

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19510229

研究課題名（和文） リボソーム関連Gタンパク質の構造機能解析

研究課題名（英文） Structural and functional study for ribosome-related G protein

研究代表者

竹本 千重 (TAKEMOTO CHIE)

独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・上級研究員

研究者番号 40306527

研究成果の概要：バクテリアに広く保存されているGタンパク質の内、リボソームの生合成に関与していることが示唆されているEraとYjeQ/RsgAに注目し、リボソーム小サブユニット(30S)によるGTPase活性化機構の解明を試みた。超好熱菌YjeQの結晶構造を決定すると同時に、YjeQ-30S複合体の超低温電子顕微鏡による解析行ったところ、N末端のバレルドメインが、翻訳開始因子IF1の結合位置とほぼ一致していた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：リボソーム、Gタンパク質、結晶構造解析、構造機能相関、RNA結合、GTPase

## 1. 研究開始当初の背景

リボソームは、RNA-タンパク質複合体であり、大小2つのサブユニットが会合した構造をとっている。リボソーム上では、遺伝子のDNA配列にしたがって、アミノ酸をペプチド結合によって連結する、いわゆるタンパク質合成反応が行われており、この反応は「翻訳」と呼ばれている。翻訳反応は、反応の開始、ペプチド結合の伸長、反応の終結というように、大きく3つの段階に分けることができるが、それぞれの過程において、GTPをGDPに加水分解するGTP加水分解酵素反応（GTPase反応）を伴う構造変化が反応制御が重要な役割

を果たしている。多くのGタンパク質と同様に、翻訳因子も単独でのGTP加水分解活性は非常に低く、リボソーム上で著しく活性化される。例として、翻訳開始因子IF2、伸長因子EF-TuとEF-G（真核生物ではEF-1 $\alpha$ とEF-2）、終結因子RF3が挙げられる。このうち最も研究が進んでいる伸長因子については、2つの伸長因子が相互作用するリボソーム側の部位は共通しており、大サブユニットに含まれる23S rRNA上の2箇所のhelixであることが、RNAの化学修飾による生化学的実験で示され[文献1]、超低温電子顕微鏡(cryo-EM)による複合体の構造解析もそれを裏付ける結果

を提示している[文献2]。申請者らは、ドイツCharite大学のS. Connell、C. Spahr博士らと共同研究を行い、リボソーム-EF-G複合体のcryo-EM (7Å) による電子密度と、GTPを結合した活性型EF-G-2 (EF-Gホモログ)の結晶構造(2.2Å)の結果を総合的に解釈することで、GTPase活性化に直接的な役割を果たしているのは、上述の2つのRNA helixのうち、毒素タンパク質の標的となるhelix 95 (sarcin-ricin loop)であることを突き止め、これはEF-Tuでも共通であることを提唱した[文献3]。EF-TuとEF-Gは、典型的なGTPaseドメインとβバレルで構成されるRNA結合ドメインを持ち、2つのドメインの立体構造は、相対的な配置も含めて、極めて類似している。また、翻訳開始因子IF2や、終結因子RF3も、単体の全長構造は未決定であるが、GTPaseドメインの配列やリボソームとの複合体のcryo-EM解析によって、伸長因子と同様な相互作用、反応機序で機能していると考えられる。つまり、これらの翻訳関連Gタンパク質のGTPase活性化因子は、リボソーム大サブユニットであり、Gタンパク質の構造類似性は、GTPase活性化因子が共通であることと相関があることを示唆している。

