

平成30年6月7日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06964

研究課題名(和文) リボソーム触手様タンパク質とアミノアシルtRNA合成酵素の相互作用の構造基盤解明

研究課題名(英文) Elucidation of the structural basis for the interaction of the ribosomal stalk protein with aminoacyl-tRNA synthetase

研究代表者

伊東 孝祐 (Kosuke, Ito)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：20502397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リボソーム表面で柔軟かつ広範囲に運動する“触手様タンパク質”は、翻訳因子と直接相互作用して翻訳因子をリボソームへとリクルートする。一方で最近、触手様タンパク質がアミノアシルtRNA合成酵素とも相互作用し、アミノアシルtRNAを翻訳因子へ効率よく供給する役割も担うことが示された。本研究では、まず触手様タンパク質とアミノアシルtRNA合成酵素の相互作用実験を行った。その結果、触手様タンパク質のC末端ドメインのN末端側部位がアミノアシルtRNA合成酵素との相互作用に重要であることを示唆する結果を得た。また、我々は触手様タンパク質-アミノアシルtRNA合成酵素の微結晶を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The ribosomal stalk protein moves in a broad range on the ribosome. The ribosomal stalk protein directly interacts with and recruits the translation factors to the ribosome. On the other hand, recently it was found that the ribosomal stalk protein also binds to aminoacyl-tRNA synthetase and contributes to the efficient supply of aminoacyl-tRNA to the translation elongation factor. In our present research, we first conducted the analysis of the interaction between the ribosomal stalk protein and aminoacyl-tRNA synthetase. The results suggested that the N-terminal region of the C-terminal domain of the stalk protein is important for the binding. In addition, we obtained the microcrystals of the stalk protein-aminoacyl-tRNA complex.

研究分野：構造生物化学

キーワード：リボソーム 触手様タンパク質 アミノアシルtRNA合成酵素 翻訳 X線結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の翻訳は、アミノアシル tRNA 合成酵素が tRNA にアミノ酸を付加し、そのアミノアシル tRNA と結合した翻訳因子がリボソーム中に入り込むことで進行する。リボソームタンパク質の一種である“触手様タンパク質”は、そのような翻訳因子をリボソームへとリクルートする役割を担い、タンパク質合成を行うために必須の構造体である (図 1)。触手様タンパク質はリボソーム上に複数コピー存在しており、ダイマー化した N 末端ドメインを介してアンカータンパク質に結合している (図 1)。一方、触手様タンパク質の C 末端ドメインは、N 末端ドメインと変性領域を介して繋がっており、リボソーム表面で柔軟に運動していると考えられている (図 1)。

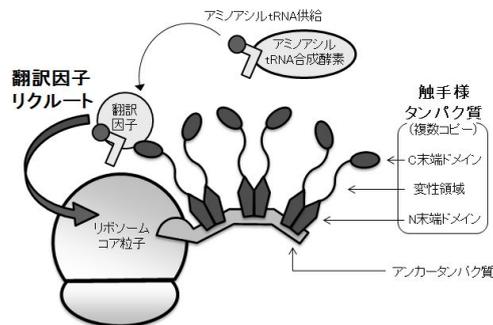


図 1 リボソーム触手様タンパク質の役割

これまでに当研究室では、触手様タンパク質の N 末端ドメインとアンカータンパク質の複合体の結晶構造を決定し、触手様タンパク質とアンカータンパク質の会合様式を明らかにしてきた (Naganuma *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2010)。また、我々は NMR 解析により、触手様タンパク質の運動範囲は、半径 125Å にも及ぶ広範囲なものであることを明らかにしてきた (Lee *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2013)。さらに、我々は触手様タンパク質はその C 末端ドメインを介して翻訳因子と直接相互作用することを示すとともに (Nomura *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012)、触手様タンパク質 C 末端ドメインと翻訳因子の一種である EF1A との複合体の結晶構造を決定し、その相互作用様式の詳細を明らかにしてきた (Ito *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2014) (図 2)。

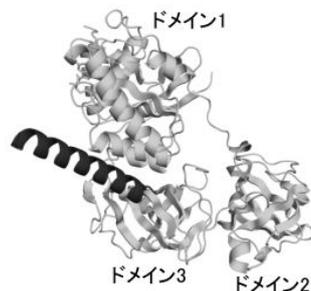


図 2 触手様タンパク質 C 末端ドメイン (黒色) と翻訳因子 EF1A (灰色) との複合体構造

一方、アミノアシル tRNA 合成酵素は細胞質基質で機能する酵素であり、翻訳因子とは違い、リボソームコア粒子には取り込まれない因子である。しかしながら最近、このアミ

