

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03155

研究課題名(和文) 翻訳サイクルの広範に働くリボソームストーク蛋白質の多彩な分子機能

研究課題名(英文) Versatile molecular functions of the ribosomal stalk protein in translation cycle

研究代表者

内海 利男 (Uchiumi, Toshio)

新潟大学・自然科学系・フェロー

研究者番号：50143764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝情報の翻訳反応は、リボソームに、翻訳因子EF1Aにより次々にアミノ酸がもたらされ効率よく進行するが、その仕組みには不明な点が多く残されている。本研究では、ストークと呼ばれるリボソーム蛋白質が、C末端部位を介してEF1A-GTPと直接結合し、アミノ酸-tRNAのリボソームへの運搬を促進する。他、GTPの加水分解後に構造が変化して生じるEF1A-GDPとも結合し、リボソームからの解離促進寄与すると推測された。そしてこれらの結合は他の因子EF1Bにより調節されることを証明した。また、ストークとストレス応答因子YchFとの結合性を検出し、ストークの翻訳効率と制御における多彩な働きを立証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では一部のリボソーム蛋白質(ストーク)が翻訳因子EF1Aと直接相互作用し、リボソームに効率よくアミノ酸-tRNAを次々に運搬するはたらきを担うこと、また他の因子EF1BがストークとEF1A間相互作用を調節し、不活性型EF1A-GDPから活性型EF1A-GTPに変換することを示し、ストーク/EF1A/EF1Bの連携作用が蛋白質合成の効率化をもたらすことを証明した。また、ストークがストレス応答因子YchFのリボソーム結合にも関与することを立証し、蛋白質合成機構へのストークの多彩なはたらきが示された。蛋白質合成制御の研究ばかりでなく基礎医学や応用生命科学の分野にも広く影響を与える内容である。

研究成果の概要(英文)：Translation of genetic information proceeds on the ribosome with amino acids being brought efficiently to the ribosome by the translation factor EF1A one after another. There are many unclear points about the mechanism for achieving the high efficiency. In this project, we have demonstrated that the ribosomal stalk protein contributes to translation efficiency by binding, via its C-terminal region, to two different conformations of EF1A, that is, the active EF1A-GTP form that carries the aminoacyl-tRNA to the ribosome and the inactive EF1A-GDP form that is dissociated from the ribosome, and that the interaction between the stalk and EF1A is disrupted by another factor EF1B which promote nucleotide exchange from EF1A-GDP to EF1A-GTP. Furthermore, we also detected ability of the stalk to bind to a stress-response factor, YchF. These results represent the versatile functions of the ribosomal stalk in translation efficiency and control.

研究分野：分子生物学

キーワード：リボソーム リボソーム蛋白質 リボソームストーク 翻訳因子 蛋白質合成 EF1A EF1B YchF

1. 研究開始当初の背景

翻訳サイクルは遺伝子発現の最終段階の複雑な動的反応であり、リボソームと多くの翻訳因子の順序だった相互作用を介して進行する。特に GTP の加水分解を介する反応にはリボソーム大亜粒子中に複数コピー存在する“ストック蛋白質”（真核生物の P1/P2、古細菌の aP1、真正細菌の L12）が重要な役割を演じることが古くから示唆されてきたが、その詳細な作用機構は現在もなお明確にされていない。真核生物の P1/P2 と古細菌 aP1 間にはアミノ酸配列において明確な相同性が認められるが、興味深いことに、これらと真正細菌の L12 の配列は完全に異なり、P1/P2/aP1 と L12 は類似の不可欠機能を保有するにも関わらずそれぞれ独自に進化してきたと考えられる。ストック蛋白質はリボソーム上で柔軟で動的な性質を保有し、翻訳の動態や翻訳速度制御に直接関与すると考えられる。翻訳機構の解明および蛋白質合成系の応用研究への展開のためにもストック蛋白質の構造・機能と動態に関する分子レベルの解明は現在までに残された極めて重要な課題である。

