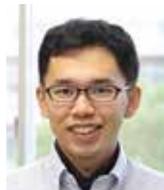


合成装置と対話する発現産物 新生ペプチド鎖による翻訳制御機構



岡山大学 学術研究院 環境生命自然科学学域准教授
茶谷 悠平

1. はじめに

DNA に書き込まれた遺伝情報は、まずメッセンジャー RNA (mRNA) に写し取られたあと、細胞内装置リボソームによってアミノ酸配列へと翻訳され、タンパク質が作られる。このとき、タンパク質はひも状のポリペプチド鎖として、リボソームに開いた「トンネル」を通りながら伸長していく。現行の教科書では、ポリペプチド鎖はアミノ酸がつながった直後に、細胞内に露出するように説明されることが多い。しかし実際には、30～40 個くらいのアミノ酸がつながってからようやく、ペプチド鎖の先端がリボソームの外に顔を出す (図 1)。

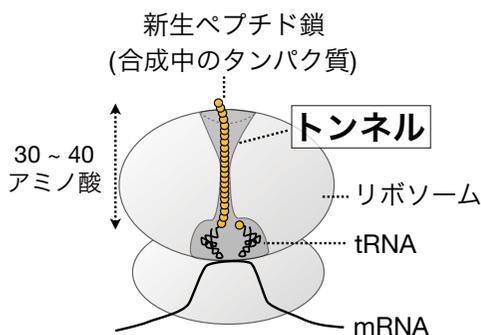


図 1 新生ペプチド鎖を通るリボソームのトンネル

リボソームのトンネルは当初、テフロンのように滑らかで、新規合成されるペプチド鎖とはほとんど相互作用しないものと考えられていた。しかし、2000 年代のはじめに、複数の研究チームがトンネルと強く相互作用し、タンパク質合成を停止 (アレスト) させる「翻訳アレストペプチド」の存在を報告した。

この発見を一つの契機として、ただの中間体とみなされていた新生ペプチド鎖が、合成の途中でリボソームに働きかけ、その進め方を調節、あるいは書き換えていることがわかってきた。本稿では、こうした翻訳

を制御する新生ペプチド鎖の機能について、翻訳アレストを例に、その分子メカニズムの一端を紹介する。

2. リボソームトンネル

リボソームは、mRNA 配列上の開始コドンを目印としてタンパク質の合成を開始し、その後の mRNA 配列を 3 塩基ずつ読み取りながら、順にアミノ酸へと翻訳していく。この核酸配列をアミノ酸配列へ変換する「翻訳」の過程で中心的な役割を果たすのが、アミノ酸をリボソームに運ぶトランスファー RNA (tRNA) である。アミノ酸が結合したアミノアシル tRNA は、mRNA のコドン (3 塩基配列) との対応が確認できた場合のみ、リボソームの P サイトに存在する tRNA から新生ペプチド鎖を受け取る。その後、この tRNA は新生ペプチド鎖とともに P サイトへ移動する。一方、空になった A サイトには次のコドンに対応したアミノアシル tRNA が結合し、再びペプチド鎖の受け渡しが行われる。この反応が繰り返されることで、タンパク質合成は進んでいく。このとき、伸びていく新生ペプチド鎖は、リボソームを貫通する「穴」、すなわち本稿で注目する「リボソームトンネル」に挿入されていく。

3. 翻訳アレストペプチド

リボソームのトンネル構造は、その大部分がリボソーム RNA (rRNA) によって構成されるが、一部にはタンパク質が埋め込まれていて、狭くなった領域 (狭窄部) を形成している。このように、トンネル内は電荷や立体構造の面で、かなり特殊な環境となっている。そのため、この空間と相性が悪く、内部で「詰まり」を起こし、翻訳反応を一時停止させるアミノ酸配列が存在する。こうした働きをもつ配列は「翻訳アレストペプチド」と呼ばれ、その先駆けとして発見されたのが、大腸菌の SecM および TnaC である。

secM や *tnaC* 遺伝子は、通常の遺伝子と異なり、合成されたポリペプチド自体には明確な機能が備わっていない。しかし、これらは翻訳の途中でリボソムの働きを制御するという「翻訳制御」機能を通じて、それぞれの生理機能を発揮する。ここでは TnaC を例に、アレストペプチドによる遺伝子発現制御機構を紹介する。

