

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2008 ～ 2010
課題番号：	20570167
研究課題名(和文)	大腸菌 100S リボソームの構造と形成および解消機構の解明
研究課題名(英文)	Elucidation of E.coli 100S ribosome structure and formation mechanisms
研究代表者	
	吉田 秀司 (Yoshida Hideji)
	大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：	60288735

## 研究成果の概要(和文)：

大腸菌 100S リボソームの形成機構を明らかにするために、極低温電子顕微鏡を用いて 100S リボソームを観察した。その結果、100S リボソームは tRNA を含まない 2 つの 70S リボソームが 30S サブユニットを介して結合しており、この結合にリボソーム蛋白質 S2, S3, S5 が関与していることを明らかにした。これら蛋白質は mRNA のリボソーム結合に関与しており、これら蛋白質周辺の構造変化によって 100S リボソームに mRNA が結合することを阻害しているのかも知れない。

## 研究成果の概要(英文)：

In order to elucidate the mechanisms of E. coli 100S ribosome formation, the structure of the 100S ribosome was observed by electron cryomicroscopy. The results revealed that the 100S ribosome is formed by two tRNA-free 70S ribosomes through the interactions between their 30S subunits and that the S2, S3 and S5 proteins are likely to be directly involved in the interactions. The functions of these proteins are related to the binding of mRNA to the ribosome. The undesirable binding of mRNA to the 100S ribosomes may be inhibited by the conformational changes around the S2-S5 region.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

## 研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：リボソーム、大腸菌、ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

近年、リボソームの構造が低温電子顕微鏡や X 線結晶構造解析で明らかにされ、蛋白質合成の中心反応であるペプチジル転移反応を大サブユニット中のリボソーム RNA が担っていることが示された。その反応の詳

細は未だ議論中であるが、リボソームがリボザイム(Ribozyme)であり、蛋白質合成の触媒反応を RNA が行っていることは確定的となっている。このリボソームの蛋白質合成能力を調節しているのは主として蛋白質因子である。細胞が様々なストレスに曝されて蛋

白質の合成を抑制しなければならないとき、細胞内ではストレスの情報を発信源とした蛋白質発現ネットワークが稼働し、リボソームや翻訳因子の生合成、そしてリボソームの蛋白質合成活性までもがダイナミックな制御を受ける。しかし、これらの制御の全貌は大腸菌においてすら未だ十分には明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

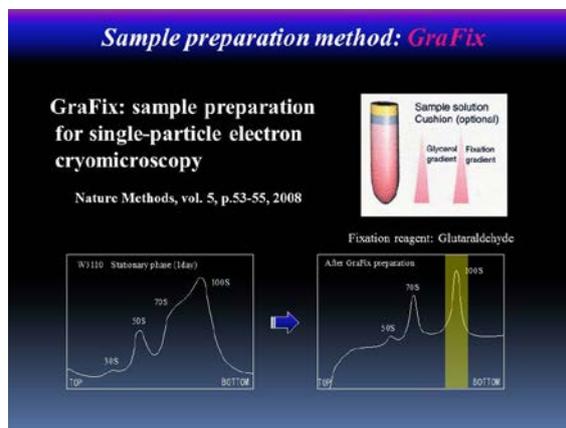
大腸菌では増殖段階が定常期に入ると70Sリボソームを二量体化し、蛋白質合成活性を持たない100Sリボソームを形成する。我々はこの100Sリボソームを形成する段階を「Hibernation stage(休眠段階)」と名付け、蛋白質の合成サイクルに組み込んだ。この100Sリボソームを形成する蛋白質としてRMF (Ribosome Modulation Factor) という蛋白質が同定されており、このRMFの機能を促進するものとしてHPF (Hibernation Promoting Protein)が確認されているが、これらの蛋白質のリボソーム上の結合位置や大きさから考えて、これらが2つの70Sリボソームを架橋して二量体化しているとは考えられない。従って、これら蛋白質がリボソームに結合することによって構造変化が引き起こされ、二量体化がなされていると推測される。また、大腸菌が飢餓状態から脱して栄養状態が良くなると100Sリボソームは即座に解消し、蛋白質合成活性のある70Sリボソームへと変化するが、この変化を引き起こす因子についても未知である。そこで、本課題では100Sリボソームの構造と、形成および解消の機構を明らかにし、ストレスに応答した蛋白質合成活性の制御機構を解明することを目的としている。また、100Sリボソーム形成・解明には既知のもの以外の蛋白質が関与している可能性があり、新規リボソーム結合蛋白質の探索も行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 100Sリボソームの極低温(Cryo)電子顕微鏡による構造解析

