

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22770093

研究課題名（和文）セレノプロテイン生合成における翻訳制御機構解明

研究課題名（英文）Analysis of translation mechanism for selenoprotein synthesis

研究代表者 尾瀬 農之（OSE TOYOYUKI）

北海道大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：80380525

研究成果の概要（和文）：

ヒト由来 SBP2, L30, EFSec, SECIS-RNA, tRNA^{Sec} の調製に成功し、生化学的実験を進めてきた。L30 に関して結晶構造解析及び RNA との結合実験をおこなうことができ、論文発表した。また、機能的 tRNA^{Sec} の調製方法を確立することができたため、アミノ酸存在下において EFSec や SBP2 との相互作用研究を進めている。野生型では等温滴定型熱量計を用いて GDP との相互作用解析を行い、 $K_d=229$ nM での相互作用が見られ、調製したタンパク質は正しい構造をとっていることが確認できた。また作製した変異体では、二次構造を保持していることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

We successfully prepared protein and RNA molecules which are required for selenocystein incorporation on ribosome. These molecules are SBP2, L30, EFSec, SECIS-RNA, tRNA^{Sec} and subjected to biochemical and biophysical experiments. Crystal structure of L30 could be analyzed and published. Since we originally succeeded generating functional tRNA^{Sec}, binding assay among tRNA^{Sec}, EFSec, and SBP2 in the presence of specific amino acid are now in progress. We observed the significant binding affinity ($K_d=229$ nM) between the wild type and GDP using ITC, the way to prepare the molecule was thus confirmed. Furthermore, mutants generated for the purpose of crystallization were proved that they have proper secondary structures.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
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・構造生物化学

キーワード：翻訳マシーナリ，RNA 調製，蛋白質調製

1. 研究開始当初の背景

(1) リボソーム蛋白質 L30 に関して、酵母由来のもの性質は、構造情報も含めてよ

く調べられていた。しかし、酵母はセレノシステイン導入系は保持していない。ヒト由来のものは報告例がなかった。

(2) L30 と mRNA の一部である SECIS は、イオンの有無による親和性の変化など、分子的な解析が待たれていた。

(3) EFSec と tRNA^{Sec} の相互作用に関して、精製した分子を用いた報告例はなかった。また、tRNA^{Sec} にアミノ酸がチャージされているかどうかで EFSec との相互作用が変化し、これが EFSec-SBP2 間の相互作用に影響を及ぼすことに関する、間接的な証拠が得られていた。

2. 研究の目的

微量必須元素セレンの主要な代謝経路である蛋白質・RNA へのセレン導入経路の分子メカニズムを明らかにするために、X 線結晶構造解析を用いて分子構造基盤の確立を目指した。真核生物においてキーとなる伸長因子を中心に、直接 Sec-tRNA^{Sec} 作用する SBP2, EFSec, SECIS などの因子を研究対象とした。

3. 研究の方法

本研究は、セレノプロテイン翻訳時に真核生物 80S リボソーム上で要求される蛋白質群(SBP2, EFSec, L30)と二種類の RNA(Sec-tRNA^{Sec}, SECIS)間の相互作用を精密に解明するものである。それぞれの蛋白質の調製には大腸菌・昆虫細胞・哺乳類細胞を組み合わせ、修飾の無い RNA の調製は *in vitro* 転写で、修飾された tRNA 調製は大腸菌及び哺乳類細胞を利用するなど、目的に応じて最適な調製方法を採用する。

4. 研究成果

(1)

ヒト由来 L30 の構造は、L7Ae ファミリー特有の $\alpha/\beta/\alpha$ sandwich topology であった(図 1)。サーチモデルに使用した酵母由来 L30 と mRNA 複合体の構造を図 2 に示す。これら 2 つの相同性はとても高いが、酵母には Sec が存在しないことが確認されている。

高等生物の代表として、イヌのリボソーム 80S の全体構造は、電顕により分解能 8.7 Å で構造析されている。リボソーム上で、L30 がどの領域を使用して SECIS と相互作用しているのか、Sec 翻訳でどのようにアンカリングに使用されているのか、今回解析したヒ

