

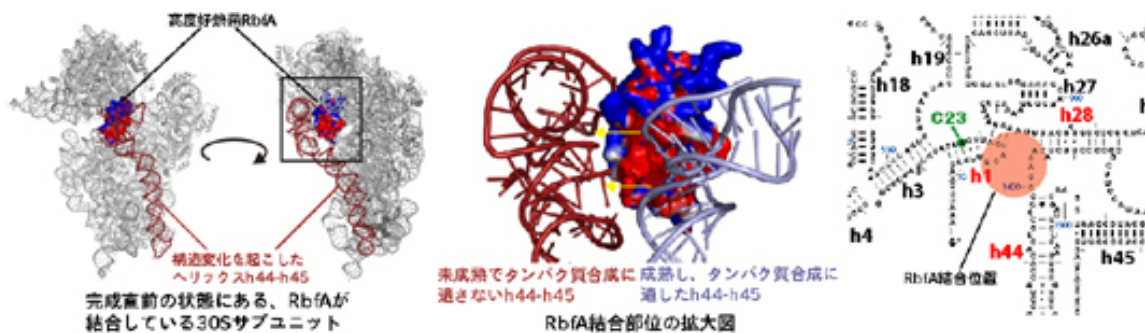
2007年11月9日  
 独立行政法人 理化学研究所  
 ニューヨーク州立大学  
 フランクフルト大学

## タンパク質合成工場「リボソーム」30Sサブユニットの完成直前の姿を捉える

- 成熟因子 RbfA タンパク質との結合部位を世界で初めて解明 -

高等生物からバクテリアまで、地球上に生育するすべての生物は、DNAのコードする遺伝情報に基づいて多様な機能を持つ分子を発現させ、その生命活動を営んでいます。このうち特に重要なのはタンパク質であり、細胞の中では分子量が約250万もの巨大な工場である「リボソーム」で合成されています。リボソームは、多数のRNAとタンパク質を含むサブユニットと呼ばれる構造からなりますが、この複雑な分子がどのようにして組み上がって成熟していくのかは未だに不明の点が多く、世界中で盛んに研究されています。

理研ゲノム科学総合研究センタータンパク質基盤研究グループは、わが国が推進している「タンパク3000プロジェクト」の一環として、米国ニューヨーク州立大学、独国フランクフルト大学の研究グループと協力し、バクテリアのリボソームの成熟に関わるタンパク質「RbfA」が、リボソーム30Sサブユニットに結合した状態の超低温電子顕微鏡像を観察し、その完成直前の姿を捉えることに成功しました。得られた構造から、「RbfA」がリボソーム30Sサブユニットの機能に重要な部分に結合することによってその成熟を助けると同時に、リボソーム30Sサブユニットの構造を変化させることにより、未成熟のままタンパク質合成に利用されないようにしていることが明らかになりました。「RbfA」がバクテリアに特有のタンパク質なことから、今回の成果で得られた構造情報は、病原菌のリボソームの働きを止めて作用する新薬の開発などに役立つと期待されます。



(図) 高度好熱菌30Sサブユニット-RbfA複合体の構造

2007年11月9日  
独立行政法人 理化学研究所  
ニューヨーク州立大学  
フランクフルト大学

## タンパク質合成工場「リボソーム」30S サブユニットの完成直前の姿を捉える

- 成熟因子 RbfA タンパク質との結合部位を世界で初めて解明 -

### ◇ポイント◇

- ・リボソーム成熟に関わる RbfA タンパク質の結晶構造を解析
- ・タンパク質の合成開始を根本から阻害する部位に結合
- ・リボソームへの作用部位の情報が新規薬剤の設計の新たな羅針盤に

