

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20770129

研究課題名(和文)

質量分析法と重水素交換を用いたリボゾームの反応機序とダイナミクスの研究

研究課題名(英文)

The study on reaction mechanisms and dynamics of ribosome using deuterium exchange and mass spectrometry

研究代表者

山本 竜也 (YAMAMOTO TATSUYA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70437573

研究成果の概要(和文): タンパク質はリボゾームによって合成されるが(翻訳)、その様子はリボゾームが 50 以上のタンパク質と 3 つ RNA から成る巨大な複合体(2.3MDa)であるため、溶液中で詳細に観察されてこなかった。本研究によって、タンパク質合成過程の中の「転移」について、質量分析法と重水素交換を用いることで 52 リボゾームタンパク質の構造変化の程度を実際に働いている時間スケール(ミリ秒)で一斉検出することに成功した。

研究成果の概要(英文): Protein synthetic process by ribosome (translation) had never been observed the detail movement in solution, because ribosome is a macro complex (2.3MDa) comprised of 55 proteins and three rRNAs. In this study, we succeeded in the simultaneous detection of 52 ribosomal proteins in solution on the working time scale by using deuterium exchange and mass spectrometry, and elucidated the magnitude of the conformation change during the translocation process in protein synthesis.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：タンパク質・核酸の構造・動態・機能

## 1. 研究開始当初の背景

大腸菌リボゾームは 55 種類のタンパク質と 3 種類の RNA からなる巨大複合体(分子量:2.7MDa)で、タンパク質合成の機能を持つ。その構造-機能研究は、2000 年に原子分解能での X 線結晶構造が解かれて以来急激に進展しており、中でもクライオ電子顕微鏡は結晶化を必要としないため多くの像を観察可能で、それらの重ねあわせによるズレを比較することによって、機能に重要な大きな構造の変化を捉えることに成功していた。一

方で、最も重要な常温溶液中での動的構造や、各タンパク質レベルでの構造変化など、未解明な部分も数多く残されていた。

## 2. 研究の目的

リボゾームのタンパク質合成反応は開始伸長 転移 終結の流れで進行し、数多くの因子や基質が関与しているため中間体が数多く存在している。したがって、各リガンドと順序よく結合し反応がスムーズに進行するためには、リボゾームが常に最適な構造

変化を行う必要があると考えられる。これまでリボソームの構造と機能の研究は、大きさや複雑な複合体であるという理由から非常に困難であったが、我々は質量分析法と重水素交換を用いることで、リボソームの溶液中のダイナミクスをタンパク質ごとに一斉解析する方法を確立した(これまでの研究成果を参照)。そこで本研究では、大腸菌リボソーム反応中間体の重水素交換を行い、その時の質量変化を質量分析計で検出することで、リボソームの反応機序とダイナミクスとの関係を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

リボソームを MALDI-TOF 型質量分析計で測定すると、Fig.1 のようなスペクトルが得られる。スペクトル上に示されたピークは全てリボソームタンパク質由来のピークで、rRNA は検出されません。70S 状態のリボソーム溶液に重水を過剰量加えることで重水素交換を開始し、一定時間間隔で酢酸と氷冷により pH と温度を下げることで交換をクエンチする。重水素交換を行うとこれらのピークが高質量側にシフトし、各タンパク質の質量経時変化を調べることで、交換量や交換速度といったダイナミクス由来の情報を得る(Fig.1)。分子表面や激しく揺らいでいる部分は交換が速いが、分子内部や二次構造部位は交換が遅い。また交換量が多いタンパク質はフレキシブルな領域が多く、交換量が少ないものは硬い領域が多いと言える。それらの現象を利用して、各リボソームタンパク質のダイナミクスがそれぞれの反応過程においてどのように影響を受けるのかを調べる。

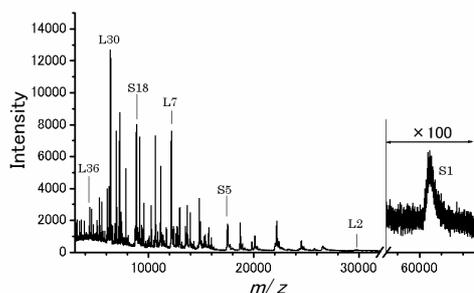


Fig1 リボソームの MALDI-TOF-MS スペクトル(未ラベルピークも同定済み)