ノアシル tRNA 合成酵素が意外なことに、リボソームの触手様タンパク質と相互作用することが報告された (Godinic-Mikulcic *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2014)。このことから、触手様タンパク質は「翻訳因子をリボソームへリクルートする」ばかりでなく、「アミノアシル tRNA 合成酵素をリボソーム近傍に集積させることで、アミノアシル tRNA を効率よく翻訳因子に供給し、さらにはリボソームで消費された tRNA を効率よくアミノアシル tRNA 合成酵素に引き渡す役割も担う」という、翻訳反応の新たな仕組みが明らかになった。しかし、翻訳因子とは構造も機能も全く異なるアミノアシル tRNA 合成酵素を、なぜ触手様タンパク質は認識できるのか、そのメカニズムは明らかでなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々のこれまでの成果に立脚し、触手様タンパク質・アミノアシル tRNA 合成酵素複合体の相互作用様式を生化学的実験および結晶構造解析により明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、結晶化に適した構造が安定な触手様タンパク質断片を作製することを目的とし、まず触手様タンパク質におけるアミノアシル tRNA 合成酵素との相互作用部位の特定を行った。相互作用解析は Native-PAGE や蛍光偏光法により行った。そして、構造解析は結晶構造解析により行った。

## 4. 研究成果

まず、蛍光偏光法の実験結果を示す。蛍光偏光測定で使用するタンパク質は好熱性古細菌 *M. thermautotrophicus* 由来のものを使用した。まず、触手様タンパク質の C 末端から 14 番目のアミノ酸に蛍光標識を導入したサンプル (aP1C14-FITC) を調製し、アミノアシル tRNA 合成酵素として SerRS を使用し、aP1C14-FITC- SerRS 間の親和性を測定した。その結果、 $K_d = 2.03 \mu\text{M}$  の親和性で相互作用することが確認された (図 3A)。次に、触手様タンパク質の N 末端ドメインをマルトース結合タンパク質に置き換え、そして C 末端から 14 番目のアミノ酸に蛍光標識を導入したサンプル (MBP-aP1C14[ΔNTD]-FITC) を調製し、SerRS との相互作用を測定した。その結果、 $K_d = 4.13 \mu\text{M}$  の親和性で相互作用することが確認された (図 3B)。即ち、触手様タンパク質の N 末端ドメインは SerRS との相互作用に関与していないことが明らかになった。次に、触手様タンパク質の C 末端 13 残基を削除し、そして C 末端から 14 番目のアミノ酸に蛍光標識を導入したサンプル (aP1C14[ΔC13]-FITC) を調製し、SerRS との相互作用解析を行った。その結果、 $K_d = 2.47 \mu\text{M}$  の親和性で相互作用することが確認された (図 3C)。この結果は注目に値するもので

ある。なぜなら、前述のように、我々は過去の研究で、触手様タンパク質はC末端ドメインのC末端を介して翻訳因子と相互作用していることを明らかにしているからである。すなわち、今回の結果は、アミノアシル tRNA 合成酵素と翻訳因子は違った部位で触手様タンパク質と相互作用していることが明らかになった。次に、我々は蛍光標識を触手様タンパク質のC末端ドメインのN末端側に蛍光標識を施したサンプル (aP1C30-FITC: 触手用タンパク質C末端ドメインのN末端側に蛍光標識が導入した) を調製して相互作用解析を行った。その結果、触手用タンパク質と SerRS は相互作用しないことが明らかになった (図 3D)。このことは、蛍光標識化合物が触手用タンパク質-SerRS の相互作用を阻害したことを意味しており、即ち、SerRS は触手用タンパク質のC末端ドメインのN末端部

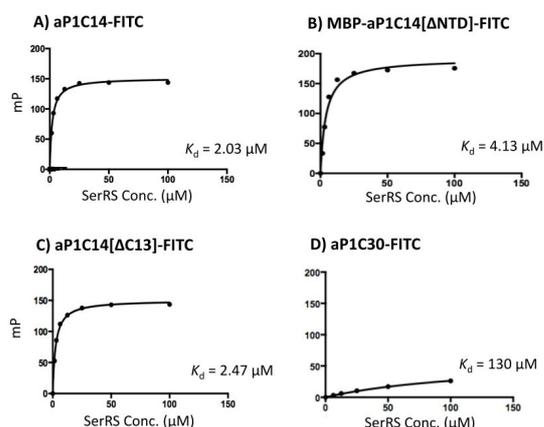


図3 触手様タンパク質と SerRS の相互作用解析

位で相互作用することを示唆するものである。

以上の結果をまとめると、触手様タンパク質はC末端ドメインのN末端領域でアミノアシル tRNA 合成酵素と相互作用していることが明らかになった。一方我々は過去の研究で、触手様タンパク質はC末端ドメインのC末端を介して翻訳因子と相互作用していることを明らかにしているが、今回我々は、翻訳因子との結合の要となるその領域はアミノアシル tRNA 合成酵素との相互作用に関与していないことを明らかにした。これらの結果は、アミノアシル tRNA 合成酵素と翻訳因子が同時に触手様タンパク質と相互作用し、そして翻訳効率を上昇させる反応が存在することを示唆するものである。なお、以上の実験結果は予備実験段階であり、今後実験をさらに精査する。

