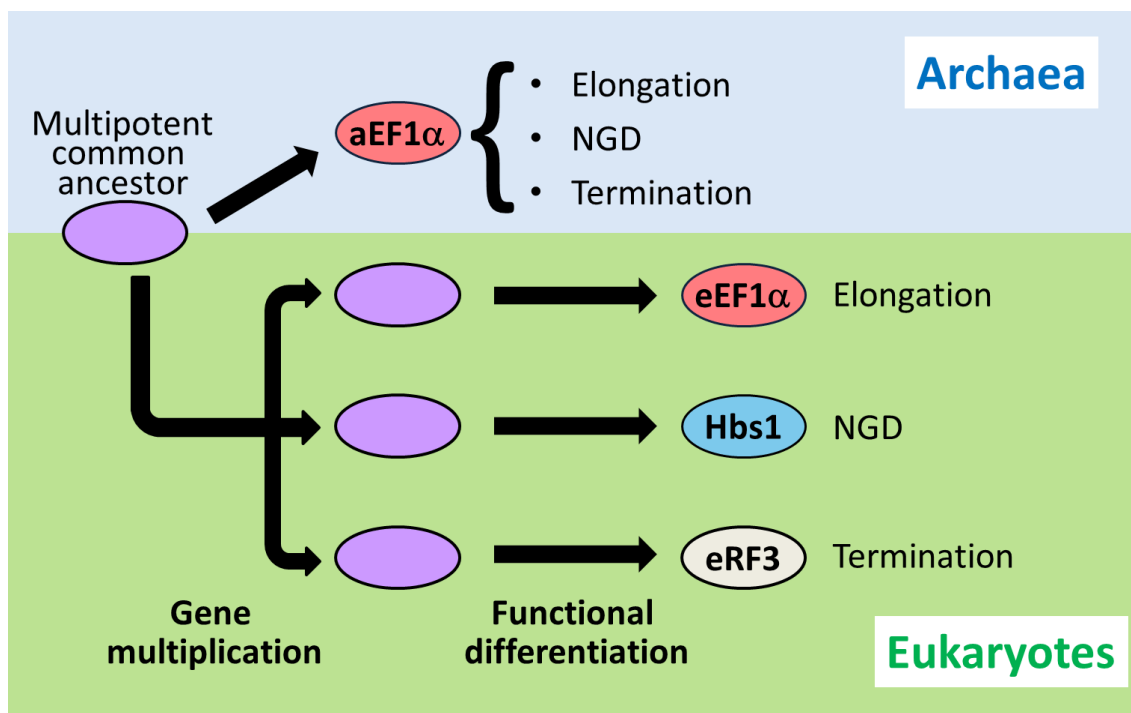


図 5.2.16 aEF1 α , eEF1 α , Hbs1, eRF3 が出現した進化的経緯

参考文献

1. Nissen, P. et al. Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA^{Phe}, EF-Tu, and a GTP analog. *Science* **270**, 1464-1472 (1995).
2. Voorhees, R.M. & Ramakrishnan, V. Structural basis of the translational elongation cycle. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 203-36 (2013).
3. Schmeing, T.M. et al. The Crystal Structure of the Ribosome Bound to EF-Tu and Aminoacyl-tRNA. *Science* **326**, 688-694 (2009).
4. Voorhees, R.M., Schmeing, T.M., Kelley, A.C. & Ramakrishnan, V. The Mechanism for Activation of GTP Hydrolysis on the Ribosome. *Science* **330**, 835-838 (2010).
5. Voorhees, R.M., Weixlbaumer, A., Loakes, D., Kelley, A.C. & Ramakrishnan, V. Insights into substrate stabilization from snapshots of the peptidyl transferase center of the intact 70S ribosome. *Nat. Struc. Mol. Biol.* **16**, 528-533 (2009).
6. Gao, Y.G. et al. The Structure of the Ribosome with Elongation Factor G Trapped in the Posttranslocational State. *Science* **326**, 694-699 (2009).
7. Tourigny, D.S., Fernandez, I.S., Kelley, A.C. & Ramakrishnan, V. Elongation factor G bound to the ribosome in an intermediate state of translocation. *Science* **340**, 1235490 (2013).
8. Pulk, A. & Cate, J.H. Control of ribosomal subunit rotation by elongation factor G. *Science* **340**, 1235970 (2013).
9. Zhou, J., Lancaster, L., Donohue, J.P. & Noller, H.F. Crystal structures of EF-G-ribosome complexes trapped in intermediate states of translocation. *Science* **340**, 1236086 (2013).
10. Chen, Y., Feng, S., Kumar, V., Ero, R. & Gao, Y.G. Structure of EF-G-ribosome complex in a pretranslocation state. *Nat. Struc. Mo. Biol.* **20**, 1077-84 (2013).
11. Brilot, A.F., Korostelev, A.A., Ermolenko, D.N. & Grigorieff, N. Structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the pretranslocation state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 20994-9 (2013).
12. Saito, K. et al. Omnipotent role of archaeal elongation factor 1 alpha (EF1α) in translational elongation and termination, and quality control of protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 19242-19247 (2010).
13. Capecchi, M.R. Polypeptide Chain Termination in Vitro - Isolation of a Release Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **58**, 1144-& (1967).
