

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2015～2017

課題番号：15KK0250

研究課題名（和文）哺乳類ミトコンドリア蛋白質合成系の再構築と分子機構の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Biochemical and structural study on the mechanism of mammalian mitochondrial translation system(Fostering Joint International Research)

研究代表者

富田 野乃（竹内野乃）(Tomita, 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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,400,000円

渡航期間： 5ヶ月

研究成果の概要（和文）：様々な哺乳類ミトコンドリア翻訳伸長リボソーム複合体のCryoEM構造解析に取り組み、渡航期間中にPRE-recycling複合体(mtRRFmt/55S)と POST-recycling複合体(mtRRF/mtEF-G2・GDPNP/39S)の構造を高分解能で決定した。ミトコンドリアにおけるリボソームリサイクリングの分子機構、リサイクリングとトランスロケーションにおけるEF-Gの作用機序、等の知見が得られた。ミトコンドリアリボソームと翻訳因子の複合体の構造について世界で初めての報告であり、薬剤デザインなどの医療応用にも直ちに結びつく成果である。

研究成果の概要（英文）：In the present work, we perform the biochemical and CryoEM structural study of various mammalian mitochondrial ribosomal complexes. During the stay in the accepting institute in Germany, the structures of PRE-recycling complex (mtRRFmt / 55S) and POST-recycling complex (mtRRF / mtEF-G2-GDPNP / 39S) were determined at high resolution. The insight for the molecular mechanism of ribosome recycling in mammalian mitochondria, and for the mechanism of action of EF-G in ribosome recycling and translocation, were obtained. It is the first report on the structure of the mitochondrial ribosomes, which are complexed with the translation factors. It is expected that the obtained knowledge is immediately linked to medical applications such as drug design.

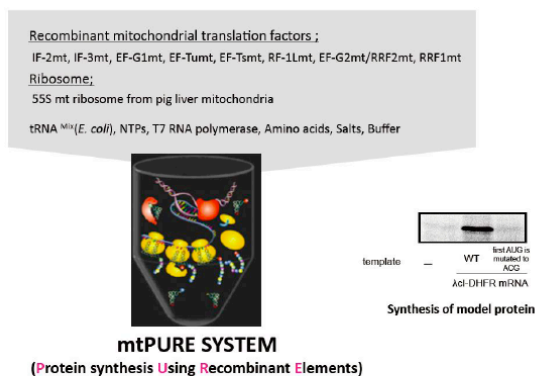
研究分野：分子生物学

キーワード：タンパク質合成 ミトコンドリア クライオ電子顕微鏡観察

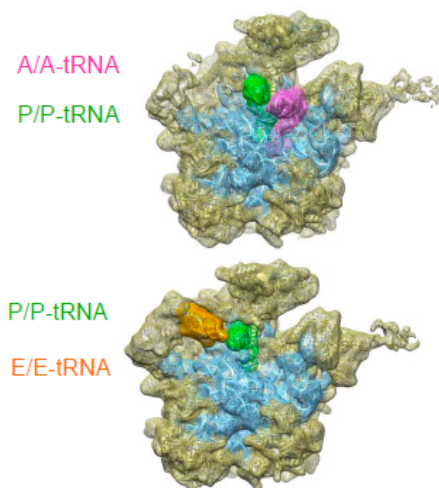
1. 研究開始当初の背景

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おり、またミトコンドリアのリボソームや翻訳因子に誤作用して副作用をもたらす薬剤も報告されている。ミトコンドリアリボソームの機能構造相関を解明する必要性が高まっており、このことは最近の精力的なミトコンドリアリボソーム (28S サブユニット、39S サブユニットまたは 55S 単体) の構造解析によっても裏付けられる(39S, Nature, 2013; 28S, PNAS, 2014; 39S, Science, 2014; 39S, Nature, 2014; 55S, Science, 2015_a; 55S, Science, 2015_b)。

申請者はこれまでにミトコンドリア翻訳因子の生化学的解析、発現制御の研究、及びミトコンドリア翻訳系の制御の研究を行ってきており、哺乳類ミトコンドリア由来再構築型生体外蛋白質合成系の構築にも成功している (mtPURE system) (図 1)。ミトコンドリアリボソームの構造解析にも取り組んできた(図 2)。



【図 1】再構築型生体外哺乳類ミトコンドリア蛋白質合成系 (mtPURE system)



【図 2】ミトコンドリアリボソームの cryoEM 構造 MFV をコードする mRNA を利用し、あらかじめ A-site に acPhe-tRNA と P-site に tRNA^{Met} をプログラムした PRE トランスロケーションリボソーム複合体(PRE-TL)を得た。この複合体にミトコンドリア mtEF-G1 を作用させることにより、POST-TL 複合体を得た。(左) PRE-TL、(右) POST-TL。