次に我々は、触手様タンパク質とアミノアシル tRNA 合成酵素との共結晶化に取り組んだ。その結果、現在までに微結晶を得ることに成功している (図 4)。

なお、本研究の一環で触手様タンパク質に結合する新規因子も探索していた結果、IF5B、ABCE1、YchF 等の新たな因子を数種同定することができた。また、触手様タンパク質と翻訳因子との相互作用メカニズムに

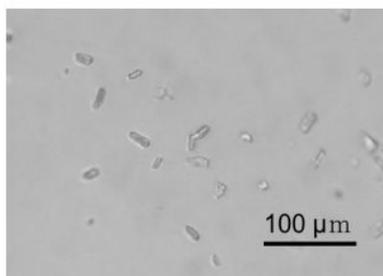


図4 触手様タンパク質と SerRS の共結晶

についても新たな知見を得ることができた。

## 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. Murakami R., Singh C.R., Morris J., Tang L., Harmon I., Azuma T., Miyoshi T., \*Ito K., \*Asano K., Uchiyumi T. (2018) The interaction between the ribosomal stalk proteins and translation initiation factor 5B promotes translation initiation. *Mol. Cell Biol.* in press 査読有り

2. Honda T., Imai H., Suzuki T., Miyoshi T., Ito K., \*Uchiyumi T. (2017) Binding of translation elongation factors to individual copies of the archaeal ribosomal stalk protein aP1 assembled onto aP0. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483(1), 153-158. 査読有り

3. Murakami R., Miyoshi T., \*Uchiyumi T., \*Ito K. (2016) Crystal structure of translation initiation factor 5B from the crenarchaeon *Aeropyrum pernix*. *Proteins* 84(5), 712-717. 査読有り

4. Imai H., Miyoshi T., Murakami R., Ito K., Ishino Y., \*Uchiyumi T. (2015) Functional role of the C-terminal tail of the archaeal ribosomal stalk in recruitment of two elongation factors to the sarcin/ricin loop of 23S rRNA. *Genes to Cells* 20(7), 613-624. 査読有り

[学会発表](計22件)

1) 阿部 高也, 今井 大達, 西川 周一, 伊東 孝祐, 内海 利男 (2017) 変異導入解析によるリボソームストークとリサイクル因子 ABCE1 間相互作用の検証; 第40回日本分子生物学会、兵庫 (12月6日-12月9日、2017年)

2) 丸山 圭, 川村 桃子, 今井 大達, 伊東 孝祐, 内海 利男 (2017) リボソームストークとGTP結合型翻訳伸長因子 EF1A 間複合体のX線結晶構造解析; 第40回日本分子生物学会、兵庫 (12月6日-12月9日、2017年)

3) 今井 大達, 阿部 高也, 三好 智博, 伊東 孝祐, 内海 利男 (2017) 翻訳リサイクル因子 ABCE1-リボソームストーク間相互作用とそ

の役割; 第 40 回日本分子生物学会、兵庫(12月6日-12月9日、2017年)

4) Imai H., Abe T., Miyoshi T., Ito K., Uchiyama T. “Archaeal ribosomal stalk protein aP1 directly binds to the ribosome recycling factor aABCE1 and promotes ribosome-dependent ATP hydrolysis” EMBL2017 Protein Synthesis and Translational Control (Heidelberg, Germany, September 6-9, 2017)

5) 青木 彩香, 今井 大達, 村田 菜摘, 伊東孝祐, 内海 利男 (2017) 新規古細菌リボソーム結合因子 aYchF の tRNA に依存する機能に関する研究; 第 19 回日本 RNA 学会年会、富山(7月19日-21日、2017)

6) 内海 利男, 今井 大達, 三好 智博, 伊東孝祐 (2016) 翻訳反応の各ステージで機能するリボソームストーク・翻訳因子間相互作用; 第 39 回日本分子生物学会、横浜(11月30日-12月2日、2016年)

7) 村田 菜摘, 八重嶋 千彰, 三好 智博, 伊東孝祐, 石野 園子, 石野 良純, 内海 利男 (2016) 超好熱性アーキアを用いたリボソーム結合性タンパク質の解析: 新規ストーク結合性因子の検出; 第 39 回日本分子生物学会、横浜(11月30日-12月2日、2016年)

