

平成21年 6月19日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号： 19790088
 研究課題名 (和文) リボソームサブユニット解離機構
 研究課題名 (英文) Mechanism of ribosome splitting
 研究代表者
 廣川 剛 (Hirokawa Go)
 国立循環器病センター研究所・疫学部・室長
 研究者番号 90450890

研究成果の概要：

リボソームは mRNA コドンの解読が行われる小サブユニットとペプチド結合の形成が行われる大サブユニットからなり、遺伝子の翻訳は両サブユニットが mRNA 上で会合することで開始され、翻訳を終えたリボソームは再び各サブユニットへ解離して次の翻訳サイクルへとリサイクルされる。この反応は3因子と GTP の加水分解を必要とする反応であるが、GTP エネルギーの役割及びこの反応の順序について明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000 円	0	1,600,000 円
2008年度	1,500,000 円	450,000 円	1,950,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000 円	450,000 円	3,550,000 円

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

リボソームは、mRNAコドンの解読が行われる小サブユニットと、ペプチド結合の形成が行われる大サブユニットからなり、これらの活性は主にrRNAが担っている。遺伝子の翻訳は、リボソームの両サブユニットがmRNA上で会合することで開始され、翻訳を終えたり

リボソームは、再び各サブユニットへ解離して、次の翻訳サイクルへとリサイクルされる。このように、細胞内ではリボソームが会合・解離を繰り返すことで、細胞の分化・増殖・成長等に必要な十分量の蛋白が合成される。細菌におけるリボソームサブユニットへの解離においては、リボソームリサイクリング因子

(RRF) と伸長因子G (EF-G) という2つの翻訳因子が協調して反応を触媒することが近年示された。これは、これまでシヨ糖濃度勾配法では認められなかった反応が、蛍光ラベルされた両サブユニット間の蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) 反応、放射ラベルを用いたリボソームのサブユニット間交換反応、及びリボソームからサブユニットへの解離に伴う光散乱の減少を利用した方法により証明されたものである。これらの方法により、2つの因子によるリボソーム解離にはGTPが必要であること、そしてこの反応は可逆的であり一過性であることなどが明らかにされた。

一方この反応は、基質リボソーム濃度が低い状態 (約 $0.05 \sim 0.15 \mu\text{M}$) で証明されており、全リボソーム濃度が約 $20 \mu\text{M}$ に達する細胞内ではこの反応が行われていない可能性が提示されている。また、2つの因子の濃度が低い状態では、リボソームの解離は見かけ上認められない。リボソームサブユニット間の結合は、細胞内に近いイオン濃度 (もしくは無細胞翻訳系に最適なイオン濃度) において、その平衡が結合側へ寄っていることなども併せて、この反応が細胞内でも行われているか否か問うことは重要な課題であった。

近年の構造解析から、リボソームサブユニット間の結合の大部分 (結合面の約 80%) が rRNA-rRNA 間の結合であることが明らかとなっている。RRF は、16S rRNA のヘリックス h44 とサブユニット間 rRNA 結合ブリッジ B2a 及び B3 部位を構成している 23S rRNA のヘリックス H69 と H71 に結合する知見が得られており、このことなどから、このブリッジ B2a および B3 が RRF と EF-G の作用により解離されることによって、サブユニットの解離が惹起されリボソームがリサイクルされるモデルが考えられている。

前述の通り、この反応には GTP が必須で

あり、加水分解されない GTP のアナログではリボソームの解離は認められない。この点は、GTP アナログでも反応が認められる EF-G が触媒する別反応、すなわち翻訳伸長過程における転移反応とは異なる。最近、GTP・EF-G 複合体とリボソームとの解離定数において、約 10 倍の差がある 2 つの値が提示されており、このことから EF-G 上における GDP/GTP 変換がリボソーム上で行われるのか否か議論されている。これらの観点からも、解離反応における GTP の役割を調べることは重要である。細胞内におけるリボソーム解離では、フリーのリボソームの解離のみならず、翻訳を終えたリボソーム-mRNA 複合体においても行われていると考えられている。この機序として、リボソーム解離と mRNA 遊離のどちらが先に起こるか、主に 3 つの可能性 (同時に起こる可能性も含む) が提示されていた。

2. 研究の目的

- RRF と EF-G のリボソーム解離反応における GTP の役割を明らかにする。特にこの反応の可逆性・一過性に着目し、GTP 枯渇時における影響について明らかにする。
- リボソームの細胞内濃度は非常に高く、細胞内ではリボソームが RRF・EF-G により解離されない可能性も否定できない。高濃度リボソームの解離反応について解析を行い、細胞内での作用について明らかにする。
- リボソーム-mRNA 複合体において、リボソーム解離と mRNA 遊離の順序を明らかにする。

