

令和 7 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K19201

研究課題名（和文）試行錯誤を伴わないRNA-蛋白質複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析手法の開発

研究課題名（英文）Development of a method to determine RNA-protein complex by cryo-EM

研究代表者

田中 良和（Tanaka, Yoshikazu）

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：20374225

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：RNAはパートナー蛋白質と複合体を形成して機能することが多い。そのため、RNA-蛋白質複合体の構造を明らかにすることは重要である。本研究では、RNA配列をリボソーム表面に提示し、ここに結合するタンパク質を結合させることにより、「RNA-蛋白質複合体」をリボソーム表面に形成させ、これを丸ごと構造解析することをめざした。

リボソームのループにtRNAを挿入し、このtRNAを修飾する蛋白質を結合させて構造解析下とこ、tRNAとこの蛋白質の複合体のマップを得ることができた。剛体フィッティングにより、「tRNA-蛋白質複合体」の構造を得ることができ、proof of conceptを達成できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAは生命のセントラルドグマの中心となる分子で、その機能を知ることは生命科学においてとても重要である。多くの場合RNAは蛋白質と複合体を形成して機能するため、RNAの機能を理解するためにはRNA-蛋白質複合体の構造を明らかにすることが意義深い。一方、リボソームはRNAでできた巨大な分子であり、その構造決定は多くのノウハウが蓄積されている。本研究では、リボソームの表面に構造解析したいRNA-蛋白質複合体を結合させ、リボソームごと構造決定する技術のproof of conceptを実現した。本研究により、RNAに関する研究が加速されると期待できる。

研究成果の概要（英文）：RNA often functions by forming complexes with partner proteins. Therefore, it is important to clarify the structure of RNA-protein complexes. In this study, we aimed to form an “RNA-protein complex” on the surface of ribosomes by inserting RNA sequences on the surface of ribosomes and binding proteins that bind to them, and to analyze the structure of the entire complex.

By inserting tRNA into the loop of the ribosome and binding a protein that modifies the tRNA, a map of the complex of tRNA and this protein was observed by cryoEM single particle analysis. The structure of the “tRNA-protein complex” was obtained by rigid body fitting.

研究分野：構造生物学

キーワード：RNA 構造 クライオ電顕

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RNA はタンパク質合成をはじめ、多岐にわたる重要な役割を担う生体高分子化合物である。RNA が機能する際、RNA 自体で生体反応を実現することは稀で、多くの場合、パートナー蛋白質と複合体を形成することにより複雑な生体反応を実現している。そのため、RNA の機能を理解するには RNA と蛋白質の複合体の構造を原子レベルで明らかにすることが重要となる。研究開始当初は、RNA と蛋白質間の相互作用の理解には主に X 線結晶構造解析法が用いられていたが、RNA-蛋白質複合体の結晶化は難しく、多くの研究対象分子の立体構造が決定できていなかった。

一方、研究開発当初は、生体高分子の立体構造解析技術が、X 線結晶構造解析からクライオ電顕単粒子解析に移行し始めている時期であった。クライオ電顕解析には、結晶化の必要がなく、微量の試料でも解析できる上、画像解析技術により反応の素過程を活写できるという長所があり、X 線結晶構造解析では解析ができなかった生体分子の構造解析を、多くの研究者がクライオ電顕単粒子解析の技術を用いて取り組んでいたが、一般的な RNA-蛋白質複合体のように 200kDa 以下の小さな分子は顕微鏡写真の背景ノイズに埋もれやすく、高分解能の構造決定が難しいという課題があった。

