

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291008

研究課題名(和文) 真核生物リボソーム生合成における5S rRNP複合体の形成機構と機能の解明

研究課題名(英文) Explanation of assembly mechanism of 5S RNP in eukaryotic ribosome biosynthesis

研究代表者

姚 閔(YAO, Min)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40311518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リボソームの生合成における二つのトランス因子Rpf2とRrs1の働き、および、それらがRpL5, RpL11, 5S rRNAをリボソーム前駆体pre-90Sに取り込む機構を解明するため、Rpf2-Rrs1複合体のコア構造の解析に成功し、得られた構造に基づいた変異体の生化学実験を行い、5S rRNAとの結合の詳細を明らかにした。また、5S rRNP、更にリボソームとの結合モデルを作製し、Rpf2-Rrs1のコア部分と5S rRNA, RpL5, RpL11とをつなぐアダプターとしての機能を持ち、pre-90S上で他の生合成関連因子の取り込みを行う足場タンパク質複合体であると提案した。

研究成果の概要(英文)：Proteins Rpf2 and Rrs1 act as ribosome assembly factors which recruit RpL5, RpL11 and 5S rRNA into pre-90S by formation of 5S RNP complex. In this study, in order to elucidate how Rpf2 and Rrs1 work for maturation of pre-90S, we determinate the Rpf2-Rrs1 core complex from *Aspergillus nidulans*. The structure contains the tightly interlocked N-terminal domains of Rpf2 and Rrs1. The long-helix of Rrs1 joins the C-terminal half of Rpf2 N-terminal domains as if it is a part of a single molecule. In addition, gel shift analysis of Rpf2-Rrs1 complex and its mutants revealed that the Rpf2-Rrs1 complex binds directly to 5S rRNA with three parts. Based on these studies and previous reports, we propose a model for ribosomal component recruitment to the pre-90S ribosome precursor.