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、米国のニューヨーク州立大学（President Dr. George Philip ジョージ・フィリップ学長）と独国のフランクフルト大学（President Dr. Rudolf Steinberg ルドルフ・スタインバーグ学長）との共同研究で、原核生物<sup>\*1</sup>リボソームの構成成分である 30Sサブユニットに、リボソーム成熟に関わるRbfAタンパク質が結合している状態を捉えることに成功しました。これは理研ゲノム科学総合研究センター（榊佳之センター長）タンパク質基盤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、上西達也リサーチアソシエイト、川添将仁テクニカルスタッフ、ニューヨーク州立大学Dr. Rajendra Agrawal（ラジェンドラ・アグローワル）のグループ、フランクフルト大学Dr. Paola Fucini（パオラ・フッチーニ）のグループによる成果です。

リボソームは、すべての生物が共通して持っている超分子複合体<sup>\*2</sup>で、遺伝情報をトランスファーRNA（tRNA）を介して「翻訳」し、タンパク質を合成します。今回注目したリボソーム 30Sサブユニット（分子量約 90 万）には、メッセンジャーRNA（mRNA）に転写された遺伝情報を正確に読み取る役割があります。30Sサブユニットは、約 1,500 塩基のリボソームRNA（16S rRNA）と 22 個のリボソームタンパク質で構成されています。生体内ではまず、16S rRNAの前駆体である 17S RNAが産生され、リボソームタンパク質と複合体を形成しながら、切断や修飾を受けて、30Sサブユニットへと成熟していきます。この成熟過程で重要な役割を果たしているタンパク質の一つがRbfAなのですが、RbfAの結合部位や結合の様式、またその役割の詳細については、よくわかっていませんでした。

研究グループは、まず放射光のX線で高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来のRbfAの結晶構造を高分解能<sup>\*3</sup>（1.84 Å）で決定しました。さらに、高度好熱菌から30Sサブユニットを回収、精製し、これらの試料を用いた 30S-RbfA複合体の超低温電子顕微鏡像を得ることに成功しました。この一連の観測から、16S rRNAが大きな構造変化を起こしていることが判明し、複合体の結晶構造から、世界で初めてRbfAの詳細な結合部位がわかりました。

決定した構造から、RbfAは、mRNAとtRNAの結合部位を占有するだけでなく、16S rRNAの柔軟性を利用してその高次構造を操作することにより、未成熟 30Sサブユニットが翻訳を開始しないように制御していることが明らかとなりました。リボソーム

の正確な成熟は、その機能の発現に必須であり、ひいては生物の生存に重大な影響を与えうる生命活動の一つと言えます。また、RbfAは、原核生物特有のリボソーム成熟因子であるため、抗生物質開発などの格好のターゲットとなり、新規薬剤の設計にリボソームへの作用部位の構造情報が役立てられると期待されます。

本研究成果は、わが国で2002年4月から2007年3月まで実施した「タンパク3000プロジェクト」の一環として行われたもので、詳細は、米国の学術雑誌『*Molecular Cell*』11月9日号に掲載されます。

## 1. 背景

リボソームは、RNAと多数のタンパク質からなる分子量約250万の巨大な複合体で、細胞内において、DNAの遺伝情報が転写されたメッセンジャーRNA (mRNA) の情報をもとにタンパク質へ「翻訳」という重要な役割を担っています。原核生物のリボソームは、70Sと呼ばれ、大小2つのサブユニット (50Sおよび30S) から構成されています。今回注目したのは、このうちの30Sサブユニット (分子量約90万) で、mRNAに転写されている遺伝情報を正確に読み取るという、翻訳過程で最も重要なステップとなっている反応を行う場所です。

原核生物のリボソーム30Sサブユニットは、およそ1,500塩基のリボソームRNA (16S rRNA) と22個のリボソームタンパク質で構成されています。16S rRNAは、まず、前駆体である17S RNAとして産生され、その両末端が3段階の切断プロセスを経て、16S rRNAとして成熟していきます。この過程で、16S rRNAは、部位によって数100塩基も離れた部分と塩基対を形成するという、非常に複雑な高次構造をとります (図1)。また、同時に、リボソームタンパク質を巻き込みながら、30Sサブユニットとして完全に成熟していきます。