これまでにネガティブ染色による電子顕微鏡観察を行い、100Sリボソームの結合形態の概略を明らかにした。また100Sリボソーム形成のkey proteinであるRMFの結合位置も明らかにした。これらの結果より、100Sリボソームの形成に伴って大きな構造変化がリボソームに引き起こされていることが予想される。そこで、この構造変化を明らかにするために、より分解能の高い極低温(Cryo)電子顕微鏡を用いて100Sリボソームを観測した。この作業は電子顕微鏡観察用のサン

プル調製によって100Sリボソームが解離してしまうことが明らかとなり当初難航したが、架橋剤を用いて構造を安定化する手法(GraFix、下図参照)を適用することにより、観察が可能となった。



GraFix 法: 架橋剤入りの蔗糖密度勾配溶液中で遠心し、100S リボソーム画分を分離する。

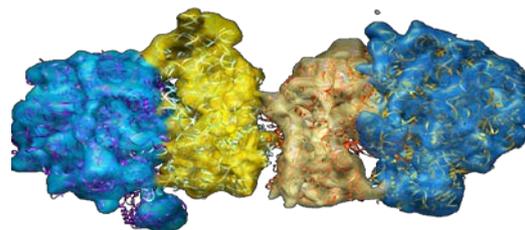
### (2) 新規リボソーム結合蛋白質の探索

これまでに発見した蛋白質以外にも定常期特異的にリボソームに結合している蛋白質が存在する可能性があり、これを探索した。この探索には塩基性蛋白質の分離に優れているRFHR (Radical-free and highly reducing) 二次元電気泳動法を用いた。

## 4. 研究成果

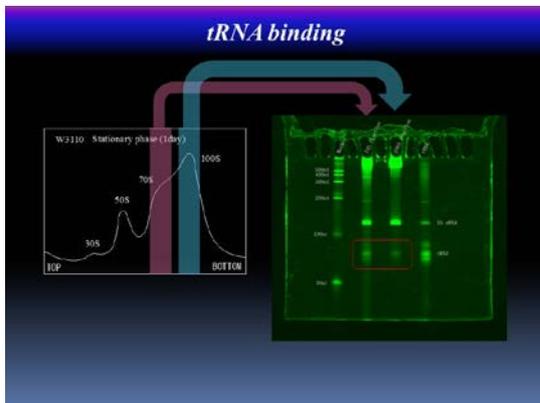
### (1) 100Sリボソームの極低温(Cryo)電子顕微鏡による構造解析

① GraFix と呼ばれる固定化法を用いて極低温電子顕微鏡で100Sリボソーム粒子観測し、約5,000枚の画像から構造の再構成を行った。その結果、100Sリボソームは二つの70Sリボソームを2回回転対称させて結合した形で構成されていることが明らかとなった(下図参照)。



100Sリボソームの全体構造: 2つの70Sリボソームが30Sサブユニット同士で結合している。

② リボソームにはA-site, P-site, E-site という3つの tRNA 結合部位が知られているが、100S リボソームではその位置に tRNA は観測されなかった。そこで、このことを確認するために70S リボソーム画分と100S リボソーム画分の RNA を電気泳動法で調べた(下図参照)。その結果、100S リボソームには tRNA が結合していないことが明らかとなった。

