

研究終了報告書

「リボソームの動的分子構造と細胞内分布の統合的理解」

研究期間:2020年12月～2024年3月

研究者:横山 武司

1. 研究のねらい

生命を維持する細胞内のシステムは、機能分子としてはたらくタンパク質が適切な時と場所で発現することで維持されている。リボソームは mRNA にコードされた遺伝情報を正確に読み取り、アミノ酸の配列へと変換する「翻訳過程」において、タンパク質合成の反応の場として重要な役割を果たしている。本研究のねらいは、生命の本質である遺伝子発現の現場を細胞内で観察することを目的とし、細胞内で生き生きとはたらくリボソームの分布とその構造の詳細を、独自の手法開発を組み合わせることで実現することである。クライオ電子顕微鏡は、生体試料を急速凍結することでガラス状の氷に閉じ込めて、透過型電子顕微鏡を用いて直接観察する手法である。そのため、リボソームの溶液下での様子とその構造を可視化することが可能である。一方で細胞内は、タンパク質合成に関与する翻訳マシナリーのみならず、多様な生体高分子複合体に満たされた分子夾雑環境である。これまでのリボソームの精製を前提とした手法では十分なコントラストが得られず難しい。細胞内のリボソームを可視化するためには、電子線を十分透過する200nmを下回る薄い試料の作成が必要である。近年では、集束イオンビームを用いて、凍結した細胞を切削し、薄いラメラを作成することで、その中に存在する生体高分子を撮影することが可能となっている。一方で、ハイスループットでラメラを作成することは困難である。本研究ではこれらの弱点を克服するため、グリッド上での薄い細胞の調製など、細胞凍結条件を工夫することで、高効率で大量のデータを取得することを目指した。また、電子顕微鏡で撮影されたリボソーム粒子は、画像処理を組み合わせることで、三次元の立体構造を取得することが出来るが、ひとつひとつの粒子像からどのような構造状態をとっているかを理解することは出来ない。そこで、独自技術であるリボソームのバーコード化を用いることで、リボソーム粒子像を画像分類し、それぞれのリボソームがどのバーコードを有しているかを紐付け、リボソームの構造状態とその分布を同時に明らかにすることを目指した。本研究課題では、リボソームをバーコード化する合成生物学的な新たなアプローチと、リボソームがタンパク質合成を行う現場を直接可視化する、クライオ電子顕微鏡におけるチャレンジングで新しいアプローチを組み合わせ、独創的な研究の展開を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

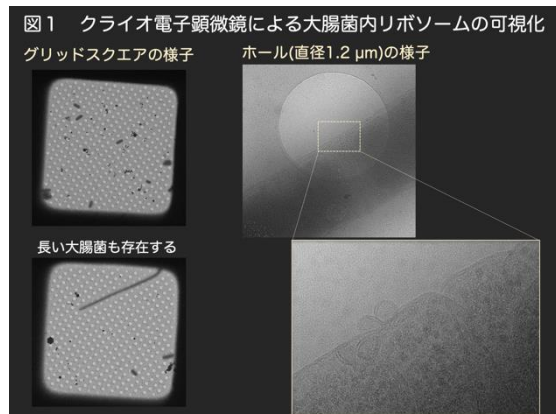
本研究は、細胞内でのリボソームをクライオ電子顕微鏡で直接観察し、独自技術であるバーコード化リボソームを利用し、細胞内の座標を特定する新たな手法開発を目的とした。細胞内のリボソームを単粒子解析する点、また細胞内のリボソームを特定するため、合成生物学的なアプローチで自在にリボソームの改変を行う点が独自性であると考えている。まず、細胞内のリボソームを直接可視化するため、様々なグリッド作成条件を検討し、クライオ電子顕微鏡法で観察可能であるか検証した。その結果、凍結条件が最適化され、大腸菌の辺縁部ではリボソーム粒子を観察可能であることが明らかになった。一方で粒子を確保することが難しいことも分

