

機関番号：13101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770108

研究課題名 (和文) リボソーム結合性 GTPase ファミリーの構造生物学

研究課題名 (英文) Structural analysis of the ribosome-bound GTPase family

研究代表者

伊東 孝祐 (ITO KOSUKE)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：20502397

研究成果の概要 (和文)：タンパク質合成は、多種多様なリボソーム結合性 GTPase ファミリーの因子が順次にリボソーム GTPase センターと作用することで進行する。そのため、リボソーム結合性 GTPase ファミリーの分子機構解明には、それらの因子と GTPase センターとの複合体の原子分解能レベルでの立体構造解析が不可欠である。本研究で我々は、リボソーム GTPase センターについて、GTPase ファミリーの一つである EF-1 $\alpha$  との相互作用部位を特定し、EF-1 $\alpha$  との複合体の立体構造を決定した。

研究成果の概要 (英文)：In translation process, GTP-bound translation factors bind to “GTPase-associated center” in the ribosomal large subunit one by one, and cause GTP hydrolysis. To elucidate its hydrolysis mechanism, the structure determinations of the complex structures of GTP-bound translation factors/GTPase-associated center are necessary. Recently, our research group has detected the direct binding between EF-1 $\alpha$ , one of the GTP-bound translation factor, and P1 protein, a component of GTPase-associated center. In this research, we have determined the complex structure of EF-1 $\alpha$  and P1 protein by X-ray crystallography in an atomic resolution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：リボソーム、GTPase センター、GTPase ファミリー、超好熱古細菌、X線結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

複雑な一連のタンパク質合成反応は、多種多様なリボソーム結合性 GTPase、すなわちリボソーム結合性 GTPase ファミリー因子とリボソーム大亜粒子に存在する GTPase センターとが順次に作用することで進行する<sup>1)</sup>。例えば真核生物のタンパク質合成におけるペプチド鎖延長段階において、リボソーム結合性 GTPase の 1 種である EF-1 $\alpha$  は、リボソーム GTPase センターと作用することで GTP を加水分解し、そのエネルギーを利用してアミノアシル tRNA をリボソームに引き渡す。次に、EF-2 はリボソーム GTPase センターと作用することで GTP を加水分解し、そのエネルギーを利用してトランスロケーション反応と tRNA の解離を引き起こす。この様に、リボソーム結合性 GTPase ファミリーの構成因子は GTPase センターと作用することで GTP を加水分解し、そこで得られたエネルギーを利用して個々の役割を果たしている。

現在までに数々のリボソーム結合性 GTPase の立体構造が決定されてきたが、それらは皆 GTPase センターとの複合体でなく単独のものである<sup>2, 3)</sup>。そのためリボソーム結合性 GTPase の機能発現の分子機構はわかっていない。また、リボソーム結合性 GTPase と GTPase センターとの親和性は非常に弱く、リボソーム結合性 GTPase・GTPase センター複合体が検出された報告は未だ無い。さらに、GTPase センターは運動性に富むことから、今日までのリボソームの立体構造解析においてもその構造は帰属されていない。そのため、リボソーム結合性 GTPase・GTPase センター複合体の構造解析は未だ手付かずの課題となっている。

以上の様な情勢の中で、申請者らは最近、あらゆる生物種においても見出せなかったリボソーム結合性 GTPase・GTPase センターの相互作用を、95 °C の極限環境で生育する超好熱古細菌を使用することではじめて検出することに成功した。さらに驚くべきことに、それらは常温において複合体として存在していた (未発表内容)。これらの研究成果により、リボソーム結合性 GTPase・GTPase センター複合体の立体構造解析は現実的なものとなった。そこで本課題では、超好熱古細菌を材料としてリボソーム結合性 GTPase ファミリーと GTPase センターの複合体の構

造解析を行うという研究構想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、リボソーム結合性 GTPase ファミリー・GTPase センター複合体の網羅的な立体構造解析を行い、(1) まず、個々のリボソーム結合性 GTPase の機能発現の分子機構を明らかにすることを目的とした。なお、構造解析を行うリボソーム結合性 GTPase ファミリー因子としては、IF-2、IF-5B、EF-1 $\alpha$ 、EF-2、RF-3 を予定していた。これらの構造を決定することにより、タンパク質合成の一連の反応、つまりタンパク質合成の開始、伸長、終結段階におけるリボソーム結合性 GTPase・GTPase センター複合体の立体構造を明らかにすることを目的とした。なお、立体構造解析で得られた考察内容は生化学的解析により検証作業を行う。本研究では、さらに、(2) 個々の結果を総合的に考察し、多種多様なリボソーム結合性 GTPase が同一の GTPase センターと作用するために備えた普遍的メカニズムを明らかにすることも目的とした。具体的に述べると、各々のリボソーム結合性 GTPase の GTP 加水分解ドメイン周辺には似かよった立体構造が存在していない。つまり、リボソーム結合性 GTPase ファミリー因子が同一の GTPase センターと作用するためには、それらのどちらか、もしくは両方が構造変化を起こして適合する必要がある。その構造変化の多様性がリボソーム結合性 GTPase・GTPase センター相互作用の普遍性を構築していると考えられ、本課題によりそれらの分子機構を明らかにする。以上を本研究の目的とした。