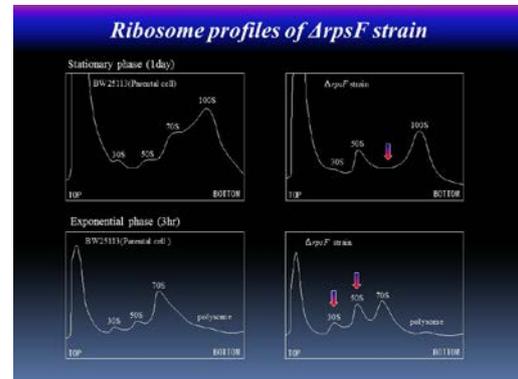


tRNA の結合 : 70S リボソームと 100S リボソームを分画し、そこから RNA を抽出して泳動した。

③ 2つの70S リボソームを繋いでいる部位について調べた。100S リボソームは30S サブユニット同士で結合しており、その位置から結合に関与すると推測される複数の蛋白質を候補として得た。そして、もし候補の蛋白質が100S リボソーム形成に関与しているなら、その蛋白質遺伝子を欠損した大腸菌株は100S リボソーム形成能を失っていると考え、大腸菌遺伝子欠損株ライブラリー (KO コレクション) のリボソーム蛋白質 S6 の遺伝子 (rpsF) 欠損株について調べた。その結果、S6 蛋白質を欠損したリボソームは70S リボソームを形成しにくい、100S リボソームは問題なく形成されるという興味深い結果が得られた(下図参照)。

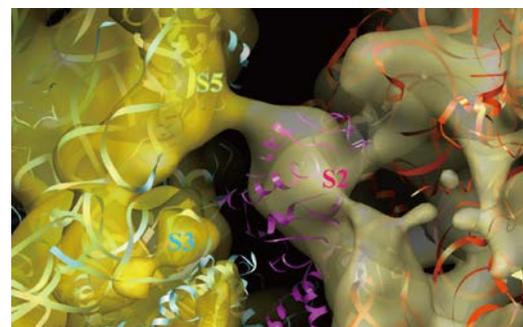
S6 蛋白質の欠損がリボソームに与える影響を調べるために、親株と欠損株のリボソーム蛋白質を RFHR 二次元電気泳動で調べると、S6 蛋白質だけではなく、S11, S18, S21 の蛋白質も減少していた。この現象は各々蛋白質のリボソーム上の位置や、リボソーム生合成において組み込まれる順序から説明することができるが、特にS18蛋白質の減少が重要である。S18蛋白質は30S サブユニットと50S サブユニットが会合する際の重要なブリッジに位置している。従って、S18蛋白質が減少したことによって70S リボソームが減少したことは合理的である。しかし、にも関わらず、70

S リボソームの二量体である100S リボソームは形成された。この事実は、100S リボソーム中の70S のブリッジ状態が、通常の70S リボソーム中のブリッジ状態と異なっていることを示唆しており、70S リボソームから100S リボソームへの変換における構造変化を考える上で非常に重要な知見である。



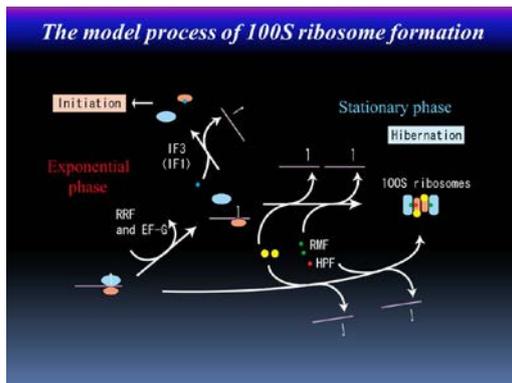
S6 蛋白質欠損株の Ribosome profile: 70S リボソームは形成されにくい、100S リボソームは形成されている。

④ 詳細な構造解析の結果、2つの70S リボソームが結合している部位はS6 蛋白質ではなく、S3 と S5 蛋白質の間の窪みに相手方のリボソームのS2 蛋白質が入り込む形で結合していることが明らかとなった(下図参照)。この部位は70S リボソームが蛋白質を合成する際、リボソームへの mRNA の入り口であり、100S リボソームではこの入り口が閉じられていることになる。このことは100S リボソームが蛋白質合成活性を持っていないことと、細胞中に大量に存在する100S リボソームに mRNA が無作為的に結合することが好ましくないことから考えると合目的であると言える。



