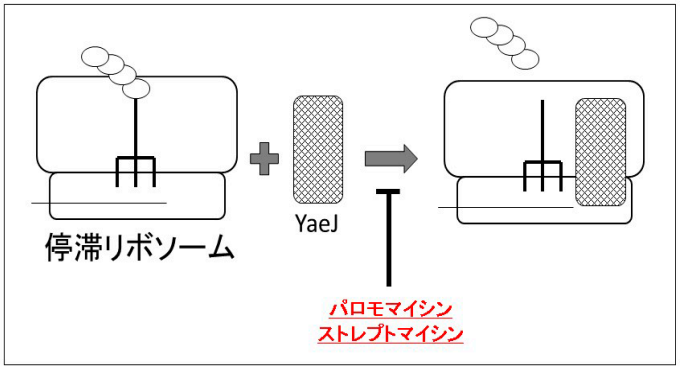
132　翻訳停滞解消を阻害する薬剤の探索と作用機序の解明	栗田　大輔

【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死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、これまでに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[^{14}C]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[^{14}C]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 μM で反応を阻害したのに対して、ストレプトマイシンは 5 μM 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



132. 翻訳停滞解消を阻害する薬剤の探索と作用機序の解明

栗田　大輔

弘前大学 農学生命科学部 分子生命科学科

Key words：リボソーム，翻訳，YaeJ，抗生物質，リボソームレスキュー

緒　言

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死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。tmRNA は、tRNA ドメインと mRNA ドメインを巧みに使い分けて、既存の mRNA から翻訳を引き継ぐことによってリボソームの停滞を解消する。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。一般に、翻訳の反応中間体は短寿命・不安定であることから、その解析は困難を極める。通常の翻訳を阻害する抗生物質は多数報告されており、それらを用いることで反応中間体を安定的に作り出し、立体構造を明らかにすることで翻訳の分子メカニズムの理解は大きく前進してきた。しかし、翻訳停滞解消機構を特異的に阻害する化合物は国内外を含めて知られていない。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、これまでに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

1.　リボソームの精製

大腸菌 A19 株を 3,000 ml の LB 培地で OD_{600}＝0.5 まで培養した。菌体を遠心分離によって回収し、−80℃で凍結保存した。菌体の 2 倍量の酸化アルミニウムで破砕し、25 ml のリボソーム A-buffer（10 mM Tris-HCl pH 7.5、10 mM $MgCl_2$、60 mM NH_4Cl、7 mM 2-mercaptoethanol）に懸濁して細胞抽出液を得た。その後、遠心分離によって不溶性画分を分離した後に超遠心を行った。得られた沈殿を 1 ml の A-buffer で洗った後に、2 ml の B-buffer（10 mM Tris-HCl pH 7.5、10 mM $MgCl_2$、1,000 mM NH_4Cl、7 mM 2-mercaptoethanol）に溶かしてリボソーム溶液を得た。遠沈管の底に 20%スクロースを含んだ B-buffer を敷き、その上に溶かしたリボソーム溶液を慎重にのせた。次に超遠心によってリボソームを沈殿させて、沈殿を 1 ml の A-buffer に溶かした。次にスクロース濃度勾配超遠心を行った。遠心後、フラクションコレクターを用いて分画した。260 nm の吸光度を測定し、70S リボソーム画分を決定した。画分を集め、限外濾過によって濃縮を行った。最終的に A-buffer（10% glycerol を含む）に置換し 500 μl まで濃縮した。OD_{260}を測定して濃度を決定し、液体窒素で凍結させ−80℃で保存した［1］。

2.　YaeJ の精製

大腸菌 BL21（DE3）株にプラスミド pGEMEX2 SmpB を形質転換し 3,000 ml の LB 培地で培養した。OD_{600}＝0.5〜0.8 の時点で終濃度 0.5 mM の IPTG を加え、さらに 3 時間培養した。菌体を遠心分離によって回収し、−80℃で凍結保存した。菌体を 25 ml の A-buffer（50 mM Hepes-KOH pH7.5、100 mM KCl、7 mM 2-mercaptoethanol）に懸濁した後に超音波により菌体を破壊した。その後、遠心分離によって不溶性画分を分離して細胞抽出液を得た。

