

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770202

研究課題名（和文）

哺乳類ミトコンドリア蛋白質合成系の分子機構

研究課題名（英文）

Mechanism of protein synthesis in mammalian mitochondria

研究代表者

富田 野乃（竹内 野乃）(TOMITA-TAKEUCHI NONO)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：80323450

研究成果の概要（和文）：哺乳類ミトコンドリアの蛋白質合成系の分子機構について、以下の成果を得た。(1) リボソーム再生過程におけるGTP加水分解の役割を明らかにした。(2) クライオ電子顕微鏡観察により、55Sリボソームの構造を10Åの分解能で決定し、更にE-site tRNAの可視化に成功した。(3) リボソームの生合成因子（ObgH1, Mtg1）について生化学的解析を行い、特にリボソーム結合様式とその制御機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have obtained following results on the mechanism of protein synthesis in mammalian mitochondrial. (1) The role of GTP-hydrolysis during ribosome recycling process has been clarified. (2) The structure of 55S ribosome has been determined at 10 Å resolution by cryoEM reconstitution. The E-site tRNA on 55S ribosome has been visualized. (3) The ribosome binding properties of the mitochondrial ribosome biogenesis factor (ObgH1, Mtg1) have been clarified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：蛋白質合成、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

近年、ミトコンドリア翻訳因子の病的変異が相次いで同定されている。また、ある種の抗がん剤や抗生物質が、ミトコンドリアリボソームに作用して誤翻訳や翻訳抑制を誘発して副作用をもたらすことも報告されている。ミトコンドリア蛋白質合成系の分子機構の詳細や、ミトコンドリアリボソームの機能構造相関を分子レベルで解明する必要性が高まっている。

2. 研究の目的

本研究課題では以下に焦点をあてて研究

を進めることとした。

- (1) リボソーム再生機構の解明：生体におけるタンパク質合成は4つの過程（開始、伸長、終結、リボソーム再生）から成る。翻訳終結後のリボソーム複合体を解離するのが“リボソーム再生”であり、次の翻訳サイクルでリボソームを始めとした諸翻訳因子が再利用されるために必要である。私達は哺乳類ミトコンドリアにおける翻訳終結後のリボソーム再生機構について解析を行い、新規の翻訳因子（RRF2mt/EF-G2mt）および RRF1mt がリボソーム解離反応を担っているこ

とを見いだしていた (Tsuboi et al. (2009) Mol. Cell)。RRF2mt/EF-G2mt と RRF1mt によるリボソーム解離反応機構の詳細を明らかにする。特にリボソーム再生反応における RRF2mt/EF-G2mt による GTP 加水分解の役割について解明する。

- (2) 55S リボソームの構造解析：これまでに報告されている哺乳類ミトコンドリア 55S リボソームの構造は、主に使用されているバッファーの塩濃度が原因で部分的に正しくない可能性がある。例えば、正確な翻訳に重要であるとされている tRNA の E-site 結合部位がないと提唱されている。生理的な条件における正しい構造を決定し、さらに薬剤デザインなどの応用にむけて高分解能での構造決定を目指す。
- (3) 哺乳類ミトコンドリアリボソームの生合成因子の機能解析：近年、ミトコンドリアリボソームの生合成の異常と神経病との関連が指摘されている。これまでのところ、ミトコンドリアリボソームの生合成因子の機能については遺伝学的手法に基づいた解析が主流であった。(2) における予備実験において独自に確立した 55S リボソームの調製方法を応用し、生合成因子の生化学的な機能解析を行うこととする。

3. 研究の方法

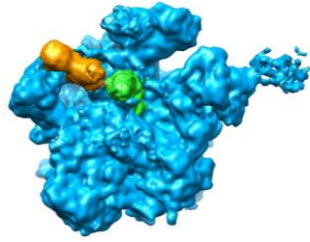
- (1) リボソーム再生機構の解明：バクテリアにおける EF-G と RRF によるリボソーム解離反応は GTP 加水分解依存的に進む。一方、私達はミトコンドリア EF-G2mt/RRF2mt と RRF1mt によるリボソーム解離反応は GTP 加水分解依存的に進むことをみいだしていた。RRF1mt の N 末領域にはユニークな付加配列 (N-terminal extention, NTE) が存在する。リボソーム解離反応における GTP 加水分解の役割を明らかにするため、RRF1mt の NTE とリボソームとの相互作用に着目し、RRF1mt の NTE 領域の各種変異体を作成し、リボソーム結合反応、リボソーム解離反応の kinetics、GTP 加水分解阻害剤の効果、などについて調べた。
- (2) 55S リボソームの構造解析：55S リボソ

ームは豚肝臓ミトコンドリアから調製した。生理的環境に近いバッファー条件を利用し、PRE トランスロケーション複合体 (55S+A-tRNA+P-tRNA)、および POST トランスロケーション複合体 (55S+P-tRNA+E-tRNA) を形成させ、それぞれについてクライオ電子顕微鏡観察を行った。

- (3) 哺乳類ミトコンドリアリボソームの生合成因子の機能解析：ゲノムデータベースに基づき、バクテリアリボソームの生合成因子と相同性があり、かつミトコンドリア局在が予測されるものを抽出した (ObgH1、Mtg1)。これらの因子について、ミトコンドリア局在、や siRNA による発現抑制の効果について解析を行った。また、(2) における予備実験において独自に確立した 55S リボソームの調製方法を応用し、生合成因子の生化学的な機能解析 (リボソームとの結合様式の解析、リボソーム依存 GTPase 活性の解析) を行った。