30Sサブユニットは、その構成成分それぞれを単離し、それらを混ぜ合わせた場合でも、正しく機能する高次構造を取り戻すことができますが、そのためには、通常の生体内環境には見られないような高温・高塩濃度などの反応条件を整えることが必要であるため、この過程には大きなエネルギー障壁が存在すると考えられています。従って、細胞内では、このようなエネルギー障壁を乗り越えて30Sサブユニットの成熟を促す因子が必要とされているのです。

Ribosome-binding factor A (RbfA) は、その遺伝子を欠損させた株の細胞内に、未成熟な17S RNAを蓄積することから、30Sサブユニットの成熟を促進するタンパク質の一つとして同定されました。また、17S RNAは、16S rRNAの23番目の塩基であるシトシン<sup>\*4</sup>をウラシル<sup>\*4</sup>に置換した変異株が低温条件にさらされた時にも蓄積しますが、RbfAを大量発現させると、その変異16S rRNAへの成熟を助けるという遺伝学的な実験から、RbfAの大まかな結合部位が予想されていました。しかし、リボソームは分子量が大きく、構成因子も多いため、成熟過程は非常に複雑で、その素過程はほとんど明らかになっていませんでした。このため、研究グループは、立体構造の面から30Sサブユニット成熟の過程を解明すべく、RbfA単体と30S-RbfA複合体の構造解析を行いました。

## 2. 研究手法と成果

研究グループは、大量に培養した高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 からリボソーム 30Sサブユニットを回収し、精製しました。また、高度好熱菌のRbfAを、大腸菌に遺伝子を組み込むことで大量に発現させて精製し、まず、30S-RbfA複合体の構造解析に必要となるRbfA単体の結晶構造解析を行いました。実験は、大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構にある放射光科学研究施設（フォトンファクトリー）のBL-5Aビームラインを用いて、高分解能（1.84 Å）で高度好熱菌のRbfAの構造を決定しました。その結果、RbfAは、RNA結合に特徴的な構造単位の一つである、KHドメイン構造を有していることが判明しました（図 2, A）。また、RbfAは、他の生物種間のアミノ酸配列の保存性が比較的低いタンパク質ですが、高度好熱菌RbfAは、既に報告されている大腸菌やインフルエンザ菌のRbfAと、立体構造や表面電荷が非常に良く似ていることが判明しました（図 2, B）。

一方、30S-RbfA複合体の超低温電子顕微鏡像と、30Sサブユニットのみの構造との比較を行ったところ、RbfAが30Sサブユニットの機能を果たす上で重要な部位に大きな構造変化をもたらしていることを発見しました。さらに、結晶構造解析のモデルを用いて、RbfAが30Sサブユニットに結合する詳細な部位を世界で初めて明らかにしました。

30Sサブユニットは、大きく分けて、Head、Body、Platformと名付けられた三つの部位で構成されています。RbfAはそのHeadとBodyの境目の50Sサブユニットとの会合面に結合していました（図 3, A）。この部分は、mRNAと、アミノ酸を運ぶトランスファーRNA（tRNA）が結合する重要な部位であり、RbfAがこの部位に結合することは、翻訳の開始反応を根本から阻害していることとなります。さらに、RbfAの結合は、30Sサブユニットが50Sサブユニットと会合する場合の相互作用部位にも影響を与えており（図 3, B）、70Sリボソームから始まる翻訳の開始も同時に阻害している可能性が考えられます。また、RbfAの結合部位は、16S rRNAの二次構造上で見ると、ヘリックス<sup>\*5</sup>のh1、h28、h44の連結部（図 3, C）で、未成熟な17S RNAの蓄積を引き起こす変異が同定されている23番目のシトシンに近いことが明らかになりました。これらの結果から、RbfAは、17S RNAが産生された初期のうちに結合して、ヘリックス形成の役割を果たすと同時に、30Sサブユニットが成熟するまでの間、未成熟の30Sサブユニットが翻訳を開始しないようにとどまり続けると結論づけられました（図 4）。すなわち、今回得られた複合体の構造は、成熟した30SサブユニットからRbfAが離れる前の、30Sサブユニットが完成する直前の状態を捉えたものです。