近年様々な生物のゲノムプロジェクトの進捗と共に、Gタンパク質遺伝子が数多く同定され、新たなファミリーの分類が行われている。そのひとつに、バクテリアに広く保存されている、翻訳因子以外のGタンパク質の一群がある。これらはリボソームの生合成に関与していることが示唆されており、Obg, EngA, Era, YjeQ/RsgAなどが挙げられる[文献4]。今日までに、主に大腸菌と枯草菌で機能解析が行われており、GDP結合型あるいはアポ型でのX線結晶構造解析が報告されている。4つのGタンパク質は、いずれもGTPaseドメインと核酸結合モチーフを有しており、細胞分裂やDNAの分配にも関与しているという報告もある。このうちYjeQ/RsgAは、リボソーム小サブユニット(30S)に結合し、さらに30S存在下でGTPase活性が80倍以上促進されることが報告されている[文献5]。一方、申請者らは、ドイツMax-Planck研究所とニューヨーク州立大学のグループとの共同研究により、*T. thermophilus*由来のEraと30S複合体のcryo-EMによる構造解析を行い、その結果、Eraは30Sに含まれる16S rRNAの3'末端付近に結合することを明らかにした[文献6]。また、EraとGTPの非水解アナログ(GMPPNP)との複合体(活性型)の構造決定に成功し(PDB ID: 1WF3)、アポ型と大きく構造が異なることと、Eraも30Sに結合することを明らかにした[文献7]。さらに、30SによってGTPase活性が促進される可能性があることが示唆されるデータを得ている。このように、YjeQとEraは、いずれもまだ生理的機能

は明らかになっていないが、30SによってGTPase活性の促進を受けることと、GTPaseドメインとRNA結合モチーフを保持しているという共通点がある。このことは、EF-TuとEF-Gのように、GTPase活性化因子(リボソーム上の作用部位)を共有している可能性を示唆している。即ち、YjeQとEraのGTPase活性化因子は、30Sサブユニットに含まれている16S rRNAまたはリボソームタンパク質(r-protein)の一部であると考えられ、この活性化因子(部位)を同定することが、これらGタンパク質の生理的機能解明に結びつくことが期待できる。

#### [参考文献]

- [1] Moazed D, Robertson JM, and Noller HF. Interaction of elongation factors EF-G and EF-Yu with a conserved loop in 23S RNA. *Nature* (1988) 334, 362-364.
- [2] Nilsson J. and Nissen P. Elongation factors on the ribosome. *Curr Opin Struct Biol.* (2005) 15, 349-354.
- [3] Connell SR, Takemoto C, Wilson DN, *et al.* Structural basis for interactions of the ribosome with the Switch regions of GTP-bound Elongation factors. *Mol. Cell* (2007) 25, 751-764.
- [4] Caldron C. E and March P. E. Function of the universally conserved bacterial GTPase. *Curr. Opin. Microbiol.* (2003) 6, 135.
- [5] Himeno H, Hanawa-Suetsugu K, Kimura T. *et al.* A novel GTPase activated by the small subunit of ribosome. *Nucleic Acids Res.* (2004) 32(17), 5303-5309
- [6] Sharma MR, Barat C, Wilson DN. *et al.* Interaction of Era with the 30S ribosomal subunit implications for 30S subunit assembly. *Mol. Cell* (2005) 18(3), 319-329.
- [7] Kawazoe M, Takemoto C, *et al.* Crystal structure of *Thermus thermophilus* Era in the GTP form. (2006) in preparation.

## 2. 研究の目的

本課題では、バクテリアリボソームの生合成に関与していることが示唆されている2つのGタンパク質EraとYjeQ/RsgAに着目し、それらのリボソーム上での作用部位や作用機序を明らかにすることによって、生理的機能を解明することを目指している。

そのためには、まずYjeQ単体のGTP型構造を決定し、次に、リボソームとの相互作用を解析して、リボソーム小サブユニット(30S)によるGTPase活性促進機構の解明に取り組む。この際、Era-30Sと比較して、GTPase活性促進メカニズムの類似点や相違点について考察する。また、YjeQの発見者でもある

弘前大学の姫野俊太教授との共同研究によって、YjeQに関する生化学的・生理学的知見や、化学修飾法によるリボソームRNAとの相互作用に関する構造情報を共有する。さらに、ドイツ・フランクフルト大学のS. Connell博士とYjeQ-30S複合体の超低温電子顕微鏡による解析について、共同研究を行う予定である。