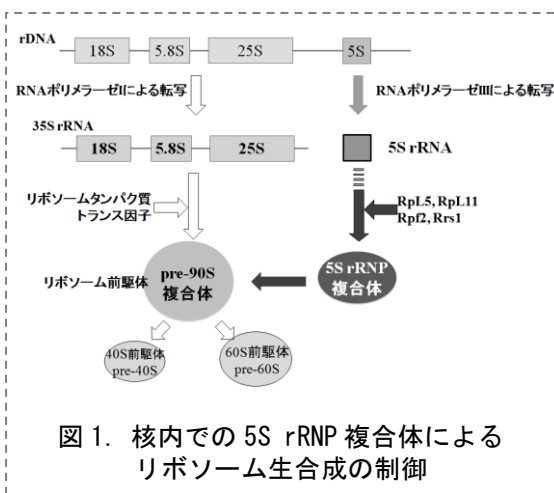
研究分野：構造生物学, X線結晶学

キーワード：リボソーム生合成 5S RNP Rrs1 Rpf2 5S rRNA X線結晶解析 相互作用解析

1. 研究開始当初の背景

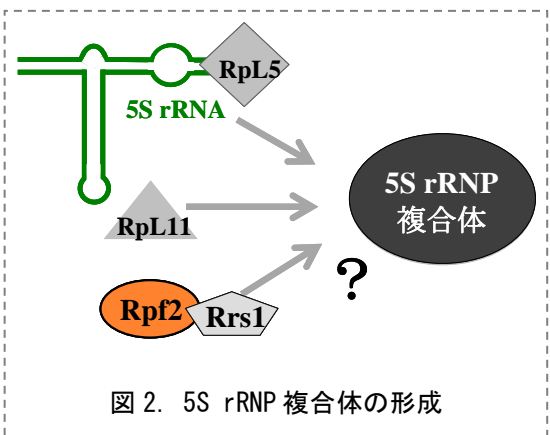
タンパク質合成装置リボソームは、真核生物の場合、4種類のrRNA (18S, 5.8S, 5S, 28S) と約80個のタンパク質 (RpLs, RpSs) からなる巨大なrRNP複合体である。この巨大rRNP複合体の生合成は核内で始まり、前駆体が形成された後、核外へ輸送され、最終的に40S, 60Sという二つのサブユニットとして成熟する。この生合成過程は、RNAや、約200種類以上のタンパク質 (rRNA切断・修飾, rRNA折り畳み, rRNA安定化など、様々な機能を持つ) などのトランス因子が関与し、大量のエネルギーを消費する壮大な化学反応系である。生命にとって非常に重要なタンパク質合成装置を作製する過程であるために、この過程の化学反応は厳密に制御される必要がある。近年、質量分析法の飛躍的な発展と生合成途中のリボソーム前駆体の精製法の確立によって、リボソーム生合成過程には、いくつかのrRNP複合体 (前駆体) が存在し、リボソームは、それらの前駆体をチェックポイントとして、段階的に成熟していくという概要が明らかになった<sup>(1,2,3)</sup>。

リボソームを構成する4種類のrRNAのうち、18S, 5.8S, 25S (28Sの前駆体) の3つのrRNAは、核内でRNAポリメラーゼIによって一続きの35S rRNA前駆体として転写され、多数のトランス因子による切断や修飾を何段階にもわたって受けることでリボソーム前駆体 (pre-90S rRNP複合体) となる (図1)。一方、5S rRNAは、これら3つのrRNAとは異なり、RNAポリメラーゼIIIによって転写され、一旦、核外へ輸送された後、RpL5と結合して核内に戻り、その後、RpL11, トランス因子 Rpf2, Rrs1 と五者複合体 (5S rRNP複合体) を形成する。近年、この5S rRNP複合体が pre-90S複合体と会合してから、pre-90Sから40Sと60Sの前駆体であるpre-40Sとpre-60Sへ成熟プロセスが進められるというメカニズムが提唱された (図1)<sup>(4)</sup>。よって、5S rRNP複合体が、リボソーム前駆体 pre-90Sの最終的な成熟過程を制御し、リボソームの量と品質を管理していると言える。実際、Rpf2とRrs1を欠失させると、5S



rRNAのpre-90S複合体への会合量が著しく低下し、pre-60Sの成熟が阻害される。このことから、トランス因子による5S rRNP複合体の形成や、5S rRNP複合体によるリボソーム生合成の制御機構は、リボソームの品質管理に関連して極めて重要であることが理解され、この分野に大きな注目が集まっている。5S rRNP複合体の構成因子である。

酵母由来の5S rRNAとRpL5, Rpf2とRrs1は、それぞれ複合体を形成していることが報告されているが (図2), Rpf2, Rrs1, Rpf2-Rrs1および5S rRNP複合体の立体構造情報が欠如しているため、5S rRNP複合体の形成過程におけるRpf2-Rrs1の役割、5S rRNP複合体によるリボソーム生合成品質管理機構の解明は進んでいない。



[参考文献]

- (1) Kopp K., et al (2007) *Mol. Biol. Cell.* **18**, 394-403
- (2) Fromont-Racine M., et al (2003) *Gene* **313**, 17-42
- (3) Castle CD., et al (2012) *Mol. Biol. Cell.* **23**, 716-728
- (4) Zhang J., et al (2007) *Genes Dev.* **21**, 2580-2592

2. 研究の目的

我々は、5S rRNP複合体の成熟に必須のトランス因子Rpf2とRrs1に着目し、5S rRNA成熟に関わる各因子間の相互作用と構造変化を示すスナップショット像を解析することで、二つのトランス因子の働きを解明し、5S rRNAの成熟機構に迫りたく、このために、本研究では、トランス因子Rpf2, Rrs1の単体、及びRpf2-Rrs1複合体、さらには、RpL5, RpL11と5S rRNAを調製し、それらを用いて、5S rRNP複合体のin vitro再構成を行う。次いで、各因子間の相互作用を解析し、構造未知のRpf2, Rrs1, Rpf2-Rrs1と、5S rRNP複合体の結晶構造解析を行う。最後に、解析したトランス因子や5S rRNP複合体の構造と、成熟60Sサブユニット上での5S rRNA, RpL5, RpL11の構造を比較することで、5S rRNAの

pre-90S への会合と、リボソームの品質管理の本質を明らかにすることを目指している。

2000年に原核生物リボソームの構造解析が行われ、また、2012年には真核生物リボソームの構造が解かれたことで、DNAの塩基配列をもとにタンパク質を合成する「翻訳」は、分子構造をもとに議論できるようになった。酵母では、この生命の根幹をなす重要なタンパク質合成装置は、1分間あたり2000個が合成されている。その合成量および合成されたリボソームの品質は、あらゆる生命現象に密接に関連している。したがって、このタンパク質合成装置の翻訳メカニズムだけでなく、合成装置そのものの生合成と品質管理は、生命にとって非常に重要であり、それゆえに、リボソームの生合成過程と制御を解明することは、生物科学の中心的命題と言える。しかし、生合成途中のリボソームの調製は困難なため、リボソーム生合成の研究はほとんど進んでいなかったが、近年、プロテオーム解析によって非常に多くのトランス因子が同定され、いくつかのrRNPの存在が発見され、成熟過程が少しずつ明らかになってきた。しかしながら、トランス因子の構造が解かれた例は非常に少なく、更に、前駆体rRNP複合体の構造解析はほとんど行われていない。そのため、数多くのトランス因子がリボソーム生合成過程の各段階でどのように機能し、それらの因子がどのように協調して、各段階の合成を制御（品質管理）するかが不明のままである。5S rRNAの合成機構の解明を目的とした本研究は、リボソーム生合成について構造生物学研究の先駆けとなる重要な研究であり、また、リボソーム生合成の品質管理機構解明の端緒となる研究である。

### 3. 研究の方法

#### (1) トランス因子 Rpf2, Rrs1 の構造機能解析

Rrs1, Rpf2 と Rpf2-Rrs1 複合体は既に確立した方法により、研究室に既存の高速クロマトグラフィシステムを用いて大量調製し、結晶化スクリーニングを行う。初期結晶が得られた場合には、結晶化スケールをアップして、pH、沈殿剤濃度と単体および複合体の濃度の3次元で最適な結晶化条件を探索する。場合によっては、サンプル調製法の再検討を行い、回折実験に適用できる結晶を作製する。良質な結晶が得られた場合には、放射光施設 SPring-8 と PF にて X 線回折実験を行う。Rpf2 単体の場合には、類似性の高い構造がなく、分子置換法が適用できないと予想されるため、上に記した位相決定の方法と同様に、S-SAD, I-SAD および Se-SAD 法による初期位相決定を試みる。また、Rpf2-Rrs1 複合体の結晶が得られた場合には、解析を終えた Rrs1 もしくは Rpf2 の構造を用いて、分子置換法によって決定する。分子置換法が難航する、もしくは、Rpf2 と Rrs1 の構造解析を終えていない場合には、S-SAD, I-SAD あるいは

Rpf2-Rrs1 の Se 置換体を調製し、Se-SAD 法を利用する。構造の精密化は我々が開発した自動精密化プログラム LAFIRE を用いて行う。

また、X 線結晶構造解析を進めると共に、小角 X 線散乱 SAXS による溶液中における複合体の構造解析も並行して行う。これにより、溶液中での分子間の配向や構造可変性についての情報を得ることができる。SAXS 実験は放射光施設 SPring-8 と PF にて行う。