### 4. 研究成果

#### (1) 主な研究成果

リボソームがタンパク質合成反応を行う際に引き起こされる溶液中での構造変化を、実際に働いている時間スケール(ミリ秒)で捉えるために、微小反応場を活用した micro reactor を用いて重水素交換の rapid quench を行うシステム開発を行った。材質はポリジ

メチルシロキサン(PDMS)用い、幅と深さが 100 $\mu$ m の溝を基本として乱流と拡散の効果を利用した流路を設計することで効率よく溶液を混合させ、20ms のクエンチングを達成した。その結果、1 残基分のペプチド伸長よりも短い時間分解能での交換反応の検出が可能となり、より速い動きについて議論できるようになってきた[雑誌論文 1]。現在さらなる改良を加え、より高い時間分解能を出せるものを作成しており、性能評価を行っている。

リボソームの反応中間体実験には欠かせない Mg<sup>2+</sup>イオン濃度変化とリボソームダイナミクスの研究について論文発表を行った[論文雑誌 2]。核酸を主要構成成分とするリボソームは Mg<sup>2+</sup>イオンによって偏った負の電荷を中和し、その構造を安定に維持しているが、多量に存在しすぎるとかえって活性を落とすことが知られている。そのメカニズムは長らく議論されてきたが、今回発表した論文において Mg<sup>2+</sup>イオン濃度に依存したリボソームのダイナミクス(柔軟性)の変化が、その一因となっていることを示した。また Mg<sup>2+</sup>イオン濃度が薄くなるにつれて tRNA 結合部位を中心にリボソームはダイナミクスを増すことが分かり、induced fit mechanism の存在が示唆された。加えて重水素交換の結果を複合体形成の assembly map と比較することで、assembly 後期に結合するタンパク質が低 Mg<sup>2+</sup>イオン濃度でもがっちりとした構造を維持することで、ダイナミックに動くようになったリボソームの構造を安定に保っていることも分かった。

リボソームの反応中間体のうち、転移過程でのリボソームは X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡によって二つのサブユニット間の回転運動(ratchet motion)が主な動きとして知られていた。しかし、その時の各タンパク質が溶液中でどのようにふるまっているのか分かっていなかった。そこで前述の micro reactor を用いることで転移過程のダイナミクスについての観察を行った。転移の構造変化が常に起こっている Unlocked 状態と、GTP アナログを使用することで構造変化が止まっている Locked 状態に対して、触媒反応に近い時間スケールである 20ms 間の重水素交換実験を行ったところ、Unlocked に比べ Locked の方が交換されにくく、50S より 30S サブユニットのタンパク質の方が大きく影響を受けることが分かった。機能関連タンパク質を詳細に見ると、tRNA 出入口(L16, L25, S12, L31, L33)やシフト(S13)に関わるタンパク質はより高度に交換され、Unlocked 状態では交換率が同調する傾向にあった。しかし mRNA の出口(S7, S11)や入口(S3, S4, S5)はそれほど高い交換率ではな

った。特に入口は同調も見られず、S3 は Unlocked 状態でも交換が低かった。これらのことは tRNA の結合、解離、シフトには各タンパク質の揺らぎも大きく関与し、逆に mRNA は rRNA の回転運動の方がより大きく影響することを示している。特に入口の S3 タンパク質近傍は mRNA フレームシフトに重要であることも示唆された。

さらに、重水素交換で得られる情報には分子表面と動きの両方が含まれているため、X線結晶構造を用いて分子表面上のプロトン数を全て数え上げ、その分を差し引くことで、動きの情報だけを取り出す再解析を行った。その結果、クライオ電子顕微鏡では 30S 複合体の Neck 領域を Hinge center として Head 領域の swiveling motion が起こると報告されているが、重水素交換においても 20ms の時間スケールでそれらを裏付けるような、Neck 領域のタンパク質が極度に変化する結果が得られた。また 50S 複合体においては、これまでに知られていなかった Head から tRNA や mRNA の導入口周辺にかけての広い領域で、極度に動かなくなっているという結果が得られた。

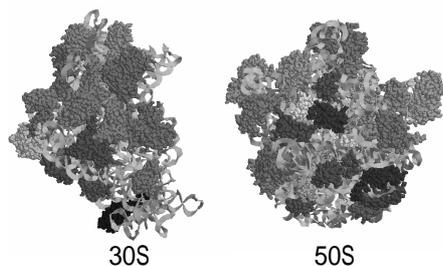


Fig.2 リボソームの重水素交換マップ

現在、「開始」過程の複合体や抗生物質に対するダイナミクスの変化に対しても同様の研究を進めている。

(2) 国内外における位置づけとインパクト  
国内外通じてこれほど大きな複合体の溶液中での動きを各タンパク質ごとに一斉解析した研究は現在のところ他にありません。また、新しく開発した micro reactor を含めた方法論は、リボソームだけにとどまらず他の巨大複合体の動きを追う研究に広く応用可能である。