14. Grentzmann, G., Brechemierbaey, D., Heurgue, V., Mora, L. & Buckingham, R.H. Localization and Characterization of the Gene Encoding Release Factor RF3 in Escherichia-Coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 5848-5852 (1994).

15. Mikuni, O. et al. Identification of the prfC gene, which encodes peptide-chain-release factor 3 of Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 5798-5802 (1994).
16. Stansfield, I. et al. The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in Saccharomyces cerevisiae. *EMBO J.* **14**, 4365-4373 (1995).
17. Zhouravleva, G. et al. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J.* **14**, 4065-4072 (1995).
18. Nakamura, Y. & Ito, K. Making sense of mimic in translation termination. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 99-105 (2003).
19. Ito, K., Uno, M. & Nakamura, Y. A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature* **403**, 680-684 (2000).
20. Korostelev, A.A. Structural aspects of translation termination on the ribosome. *RNA* **17**, 1409-1421 (2011).
21. Frolova, L.Y. et al. Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA* **5**, 1014-1020 (1999).
22. Chavatte, L., Seit-Nebi, A., Dubovaya, V. & Favre, A. The invariant uridine of stop codons contacts the conserved NIKSR loop of human eRF1 in the ribosome. *EMBO J.* **21**, 5302-5311 (2002).
23. Frolova, L., Seit-Nebi, A. & Kisselev, L. Highly conserved NIKS tetrapeptide is functionally essential in eukaryotic translation termination factor eRF1. *RNA* **8**, 129-136 (2002).
24. Seit-Nebi, A., Frolova, L. & Kisselev, L. Conversion of omnipotent translation termination factor eRF1 into ciliate-like UGA-only unipotent eRF1. *EMBO Rep.* **3**, 881-886 (2002).
25. Kolosov, P. et al. Invariant amino acids essential for decoding function of polypeptide release factor eRF1. *Nucleic Acids Res.* **33**, 6418-6425 (2005).
26. Lekomtsev, S. et al. Different modes of stop codon restriction by the stylonychia and paramecium eRF1 translation termination factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 10824-10829 (2007).
27. Korostelev, A. et al. Crystal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 19684-9 (2008).
28. Frolova, L. et al. A Highly Conserved Eukaryotic Protein Family Possessing Properties of Polypeptide-Chain Release Factor. *Nature* **372**, 701-703 (1994).
29. Gao, H.X. et al. RF3 induces ribosomal conformational changes responsible for