本計画では、主に構造機能解析によるアプローチから30Sによるリボソーム関連Gタンパク質(YjeQ, Era)のGTPase活性化機構を解明したい。

### 3. 研究の方法

#### (1) YjeQ/RsgAのGTP結合型(活性型)構造の解明

リボソーム上での活性化機構を解明するためには、単体での活性型構造を得ておく必要がある。立体構造解析には、タンパク質自身の構造安定性が有利に働くので、まずは超好熱菌 *Aquifex aeolicus* VF5由来のYjeQを選択する。ゲノムプロジェクトの登録遺伝子をホモログとの配列相同性から検索すると、2つの遺伝子に分かれて(aq\_168, aq\_169)登録されている。2つのサブユニットに分かれているコードされているか、フレームシフト等で読み枠がずれる仕組みがあるのか、あるいは、途中の配列が間違えているのか等、いくつか可能性が考えられるので、まず、遺伝子をクローニングして配列を確認する。次に、大腸菌による大量発現系を確立し、十分な純度を持つタンパク質を精製する。さらに精製したYjeQを96ウェルシッティングプレートによる結晶化スクリーニング実験にかけ、良好な結晶が得られる条件を探索する。結晶が得られたら、放射光施設 Photon Factoryで回折データを収集し、構造決定を行う。

#### (2) 大腸菌 YjeQ/RsgAの大量精製と単体の立体構造解析

リボソームとYjeQの相互作用解析は、リボソームの大量調製が可能な大腸菌を用いる。大腸菌 *E. coli* YjeQの立体構造は、リボソーム30Sサブユニットとの複合体の構造解析を行う際に、モデル構造として必要なので、複合体解析用に大量調製した一部を結晶化スクリーニングに用いて、構造決定を試みる。また、共同研究先の弘前大学を始め、多くの生化学実験は、大腸菌で行われているので、それらの結果と関連付けて構造機能相関を考察するためにも有利である。

#### (3) YjeQ-30S複合体の特異的形成と精製条件の確立

YjeQ-30S複合体の構造解析を行うためには、複合体が特異的に形成され、安定に存在

する条件を見出すことが重要である。大量調製が可能な大腸菌リボソームとYjeQを用いて、GTP, GDP, またはGTPの非水解アナログGMPPNP存在下で、リボソームとの結合能を測定する。複合体の検出は、超遠心による沈澱法か、密度勾配遠心によるサブユニットの分画法を検討する。また、複合体の均一性は、アガロースゲル電気泳動によって検証する。

#### (4) YjeQ-30S複合体の超低温電子顕微鏡による構造解析 [ドイツ・フランクフルト大学と共同研究]

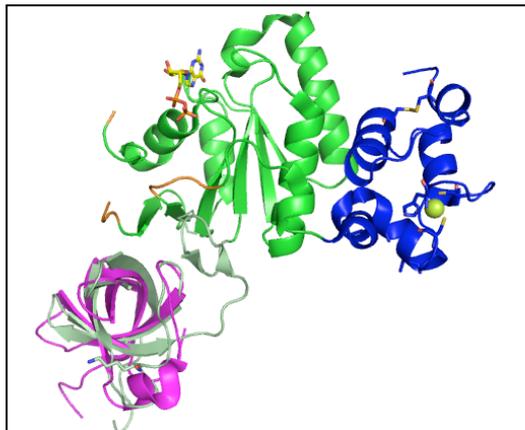
弘前大学の生化学的解析と合わせて、YjeQの結合位置とリボソーム側の相互作用部位を特定する。(3)で大量精製に成功したら、電子顕微鏡像の構造解析サンプルとして、ドイツに送付し、測定・解析を行う。平行して、結晶化も試みる。