2. 研究の目的

本研究課題ではミトコンドリアリボソームの構造解析に関わる研究項目を重点的に発展させるため、Prof. Spahn C. (Charité、ドイツ) との共同研究を強化する。翻訳伸長過程 (終結過程も含む) におけるリボソーム複合体の構造動態を網羅的に理解することを目指し、以下に挙げたミトコンドリア翻訳伸長リボソーム複合体(No.1-9)の CryoEM 構造解析を進める。

1. PRE-Translocation(TL) : P-site tRNA(fMet), A-site acPhe-tRNA/55S [伸長、トランスロケーション] ●
2. POST-TL : E-site tRNA(fMet), P-site acPhe-tRNA/55S [伸長、トランスロケーション] ●
3. mtEF-G1 • GDPNP/55S [伸長、トランスロケーション] ○
4. mtEF-G2 • GDPNP/55S [終結、リサイクリング] ○
5. mtRRF/55S [終結、リサイクリング] ○
6. mtRRF • mtEF-G2 • GDPNP/39S [終結、リサイクリング] △
7. mtRF1L/55S [終結] △
8. mtEF-Tu • GTP • Ser-tRNA(UCN)/55S [伸長、デコーディング] ■
9. mtEF-Tu • GTP • Ser-tRNA(AGY)*/55S [伸長、デコーディング] ■

- : 構造決定完了、論文投稿準備中(図 2)、
- : 複合体形成済、構造解析進行中、
- △ : 複合体形成済、構造解析未着手、
- : 複合体形成条件の検討中

*[]は知見が得られる翻訳伸長素過程を示す。
*tRNA(Ser,AGY):鈴木勉教授(東京大学)より恵与された。

EF-G2mtは申請者自身が見いだした哺乳類ミトコンドリアにおけるリボソームリサイクリングを担う新規の翻訳因子である (Tsuboi et al.(2009) Mol.Cell)。バクテリアでは、翻訳伸長因子G (EF-G) が、翻訳伸長過程におけるトランスロケーション反応とリボソームリサイクリング過程におけるリボソーム解離反応、の二つの反応を兼担するが、ミトコンドリアではトランスロケーション反応とリボソーム解離反応が別々の翻訳因子 (EF-G1mtおよび EF-G2mt) によって分担されている。EF-G2mtに関する構造解析からは、未だ不明な点が多いトランスロケーション機構について重要な知見が得られると期待される。

mtRF1Lも申請者らが同定した翻訳終結因子である (Nozaki et al. (2008) Genes Cells.)

哺乳類ミトコンドリアの翻訳因子はそのRNA成分が短縮されている特徴がある。リボソームではrRNAが短縮されて、その機能をタンパク質成分が補っていると考えられて

いる。通常 tRNA はクローバーリーフ構造を有するが、哺乳類ミトコンドリアでは tRNA(Ser, AGY)のようにDアームが欠失した分子種も機能している。このようなユニークなミトコンドリアの翻訳系の分子基盤を解明することにより、全ての生物の翻訳機構の本質を理解する糸口にも結びつくと考えている。

3. 研究の方法

複合体の形成、グリッドの作成、イメージの取得と解析、モデリングを順次進めた。

滞在先 (Prof. Spahn C., Charité, ドイツ) ではシステム (電子顕微鏡 TecnaiG2 Polara, FEI; 電子直接検出カメラ K2 Summit detector, Gatan)が順調に稼働しており、今回イメージの取得と解析、モデリングを滞在先にて行った。

4. 研究成果

図3に、申請者が渡航先滞在中に決定したミトコンドリアリボソームリサイクリング因子(EF-G2mt および RRFmt)とリボソーム複合体の構造を示す(複合体 No.4-6)。

MFV をコードする mRNA を利用し、予め P-site に tRNA^{Met} をプログラムしたモデル翻訳終結リボソーム複合体(PoTC)を得た。この PoTC 複合体にリサイクリング因子(EF-G2mt および RRFmt)を作用させたサンプルについて構造解析を進めた。その結果、リサイクリングにおける様々な素過程に相当するリボソーム複合体の構造が得られた。分解能はそれぞれ~4Å である。

