

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月4日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570165

研究課題名（和文）タンパク質合成反応サイクルにおけるリボソームの構造変化メカニズム解析

研究課題名（英文）Analysis of conformational changes in ribosome during protein synthesis reaction cycle

研究代表者

石田 恒（ISHIDA HISASHI）

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究副主幹

研究者番号：60360418

研究成果の概要（和文）：X線結晶解析により高分解能で解かれたリボソーム-mRNA-tRNA-EFG複合体をタンパク質合成反応(tRNA転位反応)前後の電子顕微鏡像にあてはめることで、その反応過程における構造変化メカニズムを解析した。その結果、リボソームのねじれ様運動、ヘッド回転運動、および P/E-gate の開閉が tRNA 転位の自由エネルギー変化に重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらには、EF-G タンパク質の外部運動および蝶つがい様（内部）運動が tRNA 転位反応を促進していることもわかった。

研究成果の概要（英文）：To understand the mechanism of reverse tRNA translocation in ribosome, all-atom molecular dynamics simulations of ribosome-mRNA-tRNA-EFG complex were performed. The complex at the post-translocational state was directed towards the translocational and pre-translocational states by fitting the complex into cryo-EM density maps. Between a series of the fitting simulations, umbrella sampling simulations were performed to obtain the free-energy landscape. Multistep structural changes, such as a ratchet-like motion and rotation of the head of the small subunit were observed. The free-energy landscape showed that there were two main free-energy barriers: one between the post-translocational and intermediate states, and the other between the pre-translocational and intermediate states. The former corresponded to a clockwise rotation, which triggered P-tRNA to move over the P/E-gate made of G1338, A1339 and A790 in the small subunit. The latter corresponded to an anticlockwise rotation of the head, which located the two tRNAs in the hybrid state. Conformational change of EF-G was interpreted as the result of the combination of the external motion by L12 around an axis passing near the sarcin-ricin loop, and internal hinge-bending motion. These motions contributed to the movement of domain IV of EF-G to maintain its interaction with the A/P-tRNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・生物物理

キーワード：リボソーム、電子顕微鏡、分子動力学、伸長因子 EF-G、tRNA 転位

1. 研究開始当初の背景

リボソームは DNA の遺伝子情報を翻訳し、タンパク質を合成する生体超分子である。翻訳時には、アミノ酸を運ぶ tRNA がリボソーム内を次々と移動する転位反応がおこる。

研究開始当初、PDB (蛋白質構造データバンク) に登録されているリボソーム X 線結晶構造 (解像度 4Å 以内) は 26 個であるのに対し、電子顕微鏡ではより多くの反応状態の構造 (約 100 構造) が EMBL-EBL 電子顕微鏡像データベースに登録されていた。当時、様々な反応状態のリボソームの電子顕微鏡像 (解像度は 10 から 15Å 程度) に高分解能の X 線結晶解析をあてはめることで、それぞれの状態に対応する立体構造モデル構築が行われていた。しかしながら、あてはめの手法は、X 線結晶構造を剛体としてあてはめることが一般的であり、立体構造モデルの精度に問題があった。そのため、立体構造モデルを分子動力学シミュレーションで解析する試みも特になかった。

2. 研究の目的

X 線結晶解析により高分解能で解かれたリボソームおよび mRNA、tRNA (タンパク質の原料となるアミノ酸を運搬する生体分子)、伸長因子 EF-G (GTP 加水分解エネルギーを用いて tRNA 転位反応を補助するタンパク質) が結合したリボソーム複合体の立体構造を、タンパク質合成反応前状態 (tRNA 転位反応前)、中間状態 (tRNA 転位反応中) の電子顕微鏡像にあてはめ、それぞれの状態に対応するリボソーム複合体の詳細な立体構造変化および自由エネルギー変化を解析し、タンパク質合成反応サイクル (特に tRNA 転位反応) における構造変化メカニズムを原子レベルで明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

tRNA 転位反応前 (EMD-1363、解像度 10.9 Å、反応中の電子顕微鏡像 (EMD-1365、解像度 11.75 Å) に対して tRNA 転位反応後のリボソーム X 線結晶構造 (PDB:2WRI/2WRJ、解像度 3.6 Å) をあてはめていくシミュレーションを実行した (図 1 を参照)。