## 3. 今後の期待

今回決定した構造から、RbfAは、mRNAとtRNAの結合部位を占有するだけでなく、16S rRNAの柔軟性を利用してその高次構造を操作することにより、未成熟30Sサブユニットが翻訳を開始しないように制御していることが明らかとなりました。リボソームの正確な成熟は、その機能の発現に必須であり、ひいては生物の生存に重大な影響を与えうる生命活動の一つと言えます。RbfAは、原核生物特有のリボソーム成熟因子なので、抗生物質などの格好のターゲットとなり得るものであり、新規薬剤の設計にリボソームへの作用部位の構造情報が役立てられると期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

ゲノム科学総合研究センター

タンパク質基盤研究グループ

プロジェクトディレクター 横山 茂之(よこやま しげゆき)

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

横浜研究所 研究推進部

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 原核生物

生物の分類の一つであり、細胞に核を持たない原核細胞からなる生物を指す。

### ※2 超分子複合体

水素結合などの比較的弱い結合の仕方で、複数の分子が集合したもの。

### ※3 高分解能

Å (オングストローム) 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、より精度の高い高解像度であることを示す。 $1\text{Å}=1\times 10^{-10}\text{m}=0.1\text{nm}$ 。

### ※4 シトシンとウラシル

核酸 (RNA または DNA) を構成するピリミジン塩基は、シトシン (C)、ウラシル (U)、チミン (T) の 3 種類あり、ウラシルは主に RNA に、チミンは主に DNA に、シトシンは両方に存在する。シトシンはグアニン (G) と 3 本の水素結合を形成して塩基対 (C-G) を形成する。ウラシルは、アデニン (A) だけでなく、グアニンとも塩基対 (U-A, U-G) を形成するが、この U-G 塩基対は、C-G に比べて安定性が低い。