2. 研究の目的

本研究では、リボソームという巨大 RNA-タンパク質複合体を構造解析手法を補助するスキヤフォールド分子として利用し、構造解析したい RNA-タンパク質複合体をリボソーム表面に形成させ、Cryo-EM 単粒子解析によりまるごと構造決定することにより、任意の RNA-タンパク質複合体の立体構造を試行錯誤することなく決定する新技術を構築することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、複合体を形成することがわかっている 2 種類の tRNA-タンパク質複合体を用いて proof of concept を行なった。遺伝子工学的手法により tRNA をリボソームのループ領域に挿入したリボソーム (Et リボソーム) を大腸菌により発現させ、スクロース密度勾配遠心分離により精製した。結合タンパク質は大腸菌により可溶性分子として大量発現させ、Ni アフィニティクロマトグラフィーとゲルろかにより精製した。Et リボソームと精製タンパク質を混合することにより、Et リボソーム表面に tRNA-タンパク質複合体を形成させた。この試料を用いて、クライオ電顕観察用の凍結グリッドを作製した。凍結グリッドは、Vitrobot Mark を用いて作製した。グリッドには、アモルファスカーボンを貼った Quantifoil R1.2/1.3 を親水化処理したものをを用いた。クライオ電顕データは Tecnai Arctica もしくは CRYOARM300II を用いて収集した。構造解析には cryoSPARC および Relion を用いた。

4. 研究成果

1 つ目のタンパク質 (タンパク質 1 とよぶ) については、5 箇所のループに RNA を挿入させた Et リボソームを作製した。これらの Et リボソームのうち 3 つ (L1、L2、L3) を用いて RNA-タンパク質複合体を作製し、ムービーを取得した。L1、L2、L3 でそれぞれ 247 movies、257 movies、1,075 movies のデータを収集した。画像解析はプログラム relion3.1 を用いて行った。2D classification により粒子を選別し、3D refinement により全体構造を大まかに収束させたコンセンサスマップを得た後、3D Classification により詳細に解析した。一連の解析の結果、L1、L2、L3 HtRibosome の Cryo-EM マップをそれぞれ 4.2 Å、4.28 Å、3.61 Å の分解能で得ることに成功した。得られたマップでは、Et リボソームの表面に、通常のリボソームではみられない大きな突起が確認され、リボソーム状に RNA が提示されていることは確認できた。しかし、このマップは不明瞭であった。局所分解能を計算したところ、リボソームのコア領域が 3-4 の好分解能だったのに対し、挿入した RNA の部分は局所分解能が 10-12 程度と低かった。RNA の挿入部位はリボソームの表面であるため、フレキシビリティが高いことが予想された。そこで、この部分に焦点を当てた解析 (Focused classification、Focused refinement) を行なった。マスクには挿入 RNA を中心に半径 60 Å の球形マスクを用いた。マスク外の領域を減算した後、アライメントを伴わない 3D classification を行った。Regularization Parameter T を変えながら条件検討したが、いずれのクラスにおいても、結合したタンパク質 1 の明瞭なマップを確認することはできなかった。一方で、挿入した RNA の柔軟性についての知見は得られた。L1 では T=30 で行った 3D classification で得られた最もメジャーなクラスには 72.2% の粒子が含まれていたのに対し、L2 では T=30 で行った 3D classification によって得られた最もメジャーなクラスには 18.9% しか粒子が含まれていなかった。L3 でも同様に、T=30 で 3D classification を行ったが、最もメジャーなクラスには 17% の粒子しか含まれていなかった。これらの結果は、その粒子群の中に多形が存在するということを意味する。L2 の focused classification (T=30) で得られた複数のマップを重ねたところ、RNA の根元の部分に対して先端の部分が大きく動いている様子が観察された。また、L3 の focused classification (T=30) で分けられた 2 つのクラスに含まれる粒子を精密化したところ、挿入された RNA の向きが大きく異なっており、RNA が大きく動

いていることが明らかになった。以上の結果から、L2 や L3 に挿入された tRNA の運動性は特に大きく、RNA-タンパク質 1 の複合体を形成させる部位として利用するには適していないと思われる。これに対して、L1 に挿入された RNA は比較的均一なコンフォメーションを保っており、今回作製した 3 種類の HtRibosome の中では最もスキャフォールド分子として有望であることがわかった。