### 4. 研究成果

#### (1) リボソーム30Sサブユニット依存性GTP加水分解酵素YjeQ/RsgAのX線結晶構造解析

超好熱菌 *A. aeolicus* VF5ゲノムから、YjeQに部分的に相同性のある2つの遺伝子(aq\_168, aq\_169)の両端のプライマーを使って遺伝子を増幅させたところ、長さ909塩基のひと繋りのORFが得られた。アミノ酸配列を大腸菌などのホモログと比較したところ、妥当な相同性が認められたので、YjeQ遺伝子としてDDBjに登録した(Nucleotide ID: AB299443)。このYjeQを大腸菌BL21(DE3)株で大量発現させて精製した。96条件のスクリーニングを5セット行い、0.2M  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ と20% PEG3350を含む条件で、結晶が得られた。条件を最適化して、結晶を改良し、放射光施設でデータ収集を行った。ホモログの構造(PDB ID: 1U0L)をモデルとして、分子置換法によって位相を決定し、1.9 Åで構造決定を行った(PDB ID: 2YV5)。得られた構造は、N末端からバレルドメイン、Gドメイン、Zn結合ドメインという3つのドメインで構成されており、GドメインにはGDPが結合していた[図1]。γ位のリン酸基を認識するスイッチ領域のうち、GTPの加水分解に直接関与するスイッチ1(Ser196-His204)は、モデルを構築することができなかった。また、スイッチ2( $^{225}\text{DTPG}_{225}$ )もヌクレオチドから大きく外れた位置にあった。全体的に、ホモログの既知構造とよく似ているが、Zn結合ドメインでは、C末端のCys残基によってジスルフィド結合が形成されて、ヘリックスが折り返した構造をとっているのは、*A. aeolicus* YjeQの特徴的な点である。高温(95°C)で生育するための耐熱機構なのかも知れない。また、Znには3つのアミノ酸(Cys257,

His259, Cys265) 残基と塩化物イオンが配位していた。ホモログ間で保存されている Cys252は、ヘリックスの向きが異なるため、配位していない。



〔図1〕 *A. aeolicus* の YjeQ の X 線結晶構造。N 末のバレルドメインに、IF1 の構造（紫）を重ねて示す。G ドメイン（緑）には GDP が結合しているが、 $\gamma$ -位のリン酸基を認識するスイッチ領域（橙）は、構造が崩れている。Zn ドメイン（濃紺）では、His と 2 つの Cys 残基が亜鉛（黄緑）に配位しており、C 末端の 2 本のヘリックス間にジスルフィド結合が形成されている。

### （2）大腸菌 YjeQ/RsgA の大量精製と単体の立体構造解析

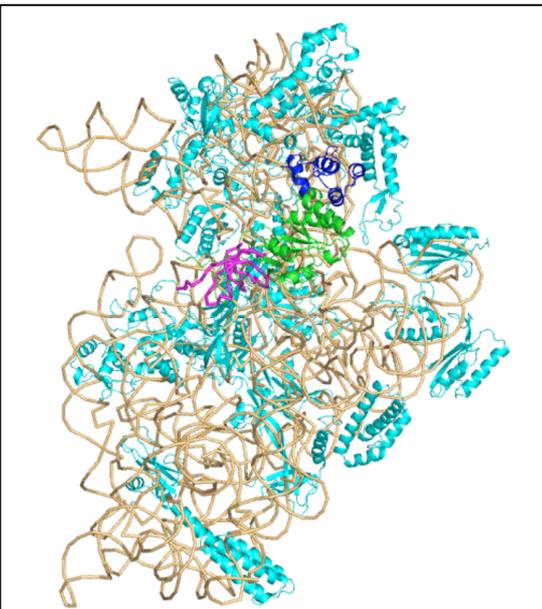
大腸菌 *E. coli* YjeQ 遺伝子を大量発現用ベクター pET11 に載せかえて、BL21 (DE3) 株で大量発現させ、イオン交換カラムクロマトグラフィーによって精製した。大量調製した一部を用いて、結晶化スクリーニングを行ったところ、PEG3350 を含む条件で、微結晶が得られた。X 線回折実験を行ったところ 4Å 程度の反射データが得られた。

### （3）YjeQ-30S 複合体の特異的形成と精製条件の確立

大腸菌 YjeQ は、G ヌクレオチド依存的に、リボソームに作用し、サブユニットを解離させる活性があることが報告されている。さらに GTP の非水解アナログ GDPNP を用いると、解離させたサブユニットのうち、30S 側に YjeQ がモル比 1 対 1 で結合するという情報を弘前大学から提供されたので、プロトコルを大量調製用に改変し、大量精製を試みた。大腸菌リボソームとモル比で 4 倍の YjeQ を 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM GDPNP 存在下でインキュベートした後、ゾーナルロータによるショ糖密度勾配遠心によって、サブユニットの精製を行い、YjeQ-30S-GDPNP 複合体を得た。また、YjeQ-30S-GDP 複合体の調製も行った。先に低マグネシウム条件(1mM)でサブユニットを解

離させ、精製した 30S に、GDP と YjeQ を加えてインキュベートし、ショ糖溶液を通過させることで、非特異な結合を外して、目的の YjeQ-30S-GDP 複合体を得る事ができた。

