

令和 5 年 4 月 18 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07310

研究課題名(和文)バクテリアトキシンによるリボソーム依存mRNA切断反応メカニズムの解明

研究課題名(英文)Structural bases for mRNA cleavage on the ribosome by RelE, a bacterial toxin

研究代表者

竹本 千重 (Takemoto, Chie)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：40306527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリアトキシンRelEは、アミノ酸飢餓にตอบสนองしてリボソーム中でmRNAを切断することによってタンパク質合成を阻害する役割を担うRNA切断酵素です。RelEには既報のRNA切断反応に典型的なアミノ酸がないため、その反応機構には未解明な点が残されていました。本研究ではRelEとリボソーム・mRNA複合体の切断直前と直後の構造を決定し、反応機構の解明を試みました。切断直前の構造中のmRNAの切断部位を実際の基質であるリボヌクレオチドに置換し、エネルギー最小化計算を行って切断前のモデル構造を得ました。変異体の活性とモデル構造を検討し、既報の一般酸塩基触媒機構を修正する反応機構を提案しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、構造生物学的手法によって、リボヌクレアーゼによるRNAの切断反応機構の解明という生化学の古典的な問題に挑戦しました。X線結晶構造解析によって決定した切断前の構造を元に、切断直前のmRNAを認識しているモデルを作成しました。これを切断反応後の実構造と比較すると、大きな構造変化はmRNAの切断部位に集中しており、切断反応はリボソームという巨大分子の中で局所的に起こっていることが分かりました。今後、ここで得られたモデルを初期構造としてシミュレーションを行うことも可能となり、生命活動の全容を分子反応の集積として解明する上で欠かせない計算科学との連携に大きく貢献すると考えられます。

研究成果の概要(英文)：The bacteriotoxin RelE is an RNA endonuclease inhibiting protein synthesis by cleaving mRNA on the ribosome in response to starvation of amino acids. Since RelE does not have the typical residues of ribonucleases, the reaction mechanism has remained unclear. In this study, we attempted to elucidate the reaction mechanism by determining the structures of RelE-ribosome-mRNA complexes in pre- and post-cleavage states. By examining the determined structures and a model structure in the pre-cleavage state, in which the deoxynucleotide of the cleavage site was replaced with a ribonucleotide, we proposed a revised mechanism of the previously suggested general acid-base catalysis mechanism.

研究分野：分子生物学、構造生物学

キーワード：リボヌクレアーゼ リボソーム X線結晶構造解析 酵素反応メカニズム RNA 分子動力学 高度好熱菌

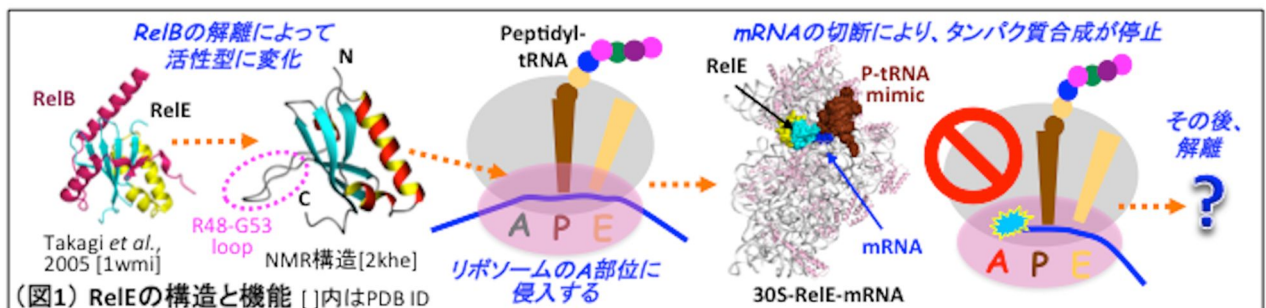
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バクテリアの生育を阻害する酵素トキシンと、その特異的インヒビターであるアンチトキシンは、細胞死を司るメカニズムだと考えられていましたが、近年、環境変化に対応して、生育速度を調整するために機能していることが分かってきました。定常期はアンチトキシンと複合体を形成して不活性化されていますが、ストレスに应答して複合体が解離すると、例えば、DNA複製(DNAジャイレース)の阻害や、タンパク質合成系の阻害(mRNA切断)などの活性を発現します。大腸菌*E. coli*のmRNAを切断するトキシンとしてはRelEとMazFがよく調べられていて、RelEはリボソーム依存的にA部位にあるmRNAを切断することが知られています(図1)。RelEの遺伝子は、アンチトキシンRelBの下流にコードされていて、上流のRelBは転写リプレッサーとしても機能しています。

