

2007年3月10日

独立行政法人 理化学研究所

ドイツ シャリティ・ベルリン医科大学

タンパク質合成工場「リボソーム」との相互作用による 翻訳伸長因子の活性化メカニズムを解明 - 遺伝子翻訳の重要な過程をスナップショットで可視化 -

◇ポイント◇

- *T. thermophilus* には、EF-G の遺伝子が 2 種類あることが判明した。
- 全生物に共通な翻訳伸長因子 EF-G の GTP 結合部位を含む構造を初めて決定した。
- 翻訳伸長因子 EF-G がリボソームの助けを借りて活性型になることを解明した。

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、ドイツのシャリティ・ベルリン医科大学（President Dr. Christoph Marksches クリストフ・マルクシス）との共同研究によって、翻訳伸長因子^{*1}EF-G はリボソーム^{*2}との相互作用によって初めて活性型になることを明らかにしました。これは理研ゲノム科学総合研究センター（榎佳之センター長）タンパク質構造・機能研究グループの横山茂之プロジェクトディレクター、竹本千重上級研究員、王宏飛リサーチアソシエイト、シャリティ・ベルリン医科大学の Dr. Sean R. Connell（ショーン・コーネル）と Dr. Christian M.T. Spahn（クリスチャン・シュパーン）らのグループによる研究成果です。

タンパク質の合成工場であるリボソームには、tRNA^{*3}が結合する部位が 3 ケ所（A 部位、P 部位、E 部位）あり、タンパク質が合成されるにつれて、tRNA は mRNA^{*3}と共にリボソーム上を A→P→E と移動します（図 1）。これは、翻訳伸長因子 EF-G が司る反応で、トランスロケーション（転座）と呼ばれます。EF-G は、トランスロケーション反応の間に GTP^{*4}を加水分解して EF-G・GDP 複合体に変化しますが、いつどのように EF-G・GTP に戻るのか、何のために GTP は加水分解されるのかについては、まだ結論が出ていませんでした。

「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」のゲノム解析により、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* には 2 つの EF-G 遺伝子が存在することが判明し、理研のグループは、この 2 つめの EF-G の X 線結晶構造解析を行って、GTP が結合した EF-G の全長構造を初めて明らかにすることに成功しました（図 2）。GTP 結合部位の構造が、伸長因子 EF-Tu と良く似ていることは、リボソーム上の同じ位置に作用する GTP 加水分解酵素であることと合理性があります。ドイツのグループは、超低温電子顕微鏡によって、同じく *T. thermophilus* のリボソーム・EF-G 複合体の高分解能(7Å)^{*5}構造解析に成功しました（図 3）。電子顕微鏡像に全長の結晶構造を重ねて、精密な構造情報を総合的に解釈し、GTP を結合した EF-G とリボソームの相互作用について詳しい解析を行いました。

その結果、EF-G のスイッチ 1^{*6}が 16S リボソーム RNA(rRNA^{*3})のヘリックス h14 と相互作用していることを新たに発見し、EF-G がリボソームの助けを借りて活性型になることへの構造的な裏付けを得ました(図 4 左)。また、伸長因子の GTP 加水分解反応に重要であると考えられている 23SrRNA のサルシンリシンループ(ヘリック

ス H95)は、EF-G の GTP 結合部位と明確に相互作用しており、このループが GTP 加水分解に直接関与していることが示唆されました (図 4 右)。

本研究成果は、わが国で推進している「タンパク 3000 プロジェクト」の一環として行われたものです。本研究成果の詳細は、米国の学術雑誌『Molecular Cell』3月9日号に掲載されます。

1. 背景

リボソームでは、アミノ酸がペプチド結合によって1つずつ連結される反応が繰り返されて、タンパク質が合成されていきます (図 1)。リボソームには、tRNA が結合する部位が3ヶ所 (A 部位、P 部位、E 部位) あり、タンパク質が合成されるにしたがって、tRNA は mRNA と共にリボソーム上を A→P→E と移動します。その間リボソームは POST (A 部位が空で、ペプチジル tRNA が P 部位を占めている安定な状態) と PRE (P 部位のペプチジル基が A 部位のアミノアシル tRNA に転移した状態) の2つの状態を繰り返しながらペプチド結合を伸ばしていきます。全生物が共通に保持している翻訳伸長因子 (elongation factor: EF) EF-Tu と EF-G は、この反応で重要な働きを担う GTP 加水分解酵素です。(真核生物^{*7}では、eEF-1α, eEF-2 と呼ばれています。)