### ※5 ヘリックス

リボソーム中で、rRNA が塩基対を形成して、2 本鎖を形成している部分をヘリックスと呼び、番号がつけられている。

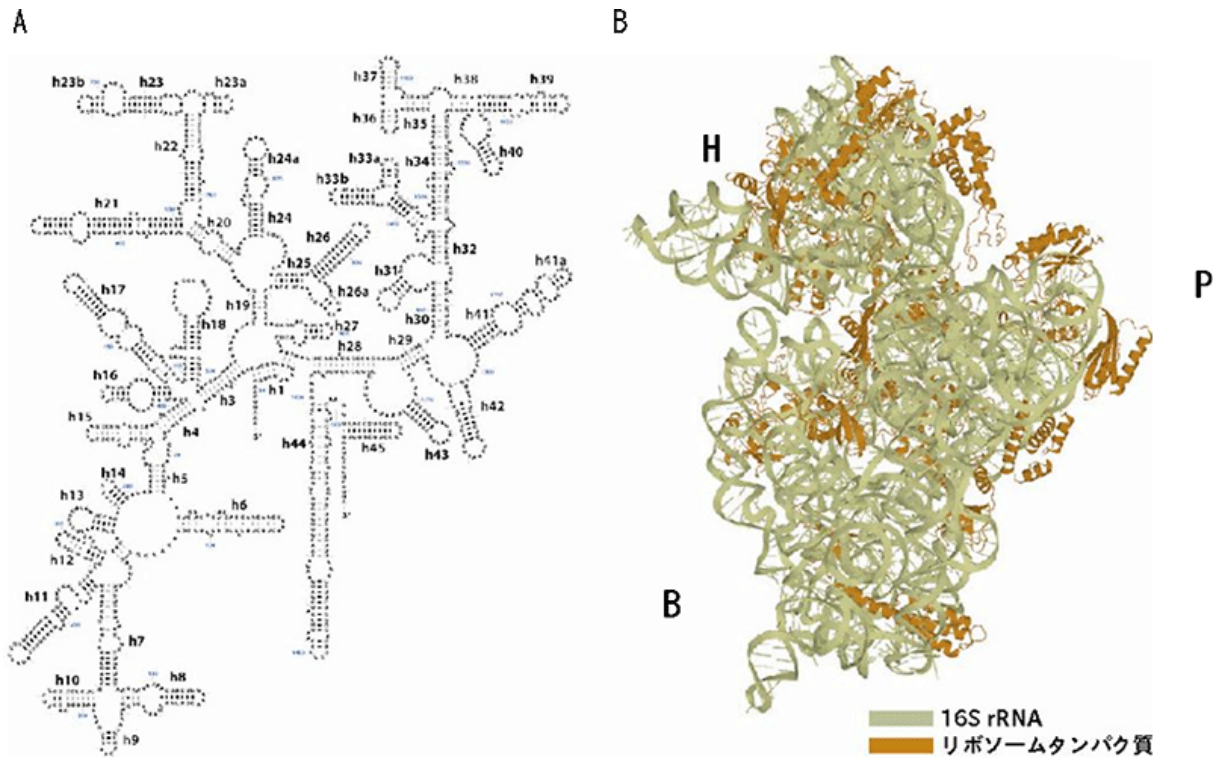


図1 30Sサブユニットの複雑な構造

A : 16S rRNA の二次構造

16S rRNA は約 1,500 塩基からなる巨大な分子で、その構造は、多数の塩基対が連なったヘリックス構造が、時には数 100 残基も離れた塩基同士で形成され、非常に複雑である。

B : 30S サブユニットの構造

原核生物では通常、22 個のリボソームタンパク質が存在し、主に 16S rRNA の複雑な構造を保つために結合している。これらは、30S サブユニットの成熟過程で、結合していく順番がある程度決まっている。リボソームタンパク質が順次結合していくにつれ、16S rRNA の高次構造が組み立てられ、やがて 30S サブユニットとして成熟する。H は Head、B は Body、P は Platform と名付けられた部分の名称を示す。