3. 研究の方法

研究成果内に記載

4. 研究成果

・GTP 枯渇による影響について検討するため、解離反応が認められる最低 GTP 濃度を決定し、この GTP 濃度において RRF/EF-G の 2 因子による解離反応を行った後に IF3 を添加することで、GTP エネルギー枯渇時の影響について検討を行ったところ、一度 2 因子により管理したサブユニットが GTP 枯渇に伴い再結合していくこと、IF3 を加えることでこの再結合が阻害されることが観察された。

・ショ糖濃度勾配を用いた方法ではこの 2 因子における反応でもサブユニットの解離が観察された。

・実際の細胞内サブユニットの濃度は、上記の反応等で用いている濃度より約 20 倍高いことが知られている。反応時の基質サブユニットの濃度を細胞内の濃度まで増加させていくと、3 因子添加時における解離反応が認められなくなる。一方、反応時の GTP 濃度を増加させれば、細胞内基質濃度の条件においてもサブユニットへの解離が観察された。

・複合体からの mRNA 遊離と各サブユニット解離の反応速度は、反応をある一定時間後に阻害剤で止めた後、その中間産物をショ糖濃度勾配により解析することを繰り返すことで測定可能であった。その結果、これら 2 反応の速度に差は認められず、このことから mRNA 遊離と各サブユニット解離の反応は同時に起こっていることが示唆された。

・mRNA 遊離と各サブユニット解離の反応は、IF3 を除く 2 因子のみでも観察され、IF3 はこの系に必須ではないことはこれまですでに明らかとなっていたが、IF3 存在下では

mRNA 遊離の速度が速くなっていた。また、サブユニット解離反応の基質として、mRNA・tRNA との複合体とそれらを含まないものとの比較を行ったところ、mRNA・tRNA の存在下でのサブユニット解離反応の方が早かった。

・ショ糖濃度勾配によりサブユニットそれぞれが出現（解離）する速度を比較したところ、ほぼ同じ速度で検出されてくることが明らかとなり、このことは、上記の mRNA 遊離と各サブユニット解離の反応は同時に起こっていることをサポートする結果であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

Hirokawa G, Iwakura N, Kaji A, Kaji H., The role of GTP in transient splitting of 70S ribosomes by RRF (ribosome recycling factor) and EF-G (elongation factor G)., *Nucleic Acids Res.*, 36, 6676-6687, 2008, 査読有

Jin ZB, Hirokawa G, Gui L, Takahashi R, Osakada F, Hiura Y, Takahashi M, Yasuhara O, Iwai N., Targeted deletion of miR-182, an abundant retinal microRNA. *Mol. Vis.*, 15, 523-533, 2008, 査読有

Demeshkina N, Hirokawa G, Kaji A, Kaji H., Novel activity of eukaryotic translocase, eEF2: dissociation of the 80S ribosome into subunits with ATP but not with GTP., *Nucleic Acids Res.*, 35, 4597-4607, 2007, 査読有

Borovinskaya MA, Pai RD, Zhang W, Schuwirth BS, Holton JM, Hirokawa G, Kaji H, Kaji A, Cate JH., Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling., *Nature Struct Mol Biol.*, 14, 727-732, 2007, 査読有

Nishimura K, Sakuma A, Yamashita T, Hirokawa G, Imataka H, Kashiwagi K, Igarashi K., Minor contribution of an internal ribosome entry site in the 5' -UTR of ornithine decarboxylase mRNA on its translation., *Biochem Biophys Res Commun.*, 364, 124-130, 2007, 査読有

Pai RD, Zhang W, Schuwirth BS, Hirokawa G, Kaji H, Kaji A, Cate JH., Structural Insights into ribosome recycling factor interactions with the 70S ribosome., *J Mol Biol.*, 376, 1334-1347, 2008, 査読有

[学会発表] (計 3件)

第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, Le Gui, 廣川 剛, 岩井直温

Is the expression profile of mRNA correlated with that of miRNA during adipocyte differentiation?, 平成19年12月, パシフィコ横浜

第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, Le Gui, 廣川 剛, 福島康江, 岩井直温, Validation of computer predicted target genes of mammalian microRNA-182, 平成20年12月, 神戸国際会議場

第73回日本循環器学会、Ji X, Takahashi R, Hirokawa G, Hiura Y, Iwai N., Serum microRNAs are promising biomarkers for several cardiovascular diseases, 平成21年3月, 大阪国際会議場

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣川 剛 (Hirokawa Go)

国立循環器病センター研究所・疫学部・室長
研究者番号: 90450890

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者