

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 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370078

研究課題名（和文）翻訳反応駆動部となるリボソームタンパク質複合体の分子機能解剖

研究課題名（英文）Molecular Dissection of the Ribosomal Protein Complex that Plays a as Drive Part of Translation apparatus

研究代表者

内海 利男（UCHIUMI TOSHIO）

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：50143764

研究成果の概要（和文）：すべての生物種のリボソームにはストークと呼ばれる柔軟で特徴的なタンパク質複合体が含まれ、リボソーム機能面で重要な役割を果たしている。本研究では主に超好熱性古細菌のリボソームストークを対象に、生化学と結晶構造解析の手法で構造と機能を解析した。その結果、ストークは aP0(aP1)₂(aP1)₂(aP1)₂ の 7 量体を形成すること、aP0 と aP1 成分はアミノ酸配列が同一の C 末端部位を保持し、これらの部位が各種 GTPase 翻訳因子に直接結合し、因子を効率よくリボソーム上にリクルートする機能を担うことが明らかにされた。

研究成果の概要（英文）：Ribosomes in all organisms have a unique flexible structure composed of ribosomal protein complex, termed the stalk, which plays a crucial role in ribosome function. In this research subject, we have investigated the structure and function of the ribosomal stalk in a hyperthermophilic archaeon by biochemical and crystallographic analyses. The results showed that the archaeal stalk is composed of aP0 and aP1, which form the heptameric complex aP0(aP1)₂(aP1)₂(aP1)₂, and that the C-terminal sequence, which is shared by aP1 and aP0, directly binds to translation factors. We concluded that the 7 copies of C-terminal tails of aP1/aP0 in the complex participate in efficient recruitment of translation factors onto the ribosome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：リボソームの分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：リボソーム／リボソームタンパク質／翻訳／タンパク質複合体／結晶構造

1. 研究開始当初の背景

リボソーム大亜粒子にはタンパク質合成（翻訳）に関与する各種 GTPase 翻訳因子を受容する機能部位（GTPase センター）が存在する。この部位は、タンパク質合成過程で必

要となる分子動力エネルギーを GTP の加水分解により提供し翻訳の分子機構を動かす、いわば“駆動部”に相当する。この機能部位には運動性を示す特徴的なタンパク質複合体が有り、リボソーム機能にとって重要な役割を担うことが知られてい

た。ストークは柔軟性に富み、リボソーム粒子の結晶構造ではその実態がつかめず、ポスト結晶時代のリボソーム研究に残された最もミステリアスな対象であった。研究代表者らは本研究開始時点までに、古細菌リボソームのストークに関する生化学的分析を行い、試験管内での複合体再構成と機能解析に成功していた。興味深い結果として、古細菌ストークは同種のGTPase因子ばかりでなく真核の因子も受容することを明らかにした (Nomura et al, *Biochem. J.* 396, 565-571 [2006])。この結果は、古細菌ストークの構造・機能面の研究が真核生物ストークの実態を探る上でも重要であることを示すものである。

2. 研究の目的

タンパク質合成の仕組みを分子レベルで理解するうえで、ストークのタンパク質複合体構造とその動的機能を解明することは極めて重要である。本研究では、真核型機能を有し、結晶化や分子間相互作用の解析に有利な超好熱性古細菌のタンパク質複合体を主要な対象とし、分子解剖、分子間相互作用、複合体結晶構造解析により、これまで解明できなかったタンパク質合成過程におけるストーク複合体の構造、動態、機能の関係を明らかにする。得られた知見は、真核のリボソームストーク研究に展開する他、大腸菌タンパク質発現系改良の応用研究への展開も試みる。

3. 研究の方法

平成 21~23 年度の 3 年間で、以下の (1) ~ (5) のテーマに対し、それぞれの手法により取り組む：

- (1) 古細菌 (*Pyrococcus horikoshii*) の aP0 と aP1 タンパク質より構成されるストーク複合体を結晶化し、その詳細な立体構造を解明する。
- (2) 古細菌リボソームストークに 3 個含まれる運動性 aP1 二量体のそれぞれのはたらきを、各二量体が結合できなくなる aP0 変異体を用いた生化学的機能解析により解析する。
- (3) リボソーム表面で動的挙動をされると考えられる aP1 の C 末端ドメインの構造、動態および機能を、

