

令和元年6月18日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18684

研究課題名(和文) ArfAによる翻訳停滞解消メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of ArfA-mediated ribosome rescue

研究代表者

栗田 大輔 (Kurita, Daisuke)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：60552651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、大腸菌70Sリボソーム、ArfA、RF2、開始tRNA、mRNAからなるノンストップ複合体をクライオ電子顕微鏡により解析し、3.0 Åの分解能で構造を決定した。その結果、ArfAのN末端側の領域はリボソーム30Sサブユニットのデコーディング領域とRF2に挟まれる形で結合する一方、ArfAのC末端領域はリボソームのmRNAエントリーチャンネル内に位置することが明らかになった。また、ArfAおよびRF2変異体を用いて、変異がペプチジルtRNA加水分解活性に与える影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、翻訳停滞解消因子は新しい抗生物質の標的として注目されつつある。一般に、翻訳を阻害する抗生物質はリボソームや翻訳関連因子に作用する。翻訳のメカニズムは生物種を問わず共通しているため、このような抗生物質は広範囲のバクテリアに対して効果を示す。しかし、このような広い抗菌スペクトルを示す薬剤は耐性菌の蔓延リスクを高めるといった問題を内包している。翻訳停滞解消因子は結核菌・ピロリ菌・赤痢菌・ペスト菌等の一部の病原菌の生育にとって必須であり、その阻害薬は耐性菌出現リスクの低い次世代の抗生物質として期待される。本研究は、このような薬剤開発の基盤となるものである。

研究成果の概要(英文)：Here, using cryo-electron microscopy, we characterize the structure of the Escherichia coli 70S ribosome bound with ArfA, RF2, a short non-stop mRNA and a cognate P-site tRNA. The C-terminal loop of ArfA occupies the mRNA entry channel on the 30S subunit, whereas its N terminus is sandwiched between the decoding centre and the switch loop of RF2, leading to marked conformational changes in both the decoding centre and RF2. Despite the distinct conformation of RF2, its conserved catalytic GGQ motif is precisely positioned next to the CCA-end of the P-site tRNA. These data illustrate a stop-codon surrogate mechanism for ArfA in facilitating the termination of non-stop ribosomal complexes by RF2.

研究分野：生化学

キーワード：リボソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内では様々な理由により翻訳が停滞する。このような停滞状態を解消するシステムとして、tmRNA によるトランス・トランスレーションが提唱されてきた。tmRNA は、tRNA ドメインと mRNA ドメインを巧みに使い分けて、既存の mRNA から翻訳を引き継ぐことによりリボソームの停滞を解消する。最近の分子遺伝学の研究によって新たな翻訳停滞解消因子 ArfA が発見され、新たなレスキュー機構の存在が明らかになった。ArfA タンパク質は停滞したリボソームに結合し、翻訳終結因子 RF2 と協調することでペプチジル tRNA を加水分解し、リボソームの停滞を解消するが、どのようにして停滞したリボソームを認識するのか、どのようにトランス・トランスレーションと使い分けているのか、不明であった。

2. 研究の目的

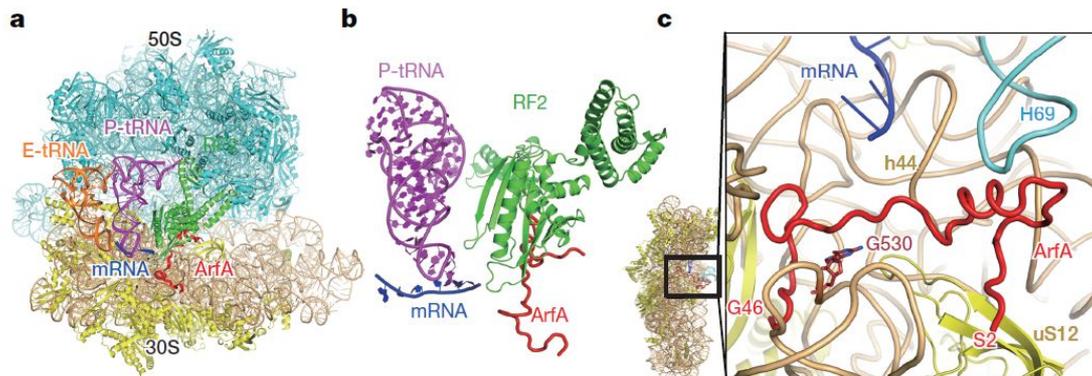
本研究では、ArfA/RF2/リボソーム複合体に対する構造解析および速度論解析を行うことでリボソームレスキュー機構の分子メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