(参考文献)

1. Agrawal, R. *et al.* (2000) *J. Cell Biol.* 150, 447-460
2. Aevansson, A. *et al.* (1994) *EMBO J.* 13, 3669-3677
3. Nissen, P. *et al.* (1995) *Science* 270, 1464-1472

## 3. 研究の方法

本研究は以下の手順で行った。

(1) リボソーム結合性 GTPase ファミリー因子・GTPase センター複合体の結晶化

結晶化を行うリボソーム結合性 GTPase は、超好熱古細菌の IF-2、IF-5B、EF-1 $\alpha$ 、EF-2、

RF-3を予定した。GTPase センターも超好熱古細菌のものを使用した。結晶化が困難なものについてはリボソーム結合性 GTPase と GTPase センターの相互作用ドメインのみを切り出して結晶化した。

## (2) X線回折データの収集

X線回折データの収集は国内の放射光共同利用施設（高エネルギー加速器研究機構（筑波）の Photon Factory、および財団法人高輝度光科学研究センター（播磨）の SPring-8）にて行った。なお、放射光共同利用施設にて効率よくデータを収集するため、結晶は予め高品質なものを本学の X線回折装置にて選別し、その結晶を液体窒素中で保存して施設に持ち込んだ。

## (3) タンパク質立体構造計算

(2)で収集した X線回折データをもとにタンパク質の立体構造計算を行い、リボソーム結合性 GTPase ファミリー因子・GTPase センター複合体の立体構造を網羅的に決定すると計画した。

## (4) 立体構造からリボソーム結合性 GTPase 機能発現の分子機構を考察

結晶構造からリボソーム結合性 GTPase と GTPase センターの相互作用部位を詳細に同定した。また、それらが相互作用するところでどの様にリボソーム結合性 GTPase の GTPase 活性が誘発されるのか、そのメカニズムをリボソーム結合性 GTPase 単体の構造と比較することで考察した。

## (5) 立体構造で得られた考察内容を生化学的解析により検証

本解析は *in vitro* と *in vivo* 両方の系について行う計画である。*In vitro* の系における解析は、まず(4)で考察した部分の部位特異的変異体を作製し、それらが GTPase 活性とポリフェニルアラニンの合成効率にどのような影響を与えるかを調べた。*In vivo* の系においては、酵母における相同遺伝子の変異株を作製し、レポータータンパク質の合成効率および変異株の育成速度を測定することで(4)の考察内容を検証する。

## 4. 研究成果

我々はこれまでに、リボソーム結合性

GTPase ファミリー因子として主に超好熱古細菌 *P. horikoshii* の EF-1 $\alpha$  について解析を進めてきた。そして、研究機関である2年間で上記計画の(1)~(4)を終了することができた。現在は(5)の段階である。以下にその成果について詳細を述べる。

## (1) Pho EF-1 $\alpha$ ・GTPase センター複合体の結晶化

リボソーム結合性 GTPase としては超好熱古細菌 *P. horikoshii* の EF-1 $\alpha$  (Pho EF-1 $\alpha$ )を使用した。なお、我々は GTPase センターの中で Pho EF-1 $\alpha$  と相互作用する部分はリボソームタンパク質 P1 の C 末端領域であることを同定した。そこで、P1 の C 末端領域である 32 残基からなるペプチドと Pho EF-1 $\alpha$  との複合体の結晶化を試みてきた。その結果、タンパク質濃度は PhoEF-1 $\alpha$  = 5.1 mg/ml、リボソームタンパク P1 C 末端領域ペプチド = 1.5 mg/ml、0.2 M NaCl、0.1 M phosphate-citrate pH 4.2、20% PEG-8000 の結晶化条件で、20℃、20日間で 0.05 x 0.05 x 0.5 mm の大きさの結晶を得ることに成功した (図 1)。

