

## リボソームの触手による翻訳因子の収集機構

今井 大達

### 1. はじめに

リボソームはmRNAの塩基配列を基にタンパク質を合成する翻訳装置である。これまで、好熱性細菌からヒトに至るさまざまな生物のリボソームの立体構造が報告され、ペプチド結合の形成やmRNA塩基配列の解読といったリボソームの基本的な作用機序はほぼ解明されつつある。一方、リボソームは翻訳の各段階で“翻訳因子”と呼ばれるさまざまなリボソーム結合タンパク質との動的な結合と解離を繰り返す。リボソームと翻訳因子の結合・解離サイクルが破綻すると、タンパク質の合成速度と正確性が低下し、場合によっては細胞死や疾患の原因となる。筆者らはリボソームと翻訳因子の結合・解離サイクルの分子機序を解明するため、古典的な生化学解析および一分子観察による研究を行ってきた。本稿では、高速原子間力顕微鏡（高速AFM）により明らかとなったリボソームの触手タンパク質（Pストーク）による翻訳因子の収集機構を紹介する。

### 2. 翻訳伸長とリボソーム触手タンパク質

遺伝情報の翻訳は開始、伸長、終結、リサイクルの四段階からなる。このうち、mRNAの塩基配列を基にペプチド鎖が伸長する翻訳伸長は、2種類のGTPase型翻訳因子EF1AとEF2が、リボソームの翻訳因子結合部位（factor-binding center）に交互に結合しながら進行する（図1）。翻訳伸長では、まず翻訳因子EF1AがGTP、アミノアシルtRNA（aa-tRNA）と三者複合体を形成してリボソームに結合する。mRNAとaa-tRNAのコドン-アンチコドン対合が安定な場合のみ、GTP加水分解を経てEF1Aのみがリボソームから解離しペプチド鎖が伸長するが、そうでない場合は三者複合体の形でリボソームから解離し、別のEF1A-

GTP-aa-tRNA三者複合体が結合する。ペプチド鎖が伸長すると、翻訳因子EF2がリボソームに結合する。EF2のGTP加水分解によりmRNAとtRNAの転座反応が促進され、リボソームは再びEF1A-GTP-aa-tRNA三者複合体を受け入れる状態となる。リボソームが終止コドンに到達するまでEF1A、EF2との結合・解離サイクルは繰り返され、真核生物では5~10アミノ酸/秒、原核生物では10~20アミノ酸/秒の速度でペプチド伸長が起きる。

EF1AとEF2は、リボソームのfactor-binding center近傍に存在するリボソームタンパク質複合体“ストーク”に依存して、自由拡散よりも速く効率的にリボソームと結合する<sup>1,2)</sup>。ストークはすべての生物のリボソームに存在する構造体であり、生化学的にストークを特異的に除去したりリボソームの試験管内翻訳伸長活性は著しく低下する<sup>3)</sup>。ストークを構成するリボソームタンパク質の種類は生物種によって異なり、ヒトの場合、リボソームタンパク質P0にリボソームタンパク質P1とP2のヘテロ二量体が二つ結合したP0-(P1-P2)<sub>2</sub>五量体を、古細菌の場合、リボソームタンパク質aP0（archaeal P0）にリボソームタンパク質aP1（archaeal P1）のホモ二量体が三つ結合したaP0-(aP1-aP1)<sub>3</sub>七量体をとる。真核生物と古細菌では、ストークを構成するリボソームタンパク質がリン酸化修飾を受けることから、Pストークとも呼ばれる。なお、リボソームE部位近

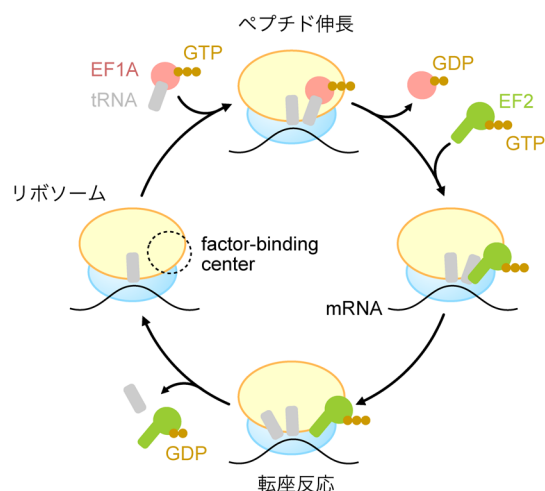


図1 翻訳伸長におけるEF1AとEF2の結合・解離サイクル  
EF1A-GTP-aa-tRNA三者複合体とEF2-GTPはリボソームのfactor-binding centerに交互に結合し、翻訳伸長を進行させる。

琉球大学大学院・医学研究科（〒903-0215 沖縄県中頭郡西原町字上原207）

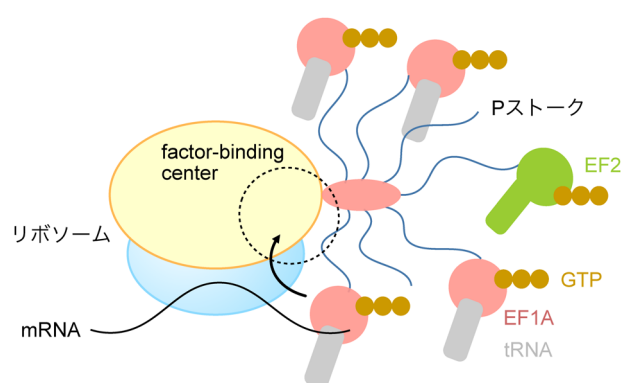
**Recruitment of translation factors by the tentacles of ribosomes**  
Hirotatsu Imai (Graduate school of medicine, University of the Ryukyus, 207 Uehara, Okinawa 903-0215, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940739

© 2022 公益社団法人日本生化学会





**図3** 触手タンパク質による翻訳因子の収集モデル  
高速AFMにより観察されたリボソーム触手タンパク質と翻訳伸長因子の複合体の模式図。触手タンパク質は複数の天然変性領域を介して周囲のEF1A, EF2濃度を上昇させ翻訳伸長反応の速度を上昇させる。

メインもリボソーム上で左右に運動しており、これまでの構造解析で触手タンパク質を捉えることができなかった原因が天然変性領域の揺らぎだけでなく、ベースドメイン自体の揺らぎにもあることが示唆された。

## 5. 触手タンパク質による翻訳伸長の反応場の形成

次に、触手タンパク質と翻訳因子の相互作用のようすをみるため、50Sリボソームサブユニットを基板にある程度強く固定しておき、一方で翻訳因子は基板上である程度拡散する条件で高速AFM観察を行った。この条件でも触手タンパク質のベースドメイン周囲に霧のようなものがみえたことから、天然変性領域はある程度自由に運動していると考えられる。観察中、サンプル溶液にEF1AまたはEF2を添加すると、それぞれの大きさに等しい4~7nmの球状の分子が現れ、触手タンパク質近傍に集合していくようすがみられた。さらに反応が進むと、触手タンパク質の周囲に翻訳因子が最大7分子まで結合できることが判明し、複数個の翻訳因子が触手タンパク質上に同時に滞在できることが明らかとなった。触手タンパク質周囲における翻訳因子の局所濃度は、リボソームの反対側（E部位）と比べ約6倍に上昇しており、翻訳因子がリボソームに効率よく結合するための反応場（翻訳因子プール）が形成されていた。この反応場は触手タンパク質を除去した50Sリボソームサブユニットの周囲では観察されず、触手タンパク質が翻訳因子プールの形成に重要であることが明らかとなった（図3）。

## 6. 触手タンパク質と翻訳因子の結合様式

古細菌の場合、触手タンパク質の天然変性領域に保存さ

れたL/GXXLFGモチーフがEF1AやEF2との結合に重要である。EF1A, EF2以外にもL/GXXLFGモチーフを介して結合する翻訳因子が報告されており、これまで、触手タンパク質と結合する4種類の翻訳因子とL/GXXLFGモチーフの結合様式がX線結晶構造解析により調べられている<sup>11-14</sup>。これらの研究結果から、触手タンパク質のL/GXXLFGモチーフが $\alpha$ -ヘリックス、 $3_{10}$ -ヘリックス、 $\beta$ -ターン、変性状態といった多様なコンホメーションをとりながら、立体構造が異なる複数の翻訳因子とそれぞれ結合することが明らかとなった。結合するタンパク質に応じて立体構造を柔軟に変化させることができる天然変性タンパク質としての性質が、さまざまな翻訳因子を収集する触手タンパク質にとって重要なのだろう。

## 7. おわりに

本研究では、試験管内でリボソームの触手タンパク質が翻訳因子を収集し翻訳因子プールが形成される過程を高速AFMにより可視化した。一分子蛍光観察により、大腸菌細胞内ではリボソーム1分子に対して平均3.5分子のEF-Tu（EF1A オーソログ）が同時に結合していることが示唆されており、翻訳因子プールは細胞中でも形成されていると予想される<sup>15</sup>。触手タンパク質が翻訳因子プールを形成する意義は何だろうか？ 試験管内翻訳では、触手タンパク質の数を低下させることで翻訳伸長の速度が低下する。また、触手タンパク質は翻訳伸長の正確性にも寄与する。出芽酵母においてリボソーム中の触手タンパク質の数が減少すると、翻訳伸長でaa-tRNAの誤った取り込みが起きやすくなる<sup>16</sup>。リボソームA部位周辺のEF1A-GTP-aa-tRNA三者複合体濃度を高めることにより、正しいコドン-アンチコドン対合を作れるペアの出現確率を上げているのだろう。

EF1A, EF2以外にも、翻訳開始因子、リボソーム解離因子、aa-tRNA合成酵素、ストレス応答キナーゼ、リボソーム不活性化酵素など、触手タンパク質に結合するタンパク質が次々と報告されている。触手タンパク質とこれらのタンパク質の相互作用は、解離定数が $\mu\text{M}$ 程度の弱い相互作用である場合が多い。特定の翻訳因子が触手タンパク質上に強く結合し長時間滞在し続けると、他の翻訳因子が触手タンパク質と結合できずリボソームへのアクセスに不利になるためと考えられる。最近、EF1Aのグアニンヌクレオチド交換因子であるEF1Bが、aa-tRNAを運搬し終えたEF1A-GDPを触手タンパク質から解離させることで翻訳伸長の効率を上げる機能を持つことが明らかとなった<sup>17</sup>。EF1A-GDPにより占有されていた触手タンパク質がフリーとなることで、他のGTPase型翻訳因子が触手タンパク質、リボソームに結合しやすくなるのだろう。EF1A以外の翻訳因子に関しても、触手タンパク質との相互作用が何らかの仕組みで調節されることで、より複雑な翻訳の制御が行



われているのかもしれない。

## 謝辞

本研究は、新潟大学内海利男名誉教授、金沢大学古寺哲幸教授と共同で行われました。本研究の実施にあたり、新潟大学伊東孝祐准教授、金沢大学安藤敏夫教授、Steven J. McArthur 博士、榎野愛実さん、中山隆宏准教授、名古屋大学内橋貴之教授、九州大学石野良純教授、石野園子准教授から多くのサポートをいただきました。本研究はJSPS、JST-CREST、金沢大学Nano-LSI Bio-SPM 共同研究事業の助成を受けました。深く御礼を申し上げます。

## 文 献

- 1) Rodnina, M.V., Pape, T., Fricke, R., Kuhn, L., & Wintermeyer, W. (1996) Initial binding of the elongation factor Tu.GTP. aminoacyl-tRNA complex preceding codon recognition on the ribosome. *J. Biol. Chem.*, **271**, 646–652.
- 2) Diaconu, M., Kothe, U., Schlünzen, F., Fischer, N., Harms, J.M., Tonevitsky, A.G., Stark, H., Rodnina, M.V., & Wahl, M.C. (2005) Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell*, **121**, 991–1004.
- 3) Hamel, E., Koka, M., & Nakamoto, T. (1972) Requirement of an Escherichia coli 50 S ribosomal protein component for effective interaction of the ribosome with T and G factors and with guanosine triphosphate. *J. Biol. Chem.*, **247**, 805–814.
- 4) Grela, P., Bernadó, P., Svergun, D., Kwiatkowski, J., Abramczyk, D., Grankowski, N., & Tchórzewski, M. (2008) Structural relationships among the ribosomal stalk proteins from the three domains of life. *J. Mol. Evol.*, **67**, 154–167.
- 5) Naganuma, T., Nomura, N., Yao, M., Mochizuki, M., Uchiumi, T., & Tanaka, I. (2010) Structural basis for translation factor recruitment to the eukaryotic/archaeal ribosomes. *J. Biol. Chem.*, **285**, 4747–4756.
- 6) Lee, K.M., Yusa, K., Chu, L.O., Yu, C.W.H., Oono, M., Miyoshi, T., Ito, K., Shaw, P.C., Wong, K.B., & Uchiumi, T. (2013) Solution structure of human P1·P2 heterodimer provides insights into the role of eukaryotic stalk in recruiting the ribosome-inactivating protein trichosanthin to the ribosome. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 8776–8787.
- 7) Mohr, D., Wintermeyer, W., & Rodnina, M.V. (2002) GTPase Activation of Elongation Factors Tu and G on the Ribosome. *Biochemistry*, **41**, 12520–12528.
- 8) Liljas, A. & Sanyal, S. (2018) The enigmatic ribosomal stalk. *Q. Rev. Biophys.*, **51**, e12.
- 9) Ando, T., Uchihashi, T., & Kodera, N. (2013) High-speed AFM and applications to biomolecular systems. *Annu. Rev. Biophys.*, **42**, 393–414.
- 10) Imai, H., Uchiumi, T., & Kodera, N. (2020) Direct visualization of translational GTPase factor pool formed around the archaeal ribosomal P-stalk by high-speed AFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 32386–32394.
- 11) Ito, K., Honda, T., Suzuki, T., Miyoshi, T., Murakami, R., Yao, M., & Uchiumi, T. (2014) Molecular insights into the interaction of the ribosomal stalk protein with elongation factor 1a. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 14042–14052.
- 12) Tanzawa, T., Kato, K., Girodat, D., Ose, T., Kamakura, Y., Wieden, H.J., Uchiumi, T., Tanaka, I., & Yao, M. (2018) The C-terminal helix of ribosomal P stalk recognizes a hydrophobic groove of elongation factor 2 in a novel fashion. *Nucleic Acids Res.*, **46**, 3232–3244.
- 13) Murakami, R., Singh, C.R., Morris, J., Tang, L., Harmon, I., Takasu, A., Miyoshi, T., Ito, K., Asano, K., & Uchiumi, T. (2017) The Interaction between the Ribosomal Stalk Proteins and Translation Initiation Factor 5B Promotes Translation Initiation. *Mol. Cell. Biol.*, **38**, e00067-e18.
- 14) Imai, H., Abe, T., Miyoshi, T., Nishikawa, S., Ito, K., & Uchiumi, T. (2018) The ribosomal stalk protein is crucial for the action of the conserved ATPase ABCE1. *Nucleic Acids Res.*, **46**, 7820–7830.
- 15) Mustafi, M. & Weisshaar, J.C. (2018) Simultaneous binding of multiple EF-Tu copies to translating ribosomes in live *Escherichia coli*. *MBio*, **9**, e02143-e17.
- 16) Wawiórka, L., Molestak, E., Szajwaj, M., Michalec-Wawiórka, B., Mołan, M., Borkiewicz, L., Grela, P., Boguszevska, A., & Tchórzewski, M. (2017) Multiplication of ribosomal P-stalk proteins contributes to the fidelity of translation. *Mol. Cell. Biol.*, **37**, e00060-e17.
- 17) Suzuki, T., Ito, K., Miyoshi, T., Murakami, R., & Uchiumi, T. (2021) Structural insights into the switching off of the interaction between the archaeal ribosomal stalk and aEF1A by nucleotide exchange factor aEF1B. *J. Mol. Biol.*, **433**, 167046.

## 著者寸描

●今井 大達 (いまい ひろたつ)

琉球大学医学部特命助教。博士 (理学)。

■略歴 2014年新潟大学理学部卒業。19年同大学院博士後期課程修了。金沢大学ナノ生命科学研究所研究員を経て21年5月より現職。

■研究テーマと抱負 リボソームの構造と機能に興味があります。生体分子の試験管内機能解析が専門ですが、リボソームが関わる生命現象について分子、細胞、個体など様々な階層で研究していきたいと思っています。

■趣味 居酒屋巡り。