タンパク質が合成される過程では、まず EF-Tu が、POST 状態のリボソームの A 部位に、コドンと対合するアミノアシル tRNA をアミノアシル tRNA・EF-Tu・GTP 複合体として運び入れます①。リボソーム上で EF-Tu が GTP を加水分解すると同時に、アミノアシル tRNA は A 部位に完全に収められます。即座に、リボソームが P サイトのペプチジル tRNA から A 部位のアミノアシル tRNA へ、ペプチド結合転移反応を行い、A 部位に1つ長くなったペプチジル tRNA が生成します② (GTP を加水分解した後、EF-Tu・GDP は、リボソームを離れ、ヌクレオチド交換因子 EF-Ts の助けをかりて、EF-Tu・GTP となってリサイクルされます)。EF-G は、この PRE 状態のリボソームに、GTP 依存的に結合し③、A 部位、P 部位にある tRNA をそれぞれ P 部位、E 部位へ移動させて、POST 状態を作り出し④、リボソームから解離します⑤。こうしてペプチド鎖が1つ伸びたペプチジル tRNA が P 部位に配置されます。この反応をトランスロケーション (translocation: 転座) と言います。POST 状態のリボソームに、EF-Tu が再び次のアミノアシル tRNA を運び込んで、タンパク質合成が進んでいきます。

EF-G は、一連の反応の間に GTP を加水分解し、EF-G・GDP になるのですが、いつどのように EF-G・GTP に変換されるのか、GTP-GDP 交換で、どのような構造変化が起こるのか、また GTP の加水分解は何のために起こるのかについては、まだ結論が出ていませんでした。

2. 研究手法と成果

「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」のゲノム解析により、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* には EF-G の遺伝子が2つあることが判明しました。2つの EF-G を大腸菌で発現させ、これを精製して活性を比較したところ、同じ活性を持つことが確認されました。さらに2つめの EF-G の結晶を作成し、大型放射光施設 SPring-8

の理研構造ゲノム I ビームラインの BL26B1、および理研構造生物学 I ビームラインの BL45XP を使用して 2.2 Å の回折データを得ました。X 線結晶構造解析の結果、GTP が結合した EF-G のスイッチ領域を含む全長構造の決定に初めて成功しました (図 2)。一方、ドイツのグループは、同じく *T. thermophilus* リボソームと EF-G・GMPPNP^{*4} との複合体について、超低温電子顕微鏡による高分解能 (7Å) での構造解析に成功しました (図 3)。両グループは、X 線結晶構造解析から得られた精密な構造情報を電子顕微鏡像にモデリングし、GTP を結合した EF-G とリボソームの相互作用について詳しい解析を行いました。

解析の結果、リボソーム 30S サブユニットの 16SrRNA のヘリックス^{*8}h14 と EF-G のスイッチ 1 の相互作用を新たに発見し、EF-G がリボソームの助けを借りて活性型になることを構造的に裏付けることができました (図 4 左)。つまり、EF-G は単独で活性型の構造はとらず、リボソームと相互作用することによって初めて GTP 結合部位周辺の構造が安定化することが示されたのです。また、伸長因子の GTP 加水分解反応に関与すると考えられている 23SrRNA の 2 つのヘリックス H89 と H95 のうち、サルシンリシンループとも呼ばれる H95 は、スイッチ領域と明確に相互作用しており、GTP 加水分解への直接の関与が示唆されました (図 4 右)。

本研究成果により、長年謎であった EF-G のスイッチ 1 の構造が決定され、EF-Tu と極めて似ていることが明らかになりました。このスイッチ I は、結晶中では隣の分子に相互作用していますが、EF-Tu の場合は tRNA と相互作用しています (図 2)。さらに、リボソームとの複合体では、ヘリックス h14 と相互作用していることが明らかになったので、EF-G は GTP を携えてリボソームに結合して初めて活性型構造が安定になると結論づけられました。リボソームによって活性型構造が安定化された EF-G は、その状態で A 部位の tRNA を P 部位に押しやります (これが今回解析された構造です)。次いで GTP の加水分解が起こり、分解されたリン酸が外れると、GTP 結合部位の構造保持は解放され、EF-G・GDP となってリボソームから解離します。つまり、リボソームが PRE 状態から、より安定な POST 状態に移行する間、EF-G は tRNA が逆戻りしないための「つかえ棒(Ratchet)」の役割を果たしているのです。あるいはまた、GTP を結合している EF-G は、H95 と h14 の相対的位置すなわち、50S と 30S の相対的位置を認識しているといえるかも知れません。