2 つ目のタンパク質 (タンパク質 2 とよぶ) については、タンパク質 2 が結合することが知られている大腸菌由来の 3 種類の tRNA (それぞれ tRNA1、tRNA2、tRNA3 とよぶ) を L1 部位に挿入した Et リボソームを作製して実験に用いた。このうちの一つ tRNA1 を用いて、Et リボソーム-タンパク質 2 複合体を作製し、2,525 movies のデータを取得した。画像解析では、顕微鏡画像から拾い出したリボソーム粒子を 2D classification に供し、70S リボソームではない 2D class average に含まれる粒子を除いた後、一度 3D refinement で全体構造を大まかに収束させたコンセンサスマップを得た後、3D classification を行った。最もメジャーなクラスに含まれる粒子のみを用いて再度 3D refinement を行い、更に、CTF refinement、Bayesian polishing による高次の粒子補正を行い、さらに 3D refinement により最終的なマップを取得した。マップ中の挿入された tRNA を観察すると、タンパク質 1 の場合と異なり、tRNA 先端にまとまった密度が観察された。既知のタンパク質 2、tRNA の立体構造を剛体フィッティングさせたところ、得られたマップと良好に一致しており、挿入 tRNA のアンチコドンステムの先端に見られるマップがタンパク質 2 に由来するものであることがわかった。タンパク質 2 は分子量 35kDa 程度の小さなタンパク質であるが、この結果より、小さな RNA 結合タンパク質を、人工的に結合部位を導入したリボソーム変異体に結合させ、丸ごと Cryo-EM 単粒子解析により可視化するという本研究の proof of concept を達成できたと言える。

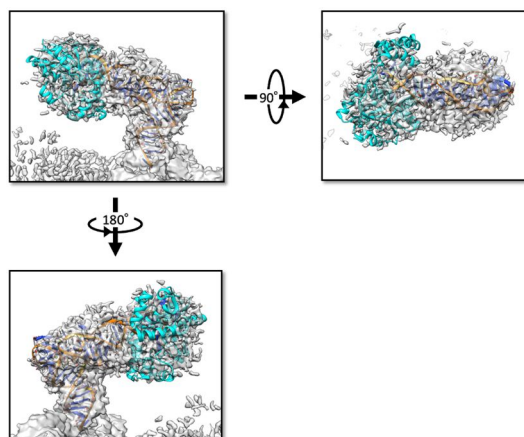


図 1 観察されたマップに剛体フィッティングした tRNA-タンパク質 2 複合体の構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tomono Junta, Asano Kosuke, Chiashi Takuma, Suzuki Masato, Igarashi Masayuki, Takahashi Yoshiaki, Tanaka Yoshikazu, Yokoyama Takeshi	4. 巻 175
2. 論文標題 Direct visualization of ribosomes in the cell-free system revealed the functional evolution of aminoglycoside	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 587 ~ 598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvae002	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 -

1. 著者名 Watari H, Kageyama H, Masubuchi N, Nakajima H, Onodera K, Focia PJ, Oshiro T, Matsui T, Kodera Y, Ogawa T, Yokoyama T, Hirayama M, Hori K, Freymann DM, Komatsu N, Araki M, Tanaka Y, Sakai R.	4. 巻 13
2. 論文標題 A marine sponge-derived lectin reveals hidden pathway for thrombopoietin receptor activation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34921-2	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 Ishizaka M, Chen M, Narai S, Tanaka Y, Ose T, Horitani M, Yao M.	4. 巻 24 (1)
2. 論文標題 Quick and Spontaneous Transformation between [3Fe-4S] and [4Fe-4S] Iron-Sulfur Clusters in the tRNA-Thiolation Enzyme TtuA.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24010833	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 Tsugita A., Uehara S., Matsui T., Yokoyama T., Ostash I., Deneka M., Yalamanchili S., Bennett C. S., Tanaka Y., and Ostash B.	4. 巻 289
2. 論文標題 The carbohydrate tail of landomycin A is responsible for its interaction with the repressor protein LanK	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS J.	6. 最初と最後の頁 6038-6057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16460	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 Ghanem Nouran, Kanagami Natsuki, Matsui Takashi, Takeda Kein, Kaneko Jun, Shiraishi Yasuyuki, Choe Christian A., Uchikubo Kamo Tomomi, Shirouzu Mikako, Hashimoto Tsubasa, Ogawa Tomohisa, Matsuura Tomoaki, Huang Po Ssu, Yokoyama Takeshi, Tanaka Yoshikazu	4. 巻 in press
2. 論文標題 Chimeric mutants of staphylococcal hemolysin, which act as both one component and two component hemolysin, created by grafting the stem domain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16354	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 該当する