初めに、分子動力学シミュレーション SCUBA と電子顕微鏡像あてはめシミュレーションを統合したシミュレーション手法を開発した。すでに、分子動力学シミュレーションを用いた電子顕微鏡像あてはめ手法は海外でいくつかあるが、これらの手法はほとんど真空中における構造最適化である。つまり真空中では溶媒効果を入れていないため、電子顕微鏡像にあてはまっても立体化学的には不自然な構造となり得る。この問題を回避するために、二次構造や水素結合などが崩れないような拘束条件を入れる必要が

あるが、それでも得られた構造は自然なものとは言い難い。そこで本研究では、真空中ではなく水中において、あてはめの分子動力学シミュレーションを実行することにした。しかしながら、水分子を入れると原子数が膨大になる欠点がある。特に、リボソームの系では原子数が 200 万原子を超える超大規模系である。そこで、超大規模シミュレーションを可能とする、分子動力学シミュレーションプログラム SCUBA を電子顕微鏡像あてはめシミュレーションと統合する必要があった。

統合シミュレーション手法は、以下の順に開発した。

(1) SCUBA の開発

原子力機構では東大と共同して、数百万原子の生体超分子系を扱う大規模な分子動力学シミュレーションシステム SCUBA を開発している。SCUBA は静電相互作用を高速かつ高精度に計算する PPPM 計算法、系のエネルギー、温度、圧力を一定に保つ様々な時間積分アルゴリズムを採用したシミュレーションシステムである。SCUBA は並列計算機を最大限有効に使うように、空間分割法を採用している。

今回計算したリボソームの系は水分子を含めると 200 万原子を超える超大規模系であるため、SCUBA を最大限利用できるように電子顕微鏡像あてはめ手法の開発、改良を進めた。計算は主に、原子力機構が所有する富士通 BX900、FX1 で実行した。使用した CPU 数は 256 または 512 CPU である。

(2) 電子顕微鏡像あてはめシミュレーション手法の開発

電子顕微鏡像の実験データと立体構造から導出される理論的データとの相関係数を目的関数としたアルゴリズムを開発した。更に、SCUBA の空間分割並列化法に適合するようにアルゴリズムを並列化した。

(3) SCUBA と電子顕微鏡像あてはめシミュレーション法の統合

電子顕微鏡像にあてはめるのに必要な力の大きさを見積もった。この力は、大きすぎると over-fitting がおこり立体構造が不自然になり、また小さすぎるとシミュレーション時間以内に構造変化がおこらない。今回の系では、分子動力学シミュレーションにおける原子間相互作用力の 10^{-4} 程度にするとシミュレーション時間以内に構造変化をおこすことが可能であると見積もることができた。電子顕微鏡像力の計算負荷はやや大きいものの、電子顕微鏡像力は原子間相互作用力に比べて変化が遅いこともわかった。この性質を利用して分子動力学シミュレーションの時間積分法では、multi-time-step 法による時間ステップ更新アルゴリズムを用いれば、電子顕微鏡像力の更新を 8 fs と大きな時間ステップを用いても、計算精度を高く保つことが可

能であることを確認した。これにより、計算時間を大幅に短縮することに成功した。

(4) tRNA 転位反応を促す反応経路検索アルゴリズムの開発

電子顕微鏡像あてはめ力が弱いこと、計算シミュレーション時間を1マイクロ秒以内で行う制限があったため、リボソムのねじれ様運動中に tRNA 転位反応を促進させる必要があった。tRNA 転位反応をシミュレーション時間以内を実現するために、リボソムの構造変化の各段階における tRNA 転位の経路を検索しながら、tRNA 転位反応を促す反応経路検索アルゴリズムを開発した。