3. 今後の展開

トランスロケーションは、全ての生物の細胞で起こる普遍的な反応ですが、伸長因子とリボソームの組み合わせには、特異性があることが知られています。このことは、リボソームのダイナミックな動きが正確に制御される機構があることを示唆しています。今後、H95 以外にも伸長因子の働きに重要だと考えられている H89 や、ストークと呼ばれる部分 (リボソームタンパク質 L10/L7/L12 複合体) との相互作用についても、伸長因子との複合体の構造解析を行うことによって、詳細な構造情報を得る事ができます。今回発見された h14 との相互作用も含めて、ひとつずつ明らかになっていく相互作用が、一連の反応のなかで、どのように順序立てられているかについて、新しい知見が得ることが期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所 横浜研究所
ゲノム科学総合研究センター
タンパク質構造・機能研究グループ
プロジェクトディレクター

横山 茂之

Tel : 045-503-9196 / Fax : 045-503-9195

タンパク質構造・機能研究グループ

上級研究員 竹本 千重

Tel : 045-503-9196 / Fax : 045-503-9195

横浜研究所 研究推進部

溝部 鈴

Tel : 045-503-9117 / Fax : 045-503-9113

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 翻訳伸長因子(Elongation Factor: EF)

ポリペプチド鎖 (タンパク質) が伸長するときに触媒として作用するタンパク質。
EF-Tu と EF-G は、GTP 加水分解酵素である。

※2 リボソーム

すべての生物の細胞に存在するタンパク質合成を担う細胞内小器官で、RNA・タンパク質の超分子複合体。大小 2 つブユニットで構成される。大きさは沈降係数(S)で表し、バクテリアは 50S (大) と 30S (小) である。

※3 RNA(ribonucleic acid:リボ核酸)

細胞内で DNA の遺伝情報は、RNA に転写される。このうち、タンパク質合成の鋳型となるのが mRNA (メッセンジャーRNA : 伝令 RNA) である。その mRNA の塩基配列とアミノ酸を対応させるアダプターが tRNA (トランスファーRNA : 運搬 RNA) である。この他に、リボソームを構成する rRNA (リボソーム RNA) や機能性の低分子 RNA (非コード RNA : ncRNA) がある。

※4 GTP (Guanine nucleoside tri-phosphate)

グアニンヌクレオシド 3 リン酸。GTP 加水分解酵素によって一番外側のリン酸結合が加水分解を受け、GDP (グアニンヌクレオシド 2 リン酸) と遊離のリン酸を生じる。GMPPNP は、この加水分解反応が起こりにくい GTP の類似化合物。

※5 高分解能

Å (オングストローム: 1×10^{-10} メートル (=0.1 ナノメートル)) の単位を用いて表し、この数字が小さいほど分解能が高く、より精度が高いことを示す。

※6 スイッチ

図 2 の脚注参照。

※7 真核生物

生物の分類のひとつであり、細胞に核を持つ、真核細胞からなる生物を指す。

※8 RNA のヘリックス(螺旋構造:helix)

相補的な配列をもつ RNA が塩基対を組んで 2 本鎖を形成している部分。RNA の構造が安定になり、機能と深い関わりがあることも多い。リボソーム中で rRNA 分子は、たくさんのヘリックスが折り畳まれて高次構造を形成している。図 2 右に示すように tRNA もヘリックス構造によって安定な立体構造を保持している。