8) 丸山 圭, 今井 大達, 三好 智博, 伊東孝祐, 内海 利男 (2016) リボソームストーク C 末端部位と翻訳因子間の結合多様性; 第 39 回日本分子生物学会、横浜(11月30日-12月2日、2016年)

9) 今井 大達, 阿部 高也, 三好 智博, 伊東孝祐, 内海 利男 (2016) 翻訳リサイクル反応におけるリボソームストークタンパク質 P1 の機能解析; 第 39 回日本分子生物学会、横浜(11月30日-12月2日、2016年)

10) Imai H., Miyoshi T., Ito K., Uchiyama T. “A role of archaeal ribosomal stalk protein aP1 in ribosome recycling: binding to an ABC-family ATPase aABCE1 and stimulation of ribosome-dependent ATP hydrolysis” RNA2016 (Kyoto, Japan, June 28-July 2, 2016)

11) 丸山 圭, 三好 智博, 伊東孝祐, 内海利男 (2016) 蛍光偏向分析によるリボソームストーク C 末端と翻訳因子間の結合親和性の検出; 第 57 回新潟生化学懇話会、6月25日、新潟

12) 今井 大達, 三好 智博, 伊東孝祐, 内海利男 (2016) 翻訳異常停滞時におけるリボソームストークタンパク質 P1 の機能解析; 第 57 回新潟生化学懇話会、6月25日、新潟

13) 村上僚, 伊東孝祐, Jacob Morris, Leiming Tang, 三好智博, 浅野桂, 内海利男 リボソームサブユニット会合における翻訳開始因子 IF5B とリボソームストーク間相互作用の構造・機能基盤 第 38 回日本分子生物学会、第 88 回日本生化学会大会、合同大会、2015/12/1-4、兵庫

14) 村田菜摘, 八重嶋千彰, 三好智博, 伊東孝祐, 石野良純, 内海利男 超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* におけるリボソーム結合性タンパク質の網羅的解析 第 38 回日本分子生物学会、第 88 回日本生化学会大会、合同大会、2015/12/1-4、兵庫

15) 丸山圭, 三好智博, 伊東孝祐, 内海利男 リボソームストーク C 末端と翻訳因子間の結合親和性の分析 第 38 回日本分子生物学会、第 88 回日本生化学会大会、合同大会、2015/12/1-4、兵庫

16) 須田真広, 今井大達, 三好智博, 伊東孝祐, 内海利男 古細菌リボソームにおける種特異的な翻訳因子受容性をもたらす分子要因 第 38 回日本分子生物学会、第 88 回日本生化学会大会、合同大会、2015/12/1-4、兵庫

17) 今井大達, 三好智博, 伊東孝祐, 内海利男 翻訳終結段階および異常停止時におけるリボソームストークタンパク質のはたらき 第 38 回日本分子生物学会、第 88 回日本生化学会大会、合同大会、2015/12/1-4、兵庫

18) 伊東孝祐, 今井大達, 鈴木隆寛, 村上僚, 三好智博, 内海利男 リボソームストークタンパク質と翻訳伸長因子 EF1 $\alpha$  の機能的相互作用の分子機構解析 第 10 回無細胞生命科学研究会、2015/10/13-14、神奈川

19) 今井大達, 三好智博, 村上僚, 伊東孝祐, 石野良純, 内海利男 ストークタンパク質を介した翻訳制御機構の研究 第 55 回生命科学夏の学校、2015/8/28-3、千葉

20) 村上僚, Jacob Morris, Leiming Tang, 三好智博, 浅野桂, 伊東孝祐, 内海利男 リボソームストークタンパク質と eIF5B の相互作用は翻訳開始反応におけるサブユニット会合を促進する 第 17 回日本 RNA 学会年会、2015/7/15-17、北海道

21) 村上僚, Jacob Morris, Leiming Tang, 三好智博, 浅野桂, 伊東孝祐, 内海利男 IF5B とリボソームストークタンパク質複合体の構造機能解析

平成 27 年度日本生化学会関東支部例会 第 26  
回新潟生化学懇話会、2015/6/20、新潟

22) 今井大達、三好智博、村上僚、伊東孝祐、  
石野良純、内海利男  
リボソームストークタンパク質を介した翻  
訳伸長因子の作用機構  
平成 27 年度日本生化学会関東支部例会 第 26  
回新潟生化学懇話会、2015/6/20、新潟

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.sc.niigata-u.ac.jp/biologyindex/uchiumi-ito/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊東 孝祐 (ITO Kosuke)  
新潟大学・自然科学系・助教  
研究者番号：20502397

### (2) 研究分担者

三好 智博 (MIYOSHI Tomohiro)  
松本歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：60534550

### (3) 連携研究者

内海 利男 (UCHIUMI Toshio)  
新潟大学・自然科学系・教授  
研究者番号：50143764

### (4) 研究協力者

( )