4. 研究成果

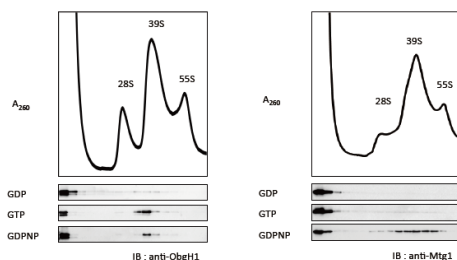
- (1) リボソーム再生機構の解明：ミトコンドリア RRF1mt は、NTE によりリボソームとの親和性が高まっており、さらに NTE によって EF-G2mt の GTP 加水分解非依存的にリボソーム解離反応が促進できることを明らかにした。また EF-G2mt の GTP 加水分解は、リボソーム解離反応後に RRF1mt と EF-G2mt がリボソームサブユニットから解離するために必要となる。EF-G の GTP 加水分解には ① リボソーム解離反応の促進、② 因子のリボソームサブユニットからの解離、の 2 つの側面があり、RRF1mt の NTE により ① の役割が不要になることが明らかとなった。
- (2) 55S リボソームの構造解析：ミトコンドリア 55S リボソームの調製方法を独自に確立して cryoEM による構造解析を進めた。10Å の分解能で構造を決定することに成功し、また 55S リボソーム上の E-site tRNA を可視化することができた (図 1)。これにより、55S リボソームには E-site が存在しないという他グループによる先行報告を修正することができた。



【図1：ミトコンドリア55Sリボソーム (POSTトランスロケーション複合体) の構造】

P-site tRNA(緑)、E-site tRNA(橙)の可視化することに成功した。簡略化のため小サブユニットは表示されていない。

- (3) 哺乳類ミトコンドリアリボソームの生合成因子 (ObgH1, Mtg1) の機能解析：以下のことを明らかとした。両者ともに、i) ミトコンドリア内膜に結合した状態でミトコンドリアマトリックスに存在する。ii) リボソーム大サブユニットにGTP型特異的に結合する。GTPの加水分解に伴い、速やかに大サブユニットから解離する(図2)。iii) RNA干渉法によりノックダウンしても、ミトコンドリアリボソームのrRNAやリボソーム蛋白質についての変化はみられない。ObgH1をノックダウンした場合、呼吸鎖複合体のComplex Vのサブユニットの合成量が特異的に上昇し、またComplex Vのアセンブリーも異常になる。一方、Mtg1をノックダウンした場合、全体的にミトコンドリアの翻訳活性が低下し、さらに呼吸鎖複合体のアセンブリーも全体的に異常になる。以上の結果は、哺乳類ミトコンドリアリボソームの生合成に関する新たな知見を与えるとともに、今後の疾患の発症機構の研究の基盤となる重要なものである。



【図2：ObgH1とMtg1のリボソーム結合】
ミトコンドリア55SリボソームとObgH1またはMtg1を各種グアニンヌクレオチド存在下でインキュベートし、SDGによ

り解析した。ObgH1とMtg1は、GTP型で大サブユニットに特異的に結合している。

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4件)

- (1) Kotani T., Akabane S., Takeyasu K., Ueda T. and *Takeuchi N. Human G-proteins, ObgH1 and Mtg1, associate with the large mitochondrial ribosome subunit and are involved in translation and assembly of respiratory complexes. *Nucleic Acids Res.* (2013) **41**, 3713-22. 査読有 DOI: 10.1093/nar/gkt079
- (2) Kurata S., Shen B., Liu JO., Takeuchi N., Kaji A. and Kaji H. Possible steps of complete disassembly of post-termination complex by yeast eEF3 deduced from inhibition by translocation inhibitors. *Nucleic Acids Res.* (2012) **41**(1):264-76. 査読有 DOI: 10.1093/nar/gks958
- (3) Häuser R, Pech M, Kijek J, Yamamoto H, Titz B, Naeve F, Tovchigrechko A, Yamamoto K, Szaflarski W, Takeuchi N., Stellberger T, Diefenbacher ME, Nierhaus KH, Uetz P. RsfA (YbeB) Proteins Are Conserved Ribosomal Silencing Factors. *PLoS Genet.* (2012) **8**(7):e1002815. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pgen.1002815
- (4) Suzuki T., Miyauchi K., Suzuki T., Yokobori S., Shigi N., Kondow A., Takeuchi N., Yamagishi A., Watanabe K. J. Biol. Chem. (2011) **286**, 35494-8. Taurine-containing uridine modifications in tRNA anticodons are required to decipher non-universal genetic codes in ascidian mitochondria. 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M111.279810

〔学会発表〕(計4件)

- (1) Nono Tomita-Takeuchi N-terminal extension of mammalian mitochondrial RRF alters the role of GTP-hydrolysis by EF-G in ribosome recycling Complex life of mRNA 2012年10月9日 EMBL, Heidelberg, Germany
- (2) 入江 遼平 Mechanism of ribosome recycling in mammalian mitochondrial protein synthesis 日本RNA学会年会 2012年07月19日 東北大学(仙台)
- (3) 小谷 哲也 Functional analysis of Mtg1 in mammalian mitochondrial ribosome biogenesis 日本RNA学会年会 2012年07月19日 東北大学(仙台)
- (4) Nono Takeuchi Protein Synthesis System of Mammalian Mitochondria 日本分子生

物学会（招待講演） 2011 年 12 月 15
日 パシフィコ横浜（神奈川県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田野乃（竹内野乃）

(TOMITA-TAKEUCHI NONO)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・
准教授

研究者番号：80323450

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：