研究代表者は、1980 年代より情報量の少ない真核生物・古細菌型ストック蛋白質の研究に着手し、生化学と構造生物学的手法により次のような新知見を世界に先駆けて報告してきた。真核生物のストック蛋白質は $P0(P1-P2)_2$ の 5 量体を、また古細菌では $aP0(aP1)_2(aP1)_2(aP1)_2$ の 7 量体を形成し、リボソーム上に存在する。真核生物の P1/P2/P0、古細菌の aP1/aP0 のそれぞれの C 末端のアミノ酸配列は共通であり、複合体の外側で柔軟に運動する天然変性部位になっている。ストック蛋白質の各 C 末端部位は伸長因子 EF1A (GDP 結合型) と EF2、開始因子 IF5B の各種 GTP 結合性翻訳因子と直接結合し、リボソームの機能部位へのリクルート、そしてそれに伴う GTP の加水分解に寄与する。ストック蛋白質の C 末端部位は GTP 結合性因子ばかりでなく、リボソームのリサイクルに寄与する ATP 結合性因子である ABCE1 とも結合し、ATP の加水分解とそれに伴う翻訳終結後のサブユニットへの解離作用にも寄与する。

以上のこれまでの研究結果より、ストック蛋白質の翻訳反応の各ステップでの多彩な働きが示されてきたが、ストック蛋白質と翻訳因子間相互作用の調節機構や、さらなる新たな機能等に関する疑問も生じ、課題として残された。

2. 研究の目的

動的で効率的な蛋白質合成プロセスへのリボソームストック蛋白質の多彩な分子機能をさらに追求するため、本研究では次の (1) ~ (3) の 3 研究課題に取り組む。

- (1) GTP 結合型 EF1A とストック蛋白質間の結合機構解明: EF1A は GTP 結合型と GDP 結合型で構造が大きく変化することが知られているが、これまでストック蛋白質と GDP 結合型 EF1A の結合様式が解明されているが、GTP 結合型 EF1A とストック蛋白質間の結合様式は解明されていない。本研究では、結晶構造解析によりこれを解明する。
- (2) EF1A のヌクレオチド交換過程における EF1A とストック蛋白質間相互作用の切り替え機構の解明: ストック蛋白質は構造の異なる GTP 結合型と GDP 結合型の両 EF1A との結合性を有するが、円滑な翻訳伸長サイクルの進行には、これら結合の切り替えの仕組みが必要であり、その切り替え機構を解明する。
- (3) 古細菌 YchF とストック蛋白質間の相互作用: 細胞ストレス応答に関与する新規リボソーム結合蛋白質 YchF とストック蛋白質間の結合機構を解明する。

これら (1) ~ (3) の研究より、リボソーム上で翻訳サイクルの効率と制御に関わるストック蛋白質の多彩な機能を明らかにする。

3. 研究の方法

2019~2021 年度の 3 年間で、主に生化学、結晶構造解析の手法を併用し、上述の (1) ~ (3) の研究目的に対し、それぞれ次の手法により、実験に取り組む。

- (1) 古細菌のサンプルを用い EF1A・GTP・aa-tRNA と aP1 ストック蛋白質間の複合体を結晶化し構造を解析する。なお、aP1 サンプルとして、各種翻訳因子との結合部位となる C 末端部位の合成ペプチド (C-ペプチド) を用いる。良質の結晶が得られない場合、tRNA 構造を擬態する蛋白質 Pelota を用いて、EF1A・GTP・Pelota・合成ペプチドの複合体の結晶化し GTP 結合型 EF1A と aP1 間相互作用の仕組みを解明する。また、GTP 結合体と GDP 結合型の両 EF1A と C-ペプチドとの結合親和性を蛍光偏光法により比較する。これらの結果から結合する GTP/GDP に依存して構造が変化する EF1A と aP1 間相互作用の違いを明確にする。

古細菌ストックは $aP0(aP1)_2(aP1)_2(aP1)_2$ の 7 量体としてリボソーム上に存在するが、この 7 コピーのストック C 末端の全てが同時に EF1A 等の因子と結合できるかどうかを、高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) を用いて観察する。

- (2) リボソーム上の GTP 加水分解により生じる EF1A・GDP が EF1A・GTP へのヌクレオチド交換過程に EF1B 因子が寄与することが知られているが、古細菌の研究例は少ないので、先ず標識 GDP/GTP を用いた filter-binding 法により、EF1B のヌクレオチド交換能

を確認する。そして、EF1B と EF1A 間の結合能とその結合による aP1・EF1A 間の結合への影響を native ゲル電気泳動法および複合体の結晶構造解析により探る。