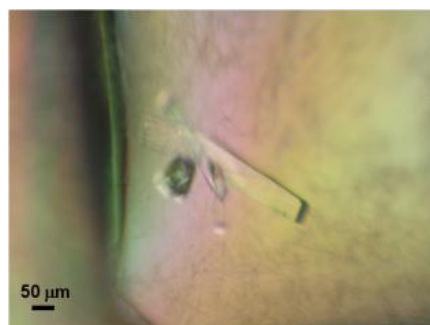


図 1 PhoEF-1 $\alpha$ ・リボソームタンパク P1 C 末端領域ペプチド複合体の結晶

なお我々は、リボソームタンパク P1 C 末端領域ペプチドが PhoEF-1 $\alpha$  に相互作用するところでどの様に PhoEF-1 $\alpha$  の GTPase 活性が誘発されるのか、そのメカニズムを PhoEF-1 $\alpha$  単体の構造と比較することで考察するために PhoEF-1 $\alpha$  単体の結晶化も行った。そしてタンパク質濃度は PhoEF-1 $\alpha$  = 5.9 mg/ml、5% (v/v) 2-Methyl-2,4-pentandiol、0.1 M HEPES pH 7.5、10% (w/v) PEG-6000 の結晶化条件で、4℃、55日間で結晶を得ることに成功した (図 2)。

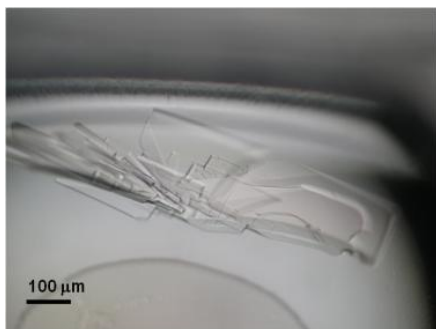


図2 EF-1 $\alpha$  単独の結晶

### (2) X線回折データの収集

X線回折データの収集は高エネルギー加速器研究機構(筑波)のPhoton Factory BL5にて行った。その結果、PhoEF-1 $\alpha$ ・リボソームタンパク P1 C末端領域ペプチド複合体の結晶については分解能 2.30 Å、空間群 C2、格子定数  $a = 157.26$  Å、 $b = 87.42$  Å、 $c = 82.46$  Å であることがわかった(図3)。同様に、PhoEF-1 $\alpha$  単独の結晶についても Photon Factory BL5にて回折強度データの測定を行った。その結果、分解能 2.37 Å、空間群 P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>、格子定数  $a = 47.48$  Å、 $b = 78.28$  Å、 $c = 138.17$  Å であることがわかった(図4)。

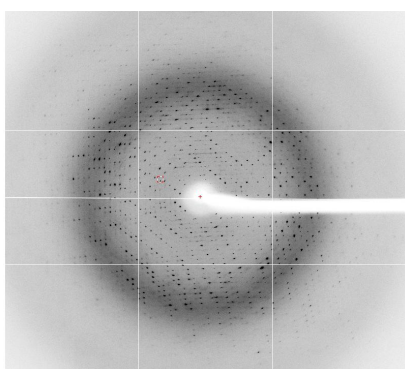


図3 PhoEF-1 $\alpha$ ・リボソームタンパク P1 C末端領域ペプチド複合体の結晶の回折強度データ

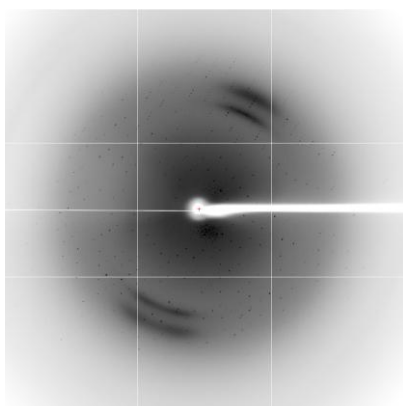


図4 PhoEF-1 $\alpha$  単体の結晶の回折強度データ

### (3) タンパク質立体構造計算および(4) 立体構造からリボソーム結合性GTPase機能発現の分子機構を考察

PhoEF-1 $\alpha$ ・リボソームタンパク P1 C末端領域ペプチド複合体は、2.30 Åの分解能で構造決定に成功した。その結果、リボソームタンパク P1のC末端領域は $\alpha$ ヘリックス構造を形成し、C末端から約10残基がPhoEF-1 $\alpha$ のドメインIとドメインIIIの間に入り込んでいることが明らかになった。また、構造中からはPhoEF-1 $\alpha$ と結合したGDPも検出された(図5)。

さらに立体構造からは、リボソームタンパク P1のC末端3残基がPhoEF-1 $\alpha$ 側の残基と各種相互作用を形成していることが判明した。この相互作用には、リボソームタンパク P1側のアミノ酸主鎖による水素結合と側鎖による疎水性相互作用の2種類が確認された(図6)。