RelEは100残基に満たない短いタンパク質で、種間の配列保存性が低いため、リボソーム依存的にmRNAを分解するという特徴的な活性に着目した多くの研究成果が報告されているにも関わらず、活性に必要な残基を特定することは困難でした。2005年にTakagiらが、古細菌RelE-RelB複合体のX線結晶構造解析に成功して、C末端を含む領域に複数のアルギニンが並置していることと、それらの残基が活性発現に重要であることを初めて示しました[Ref. 1]。しかし、典型的なRNA切断反応に必要とされる2'-OHのプロトンを脱離させるBase残基が保存されていないため、リボソームの関与等を示唆するに留まりました。2009年にNeubauerらがりボソームとRelEの複合体のX線結晶構造解析に成功して、切断後のmRNAの末端が2', 3'-cyclicリン酸であることが確定され、Tyr87 (Base), Arg81 (Acid)と、補助的にLys52, Arg61が協働する一般酸塩基触媒メカニズムを提案しました[Ref. 2]。しかし、Tyr87をPheに置換した変異体RelEは、ほとんど活性を損なわないという矛盾もあり、反応メカニズムについては疑問を残しました。この構造解析ではmRNA切断前の構造を得るために、RelEの二重変異体(R45A/R81A)と、A部位のコドンを2'-O-メチル化したmRNAを用いています。そのため切断反応直前の構造として解かれた"pre-cleavage state"の、特にArg81周辺の立体構造情報が不足していると考えられました。そこで、我々は、mRNA切断反応機構の実態に迫るために、高度好熱菌*T. thermophilus*の野生型RelEを用いてリボソーム・mRNAとの複合体のX線結晶構造解析に取り組みました。複合体の結晶をsoakingという手法によって作成する際、結晶中でmRNAの切断反応が起こるので、切断部位のヌクレオチドだけをデオキシ体に変換することによって、mRNA切断直前("pre-cleavage state")の構造を得ることに成功しました。一方、Strobelのグループが、RelBを利用したsingle-turn-overアッセイ系を構築して、RelEによるRNA切断反応の速度論量の解析を行い、Lys52 (Base), Arg81 (Acid)と、Lys54, Arg61が協働する修正モデルを提案しました[Ref. 3]。彼らの測定結果は、我々の構造と良く合致しますが、Lys52は保存性の低い残基であり、また2つのアルギニン(R61, R81)の役割は依然として明確ではないため、真のメカニズムを解明するためには、更に詳細な解析が必要であると考えました。



(図1) RelEの構造と機能 []内はPDB ID

2. 研究の目的

- (1) 活性に重要なアミノ酸残基の特定: RelEの変異体を作成して、活性に重要なアミノ酸を特定します。また、"pre-cleavage state"におけるRelEとmRNAの構造から、アミノ酸とリン酸が直接相互作用する可能性が高いと考えられますが、構造情報からpKa値を算出するなど、理論上成立するかどうか検証します。
- (2) RelEによるmRNAの切断反応メカニズムの解明: 典型的なRNA切断反応を説明する一般酸塩基触媒機構では、Baseの役割を果たすアミノ酸が切断部位のリボースから2'-OHのプロトンを引き抜くことから反応が始まります。しかし、RelEの切断部位近傍には、相当するアミノ酸が存在しないので、構造情報に基づいて詳細に解析して真の反応機構を解明します。