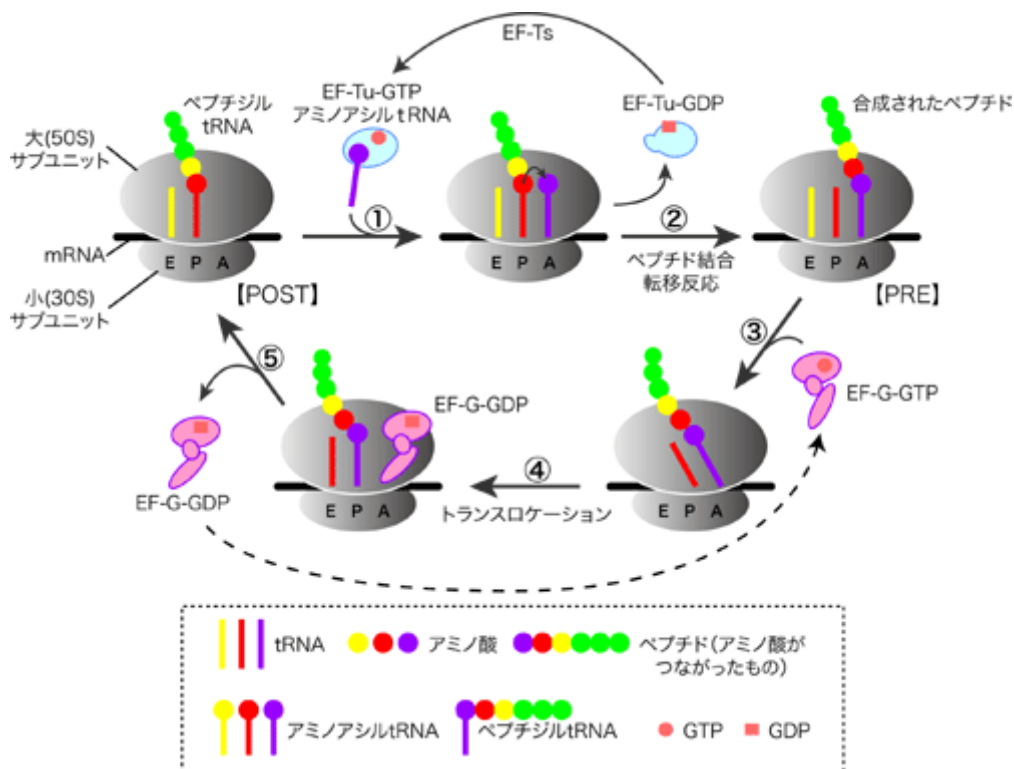


図 1 タンパク質合成で働く 2 つの伸長因子

タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸にそれぞれ対応する tRNA があって、アミノ酸を結合したアミノアシル tRNA がリボソーム上でタンパク質合成に使われる。アミノアシル tRNA・EF-Tu・GTP 複合体と EF-G・GTP 複合体は、リボソームの A 部位に交互に結合し、GTP を加水分解すると GDP 複合体となってリボソームから解離する。EF-Tu は、EF-Ts に助けられて GDP と GTP を素早く交換しているが、

EF-G・GDP を EF-G・GTP に変換する酵素はみつかっていない。

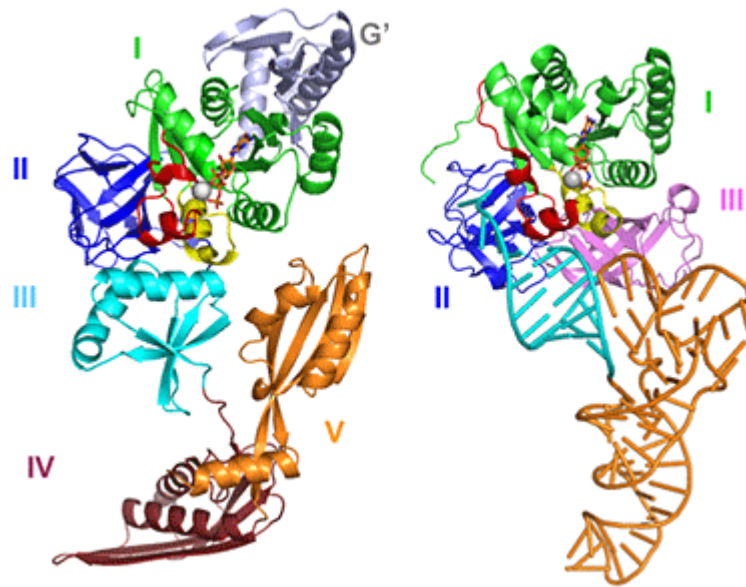


図 2 伸長因子の結晶構造

(左 : EF-G・GTP、右 : アミノアシル tRNA・EF-Tu・GMPPNP)