速度論解析はクエンチフロー法および 1 分子蛍光分析法によって行い、ArfA または RF2 の変異が、反応速度や解離定数に与える影響を明らかにした。構造解析は、生化学的手法 (部位特異的ラジカルプロービング法) と構造生物学的手法 (クライオ電子顕微鏡解析) を並行して行った。

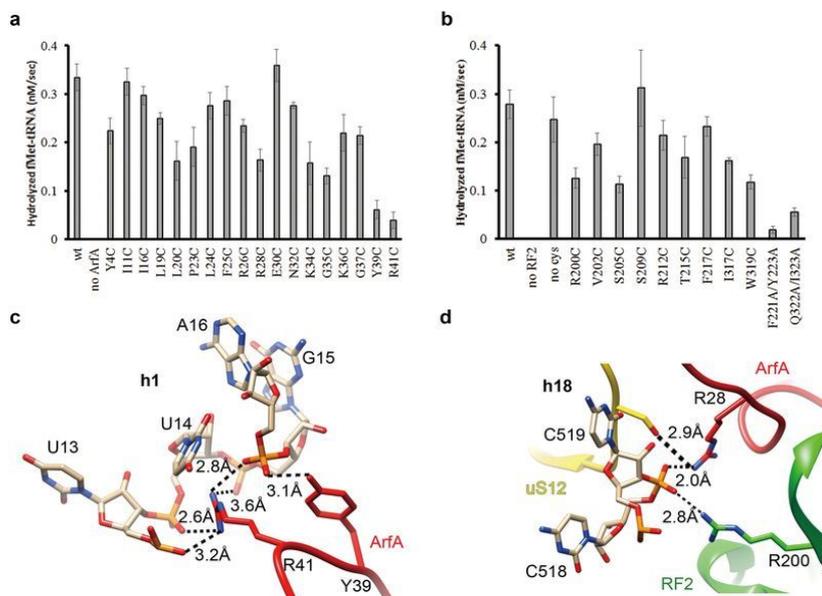
4. 研究成果

大腸菌 70S リボソーム、ArfA、RF2、開始 tRNA、mRNA からなるノンストップ複合体をクライオ電子顕微鏡により解析した。構造解析の結果、ArfA の N 末端側の領域はリボソーム 30S サブユニットのデコーディング領域と RF2 に挟まれる形で結合する一方、ArfA の C 末端領域はリボソームの mRNA エントリーチャンネル内に位置することが明らかになった。



ノンストップ複合体のリボソームのデコーディング領域は通常の翻訳終結複合体のリボソームとは異なる構造をとっていた。デコーディング領域には 16S rRNA の高度に保存された 3 つの塩基、G530・A1492・A1493 が存在する。通常の翻訳終結複合体においては、G530 終止コドン UAA の 3 文字目の A とスタッキング相互作用する。また、A1493 は 23S rRNA の A1913 とのスタッキング相互作用により安定化されており、A1492 は G530 の方向に伸びるという特徴的な構造をしている。それに対して、ノンストップ複合体においては、G530 の近くには終止コドンの代わりに ArfA の Glu30 が位置していた。そして、A1913 とスタッキング相互作用するのは A1493 ではなく A1492 であり、さらに、A1492 はリボソーム 50S サブユニットのヘリックス 69 と ArfA の Pro23 とのあいだにはさまれるかたちで安定化されていた。ノンストップ複合体のデコーディング領域はこれまでに構造が報告されたリボソームのどの状態とも異なる構造をとっており、おそらく ArfA がリボソーム 30S サブユニットのヘリックス 44 とリボソーム 50S サブユニットのヘリックス 69 を微調整しているものと考えられる。

また、精製した因子からなる *in vitro* 翻訳系と ArfA および RF2 変異体を用いて、変異がペプチジル tRNA 加水分解活性に与える影響を明らかにした。



翻訳終結複合体とノンストップ複合体とを比較したところ、翻訳終結複合体においてはRF2のSPFモチーフのSer205が終止コドンの2文字目のプリン塩基と相互作用するのに対し、ノンストップ複合体においてはSPFモチーフとArfAとの直接的な相互作用は確認されなかった。また、リボソームにおけるArfAの結合部位は終止コドンの位置する部位とは微妙にずれていた。これらを考慮すると、ArfAによる終止コドンの擬態という考え方は構造的な意味からは否定された。しかし、RF2をリクルートするための足場を形成するという機能的な意味においては、ArfAは終止コドンの代理をつとめているといえる。