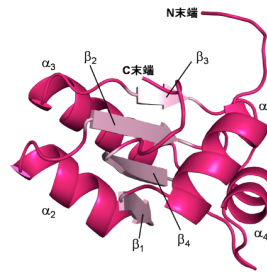


図 1 ヒト由来 L30 の全体構造

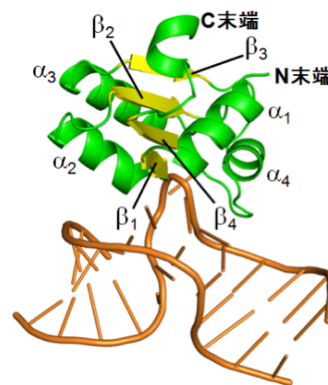


図 2 酵母由来 L30-mRNA の構造

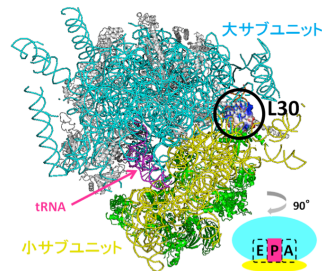


図 3 犬リボソームの全体構造と L30

ト由来 L30 を電顕モデル中にあてはめてみた。それを図 3 にしめた。右下に示すリボソームの略図を左に 90° 回転させた方向からみた図である。上(水色とグレー)が大サブユニット、下(黄色と緑)が小サブユニット、ピンク色が P サイトに存在する tRNA を表す。L30 は、リボソームを挟んで P サイトの tRNA のちょうど裏側に位置していることが確認できた。

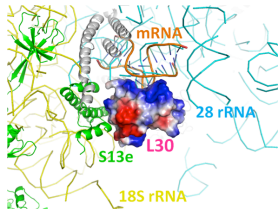


図4 リボソーム上でのL30拡大図

このリボソーム中のL30付近の拡大図を図4に示す。ヒト由来L30の表面電荷を計算し、酸性領域を赤、塩基性領域を青で示してある。L30は、大サブユニットの28S rRNA(水色)、小サブユニットの18S rRNA(黄色)、S13e(緑)と相互作用していることが確認できる。これまでに、遊離のL30は自身のmRNAと結合することで、自分の発現を調節していることが報告されている。そこで、酵母由来L30と複合体で解かれていたmRNA(図2)の相対配置をオレンジ色で示した。mRNAは、28S rRNAの結合サイトとオーバーラップしている。すなわち、L30はリボソーム上で28S rRNAと相互作用しているために、自身のmRNAと結合するのは、遊離のL30であるという事実と一致した。それに対してSECIS RNAは、リボソームに結合しているL30と相互作用することが、これまでに明らかになっている。また、酵母由来mRNAが形成する構造は典型的なK-turn(RNAのねじれた構造)であり、SECISが形成する高次構造とは異なると推測される。したがって、空間的に空いている領域(図2で右下辺り)を使用して、L30はSECISを認識し、アンカーリングをしていると考えられる。しかし、図3からも分かるようにアンカーリングに使用されるにしても、L30とAサイトの位置が離れすぎているという問題点が生じる。このような距離があるのに、どのようにしてL30がSECISに結合した状態でEFSecをAサイトへと誘導するのか、という疑問を解明するのも、これからの課題となった。

(2) EFSec

EFSecに関しては、野生型では結晶をつくるのが難しく、結晶化効率を上げるために変異体(F577L:真核生物間で保存されていない残基を置換, rEFSec:二次構造予測からループと推測される領域を欠損, K495E:SERを用いたタンパク質表面に存在すると考えられるエントロピーの高い残基を置換)を作製し、また多量体形成タグである2RS1(二量体)と3RS1(三量体)を導入した。