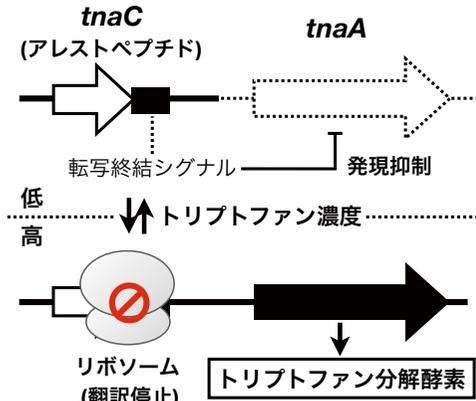


図2 翻訳停止による *tnaA* 遺伝子の発現制御

tnaC は、トリプトファン分解酵素をコードする *tnaA* mRNA の 5' 非翻訳領域に存在する上流 ORF (open reading frame: 翻訳される領域) であり、全長 24 アミノ酸の短いペプチドをコードしている (図2)。*tnaC* が翻訳され、リボソームが終止コドンに到達したとき、遊離トリプトファンの濃度が高い条件では、終結反応が正常に進まず、リボソームがその場で停止する。

この停止したリボソームは、mRNA 上に存在する転写終結シグナルとなる配列を物理的に覆い隠すことで、下流にある *tnaA* 遺伝子の発現を促進するように働く。このように、トリプトファンが多く存在する環境でのみ、トリプトファン分解酵素を発現させる仕組みは、必要ときに必要なタンパク質を合成する、という点で非常に理にかなっている。

4. TnaC 新生ペプチドによる翻訳停止の分子機構

では、TnaC の新生ペプチド鎖はどのような分子メカニズムで、トリプトファンに依存して翻訳終結を妨げているのだろうか。詳細を説明する前にまず、通常の翻訳終結反応がどのように起こるかを確認したい。リボソームが mRNA の翻訳を進め、tRNA では読み取れない「終止コドン」に到達すると、翻訳は終了へと向かう (図3)。終結反応ではまず、翻訳終結因子がリボソームの A サイトに結合し、終止コドンを確認

結合する。この相互作用をトリガーとして終結因子の立体構造が変化し、P サイトにある tRNA と新生ペプチド鎖をつなぐエステル結合の近くに、終結因子が持つ GGQ モチーフ (加水分解反応に関わる部位) が接近する。その結果、加水分解反応が起こってペプチド鎖は tRNA から切り離され、翻訳は終了する。

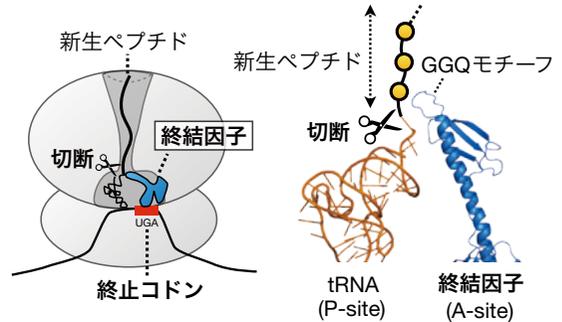


図3 翻訳終結因子による新生ペプチド鎖の切り離し

では改めて、TnaC の新生ペプチド鎖が如何にして終結反応を妨げるかを説明したい。近年、クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) による解析技術が進展し、生命現象の分子レベルでの理解を大きく推し進めている。この技術により、TnaC の翻訳によって停止したリボソームの立体構造も解明されており、停止のメカニズムは以下のように要約される (図4)。

1. TnaC の新生ペプチド鎖の一部は、リボソームのトンネル内で α ヘリックスという二次構造を形成している。
2. この構造は、トンネル内に入り込んだ遊離トリプトファンやトンネルの狭くなった部分と強い相互作用を形成し、「詰まり」を起こす。
3. N 末端側の動きが制限されることで、C 末端側のペプチド部分が本来とは異なる方向に曲がる。
4. 曲がった C 末端近くのアミノ酸の側鎖がトンネルと衝突し、その構造変化が終結因子の GGQ モチーフが正しく配置するのを妨げ、終結反応が進まなくなる。