大腸菌においては、ArfAおよびRF2による機構のほかにも少なくとも2つのリボソームレスキュー機構、すなわち、tmRNAおよびSmpBによるトランス-トランスレーションおよびArfBによる機構が存在する。トランス-トランスレーションの場合はSmpBのC末端のテイルがリボソームのmRNAエントリーチャンネルと結合すること、ArfBによる機構の場合もやはりC末端のテイルがmRNAエントリーチャンネルと結合することが、結晶構造解析により明らかにされている。これら3つのリボソームレスキュー機構を比較することにより、翻訳の停滞を解消するタンパク質がどのようにして停滞したリボソームを認識するのか、という疑問の答えになりうる。共通の分子機構がうかびあがってきた。それぞれのタンパク質はmRNAエントリーチャンネルと結合することによりリボソームの状態、すなわちmRNAの有無を見分けるのである。いい換えると、3つのリボソームレスキュー機構にかかわるタンパク質は、どれもC末端側の領域がリボソームの停滞の状態を見分けるためのセンサーとして機能する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

- López-Alonso JP, Kaminishi T, Kikuchi T, Hirata Y, Iturrioz I, Dhimole N, Schedlbauer A, Hase Y, Goto S, **Kurita D**, Muto A, Zhou S, Naoe C, Mills DJ, Gil-Carton D, Takemoto C, Himeno H, Fucini P, Connell SR. RsgA couples the maturation state of the 30S ribosomal decoding center to activation of its GTPase pocket. *Nucleic Acids Res.* 45, 6945-6959, 2017 doi: 10.1093/nar/gkx324. 査読あり
- Ma C*, **Kurita D***, Li N, Chen Y, Himeno H, Gao N. Mechanistic insights into the alternative translation termination by ArfA and RF2. *Nature*, 541, 550-553, 2017
*These authors contributed equally to this work doi: 10.1038/nature20822. 査読あり
- 姫野侑太、**栗田大輔** 細菌におけるリボソームレスキュー機構、*化学と生物*, 日本農芸化学会, 878-884, 2016 査読なし

[学会発表](計 8件)

- 栗田大輔**, Ma C, Gao N, 姫野侑太 クライオ電子顕微鏡によるリボソーム/ArfA/RF2 翻訳停滞複合体の構造解析 日本農芸化学会 東北・北海道合同支部大会 第153回大会、仙

台、2018年9月22-23日

2. **栗田大輔**、Ma C、Gao N、姫野俵太 クライオ電子顕微鏡によるリボソーム・ArfA・RF2複合体の構造解析 第5回リボソームミーティング、新潟、2018年9月13-14日
3. **栗田大輔**、Ma C、Gao N、姫野俵太 リボソーム/ArfA/RF2複合体のクライオ電子顕微鏡による構造解析 2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月
4. **栗田大輔**、Ma C、Gao N、姫野俵太 クライオ電子顕微鏡によるArfA/RF2/リボソーム複合体の構造解析 第12回無細胞生命科学研究会、柏、2017年11月27,28日
5. **栗田大輔**、Ma C、Gao N、姫野俵太 ArfAとRF2による翻訳終結機構の構造基盤 第19回RNAミーティング、富山、2017年7月
6. 竹本千重、López-Alonso JP、上西達也、菊地岳志、平田侑也、Iturrioz I、Dhimole N、Schedlbauer A、長谷要一、後藤史門、**栗田大輔**、武藤昱、Zhou S、直枝智恵子、Mills DJ、Gil-Carton D、姫野俵太、Fucini P、Connell SR リボソーム小サブユニット依存GTPase RsgAの構造解析 第19回RNAミーティング、富山、2017年7月
7. **Kurita D**, Abo T, Muto A, Himeno H. ArfA functions as a sensor to recognize the stalled ribosome after RF2 binding. *Ribosome Structure and Function* 2016, Strasbourg, France, Jul. 2016.
8. **栗田大輔**、姫野俵太 tmRNA/SmpBによる翻訳停滞リボソームの認識メカニズムの解明 日本生化学会東北支部第82回例会、弘前、2016年5月

〔その他〕

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/2016/12/15/6871/>

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/staff/daisuke-kurita/>

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、研究者個人に帰属されます。