かった。そこで、細胞内の状態を観測する意義を再考することにした。リボソームの置かれている環境の違いで、4つのモダリティーに整理した。特に、膜のない細胞とも言える「無細胞翻訳系」を用いれば、細胞内の座標の情報は取得できないものの、精製したリボソームと比較して、より付加的な様々な因子が共存した分子夾雑環境下でのリボソームの構造情報を取得出来る。そこで、全ての翻訳に必要な因子を試験管内で再構成した、再構成型の無細胞翻訳系「PURE システム」内の直接観察に取り組んだ。PURE システムで GFP の合成量を指標として翻訳活性を測定し、その溶液を直接観察することで、リボソームの活性と構造を同時に捉える新しい解析法の開発を行なった。リボソームに摂動を与え、どのようにリボソームが応答するかを、翻訳反応が行われている現場を直接捉えることで観測した。具体的には、アミノ配糖体抗菌薬の作用機構の解明に取り組み、これまで未解明であった二種類の抗菌薬はリボソーム内の tRNA の転座を阻害している様子がはっきりと捉えられた。無細胞翻訳系の直接観察は、真核生物のシステムについても発展させた。さらに、バーコードリボソームの開発にも取り組んだ。検討を重ねた結果、強固な RNA ヘリックス構造を維持するデザインが良いことが明らかになった。根本の配列を変化させることで、ヘリックスの先端の向きに変化を与えることが可能であることを見出した。本研究課題ではまだまだ道半ばではあるが、翻訳に必要な全ての様子を含んだ無細胞翻訳系を用いて、機能解析と構造解析、さらには構造のダイナミクスを紐付ける新しい手法開発に取り組んだ。

(2) 詳細

研究テーマ 1「翻訳環境下におけるリボソームのクライオ電子顕微鏡直接観察」

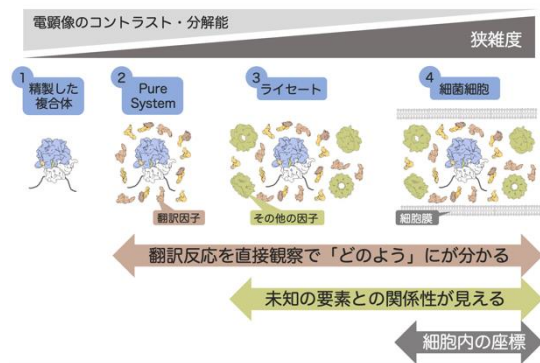
課題提案時、細胞内のリボソームを「クライオ電子顕微鏡単粒子解析」により高分解能で取得することを一つの目標として掲げた。技術的には、通常のタンパク質複合体の構造解析と同様に、グリッド上に分布した粒子像を自動測定で効率的に収集し構造解析する手法である。本研究では、リボソームが細胞内にいる状態で捉え、「翻訳の現場を捉える」ことが目的である。精製リボソームの代わりに、大腸菌をそのまま観察し、内部のリボソームの観察を目指した。通常細胞は厚いため、電子線を十分透過することが難しい。そのため、技術的に手間のかかる集束イオンビーム(FIB)による切削が必要である。本研究では、比較的厚みの薄い細菌をターゲットとし、グリッド作成条件で薄い大腸菌の内部のリボソームを、FIB による切削なしで実現しようとした。検討の結果、試料調製条件の検討により、大腸菌の辺縁部では細胞内のリボソームが観察できることがわかった(図1)。一方で、細胞ごとにリボソームを観察出来る領域が少なく、この手法で進むことが難しいとの結論に至った。



・クライオ電子顕微鏡におけるリボソーム試料、4つのモダリティー

そこで、当初の目的に立ち返り、「翻訳の現場を捉える」とは何か深く考えた。その結果、リボソームはいくつかの試料としてのモダリティーが存在するのではないかと再考に至った(図2)。リボソーム試料は、1) 精製したリボソーム複合体 2) 再構成型無細胞翻訳系(PURE システム) 3) 細胞破碎液をベースにした無細胞翻訳系 4) 細胞の直接観察。この4つのモダリティーに分類可能である。細胞を直接観察せずとも、2 や 3 のモダリティーを利用することで、リボソームを中心とした翻訳マシナリーが動的にはたらく環境下で、どのように働くかを直接観察することができる。精製したリボソーム複合体と異なり、多数の構造中間体を残した溶液を一網打尽に解析でき、翻訳システム全体を捉えて理解することが出来る利点がある。そのためまず、分子夾雑環境でクライオ電顕による観察が難しいことが予想される、2) 再構成型無細胞翻訳系内のリボソームを直接観察することが可能か検討を重ねた。このモダリティーのもう一つの利点は、翻訳活性をレポーター遺伝子の翻訳量でモニターすることで、観察したリボソーム試料と、その活性を紐付けて理解することが出来る点である。クライオ電子顕微鏡での構造解析の結果、その構造からリボソームの活性を解釈することは可能である。本手法ではさらに、実際の活性を生化学的にモニターすることが出来るので、リボソームの構造とその活性をダイレクトに結びつけて理解することが可能である。

図2 クライオ電子顕微鏡にリボソーム試料のモダリティー

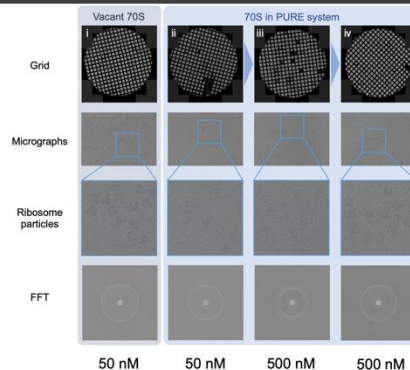


ことが出来る利点がある。そのためまず、分子夾雑環境でクライオ電顕による観察が難しいことが予想される、2) 再構成型無細胞翻訳系内のリボソームを直接観察することが可能か検討を重ねた。このモダリティーのもう一つの利点は、翻訳活性をレポーター遺伝子の翻訳量でモニターすることで、観察したリボソーム試料と、その活性を紐付けて理解することが出来る点である。クライオ電子顕微鏡での構造解析の結果、その構造からリボソームの活性を解釈することは可能である。本手法ではさらに、実際の活性を生化学的にモニターすることが出来るので、リボソームの構造とその活性をダイレクトに結びつけて理解することが可能である。

・PURE システムの直接観察、クライオグリッド作成条件の検討

クライオ電子顕微鏡によるグリッド作成条件の検討を行なった。リボソームのクライオ電子顕微鏡解析において、グリッド上に貼付したカーボン膜への吸着効率がどの程度効率的にデータ取得を出来るかを決定する。一つの電子顕微鏡ムービーを撮影する時間は固定されているので、終夜運転により測定可能な枚数も決まっている。一方で、視野内にリボソームが何粒子存在するかは試料調製の際に最適化が可能である。一回のマシントimeに取得可能な粒子数を決定する。通常精製した大腸菌リボソームでは、50 nM 程度に調製すると、粒子間に隙間があり、かつ視野に最大限に粒子が入ったグリッドを作成することが可能である。PURE システムでも、反応液を希釈し同様の濃度で検討したところ、極端にカーボンへの吸着効率が下がってしまった。これは、リボソーム以外にも、翻訳因子や tRNA などの多くの翻訳に必要な要素も同様にカーボンに吸着し、競合することでリボソームの粒子密度が低下していると予想した。PURE システムを用いた翻訳活性の測定には高濃度の 500 nM のリボソームを用いている。粒子密度低下の問題を解決するため、翻訳活性の測定に用いる濃度と同等の試料をグリッド作成に用いた。その結果、粒子密度の増加が見られ、より効率的に粒子像を集めるために最適化された(図3)。

図3 PUREシステム内70Sの直接観察、グリッドの最適化



・DARC 法(Direct visualization of Antibiotic binding on Ribosome in the Cell-free system)による、抗菌薬作用機構の可視化

最適化を踏まえて、抗菌薬の阻害メカニズムを PURE システムでダイレクトに観察する手法を確立した:DARC 法(Direct visualization of Antibiotic binding on Ribosome in the Cell-free system)。アミノ配糖体型抗菌薬は、リボソームを標的とした主要な抗菌薬の 1 グループである。本研究では、ジベカシン(DBK)とそれに HABA 基が付加し高活性化した、アルベカシン(ABK)を標的に研究を進め、HABA 基の付加による高活性化のメカニズムの解明を目指した。二種類の抗菌薬を、PURE システム内に添加し、そのままクライオ電子顕微鏡によるデータ