- dissociation of class I release factors. *Cell* **129**, 929-941 (2007).
30. Alkalaeva, E.Z., Pisarev, A.V., Frolova, L.Y., Kisselev, L.L. & Pestova, T.V. In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* **125**, 1125-1136 (2006).
 31. Mitkevich, V.A. et al. Termination of translation in eukaryotes is mediated by the quaternary eRF1•eRF3•GTP•Mg²⁺ complex. The biological roles of eRF3 and prokaryotic RF3 are profoundly distinct. *Nucleic Acids Res.* **34**, 3947-3954 (2006).
 32. Frolova, L. et al. Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA* **2**, 334-341 (1996).
 33. Fan-Minogue, H. et al. Distinct eRF3 requirements suggest alternate eRF1 conformations mediate peptide release during eukaryotic translation termination. *Mol. Cell* **30**, 599-609 (2008).
 34. Cheng, Z. et al. Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes Dev.* **23**, 1106-1118 (2009).
 35. Inagaki, Y., Blouin, C., Susko, E. & Roger, A.J. Assessing functional divergence in EF-1 alpha and its paralogs in eukaryotes and archaeobacteria. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4227-4237 (2003).
 36. Song, H.W. et al. The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1 - Mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* **100**, 311-321 (2000).
 37. Kong, C.G. et al. Crystal structure and functional analysis of the eukaryotic class II release factor eRF3 from *S. pombe*. *Mol. Cell* **14**, 233-245 (2004).
 38. Dontsova, M. et al. Translation termination factor aRF1 from the archaeon *Methanococcus jannaschii* is active with eukaryotic ribosomes. *FEBS Lett.* **472**, 213-216 (2000).
 39. Shoemaker, C.J. & Green, R. Translation drives mRNA quality control. *Nat. Struct. Mo. Biol.* **19**, 594-601 (2012).
 40. Inada, T. Quality control systems for aberrant mRNAs induced by aberrant translation elongation and termination. *Biochim. Biophys. Acta.* **1829**, 634-642 (2013).
 41. Doma, M.K. & Parker, R. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **440**, 561-564 (2006).
 42. Gandhi, R., Manzoor, M. & Hudak, K.A. Depurination of Brome Mosaic Virus RNA3 in Vivo Results in Translation-dependent Accelerated Degradation of the Viral RNA. *J. Biol. Chem.* **283**, 32218-32228 (2008).
 43. Kuroha, K. et al. Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent

- polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep.* **11**, 956-961 (2010).
44. Frischmeyer, P.A. et al. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* **295**, 2258-2261 (2002).
 45. van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C. & Parker, R. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* **295**, 2262-2264 (2002).
 46. Brandman, O. et al. A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* **151**, 1042-54 (2012).
 47. Eckmann, C.R., Rammelt, C. & Wahle, E. Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2**, 348-61 (2011).
 48. Carr-Schmid, A., Pfund, C., Craig, E.A. & Kinzy, T.G. Novel G-protein complex whose requirement is linked to the translational status of the cell. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2564-2574 (2002).
 49. Cole, S.E., LaRiviere, F.J., Merrih, C.N. & Moore, M.J. A Convergence of rRNA and mRNA Quality Control Pathways Revealed by Mechanistic Analysis of Nonfunctional rRNA Decay. *Mol. Cell* **34**, 440-450 (2009).
 50. van den Elzen, A.M.G. et al. Dissection of Dom34-Hbs1 reveals independent functions in two RNA quality control pathways. *Nat. Struc. Mo. Biol.* **17**, 1446-1452 (2010).
 51. Passos, D.O. et al. Analysis of Dom34 and Its Function in No-Go Decay. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3025-3032 (2009).
 52. Graille, M., Chaillet, M. & van Tilbeurgh, H. Structure of yeast Dom34 - A protein related to translation termination factor eRF1 and involved in No-Go decay. *J. Biol. Chem.* **283**, 7145-7154 (2008).
 53. Lee, H.H. et al. Structural and functional insights into Dom34, a key component of No-go mRNA decay. *Mol. Cell* **27**, 938-950 (2007).
 54. Kurita, D., Muto, A. & Himeno, H. tRNA/mRNA Mimicry by tmRNA and SmpB in Trans-Translation. *J Nucleic Acids* **2011**, 130581 (2011).
 55. Wohlgemuth, I., Brenner, S., Beringer, M. & Rodnina, M.V. Modulation of the rate of peptidyl transfer on the ribosome by the nature of substrates. *J. Biol. Chem.* **283**, 32229-35 (2008).
 56. Pavlov, M.Y. et al. Slow peptide bond formation by proline and other N-alkylamino acids in translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 50-4 (2009).
 57. Peil, L. et al. Distinct XPPX sequence motifs induce ribosome stalling, which is rescued by the translation elongation factor EF-P. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **110**, 15265-15270 (2013).

58. Doerfel, L.K. et al. EF-P Is Essential for Rapid Synthesis of Proteins Containing Consecutive Proline Residues. *Science* **339**, 85-88 (2013).
59. Ude, S. et al. Translation Elongation Factor EF-P Alleviates Ribosome Stalling at Polyproline Stretches. *Science* **339**, 82-85 (2013).
60. Hanawa-Suetsugu, K. et al. Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**, 9595-600 (2004).
61. Glick, B.R. & Ganoza, M.C. Identification of a soluble protein that stimulates peptide bond synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **72**, 4257-4260 (1975).
62. Glick, B.R., Chladek, S. & Ganoza, M.C. Peptide bond formation stimulated by protein synthesis factor EF-P depends on the aminoacyl moiety of the acceptor. *Eur. J. Biochem.* **97**, 23-28 (1979).
63. Aoki, H. et al. Interactions of elongation factor EF-P with the *Escherichia coli* ribosome. *FEBS J.* **275**, 671-681 (2008).
64. Doerfel, L.K. & Rodnina, M.V. Elongation factor P: Function and effects on bacterial fitness. *Biopolymers* **99**, 837-45 (2013).
65. Roy, H. et al. The tRNA synthetase paralog PoxA modifies elongation factor-P with (R)-beta-lysine. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 667-669 (2011).
66. Yanagisawa, T., Sumida, T., Ishii, R., Takemoto, C. & Yokoyama, S. A paralog of lysyl-tRNA synthetase aminoacylates a conserved lysine residue in translation elongation factor P. *Nat. Struct. Mo. Biol.* **17**, 1136-43 (2010).
67. Peil, L. et al. Lys34 of translation elongation factor EF-P is hydroxylated by YfcM. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 695-697 (2012).
68. Gutierrez, E. et al. eIF5A promotes translation of polyproline motifs. *Mol. Cell* **51**, 35-45 (2013).
69. Blaha, G., Stanley, R.E. & Steitz, T.A. Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. *Science* **325**, 966-70 (2009).
70. Bullwinkle, T.J. et al. (R)-beta-lysine-modified elongation factor P functions in translation elongation. *J. Biol. Chem.* **288**, 4416-23 (2013).
71. Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J.C., Moras, D. & Poch, O. Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Res.* **30**, 5382-5390 (2002).
72. Kobayashi, K., Ishitani, R. & Nureki, O. Recent structural studies on Dom34/aPelota and Hbs1/aEF1 α : important factors for solving general problems of ribosomal stall in translation. *Biophysics* **9**, 131-140 (2013).
73. Nakamura, Y. & Ito, K. tRNA mimicry in translation termination and beyond. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2**, 647-68 (2011).

74. Dong, A. et al. In situ proteolysis for protein crystallization and structure determination. *Nat. Methods* **4**, 1019-21 (2007).
75. Vagin, A. & Teplyakov, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022-1025 (1997).
76. Kobayashi, K., Saito, K., Ishitani, R., Ito, K. & Nureki, O. Structural basis for translation termination by archaeal RF1 and GTP-bound EF1 α complex. *Nucleic Acids Res.* **40**, 9319-9328 (2012).
77. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D* **60**, 2126-2132 (2004).
78. Adams, P.D. et al. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. D* **58**, 1948-1954 (2002).
79. Weeks, C.M. & Miller, R. The design and implementation of SnB version 2.0. *J. Appl. Crystallogr* **32**, 120-124 (1999).
80. de la Fortelle, E. & Bricogne, G. Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol.* **276**, 472-494 (1997).
81. Abrahams, J.P. & Leslie, A.G.W. Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F-1 ATPase. *Acta Crystallogr. D* **52**, 30-42 (1996).
82. Cowtan, K.D. & Zhang, K.Y.J. Density modification for macromolecular phase improvement. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **72**, 245-270 (1999).
83. Terwilliger, T.C. Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallogr. D* **56**, 965-972 (2000).
84. Taylor, D. et al. Cryo-EM structure of the mammalian eukaryotic release factor eRF1-eRF3-associated termination complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 18413-8 (2012).
85. Chen, L.M. et al. Structure of the Dom34-Hbs1 complex and implications for no-go decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1233-1240 (2010).
86. Shoemaker, C.J., Eyler, D.E. & Green, R. Dom34:Hbs1 Promotes Subunit Dissociation and Peptidyl-tRNA Drop-Off to Initiate No-Go Decay. *Science* **330**, 369-372 (2010).
87. Tsuboi, T. et al. Dom34:Hbs1 Plays a General Role in Quality-Control Systems by Dissociation of a Stalled Ribosome at the 3' End of Aberrant mRNA. *Mol. Cell* **46**, 518-529 (2012).
88. Becker, T. et al. Structure of the no-go mRNA decay complex Dom34-Hbs1 bound to a stalled 80S ribosome. *Nat. Struct. Mo. Biol.* **18**, 715-720 (2011).
89. Pisareva, V.P., Skabkin, M.A., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V. & Pisarev, A.V.

- Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *EMBO J.* **30**, 1804-1817 (2011).
90. Shoemaker, C.J. & Green, R. Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, E1392-E1398 (2011).
 91. Smith, P.C. et al. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol. Cell* **10**, 139-49 (2002).
 92. Karcher, A., Schele, A. & Hopfner, K.P. X-ray structure of the complete ABC enzyme ABCE1 from *Pyrococcus abyssi*. *J. Biol. Chem.* **283**, 7962-7971 (2008).
 93. Karcher, A., Schele, A. & Hopfner, K.P. X-ray structure of the complete ABC enzyme ABCE1 from *Pyrococcus abyssi*. *J. Biol. Chem.* **283**, 7962-71 (2008).
 94. Barthelme, D. et al. 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**, 3228-33 (2011).
 95. Pisarev, A.V. et al. The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol. Cell* **37**, 196-210 (2010).
 96. Becker, T. et al. Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Nature* **482**, 501-506 (2012).
 97. Strunk, B.S., Novak, M.N., Young, C.L. & Karbstein, K. A translation-like cycle is a quality control checkpoint for maturing 40S ribosome subunits. *Cell* **150**, 111-121 (2012).
 98. Davis, L. & Engebrecht, J. Yeast dom34 mutants are defective in multiple developmental pathways and exhibit decreased levels of polyribosomes. *Genetics* **149**, 45-56 (1998).
 99. Bhattacharya, A., McIntosh, K.B., Willis, I.M. & Warner, J.R. Why Dom34 Stimulates Growth of Cells with Defects of 40S Ribosomal Subunit Biosynthesis. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5562-5571 (2010).
 100. Duttler, S., Pechmann, S. & Frydman, J. Principles of cotranslational ubiquitination and quality control at the ribosome. *Mol. Cell* **50**, 379-93 (2013).
 101. Schaeffer, D. & van Hoof, A. Different nuclease requirements for exosome-mediated degradation of normal and nonstop mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 2366-2371 (2011).
 102. Laurberg, M. et al. Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature* **454**, 852-857 (2008).
 103. Weixlbaumer, A. et al. Insights into Translational Termination from the Structure of RF2 Bound to the Ribosome. *Science* **322**, 953-956 (2008).

104. Hoshino, S. Mechanism of the initiation of mRNA decay: role of eRF3 family G proteins. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **3**, 743-57 (2012).
105. Funakoshi, Y. et al. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes Dev.* **21**, 3135-48 (2007).
106. Osawa, M. et al. Biological role of the two overlapping poly(A)-binding protein interacting motifs 2 (PAM2) of eukaryotic releasing factor eRF3 in mRNA decay. *RNA* **18**, 1957-1967 (2012).
107. Mateyak, M.K. & Kinzy, T.G. eEF1A: thinking outside the ribosome. *J. Biol. Chem.* **285**, 21209-13 (2010).
108. Chauvin, C. et al. Involvement of human release factors eRF3a and eRF3b in translation termination and regulation of the termination complex formation. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 5801-11 (2005).
109. Lee, M.H. & Surh, Y.J. eEF1A2 as a Putative Oncogene. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1171**, 87-93 (2009).
110. Ruest, L.B., Marcotte, R. & Wang, E. Peptide elongation factor eEF1A-2/S1 expression in cultured differentiated myotubes and its protective effect against caspase-3-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 5418-5425 (2002).
111. Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. & McCammon, J.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 10037-41 (2001).

外部発表

報文目録

1. Structural basis for mRNA surveillance by archaeal Pelota and GTP-bound EF1 α complex.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 17575-17579, 107 (2010)
Kan Kobayashi, Izumi Kikuno, Kazushige Kuroha, Kazuki Saito, Koichi Ito, Ryuichiro Ishitani, Toshifumi Inada, and Osamu Nureki
2. Omnipotent role of archaeal elongation factor 1 alpha (EF1 α) in translational elongation and termination, and quality control of protein synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 19242–19247, 107 (2010)
Kazuki Saito, Kan Kobayashi, Miki Wada, Izumi Kikuno, Akira Takusagawa, Masahiro Mochizuki, Toshio Uchiumi, Ryuichiro Ishitani, Osamu Nureki, and Koichi Ito
3. Structural basis for translation termination by archaeal RF1 and GTP-bound EF1 α complex.
Nucleic Acids Res., 9319-9328, 40 (2012)
Kan Kobayashi, Kazuki Saito, Ryuichiro Ishitani, Koichi Ito, and Osamu Nureki
4. 古細菌由来 Pelota•EF1 α •GTP 複合体による mRNA 品質管理機構の構造基盤生物物理, **52**, 182-185 (2012)
小林幹, 石谷隆一郎, 濡木理
5. Recent structural studies on Dom34/aPelota and Hbs1/aEF1 α : important factors for solving general problems of ribosomal stall in translation.
BIOPHYSICS, 131-140 (2013)
Kan Kobayashi, Ryuichiro Ishitani, Osamu Nureki

講演目録

1. ○小林幹, 菊野泉, 黒羽一誠, 斉藤和紀, 伊藤耕一, 石谷隆一郎, 稲田利文, 濡木理
古細菌由来 Pelota-EF1 α -GTP 複合体による mRNA 品質管理機構の構造基盤
第 12 回日本 RNA 学会年会, 口頭発表番号: O-14, 東京, 7 月, 2010 年
2. ○小林幹, 菊野泉, 黒羽一誠, 斉藤和紀, 伊藤耕一, 石谷隆一郎, 稲田利文, 濡木理
Structural basis for mRNA surveillance pathways by archaeal Pelota and GTP-bound EF1 α complex.
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学大会合同大会, ポスター発表番号: 1P-0117, 兵庫, 12 月, 2010 年