3. 研究の方法

- (1) RelE変異体の作成による重要残基の特定とその役割の推定: 高度好熱菌の野生型RelEを用いた"pre-cleavage state"の構造では、Arg64, Arg84, Tyr88 (大腸菌ではArg61, Arg81, Tyr87に相当)が、mRNA(U₁dA₂G₃)の切断部位と直接相互作用しています。この他に既報で重要性が示唆されているLys57(Lys54)やC末付近の残基などの変異体を計20種類設計しました。活性に重要ではない残基の変異体は、形質転換した大腸菌のコロニーが出ない、あるいは液体培地で増殖できません。またArgをLys, Hisに、TyrをPhe, Ile等に置換することで、その残基の役割を推定することができます。
- (2) mRNA切断直前の構造のモデリングと考察: "pre-cleavage state"の複合体の結晶には、mRNAが切断されないようにデオキシ体に置換したオリゴヌクレオチド(U₁dA₂G₃)を用いました。本来のmRNAの切断直前の構造を考察するために、得られた構造のdA₂のリボースの2'に水酸基を生成させてリボヌクレオチドに置換したモデルを作成し、CNSとAmber14を使ってモデル構造を得ました。また、propka3.1によって切断部位に関わる残基のpKa値を算出してモデル構造の妥当性も合わせて検討しました。

4. 研究成果

RNA切断位置近傍のRelE変異体の解析から、最も重要な残基はArg64とArg83であることが示され、このことは構造情報とも一致しました。また、Lys57とTyr88も活性に影響を及ぼすことが示唆されましたが、Lys57はAlaやMetに置換しても大腸菌の生育を著しく妨げるので、側鎖の性質が酵素反応に本質的な役割を果たしているとは考えにくい結果でした。さらに、Amber14で得られたモデル構造では、切断部位に近接するアミノ酸のうち、特に保存性の高いArg64とArg83はリン酸に対して等価な構造となり、Lys57は切断部位の2'-Oよりもリン酸の方向へシフトしているためBaseの役割を担っていない可能性が示唆されました。

2015年にStrobelのグループが、リン酸の酸素原子を硫黄に置換した基質を用いたRelE変異体のRNA切断活性の解析とpH依存性の実測と予測から、Lys54(Base)とArg81(Acid)による酸塩基触媒機構の修正モデルを提案しました[Ref. 4]。彼らのアッセイの結果と我々の"pre-cleavage state"構造は良く一致するにも関わらず、結論が一致しません。その理由を詳細に検討したところ、彼らが結果の解釈に用いている大腸菌RelE変異体の構造が、高度好熱菌野生型RelEの構造と微妙に異なるためであることが分かりました。そこで、さらに検討を進め、Baseが2'-OHのプロトンを脱離させる一般酸塩基触媒機構ではなく、Arg64もしくはArg83による酸触媒メカニズムを提案しました。

[Ref.2] Neubouer C, et al. (2009) Cell 139(6), 1084-1095. (PDB ID: 3kiq, 3kir)

[Ref.3] Meghan A., et al. (2013) Biochemistry 52, 8633-8642.

[Ref.4] Brian F., et al, (2015) Biochemistry 54, 7048-7057.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 C. Takemoto, M. Kawazoe, T. Kaminishi, S. Suzuki, A. Tatsuguchi, K. Hanawa-Suetsugu, F. Konishi, M. Shirouzu, Y. Muto, P. Fucini and S. Yokoyama
2. 発表標題 Structural bases for mRNA cleavage on the ribosome by RelE, a bacterial toxin
3. 学会等名 Ribosome 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

RIKEN BDR タンパク質機能・構造研究チーム https://www.bdr.riken.jp/jp/research/labs/shirouzu-m-protein/index.html

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------