取得を行い、単粒子解析を行なった。その結果、DBK と ABK 共にリボソームの小サブユニット上の、遺伝暗号解読の場である、デコーディングセンターに、抗菌薬に相当するクライオ電顕密度が確認された(図 4)。抗菌薬がデコーディングセンターに結合することにより、強制的に A1492、A1493 塩基がフリップし、このことが A サイトから P サイトへの tRNA の転座を阻害し、リボソームの移動を阻害していることが明らかになった。これらの、PURE システムの溶液と同一条件で

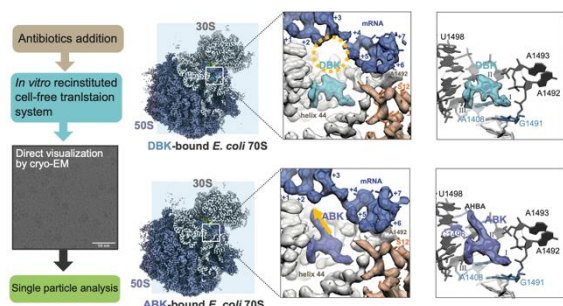
GFP の合成量を指標にした、翻訳阻害活性を行なった。その結果、HABA 基を有する、ABK は DBK よりも強い翻訳阻害活性を示すことが明らかになった。DARC 法によるクライオ電子顕微鏡構造を確認すると、ABK においては HABA 基がより多くの相互作用をリボソームと形成していることがわかり、このことが ABK の高活性化の原因の一旦であることが明らかになった(図 4)。新規抗菌薬の合理的デザインに資する、構造情報の取得に成功した(Tomono#, Asano# et al. *J Biochem*, 2024)。

・真核生物の翻訳マシナリーへの展開、無細胞翻訳系を利用した構造解析

本研究課題では、さらに真核生物の翻訳システムの理解も目指し、特にウサギ網赤血球ライセート(RRL)を用いて、リボソームの直接観察を検討した。直接観察の結果、リボソームが休眠した状態の複合体の構造を取得した。また、さきがけ外での共同研究であるが、技術的に関連した研究として、小麦胚芽無細胞翻訳系を用いてリボソーム複合体の構造解析を行なった。この研究では、植物の根で発現するハウ素のチャンネルの遺伝子発現制御をリボソームがハウ素のセンサーとして働く様子を、クライオ電子顕微鏡により明らかにした。ハウ素チャンネルの mRNA を小麦胚芽無細胞翻訳系に添加し、ハウ素存在、非存在下で構造解析したところ、翻訳因子 eRF1 の結合の安定性が変化した。その結果、mRNA の分解が促進する分子メカニズムを解明した(図 5)(Tanaka#, Yokoyama#, Saito# et al. *Nat Chem Biol*, 2024)

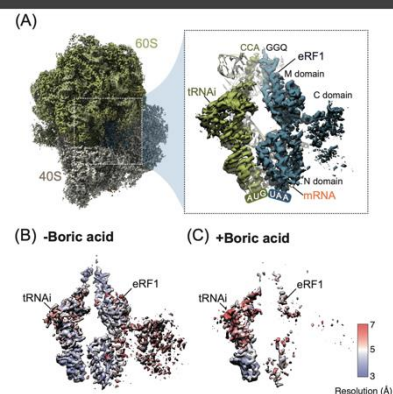
研究テーマ 2「バーコードリボソームによる、高分解能構造と粒子座標の紐付け」

図 4 DARC法によるリボソーム上のアミノ配糖体結合の可視化



HABA基がanchoring motifとして機能することが明らかになった

図 5 小麦無細胞翻訳系由来リボソームの解析



翻訳が行われている環境下で、標的としているリボソームがどこにいるかを特定するため、リボソーム RNA の一部を改変し、構造的な特徴を持たせることで、画像処理により座標を特定する、バーコードリボソームの開発を行なった。このアイデアは、以前の研究をもとに着想を得た。研究代表者は以前の研究で、Tn5 トランスポゾンを用いてリボソーム RNA にランダムに挿入変異を導入し、機能配列を選択した (Yokoyama and Suzuki, NAR, 2008)。まず初めに、このうち 16S rRNA 上に挿入変異を有する変異体リボソームを用いて、クライオ電子顕微鏡単粒子解析を行なった。興味深いことに、一つの挿入変異から、複数の二次構造が形成されることを見出し、画像分類によりそれぞれの構造を決定した。研究代表者は将来展望として、リボソームの自在なデザイン、活性制御を目指している。この構造解析の結果は、興味深く今後の研究に生かしていきたい。

3. 今後の展開

クライオ電子顕微鏡の特徴は、生体高分子複合体の構造と、画像分類によりダイナミクスの情報を取得することが出来る点にある。本研究により、リボソームが活発に働く無細胞翻訳系内を直接観察する手法の確立を行った。社会実装に向けては、無細胞翻訳系を用いた抗菌薬の機能解析は、新規抗菌薬の開発において有用であると考えている。本研究では、すでに大腸菌抽出液内のリボソームを高分解能で可視化し、抗菌薬の結合を確認している。今後は、この実験系を感染性細菌に展開し、リボソームの可視化、抗菌薬のスクリーニングを行う予定である。

4. 自己評価

さがけ細胞の高次構造体に参加したことは、研究者としての大事な経験となった。特に、領域会議でのすべての研究者とのディスカッション、また他の研究者が取り組む全力の研究を目の当たりにし、自分自身を見直すきっかけにもなり、また自問自答をすることで成長に繋がった。研究の成果また進捗については、当初の予定から再考をする必要があり、道半ばであると言える。一方で、研究者としての哲学、自問自答の中で今後どのように研究を進めていくか、何をしたいのか、進めるべきなのか、より考えが明確になり研究者として大きく成長出来たと思う。さがけ研究は、研究者の思いが見える研究である、さがけ期間後も、思いが見える研究を実現していけるように努力して行きたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. Mayuki Tanaka[#], **Takeshi Yokoyama[#]**, Hironori Saito[#], Madoka Nishimoto, Kengo Tsuda, Naoyuki Sotta, Hideki Shigematsu, Mikako Shirouzu, Shintaro Iwasaki*, Takuhiro Ito*, and Toru Fujiwara* Boric acid intercepts 80S ribosome migration from AUG-stop by stabilizing eRF1 at the A site. *Nature Chemical Biology* (2024)

植物の主要な栄養素であるホウ素はこれまでどのように感知され、ホウ素の輸送体タンパク質による取り込みを制御しているかは未解明でした。ホウ素輸送体タンパク質の mRNA の 5'UTR に存在する最小 ORF (AUG-Stop) 配列上で、ホウ素依存的にリボソームが停滞し発現制御する様子を、小麦胚芽の無細胞翻訳系から抽出し、クライオ電子顕微鏡により分子レベルで明ら

かにしました。

2. Junta Tomono[#], Kosuke Asano[#], Takuma Chiashi, Masato Suzuki, Masayuki Igarashi, Yoshiaki Takahashi, Yoshikazu Tanaka*, and **Takeshi Yokoyama***

Direct visualization of ribosomes in the cell-free system revealed the functional evolution of aminoglycoside. *The Journal of Biochemistry* (2024)

試験管内で翻訳に必要な要素を再構成した、再構成型無細胞翻訳系(PURE システム)を用いて、抗菌薬がリボソームの機能を阻害する様子を、クライオ電子顕微鏡で直接捉える DARC 法を開発した。この新しい手法により、抗菌薬の活性を生化学的に捉え、同時にどのように働くかをクライオ電子顕微鏡によって観察する新しいアプローチで、半合成型アミノグリコシドであるアルベカシンがプロトタイプであるジベカシンからどのように高機能化したかを明らかにした。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表:

第23回日本蛋白質科学会年会、ワークショップ「高次構造体のはたらきを観る！」

2023年7月7日

Cryo-electron microscopy of ribosomal complexes to understand their roles in infectious diseases

Takeshi Yokoyama

総説: 横山 武司、透過型電子顕微鏡によるリボソームの構造解析、その歴史と今
顕微鏡、57(3)、(2023)

横山 武司、クライオ電子顕微鏡によるリボソーム機能制御メカニズムの可視化
生物物理、62(1)、(2022)

著作物: 伴野 詢太、田中 良和、横山 武司、クライオ電子顕微鏡で見る、リボソームの
「かたち」と「動き」高度化するクライオ電子顕微鏡ハンドブック、第4章、14節、(2023)

受賞: 東北大学プロミネントリサーチフェロー(2022)