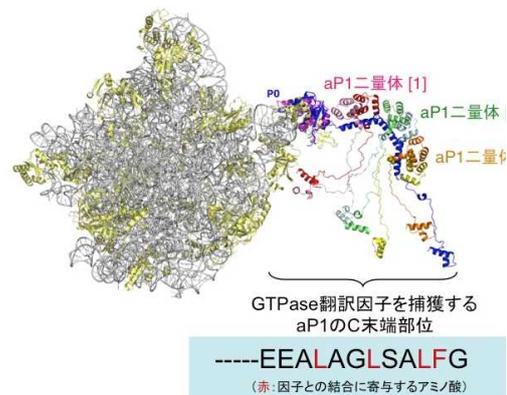
C 末端配列の合成ペプチドを使用した生化学解析と結晶構造解析により解明する。

- (4) 真核と古細菌 P0 タイプタンパク質に存在する特有ドメイン (Ex 部位) のはたらきを、Ex 部位削除変異体を用いた生化学的機能解析により明らかにする。
- (5) 古細菌ストーク研究から得られた知見を真核リボソームストークの構造・機能研究に展開する。真核ストークの研究にはカイコのリボソームタンパク質 P0、P1、P2 を用いる。さらに、知見を大腸菌リボソームストークにも展開し、大腸菌リボソームの機能改変による有効利用の可能性を探る。

平成 21 年度には主に (1)、(2) および (3) の一部の解析を行った。平成 22 年度は主に (3) を行ったが、その過程で真核との比較をする必要があり、(5) の真核ストークの解析も行った。平成 23 年度は (3) を継続した他 (4) と (5) の実験を実施し、研究を総括した。

4. 研究成果

- (1) 古細菌ストーク複合体の結晶構造：
ストーク複合体結晶の回折像より 2.4 オングストロームの分解能で構造を決定した。P0 の N 末端部位は球状のドメイン構造をとり、C 末端側には縦に 3 個のアルファヘリックス構造が繋がっていた。aP1 は安定な二量体を形成し、3 個の aP1 二量体が N 末端側の疎水性アミノ酸を介して aP0 の C 末端側の各ヘリックスと疎水結合し 7 量体を形成していた。得られた複合体構造はリボソーム大亜粒子の結晶構造 (aP0/aP1 構造が欠如している) に矛盾なく fitting でき、リボソーム全体像を示すことに成功した (図 1)。



- 図 1 リボソーム構造に fitting されたストーク複合体の結晶構造 (右側)
- (2) 3 個の aP1 二量体のはたらき：
aP0 上の aP1 二量体結合部位の疎水性

アミノ酸を親水性アミノ酸に置換し、3個のうち1または2個のaP1二量体を脱離させた変異体複合体を作成し、翻訳因子受容性の機能解析を行った。この結果、3個のaP1二量体はそれぞれ単独で、eEF-2依存GTPase活性を保持することが明らかとなり、各aP1二量体とも独立して機能を保有していることが判明した。

(3) aP1のC末端部位のはたらき：

nativeゲル電気泳動により、aP1が翻訳GTPase因子aEF-1a、aEF-2、およびaIF5Bとそれぞれ直接結合することを示した。さらにそれらの結合は、aP1のC末端の18アミノ酸に対応する合成ペプチドを添加することで阻害され、結合がC末端を介することが示された。

aP1タイプのタンパク質間でC末端から2番目と3番目の疎水性アミノ酸は古細菌から真核まで高度に保存されていた。そこでこれらのアミノ酸を他の親水性アミノ酸に置換したところ翻訳GTPase因子との結合性が完全に消失した。これらの結果より、aP1のC末端に存在する疎水性アミノ酸がGTPase因子との結合に直接関わるということが明らかにされた。

その他、GTP/GDPの存在がC末端・aEF-2間の結合性に影響するかどうか生化学的に解析したが、GTP/GDPのいずれの添加もaP1・aEF-2の結合性に効果を与えなかった。すなわちaP1のC末端は翻訳GTPase因子がGTP加水分解前後で等しく結合性を保持することが示唆された(図2)。

