

【目的】 細胞内では様々な理由により翻訳が停滞する。翻訳の停滞したリボソームの蓄積は細胞に致命的な影響を与えることから、停滞状態を解消する「リボソームレスキューシステム」が必ず存在している。バクテリアでは tmRNA によるトランス・トランスレーションがその役割を果たしている。長い間、トランス・トランスレーションは唯一知られているリボソームレスキューシステムであったが、近年の遺伝学・構造生物学の研究から新たな翻訳停滞解消因子 YaeJ が明らかになった。本研究では、ペプチジル tRNA の加水分解活性を指標にして、YaeJ がリボソームに結合した瞬間の状態を得られる薬剤の探索を行う。本研究では、我々が培った独自の *in vitro* 翻訳系を化合物探索のスクリーニングに利用することで、これまででない翻訳停滞解消システムの阻害剤を探索すると共に、得られた YaeJ/リボソーム反応中間体に対して高分解能構造解析への道筋をつけることを目的とする。

【方法】 YaeJ は、リボソームの A サイトに作用する。このことを念頭に、30S サブユニットのデコーディング領域の近傍に結合する抗生物質を用いてペプチジル tRNA 加水分解反応の阻害を指標にして bench-top assay を行った。まず 70S リボソーム、mRNA、N-acetyl[¹⁴C]Phe-tRNA を用いて翻訳停滞リボソームを *in vitro* で形成させた。YaeJ を加えることによってリボソーム画分に含まれる N-acetyl[¹⁴C]Phe-tRNA の放射活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、ペプチジル tRNA 加水分解活性を評価した。YaeJ と停滞リボソームの解離会合の段階を評価するために、1 分子蛍光分析システムを用いてアフィニティ解析を行った。まず YaeJ に対して蛍光試薬で標識を行った。次に蛍光標識した YaeJ、様々な濃度の翻訳停滞リボソームを用いて複合体を形成させた。複合体の評価は蛍光偏光解消法によって行った。さらに YaeJ に影響を与える化合物を検討するために、マイクロプレートリーダーを使用した表現型解析を行った。この解析は 96 穴プレート上で大腸菌野生株および YaeJ 欠損株を様々な条件で培養して成長曲線を得ることで、各種化合物に対する耐性を評価するものである。これによって YaeJ の生理的役割、すなわち YaeJ が必要とされる条件を明らかにした。

【結果】 リボソームのデコーディング領域に作用する抗生物質パロモマイシンおよびストレプトマイシンが YaeJ によるペプチジル tRNA 加水分解活性に与える影響を検証したところ、パロモマイシンは終濃度 50 μ M で反応を阻害したのに対して、ストレプトマイシンは 5 μ M で十分に阻害活性を示した。どちらもリボソーム上のデコーディング領域に結合するが、その阻害メカニズムが異なっている。これらの抗生物質が YaeJ のリボソームへの結合を阻害するのか、または結合後のステップに影響を与えるのかを明らかにするために、1 分子蛍光分析によるアフィニティ解析の実験系を立ち上げた。まず、抗生物質非存在下で蛍光標識した YaeJ を用いて蛍光変更解消法を行ったところ、解離定数は 27.34 nM であった。今後、抗生物質を加えて同様の実験を行う必要がある。また、YaeJ 欠損株の表現型解析を行ったところ、一部の化合物について YaeJ 欠損株の増殖速度を低下させることを確認した。

薬剤が YaeJ によるペプチジル tRNA 加水分解活性に与える影響

