タンパク質合成抑制因子RelEとその調節の構造基盤

九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門 木村 誠

1. はじめに

大腸菌に代表される真正細菌は、環境ストレス条件下でDNA複製反応やタンパク質合成反応を抑制し自らの増殖を抑える調節因子・トキシン/アンチトキシンシステム※(TAシステム)をもっている¹⁾。

TAシステムの発見は25年前に遡る。OguraとHiragaは大腸菌F-プラスミド上の遺伝子群が大腸菌の増殖を抑制することを見だし、それらを*ccd* オペロンと名付けた²⁾。*ccd* オペロンはトキシン遺伝子とアンチトキシン遺伝子からなり、F-プラスミドが大腸菌内に存在すれば、その遺伝子産物であるトキシンとアンチトキシンは複合体を形成し、トキシンの毒性は抑制されている。しかし、F-プラスミドが大腸菌の分裂過程で消失した際には、アンチトキシンが細胞内プロテアーゼにより分解され、遊離したトキシンがジャイレースに結合することにより大腸菌のDNA複製反応を阻害する。その結果、大腸菌の生育が抑制される³⁾。すなわち、TAシステムはF-プラスミドが大腸菌内での増殖を維持するために獲得した分子装置と考えられた。その後、多くのプラスミドに*ccd* オペロン様のTAシステムが見いだされたが、分子生物学の研究対象にはならなかった。

ところが、1993年、TAシステムが大腸菌染色体上にも存在することが見いだされ⁴⁾、これらのオペロンがさまざまな環境ストレスに対応して大腸菌のDNA複製やタンパク質合成反応を調節していることが明らかになった。したがって、染色体上のTAシステムは真正細菌のアポトーシス様の現象にかかわる分子として考えられ、その分子生物学的研究が展開されてきた。最近、6種の大腸菌TAシステム(*relBE*, *mazEF*, *chpB*, *dinJ-yafQ*, *yoeB-yefM*, *yafN-yafO*)のうち、*mazEF*と*yoeB-yefM*の

トキシン MazF と YoeB が mRNA を切断する RNase (mRNA interferase) であることが明らかにされるとともに^{5),6)}、それらのトキシン - アンチトキシン複合体 (MazE-MazF と YoeB-YefM) の結晶構造が報告されている^{7),8)}。

大腸菌 TA システムの1つである *relBE* は遺伝子 *relB* と *relE* から構成され、*relE* は細胞毒であるトキシン (RelE: 11 kDa) を、*relB* は RelE の阻害タンパク質であるアンチトキシン (RelB: 9 kDa) をコードしている (Fig. 1)⁹⁾。通常の生育条件下では、アンチトキシン RelB はトキシン RelE と複合体 (RelB-RelE) を形成することにより RelE の毒性を抑制している¹⁰⁾。また、RelB および RelB-RelE 複合体は *relBE* オペロン上流のプロモーターに結合し、自らの転写を負に制御するリプレッサーとしても機能している¹¹⁾。すなわち、RelE の毒性は転写レベルと翻訳後レベルで抑制されている。ところが、アミノ酸欠乏条件下では Lon などの細胞内プロテアーゼが活性化され、プロテアーゼに対して感受性の強い RelB のみが特異的に分解されることにより RelE が活性化される。その結果、RelE の活性によりタンパク質合成反応が抑制される。

RelE の活性に関しては長く不明であったが、2003年、Pedersen らは RelE が翻訳過程の mRNA をリボソームの A-部位で特異的に切断することを見だし、RelE は mRNA interferase である MazF や YoeB と異なり、リボソーム依存性 RNase であることを提唱した (Fig. 1)¹²⁾。一方、Hayes と Sauer は翻訳過程でリボソームが mRNA 上で滞った際に、リボソームが mRNA を切断することを見出した¹³⁾。このことから、RelE はリボソームに結合することにより、リボソームに内在している RNase 活性を増強する因子であると提唱している研究グループもある¹⁾。このように、*relBE* を介したタンパク質合成抑制機構に関しては未解明であり、RelB と RelE の高次構造情報もまたれていた。

