

氏名	YUTTHANASIRIKUL RAYAKORN		
博士の専攻分野の名称	博士（理学）		
学位記号番号	博理工甲第 1003 号		
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 24 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	Molecular Mechanism of Oxidative Damage to Translation Factor EF-Tu in the Cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 における翻訳因子 EF-Tu の酸化傷害の分子機構)		
論文審査委員	委員長	教授	西山 佳孝
	委員	教授	西田 生郎
	委員	准教授	日原由香子
	委員	教授	戸澤 讓

論文の内容の要旨

EF-Tu is a translation factor that is essential for elongation of peptides in the translational machinery. EF-Tu binds aminoacyl tRNA in the GTP-bound form, delivers it into the A site of the ribosome, and dissociates from the ribosome upon hydrolysis of GTP. In a previous study, translation factor EF-G, another key protein for translational elongation, has been identified as a target of reactive oxygen species (ROS) within the translational machinery in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. However, it remained to be clarified whether other elongation factors might also be sensitive to ROS. In the present study, I focused on EF-Tu of *Synechocystis* and studied the sensitivity of EF-Tu to oxidation by ROS.

Since EF-Tu has three different forms, namely, GTP-bound (EF-Tu-GTP), GDP-bound (EF-Tu-GDP), and nucleotide-free forms, I investigated the sensitivity of the individual forms to ROS. Analysis of the redox state of Cys82, which is a single cysteine residue in this protein, showed that Cys82 in both EF-Tu-GTP and nucleotide-free EF-Tu were sensitive to oxidation by H₂O₂, whereas Cys82 in EF-Tu-GDP was less sensitive to H₂O₂. Assay of translational activity with a translation system *in vitro* derived from *Escherichia coli* revealed that EF-Tu-GTP that had been treated with H₂O₂ prior to its addition to the translation system, the synthesis of DHFR fell with increases in the concentration of H₂O₂. However, the translational activity of EF-Tu-GDP was resistant to oxidation. The translational activity of nucleotide-free EF-Tu was very sensitive to H₂O₂. Addition of only 0.1 mM H₂O₂ decreased the translational activity to approximately 20% of the original level. Oxidation of Cys82 resulted in the formation of both intermolecular disulfide bond and sulfenic acid. Replacement of Cys82 by serine rendered all forms of EF-Tu to be insensitive to oxidation and inactivation by H₂O₂, suggesting that Cys82 might be the target of oxidation and inactivation by H₂O₂. Furthermore, the oxidized EF-Tu was reduced and reactivated by thioredoxin, a ubiquitous protein that mediates dithiol-disulfide exchange, suggesting that oxidation of EF-Tu is reversible.

Analysis of molecular mass with gel filtration chromatography showed that under reducing conditions, both EF-

Tu-GTP and EF-Tu-GDP were monomers, whereas nucleotide-free EF-Tu was a dimer. However, under oxidizing conditions, part of EF-Tu-GTP formed a dimer and, moreover, part of nucleotide-free EF-Tu formed large complexes with more than 30 molecules. It seems that the formation of the intermolecular disulfide bond might trigger the formation of large complexes to inhibit the function of EF-Tu. Single-molecule observation with atomic force microscopy showed that the addition of DTT to the large complexes resulted in the dissociation into many small molecules. Thus, EF-Tu might be sensitive to ROS in both GTP-bound and nucleotide-free forms via oxidation of Cys82 but oxidation might be reversed in a redox-dependent manner in *Synechocystis*.

Immunological analysis of EF-Tu *in vivo* showed that when *Synechocystis* cells were exposed to strong light, some portion of EF-Tu might form oxidized oligomers and their levels increased during prolonged illumination. In *ftr-v* mutant, which lacks the variable subunit of ferredoxin-thioredoxin reductase, the levels of oxidized oligomer of EF-Tu increased significantly, indicating that reduction of EF-Tu by thioredoxin had been interrupted. Taking together, it seems likely that reducing power that is generated from the photosynthetic transport of electrons might be transmitted to EF-Tu via thioredoxin.

論文の審査結果の要旨

当学位論文審査委員会は、論文発表会を平成 28 年 2 月 23 日に開催し、論文内容の審査を行った。審査結果を以下に要約する。

光合成微生物シアノバクテリアでは、タンパク質合成の翻訳伸長反応が酸化ストレスに対して感受性が高く、これまでに翻訳伸長に關与する翻訳因子 EF-G が酸化傷害の標的の一つになることが明らかにされている。しかし、その後の研究で、EF-G 以外の構成成分も翻訳の酸化傷害に關与している可能性が示唆されていた。本研究では、翻訳伸長に關与する別の翻訳因子 EF-Tu も酸化傷害を受けることを明らかにしている。そのメカニズムとして、EF-Tu のシステイン残基 Cys82 が分子間ジスルフィド結合やスルフェン酸を形成して EF-Tu が可逆的に不活性化することを *in vitro* で解明している。さらに、EF-Tu の酸化が *in vivo* でも観察されることも見出している。以上の発見を踏まえ、本論文では EF-Tu の酸化傷害とそのレドックス制御に関する新たな知見をまとめている。

