

## 大腸菌の持つ二段構えのリボソーム解放機構

阿保 達彦, 茶谷 悠平

### 1. はじめに：細菌のリボソーム解放システム，トランストランスレーション

4種類のヌクレオチドで記述される遺伝情報は、連続する三つのヌクレオチドが一組のコドンとして一つのアミノ酸を指定し、タンパク質の一次構造を決定する。4<sup>3</sup>=64種類のコドンのうち61種類はアミノ酸を指定するが、3種類は指定するアミノ酸を持たない、いわゆる終止コドンである。終止コドンは単に「対応するアミノアシルtRNAが存在しない」コドンではなく、「翻訳終結因子 (release factor: RF) によって認識される」コドンであり、RFによるペプチジルtRNA加水分解に始まる一連の翻訳終結反応のシグナルとして積極的な役割を担う。また、終止コドンは開始コドンとともにオープンリーディングフレーム (open reading frame: ORF) を規定する。終止コドンがなければ翻訳産物のC末端が定まらないという事態に陥る。すなわち、下世話な言葉でいえば「終止コドンは大事」なのである。では、終止コドンがない場合、翻訳はどうなるのであろうか。終止コドンを持たないnon-stop mRNAであっても、SD (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンがそろっていれば翻訳は開始される。しかし、その場合リボソームはmRNAの末端に到達しても正常に翻訳を終結できずに立ち往生し、mRNA、ペプチジルtRNAなどからなる複合体、nonproductive translation complex (NTC) が形成される (図1)。

細菌はトランストランスレーション (*trans-translation*) と呼ばれる特殊な翻訳機構によって立ち往生したリボソームを解放してNTCを解消することが知られる (図1A)<sup>1-4)</sup>。 *trans-translation* に関してはさまざまな総説 (たとえば本誌79巻, 姫野ら<sup>4)</sup>) が出版されているため、ここで詳細な解説は控えるが、ごく簡単に表現すれば、*ssrA* 遺伝子にコードされるtmRNA (SsrA RNA) 分子\*がnon-stop mRNAに

継ぎ足される形で翻訳が進行し、tmRNA上の終止コドンで翻訳が終結することでNTCが解消されるシステムである<sup>2-5)</sup>。継ぎ足された部分のRNAも当然ながら翻訳され、そこにコードされるペプチド配列がC末端に融合されたポリペプチド鎖ができ上がる。このC末端に融合される配列はSsrAタグと呼ばれ、SsrAタグがC末端に付加したタンパク質はプロテアーゼにより積極的に分解される<sup>1-4)</sup>。

NTCの蓄積は、リボソームの実効濃度の減少による細胞全体の翻訳活性の低下を招き、有害であると考えられる。*trans-translation* はNTCの解消を通じ、翻訳活性を維持する効果をもたらす。さらに、non-stop mRNAにコードされる不完全なポリペプチドは機能しないだけでなく、むしろ有害である可能性もあるため、産物が分解されるのは理にかなっている。また、non-stop mRNAの3'末端に形成されるNTCはヌクレアーゼのアクセスに対する障害となることからNTCの解消はnon-stop mRNAを減少させることにもなる。このように*trans-translation* は翻訳活性の維持、タンパク質品質管理、mRNA品質管理と、複数の重要な効果をもたらす機構として認識されている<sup>2-4)</sup>。

最近、大腸菌において*trans-translation*のバックアップ機構とでもいべきリボソーム解放機構が発見され、リボソーム解放の重要性があらためて示された。以下でその新たなリボソーム解放機構について、その発見の経緯、巧妙な発現制御、多彩な分子機構を概説したい。

### 2. 第二のリボソーム解放因子 ArfA

昨今、盛んにゲノム解析が行われ、さまざまな真正細菌のゲノム情報が明らかになってきている。それによると、*ssrA* は、ごく少数の例外を除きすべての真正細菌で見いだされている。加えて、NTCの解消と不完全なポリペプチド鎖の除去という機能を担うことから、*trans-translation* は細菌の生命維持において重要であると考えられた。実際、淋菌、マイコプラズマ、ピロリ菌等ではtmRNAが生育に必須であるということを示す (または示唆する) 報告がなされている<sup>2,3)</sup>。しかし一方で、大腸菌、枯草菌等多くの

\*本稿では一般的な用法に従い基本的にtmRNAと呼び、遺伝子名としては*ssrA*、tmRNAにコードされるタグ配列の名称としてはSsrAタグという呼称を採用する。