われわれは超好熱古細菌 (*Pyrococcus horikoshii* OT3) タンパク質の高次構造に関する研究過程で、超好熱古細菌ゲノム中に *relBE* 相同遺伝子を見いだした。そこで、RelB と RelE の高次構造情報を提供するために、それらの大腸菌内での共発現後、組み換えタンパク質複合体 (aRelB-aRelE) を分離精製した。さらに、精製した aRelB-aRelE 複合体の結晶化に成功し、その結晶構造を多波長異常分散法により 2.3 Å の分解能で決定した¹⁴⁾。本稿では、超好熱古細菌由来 aRelB-aRelE 複合体の結晶構造を

Protein Synthesis Suppressor RelE and Structural Basis for Its Regulation

Makoto KIMURA

Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University

Fig. 1 Genetic organization and regulatory components of the *relBE* toxin-antitoxin operon (left) and the site of mRNA cleavage by RelE (right). (カラー図は電子ジャーナル<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/>参照)

Fig. 2 Structures of aRelB and aRelE. The crystal structure of the complex aRelB/aRelE from *P. horikoshii*. aRelB is present as a polypeptide chain lacking any distinct hydrophobic core, and aRelE folds into an α/β structure. N and C indicate N- and C-termini of both molecules, respectively. (カラー図は電子ジャーナル<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/>参照)

紹介するとともに、タンパク質合成調節因子である RelE の構造機能相関について概説する。

2. 超好熱古細菌由来タンパク質複合体 aRelB-aRelE の結晶構造

超好熱古細菌 aRelB-aRelE 複合体の結晶構造を Fig. 2 に示す。アンチトキシン aRelB は 3 本の α ヘリックス

からなり、疎水性コアを含まず伸びた構造をもつタンパク質で、aRelE の回りを取り囲むように複合体を形成していた (Fig. 2)。aRelB の伸びた構造は、アンチトキシン RelB が細胞内プロテアーゼに対して強い感受性を示すことをよく説明していた。一方、トキシン aRelE は 3 本の α ヘリックスと 5 本の β ストランドからなる α/β 型の球状タンパク質で、 α ヘリックスと β -シートの疎水性相互作用により強固な構造をもっていた。aRelB-aRelE 複合体の構造は最近決定された MazE-MazF や YoeB-YefM とは類似していなかった。さらに、aRelE の構造を既知の RNase の構造と比較したが、いずれの RNase ととも構造類似性を示さなかった。

次に、両タンパク質の分子表面の荷電分布を調べてみると、aRelB は全体的に負電荷を帯びているのに対して、aRelE は正電荷をもち、両タンパク質の相互作用が主として静電的相互作用によるものであることがわかった。特に、aRelB の $\alpha1$ - $\alpha2$ 間ループに位置する酸性アミノ酸クラスター (Glu³⁰, Glu³¹, Asp³³, Asp³⁵, Glu⁴⁰) が、aRelE の β -シート上の塩基性アミノ酸クラスター (Lys⁴⁷, Arg⁵⁸, Arg⁶⁵, Lys⁸¹, Lys⁸³) と静電的に強く相互作用していることがわかった。

RNase の阻害様式については、すでにコリシンやバルナーゼにおいてよく研究されている。これらの場合、いずれも阻害タンパク質が RNase の活性部位に結合し基質の結合を阻止することにより RNase 活性を阻害している¹⁵⁾。今回決定した aRelB-aRelE は、これら既知の RNase に対する阻害形式とは異なり、aRelB が aRelE

Fig. 3 Structural comparison of aRelE with the decoding domain of EF-G. The structure aRelE is compared with that of the decoding domain (domain IV; positions 469-598) in EF-G (PDB: 1DAR). The residues that were shown to be important for protein synthesis inhibitory activity of aRelE are indicated. (カラー図は電子ジャーナル<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/>参照)

