

翻訳伸長因子の改変によるタンパク質合成能力の限界拡張

茶谷 悠平

岡山大学 学術研究院 環境生命自然科学学域 (理)

研究の目的

細胞は千差万別の機能、配列を持つタンパク質によって成り立っている。タンパク質の配列情報は DNA にコードされるため、1. 有用活性を持つタンパク質遺伝子の同定、2. 遺伝子組換え生物の作出、3. 大量生産、といった流れで、生物資源の応用が進められてきた。この流れは、2000 年代に登場した次世代シーケンサーによる大規模なゲノム情報の取得と蓄積、近年の機械学習によるタンパク質構造の高精度予測の実現により、さらに加速していくと見込まれる。

このように、有用タンパク質の発見、応用が加速する一方で、そのタンパク質が組み換え生物の細胞内で合成可能であるかは、現時点でほとんど顧みられていない。しかし近年の研究から、タンパク質合成装置リボソームには、さまざまな「弱点」が存在し、ありとあらゆるタンパク質を合成できるわけではないことが報告され始めている。

合成途上のタンパク質は、リボソームに開いたトンネル構造を通過しつつ合成されるが、その際トンネルとの過剰な相互作用、あるいは反発によって、内部で異常な「歪み」を生じさせるアミノ酸配列が存在していたことが明らかになってきた^{1,2)}。このような合成困難な難翻訳アミノ酸配列として、正負の電荷を持つアミノ酸が連続したモチーフ、プロリンの連続配列などが挙げられる。こうした合成上のリスクに対して生物は、合成が滞ったリボソームに作用して難翻訳配列の合成を促進するタンパク質：翻訳促進因子を獲得、利用していたことも明らかとなりつつある。本研究では、正電荷あるいは負電荷アミノ酸に富んだ配列の合成を促進する、翻訳促進因子 YbiT の機能について解析し、天然型より優れた翻訳促進機能を有する因子の創出を最終目標とした研究を行った。

方法

YbiT は ABCF (ATP-Binding Cassette Subfamily-F) タンパク質に分類される翻訳促進因子で、大腸菌には YbiT を含めて四種類の ABCF タンパク質が見出される。これらの立体構造は極めて近似しているにも関わらず、それぞれが異なる難翻訳アミノ酸配列に特異的に作用する(図 1)³⁾。

難翻訳配列が引き起こすリボソームの機能異常は、リボソーム内部のペプチド転移活性中心(Peptidyl-transfer center)周辺の構造異常に起因する。これに対して ABCF タンパク質は、アルファヘリックスから構成されるリンカードメインをリボソーム

内部に挿入することで、異常を解消すると考えられている⁴⁾。以上の先行知見から、YbiT もリンカードメインをリボソーム内部の異常発生箇所に作用させ、翻訳異常を解消、あるいは予防していると予想されるが、その詳細は明らかとなっていない。そこで本研究では、このリンカードメインに網羅的変異解析(アラニンスキャニング)を行い、YbiT の機能に重要なアミノ酸残基の特定と、翻訳促進活性が向上する変異体の取得を試みた。

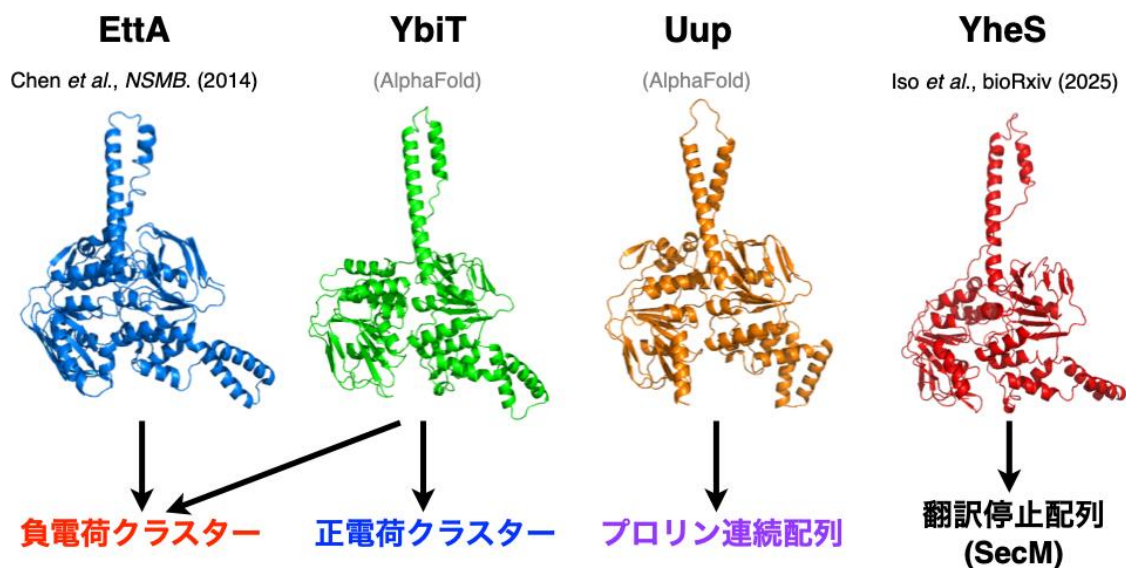


図1. 大腸菌に見られるABCFタンパク質4種は、それぞれ異なる難翻訳配列に作用する

結果

YbiT のリンカードメイン 85 残基のアラニン置換変異体を作成し、図 2 に示すような難翻訳アミノ酸配列をコードするレポーター遺伝子を利用し、それぞれの活性を評価した。今回、三種類の難翻訳配列それぞれに対しての YbiT 変異体それぞれの翻訳促進活性を評価し、比較を行った。

まず、ORF 内部に位置する負電荷、あるいは正電荷が連続する 20D, 20K 配列への機能性を比較した。結果全体では $\rho = 0.595$, $p\text{-value} = 1.82e^{-9}$ と強い相関関係が見られた。つまり、正電荷、

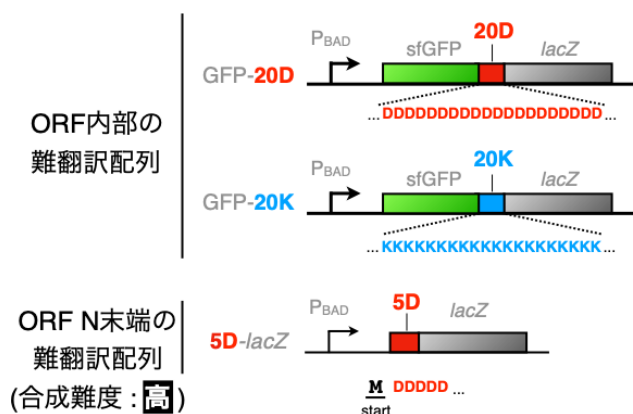


図2. YbiTの活性評価に用いた難翻訳配列を含むレポーター

負電荷アミノ酸の異なる難翻訳配列に対して、YbiT の同じアミノ酸残基が作用していることが示唆された。

続いて、翻訳開始直後に翻訳されるために異常発生リスクが増加する負電荷アミノ酸クラスター(5D)⁵⁾と、そのリスクが見られない 20D 配列との比較を行った。こちら、 $\rho = 0.648$, $p\text{-value} = 1.85\text{e}^{-10}$ と高い相関を示した。このことは、YbiT は負電荷アミノ酸クラスターの合成を、リボソームトンネル内の新生ペプチドの状況を見分けることなく、同様のメカニズムで促進することを示唆している。

結論

本研究から、YbiT のリンカードメインについて機能に重要なアミノ酸残基の概観が明らかとなった。注目すべき点として、変異によって活性が大きく低下する変異体はリンカードメインの先端部分に集中しており、リボソーム内部への作用が機能に重要であることが示された。また、野生型よりも高い翻訳促進活性を示す変異体も複数同定された。ただし、これらの変異体は特定の難翻訳配列には効果的である一方、その他の配列にはさほどの活性上昇は見られないなど、その原理についてはさらなる解析が必要となっている。また今回はアラニン残基への変異のみ検討を行ったが、より活性が向上した YbiT の単離を目指していくには、より大規模な変異解析を行っていく必要がある。

最後に、本研究を支援いただいた公益財団法人 野田産業科学研究所に、深く感謝いたします。

文献

- 1) Chiba, S., Fujiwara, K., Chadani, Y. & Taguchi, H. Nascent chain-mediated translation regulation in bacteria: translation arrest and intrinsic ribosome destabilization. *J. Biochem.* **173**, 227–236 (2023).
- 2) Ando, Y. *et al.* A mini-hairpin shaped nascent peptide blocks translation termination by a distinct mechanism. *Nat. Commun.* **16**, 2323 (2025).
- 3) Chadani, Y. *et al.* The ABCF proteins in Escherichia coli individually cope with ‘hard-to-translate’ nascent peptide sequences. *Nucleic Acids Res.* **52**, 5825–5840 (2024).
- 4) Chen, B. *et al.* EttA regulates translation by binding the ribosomal E site and restricting ribosome-tRNA dynamics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 1–11 (2014).
- 5) Chadani, Y. *et al.* Nascent polypeptide within the exit tunnel stabilizes the ribosome to counteract risky translation. *EMBO J.* **40**, e108299 (2021).