Rrs1 と Rpf2 の単体と Rrs1-Rpf2 二者複合体の構造が得られた場合には、それらの構造を比較することで、二者間の相互作用の詳細を明らかにする。そして、得られた構造を元に相互作用に重要な残基を置換した変異体を作製し、ゲルシフトアッセイやゲルろ過分析、当研究室に既存の ITC を用いて結合実験を行い、Rpf2 と Rrs1 の働きを解明する。この際、膨大な量の変異体の発現系構築、精製を行うために、quick-change 法及び本研究室に既存の微量自動タンパク質精製装置（マグネットビーズシステム）を利用し、発現系の構築を迅速に行う。また、本研究室に設置しているクロマト装置を使い、タンパク質精製の自動化システムを利用することにより、短期間で多数の変異体の大量調製が可能である。

#### (2) 5S rRNP 複合体の構造解析

真核生物リボソームタンパク質（RpLs, RpSs）の調製は一般的に難しいことから、発現系の検討を行う。RpL5 は *E. coli* を用いた発現系の構築を行い、大量調製を行う。*E. coli* 発現系が難しい場合は、発現系を *P. pastoris* に変更する。また、RpL5 は核外で 5S rRNA と複合体を作り、核内へ輸送されることから、この二者複合体が安定であると考えられる。そこで、RpL5 と 5S rRNA の二者共発現系の構築を行い、安定した高純度の複合体の調製を目指す。我々は、リボソーム生合成過程の研究が進んでいる出芽酵母をターゲットとして研究を進めている。しかし、試料の調製状況によっては麹菌などの生物種もターゲットとし、同種を用いた複合体だけでなく、異種を用いた複合体での調製も視野に入れている。一方、RpL11 は *E. coli* を使い、Rpf2 と Rrs1 とを三者共発現させることで、可溶化発現に成功した。この発現系を用いて、スケールをアップして大量調製法の確立を行う。

5S rRNA は T7 RNA Polymerase を用いた *in vitro* transcription により大量調製の方法を確立した。ラージスケール（100 ml）で *in vitro* transcription を行い、RNA 専用高速クロマトグラフィシステムを用いて陰イオン交換樹脂で精製する。また、真核生物 60S リボソームの構造から、5S rRNA の 3'末端は RpL5 と強力な相互作用をしていることがわかる。そのため、正しい長さをもつ 5S rRNA が必要と考えている。そこで、リボザイムを用い、末端が正しくトリミングされた 5S rRNA の調製法の構築を行う。

5S rRNP 複合体の形成機構を解明するため、各成分(サブ複合体)間の相互作用を調べる。5S rRNA と他の成分間の相互作用解析をゲルシフトアッセイ、ゲルろ過分析を用いて行う。この際、5S rRNA を放射性同位体  $^{34}\text{P}$  にて標識し検出に用いる。また、当研究室に既存の ITC を用いて、化学量論的組成と親和力の測定を行う。それらの実験によって、5S rRNP 複合体の形成条件を最適化し、安定な複合体を調製する。さらに、当研究室に既存の動的光散乱光度計(DLS)を用いて、粒子のサイズを測定することによって複合体の確認も行う。放射光施設 SPring-8 と PF を利用する SAXS による解析も並行して行う。これらの動的な構造情報を X 線結晶構造解析から得られる詳細な構造情報と併せることにより、構造変化をより明確にすることが期待できる。

ゲルシフトアッセイ、ゲルろ過分析、ITC および DLS により決定した複合体形成条件をもとに 5S rRNP 複合体を大量調製し、結晶化スクリーニングを行う。結合実験の結果によって、他の複合体の大量調製、結晶化スクリーニングも行う。何らかの初期結晶が得られた場合には、pH、沈殿剤濃度と複合体の濃度の 3 次元で結晶化条件の最適条件を探索する。場合によってはサンプル調製法の再検討を行い、回折実験が可能な良質な単結晶を作製する。

5S rRNP 複合体の良質な単結晶が得られた場合には、シンクロトロン放射光施設にてクライオ条件下で X 線回折実験を行う。構造因子の初期位相は、現在得られている真核生物 60S リボソーム上の 5S rRNA, RpL11, RpL5 の構造を用いて、分子置換法により決定する。分子置換法による位相の計算が難航する場合には、Rpf2, Rrs1, RpL11, RpL5 の Se 置換体を作製し、Se-SAD 法あるいは 5S rRNA のリン酸原子を利用した P-SAD 法を用いて位相の計算を行う。