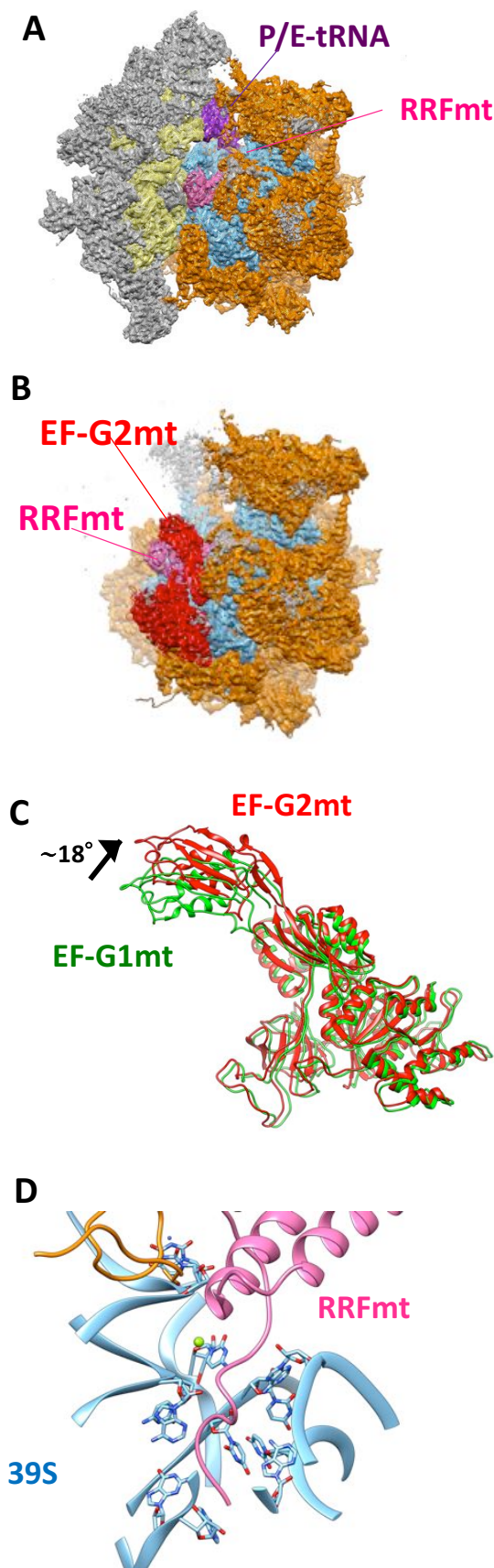
(A) RRFmt, tRNA, 55S リボソーム複合体(複合体 No.5)。リボソーム解離反応におけるはじめの素過程に相当する。

(B) RRFmt, EF-G2mt, 39S リボソーム大サブユニット複合体(複合体 No.6)。リボソーム解離反応後の素過程に相当する。RRFmt には、バクテリア RRF と比較して、N 末に 20 アミノ酸からなるユニークな付加配列が保存されている。この領域によって RRFmt は高いリボソーム親和性をもつ。解離したリボソーム大サブユニット上に RRF と EF-G が共存した構造はこれまで報告がなかった。

(C) EF-G1mt (複合体 No.3)と EF-G2mt (複合体 No.4 および 6)の比較。

(D) RRFmt の N 末端領域とリボソームトンネルの相互作用の様子(複合体 No.5)。

ミトコンドリアのリボソームリサイクリング因子を用いることにより、これまでバクテリアの因子では形成が難しかった複合体が得られた。リボソームリサイクリングにおける RRF の作用機序、トランスロケーションとリボソームリサイクリングにおける EF-G の作用機序の違い、リボソームリサイクリングにおける EF-G による GTP 加水分解の役割、などが初めて明らかになった (投稿準備中)。



【図3】リサイクリング因子(EF-G2mt および RRFmt)・リボソーム複合体の cryoEM 構造 (詳細は本文参照)

共同研究先の Spahn 博士のグループは、クライオ電子顕微鏡観察によるリボソーム複合体の構造解析において世界で卓越したグループである。これまでにバクテリア、および真核細胞のリボソーム構造動態について先駆的な研究を行っている。日本国内に当該技術をもった研究者はいない。一方、申請者のグループは、主に生化学的解析技術を基盤としてミトコンドリアの翻訳系の基礎研究に貢献してきたが、今回の国際共同研究を通じて、申請者自身のグループでも構造解析を進められるようにすることを目指している。近年、ゲノム解析に基づいてミトコンドリア翻訳因子の病的変異を同定し、それをきっかけにミトコンドリア翻訳系の研究に参入してくる研究者が多い。申請者のグループで構造解析技術を導入することにより、病的変異をもつミトコンドリア翻訳因子の機能解析や、ミトコンドリアリボソームに誤作用する薬剤の作用機序の解析など、一層、国際的な共同研究が推進されるようになると期待している。また、日本国内の翻訳全般の研究水準は大変高いが、CryoEM によるリボソーム複合体の構造決定の技術は遅れている。本研究課題で申請者が当該技術を習得することにより、国内のリボソーム構造解析の技術基盤の向上にも貢献できると考えている。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Hayashi, H., Nagai, R., Abe, T., Wada, M., Ito, K. & Takeuchi-Tomita, N. Tight interaction of eEF2 in the presence of Stm1 on ribosome.
J Biochem. (2018) 163(3):177-185.
doi: 10.1093/jb/mvx070.
査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 富田野乃
再構成型酵母翻訳系の開発とその応用
ConBio2017 (招待講演)
2017 年
2. 富田野乃
再構成型酵母翻訳系の開発とその応用
12 回無細胞生命科学研究会
2017 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] なし
○出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 野乃 (TOMITA, 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) 研究協力者

[主たる渡航先の主たる海外共同研究者]

Christian MT. Spahn
Charité (ドイツ)・Institute of Medical Physics
and Biophysics・教授

[その他の研究協力者]

なし