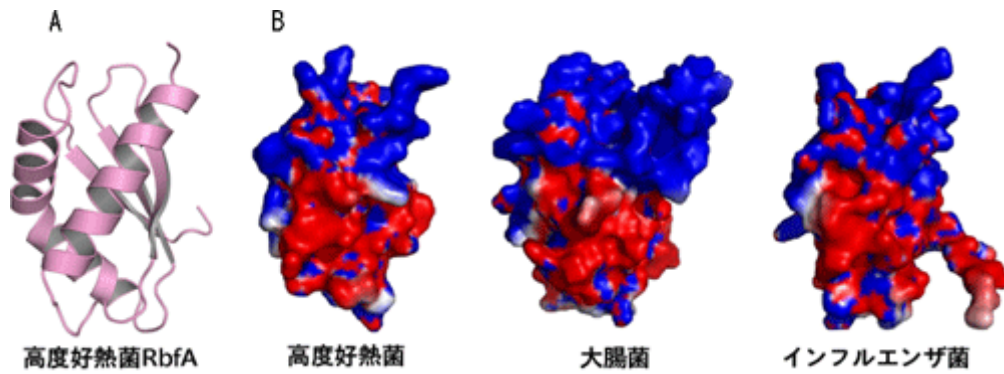


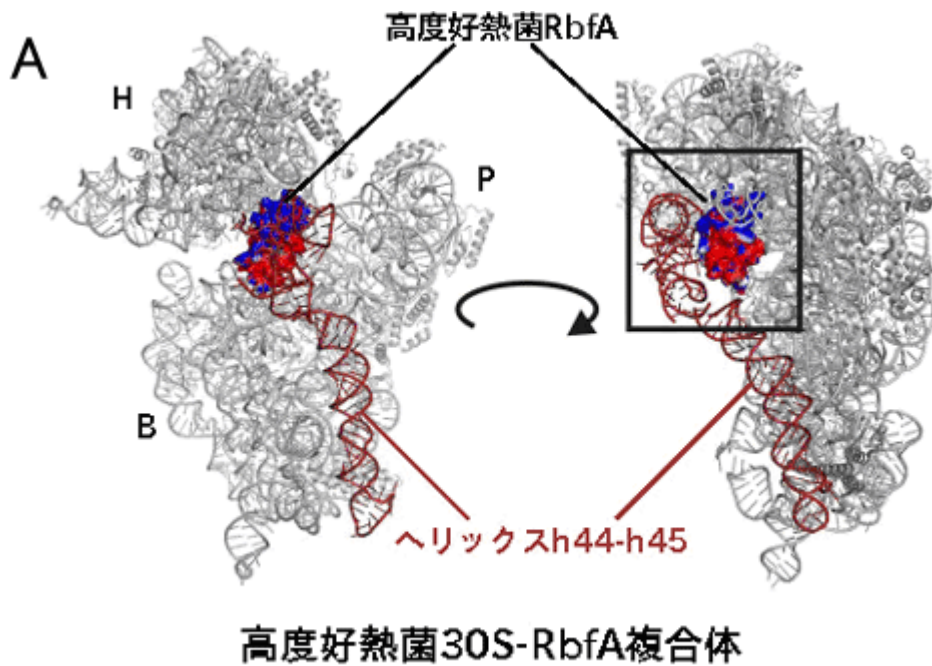
図2 高度好熱菌 RbfA の構造及び、他生物種との表面電荷の比較

A : 高度好熱菌 RbfA の構造

高度好熱菌 RbfA は 95 残基のアミノ酸からなるタンパク質である。このタンパク質を構造解析したところ、RNA 結合に特有の構造単位の一つで、KH ドメインと呼ばれる構造であることが判明した。

B : 高度好熱菌 RbfA と大腸菌 RbfA、インフルエンザ菌 RbfA の表面電荷の比較

高度好熱菌 RbfA は、進化的に近いとされる大腸菌のものとも比べても、アミノ酸配列の保存性は 27% と比較的低いが、立体構造や表面電荷はとてもよく似ている（青は塩基性、赤は酸性）。これは、アミノ酸自身の保存性よりも、タンパク質の形とその表面電荷の偏りが、その機能に重要な役割を果たしていることを示唆している。



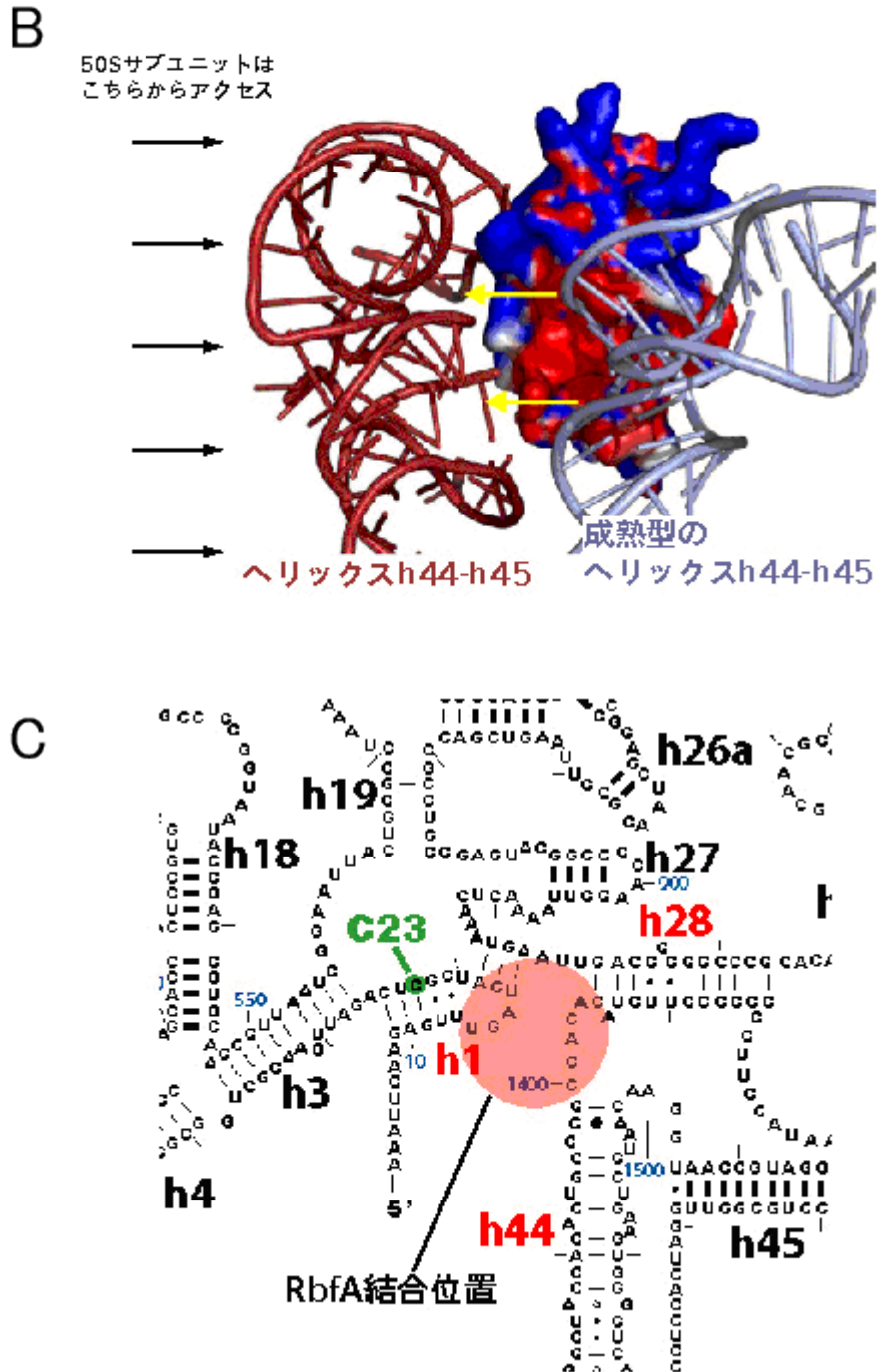


図3 高度好熱菌 30S サブユニット-RbfA 複合体の構造

- A :** 高度好熱菌 30S サブユニット-RbfA の構造  
RbfA は、30S サブユニットの 50S サブユニットとの会合面にあるヘリックス h44 と h45 の内側に結合していた。この部分は mRNA の通り道で、また、tRNA の結合位置とも重なっていた。このことから、RbfA が 30S サブユニットに結合している間は、mRNA、tRNA の結合が阻害されることが示唆された。
- B :** ヘリックス h44、h45 の構造変化とその影響 (A の囲み部分の拡大図)  
30S サブユニットが 50S サブユニットと会合する際、ヘリックス h44 と h45 は、サブユニット間の相互作用に対する寄与が最も大きな部位である。RbfA



の結合により、h44 と h45 の構造は大きく歪められ、成熟型 30S サブユニットに比べて、50S サブユニット会合面方向へ大きく押し出される。このことから、RbfA の結合は、30S サブユニットの、50S サブユニットとの会合も阻害していることが考えられる。

C : 16S rRNA 二次構造上における RbfA の結合位置

RbfA は、ヘリックス h1、h28、h44 が形成するジャンクション（赤い円）の付近に結合している。ヘリックス h1 に、23 番目のシトシン（緑の点）は含まれており、RbfA は主にヘリックス h1 の形成を助けていると考えられる。

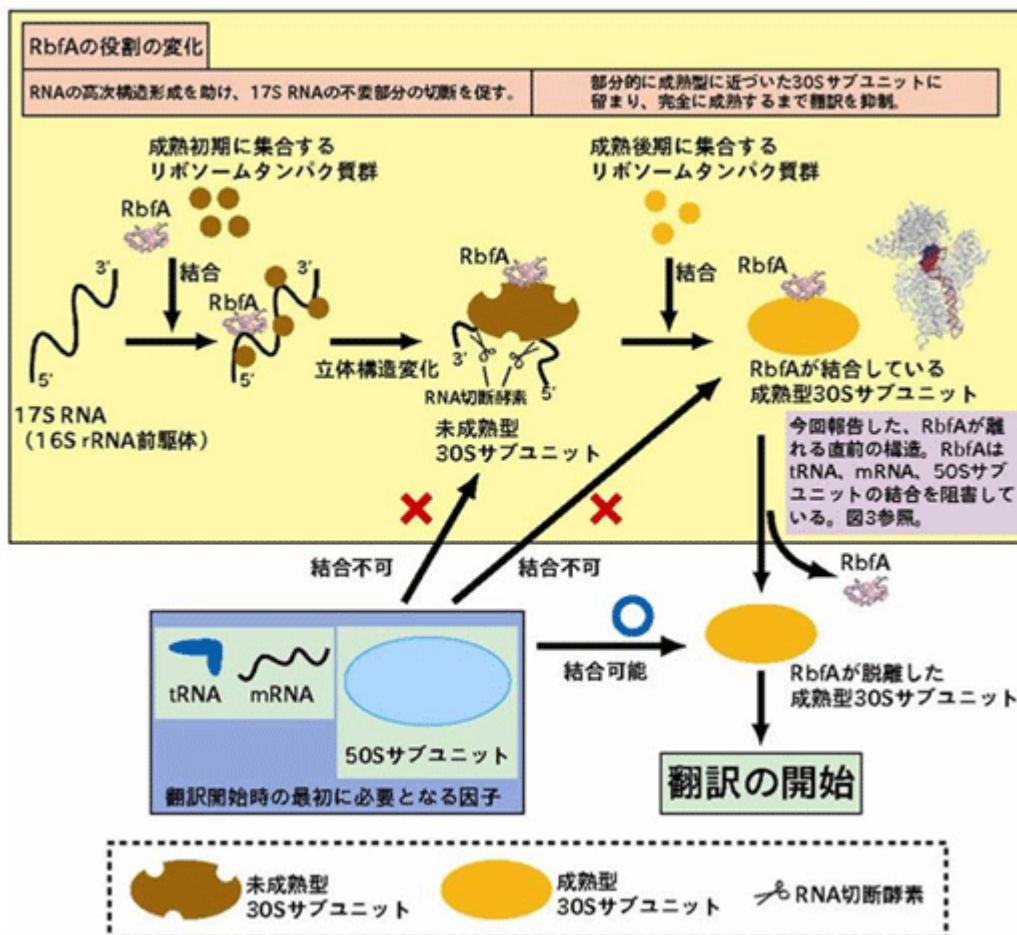


図4 30S サブユニットの成熟過程における RbfA の役割

16S rRNA は、まず、前駆体であるおよそ 1,700 塩基の 17S RNA として産生される。RbfA は成熟過程初期の 17S RNA に結合し、同時に、成熟初期に集合するリボソームタンパク質群と共に、初期の未成熟 30S サブユニットを形成する。このとき、RbfA によって RNA の高次構造形成が促され、17S RNA の 5'、3'両末端にある余分な配列が切断プロセスを受けられるようになり、RNA 切断酵素によって切断を受ける。その後、さらに 30S サブユニットの成熟が進み、今回の報告した RbfA が離れる直前の状態である、成熟した 30S と RbfA の複合体を経て、30S サブユニットの成熟が完結

する。RbfA は、30S サブユニットが成熟し終えるまでの間、mRNA と tRNA が結合する部位を覆っており、加えて 50S サブユニットと結合する際の相互作用部位の構造に著しく影響を与えている。mRNA、tRNA、50S サブユニットは、翻訳を行う際になくてはならない要素であり、これらが結合できないことは、すなわち、RbfA は 30S サブユニットが成熟し終えるまでの間、未成熟な 30S サブユニットの翻訳開始を阻害していることにほかならない。