

## 微生物におけるタンパク質合成反応の動態制御機構に関する研究



富山県立大学工学部生物工学科 高田 啓

### はじめに

ゲノム DNA にコードされた遺伝情報を正しく読み写し、生命機能の担い手であるタンパク質の発現を保証することは、すべての生命にとって必須なプロセスである。特に、その最終段階である翻訳反応はその主役であるリボソームを含め多数の因子が関わり、複写された塩基配列上の遺伝情報を読み解き、アミノ酸配列へと変換する非常に複雑な反応である。そのため、そのエラー率は DNA 複製・転写反応と比べ高く、またリボソームの生合成を含め、翻訳反応の駆動は細胞内の最大のエネルギー消費過程である。さらに、医療分野で用いられる抗生物質の約 30% はリボソームが標的であることも特筆すべき点である。「この曖昧で大食漢、そして脆弱性を秘めた超巨大複合体・リボソームを微生物はどういうにハンドリングしているのか?」、遺伝学・生化学的解析を中心に、翻訳装置を介した栄養状態の感知機構・抗生物質耐性機構・品質管理機構などに関して、筆者がこれまでモデル微生物・枯草菌を用いて行ってきた研究概要を以下に示す。

### 1. 翻訳伸長状態を介して、栄養状態を感知する仕組み：

#### 緊縮応答機構について

「緊縮応答」とは微生物一般において保存されている環境適応機構の一つであり、アミノ酸欠乏などのストレスによって核酸小分子 (p)ppGpp の蓄積が誘導されると、遺伝子発現制御を介してアミノ酸合成が促進される一方で、DNA 複製やリボソーム生合成などが阻害され、生体分子の無駄な消費が抑制される。緊縮応答機構の主要因子 RSH (RelA/SpoT Homologue) は、アミノ酸枯渢により翻訳伸長途中で停止状態にあるリボソームとアミノアシル化されていない tRNA (deacylated tRNA) をシグナル分子として感知し、(p)ppGpp の合成を誘導すると考えられてきた。一方で、RSH タンパク質の精製は非常に難しく生化学的な解析が困難であったため、その詳細な分子メカニズムは不明確であった。そのなかで、筆者は枯草菌 RSH タンパク質である Rel およびリボソームの精製法を確立に取り組み、翻訳停止状態のリボソームと deacylated tRNA がトリガーとなって Rel の (p)ppGpp 合成活性が飛躍的に上昇することを試験管内再構成系によって明らかにした<sup>1)</sup> (図1)。また、

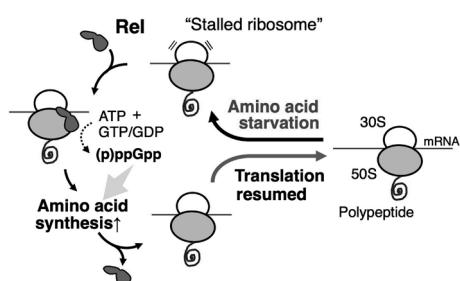


図1. アミノ酸飢餓によって誘導される緊縮応答制御

Rel の C 末端ドメインが翻訳停止状態のリボソーム及び deacylated tRNA を感知するセンサー機能を担っていることを明らかにした<sup>2)</sup>。さらに、(p)ppGpp によるアロステリックな活性制御機構を発見し、詳細な解析により、(p)ppGpp による RSH 活性化の分子メカニズムを明らかにした<sup>3)</sup>。この手法は高度好熱菌由来の RSH の機能解析に転用することができ、汎用性が高いものであることを実証した<sup>4)</sup>。