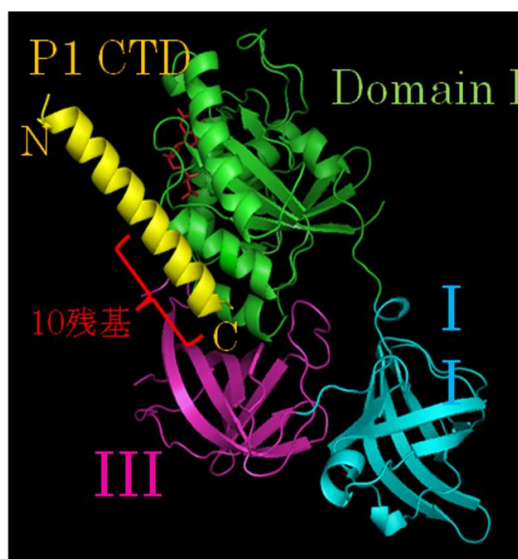


図5 PhoEF-1 $\alpha$ ・リボソームタンパク P1 C末端領域ペプチド複合体(全体像)

PhoEF-1 $\alpha$ の各ドメインI、II、IIIとリボソームタンパク P1 C末端領域ペプチドをそれぞれ色分けして表示した。また、GDPを赤色スティックモデルで表示した。

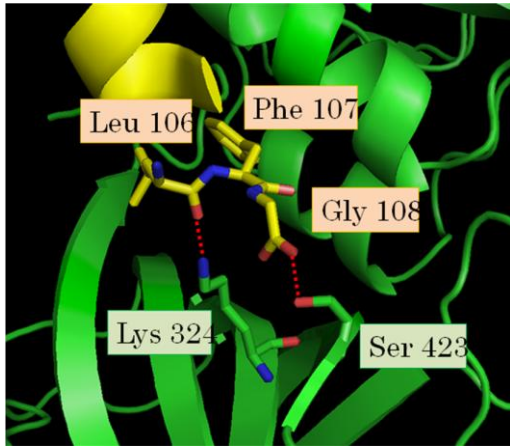


図6 PhoEF-1 $\alpha$ ・リボソームタンパクP1 C 末端領域ペプチド複合体（接触部）

PhoEF-1 $\alpha$  とリボソームタンパク P1 C 末端領域ペプチドを色分けして表示した。また、水素結合を赤色点線で表示した。

(5) 立体構造で得られた考察内容を生化学的解析により検証

(4) で検出された相互作用についてさらに追究するため、今後はリボソームタンパク P1 C 末端領域または PhoEF-1 $\alpha$  の変異導入体を作成して生化学的結合実験を実施する予定である。具体的には、部位特異的変異体を作製し、それらがリボソームの GTPase 活性とポリフェニルアラニンの合成効率にどのような影響を与えるかを調べる。さらに *In vivo* の系についても調べる。*In vivo* の系においては、酵母における相同遺伝子の変異株を作製し、レポータータンパク質の合成効率および変異株の成育速度を測定することで考察内容を検証する。

以上の様に、我々は PhoEF-1 $\alpha$  について当初の予定をほぼ 90%は達成できた。今後は他のリボソーム結合性 GTPase ファミリー因子である IF-2、IF-5B、EF-2、RF-3 についても同様の解析を行っていききたい。そして、多種多様なリボソーム結合性 GTPase が同一の GTPase センターと作用するために備えた普遍的メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 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年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (2010) 12/7~10 神戸

- 2) 伊東 孝祐、水口 伊玖磨、青木 健、浅妻 悟、三ツ井 敏明、内海 利男  
リボソーム変異型大腸菌株の真核生物タンパク質発現系への利用  
第 5 回無細胞生命科学研究会年会 (2010) 9/29~30 岡山

- 3) 伊東 孝祐、斉 浩、清水 義宏、三浦 謹一郎、上田 卓也、内海 利男  
Pth (Peptidyl-tRNA hydrolase) -tRNA ミニヘリックス複合体の X 線結晶構造解析  
第 32 回日本分子生物学会年会・第 82 回日本生化学会大会 合同大会 (2009) 12/9~12 横浜

- 4) 伊東 孝祐、斉 浩、清水 義宏、三浦 謹一郎、上田 卓也、内海 利男  
Pth (Peptidyl-tRNA hydrolase) -tRNA ミニヘリックス複合体の X 線結晶構造解析  
第 4 回無細胞生命科学研究会年会 (2009) 11/16~17 下呂

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 孝祐 (ITO KOSUKE)  
新潟大学・自然科学系・助教  
研究者番号：20502397