

博士論文審査報告書

論文題目 : Crystal structure analysis of release factor 3 from sulfate-reducing bacterium
「翻訳終結因子 RF3 の X 線結晶解析」

申請者 : 木平 清人

1. 論文内容の要旨

本研究では硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki 由来の翻訳終結因子・RF3 (DvRF3) の 3 次元構造を X 線結晶解析法によって明らかにし、RF3 について今まで知られていなかった生物学的機能についての考察を行った。

原核生物における翻訳終結反応は、RF1/RF2と呼ばれるペプチド鎖解離因子および翻訳終結因子・RF3により触媒される。RF3はGTP結合タンパク質 (GTPase) である。翻訳終結過程において、RF3はGTPを加水分解物してGDPを生成し、自身の構造を変化させるタンパク質スイッチとして機能する。翻訳終結に至り、mRNAの終止コドンが認識されるとペプチド鎖解離因子・RF1またはRF2がリボソーム・mRNA複合体に結合し、翻訳・合成されたペプチド鎖は複合体から解離される。本研究の対象であるRF3は、リボソームに結合したRF1/RF2を除去し、リボソームの再生サイクルへの移行を触媒する。

DvRF3は、アミノ酸残基数529、分子量約60,000のGTP結合タンパク質である。本研究では、DvRF3を大腸菌に組み込んだ大量発現系を構築し、精製した結果、2つの異なる特徴を示したRF3成分 (DvRF3aおよびDvRF3b) を分離・精製することに成功した。また両者を結晶化し、原子分解能でX線結晶解析することに成功した (DvRF3a: 1.8 Å、DvRF3b: 3.0 Å)。構造解析の結果、DvRF3aはGDP結合型、またDvRF3bはppGpp結合型であることを明らかにした。ppGppは原核生物の栄養飢餓ストレスに対応して機能する (緊縮応答) 物質であることが知られている。DvRF3および大腸菌RF3 (EcRF3) についてGDPおよびppGppとの親和性の違いを調べた結果、両RF3は細胞の栄養飢餓状態におけるppGpp濃度においては常にppGpp結合型であること、および、培養において対数増殖期以降の大腸菌細胞内では、ppGpp濃度の増加とともにppGpp結合型のRF3が支配的になることを見出した。また、ppGppの高濃度条件下では、RF3によるリボソームの再生が抑制されることを、PUREシステムを使って証明した。これは、細胞が、栄養飢餓状態に陥った際、RF3がリボソームに作用して翻訳システムをコントロールしていることを示唆するものである。さらに、EcRF3とDvRF3はppGppとの親和性に違いがあることを見出し、それがppGppのリン酸基のひとつに相互作用するアミノ酸 (およびその側鎖の立体構造) の違いに起因することなどを明らかにした。

2. 論文審査結果

本研究では、硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki 由来の翻訳終結因子・RF3 (DvRF3) の大量発現系の構築を行い、得られたタンパク質試料に対して精密に精製を行い、2 つの成分 (DvRF3a および DvRF3b) に分離することに成功した。また両成分ともに結晶化し、原子分解能における結晶構造解析に成功した (DvRF3a: 1.8 Å、DvRF3b: 3.0 Å)。

本研究の結果、DvRF3 は、GDP/GTP のみならず、ppGpp というヌクレオチドにも結合可能であることを見出した。また、DvRF3 および大腸菌由来の RF3 (EcRF3) が ppGpp と GDP の細胞内濃度に応じてその結合比を変化させること、および、大腸菌の再構築系 (PURE システム) 翻訳システムにおいて、ppGpp が、両 RF3 による RF1/RF2 のリボソームからの遊離促進反応を抑制することを証明した。これらは、これまで GDP と GTP の交換を触媒して、RF1/RF2 のリボソームからの遊離を促進する機能のみを持つ酵素であると考えられていた RF3 について、新たな細胞内機能を示唆する結果である。

ppGpp は原核生物の緊縮応答の結果生成され、主に転写システムで機能すると考えられてきた。従って、緊縮応答が翻訳に関わるという報告は極めて少なく、翻訳に対して作用するかどうかは明確になっていない。実際、翻訳に関わるタンパク質因子群と ppGpp との複合体の結晶構造の報告も今までに一例もない。従って、本研究は、原核生物の翻訳システムの制御に対する RF3 および ppGpp の役割を解明する研究に新しい展開をもたらし、当該研究分野の発展に大いに寄与するものと期待される。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成 21 年 1 月 27 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：樋口芳樹 印

副査：大隅 隆 印

：吉川信也 印

：中川敦史 印
(大阪大学蛋白質研究所、教授)

：柴田直樹 印