- (3) 古細菌由来の YchF ばかりでなく、酵母の相同蛋白質である Ola1 のリボソーム結合性をショ糖密度勾配遠心法により解析する。さらに、古細菌 YchF と aP1 ストーク間の結合性を native ゲル電気泳動法やプルダウン法により解析する他、この結合への aP1 の C 末端部位の関与を変異実験や合成ペプチドを用いた結晶構造解析で探る。

4. 研究成果

- (1) GTP結合型EF1AとaP1ストーク間相互作用:GTP結合型EF1AとaP1間の結合様式の解明のため、各種古細菌由来のEF1A・GTP・aa-tRNA・C-ペプチドの複合体の結晶化を試みたが、良質の結晶が得られなかった。そこで、tRNA構造を擬態する蛋白質Pelotaを用いて、*Aeropyrum pernix*由来のEF1A・GTP・Pelota・C-ペプチド複合体をサンプルとしたところ、良質の結晶を得ることができた。構造解析の結果、GTP結合型EF1AはGDP結合型と比較し、ドメイン1がドメイン2と3に対し約90°旋回移動しており、それに対しC-ペプチドはコイル状態で、EF1Aのドメイン1と3の間の疎水性に富むスペースに結合することが判明した。そしてC-ペプチドの結合部位はGDP結合型EF1Aの部位とは大きく異なっていた(図1)。蛍光偏光測定により、C-ペプチドとの結合性をGTP結合型EF1AとGDP結合型EF1Aで比較したところ、意外なことに、これら複合体の構造が大きく異なるにも関わらず、aP1のC末端ペプチドとの結合親和性は類似していた。

ストークのC末端が構造の異なるGTP結合型とGDP結合型EF1Aに結合することが判明したが、リボソーム上に7コピー存在するストークC末端の全てに同時に因子が結合できるかどうかを高速原子間力顕微鏡(高速AFM)を用いて観察した。その結果、GTP結合型とGDP結合型共に、濃度に依存して7コピー全てのC末端に結合が可能であることが判明した。

- (2) EF1Aのヌクレオチド交換過程におけるEF1Aとストーク蛋白質間相互作用の切り替え機構の解明:古細菌

(*Pyrococcus horikoshii*)におけるEF1A・GDP→EF1A・GTPのヌクレオチド交換因子EF1Bを大腸菌を用いて発現・精製し、そのヌクレオチド交換活性を標識GDP/GTPを用いて測定した。その結果、調製したEF1BはアミノアシルtRNAの共存下で、有意なヌクレオチド交換活性を示し、翻訳伸長活性と4倍促進した。ヌクレオチド交換にアミノアシルtRNAの必要性を示す明確な知見は古細菌のサンプルを使用した本研究による初めての知見であり興味深い結果である。EF1Bの変異実験より、R90-アルギニン残基をアラニンに置換した変異体がヌクレオチド交換を完全に抑制するが、翻訳伸長活性には大きな効果を示さず、EF1BにはEF1A・GDPのヌクレオチド交換以外に、翻訳伸長に関わる別の機能を有することが示唆された。EF1AとaP1ストーク間相互作用へのEF1Bの関わりを探るため、EF1A・EF1B間複合体の結晶化と構造解析を試みた(図2)。その結果2Åの分解能で構造モデルを提示することができた。得られた構造モデルより、EF1Bの結合によりEF1Aのドメイン1の位置が移動し、EF1A・GDP中のストーク結合部位が完全に崩壊することが判明した(図2)。そしてこの

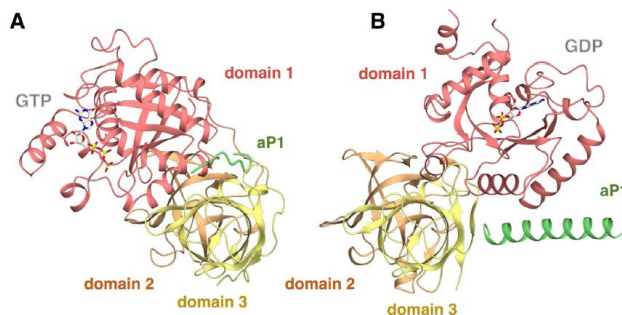


図1 リボソームストーク aP1 のC末端部位と EF1A 間複合体の結晶構造。GTP 結合型 EF1A と aP1 の C 末端ペプチドの複合体 (A: 本研究) および GDP 結合型 EF1A と C 末端ペプチドの複合体 (B: 以前の解析結果) の結晶構造。ストーク C 末端を緑で示す。EF1A のドメイン 1 (赤) の位置がドメイン 2 (茶) とドメイン 3 (黄) に対して約 90° 旋回し aP1 の C 末端との結合様式が大きく変化している。

