

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2008～2011

課題番号：20247007

研究課題名 (和文) RAT-U13snoRNA 複合体構造解析によるリボソーム成熟機構の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of the ribosome maturation mechanism by the structure analysis of RAT-U13snoRNA complex

研究代表者

田中 勲 (TANAKA ISAO)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号：70093052

研究分野：構造生物学, X線結晶学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析, RNA-タンパク質相互作用, snoRNA, リボソーム生合成, アセチル化

1. 研究計画の概要

リボソームは翻訳の基幹装置であり, その生合成機構の解明は, 生命現象解明の中心的課題である. 本研究では, rRNA の成熟過程を, アセチル基転移酵素とガイド snoRNA の複合体解析を通して解明することを研究目的としている. 連携研究者の鈴木勉 (東大・院工) は, 近年, 真核生物において rRNA の Helix45 のアセチル化に関与する必須遺伝子を同定したが, この遺伝子は我々が構造解析したヘリカーゼ機能を持つ tRNA アセチル基転移酵素 TmcA のホモログをコードしている. 我々はこれらの事実から, この TmcA ホモログは備え持つヘリケースドメインにより Helix45 の 2 次構造を解きつつ, U13 をガイドとして pre-18SrRNA に結合し, アセチル化を施しているという新しい概念を持つに至った. 本研究では, この TmcA ホモログ (RAT: RNA Acetyltransferase) が U13 をガイドとして pre-18SrRNA を認識し, その 2 次構造を解き, アセチル化を行う分子機構を解明し, 次いで, そのアセチル化を認識した rRNA 切断酵素が pre-18SrRNA をプロセッシングするまでの分子機構を解明する.

2. 研究の進捗状況

平成 20 年度は, 真核生物由来 TmcA の発現・精製系の確立を目指して研究を進めた. そのためマウス由来の TmcA のホモログ (mTmcA) をコードする遺伝子を含むベクターを購入し, PCR により増幅した. mTmcA は 115kDa を超えるタンパク質であり, 可溶性, 精製が困難であるため, GST との融合タンパク質として発現させる系を構築し, QuikChange キットを用いて, GST と mTmcA の

間に His-tag を挿入した. mTmcA の発現を確認したところ, 不溶性画分に発現が確認された. 次いで酵母 Pch1a を用いた mTmcA の発現系を構築し, アフィニティークロマトグラフィーにより, GST 融合している mTmcA を調製することができた. 精製過程を最適化することにより, 大量に調製することが可能となった. さらに, 精製された mTmcA の ATPase 活性を確認した. 一方, バイオインフォマティクスを用いて mTmcA と相互作用する分子群を探索した結果, mTmcA はリボソーム rRNA18S の生合成に関連する因子 UTP7, UTP22, KRR1, ENP1, ENP2, NOP4 と相互作用し, rRNA18S の生合成に関与する可能性を示唆した.

平成 21 年度は, RNA 複合体の調製系を構築することを目指したが, 酵母により発現された mTmcA の安定性が著しく低く, その原因が C 末端領域にあることがわかったので, C 末端領域の欠失変異体の調製系を構築した. 野生型よりも安定な分子として精製できることが分かり, また, それらの ATPase 活性も確認できた. アセチル基転移活性については, 連携研究者の拠点 (鈴木研究室) との共同研究により, 質量分析装置を用いて評価したが, 十分な活性は確認されなかった. 活性を有する溶媒条件を引き続き検討するとともに, 各変異体の結晶化条件のスクリーニングを開始した.