3. ○小林 幹, 菊野泉, 黒羽一誠, 斉藤和紀, 伊藤耕一, 石谷隆一郎, 稲田利文, 濡木理
古細菌由来 Pelota-EF1 α -GTP 複合体による mRNA 品質管理機構の構造基盤
第 11 回日本蛋白質科学学会年会, ポスター発表番号: 2P-018, 大阪, 6 月, 2011 年
4. ○Kan Kobayashi, Kazuki Saito, Ryuichiro Ishitani, Koichi Ito, and Osamu Nureki
Structural basis for translation termination by archaeal RF1 and GTP-bound EF1 α complex.
RNA 2011, Poster No. 388, Kyoto, Japan, June, 2011
5. ○小林 幹, 菊野泉, 黒羽一誠, 斉藤和紀, 伊藤耕一, 石谷隆一郎, 稲田利文, 濡木理
古細菌由来 Pelota-EF1 α -GTP 複合体による mRNA 品質管理機構の構造基盤
RNA フロンティアミーティング 2011, 口頭発表番号: 4.4, 愛知, 8 月-9 月, 2011 年
6. ○Kan Kobayashi, Kazuki Saito, Ryuichiro Ishitani, Koichi Ito, and Osamu Nureki
Structural basis for translation termination by archaeal RF1 and GTP-bound EF1 α complex.
The 2011 International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetase, Poster No. 125, Utah, USA., September, 2011
7. ○Kan Kobayashi, Kazuki Saito, Ryuichiro Ishitani, Koichi Ito, and Osamu Nureki
Structural basis for translation termination by archaeal aRF1 and GTP-bound EF1 α complex.
第 34 回日本分子生物学会年会, 口頭発表番号: 2T7pI-7, 神奈川, 12 月, 2011 年
8. ○Kan Kobayashi, Kazuki Saito, Ryuichiro Ishitani, Koichi Ito, and Osamu Nureki
Structural basis for translation termination by archaeal aRF1 and GTP-bound EF1 α complex.
第 34 回日本分子生物学会年会, ポスター発表番号: 2P-0313, 神奈川, 12 月, 2011 年
9. ○小林 幹, 斉藤和紀, 石谷隆一郎, 伊藤耕一, 濡木理
古細菌由来 aRF1•EF1 α •GTP 複合体による翻訳終結機構の構造基盤
RNA フロンティアミーティング 2012, 口頭発表番号: 特になし, 熊本, 9 月, 2012 年
10. ○Kan Kobayashi, Kazuki Saito, Ryuichiro Ishitani, Koichi Ito, and Osamu Nureki

Structural basis for translation termination by archaeal RF1 and GTP-bound EF1 α complex.
XXIV tRNA Conference, Poster No. PEII-21, Olmue, Chile, December, 2012

11. ○ Kan Kobayashi

Multipotent archaeal elongation factor 1 alpha: elongation, termination and ribosome rescue
Tokyo RNA Club The 12th meeting, 口頭発表番号: 特になし, 東京, 3 月, 2013 年

12. ○ Kan Kobayashi, Kazuki Saito, Ryuichiro Ishitani, Koichi Ito, and Osamu Nureki

Structural basis for translation termination by archaeal RF1 and GTP-bound EF1 α complex.
第 15 回日本 RNA 学会年会, 口頭発表番号: O-53, 愛媛, 7 月, 2013 年

13. ○ Kan Kobayashi, Kazuki Saito, Ryuichiro Ishitani, Koichi Ito, and Osamu Nureki

Structural basis for translation termination by archaeal RF1 and GTP-bound EF1A complex.
The 2013 International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetase, Oral No. O-20, Hakone, Japan., October, 2011

受賞

1. 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻奨励賞, 3 月, 2011 年
2. 優秀ポスター章, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 6 月, 2011 年
3. Sidney Altman Endowment Travel Award (優秀ポスター賞), XXIV tRNA Conference, 12 月, 2012 年
4. Oral presentation award, The 2013 International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetase, 10 月, 2013 年

謝辞

本研究は東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻の濡木理教授の研究室で行われたものである。濡木教授には日頃の研究指導のみならず進路や日常生活についても相談に乗って頂き、大変感謝しております。石谷隆一郎准教授、西増弘志博士、石井亮平博士には研究を進める過程でいろいろと有益な助言を頂き、感謝しております。事務面では研究室秘書の山崎枝子さんに大変お世話になりました。また本研究は共同研究者である伊藤耕一教授、稲田利文教授、堂前直博士、黒羽一誠博士、斎藤和紀博士、菊野泉さん、Michael Ibba 教授、Katz-Zondek, Assaf 博士、Rajkovic, Andrei 博士にも大変お世話になりました。X 線回折実験の際は大型放射光施設 SPring-8, Photon Factory のスタッフの方々に大変お世話になりました。研究生を送る上では首藤和佳子さんにいろいろとお世話になりました。感謝申し上げます。最後に私を応援するとともに暖かく見守ってくださる家族に感謝申し上げます。