岡山大学大学院自然科学研究科 (理学部生物学科) (〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中3-1-1)

Ribosome rescue systems in *Escherichia coli*

Tatsuhiko Abo and Yuhei Chadani (Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Tsushima-Naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870736

© 2015 公益社団法人日本生化学会

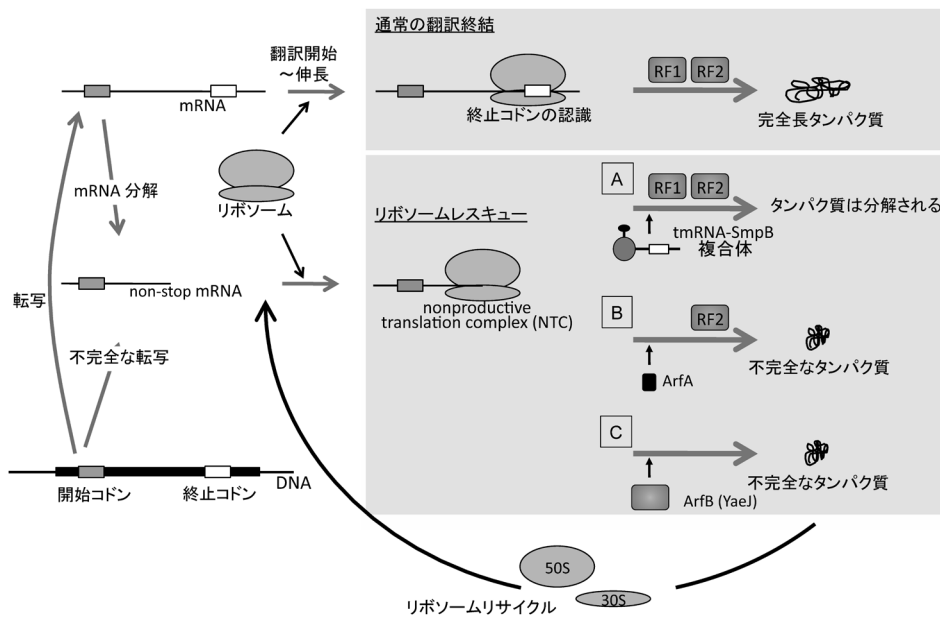


図1 大腸菌のリボソームレスキューシステム

mRNA上の開始コドンから開始した翻訳は、終止コドンを確認したRF1またはRF2の作用で終結する。翻訳を終えたリボソームはmRNAから解離し、次のmRNAを翻訳する。しかし、mRNAの分解や不完全な転写により生じたnon-stop mRNAを翻訳するリボソームはその3'末端で停滞し、nonproductive translation complex (NTC)が形成される。NTCに捕らわれたリボソームは次の翻訳を行うことができず、結果として細胞内のリボソームの有効濃度が減少し、翻訳活性が低下する。大腸菌には少なくとも三つのリボソームレスキュー系が存在する。*trans*-translation (A)はNTCを解消し、同時に不完全なポリペプチドを分解へと導く。SmpBはtmRNAと特異的に結合するタンパク質である<sup>4)</sup>。ArfAはRF2をリクルートしてリボソームをレスキューする(B)。ArfB (YaeJ)は自身がペプチジルtRNA加水分解活性を備えたRFホモログであり、その作用に他の因子を必要としない(C)。ArfA, ArfBによるNTCの解消は不完全なポリペプチドの分解を伴わない。

細菌でtmRNA欠損株が得られ、必ずしもこれらの菌株では*trans*-translationは必要ではないらしいことも示されており、*trans*-translationの生理学的な存在意義に関しては疑問が残されていた。

そこで我々は、大腸菌のtmRNAが必須でないのは*trans*-translationにかわる第二のNTC解消機構が存在するからであり、その因子を欠く大腸菌株は生育にtmRNAを必要とする、との作業仮説のもと、その第二の因子の探索を試みた。その結果、機能不明のORF、*yhdL*に塩基置換が生じた株が得られた<sup>6)</sup>。*yhdL*は大腸菌ゲノム上で72アミノ酸からなるタンパク質をコードしうる(わざわざこのような回りくどい表現をするのには後述のような理由がある)ORFであり、得られた変異株ではその18番目のトレオニンがアラニンに置換していた。