5S rRNP 複合体の構造および 80S リボソーム上の RpL11, RpL5, 5S rRNA の構造を比較することから、5 つの成分間の詳細な相互作用様式を明らかにし、5S rRNA の 90S への会合とリボソームの品質管理機構を提案する。その後、この提案を検証するため、重要な残基を置換した変異体を作製し、ゲルシフトアッセイやゲルろ過分析、ITC を用いて結合実験を行う。この際、膨大な量の変異体の発現系構築、精製を行うために、quick-change 法及び本研究室に既存の微量自動タンパク質精製装置(マグネットビーズシステム)を利用し発現系の構築を迅速に行う。

#### 4. 研究成果

研究計画に基づき、平成25年度は、トランス因子 Rpf2, Rrs1 の複合体の構造解析を試みた。まず、付加剤を加えることによって断片化された Rpf2-Rrs1 のコア部分 Rpf2f-Rrs1f につ

いて、2.2Å 分解能の回折能を持つ結晶を得ることに成功した。しかし、Rpf2 と Rrs1 が新規構造であるため、分子置換法による位相決定に至ることができなかった。そこで、Rpf2f-Rrs1f (Rpf2f: 10-254aa; Rrs1f: 18-114aa) の Se 置換体を調製し、3.5 Å 分解能での Se-SAD データを得て、Native の回折データを合わせて、構造解析に成功した。得られた構造は、Rpf2f と Rrs1f が、一つの rigid-core を形成し(図3)、Rpf2f と Rrs1f がそれぞれ単独に安定な構造を形成していないことを示唆している。

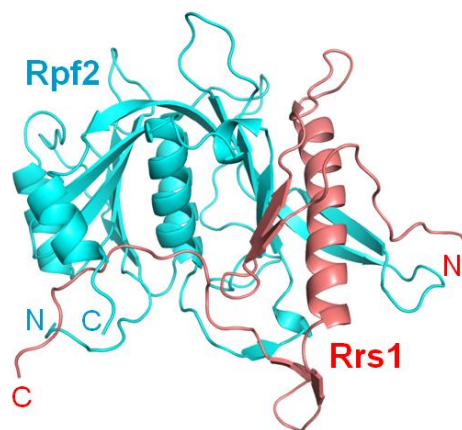
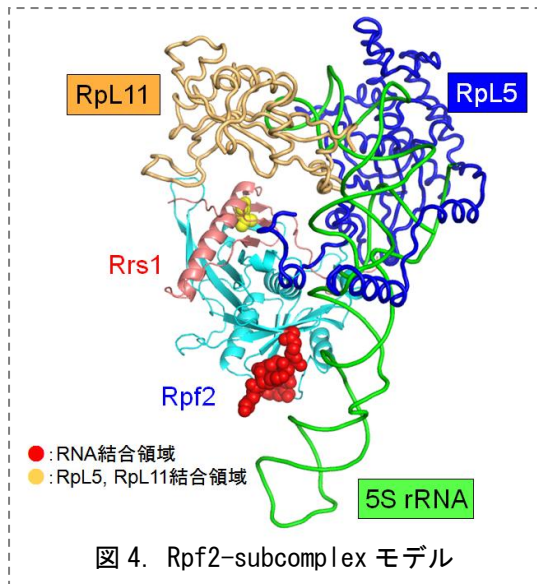