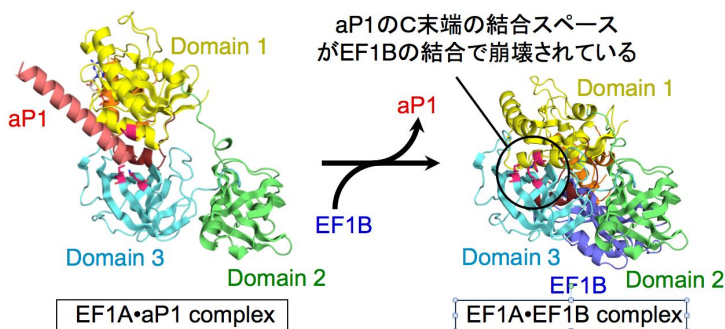


図2 EF1Bの結合に伴うEF1Aの構造変化とaP1ストーク結合部の崩壊。GDP結合型EF1A構造(左:以前の解析)でドメイン1(黄)とドメイン3(薄青)間のスペースにaP1のC末端(赤)が結合するが、EF1B(濃青)結合することでドメイン1と3間が接触し、aP1結合部位が崩壊している(右:本研究)。

翻訳伸長活性と4倍促進した。ヌクレオチド交換にアミノアシルtRNAの必要性を示す明確な知見は古細菌のサンプルを使用した本研究による初めての知見であり興味深い結果である。EF1Bの変異実験より、R90-アルギニン残基をアラニンに置換した変異体がヌクレオチド交換を完全に抑制するが、翻訳伸長活性には大きな効果を示さず、EF1BにはEF1A・GDPのヌクレオチド交換以外に、翻訳伸長に関わる別の機能を有することが示唆された。EF1AとaP1ストーク間相互作用へのEF1Bの関わりを探るため、EF1A・EF1B間複合体の結晶化と構造解析を試みた(図2)。その結果2Åの分解能で構造モデルを提示することができた。得られた構造モデルより、EF1Bの結合によりEF1Aのドメイン1の位置が移動し、EF1A・GDP中のストーク結合部位が完全に崩壊することが判明した(図2)。そしてこの

崩壊は、nativeゲル電気泳動により、EF1A・EF1BにaP1が全く結合しないことより確認することができた。この結果より、リボソーム上のGTP加水分解で生じるEF1・GDPとaP1ストーク間相互作用をEF1Bが一時的に崩壊することでEF1A・GTP形成と翻訳伸長サイクルの効率化に寄与することが示された。

- (3) 古細菌YchFとストーク蛋白質間の相互作用：YchFは真核細胞やバクテリアを用いた研究で、細胞のストレス下における翻訳制御に関与すると考えられているが、古細菌を用いた研究は極少ない。本研究では、主に古細菌 (*Pyrococcus furiosus*) のYchFを対象にリボソームとの結合、ストーク蛋白質との機能相関について解析した。まず、ショ糖密度勾配遠心法により古細菌細胞から粗リボソームを調製し、含まれる蛋白質成分の質量分析により、リボソーム結合蛋白質を解析した。YchFは、Protein Score (蛋白質同定の信頼性を示す数値) は低いもののリボソーム結合性蛋白質として同定された。大腸菌で発現した古細菌YchFのリボソーム上の結合部位をフットプリント法により解析したところ、GTPaseセンターと呼ばれる機能中心がその作用部位として同定された。また、YchFとaP1ストーク蛋白質間の結合性をゲル電気泳動とpull-down法により証明した。また、aP1のC末端の18アミノ酸を削除したaP1 Δ CのYchFとの結合性は消失しaP1のC末端部位の結合への関与が示された。さらに、YchFのリボソームに依存するGTPase活性を検出し、この活性へのaP1ストークのC末端部位の関与をC末端の18残基よるなるC-ペプチドを使用した競合実験により明らかにした。また、酵母のYchF相同体 (Ola1) がリボソームへの結合性を保有することをショ糖密度勾配遠心法により示した。