平成 22 年度は, 前年度までに調製した種々のマウス由来 RAT (mRAT) の活性を, 連携研究者の拠点 (鈴木研究室) との共同研究により, 質量分析装置で評価した. 種々の溶媒条件にて活性を評価した結果, 特定の塩濃度の条件下で Helix45 周辺の RNA フラグメントにアセチル基を転移する活性を発現すること

が明らかになった。結晶構造解析に向けては、種々の mRAT 変異体を調製し、結晶化スクリーニングを行ったが、解析可能な良好な結晶を得ることは出来なかった。また、酵母由来の RAT の大量調製系を構築し、得られたタンパク質の ATPase 活性を確認した。さらに、その結晶化スクリーニングを開始した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

タンパク質合成の基幹装置、リボソームの成熟機構に関与すると仮説を立てた TmcA ホモログ (RAT : RNA Acetyltransferase) タンパク質の分子機構解明を目指して、115kDa を超えるタンパク質の発現、精製の系を確立するとともに、仮説どおり、ATPase 活性とアセチル基転移活性を確認した。

4. 今後の研究の推進方策

機能解析を終えたマウス由来の RAT については、結晶構造解析を目指して、アセチル基転移活性の確認された基質フラグメントとの複合体の結晶化をすすめるとともに、酵母由来の RAT についてもまずはアセチル基転移活性を確認し、同様に結晶化実験へと進める。

5. 代表的な研究成果

(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 6 件)

1. Akiyoshi Nakamura, Kelly Sheppard, Junji Yamane, Min Yao, Dieter Soll and Isao Tanaka, Two distinct regions in *Staphylococcus aureus* GatCAB guarantee accurate tRNA recognition, *Nucl. Acid Res.* 38, 672-682 (2010) 査読有
2. Takao Naganuma, Naoko Nomura, Min Yao, Masahiro Mochizuki, Toshio Uchiumi and Isao Tanaka, Structural Basis for Translation Factor Recruitment to the Eukaryotic/ Archaeal Ribosomes, *J. Biol. Chem.* 285, 4747-4756 (2010) 査読有
3. Masaaki Sokabe, Toyoyuki Ose, Akiyoshi Nakamura, Keita Tokunaga, Osamu Nureki, Min Yao and Isao Tanaka, The structure of alanyl-tRNA synthetase with editing domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 11028-11033 (2009) 査読有
4. Sarin Chinnaronk, Tateki Suzuki, Tetsuhiro Manita, Yoshiho Ikeuchi, Min Yao, Tsutomu Suzuki and Isao Tanaka, RNA helicase module in an

acetyltransferase that modifies a specific tRNA anticodon, *The EMBO J.* 28, 1362-1373 (2009) 査読有

5. Yoshikazu Tanaka, Shiori Yamagata, Yu Kitago, Yoko Yamada, Sarin Chinnaronk, Min Yao and Isao Tanaka, Deduced RNA binding mechanism of ThiI based on structural and binding analyses of a minimal RNA ligand, *RNA.* 15, 1498-1506 (2009) 査読有
6. Sarin Chinnaronk, Farhad Forouhar, Junichi Sakai, Min Yao, Cecile M. Tron, Mohamed Atta, Marc Fontecave, John F. Hunt and Isao Tanaka, Snapshots of Dynamics in Synthesizing N^6 -Isopentenyladenosine at the tRNA Anticodon, *Biochemistry.* 48, 5057-5065 (2009) 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. Akiko Kawaguchi, Structure analysis of ribosomal protein L30 to understand the interaction to SECIS, The 9th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine (Selenium 2010), 31 May - 4 June, 2010, Kyoto University (Kyoto, Japan)
2. Min Yao, Structural basis for translation factor recruitment to the eukaryotic/ archaeal ribosomes, Taiwan-Japan Joint Seminar on Crystallography and IPR Seminar, Institute for Protein Research, 7-9 December, 2009, Osaka University (Suita, Japan)
3. Min Yao, The structure of the archaeal ribosomal stalk complex: insights into the function of translation factor recruitment in eukarya/archaea mode, Ribosome Synthesis Meeting, 26-30 August, 2009, Kolpinghaus Regensburg (Regensburg, Germany)
4. Isao Tanaka, The structure of archaeal ribosomal stalk complex: insights into the function of GTPase center, VIII European Symposium of The Protein Society, 14-18 June, 2009, Kongresshaus Zurich (Zurich, Switzerland)
5. 田中勲, 翻訳駆動エネルギー生産部位「ストーク」の構造機能解析, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月 27-29 日, 福岡国際会議場 (福岡市)