結合部位の詳細構造 : S3 と S5 が作り出す窪みの間に S2 が入り込んでいる。100S リボソーム中の30S サブユニット同士が結合する箇所では、このような Bridge が2カ所存在する。

⑤ 極低温電子顕微鏡観察により得られた70Sリボソームの構造と100Sリボソームの構造を比較すると、100Sリボソーム中の30Sサブユニットに、70Sリボソーム状態には存在しない密度領域が観測された。2009年に発表した論文ではRMFやHPFの結合以前に70Sリボソームが変化している可能性を指摘したが、この未知の密度領域のものがその原因かも知れない。この考えを元に下図のような100Sリボソームの形成過程のモデルを構築した。



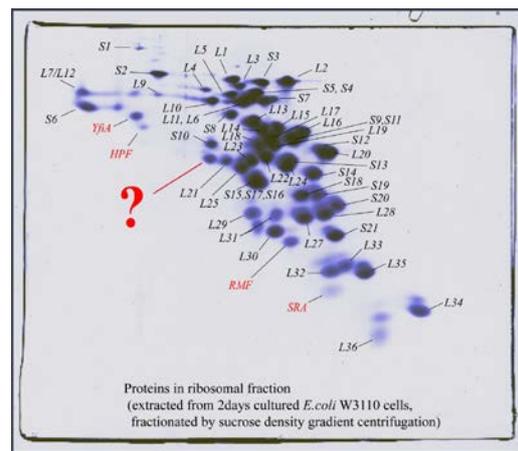
100Sリボソーム形成モデル: 翻訳終了後のリボソームからtRNAが外れて、未知の変化後に蛋白質因子が結合する。

## (2) 新規リボソーム結合蛋白質の探索

バクテリアが飢餓状態に陥ると様々な蛋白質が発現していることを明らかにした。そしてリボソームでは100Sリボソームの形成という劇的な変化があるが、これ以外にもこれら定常期特異的蛋白質がリボソームに結合している可能性があると考え、これを調べた。リボソームに結合する蛋白質は塩基性のものが多く、通常の二次元電気泳動法では解析できない。そこで塩基性蛋白質の分離に適したRFHR二次元電気泳動法を用いて解析した。その結果、下図の電気泳動画面の?マークで示す位置に、リボソーム蛋白質以外の新しい蛋白質を発見した。

この蛋白質は定常期になると発現し、培養開始から2日後にピークを示し、その後減少する。蔗糖密度勾配遠心を行ってリボソームへの結合を確認して定量を行ったが、5個のリボソーム当たり1個のリボソームにしか結合していなかった。これは細胞全体での発現量の一部であった。この蛋白質を同定するとYqjDという機能未知の蛋白質であり、配列から二次元構造予想を行うとC末端にTrans-membrane motifが確認された。そこで、超遠心を駆使して膜画分を取って解析すると、そこにYqjDが存在した。従って、YqjDはリボソーム結合蛋白質であり、膜蛋

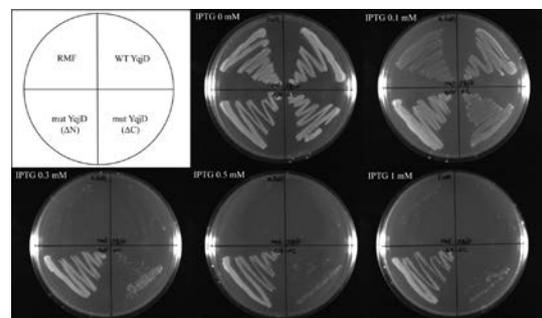
白質であると結論付けられた。



RFHR二次元電気泳動ゲル画面: リボソーム画分から抽出した蛋白質を泳動した結果、赤文字で示している蛋白質がリボソーム蛋白質以外で検出された。

次に、このYqjDの機能について調べるために、この遺伝子を欠損した大腸菌株を作成し、その特性を調べた。しかし、成長曲線や細胞形状、100Sリボソームの形成などに変化は見られなかった。そこで、全長配列をもつYqjD、核貫通モチーフを含むC末端領域を欠損したYqjD、リボソーム結合に関与すると予想されるN末端配列を欠損したYqjDをIPTG誘導で過剰発現する大腸菌株を作成し、これをIPTG入りの寒天培地で培養してみた。その結果、下の写真が示すように、全長のYqjDやC末端領域を欠損したYqjDを発現すると生育阻害を示した。

