

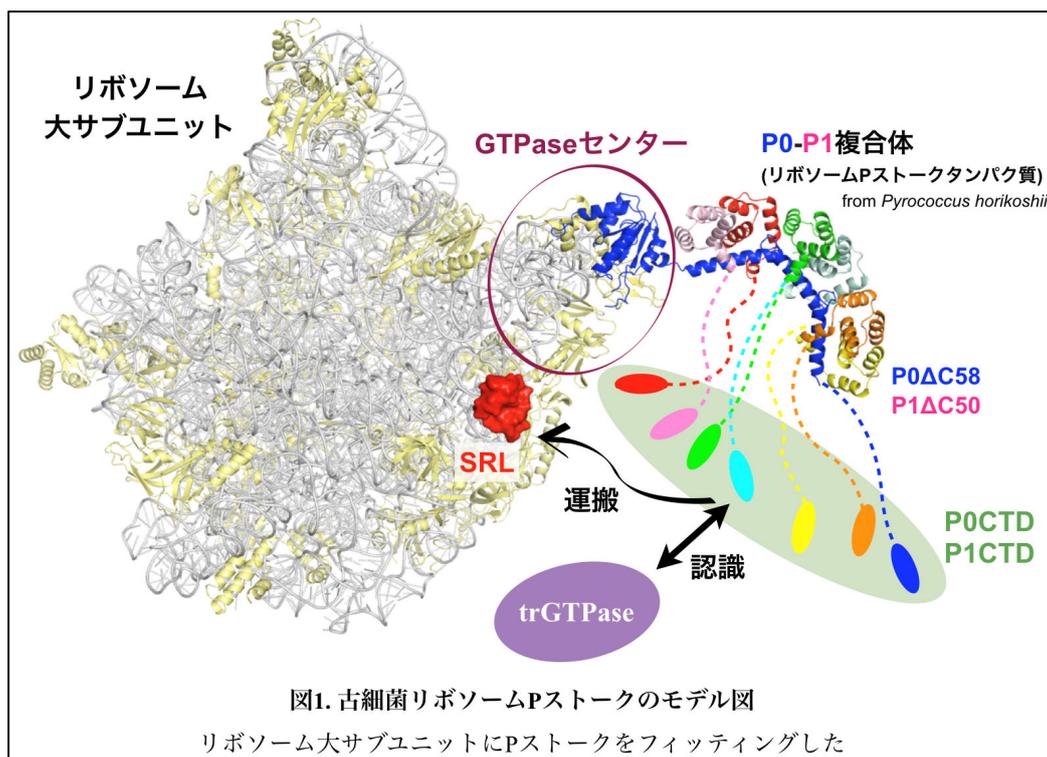
リボソーム P ストックによる翻訳伸長因子 EF-2 の運搬機構の解明

Nucleic Acids Research, 46, 3232-44 (2018); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 3748-53 (2012)

研究背景

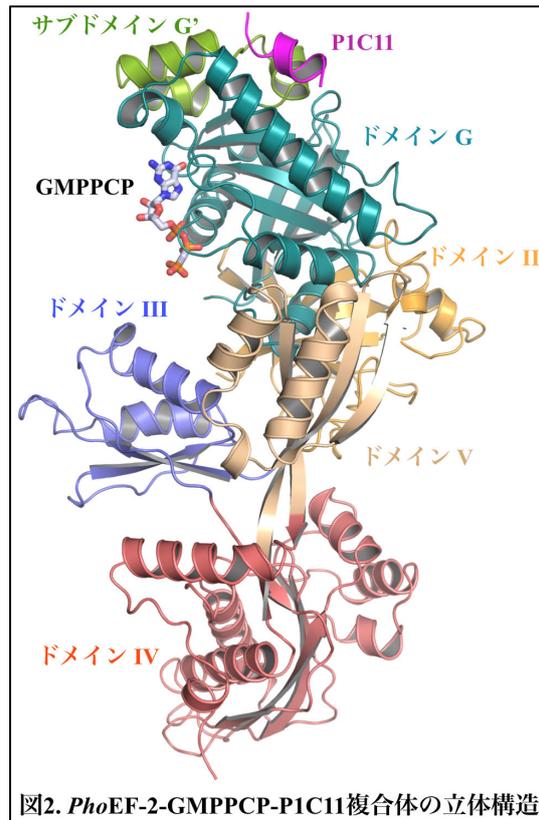
地球上すべての生物に存在するリボソームは、タンパク質の生合成すなわち翻訳を司る超分子複合体の分子機械です。翻訳過程において、リボソーム第3の機能部位である「GTPase センター」は、翻訳の進行に必須な GTP 加水分解エネルギーを継続的に供給するために GTPase の結合・解離に重要な役割を果たしています。GTPase センターには、全生物で機能的に保存されている柔軟性の高い隆起状タンパク質複合体「リボソーム P ストック」が存在します。P ストックは、様々な翻訳因子 GTPase をリボソームの GTPase 結合サイトであるサルシン・リシンループ (SRL) へ運搬する役割を担っています (図 1)。この 10 数年間に、X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡法により、リボソームやリボソーム—翻訳因子複合体の様々な構造が明らかにされてきましたが、その領域を可視化することはできず、どのように GTPase を導入するかは未だ謎に包まれています。