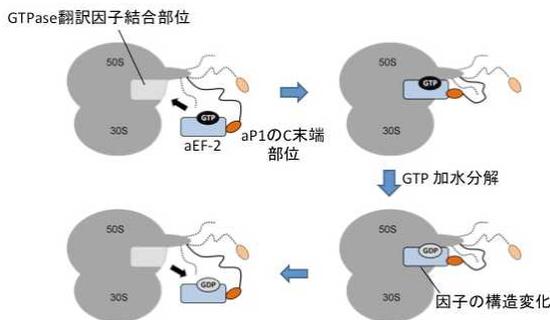


図2 リボソーム上でのaEF-2(青)によるGTP加水分解の前後で保持されるaP1のC末端部(茶)との相互作用モデル

(4) aP0/P0に存在するEx部位について：

古細菌aP0と真核P0には存在するが真正細菌相同体であるL10には存在しない分子中央のEx部位の機能を、カイコ(真核)と大腸菌(真正細菌)間のキメラ型P0/L10を各種作成し、解析した。その結果、Ex部位は真核型のGTPase因子の受容性に寄与し、真正細菌の因子受容性には効果を示さなかった。Ex部位が真核/古細菌型の翻訳制御に関わる可能性が示された。

(5) 真核/真正細菌ストーク研究への展開：

① 古細菌aP0とaP1の結合機構を真核のP0とP1/P2の結合機構研究に展開し古細菌と真核間で同様の結合モードであることが示された。

② 古細菌aP1のC末端部位の機能面に関して得られた知見を真核のP1/P2に展開し機能解析を行ったところ、真核でも同様にC末端部位の疎水性アミノ酸の役割が明確に示され、C末端部位の保存された役割が明らかになった。

③ カイコ(真核)と大腸菌(真正細菌)間のキメラ型P0/L10を各種作成し真正細菌のGTPase因子受容性に必須となる部位を解析したところL10のC末端とそこに結合するL12二量体が存在すれば低いながら真正細菌のGTPase因子の受容性を示した。従って、大腸菌L10のN末端ドメインをカイコ等の真核型配列に置換することでかなり減速型の駆動部を大腸菌リボソームに導入できる可能性が示された。

以上の結果より、リボソームのストークは複数コピーの共通配列を有するタンパク質より構成され、リボソーム上で柔軟に運動し、各種GTPase翻訳因子を効率よく捕獲し、翻訳反応の効率を高めることが推察された。ストークのはたらきとして、各種因子を捕獲する複数の“触手”としてのモデルを考案した(図3)。

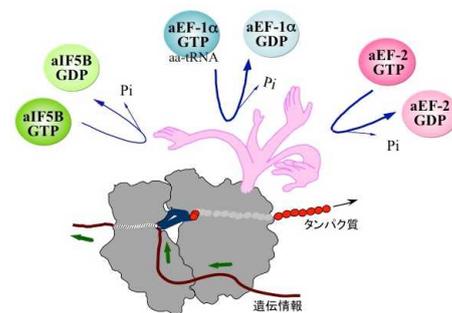


図3 各aP1分子のC末端部位が各種GTPase翻訳因子を捕獲する触手のようなはたらきを示すイメージ

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 11 件)

- ① Nomura, N., Honda, T., Baba, K., Naganuma, T., Tanzawa, T., Arisaka, F., Noda, M., Uchiyama, S., Tanaka, I., Yao, M., and Uchiyumi T.; Archaeal ribosomal stalk protein interacts with translation factors in a nucleotide-independent manner via its conserved C terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 109, 3748-3753 (2012) 《査読有》
- ② Mochizuki, M., Kitamyō, M., Miyoshi, T., Ito, K., and Uchiyumi T.; Analysis of Chimeric Ribosomal Stalk Complexes from Eukaryotic and Bacterial Sources: Structural Features Responsible for Specificity of Translation Factors. *Genes to Cells* 17, 273-284 (2012) 《査読有》
- ③ Muhs, M., Yamamoto, H., Ismer, J., Takaku, H., Nashimoto, M., Uchiyumi, T., Nakashima, N., Mielke, T., Hildebrand, P. W., Nierhaus, K. H., and Spahn, C. M.; Structural basis for the binding of IRES RNAs to the head of the ribosomal 40S subunit. *Nucleic Acids Res.* 39, 5264-5275 (2011) 《査読有》
- ④ Saito, K., Kobayashi, K., Wada, M., Kikuno, I., Takusagawa, A., Mochizuki, M., Uchiyumi, T., Ishitani, R., Nureki, O., and Ito, K.; An omnipotent role of archaeal EF1 α in translational elongation and termination, and quality control of protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 107, 19242-19247 (2010) 《査読有》
- ⑤ Naganuma, T., Nomura, N., Yao, M., Mochizuki, M., Uchiyumi, T., and Tanaka, I.; Structural basis for translation factor recruitment to the eukaryotic/archaeal ribosomes. *J. Biol. Chem.* 285, 4747-4756 (2010) 《査読有》
- ⑥ Hattori, M., Jin, Y., Nishimasu, H., Tanaka, Y., Mochizuki, M., Uchiyumi, T., Ishitani, R., Ito, K., and Nureki, O.; Structural basis of novel interactions between the small-GTPase and GDI-like domains in prokaryotic FeoB iron transporter. *Structure*, 17, 1345-1355 (2009) 《査読有》
- ⑦ Miyoshi, T., Nomura, T., and Uchiyumi,