*yhdL*欠損株は通常は何の表現型も示さないが、*ssrA*の欠損や、SsrAとともに*trans*-translationに必須の遺伝子*smpB*の欠損と併せると合成致死の表現型を示す。すなわち*yhdL*は*trans*-translationができない大腸菌の生育には必須である。興味深いことに、*yhdL*と*ssrA*の合成致死の表現型は亜致死濃度のピューロマイシンにより、部分的に抑圧される。ピューロマイシンはアミノアシルtRNAのミ

ミックとしてペプチド基を受け取り、その時点で翻訳を終結させる抗生物質であり、その性質上NTCに作用すればそれを解消しうる。これはすなわち、*yhdL ssrA*二重欠損が生育できないのはNTCの蓄積が原因である、と解釈でき、最初の仮説どおり*yhdL*が*trans*-translationにかわる第二のNTC解消因子であることを強く示唆する結果である。そこで、明確な証拠を得るために、ORF内に転写ターミネーターを挿入したモデル遺伝子を細胞内で発現させた。転写ターミネーターの作用で終止コドンに到達する前に強制的に転写が終結されるため、この遺伝子が発現するとnon-stop mRNAが生産され、その末端でNTCが形成される。*ssrA*、*yhdL*それぞれの欠損や過剰発現を組み合わせたさまざまな条件でモデル遺伝子の産物を解析した結果、実際に*yhdL*がNTC解消に関与していることが示された。

さらに、精製したYhdLタンパク質が*in vitro*でNTC解消活性を示すことも明らかとなった。大腸菌*yhdL*欠損株の抽出液にSsrA RNAのタグコード領域に対合するオリゴヌクレオチドを加え、*trans*-translationを阻害することで、*ssrA yhdL*二重欠損の状態を再現できる。その状態で、人工合成したnon-stop mRNAを翻訳させると、NTCが蓄積する。NTCの蓄積はペプチジルtRNAの増加を指標に解析で

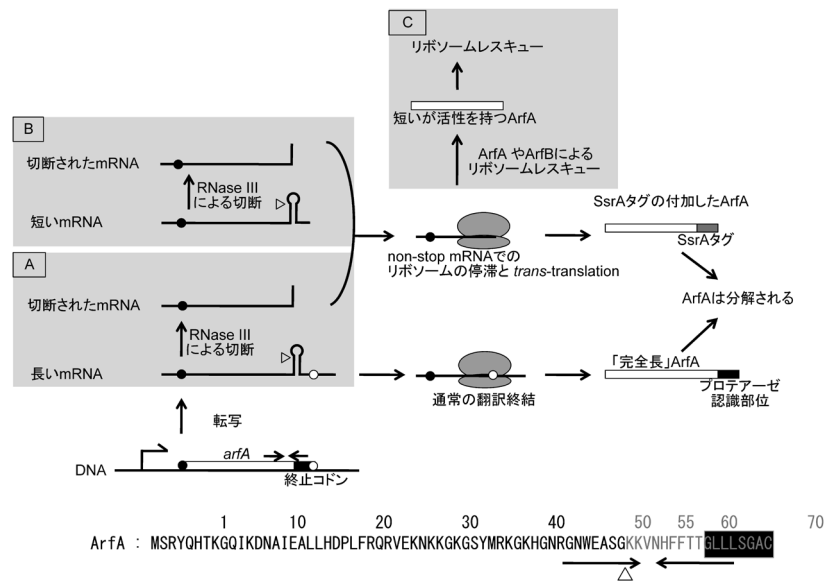


図2 大腸菌 ArfA の発現制御機構

*arfA* は終止コドンを持つ長い mRNA (A), または短い mRNA (B) として転写される。いずれの場合も RNase III の作用で切断され、non-stop mRNA になる。また、短い mRNA はそれ自身が non-stop mRNA である。これらは翻訳されても *trans-translation* の標的となり、ArfA は発現しない。また、長い mRNA から翻訳される完全長の ArfA の C 末端にはプロテアーゼの標的配列が存在し、分解される。結果として、ArfA は通常は発現しない。しかし、NTC が *trans-translation* の処理能力を超えて蓄積すると、*arfA* non-stop mRNA にコードされる短い ArfA は、タンパク質分解を伴わないレスキュー経路の作用により、分解されることなく発現し、リボソームレスキュー活性を發揮する (C)。

きる。そこに精製した YhdL を加えると、確かにペプチジル tRNA は減少し、YhdL タンパク質による NTC 解消が *in vitro* でも示された。以上の解析から、YhdL タンパク質が NTC を解消することが明らかとなった (図 1B)。これを受け、*yhdL* を alternative ribosome rescue factor A という意味で *arfA* と改名することを提案し<sup>6)</sup>、広く認められている。これ以降、現在の名称である *arfA* を用いる。

### 3. 第三のリボソーム解放因子 ArfB

*arfA* *ssrA* 二重欠損株の示す合成致死のマルチコピーサプレッサーとして *yaeJ* が単離された<sup>7)</sup>。*yaeJ* の翻訳産物である YaeJ タンパク質は、ペプチジル tRNA 加水分解に必須とされるいわゆる Gly-Gly-Gln (GGQ) モチーフ<sup>8)</sup> を持つ翻訳終結因子のホモログである。YaeJ のヒトミトコンドリアにおけるホモログ ICT-1 タンパク質は NTC 解放活性を持つことが報告されていたが<sup>9)</sup>、YaeJ が大腸菌で同様の活性を持つことは知られていなかった。筆者らのグループが遺伝学的解析から YaeJ の NTC 解放活性を明らかにした (図 1C) のと同時に、群馬大学の行木研究室では構造生物学的解析から同様の結論に達し<sup>10)</sup>、それぞれ独立に報告している。我々は第三の NTC 解消因子であることから *yaeJ* を *arfB* (alternative ribosome rescue factor B) と改称することを提案している<sup>7)</sup>。なお、*arfA* *ssrA* 二重欠損株が合成致

死を示すということは、染色体上の *arfB* は単独では細胞内で生じる NTC を生存可能なレベルまで減ずることはできないことを示す。

### 4. ArfA の発現制御：trans-translation による発現抑制

ArfA の発現は、その機能と密接に関わる特徴的な制御を受けている (図 2)。完全長の ArfA の細胞内での発現は低レベルで、*arfA* mRNA もほとんど検出されないが、ArfA の C 末端を欠失させると ArfA の生産量が増加し、さらに mRNA も安定化する。その原因が *arfA* ORF 内部に存在するステムループ構造をとりうる逆向き反復配列であることがわかり、*arfA* の特徴的な発現制御機構が明らかとなった<sup>11, 12)</sup>。*arfA* mRNA 上のこの逆向き反復配列が形成するステムループ構造は RNase III によって認識、切断される。その結果、*arfA* mRNA は non-stop mRNA となる。前述のように non-stop mRNA の 3' 末端では NTC が形成され、通常は *trans-translation* によって解消される。同時に、作られていたポリペプチドは SsrA タグが付加されることで分解へと導かれる。*arfA* の場合も例外ではなく、「後半部分を失った ArfA」は分解される。このため完全長の ArfA の細胞内での発現は低レベルであった。RNase III の欠損や、ステムループ構造をとらせない (アミノ酸配列には影響しない) ように *arfA* に導入した塩基置換変異はいずれも

ArfA 産生量の増加につながった。この結果から ArfA の独特の発現制御機構を描くことができた。すなわち、*arfA* は通常は non-stop mRNA として発現し、*trans-translation* の標的となって分解され続けるため、細胞内には（あるとしても）ほとんど存在しない。しかし、何らかの要因で細胞内の non-stop mRNA が増加し、*trans-translation* システムの処理能力を超えたとき、分解を免れた（C 末端を欠く）ArfA が NTC 解消因子としてその機能を発揮する、という機構である。これは *trans-translation* のバックアップ機構としての ArfA の発現制御機構としては、大変異なっている。*trans-translation* は NTC を解消すると同時に、潜在的に有害である不完全なポリペプチドを分解へと導く。それに対して ArfA は NTC を解消するものの、ポリペプチドは分解され残る。細胞内システムの健全性を維持するためには、*trans-translation* の方が細胞にとって「安全・確実」であると思われる。ただし、NTC の蓄積が *trans-translation* の処理能力を超えた場合、（ポリペプチドは分解され残るもの）ArfA の助けも必要となる。まさにそのような状況で ArfA は分解を免れて発現し、NTC 解消因子としての機能を発揮するのであろう。RNase III により *arfA* mRNA は 55 番目のコドン付近で切断される。実際、*ssrA* 変異株では 56 番目以降のアミノ酸を欠失する ArfA が検出できるのだが、人為的に 56 番目以降のアミノ酸を欠失させた ArfA、すなわち上記の機構で発現する ArfA は NTC 解放活性を保持しており、このシナリオと矛盾しない。翻訳を停止させるストレス、たとえば抗生物質の添加により ArfA の発現の増加が観察されることもこれを支持する。

*trans-translation* が関わる ArfA の発現制御は大変厳密である。転写産物の解析から *arfA* の転写は逆向き反復配列のすぐ下流で終結することが示されたが、この転写終結点も *arfA* ORF の内部に存在し、たとえ RNase III による分解を免れても大部分の *arfA* mRNA は non-stop mRNA となる。さらに、仮に転写が *arfA* のゲノム上の ORF をカバーするまでに進み得たとしても、その（ゲノム上にコードされたとおりの）翻訳産物は C 末端付近の疎水性アミノ酸からなるクラスターがプロテアーゼの標的となることから大変不安定で、速やかに分解される。つまり、ArfA は転写終結、mRNA プロセッシング、タンパク質分解の三重の発現抑制機構により、事実上 *trans-translation* システムの処理能力を超えた non-stop mRNA が存在するときのみ発現するように制御されているのである。

さらに、この ArfA の発現制御機構は ArfB の存在意義についても説明できる。上述のように *arfA* *ssrA* 二重欠損が致死であるということ<sup>6)</sup> は、大腸菌ゲノム上の *arfB* は、少なくともこの状態においては、大腸菌の生育を維持できないことになる。つまり、ArfB は、ArfA、SsrA 双方が存在しないという（通常生育している大腸菌はめったに経験する

ことのない）特殊な状況で生育を支える因子であるとは考えにくい。むしろ、ArfA が必要とされる状況、すなわち、non-stop mRNA が危険なまでに蓄積した状況で、より早く ArfA を発現させ、NTC を解消させるという役割を担っているのではないだろうか。あまりにも厳密にその発現が制御されているため、ArfA は、必要とされる状況になってもすぐには発現できない恐れがあるが、ArfB はそのレスポンスを少しでも早めることができる。ArfA、ArfB は *trans-translation* と協働して、細胞の健全性を維持する NTC 解消システムを構成しているのであろう。

この ArfA の発現制御系は、もう一つ、大きな意味を持つ。すなわち、*arfA* は、non-stop mRNA として発現するようプログラムされ、しかもそれがその機能と密接に関わっているこれまで知られている唯一の遺伝子なのである。

## 5. ArfA によるリボソーム解放の分子機構

自ら GGQ モチーフを備える ArfB と異なり、実質 55 アミノ酸残基程度の ArfA が単独で NTC を解消できるとは考えにくい。むしろ RF などの他の因子と協働していると考えるのが自然であらう。実際、ArfA は単独では NTC を解消できず、*in vitro* 系での探索の結果、ArfA による NTC 解消には RF2 が必要であることが明らかとなった<sup>13,14)</sup>。おそらく、何らかの機構で NTC を認識した ArfA が RF2 をリクルートし、そのペプチジル tRNA 加水分解活性により NTC を解消させるのであろう。面白いことに終止コドンの認識を改変した RF2 でも結果は同じであった。一方で RF1 はこの機構には関与しなかった。RF1 と RF2 は認識配列の一部を共有し、同じようにペプチジル tRNA を加水分解するが、決して同一の因子ではない。ArfA と RF2 の関係は、RF1、RF2 の起源に関しても何らかのヒントを与えてくれるかもしれない。

ArfA による NTC の解消に RF2 が要求されることから、もう一つ導き出されるルールがある。それはリボソーム内のペプチジル tRNA を加水分解するには、RF、またはそのホモログである ArfB の GGQ モチーフが必須である、というルールである。

ArfA が NTC を認識し、おそらくは NTC に結合し、RF2 をリクルートすることで NTC を解消するという構図は描けた。しかし、どのように認識するのか、どのように結合するのか、どのようにリクルートするのか、その具体的な分子機構は依然として不明である。最近、弘前大学の姫野研究室が ArfA と RF2 の NTC 内における挙動の手がかりを見いだした<sup>15)</sup>。ヒドロキシラジカルプロービング法でリボソーム内の ArfA の位置を解析したところ、A サイトのデコーディングセンターと mRNA エントリーチャンネルのごく近傍に位置し、そこに RF2 が加わると結合様式が変化

することが示された。これは、ArfAがNTCを認識し、リボソームAサイトに結合し、次いでRF2をリクルートするというモデルを支持する結果である。ArfAとNTC中のリボソームとの結合をより詳細に解析することで、ArfAとRF2によるNTC解消の分子機構の詳細を明らかにするのが現在の課題である。