古細菌と真核生物では、P ストックは、P0 と P1 ホモダイマー (古細菌)、P1•P2 ヘテロダイマー (真核生物) によって構成されています。近年、私たちのグループが古細菌由来の P0-[P1]₂[P1]₂[P1]₂ の結晶構造解析に成功しましたが、結晶化のために P0 の C 末端 58 残基と P1 の C 末端 50 残基を切断したため、P ストックの C 末端領域は可視化できていません。また私たちの先行研究から、P1 の C 末端領域 (P1CTD) の L103, L106, F107 の 3 残基が GTPase との相互作用に重要であることが示されています。一方、P ストックの C 末端領域が選択的・特異的に認識する GTPase (開始因子 (IF5B), 伸長因子 (EF-2/EF-G, EF-1 α /EF-Tu), 終結因子 (RF3)) では、P1 の結合領域が保存されていないことは特徴的で興味深いです。



研究成果

私たちは P ストックと翻訳伸長因子 EF-2 の相互作用の詳細を明らかにするために、好高熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来の EF-2 (*PhoEF-2*) を用いて、Apo 型、(*PhoEF-2*-Apo)、GDP 結合型 (*PhoEF-2*-D2-GDP)、GMPPCP 結合型 (*PhoEF-2*-GMPPCP)、*PhoEF-2*-GMPPCP と P1 の C 末端 11 残基との複合体 (*PhoEF-2*-GMPPCP-P1C11) (図 2) の計 4 種類の立体構造を決定しました。構造から、P1C11 は 1 本の α ヘリックスを形成し、*PhoEF-2* の GTP 結合サイトの反対側に位置するドメイン G とサブドメイン G' との間の疎水性の溝で相互作用していました。私たちは *PhoEF-2* の P1 結合領域を形成する 12 残基について点変異体を作製し、Native-PAGE を用いた定性的な結合実験を行いました。その結果、M167 と F205 (ドメイン G)、F226 (サブドメイン G') の 3 残基が P1CTD との相互作用に重要であることが示されました。また、構造から P1 結合領域は、GTP 結合サイトの反対側に位置していますが、構造を



詳細に観察すると、いくつかの P1 結合残基が GTP 結合モチーフのうち G4 モチーフの V153 と疎水コアを形成し、G5 モチーフと F205 が同一ループ上に存在することが明らかになりました。これらの構造的な関係性は *PhoEF-2* への P1 の相互作用が核酸 (GTP/GDP) の結合によって影響を受ける可能性を示唆しています。

さらに、表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて、GMPPCP 型、GDP 型、Apo 型について、それぞれ P1 との定量的な結合実験を行った結果、GDP 型と P1 の結合親和性は GMPPCP 型に匹敵したが、核酸結合型は Apo 型より少し強い親和性を示しました。さらに、GDP 型が P1 とどう相互作用するかを明らかにするために、私たちは、分子動力学シミュレーションを用いて *PhoEF-2*-GDP と P1C11 複合体 (*PhoEF-2*-GDP-P1C11) とのドッキングモデルを構築しました。このモデルは、*PhoEF-2* が GTP 加水分解後におそらくリボソームから解離した状態を示唆しています。これら 5 種類の *PhoEF-2* の構造比較から、各型における P1C11 結合領域が異なるコンフォメーションを取っていることを発見した。これらすべての結果をまとめ、私たちは、*PhoEF-2* の P1 結合領域が翻訳過程に応じて、“closed”、“open”、“release” の 3 状態を取ることを提案しました (図 3)。