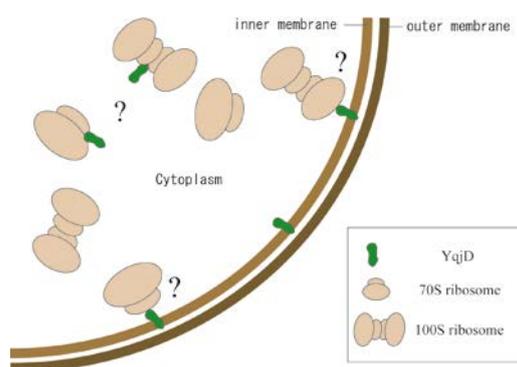
一方、N末端を欠損すると生育阻害効果を失った。従って、YqjDがリボソームに結合すると生育阻害が引き起こされていることになり、これはYqjDが蛋白質合成活性を阻害することを示唆している。



YqjDによる生育阻害: Full-YqjD、 $\Delta$ C-YqjDでは生育阻害が観測されるが、N末ドメインを欠損すると阻害されない。

以上の実験から下図のようなYqjDの存在様式のモデルを構築した。YqjDは100Sリボソームが存在する定常期で発現し、70Sや100Sリボソームに結合し、膜にアンカーしているものと考えられる。このYqjDの遺伝子を欠損しても、今のところ変化は確認されていないが、アミノ酸配列から相同性検索を行うとパラログが2つ検出されることから、YqjD欠損株ではこれらパラログが相補的に発現している可能性がある。

現在、さらなる機能解析を実施中であり、同時に論文発表の準備も進めている。



YqjDの存在様式：YqjDは定常期に発現して70Sにも100Sにも結合し、リボソームを膜にアンカーすると考えられる。

## 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3件)

- ① Takayuki Kato, Hideji Yoshida, Tomoko Miyata, Yasushi Maki, Akira Wada, and Keiichi Namba, Structure of the 100S ribosome in the Hibernation stage revealed by electron cryomicroscopy, *Structure*, 査読有, vol.18, 2010, pp. 719-724.
- ② Akiko Sato, Takumi Watanabe, Yasushi Maki, Masami Ueta, Hideji Yoshida, Yutaka Ito, Akira Wada, Masaki Mishima, Solution structure of the E. coli ribosome hibernation promoting factor HPF: Implications for the relationship between structure and function, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, vol.389, 2009, pp. 580-585.
- ③ Hideji Yoshida, Masami Ueta, Yasushi Maki, Akiko Sakai, and Akira Wada, Activities of E. coli ribosomes in IF3

and RMF change to prepare 100S ribosome formation on entering the stationary growth phase, *Genes to Cells*, 査読有, vol.14, 2009, pp. 271-280.

[学会発表] (計9件)

- ① Hideji Yoshida, Takayuki Kato, Yasushi Maki, Sho Furuike, Masami Ueta, Akira Wada, and Keiichi Namba, Structure of the 100S ribosome demonstrated by electron cryomicroscopy, *Ribosome* 2010, 2010年5月4日, オルビエート (イタリア)
- ② 吉田秀司、加藤貴之、牧泰史、古池晶、上田雅美、境晶子、和田明、難波啓一、GraFix法により安定化した100SリボソームのcryoEMによる構造解析、第11回RNAミーティング、2009年7月28日、新潟市朱鷺メッセ
- ③ Hideji Yoshida, Yasushi Maki, Masami Ueta, Akiko Sakai, and Akira Wada, E. coli YqjD expresses during the stationary phase and binds to ribosomes, RNA2008 Thirteenth annual meeting of the RNA society, 2008年8月1日, ベルリン (ドイツ)

[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]

ホームページ等

<http://www.osaka-med.ac.jp/~yhide/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 秀司 (Yoshida Hideji)  
大阪医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60288735

### (2) 研究分担者

牧 泰史 (Maki Yasushi)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60401733

境 晶子 (Sakai Akiko)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30225750