細胞抽出液を SP-sepharose カラムに添加した。次に 30 ml の A-buffer で洗浄した後に、KCl 濃度を 100 mM から

1,000 mM へと濃度勾配をかけて溶出した。

各フラクションに対して SDS-PAGE を行った。YaeJ のバンドが確認されたフラクションを回収し Ni-NTA agarose カラムに添加した。次に 30 ml の wash buffer（50 mM Hepes-KOH pH7.5、200 mM KCl、1,000 mM NH_4Cl、7 mM 2-mercaptoethanol）で洗った後に、30 ml の B-buffer（50 mM Hepes-KOH pH7.5、200 mM KCl、20 mM imidazole、7 mM 2-mercaptoethanol）で洗った。その後、imidazole 濃度を 20 mM から 1,000 mM へと濃度勾配をかけて溶出した。

各フラクションに対して SDS-PAGE を行った。YaeJ のバンドが確認されたフラクションを回収し、限外濾過によって濃縮を行った。最終的に A-buffer（10% glycerol を含む）で置換し 500 μl まで濃縮した。bradford 法によってタンパク質濃度を決定し、液体窒素によって凍結させ−80℃で保存した［2］。

3. *In vitro* peptidyl-tRNA 加水分解活性の測定

停滞したリボソームを *in vitro* で形成するために、20 pmol リボソーム、100 pmol mRNA、20 pmol N-acetyl-[^{14}C]Phe-tRNA を 40 μl の TMND buffer 中で混合し、37℃で 10 分間インキュベートした。この停滞したリボソームに 10 μl の YaeJ 溶液を加え、10 分間インキュベートした。その後、反応液をニトロセルロースメンブレンのフィルターに通し、さらに 5 ml の TMND buffer でフィルターを洗浄した。リボソーム画分はフィルターに結合するため、メンブレン上の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定することで、YaeJ による AcPhe-tRNA の加水分解活性を求めた［1］。

4. 1 分子蛍光分析による YaeJ のリボソーム結合活性の測定

アミノ基を蛍光標識した YaeJ を停滞したリボソームを *in vitro* で形成するために、20 pmol リボソーム、100 pmol mRNA、20 pmol *N*-acetyl-[^{14}C]Phe-tRNA を 40 μl の TMND buffer（80 mM Tris-HCl pH 7.8、7 mM $MgCl_2$、150 mM NH_4Cl、2.5 mM DTT、2 mM spermidine）中で混合し、37℃で 10 分間インキュベートした。この停滞したリボソームに 10 μl の YaeJ 溶液（50 pmol YaeJ および各種濃度のパロモマイシンまたはストレプトマイシン）を加え、10 分間インキュベートした。その後、反応液をニトロセルロースメンブレンのフィルターに通し、さらに 5 ml の TMND buffer で洗浄した。リボソーム画分はフィルターに結合するため、メンブレン上の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定することで、YaeJ による AcPhe-tRNA の加水分解活性を求めた［1］。

5. 表現型解析

LB プレート上にストリークした大腸菌 A19 株および A19ΔyaeJ 株をコロニー接種液 GENIIIF-A（バイオログ社）に懸濁した。懸濁液は GENIII マイクロプレート（バイオログ社）に 100 μl ずつ分注した。マイクロプレートを蒸散抑制機能付きマイクロプレートリーダーにセットし、37℃の条件で経時的に吸光度を測定した。

結果および考察

1. 抗生物質が YaeJ によるペプチジル tRNA 加水分解活性に与える影響

リボソーム、mRNA、*N*-acetyl-[^{14}C]Phe-tRNA 複合体を *in vitro* で形成させたところ、約 8 pmol の *N*-acetyl-[^{14}C]Phe-tRNA がリボソームに結合していた（図 1A、B）。この複合体に YaeJ を添加したところ、リボソームに結合している *N*-acetyl-[^{14}C]Phe-tRNA は約 1 pmol に減少した。この条件で抗生物質の影響を検証した。

パロモマイシンのペプチジル tRNA 加水分解活性に与える影響を検証したところ、500 μM で強い阻害活性を示した（図 1A）。抗生物質の濃度を振ってみたところ、500 μM と比較して 50 μM では 72%、5 μM では 12%の阻害活性を示した。このことから IC_{50}は 5〜50 μM であると推定できる。ストレプトマイシンについても同様の実験を行ったところ、5 μM で十分な阻害活性（75%）を示すことが明らかになった（図 1B）。0.5 μM では 8%の阻害活性であることから IC_{50}は 0.5〜5 μM であることが推定され、パロモマイシンより強い阻害活性を示した。

パロモマイシンは、リボソームの小サブユニットの 16S rRNA の helix44 の内側に結合して A1492、A1493（正しいコドン・アンチコドン対合を監視する塩基）をフリップアウトさせることで、コドンの誤読を引き起こす抗生物質である［3］。一方、ストレプトマイシンは 16S rRNA の helix1、18、27、44 に挟まれる形でデコーディング領域

に結合し、アミノアシル tRNA 結合後のリボソームの状態を安定化することにより、コドンの誤読を引き起こす [3]。注意すべき点は、どちらも翻訳のミスリーディングを起こす薬剤であるが、その作用メカニズムが異なることである。2012 年に報告された高度好熱菌リボソームと大腸菌 YaeJ 複合体の結晶構造によると、YaeJ はリボソームの A サイト（アミノアシル tRNA 結合部位）に結合することが明らかになっている [4]。パロモマイシンと YaeJ のリボソーム上での結合部位は重複していないのに対して、ストレプトマイシンは YaeJ の C 末端領域と結合部位が近接している。これらの薬剤によるペプチジル tRNA 加水分解活性の阻害が、YaeJ のリボソームへの結合阻害によるものであるか、結合後のステップ（YaeJ の構造変化等）の阻害によるものであるか、明らかにする必要がある。

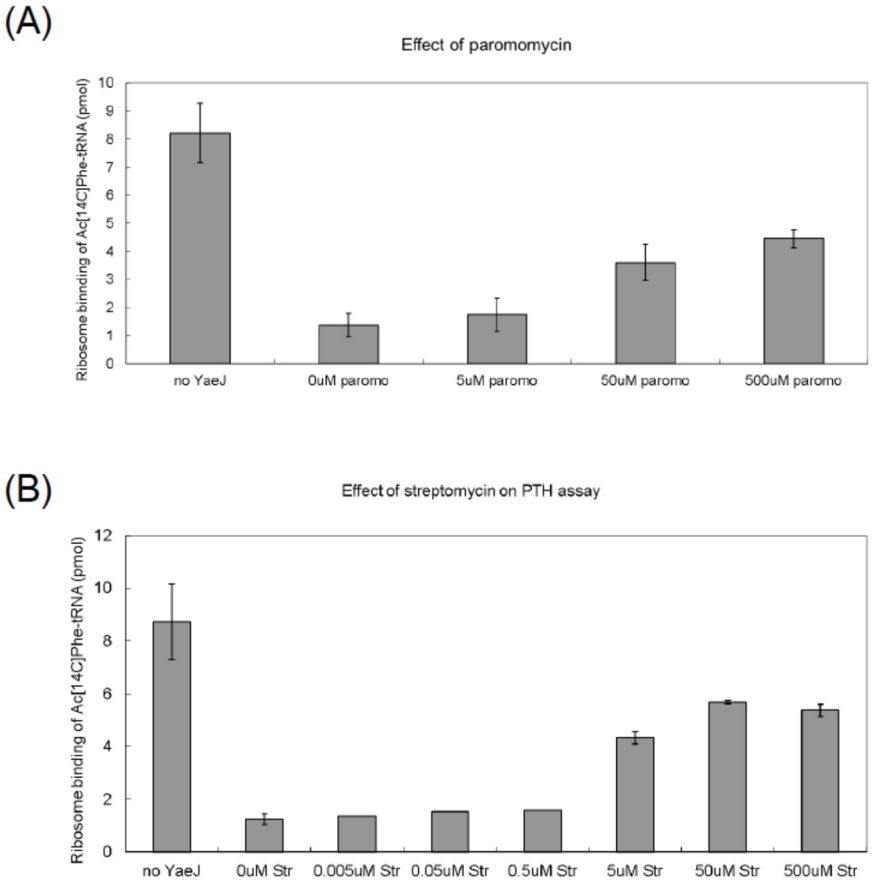


図 1. 薬剤が YaeJ によるペプチジル tRNA 加水分解活性に与える影響

A) パロモマイシンがペプチジル tRNA 加水分解活性に与える影響。

B) ストレプトマイシンがペプチジル tRNA 加水分解活性に与える影響。

2. 蛍光偏光解消法による YaeJ のリボソーム結合活性

薬剤が YaeJ のリボソームへの結合に影響を与えるか明らかにするために、蛍光偏光解消法によるリボソーム結合活性測定の実験系の確立を行った。この手法では、YaeJ を蛍光標識する必要がある。タンパク質を蛍光標識する方法として、大きく分けて 2 種類の方法、すなわちアミノ基を修飾する方法とチオール基を修飾する方法がある。大腸菌 YaeJ はシステイン残基を持っていないため、アミノ基を修飾する方法を選択した。YaeJ の pI は 10.78 であり、塩基性アミノ酸を多く含んでいる。これらのアミノ基をすべて修飾した場合、リボソームへの結合に影響を与える可能性が高いことから、部分修飾を行うための条件検討を行った。部分修飾を行った YaeJ を用いて、薬剤の非存在下で様々な濃度のリボソームと複合体を形成させて偏光度を測定したところ図 2 に示す結合曲線が得られた。得られたデータをソフトウェア GraphPadPrism5 を用いてフィッティングさせたところ、Kd は 27.34 nM であった。今後、薬剤を加えて同様の実験を行うことで、リボソームへの結合に与える影響を明らかにする必要がある。

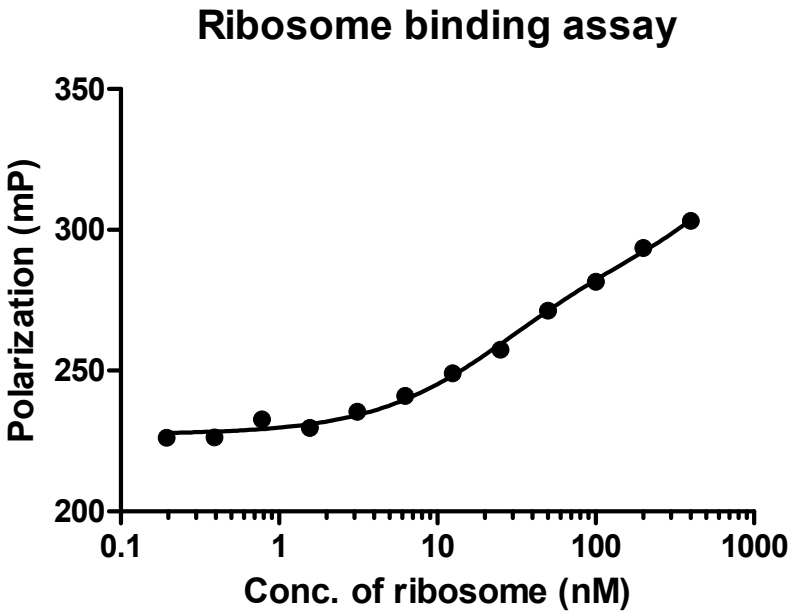


図 2. 蛍光偏光解消法による YaeJ のリボソーム結合活性

3. YaeJ 欠損株の表現型解析

YaeJ の生理的役割を明らかにするために yaeJ 遺伝子欠損株の表現型解析を行った。ここでは BIOLOG 社の GEN Ⅲ MicroPlate™ を使用している。このプレートには 96 種類の様々な化合物が各ウェルに入っており、バクテリアの培養液をそれぞれ加えて蒸散抑制機能付きのプレートリーダーで経時的に吸光度を測定することで、各種化合物がバクテリアの増殖に与える影響を高効率で検証することが可能になる。この方法を、大腸菌野生株および yaeJ 欠損株に対して行い、増殖曲線から倍加時間を求めた（図 3）。96 穴プレートの各ウェルのうち、A1 はネガティブコントロール、A10 はポジティブコントロールとなっている。多くの化合物において、野生株と yaeJ 欠損株で倍加時間に差はなかったものの、トロレアンドマイシン（D10）およびグアニジン塩酸塩（E11）に対しては、野生株より yaeJ 欠損株の方が 2 倍以上長い倍加時間を示した。今後、これら以外の化合物に対しても同様の表現型解析を行うことで YaeJ の生理的役割が明らかになることが期待される。

(A)

A19	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000	1000	699.4	700.3	1000	1000	1000	1000	1000	129.8	146.6	1000
B	1000	963.8	652.2	1000	1000	1000	908.5	1000	647.6	146.4	310.7	860.3
C	940.5	684.5	748.2	720.4	1000	1000	761.6	612.6	771.4	110.1	1000	1000
D	811.2	903.8	1000	1000	653.2	1000	900.4	1000	525.2	331	124.6	1000
E	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	225.7	128.6
F	1000	990.8	862.5	677.1	1000	1000	499.9	1000	1000	128.7	1000	672.3
G	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	249.3	1000
H	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	628.1	1000

(B)

A19DyaeJ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000	1000	679.4	608.2	1000	1000	1000	1000	1000	192.5	163.9	1000
B	1000	749.7	684	1000	1000	1000	1000	1000	711.1	214.7	339.4	1000
C	1000	1000	797.2	890.2	1000	1000	931.5	916.8	805.8	122.1	1000	1000
D	644	681.5	1000	1000	634.1	961.4	696.6	1000	528.6	686.8	173.1	1000
E	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	546.3	141.9
F	1000	887.8	754.5	537.1	860.7	833.5	482.8	1000	1000	142	1000	1000
G	1000	758.5	1000	597	1000	1000	1000	1000	1000	1000	408.3	1000
H	1000	1000	1000	1000	986.4	1000	1000	1000	1000	1000	451.1	1000

図 3. 各種化合物に対する表現型解析

A) 大腸菌 A19 株（野生株）の倍加時間。

B) 大腸菌 A19ΔyaeJ 株の倍加時間。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、群馬大学大学院理工学府分子科学部門の行木信一准教授である。

文　献

1) Kurita D, Chadani Y, Muto A, Abo T, Himeno H. ArfA recognizes the lack of mRNA in the mRNA channel after RF2 binding for ribosome rescue. Nucleic Acids Res. 2014 Dec 1;42(21):13339-52. Epub 2014 Oct 29. PMID:25355516 doi: 10.1093/nar/gku1069.

2) Handa Y, Inaho N, Nameki N. YaeJ is a novel ribosome-associated protein in Escherichia coli that can hydrolyze peptidyl-tRNA on stalled ribosomes. Nucleic Acids Res. 2011 Mar;39(5):1739-48. Epub 2010 Nov 3. PMID:21051357 doi: 10.1093/nar/gkq1097.

3) Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. Nature. 2000 Sep 21;407(6802):340-8. PMID:11014183

4) Gagnon MG, Seetharaman SV, Bulkley D, Steitz TA. Structural basis for the rescue of stalled ribosomes: structure of YaeJ bound to the ribosome. Science. 2012 Mar 16;335(6074):1370-2. PMID:22422986 doi: 10.1126/science.1217443.