

氏名	永野 孝典
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 894 号
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 22 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	大腸菌翻訳因子 EF-G の酸化傷害とレドックス制御の分子機構
論文審査委員	委員長 准教授 西山 佳孝 委員 教授 西田 生郎 委員 准教授 朝井 計 委員 准教授 日原由香子

論文の内容の要旨

大腸菌の翻訳因子 elongation factor G (EF-G) は酸化されやすいタンパク質として知られているが、酸化傷害のメカニズムや、EF-G の酸化が翻訳活性に及ぼす影響に関しては不明であった。本研究によって、EF-G が大腸菌翻訳系における酸化の主要な標的分子であることや、EF-G が活性酸素によってジスルフィド結合を形成して可逆的に不活性化することが明らかとなった。さらに、EF-G の酸化はリボソームの機能を抑制して翻訳伸長反応のサイクルを遅延させることが明らかとなった。本論文は、EF-G のレドックス状態による翻訳制御機構に関する新たな知見についてまとめたものである。

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、そのメカニズムはこれまで未解明であった。近年、大腸菌の翻訳因子 EF-G が、酸化によるカルボニル化を受けるタンパク質の一つとして同定された。EF-G は、タンパク質合成の翻訳伸長段階において重要な役割を担っており、ペプチジル tRNA のトランスロケーション反応を促進する翻訳因子である。しかし、EF-G の酸化とタンパク質合成との関係は依然として不明であった。

近年、光合成微生物シアノバクテリアにおける光合成の強光ストレス応答の研究から、EF-G が活性酸素によって酸化され、特定の 2 つのシステイン残基間で分子内ジスルフィド結合を形成して不活性化することが明らかとなった。さらに、EF-G のアライメント解析から、シアノバクテリア EF-G で酸化の標的となる 2 つのシステイン残基が、大腸菌をはじめとする多くの生物の EF-G に保存されていることが分かった。これらの知見を踏まえ、本研究では、大腸菌 EF-G の酸化傷害とレドックス制御の分子メカニズムの解明を目的とした。

第 2 章では、大腸菌 EF-G 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と翻訳活性の解析が記述されている。大腸菌無細胞翻訳系 PURE system を用いて、EF-G の酸化が翻訳活性へ及ぼす影響を解析した結果、0.5 mM H₂O₂ によって EF-G の翻訳活性が失活することが明らかとなった。また、システイン残基の改変や、SH 基修飾試薬 PEG-maleimide を用いたシステイン残基のレドックス状態の解析から、H₂O₂ による EF-G の不活性化は、Cys114 と Cys266 の酸化による分子内ジスルフィド結合の形成が原因であることがわかった。

改変型 EF-G を用いた無細胞翻訳系は酸化耐性が增大したことから、EF-G は翻訳系における酸化のプライマリーターゲットであることが示唆された。さらに、酸化型 EF-G はチオレドキシンの作用によって分

子内ジスルフィド結合が還元され翻訳活性が回復したことから、大腸菌翻訳系はEF-Gのレドックス状態によって活性が制御されていることがわかった。以上の結果から、細胞内では、呼吸系などに由来する酸化ストレスと還元力供給とのバランスによって翻訳系がレドックス制御されていることが示唆された。

第3章では、EF-Gの酸化によるリボソームの翻訳伸長機能の抑制に関して、分子メカニズムの解析が記述されている。まず、酸化型・還元型EF-Gの存在下で翻訳活性を解析した結果、酸化型EF-Gが還元型EF-Gの活性を阻害することがわかった。次に、リボソーム内で起こる翻訳伸長の各反応ステップにおけるEF-Gの酸化の影響について解析を行った。EF-Gが関与する翻訳伸長反応において、(1)GTPと結合、(2)GTP型EF-Gのリボソームへ挿入、(3)ペプチジル tRNAのトランスロケーション、(4)GTPの加水分解、(5)リボソームからEF-Gの解離といった5つのステップが繰り返すことでポリペプチド鎖の伸長が起こる。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTPによるGTP結合能の解析から、EF-Gの酸化はGTPとの結合に影響を及ぼさないことがわかった。また、GDPNPあるいはフシジン酸でGTP型にEF-Gを固定してリボソームへの挿入過程を解析した結果、酸化型EF-Gはリボソームへ正常に挿入されることがわかった。さらに、ピューロマイシンを用いたシングルトランスロケーションアッセイから、酸化型EF-Gの存在下でも正常にトランスロケーション反応が進行することがわかった。しかし、酸化型EF-GのGTP加水分解活性は、還元型EF-Gに比べ約40%まで活性が減少した。また、酸化型EF-Gはリボソームからの解離速度が低下した。以上の結果から、EF-Gの酸化は、GTP加水分解とそれに共役したリボソームからの解離を抑制して翻訳伸長反応のターンオーバー速度を低下させ、翻訳活性を抑制することが明らかになった。さらに、EF-Gの翻訳抑制は、チオレドキシンによって回復することから、この抑制機構は可逆的であることが示唆された。以上の結果から、大腸菌は生育環境にตอบสนองして、EF-Gのレドックス状態を介したタンパク質合成の調節を行っていることが初めて示唆された。

第4章では、本研究を総括し、EF-Gの酸化による翻訳抑制が、多様な生物に保存された保存された本質的な分子メカニズムであることを示すとともに、酸化耐性を有する無細胞翻訳系を開発するための基礎理論となる可能性を示している。