EF-G は、5つのドメインから構成されており、ドメイン I (緑) と II (青) は EF-Tu とともに類似性が高い (ただし、EF-Tu には G'がない)。ドメイン I は GTP 加水分解酵素に相当するドメインである。GTP 加水分解酵素には、GTP (スティックで示す) を認識する 5つのモチーフ(G1-G5)があり、G2, G3 はそれぞれスイッチ 1 (赤) , スイッチ 2 (黄) と呼ばれ、GTP の β , γ 位のリン酸基やそれに配位するマグネシウム分子 (白) と相互作用する重要な領域である。ドメイン III-V は、アミノアシル tRNA・EF-Tu・GMPPNP との構造比較から tRNA (橙) に相当する分子擬態であることが知られている。図に使用した座標の PDB ID はそれぞれ 1WDT (左) と 1BO2 (右)。

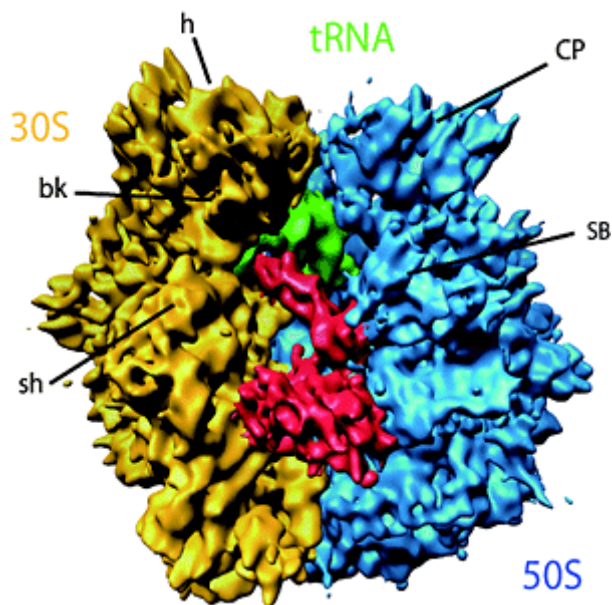


図3 7Åの電子顕微鏡像

T. thermophilus 70S リボソームの電子顕微鏡像。50S と 30S のサブユニットの会合面で、mRNA やアミノアシル tRNA、伸長因子が機能する。EF-G(赤)は、リボソームの A 部位に結合している。細胞内ではペプチジル tRNA が占有する場所である P 部位に tRNA (黄緑) が結合している。

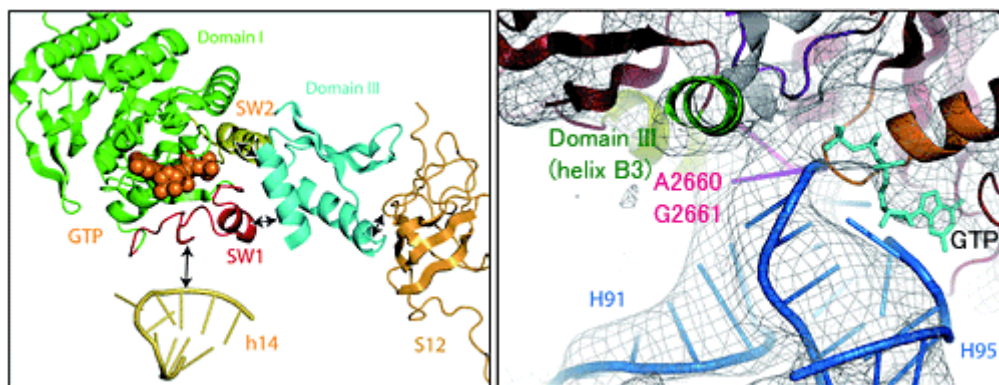


図4 リボソームと EF-G の相互作用

(左) スイッチ 1 と 16S rRNA のヘリックス h14 (30S)の相互作用

単体の結晶構造解析によって EF-G のスイッチ 1(SW1)の構造が決定されたことと、電子顕微鏡像の分解能が高かったため、相互作用している部位を特定できた。最密充填モデルで示した GTP は、EF-G・GTP の結晶構造からモデリングしたもの。矢印は、今回のリボソーム複合体で同定された相互作用。S12 は、リボソーム 30S サブユニットを構成するタンパク質のひとつ。

(右) EF-G の GTP 結合部位と 23S rRNA の H95 (50S)の相互作用>

電子顕微鏡によって得られた GTP 結合部位と H95 に相当する電子密度が、明

らかに繋がっていることから、相互作用していると解釈できる。特に A2660-G2661 は、配列保存性の高い塩基で、機能にも重要であると考えられている。