図3. Rpf2-Rrs1 複合体のコア結晶構造

平成26年度は、平成25年度に引き続き、得られた Rpf2-Rrs1 複合体のコア構造(Rpf2f-Rrs1f)に基づいて、Rpf2 と Rrs1 の変異体を作製し、ゲルシフトアッセイによる結合実験を行い、5S rRNA 結合能を検討した。その結果、Rpf2 N 末ドメイン上の 3 つの領域が 5S rRNA との結合に重要であることが明らかになった。これらの情報を Rpf2-Rrs1 複合体のコア構造に加えて、Rpf2-subcomplex モデル(図4)、更に、Rpf2-subcomplex とリボソーム結合モデルを作製したところ、Rpf2-Rrs1 複合体のコアがリボソーム前駆体と 5S rRNA の間に位置すると考えられた。このモデルから Rpf2-Rrs1 複合体のコア(N 末ドメイン)は、90S と 5S rRNA, RpL5, RpL11 をつなぐアダプターとしての機能を持ち、pre-90S 上で他の生合成関連因子の取り込みを行う、足場タンパク質複合体であると考えられる。以上の結果をまとめて、*Nucl. Acid Res.* 誌に発表した(主な発表論文等 雑誌論文の①)。

平成 27 年度は、Rpf2-Rrs1-5S rRNA 複合体の構造解析を進め、安定な Rpf2-Rrs1-5S rRNA 複合体について大量調製を試みた。まず、*in vitro* 転写により、5S rRNA の大量調製を行い、その後、様々な精製条件を用いた試行錯誤を繰り返したところ、Rpf2-Rrs1-5S rRNA 複合体の再構築に成功し、結晶化のスクリーニングへ進めた。今後、良質な単結晶が得られたら、Rpf2-Rrs1-5S rRNA の構造解析を行い、提案したモデルを検証し、リボソーム成熟における 5S rRNP 複合体の役割を追究する。



## 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 Nozomi Asano, Koji Kato, Akiyoshi Nakamura, Keisuke Komoda, Isao Tanaka, Min Yao, Structural and functional analysis of the Rpf2-Rrs1 complex in ribosome biogenesis, *Nucl. Acid Res.* **43**, 4746-4757 (2015)  
査読有, DOI: 10.1093/nar/gkv305
- ② Nozomi Asano, Akiyoshi Nakamura, Keisuke Komoda, Koji Kato, Isao Tanaka, Min Yao, Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of ribosome assembly factors: the Rpf2-Rrs1 complex, *Acta Cryst. F.* **70**, 1649-1652 (2014)  
査読有, DOI: 10.1107/S2053230X14024182
- ③ Nozomi Asano, Haruka Atsuumi, Akiyoshi Nakamura, Yoshikazu Tanaka, Isao Tanaka, Min Yao, Direct interaction between EFL1 and SBDS is mediated by an intrinsically disordered insertion domain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 1251-1256 (2014)  
査読有, DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.143

[学会発表] (計 3 件)

- ① 姚 閔, ペプチド性タグを利用したタンパク質結晶化の新技术—タンパク質結晶構造解析のための実用的な結晶化タグ—, JST 発 医療分野 新技术説明会 A-STEP から創出された最新シーズ技術を一挙公開, 平成27年10月9日, JST東京本部別館 (東京都千代田区)
- ② 朝野希美, 加藤公児, 中村彰良, 薦田圭介, 田中勲, 姚 閔, 真核生物リボソーム生合成関連因子 Rpf2 と Rrs1 の構造機能解析, 第3回 RIBOSOME MEETING, 平

成 27 年 3 月 17-18 日, ANA ホリデイ・インリゾート宮崎 (宮崎県宮崎市)

- ③ 朝野希美, 中村彰良, 薦田圭介, 加藤公児, 田中勲, 姚 閔, リボソーム成熟に必要なタンパク質複合体の結晶構造解析へのチャレンジ, 平成 26 年度日本結晶学会年会及び総会, 平成 26 年 11 月 1-3 日, 東京大学農学部 (東京都文京区)

[その他]

北海道大学 X 線構造生物学研究室

ホームページ

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

姚 閔 (YAO, Min)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号: 40311518

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

薦田 圭介 (KOMODA, Keisuke)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・特任助教

現所属: Department of Plant Pathology and Microbiology, Iowa State University (米国)・Postdoctoral Research Associate

研究者番号: 40581640