の分子表面を取り囲むことにより、aRelEのリボソームのA-部位への進入を阻害していることが示唆された。

3. aRelEのタンパク質合成阻害活性部位の推定

aRelEの結晶構造はいずれのRNaseとも構造類似性を示さなかったが、リボソームのA部位にtRNAの分子擬態として作用することが知られているEF-GのドメインIVと比較したところ、aRelEの分子サイズ、形、および二次構造の分布がEF-GのドメインIVのそれらに類似していることがわかった (Fig. 3)。この結果より、aRelEのβ3-β4ループとC末端領域がドメインIVと同様にリボソームのA部位に結合することが示唆された。

このことを検証するために、RelEファミリー間でよく保存されているアミノ酸残基：Lys¹³、Leu¹⁸、Arg⁴⁰、Leu⁴⁸、Gly⁵⁰、Arg⁵⁸、Arg⁶⁵、Lys⁸³、Arg⁸⁵をそれぞれAlaに置換した9種の変異体を作製し、大腸菌無細胞系のタンパク質合成阻害活性におよぼす影響を調べた (Fig. 4)。その結果、Arg⁸⁵をAlaに置換した変異体R85Aの阻害活性が著しく低下し、Arg⁴⁰、Leu⁴⁸、Arg⁵⁸およびArg⁶⁵をそれぞれAlaに置換した変異体R40A、L48A、R58AおよびR65Aの阻害活性も低下していた。一方、その他のアミノ酸の変異体K13A、L18A、G50A、K83Aはタンパク質合成阻害活性を保持していた。

aRelEのタンパク質合成阻害活性に重要であった5種のアミノ酸 (Arg⁴⁰、Leu⁴⁸、Arg⁵⁸、Arg⁶⁵、Arg⁸⁵) の高次構造における位置を見てみると、いずれのアミノ酸残基もaRelEのリボソームへの結合部位と推定されている領域に局在していることから、aRelEがEF-GのドメインIVと同様tRNAの分子擬態としてリボソームのA部位に結合することが強く示唆された (Fig. 3)。現在、

Fig. 4 Protein synthesis inhibitory activity of aRelE and its mutants. Various amounts of aRelE or alanine-substituted mutants were examined as to their potential to inhibit the ³⁵S-methionine incorporation in the *E. coli* ribosomal protein S1. Inhibition is expressed as the remaining activity of the protein synthesis. The ³⁵S-methionine incorporation into the ribosomal protein S1 without aRelE or its mutants was set to 100%.

Fig. 5 Heterotetrameric structure of aRelB and aRelE from *P. horikoshii*. Two molecules (A and B) of the complex aRelB/aRelE observed in the asymmetric unit are indicated. Side-chains of hydrophobic residues at the α-helix α1 in aRelB are indicated. (カラー図は電子ジャーナル<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/>参照)

このことを検証するために、aRelEとリボソーム小サブユニットとの複合体の結晶構造解析を、マックスプランク分子遺伝学研究所 (ベルリン) のWillsonらとの共同研究により進めている。近い将来、RelEの作用機構が原子レベルで明らかになることを期待している。

4. aRelB-aRelEのヘテロ4量体構造

RelB と RelB-RelE 複合体は *relBE* オペロン上流に位置する回文塩基配列に結合し、自らの転写を負に制御するリプレッサーとしても機能している¹¹⁾。多くのリプレッサーがホモ2量体を形成することにより認識配列を認識していることから、RelB および RelB-RelE 複合体の2量体化が示唆された。aRelB-aRelE の結晶構造解析において、結晶の非対称単位当たり2分子の複合体 (aRelB-aRelE)₂ が存在したことから、溶液中において aRelB と aRelE がヘテロ4量体を形成していることが示唆された。そこで、複合体 aRelB-aRelE の分子量をゲルろ過クロマトグラフィーにより評価したところ、分子量約35 kに相当する位置に溶出したことから、aRelB-aRelE 複合体が2量体化していることが強く示唆された。

結晶の非対称単位に見られた aRelB と aRelE のヘテロ4量体の構造を Fig. 5 に示す。興味深いことに aRelB のN末端側の α ヘリックス(α 1)に疎水性アミノ酸(Leu, Ile, Val) が、ロイシンジッパー様モチーフを形成して分子表面に露出していることがわかった。ロイシンジッパーは真核生物の転写因子によく見いだされる構造モチーフで転写因子の2量体化に関与し、その近傍に位置する塩基性アミノ酸が認識配列との結合に関与していることが知られている。このことから、aRelB のN末端 α ヘリックス(α 1)が aRelB および aRelB-aRelE 複合体の2量体化に関与し、N末端に位置する塩基性アミノ酸 Arg2, Lys5, Lys11 などが認識配列との相互作用に関与していることが示唆された。

5. まとめ

超好熱古細菌 aRelB-aRelE 複合体の結晶構造を解析し、トキシソ RelE の作用様式およびアンチトキシソ RelB の阻害様式に関して構造基盤情報を提供した。既述したように、RelE が翻訳過程の mRNA をリボソーム上で特異的に切断することから、RelE はリボソーム依存性 RNase と提唱されている¹²⁾。一方、RelE は RNase ではなくリボソームに結合することにより、リボソームが本来もっている RNase 活性を増強する因子であると提唱している研究グループもある¹⁾。著者らは、aRelE の構造がいずれの RNase の構造とも類似していないことと、aRelB の aRelE に対する阻害様式が既知の RNase

に対するそれと異なることから、RelE の作用機構として後者の説を支持している。今後、aRelB-aRelE の結晶構造に基づいた生化学的研究と、aRelE とリボソーム小サブユニットの複合体の結晶構造の解析により、近い将来 RelE の構造機能相関が解明されることを期待している。

最後に、本稿で紹介した研究成果は、タンパク 3000 プロジェクト個別の解析プログラム「転写・翻訳」の一環として、高木久徳君(九大大学院生)と角田佳充助教授(九大大学院農学研究科)とともに行ったものである。また、共同研究者である田中勲教授(北大大大学院理学研究科)と姚関助手(北大大大学院理学研究科)からは有益な御助言を賜りました。これらの方々にご場を借りて厚く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Buts, L., Lah, J., Dao-Thi, M.-H., Wyns, L. and Loris, R. (2005) *Trends Biochem. Sci.* **30**, 672-679.
- 2) Ogura, T. and Hiraga, S. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4784-4788.
- 3) Bernard, P. and Couturier, M. (1992) *J. Mol. Biol.* **226**, 735-745.
- 4) Masuda, Y., Miyakawa, K., Nishimura, Y. and Ohtsubo, E. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 6850-6856.
- 5) Zang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K. P., Ikura, M., Qing, G. and Inouye, M. (2003) *Mol. Cell* **12**, 913-923.
- 6) Christensen, S. K., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., Gottesman, S., Gerdes, K. and Van Melderen, L. (2004) *Mol. Microbiol.* **51**, 1705-1717.
- 7) Kamada, K., Hanaoka, F. and Burley, S. K. (2003) *Mol. Cell* **11**, 875-884.
- 8) Kamada, K. and Hanaoka, F. (2005) *Mol. Cell* **19**, 497-509.
- 9) Gerdes, K. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 561-572.
- 10) Galvani, C., Terry, J. and Ishiguro, E. E. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 2700-2703.
- 11) Gottfredsen, M. and Gerdes, K. (1998) *Mol. Microbiol.* **29**, 1065-1076.
- 12) Pedersen, K., Zavialov, A. V., Pavlov, M. Y., Elf, J., Gerdes, K. and Ehrenberg, M. (2003) *Cell* **112**, 131-140.
- 13) Hayes, C. S. and Sauer, R. T. (2003) *Mol. Cell* **12**, 903-911.
- 14) Takagi, H., Kakuta, Y., Okada, T., Yao, M., Tanaka, I. and Kimura, M. (2005) *Nature Struct. Mol. Biol.* **12**, 327-331.
- 15) Graille, M., Mora, L., Buckingham, R. H., van Tilbeurgh, H. and Zamaroczy, M. (2004) *EMBO J.* **23**, 1474-1482.

タンパク質合成抑制因子 RelE とその調節の構造基盤

木村 誠

九州大学大学院農学研究院教授

〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

e-mail: mkimura@agr.kyushu-u.ac.jp