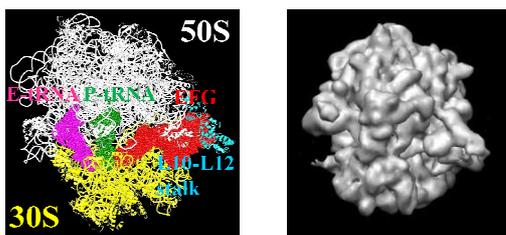


図1. X線結晶構造(左)を電子顕微鏡像(右)にあわせる。

計算手順は以下のように実行した(図2参照)。

①. X線結晶構造を電子顕微鏡像に合わせるための電子顕微鏡像あてはめシミュレーションを実行する。ただし、後で自由エネルギー地形を計算するために1回あたりの電子顕微鏡像あてはめシミュレーション(約500ps)では、大きな構造変化は起こさないようにあてはめ力を調節する。

②. ①で得られたリボソーム立体構造において、リボソームを構成する約50個の核酸、タンパク質の重心を固定する約50個のポテンシャルを入れたアンブレラサンプリングシミュレーション(約4ns)を実行する。ここで、自由エネルギー地形を計算するために約50個の重心座標、および立体構造解析のためのリボソーム立体構造をサンプリングする。

③. ②に戻る。

このサイクルを約60回繰り返すことで、リボソームの大規模構造変化を連続的に観測することに成功した。また構造変化中のリボソーム2次構造も安定していることを確認した。そして、サンプリングした構造からWHAM(weighted histogram analysis method)を用いて自由エネルギーを計算した。

反応座標にはリボソームを構成する核酸、タンパク質の重心からなる多次元空間座標ではなく、より直観的描像が得られるように、リボソームの大きなサブユニットと小さなサブユニットとの間のねじれ角に相当する

1次元量、もしくはtRNAの転位移動量を加えた2次元量を用いることにした。

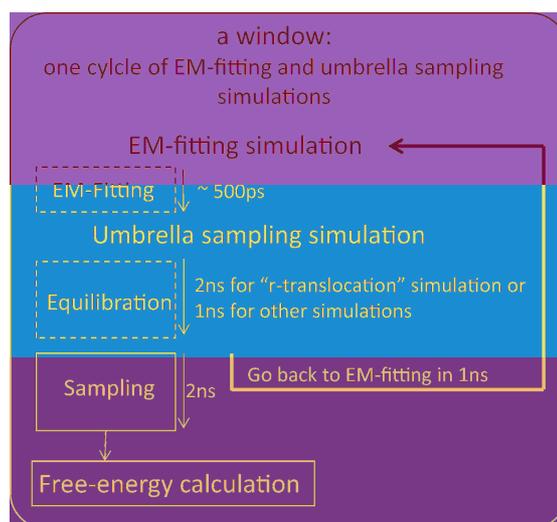


図2. 計算手法の概要図

(電子顕微鏡像あてはめ(EM-fitting)シミュレーションとアンブレラサンプリングシミュレーションを交互におこなう。)

4. 研究成果

本計算により、リボソームを構成する大きなサブユニット(50S)と小さなサブユニット(30S)(図1参照)のねじれ様運動、小さなサブユニットのヘッド領域の回転運動を観測、およびtRNA転位反応(大きなサブユニットと小さなサブユニットの間をtRNAが移動する過程)を観測することに成功した。

計算によりサンプルされた構造から自由エネルギー地形を求めた。その結果、tRNA反応後状態(ねじれ状態が最小)に安定状態、反応前状態(ねじれ状態が最大)に準安定状態、反応中間状態がやや不安定であることがわかった(図3参照)。そして、反応前状態と反応中間状態との間、および反応中間状態と反応後状態との間に7kcal/mol程度の自由エネルギー障壁があることがわかった。

自由エネルギー障壁がある反応座標値は、リボソームのヘッド領域が回転運動をおこなうときの反応座標値とほぼ同じであったことから、このヘッド領域の回転運動がtRNA転位反応に大きく寄与していると考えられる。また小さなサブユニットのヘッド領域の回転運動がギアの歯車としての役割、tRNAが歯止めとしての役割を果たしていることが示唆された。このことはヘッド領域の回転方向(時計回り、反時計回り)がtRNAの運動方向により決まることを示唆する。