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 ストップコドンリードスルーの分子機構解明
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 タンパク質立体構造解析と質量分析の融合研究
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 ヘモリシンの立体構造解析と構造情報を生かしたデザイン
3. 学会等名 分子ロボティクス研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 tRNA thiolation by TtuA-TtuB using [4Fe-4S] cluster
3. 学会等名 the 12th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千足啄馬、高田希美、橋本翼、深野華子、山本健太郎、鈴木仁人、星野仁彦、横山武司、田中良和
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡単粒子解析を用いた、非結核性抗酸菌の薬剤耐性因子によるリボソーム解離機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅野航佑、伴野詢太、鈴木仁人、横山武司、田中良和
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡単粒子解析による、リボソームを標的とするアミノ配糖体抗菌薬の微細構造差が生み出す阻害活性増強機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Tsugita, Shiro Uehara, Takashi Matsui, Takeshi Yokoyama, Iryna Ostash, Maksym Deneka, Subbarao Yalamanchili, Clay S. Bennett, Bohdan Ostash, and YoshikazuTanaka
2. 発表標題 Crystal structure analysis of LanK complexed with landomycinA, a potent antitumor antibiotic
3. 学会等名 e-Asia Joint Symposium on "Marine Biodiversity as a Source of New Chemotypes (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千足啄馬、横山武司、田中良和
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡単粒子解析法によるウサギ赤血球ライセートに内在する80Sリボソーム構造解析の検討
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伴野詢太、浅野航佑、鈴木仁人、横山武司、田中良和
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡単粒子解析によるリボソームを標的としたアミノ配糖体抗菌薬の新規作用機序の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本翼、高田希美、千足啄馬、深野華子、山本健太郎、鈴木仁人、星野仁彦、横山武司、田中良和
2. 発表標題 薬剤耐性獲得機構の解明に向けた、クライオ電子顕微鏡単粒子解析による非結核性抗酸菌Mycobacterium abscessusリボソームへのマクロライド結合様式の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuma Chiashi, Takeshi Yokoyama, Yoshikazu Tanaka
2. 発表標題 Cryo-EM visualizes ribosomes in mammalian cell free translation system
3. 学会等名 日本・ウクライナ・タイ二国間交流事業合同シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsubasa Hashimoto, Nozomi Takada, Takuma Chiashi, Hanako Fukano, Kentaro Yamamoto, Masato Suzuki, Yoshihiko Hoshino, Takeshi Yokoyama, Yoshikazu Tanaka
2. 発表標題 Elucidation of the binding mode of a macrolide antibiotic to NTM ribosome for understanding drug resistance mechanism by using cryo-EM
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junta Tomono, Kosuke Asano, Masato Suzuki, Takeshi Yokoyama, Yoshikazu Tanaka
2. 発表標題 Elucidation of new action mechanism of aminoglycoside antibiotics on ribosomes using single particle cryo-electron microscopy
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本翼、高田希美、千足啄馬、深野華子、山本健太郎、鈴木仁人、星野仁彦、横山武司、田中良和
2. 発表標題 非結核性抗酸菌Mycobacterium abscessusリボソームにおけるマクロライド耐性機構の解明を目指したクライオ電子顕微鏡構造解析
3. 学会等名 2021年度生物物理学会、北海道支部・東北支部合同例会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 伴野 詢太, 田中 良和, 横山 武司	4. 発行年 2023年
2. 出版社 NTS	5. 総ページ数 460
3. 書名 クライオ電子顕微鏡ハンドブック、第4章14節、クライオ電子顕微鏡で見る、リボソームの「かたち」と「動き」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	横山 武司 (Yokoyama Takeshi) (20719447)	東北大学・生命科学研究科・助教 (11301)	
研究分担者	長尾 翌手可 (Nagao Asuteka) (30588017)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・講師 (12601)	

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