### 2. 抗生物質の遊離を誘導する仕組み：ARE-ABCF 因子による抗生物質耐性機構とその進化について

近年、抗生物質の乱用による耐性菌の出現や環境汚染などの問題が深刻化している。抗生物質の大半はリボソームを標的とする天然化合物に由来し、その多くは土壌微生物の放線菌によって生産される。興味深いことに、放線菌が自身のリボソームを守るために保持する自己耐性遺伝子 (ARE-ABCF タンパク質) が、院内感染の原因となる病原性細菌など多くのバクテリアで保存されていることがわかつてきた。ABCF は ABC ファミリーに一般的な膜貫通領域をもたず、他の膜タンパク質と共に働くことで抗生物質の排出に寄与していると考えられてきたが、その作用メカニズムは不明であった。筆者は、枯草菌 ARE-ABCF タンパク質 (VmlR) に着目し、VmlR がリボソームに直接結合し、抗生物質耐性に寄与することを明らかにし<sup>5)</sup>、発現制御の分子機構と合わせ<sup>6)</sup>、ARE-ABCF タンパク質の作用メカニズムを解明した。具体的には、Cryo-EM を用いた構造解析によって、VmlR がリボソーム上の tRNA の出口である E サイトに直接結合し、2 つの長い  $\alpha$  ヘリックスからなる領域 (ARD: antibiotics resistant domain) がニードルのように翻訳活性中心 (PTC) まで入り込むことで抗生物質に作用し、抗生物質がリボソームから遊離することを明らかにした (図2)。既存の抗生物質耐性機構の多くは、「トランスポーターによる抗生物質の細胞外排出」や「酵素による化学的修飾を通じた不活化」で説明される。一方で、ARE-ABCF は抗生物質の標的に直接作用し、抗生物質の解離を促進する新しい作

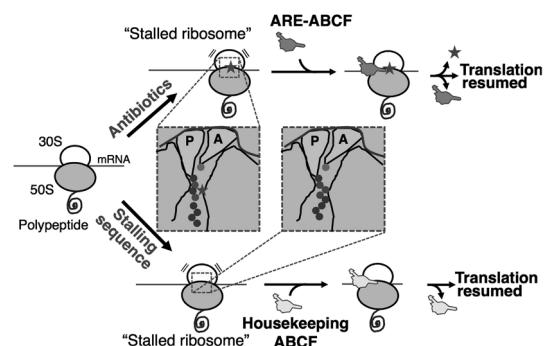


図2. 新規翻訳促進因子 ABCF の作用機序

用機序を示すタンパク質として注目されている。ARE-ABCFが耐性を付与する抗生素質のスペクトラムは多様であり、その多様性は翻訳活性中心に直接作用するARDの長さとアミノ酸組成に起因すると考えている。

一方で、抗生素質耐性には寄与しないABCFホモログ(Housekeeping ABCF)が微生物一般に広く保存されており(通常、生物種あたり2~4コピー存在)、リボソームへの結合活性を有すると予想されるが、翻訳機構に対する機能は不明であった。筆者はこれらHousekeeping ABCFはリボソームが合成を苦手とするアミノ酸モチーフであるプロリン・正電荷および負電荷に富んだ連続配列によって生じる翻訳停滞を解消する翻訳促進因子であることを明らかにした<sup>7)</sup>(図2)。この結果は、多剤耐性遺伝子として注目されているARE-ABCF因子群が、翻訳促進因子を共通祖先として進化してきたことを示すものである。

**3. 翻訳の曖昧さを補完する仕組み：翻訳品質管理機構に関する遺伝情報を正確に読み写しタンパク質の発現を保証することは生命現象の根幹ですが翻訳反応中のエラーは翻訳伸長の停滞や異常タンパク質の凝集を引き起こすなど、生体機能に悪影響を及ぼすことが知られている。近年、このような翻訳の曖昧さを補完する翻訳品質管理機構RQC(Ribosome-associated Quality Control)が真核生物において発見され、その分子機構の解明がホットトピックとなっている。さらに、枯草菌において真核生物の翻訳品質管理機構RQCの主要因子Rqc2と配列相同性のある因子RqcHが発見され、以下①~③の作用モデルが提唱されていた。①RqcHは翻訳停滞に伴い解離した50Sサブユニットに結合し、Alanine-tRNAを呼び込むことで非典型的な翻訳伸長を促す。②その結果、合成途上鎖のC末端にポリアラニンが附加される。③これが分解タグとして認識され、翻訳途上の新生ペプチド鎖が分解される。一方、関連因子の有無やポリアラニン附加の分子機構など不明な点が多く残されていた。そこで、筆者は枯草菌細胞抽出液よりRqcH:50S複合体の単離方法を確立に取り組み、新規関連因子YabOを同定した。機能解析の結果、YabOは50Sサブユニット上でP-site tRNAを安定化させることでポリアラニン附加反応を促進する因子であることを明らかにし、RqcPと名付けた。また、単離した複合体をCryo-EMを用いた構造解析に供し、ポリアラニン附加反応中間複合体を複数活写することで、ポリアラニン附加反応の分子機構を解明した<sup>8)</sup>(図3)。さらに、これら知見をもとにRqcH・RqcPによる50Sサブユニット上でのポリアラニン附加反応を試験内再構成することに成功し、ポリアラニン附加反応は解離した50Sサブユニット上で翻訳促進因子やmRNAなどに依存しない「非典型的な翻訳反応」であることを明らかにした<sup>9)</sup>。**

加えて、さらなる関連因子の探索に取り組み、RqcPと同様に促進因子として作用する新規関連因子YlmHを同定した<sup>10)</sup>(図3)。

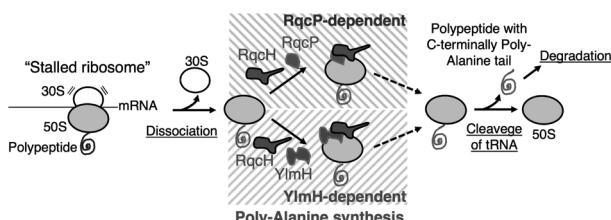


図3. 翻訳品質管理機構RQCの分子機構

生命情報科学的解析から、翻訳品質管理機構RQCの主要因子RqcHは保持する一方、促進因子RqcPを保持していない微生物群の多くで、YlmHが保存されていることを明らかにした。RqcPとYlmHはS4 domainという共通した機能ドメインを有しており、枯草菌のようにRqcP及びYlmHの二種類の促進因子を保持する微生物種やどちらか一方を保持している微生物種など、種間で多様性があることを明らかにした。

### おわりに

本研究では、微生物におけるタンパク質合成反応の動態制御機構に焦点を当て、翻訳反応がどのように調整され、環境変化に適応しているのかを明らかにすることを目指した。翻訳反応は、生物学の教科書的な内容として広く知られる一方で、その背後にある分子機構や制御原理には未解明な部分が多く残されている。本研究で得られた知見は、抗生素質耐性菌対策や効率的な微生物バイオものづくりの発展に寄与するだけでなく、翻訳制御機構に関する新たな発見の可能性を切り開くものと期待される。今後も、農芸化学分野のさらなる発展を目指し、未解明の領域に挑み続けるとともに、基礎研究から応用研究への橋渡しとなる研究を推進していく所存である。

### (引用文献)

- 1) Takada H. et al., *Front. Microbiol.*, 11, 277, (2020)
- 2) Takada H. et al., *Nucleic Acids Res.*, 49, 444–457, (2021)
- 3) Roghanian M\*, Nerom KV\*, Takada H\*. et al., *Mol. Cell*, 81, 3310–3322, (2021) \*equal contribution
- 4) Tamman H. et al., *Nat. Chem. Biol.*, 16, 834–840, (2020)
- 5) Crowe-McAuliffe C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 115, 8978–8983, (2018)
- 6) Takada H. et al., *Nucleic Acids Res.*, 50, 6174–6189, (2022)
- 7) Takada H. et al., *Nucleic Acids Res.*, 52, 9854–9866, (2024)
- 8) Crowe-McAuliffe C\*, Takada H\*. et al., *Mol. Cell*, 81, 115–126, (2021) \*equal contribution
- 9) Takada H. et al., *Nucleic Acids Res.*, 49, 8355–8369, (2021)
- 10) Takada H. et al., *Nucleic Acids Res.*, 52, 8483–8499, (2024)

**謝 辞** 本研究は、スウェーデン王国The Laboratory for Molecular Infection Medicine Swedenおよび京都産業大学生命科学部で行われたものです。約3年半の留学期間中、公私にわたってご指導を賜りましたVasili Hauryliuk博士、Gemma Atkinson博士に厚く御礼申し上げます。また、京都産業大学教授千葉志信先生、国立遺伝学研究所藤原圭吾博士には、本研究を発展させるにあたり、公私共に親身にご支援いただきましたことを深く感謝いたします。日頃より温かいお言葉とご助言をいただきました、東京農業大学名誉教授吉川博文先生、同大学教授千葉櫻拓先生、同大学教授朝井計先生、同大学准教授渡辺智先生、法政大学教授山本兼良先生、同大学客員教授故・石浜明先生、立教大学名誉教授河村富士夫先生、同大学教授末次正幸先生、明治大学准教授島田友裕先生、富山県立大学教授大島拓先生に厚く御礼申し上げます。多くの共同研究者の先生方より貴重なご意見・ご助言を賜りました。全ての方のお名前を挙げることはできませんが、心から御礼申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました吉川博文先生に厚く御礼申し上げます。