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 25 年 2 月 6 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。

大腸菌の翻訳因子 elongation factor G (EF-G) は酸化されやすいタンパク質として知られているが、酸化傷害のメカニズムや、EF-G の酸化が翻訳活性に及ぼす影響に関しては不明であった。本研究によって、EF-G が大腸菌翻訳系における酸化の主要な標的分子であることや、EF-G が活性酸素によってジスルフィド結合を形成して可逆的に不活性化することが明らかとなった。さらに、EF-G の酸化はリボソームの機能を抑制して翻訳伸長反応のサイクルを遅延させることが明らかとなった。本論文は、EF-G のレドックス状態による翻訳制御機構に関する新たな知見についてまとめたものである。

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、そのメカニズムはこれまで未解明であった。近年、大腸菌の翻訳因子 EF-G が、酸化によるカルボニル化を受けるタンパク質の一つとして同定された。EF-G は、タンパク質合成の翻訳伸長段階において重要な役割を担っており、ペプチジル tRNA のトランスロケーション反応を促進する翻訳因子である。しかし、EF-G の酸化とタンパク質合成との関係は依然として不明であった。

近年、光合成微生物シアノバクテリアにおける光合成の強光ストレス応答の研究から、EF-G が活性酸素によって酸化され、特定の 2 つのシステイン残基間で分子内ジスルフィド結合を形成して不活性化することが明らかとなった。さらに、EF-G のアライメント解析から、シアノバクテリア EF-G で酸化の標的となる 2 つのシステイン残基が、大腸菌をはじめとする多くの生物の EF-G に保存されていることが分かった。これらの知見を踏まえ、本研究では、大腸菌 EF-G の酸化傷害とレドックス制御の分子メカニズムの解明を目的とした。

第 2 章では、大腸菌 EF-G 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と翻訳活性の解析が記述されている。大腸菌無細胞翻訳系 PURE system を用いて、EF-G の酸化が翻訳活性へ及ぼす影響を解析した結果、0.5 mM H₂O₂ によって EF-G の翻訳活性が失活することが明らかとなった。また、システイン残基の改変や、SH 基修飾試薬 PEG-maleimide を用いたシステイン残基のレドックス状態の解析から、H₂O₂ による EF-G の不活性化は、Cys114 と Cys266 の酸化による分子内ジスルフィド結合の形成が原因であることがわかった。

改変型 EF-G を用いた無細胞翻訳系は酸化耐性が増大したことから、EF-G は翻訳系における酸化のプライマリーターゲットであることが示唆された。さらに、酸化型 EF-G はチオレドキシンの作用によって分子内ジスルフィド結合が還元され翻訳活性が回復したことから、大腸菌翻訳系は EF-G のレドックス状態によって活性が制御されていることがわかった。以上の結果から、細胞内では、呼吸系などに由来する酸化ストレスと還元力供給とのバランスによって翻訳系がレドックス制御されていることが示唆された。

第 3 章では、EF-G の酸化によるリボソームの翻訳伸長機能の抑制に関して、分子メカニズムの解析が記述されている。まず、酸化型・還元型 EF-G の存在下で翻訳活性を解析した結果、酸化型 EF-G が還元型 EF-G の活性を阻害することがわかった。次に、リボソーム内で起こる翻訳伸長の各反応ステップにおける EF-G の酸化の影響について解析を行った。EF-G が関与する翻訳伸長反応において、(1)GTP と結合、(2)GTP 型 EF-G のリボソームへ挿入、(3)ペプチジル tRNA のトランスロケーション、(4)GTP の加水分解、(5)リボソームから EF-G の解離といった 5 つのステップが繰り返すことでポリペプチド鎖の伸長が起こる。[α -³²P] GTP による GTP 結合能の解析から、EF-G の酸化は GTP との結合に影響を及ぼさないこと

がわかった。また、GDPNP あるいはフシジン酸で GTP 型に EF-G を固定してリボソームへの挿入過程を解析した結果、酸化型 EF-G はリボソームへ正常に挿入されることがわかった。さらに、ピューロマイシンを用いたシングルトランスロケーションアッセイから、酸化型 EF-G の存在下でも正常にトランスロケーション反応が進行することがわかった。しかし、酸化型 EF-G の GTP 加水分解活性は、還元型 EF-G に比べ約 40% まで活性が減少した。また、酸化型 EF-G はリボソームからの解離速度が低下した。以上の結果から、EF-G の酸化は、GTP 加水分解とそれに共役したリボソームからの解離を抑制して翻訳伸長反応のターンオーバー速度を低下させ、翻訳活性を抑制することが明らかになった。さらに、EF-G の翻訳抑制は、チオレドキシンによって回復することから、この抑制機構は可逆的であることが示唆された。以上の結果から、大腸菌は生育環境に应答して、EF-G のレドックス状態を介したタンパク質合成の調節を行っていることが初めて示唆された。

第 4 章では、本研究を総括し、EF-G の酸化による翻訳抑制が、多様な生物に保存された本質的な分子メカニズムであることを示すとともに、酸化耐性を有する無細胞翻訳系を開発するための基礎理論となる可能性を示している。

本論文に記された研究成果は、本人が筆頭著者として、生化学の分野で国際的に著名な学術誌 *The Journal of Biological Chemistry* に掲載されており、また共著者として一報の論文が受理されている。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。