(3) 今後の展望

今回主に行った「転移」過程のダイナミクスの研究を参考に、「開始」「終結」なども同様に構造変化を求め、全過程を通じてどのような動きを行っているのかを調べる。また抗生物質、翻訳を制御する因子の他、リボソーム結合型の翻訳後修飾タンパク質、膜輸送タンパク質、miRNA などがリボソームにどのように作用して細胞の制御を行っているのか

について様々な解析を行う。

## 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3件)

Tatsuya Yamamoto, Yoshihiro Shimizu, Takuya Ueda, Yoshitsugu Shiro, and Makoto Suematsu, "Application of micro-reactor chip technique for millisecond quenching of deuterium incorporation into 70S ribosomal protein complex", International Journal of Mass Spectrometry, 査読有, 302, 2011, 132-138

Tatsuya Yamamoto, Yoshihiro Shimizu, Takuya Ueda, and Yoshitsugu Shiro, "Mg<sup>2+</sup> dependence of 70 s ribosomal protein flexibility revealed by hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry", The Journal of biological chemistry, 査読有, 285(8), 2010, 5646-5652

山本 竜也, 質量分析法による巨大タンパク質複合体ダイナミクスの研究、生物物理、査読有、48(6)、2008、345-346

[学会発表](計11件)

山本 竜也, 巨大蛋白質複合体のダイナミクスを働いているタイムスケールで観察する、BMS シンポジウム「機能するタンパク質の構造を探る」、H22.12.11、微生物化学研究所(東京)、招待講演

山本 竜也・清水 義宏・上田 卓也・城 宜嗣、H/D 交換と質量分析によって観測された Mg<sup>2+</sup> に依存した 70S リボソームの柔軟性、第 58 回質量分析総合討論会 / 第 1 回アジア・オセアニア質量分析会議、H22.6.15-18、つくば国際会議場、招待講演

山本 竜也・清水 義宏・上田 卓也・城 宜嗣、70S ribosomal protein dynamics in translocation revealed by H/D exchange and mass spectrometry、シンポジウム「分子アンサンブル 2009」、H21.12.7-9、和光市

山本 竜也・清水 義宏・上田 卓也・城 宜嗣、H/D 交換と質量分析法を用いた転移過程における 70S リボソーム蛋白質のダイナミクス研究、第 11 回 RNA ミーティング、H21.7.27-29、新潟市

Tatsuya Yamamoto, Yoshihiro Shimizu, Takuya Ueda, Yoshitsugu Shiro, 70S Ribosomal protein dynamics in translocation revealed by H/D exchange and mass spectrometry, 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, H21.5.31-6.4, Philadelphia USA

山本 竜也・清水 義宏・上田 卓也・城 宜嗣、H/D 交換と質量分析法を用いた転移過程における 70S リボソーム蛋白質のダイナミクス研究、第 57 回質量分析総合討論会、H21.5.13-15、つくば市

山本 竜也・清水 義宏・上田 卓也・城 宜嗣、H/D 交換と質量分析法を用いた転移過程における 70S リボソーム蛋白質のダイナミクス研究、BMB2008、H20.12.9-12、神戸

山本 竜也・清水 義宏・上田 卓也・城 宜嗣、H/D 交換と質量分析法によるリボソーム/EF-G 複合体のダイナミクス解析、日本生物物理学会第 46 回年会、H20.12.3-5、福岡

山本 竜也・清水 義宏・上田 卓也・城 宜嗣、H/D 交換と質量分析法による 70S リボソーム蛋白質ダイナミクスの  $Mg^{2+}$ 濃度依存性解析、第 10 回 RNA ミーティング、H20.7.23-25、札幌

Tatsuya Yamamoto and Yoshitsugu Shiro,  $Mg^{2+}$  concentration dependence of 70S ribosomal protein dynamics revealed by H/D exchange and mass spectrometry, 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry, H20.6.1-5, Denver, USA

山本 竜也・城 宜嗣、70S リボソーム蛋白質ダイナミクスの  $Mg^{2+}$ 濃度依存性解析、第 56 回質量分析総合討論会、H20.5.14-16、つくば

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.keio.jp/~dynamics/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 竜也 (YAMAMOTO TATSUYA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70437573

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし