

翻訳停滞解消因子 ArfA を標的とする新規抗生物質の探索と作用機構の解明

栗田 大輔
弘前大学 農学生命科学部

研究の目的

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、細胞には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。細菌では、停滞したリボソームは tmRNA と呼ばれる RNA によって解消されるとされてきた。申請者は、生化学的な手法を用いて分子メカニズムの解明に取り組んできた。

最近になって tmRNA とは別の新たな翻訳停滞解消因子 ArfA が発見され、新たなリボソームレスキューシステムの存在が明らかになった。これまでの研究によって、リボソームレスキューシステムの分子メカニズムに関する理解は大きく進んだ一方、応用に関する研究は十分に追いついていない。翻訳停滞解消因子は一部の病原菌の生育にとって必須であることから、その阻害薬は耐性菌出現リスクの低い次世代の抗生物質として期待される。本研究は、ArfA 阻害剤の探索と作用メカニズムの解明を目的とする。

方法

1. 遺伝子欠損株の作製

大腸菌 MG1655 の遺伝子欠損株を作製するために P1 トランスダクションを行った。まず Keio コレクションの BW25113ΔsmpB::Kan^R 株に P1 ファージを感染させ、P1 ファージを回収した。この P1 ファージを大腸菌 MG1655 株に感染させた後にカナマイシン入りの LB プレート上でセクションを行い、目的の株を得た。

2. 表現型マイクロアレイ

LB プレート上にストリークした大腸菌 MG1655 株および MG1655ΔsmpB 株をコロニー接種液 GEN III IF-A (バイオログ社) に懸濁した。懸濁液は PM11 MicroPlateTM (バイオログ社) に 100 uL ずつ分注した。マイクロプレート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て 37°C の条件で培養を行い、経時的に吸光度を測定した。

3. ArfA タンパク質の精製

大腸菌 BL21(DE3)株にプラスミド pQE80L arfA を形質転換し、3000 mL の LB 培地で培養した。OD₆₀₀ が 0.5 に達したところで終濃度 0.5 mM の IPTG を添加して、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°C で凍結保存した。菌体を25 mLのA-buffer (50 mM Hepes-KOH pH 7.5, 100 mM KCl, 7 mM 2-mercaptoethanol) に懸濁した後に超音波により菌体を破碎した。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。細胞抽出液をイオン交換クロマトグラフィー (SP-sepharose) によって分画し、各フラクションに対して SDS-PAGE を行うことで ArfA 画分を決定した。さらにアフィニティクロマトグラフィー (Profinity IMAC) によって分画した。ArfA 画分を AmiconUltra15 による限外ろ過によって A-buffer (10% グリセロールを含む) 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°C で保存した。

4. バイオレイヤー干渉法による解離会合速度解析

3.3 μM の ArfA をセンサーチップ (Ni-NTA) 上に固定し、リボソームとの結合を干渉波の波長シフトを通してリアルタイムに計測した。リボソームは B-buffer (80 mM Tris-HCl pH 7.8, 7 mM MgCl_2 , 150 mM NH_4Cl and 2.5 mM DTT) で希釈したものをを用いている。得られたデータから結合速度定数 (k_{on}) および解離速度定数 (k_{off}) を求め、解離定数 (K_d) を決定した。

結果

申請者の先行研究によって、ArfA はリボソームの A-site に結合することを明らかにした (文献 1, 2)。リボソームの A-site は多数の翻訳因子や tRNA が結合する重要な部位であり、多くの抗生物質の標的となっている。通常の翻訳を阻害する抗生物質は数多く知られているが、翻訳停滞解消システムを阻害する抗生物質は知られていない。本研究では、ArfA を特異的に阻害する薬剤候補をスクリーニングするために、遺伝子欠損株を用いた表現型解析を行った。ここでは BIOLOG 社の PM11C 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、それぞれの条件で各化合物が大腸菌の増殖に与える影響を検証した。この方法を野生株および遺伝子欠損株に対して行い、増殖曲線から倍加時間を求めた (表 1)。arfA と smpB 遺伝子は合成致死の関係にあること (2)、通常 arfA は smpB の働きによって発現が抑制されていることから (3)、ArfA を阻害する薬剤を見つけるために smpB 欠損株を使用した。その結果、多くの化合物では野生株と smpB 欠損株で倍加時間に大きな差はなかったものの、エリスロマイシンに対しては、野生株より smpB 欠損株の方が 3 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解析を行うことで ArfA 阻害剤の候補を見つけることができると期待される。

MG1655	240.6	233.1	239.7	278.4	276.7	391	1000	1000	249.2	282.5	367.5	1000	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	
	218.5	213.3	228.3	257.2	235.8	248.8	369.4	1000	258.5	278.8	322.9	1000	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	
	187.3	190	192.2	361.1	223.6	1000	1000	1000	216.5	249.7	1000	1000	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	
	210.6	220.6	210.5	279.3	218.1	327.9	1000	1000	202.2	213.9	244.8	1000	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	
	226.1	218.1	204.2	205.5	205.5	208.4	1000	1000	197.9	240.5	1000	1000	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	
	219.1	323.9	1000	1000	160.9	163.7	177.8	300.9	170.1	185.6	181.6	1000	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	
	179.1	194.1	180.4	192.1	180.4	165	178.4	185.2	180.9	237.5	588.1	1000	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	
	159.2	158.1	215.2	1000	166.5	167.3	171.2	186.3	131.5	137.4	216.3	1000	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	
														I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10	I11	I12
	DsmB	162.8	154	149.3	171.6	133.8	170.5	389.4	955.8	143.4	148.7	171	1000	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12
151.3		144	142.4	148.9	143	142.1	156.8	365.2	145.3	140.3	315.9	1000	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	
126.5		125.6	213.9	416.7	117.3	1000	1000	1000	107.3	122.3	1000	1000	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	
142.5		136.4	151.2	257.6	125.2	153.1	355	1000	133.4	135.6	143.6	1000	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	
147.1		137.4	143.9	150.6	135	136.2	1000	1000	157.7	166.3	425.2	1000	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	N12	
196.4		251.4	1000	1000	131.5	143.2	196.1	1000	146	146.5	148.3	157.5	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	
173.4		160.1	150.4	213.5	141	146.4	141.3	199.1	229.4	341.8	574.7	1000	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	
171.4		172.9	187.8	843.4	163.9	174.1	157.1	163.6	160.9	177.3	256.1	1000	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11	Q12	
														R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12
														S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12

表1 野生株および smpB 欠損株の倍加時間（左）と MicroPlate 上の化合物（右）

得られた薬剤候補が、どのようにして ArfA の活性を阻害するのかを *in vitro* で明らかにするために、ArfA のリボソームに対する結合活性を評価するための実験系の条件検討を行った。条件検討の結果、薬剤非存在下で ArfA は 70S リボソームに対して 1.2 ± 0.5 nM の Kd で結合することを明らかにした（図 1）。今後、得られた薬剤が ArfA のリボソームへの結合を明らかにしていく。

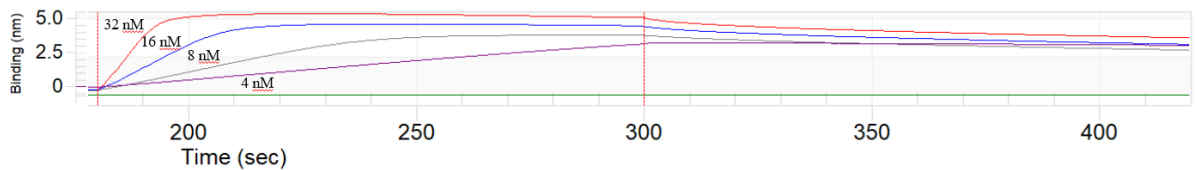


図1 バイオレイヤー干渉法による ArfA とリボソームの相互作用解析

結論

以上の結果から、表現型マイクロアレイ法およびバイオレイヤー干渉法の実験系の確立に成功した。これらの系を様々な化合物に対して行うことで、ArfA 阻害剤の発見および阻害メカニズムの解明につながると期待される。

1. Ma, C*, Kurita, D*, Li, N., Chen, Y., Himeno, H., Gao, N. (2017) Mechanistic insights into the alternative translation termination by ArfA and RF2. *Nature*. **541**: 550-553. (*co-first author)
2. Kurita, D., Chadani, Y., Muto, A., Abo, T., Himeno, H. (2014) ArfA recognizes the lack of mRNA in the mRNA channel after RF2 binding for ribosome rescue. *Nucleic Acids Res*. **42**: 13339-13352.
3. Chadani, Y., Ono, K., Ozawa, S., Takahashi, Y., Takai, K., Nanamiya, H., Tozawa, Y., Kutsukake, K., Abo, T. (2010) Ribosome rescue by Escherichia coli ArfA (YhdL) in the absence of *trans*-translation system. *Mol Microbiol*. **78**: 796-808.
4. Chadani, Y., Matsumoto, E., Aso, H., Wada, T., Kutsukake, K., Sutou, S., Abo, T. (2011) *trans*-translation-mediated tight regulation of the expression of the alternative ribosome-rescue factor ArfA in *Escherichia coli*. *Genes Genet Syst*. **86**: 151-163.