① 野生型

析を行い、 $K_d=229$ nMでの相互作用が見られ

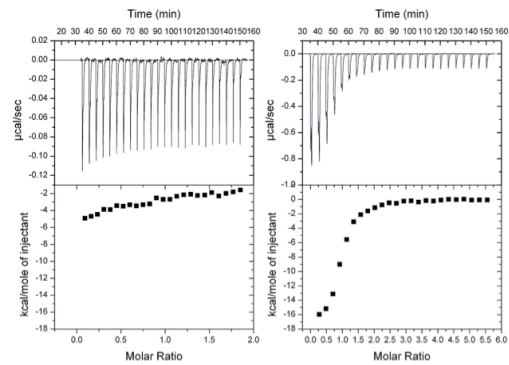


図5 EFSec-GDPの相互作用解析

野生型ではITCを用いてGDPとの相互作用解した。この結果より、EFSec-GDP相互作用は、エンタルピー的に有利・エントロピー的に不利であり、 Mg^{2+} およびGDP存在下でEFSecは

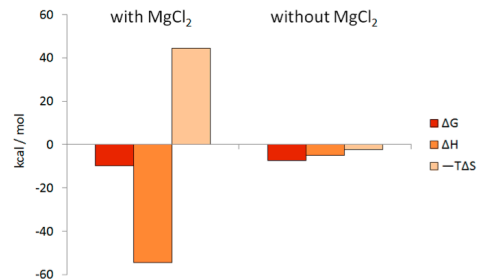


図6 ITCから得られた熱力学パラメータの比較

構造を形成することが示唆された(図5・6)。したがって、結晶化を試行するにあたり、EFSec単独よりも Mg^{2+} およびGDPとの共結晶化の方が結晶化しやすいことが分かった。また、3種類のprotease(trypsin, V8, Lys-C)を用いてproteolysisを行った結果、GDPが結合するであろうN末端領域は分解されないのに対し、EFSec特有のC末端側の挿入配列の部分は完全に分解されてしまった。このことからEFSecのN末端領域は Mg^{2+} およびGDP存在下で安定であるのに対し、C末端側は、構造をほとんど形成しない領域であることが判明した。

② 変異体

F577L変異体, K495E変異体では、野生型と大きな性質の差は見られなかったが、rEFSecでは大きな差が見られた。精製中に、野生型では硫酸アンモニウム濃度が1.2Mで沈殿するのにに対し、rEFSecでは2.5Mまで濃度を上げなければ沈殿せず、疎水的な性質に大きく

変化があった。また、rEFSec 以外では、タンパク質溶液の Glycerol 濃度を 10 %にして 3 日間放置していても沈澱が見られないのに対し、rEFSec ではその濃度で一晩放置するだけで大量の沈澱が見られた。ここでも rEFSec はその他と比較して、大きく性質が違うと言えよう。

多量体形成タグを導入したのも、ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出位置から、二量体・三量体を形成していることが確認できた。現在までに野生型・変異体両方とも結晶は得られていないが、今後も様々な条件で結晶化試行をする予定である。

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 1 件)

査読有り

① Crystallization and preliminary X-ray structure analysis of human ribosomal protein L30e

Acta Cryst. **F67**, 1516-1518(2011)

Akiko Kawaguchi, Toyoyuki Ose, Min Yao, and Isao Tanaka

doi:10.1107/S1744309111045131

[学会発表] (計 2 件)

① 川口亜希子, 尾瀬農之, 中村彰良, 姚関, 田中勲

Mechanistic analysis of the 21st amino acid incorporation system in eukaryotes
Sapporo Symposium on Advanced Crystallography

2012 年 3 月 17 日

北海道大学 (札幌市)

② 川口亜希子, 尾瀬農之, 中村彰良, 喜多俊介, 姚関, 田中勲

Structure analysis of ribosomal protein L30 to understand the interaction to SECIS
9th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine (国際セレン学会)

2011 年 5 月 31 - 6 月 4 日

京都大学 (京都市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾瀬 農之 (OSE TOYOYUKI)

北海道大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 80380525

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし