

2008B 期 萌芽的研究課題 研究成果報告書

[実験責任者 / Project Leader]

木平 清人 / Kihira Kiyohito (0009996)

兵庫県立大学大学院生命理学研究科生命科学専攻生体物質構造学 I

博士後期課程 3 年 (課題採択時)

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 客員教員 (現職)

[課題番号: 2008B1729]

[申請番号: 9371] 硫酸還元菌由来翻訳終結因子 RF3 の構造生物学的研究

(萌芽的研究課題 / 成果非専有 / 新規 /)

[実験課題名]

硫酸還元菌由来翻訳終結因子 RF3 の構造生物学的研究

[Title of Experiment]

The crystal structure analysis of release factor 3 from sulfate-reducing bacterium

[ビームライン / Beamline]

BL38B1

## 研究の背景

ペプチド鎖解離因子はクラス I およびクラス II と呼ばれる 2 つのクラスに分類される<sup>1)</sup>。クラス I 解離因子は終止コドンの特異的に認識し、リボソームのペプチド鎖転移反応中心を活性化することで、ペプチド鎖解離反応を進行させると考えられる。原核生物では RF1 および RF2 と命名された 2 種類のクラス I 解離因子が知られており、それらは認識する終止コドンが異なる<sup>2)</sup>。真核生物では eRF1 がすべての終止コドンに対応する。クラス II 解離因子は、クラス I 解離因子によるペプチド鎖解離反応後、リボソーム内の mRNA 上に残されたままのクラス I 解離因子の除去を促進すると考えられている GTP 結合タンパク質である<sup>3), 4)</sup>。これは原核生物では RF3, 真核生物では eRF3 と呼ばれている。RF3 と eRF3 はともに EF-G のような伸長因子のホモログである。

翻訳終結機構についての生化学的なデータの蓄積がある一方、構造生物学の手法を用いた詳細なメカニズムの解明は遅れていたが、最近になって、これらのペプチド鎖解離因子の立体構造が次々と明らかにされてきた。まず真核生物のクラス I 解離因子である eRF1 の立体構造が明らかになり<sup>5)</sup>、続いて、原核生物のクラス I 解離因子である RF2 の単体の X 線結晶構造が解析された<sup>6)</sup>。また 2000 年から 2001 年にかけてリボソームの結晶構

造も明らかになり<sup>7), 8)</sup>, クライオ電子顕微鏡法と X 線結晶解析の情報を組み合わせること  
で, リボソーム上の翻訳反応機構について活発な議論が繰り返されている. そのような状  
況の中, 原核生物のクラス II 解離因子である RF3 が伸長因子 EF-G のホモログであること  
を利用して, クライオ電子顕微鏡法を応用した RF3 とリボソームとの結合像が報告された<sup>9)</sup>. しかし, RF3 の結晶構造は, 多くのグループが挑戦していたにもかかわらず明らかにな  
っていなかったため, RF2 などのように具体的な機能ドメインや, その作用機序を原子レ  
ベルで議論するまでには至らなかった. 一般に RF3 は非常に凝集しやすい性質を持ってお  
り, この性質が結晶解析を困難にしていると考えられていた.

## 研究状況

我々は, 翻訳終結の場における RF3 の役割およびその作用機序を構造生物化学的観点から  
明らかにするため, これまで硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 由来 RF3 を大  
腸菌に組み込み, その大量発現系から得られた組み換え RF3 について, 発現条件の検討,  
精製方法の開発, 結晶化条件のスクリーニングなどを進め, 最終的には X 線結晶解析によ  
る立体構造の決定を目指してきた. その結果, GDP 結合型 RF3 の単結晶を得ることに成功  
した. その結晶を用いて X 線回折実験を行い, 約 3Å 分解能の回折データを収集した. しか  
し結晶の格子定数や空間群は決まったが, 回折斑点のモザイク性が高く, 構造解析を進め  
るための完全な強度データセットを得ることはできなかった. その後, さらに良質の結晶  
を得ることを目的として RF3 の精製法の改良に着手したところ, RF3 のイオン交換クロマ  
トグラフィーによる精製において, 大量発現させた本 RF3 試料には 2 つの成分が含まれて  
いることを見出した. また, このイオン交換クロマトグラフィーについて溶出条件を改良  
することにより, 2 つの RF3 成分の分離精製に成功した. これら 2 つの成分は SDS 電気泳  
動では全く同じ泳動度を示すが, ネイティブ電気泳動においては両者の泳動距離が異なっ  
ている. また, 一方に GDP を添加することにより他方と同じ泳動パターンを示すことも確  
認した. これらのことから両成分は GDP 結合型および GDP 非結合型の RF3 と推定した.  
その後, GDP 結合型 RF3 の新たな単結晶を得ることができ, 放射光施設・Spring-8 BL41XU  
において回折実験を行ったところ, 本結晶の回折斑点のモザイク性は低く非常に良質であ  
り, 1.8 Å 分解能のほぼ完全な強度データセットの収集に成功した (図 1, 表 1). その後,  
分子置換法によって得られた電子密度図を用いて GDP 結合型 RF3 のモデル構築を行い,  
現在までに精密化はほぼ完了している (図 3). しかし, G タンパク質において広く保存さ  
れており, RF3 の機能発現に重要であると考えられている switch 1 領域の一部について,  
構造を決定することができなかった. 一方で, GDP 非結合型と思われる RF3 についても精  
製・結晶化を行い, 2008 年 2 月に単結晶を得ることに成功した (図 2). 本試料について得  
られる結晶は非常に小さく, 実験室系の X 線発生装置では結晶の質を決定することが難し  
かったが, 放射光施設・Spring-8 BL38B1 において調製した複数の結晶についてデータ測  
定を行ったところ, 約 3Å 程度の分解能で Native データセットを得ることができた (本申

請課題). その後, RF3 の構造を約  $3\text{\AA}$  の分解能で解析・精密化することができた (図 4, 表 1). その結果, GDP 結合型では見えなかった switch1 領域周辺の構造が明らかになった. switch1 領域は G タンパク質が GDP 結合型から GTP 結合型に遷移するとき最も構造変化が大きい部位で, フレキシビリティが高いことが知られている. 実際, これまで数多くの G タンパク質が構造解析されているにもかかわらず, switch1 領域の全体構造が見えているものは数例しか報告されていない. また, switch1 領域には GTP の  $\gamma$ -リン酸基と相互作用すると考えられる残基が存在するため, GTP 結合時における RF3 の構造変化を推測する上で重要な知見が得られたと言える. GDP 結合型および非結合型の構造を比較したところ, 全体構造に大きな違いは見られなかった (図 5).

### 今後の研究計画

本研究課題によって本試料の構造解析に成功したが, 詳細な反応機構を議論するためには, さらなる分解能の向上が必要であると考えられる. そのため, 試料調製法も含め, 結晶化条件を再検討する必要がある.

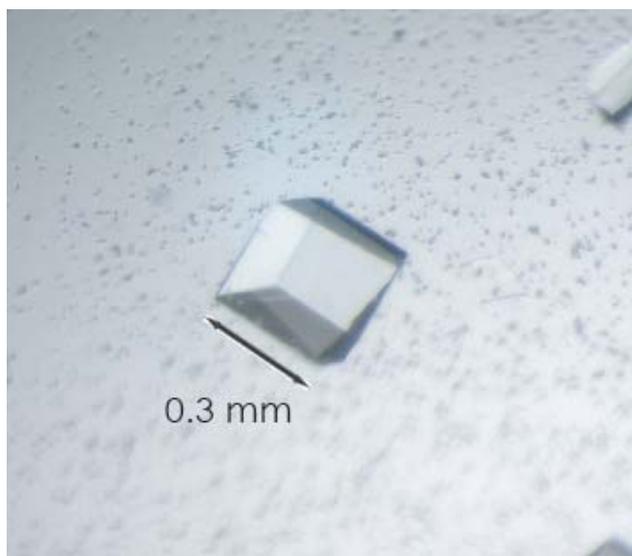


図 1. GDP 結合型 RF3 の結晶

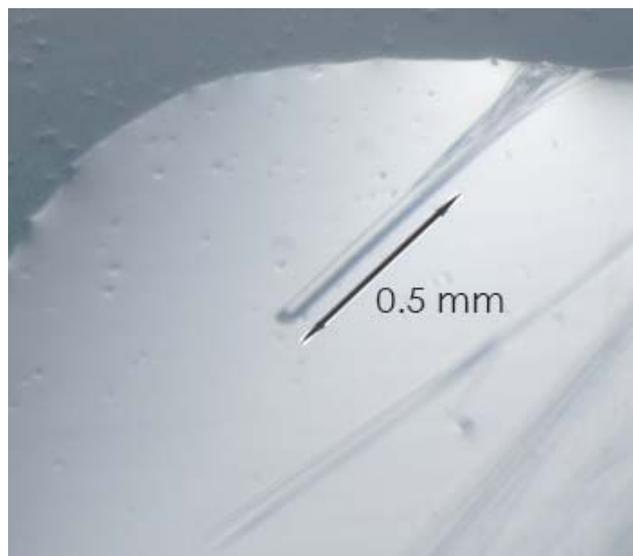


図 2. GDP 非結合型 RF3 の結晶

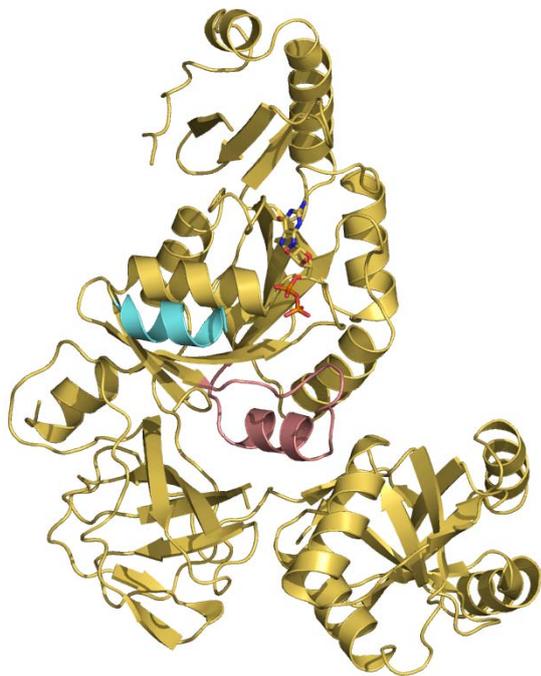


図 3. GDP 結合型 RF3 の結晶構造

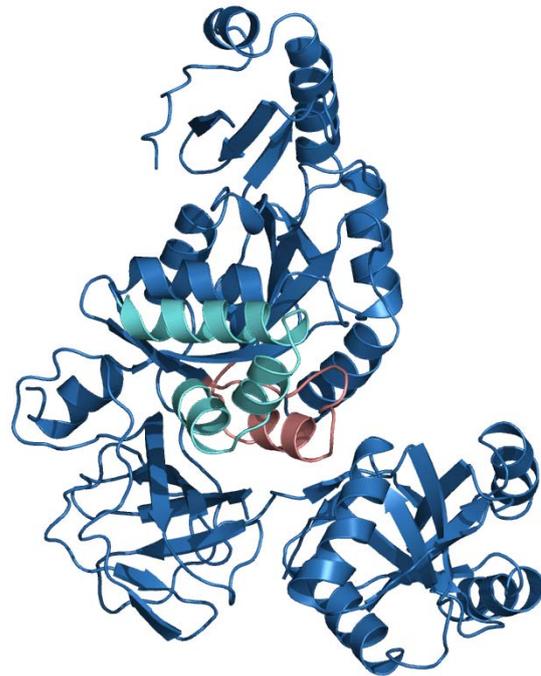


図 4. GDP 非結合型 RF3 の結晶構造

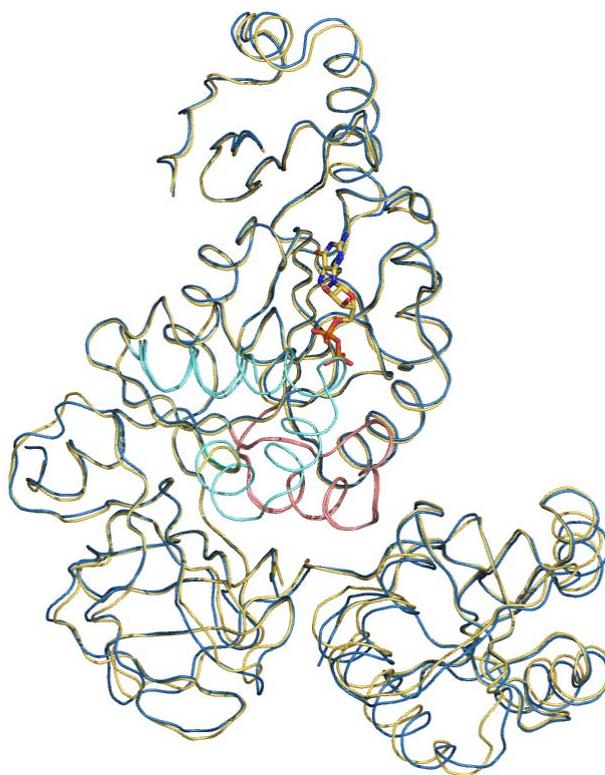


図 5. GDP 結合型 RF3 と GDP 非結合型 RF3 の重ね合わせ

**表 1.** Data collection, phasing and refinement statistics

|   | GDP 結合型 RF3           | GDP 非結合型 RF3          |
|---|-----------------------|-----------------------|
| Values in parentheses are for the highest resolution shell.   |                       |                       |
| <b>Data collection</b>  |                       |                       |
| Wavelength (Å)  | 1.0000                | 1.0000                |
| Space group   | <i>P</i> 1            | <i>P</i> 1            |
| Cell dimensions   |                       |                       |
| <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)  | 47.39, 82.80, 148.29  | 80.20, 83.46, 114.25  |
| $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)   | 104.21, 89.78, 89.63  | 72.98, 74.18, 89.78   |
| Matthews coefficient (Å <sup>3</sup> Da <sup>-1</sup> )   | 2.3                   | 2.86                  |
| Solvent content (%)   | 46.6                  | 57.0                  |
| No. molecules in the AU   | 4                     | 4                     |
| Resolution (outer shell) (Å)  | 50.0–1.80 (1.86–1.80) | 50.0–3.00 (3.11–3.00) |
| $R_{\text{merge}}$ † (%)  | 4.3 (32.6)            | 7.8 (48.3)            |
| Completeness (%)  | 92.8 (89.0)           | 97.0 (97.3)           |
| <i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )  | 9.8 (2.4)             | 7.9 (1.22)            |
| <b>Refinement</b>   |                       |                       |
| Resolution (Å)  | 1.80                  | 3.0                   |
| No. of reflections  | 89,903                | 53,936                |
| $R_{\text{work}}$ / $R_{\text{free}}$   | 18.8 / 21.8           | 24.1 / 28.3           |
| No. of atoms  |                       |                       |
| Protein   | 15,437                | 16,127                |
| Nucleotide  | 112                   | 143                   |
| Water   | 761                   | –                     |
| R.m.s. deviations   |                       |                       |
| Bond lengths (Å)  | 0.015                 | 0.008                 |
| Bond angles (°)   | 1.79                  | 1.54                  |
| <i>B</i> -factor  | 49.5                  | 43.2                  |
| † $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i  I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle }{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ , where $I(hkl)$ is the intensity of reflection <i>hkl</i> , $\sum_{hkl}$ is the sum over all reflections and $\sum_i$ is the sum over <i>i</i> measurements of reflection <i>hkl</i> . |                       |                       |

- 1) Nakamura, Y. & Ito, K. : *Trends Biochem. Sci.*, 28, 99-105(2003)
- 2) Scolnick, E.M. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61, 768-774(1968)
- 3) Zavialov, A. V. et al. : *Cell*, 107, 115-124(2001)
- 4) Zavialov, A. V. et al. : *Mol. Cell*, 10, 789-798(2002)
- 5) Song, H. et al. : *Cell*, 100, 311-321(2000)
- 6) Vestergaard, B et al. : *Mol. Cell*, 8, 1375-1382(2001)
- 7) Ban, N. et al. : *Science*, 289, 905-920(2000)
- 8) Yusupov, M. M. et al. : *Science*, 292, 833-896(2001)
- 9) Klaholz, B.P. et al. : *Nature*, 427, 862-865(2004)