第 1 章では本論文の研究背景を述べている。従来、酸化ストレスが原核・真核細胞のタンパク質合成を抑制することが知られていたが、その分子メカニズムはこれまで未解明であった。1990 年代に、大腸菌や枯草菌において翻訳因子 EF-G や EF-Tu が、酸化条件下でカルボニル化されるタンパク質として同定された。これらの翻訳因子はタンパク質合成の翻訳伸長反応において重要な役割を担っており、EF-G はリボソーム内でペプチジル tRNA を転移する反応を、EF-Tu はアミノアシル tRNA をリボソームに挿入する反応を担っている。しかし、これらの翻訳因子の酸化のメカニズムや、翻訳因子の酸化がタンパク質合成に及ぼす影響は不明であった。

近年、シアノバクテリアにおいて、EF-G の特定の 2 つのシステイン残基が分子内ジスルフィド結合を形成して EF-G が不活性化し、タンパク質合成が抑制されることが *in vitro* の研究で明らかとなった。さらに、酸化標的のシステイン残基を改変した EF-G をシアノバクテリアで発現させると、タンパク質合成および光合成が強光下で活性化することもわかり、EF-G の酸化とタンパク質合成および光合成の強光応答が關連していることが示唆された。しかし、酸化条件下におけるタンパク質合成の阻害が EF-G の酸化だけでは説明できないこともわかり、翻訳伸長に關わる他の翻訳因子も酸化傷害を受け、タンパク質合成の阻害に關与している可能性が示唆された。そこで本研究では、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下、*Synechocystis* と表記) の翻訳因子 EF-Tu の酸化感受性を調べ、酸化傷害の分子メカニズムを解明することを目的とした。

第 2 章では、*Synechocystis* の EF-Tu の酸化傷害の分子メカニズムに関して、酸化条件下におけるシステイン残基のレドックス状態や翻訳活性、分子形態の変化が記述されている。

EF-Tu の構造は、結合するヌクレオチドによって大きく異なるため、GTP 結合型 EF-Tu、GDP 結合型 EF-Tu、ヌクレオチドフリー型 EF-Tu の 3 種類の組換えタンパク質を作製して、 H_2O_2 に対する感受性を調べた。大腸菌無細胞翻訳系 PURE system を用いて、EF-Tu の酸化が翻訳活性へ及ぼす影響を解析した結果、GTP 結合型およびヌクレオチドフリー型は H_2O_2 に高い感受性を示し失活するが、GDP 結合型は H_2O_2 に対して耐性を示すことがわかった。

Synechocystis の EF-Tu にはシステイン残基が一つしかない。このシステイン残基 Cys82 のレドックス状態を SH 基修飾剤 PEG-maleimide を用いて解析したところ、GTP 結合型およびヌクレオチドフリー型では Cys82 が H_2O_2 によって酸化され、EF-Tu は酸化型の多量体および単量体を形成するが、GDP 結合型では酸化

されにくいことがわかった。Cys82 をセリンに置換すると、どの EF-Tu 組換え体でも翻訳活性が H₂O₂ に対して耐性を示し、酸化型多量体の形成は見られなくなった。したがって、Cys82 の酸化が失活および多量体形成の原因となっていることがわかった。

質量分析解析や DAz-2 化学修飾解析から、EF-Tu の酸化型多量体は Cys82 を介した分子間ジスルフィド結合を形成していること、酸化型単量体は Cys82 にスルフェン酸を形成していることがわかった。ゲルろ過クロマトグラフィーで分子形態を解析すると、ヌクレオチドフリー型 EF-Tu は還元状態で 2 量体、酸化状態で 2 量体や 30 分子以上からなる巨大な複合体を形成することがわかった。この巨大複合体を原子間力顕微鏡 AFM で観察すると、直径 20nm 程度の球状物質であり、そこに還元剤 DTT を添加すると速やかに多数の分子に解離していくことがわかった。

Synechocystis の細胞懸濁液に強光を照射して、EF-Tu のレドックス状態をウェスタン解析したところ、時間とともに EF-Tu が単量体から多量体へと変化することがわかった。チオレドキシン還元酵素 FTR の破壊株では、多量体への変化が顕著に促進することがわかった。したがって、強光下では EF-Tu が酸化され多量体を形成すること、EF-Tu は光合成電子伝達に由来する還元力によって還元されることが示唆された。この結果は、*in vitro* で見られた現象の一部を *in vivo* に反映していると考えられる。

第 3 章では、本研究の総括および今後の展望が述べられている。EF-Tu の酸化メカニズムや翻訳に与える影響がまとめられており、今後の課題として、EF-Tu の失活メカニズムの全容解明や、*in vivo* における EF-Tu の巨大複合体の解析とその生理学的意義の解明が挙げられている。

このように、本研究は EF-Tu の酸化メカニズムを世界で初めて解明したものであり、しかも酸化感受性が結合するヌクレオチドによって異なることを見出した点でも画期的だと思われる。これらの研究成果は、生化学の分野で国際的に著名な学術誌 *The Journal of Biological Chemistry* に筆頭著者として論文が受理されており、また共著者として一報の論文が掲載されている。以上のことから、当学位論文審査委員会は本論文が博士（理学）の学位授与に十分値するものとし、学位論文として合格と判定した。