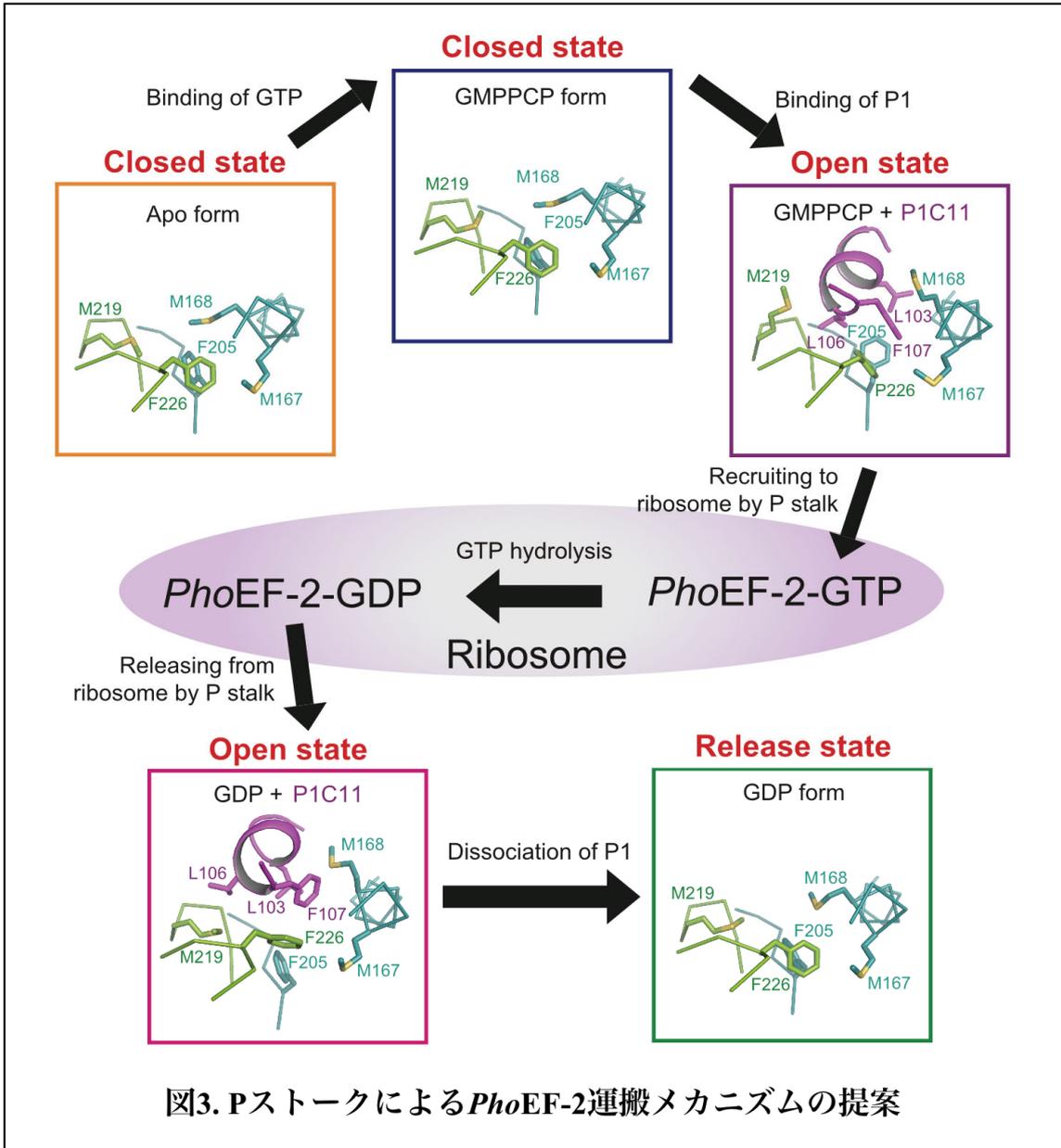


図3. Pストークによる*PhoEF-2*運搬メカニズムの提案