T.; Engineering and characterization of the ribosomal L10/L12 stalk complex: a structural element responsible for high turnover of the EF-G-dependent GTPase. *J. Biol Chem.* 284, 85-92 (2009) 《査読有》

[学会発表] (計 26 件)

- ① 内海利男、野村直子、本田貴嘉、馬場健太朗、長沼孝雄、田中勲、姚閔；リボソームには複数の“腕”がある；第1回 RIBOSOME MEETING, 2012年3月15日、広島大学生物生産学部《招待》
- ② Ryo Maruyama, Kazuyuki Yusa, Masahiro Mochizuki, Kosuke Ito, Takaomi Nomura, Toshio Uchiyumi; Introduction of a Lepidoptera-specific sequence within the GTPase-associated center of 28S rRNA into *Escherichia coli* 23S rRNA: Effects of the mutations; The 16th Annual Meeting of the RNA Society, Kyoto, 2011, June 14-18, Kyoto Japan
- ③ 馬場健太朗、姚閔、田中勲、内海利男；動物リボソーム stalk ヘテロ二量体の分子集合モードの解析；第11回日本蛋白質科学会、2011年6月7-9日、ホテル阪急エキスポパーク・大阪
- ④ 望月正弘、北名真澄、伊東孝祐、内海利男；真核型リボソームのストークアンカータンパク質 P0 を構成する 3 ドメインの機能解析；第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会、2010年12月7-10日、神戸ポートアイランド・神戸
- ⑤ 内海利男；リボソームの翻訳因子作用中心に位置する動的タンパク質複合体；第10回日本蛋白質科学会（ノーベル賞特別シンポジウム）、2010年6月18日、札幌コンベンションセンター・札幌《招待》
- ⑥ Uchiyumi, T.；The stalk protein complex at the ribosomal GTPase-associated center; Current Issues of Ribosomal Structure and Function, 2010, April 9, Berlin Germany 《招待》
- ⑦ 望月正弘、長沼孝雄、内海利男；真核生物・古細菌リボソームタンパク質 P0 に存在する特徴的なドメインの役割；第32回日本分子生物学会、2009年12月9-12日、パシフィコ横浜・横浜
- ⑧ 野村直子、長沼孝雄、姚閔、内海利男、田中勲；リボソーム GTPase センターを構成するストークと翻訳因子の相互作用解析；第32回日本分子生物学会、2009年12月9-12日、パシフィコ横浜・横浜
- ⑨ 渡辺裕樹、三好智博、内海利男；リボソーム 16S RNA・helix 18 の G505-C507、G524-C526 間塩基対合の生化学的検証：EF-G 依存 GTPase 活性への関与；

第 11 回日本 RNA 学会、2009 年 7 月 27-29 日、朱鷺メッセ・新潟

〔図書〕(計 1 件)

- ① 飯塚哲太郎、伊藤健治、内海利男、大井浩明他、岡本研、小澤敬也、上代淑人他、19 名、丸善(株)、ハーバー・生化学、2011 年 1 月 31 日、総ページ 812 (415~458 担当)

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称：大腸菌を用いたタンパク質の合成方法

発明者：内海利男、朝妻悟、水口伊玖磨、山本紘、三ッ井敏明

権利者：国立大学法人 新潟大学

種類：特許

番号：4 7 2 9 7 1 0

取得年月日：2011 年 4 月 28 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

・報道関連情報

①新潟日報(朝刊)2012年3月8日に掲載

②新潟大学ホームページに掲載
<http://www.niigata-u.ac.jp/top/pickup/240229.html>

・ホームページ情報

①研究室

<http://www.sc.niigata-u.ac.jp/biologyindex/uchiumi-ito/index.html>

②所属学科(新潟大学理学部生物学科)

<http://www.sc.niigata-u.ac.jp/biologyindex/biologyindex.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内海 利男 (UCHIUMI TOSHIO)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：50143764

(2) 研究分担者

伊東 孝祐 (ITO KOSUKE)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：20502397

姚 閔 (YAO MINN)

北海道大学・大学院先端生命科学研究所・准教授

研究者番号：40311518