自由エネルギー地形を解析することにより、小さなサブユニットのPサイトとEサイトの中間に位置するG1338、A1339、A790から構成されるゲート様構造(P/E-loop)が、

tRNA 転位反応の自由エネルギーに大きく寄与していることがわかった。更に、これらのループは tRNA 転位の際、構造を局所的に大きく変動させていた。このことから、これらのループ部分が tRNA 転位反応におけるゲート開閉の役割を果たしていることがわかった。

また、報告者らが以前開発した DynDom-3D を用いて伸長因子 EF-G の構造変化を解析した。DynDom-3D は生体分子のどの部位がどのような内部運動をするのかを解析するプログラムである。結果、EF-G がリボソームの機能発現に重要な sarcin-ricin ループ近傍を通過する回転軸周りの外部運動と、蝶つがいのように構造を開閉する蝶つがい様（内部）運動が見つかることができた。そして、この外部運動と蝶つがい様運動が、tRNA 転位反応の一方向性に寄与していることがわかった。更には、この蝶つがい様（内部）運動は F-G の GTP 加水分解後に生成される無機リン酸の解放にも寄与していることが示唆された。

本解析により、タンパク質合成時の tRNA 転位メカニズムについて以下のモデルを提唱した。

(1) tRNA 転位反応前状態（ねじれ状態が最大）では P/E-gate は閉じており、準安定状態になっている。閉じた P/E-gate は tRNA 転位反応をブロックしていると考えられる (locked 状態)。

(2) EF-G の GTP 加水分解により、P/E-gate が開く (unlocked 状態)。

(3) tRNA が転位反応を開始し、P-サイトの tRNA が P/E-gate を通過し始める。

(4) リボソームのヘッド領域の回転が tRNA 転位反応を促進する。このとき EF-G の外部運動と EF-G のドメイン 4 が蝶つがい様（内部）運動をすることで EF-G と tRNA との接触を保たれる。このことにより、tRNA 転位反応が反対に逆戻りしないようにする。

(5) 反応後状態（ねじれ状態が最小、P-site の tRNA が P/E-gate を通過した後）に P/E-gate が閉じ安定状態になる。閉じた P/E-gate は tRNA を E-サイトに固定させる (relock 状態)。

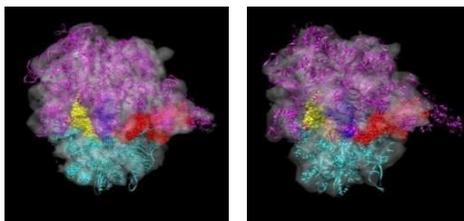


図 3 : 反応中間状態 (左) および反応前状態 (右) に相当する立体構造

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Ishida, H., Molecular Dynamics Simulation System for structural analysis of biomolecules by high performance computing, *Progress in Nuclear Science and Technology*, 2, 470-476, 2011 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Ishida, H and Matsumoto, A., Free-energy landscape of tRNA translocation through ribosome revealed by electron microscopy density map and molecular dynamics simulations, Biophysical society 57th annual meeting, Philadelphia, USA, 2013 (平成 25 年 2 月 4 日、アメリカ)
- ② Ishida, H and Matsumoto, A. Dynamics of tRNA translocation revealed by electron microscopy density map and molecular dynamics simulations, Mini-Symposium on Modeling, Simulation and Function of Biomolecular Assemblies, Tokyo, Nov 2012 (平成 24 年 11 月 9 日、東京) 招待講演
- ③ Ishida, H. and Matsumoto, A., Free-energy landscape of translocation through ribosome analysed using MD simulations and cryo-EM density maps, 第 50 回日本生物物理学会年会 (平成 24 年 9 月 24 日、名古屋)
- ④ Ishida, H. and Matsumoto, A., Energy landscape of translocation of tRNA molecules through ribosome revealed by electron microscopy density map and molecular dynamics simulations, CECAM workshop on "Dynamics of protein-nucleic acid interactions: Integrating simulations with experiment", Switzerland, Zurich, Sep 2011 (平成 23 年 9 月 16 日、スイス) 招待講演

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 恒 (ISHIDA HISASHI)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・

量子ビーム応用研究部門・研究副主幹

研究者番号: 60360418