### （4）構造モデリングによる YjeQ/RsgA の GTP 結合型（活性型）構造に関する考察



〔図2〕 翻訳因子 IF1 (紫) と 30S 複合体の結晶構造 (PDB:1HR0) に、YjeQ をバレルドメインで重ねたモデル図。リボソームタンパク質はシアン、16S rRNA は茶色で示した。YjeQ の G ドメイン（緑）は、30S の P site に重なっている。Zn ドメイン（濃紺）は実際には、もう少し G ドメインに近い位置にあると予想される。

超好熱菌 *A. aeolicus* の YjeQ の結晶構造解析を行ったところ、バレルドメイン、G ドメイン、Zn 結合ドメインの 3 ドメイン構造であり、バレルドメインの逆平行  $\beta$  シート構造は、翻訳開始因子 IF1 に良く似ていた〔図1〕。そこで、IF1-30S 複合体構造 (PDB ID:1HR0) 中の IF1 に、このバレルドメインをアラインしたところ、G ドメインは、リボソームの tRNA 結合サイトのうち、P サイトに重なることが分かった〔図2〕。しかし、今回の構造は GDP 型であるため、GTPase 活性中心となるスイッチ領域が構造をとっていない。GTP 型構造を解いた Era のスイッチ領域構造を利用して YjeQ のスイッチのモデル構造を構築したところ、C 末の Zn ドメインの配向が大きく変化する可能性が示唆された。このことは、弘前大学の生化学的解析の結果とも良く一致する（未発表）。ただし、あくまでも

モデル構造なので、実験的証拠が必要である。

(5) YjeQ-30S 複合体の超低温電子顕微鏡による構造解析 [ドイツ・フランクフルト大学と共同研究]

YjeQ と 30S の相互作用をより詳しく調べるために、(3)で大量精製した複合体をドイツに送付し、弘前大学から大学院生を派遣して、超低温電子顕微鏡による構造解析を行った。30S サブユニットのみと YjeQ-30S-GDPNP 複合体の 2 つのサンプルの電子顕微鏡像を比較したところ、明らかに付加的なタンパク質分子の電子密度が観測された。ここに、大腸菌 YjeQ のホモロジーモデル構造をフィッティングしたところ、かなり妥当なモデルが得られた。N 末端のバレルドメインは、IF1 の結合位置に非常に近いが、少し異なることが分かった。従って、(4)のモデル構造とは、微妙にずれている。また、Era-30S の構造と比較すると、G ドメインの位置は、全く異なることが分かった。注目すべきは、リボソーム側の構造変化である。30S の主成分である 16S rRNA 中で最も長い helix 44 が大きく構造変化していることが明らかになった。このリボソーム RNA の構造変化は、YjeQ のサブユニット解離活性を裏付けるものであり、弘前大学のデータとも一致する (発表論文 1)。更なる精密化を進めるとともに、GTPase の活性中心とリボソームの相互作用を精査するために、GTP 型 YjeQ のできるだけ正しい構造モデルが必要となっている。

## 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 2 件)

- (1) Kimura T., Takagi K., Hirata Y., Hase Y., Muto A. and Himeno H.: Ribosome-small-subunit-dependent GTPase interacts with tRNA-binding sites on the ribosome. *J. Molecular Biology* **381**(2), 467-477 (2008) 査読有
- (2) Kimura T., Takagi K., Hanawa-Suetsugu K., Kalachnyuk L., Muto A. and Himeno H.: Interaction between RgsA and the ribosome. *J. Nucleic Acids Symp. Ser.* **51**, 375-376 (2007) 査読無

[学会発表] (計 1 件)

竹本千重「リボソーム成熟因子 RimM の結晶構造解析」第 10 回 RNA ミーティング  
2008 年 7 月 23 日、札幌コンベンションセンター

[その他]

<http://protein.gsc.riken.jp/takemoto>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹本 千重 (TAKEMOTO CHIE)  
独立行政法人理化学研究所・システム研究  
チーム・上級研究員  
研究者番号 40306527

### (3) 連携研究者

姫野 俵太 (HIMENO HYOTA)  
弘前大学・農学生命学部・教授  
研究者番号 80208785