これらの(3)の研究より、YchFは他のGTPase翻訳因子同様、aP1ストーク蛋白質のC末端を介して結合し、リボソームのGTPaseセンターにリクルートし、GTPの加水分解に寄与することが明らかになった。興味深いことに、このGTPase活性はtRNA添加により促進され、tRNAの関わりについては今後の興味深い課題として残された。

以上の(1)～(3)の結果より、リボソーム上でのEF1A・GTP→EF1A・GDPの加水分解に伴いEF1Aに大きな構造変化が生じるが、ストーク蛋白質のC末端部位はそれぞれの構造に応じた構造変化が生じ、異なる様式でEF1Aと結合すること、そしてリボソームGTPaseセンターから遊離したEF1A・GDPは、EF1BによりEF1A・GDP→EF1A・GTPのヌクレオチド交換が生じるが、その際はストーク蛋白質との相互作用が一時的に崩壊し、これを機に相互作用様式が変換することが判明した。また、細胞ストレス応答に関与する新規リボソーム結合蛋白質もストーク蛋白質に依存してリボソームにリクルートされることが示され、リボソーム上で翻訳サイクルの効率と制御に関わるストーク蛋白質の多彩な機能が立証された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Suzuki, T., Ito, K., Miyoshi, T., Murakami, R., Uchiumi, T.	4. 巻 433
2. 論文標題 Structural insights into the switching off of the interaction between the archaeal ribosomal stalk and aEF1A by nucleotide exchange factor aEF1B.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 167046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2021.167046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Imai, H., Uchiumi, T., Kodera, N.	4. 巻 117
2. 論文標題 Direct visualization of translational GTPase factor pool formed around the archaeal ribosomal P-stalk by high-speed AFM.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. U S A	6. 最初と最後の頁 32386-32394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2018975117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Maruyama, K., Imai, H., Kawamura, M., Ishino, S., Ishino, Y., Ito, K., Uchiumi, T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Switch of the interactions between the ribosomal stalk and EF1A in the GTP- and GDP-bound conformations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51266-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 L. Yang, K.-M. Lee, C. W.-H. Yu, H. Imai, K. Ito, T. Uchiumi, K.-B. Wong et al.	4. 巻 50
2. 論文標題 The flexible N-terminal motif of uL11 unique to eukaryotic ribosomes interacts with P-complex and facilitates protein translation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 5335-5348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yaeshima, C., Murata, N., Ishino, S., Sagawa, I., Ito, K., Uchiumi, T.	4. 巻 593
2. 論文標題 A novel ribosome-dimerization protein found in the hyperthermophilic archaeon <i>Pyrococcus furiosus</i> using ribosome-associated proteomics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 116-121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今井 大達、内海 利男、古寺 哲幸
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡による古細菌リボソームストーク複合体上に形成されたGTPase翻訳因子プールの可視化
3. 学会等名 第43回日本分子生物学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井 大達、内海 利男、古寺 哲幸
2. 発表標題 Visualization of translational GTPase factor-pool formed around the archaeal ribosomal P-stalk by HS-AFM
3. 学会等名 日本生物物理学会第58回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊東孝祐、丸山圭、今井大達、内海利男
2. 発表標題 リボソームストークタンパク質の構造・機能研究
3. 学会等名 第93回日本細菌学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊東孝祐、丸山圭、今井大達、内海利男
2. 発表標題 リボソーム・翻訳因子間の結合と解離に寄与するストーク蛋白質の構造可変性
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木隆寛、伊東孝祐、三好智博、村上僚、内海利男
2. 発表標題 リボソームストークタンパク質とEF1Aの相互作用はEF1Bにより解消される
3. 学会等名 第16回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井 大達, 内海 利男, 古寺 哲幸
2. 発表標題 Direct visualization of translational GTPase factor pool formed around the archaeal ribosomal P-stalk by high-speed AFM
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Uchiumi-Ito Lab. https://www.sc.niigata-u.ac.jp/biologyindex/uchiumi-ito/</p>
--

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
研究分担者	伊東 孝祐 (Ito Kosuke) (20502397)	新潟大学・自然科学系・准教授 (13101)	
研究分担者	西川 周一 (Nishikawa Shuh-ich) (10252222)	新潟大学・自然科学系・教授 (13101)	
研究分担者	石野 園子 (Ishino Sonoko) (80399740)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	

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			
中国	The chinese University of Hong Kong			