## 6. おわりに

複製、転写、翻訳、いずれの反応も、その開始段階が重要であることは、開始しなければ何も起こらないことから明らかである。しかし、これら情報高分子の合成反応は、その終結段階も重要であり、軽視してよいものではないということが、この研究を行ってあらためて認識された。

細胞内でのmRNAのターンオーバーは活発であり、これが遺伝子発現の迅速なオン・オフの調節を保証している。しかし、mRNAはその分解の過程で必ず終止コドンを持たない状態を経験する。すなわち、non-stop mRNAは細胞内で常に一定量存在しており、必然的にNTCも常に形成されている。細菌は大きなエネルギーを消費してでもこのNTCの蓄積を避け、翻訳系の健全さを保証している。意外と知られていないこの「終わりの保証」にもさまざまな面白さが潜んでいる。

## 謝辞

岡山大学で同じ研究グループとしてさまざまな面で支えて下さる杵掛和弘教授、富永晃准教授、これまで在籍した学生、研究員の皆さん、さらにこれまでお世話になった多

くの方々にあらためて御礼申し上げたい。

## 文 献

- 1) Keiler, K.C., Weller, P.R., & Sauer, R.T. (1996) *Science*, **271**, 990–993.
- 2) Abo, T. & Chadani, Y. (2014) *Front. Microbiol.*, **5**, 156.
- 3) Himeno, H., Nameki, N., Kurita, D., Muto, A., & Abo, T. (2015) *Biochimie*, **114**, 102–112.
- 4) 姫野倭太, 栗田大輔, 高田一馬, 今野貴之, 埴 (末次) 京子, 竹本千重, 川添将仁, 横山茂之, 行木信一, 河合剛太, 武藤昱 (2007) *生化学*, **79**, 213–221.
- 5) Karzai, A., Susskind, M., & Sauer, R. (1999) *EMBO J.*, **18**, 3793–3799.
- 6) Chadani, Y., Ono, K., Ozawa, S., Takahashi, Y., Takai, K., Nanamiya, H., Tozawa, Y., Kutsukake, K., & Abo, T. (2010) *Mol. Microbiol.*, **78**, 796–808.
- 7) Chadani, Y., Ono, K., Kutsukake, K., & Abo, T. (2011) *Mol. Microbiol.*, **80**, 772–785.
- 8) Frolova, L.Y., Tsivkovskii, R.Y., Sivolobova, G.F., Oparina, N.Y., Serpinsky, O.I., Blinov, V.M., Tatkov, S.I., & Kisselev, L.L. (1999) *RNA*, **5**, 1014–1020.
- 9) Richter, R., Rorbach, J., Pajak, A., Smith, P.M., Wessels, H.J., Huynen, M.A., Smeitink, J.A., Lightowlers, R.N., & Chrzanoska-Lightowlers, Z.M. (2010) *EMBO J.*, **29**, 1116–1125.
- 10) Handa, Y., Inaho, N., & Nameki, N. (2011) *Nucleic Acids Res.*, **39**, 1739–1748.
- 11) Chadani, Y., Matsumoto, E., Aso, H., Wada, T., Kutsukake, K., Sutou, S., & Abo, T. (2011) *Genes Genet. Syst.*, **86**, 151–163.
- 12) Garza-Sánchez, F., Schaub, R.E., Janssen, B.D., & Hayes, C.S. (2011) *Mol. Microbiol.*, **80**, 1204–1219.
- 13) Chadani, Y., Ito, K., Kutsukake, K., & Abo, T. (2012) *Mol. Microbiol.*, **86**, 37–50.
- 14) Shimizu, Y. (2012) *J. Mol. Biol.*, **423**, 624–631.
- 15) Kurita, D., Chadani, Y., Muto, A., Abo, T., & Himeno, H. (2014) *Nucleic Acids Res.*, **42**, 13339–13352.

## 著者寸描

### ●阿保 達彦 (あほ たつひこ)

岡山大学大学院自然科学研究科 (理学部生物学科) 准教授。博士 (農学)。

■略歴 1965年東京都に生る (親が転勤族だったため実質的には埼玉県出身)。89年東京大学農学部農芸化学科卒業。94年同大学院農学系研究科農芸化学専攻修了。98年名古屋大学大学院理学研究科助手。2002年より現職。

■研究テーマと抱負 健全な翻訳系の維持のしくみを明らかにする。

■ウェブサイト <http://www.biol.okayama-u.ac.jp>

■趣味 読書, 旅 (計画, 実行, 妄想)。