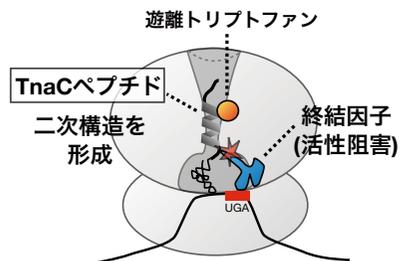


図4 TnaC ペプチドの合成で停止したリボソーム

このように、新生ペプチド鎖が形成する構造が次々と連鎖を起こし、最終的にはリボソーム本来の機能が発揮できなくなる「ドミノ倒し」が生じるのである。

TnaCのようなアレストペプチドによる翻訳制御は、大腸菌などの原核生物だけでなく、ヒトや植物、出芽酵母などの真核生物、さらにはウイルスでも見つかっている。ドミノ倒しの図式はそれぞれのケースで固有だが、いずれの生物にもリボソーム機能を制御する新生ペプチド鎖が存在するという点は、注目に値する。

5. 翻訳を制御する、新たな新生ペプチド鎖の探索

では、翻訳を制御する新生ペプチド鎖は、どのような場面で利用されているのだろうか。これまでに発見された TnaC などのアレストペプチドは、制御対象となる遺伝子の 5' 非翻訳領域内に位置する、上流 ORF にコードされる場合が多い。つまり、自身の翻訳によって別の遺伝子の発現を調節する新生ペプチド鎖の多くは、上流 ORF にコードされると推察できる。

しかし、このような上流 ORF は *tnaC* のように非常に短く、通常の遺伝子アノテーション（データベースへの登録）では見落とされている可能性がある。そこで著者らは、ゲノム全体の mRNA に対して、実際にリボソームが翻訳している領域を網羅的に調べる「リボソームプロファイリング法」を用い、大腸菌のゲノム配列から未発見の上流 ORF を探索した。その結果、これまで同定されていなかった上流 ORF 候補を約 38 種類発見することに成功した。

では次に、これらの中からアレストペプチドをコードする ORF を見分けたいが、どのようにすれば良いだろうか。翻訳アレストペプチドは、リボソームの進行を強固に阻害するが、それを細胞内で無制限に発現させると、リボソームが無意味に、かつ過剰に停止してしまい、通常のタンパク質合成が大きく妨げられる。このような状態は、細胞にとって「翻訳ストレス」となり、増殖に多大な悪影響を及ぼす。したがって、そうしたストレス応答を指標にすれば、アレストペプチド候補を絞り込むことが可能だと考えられた。

このアプローチにより、著者らは *pepNL* および *nanCL* という 2 種類の新たな翻訳アレストペプチドを特定するに至った。これらは翻訳停止を引き起こすことで、それぞれの mRNA 下流側に位置する制御対象遺伝子の発現を左右する、新生ペプチド鎖配列であることが明らかとなった。

6. PepNL による翻訳停止のメカニズム

ここでは、発見した新規アレストペプチドのうち、PepNL がどのようにして翻訳停止を引き起こすのか、その解析結果を紹介する。PepNL は 14 アミノ酸からなる上流 ORF にコードされており、翻訳の停止はその終止コドンで発生する。この停止によって、直下に位置するペプチド分解酵素 PepN の発現が抑えられる仕組みとなっている。TnaC による翻訳停止には、遊離トリプトファンのような「停止誘導因子」を必要とするが、PepNL はそのような因子を必要とせず、自身のアミノ酸配列だけで翻訳を停止させる。

著者らは、この PepNL による翻訳停止の詳細な分子メカニズムを明らかにするため、Cryo-EM による構造解析を行った（東京大学・瀧木理研究室との共同研究）。その結果、リボソームトンネル内の新生ペプチド鎖が、通常とは大きく異なる折れ曲がった形、いわば「ヘアピン」構造を形成していることが判明した（図 5）。通常、新生ペプチド鎖はトンネル内をまっすぐ伸びながら出口へ向かう。しかし PepNL の場合、N 末端側が折れ曲がってトンネル入り口側に戻るような形となり、その場で詰まっていた。

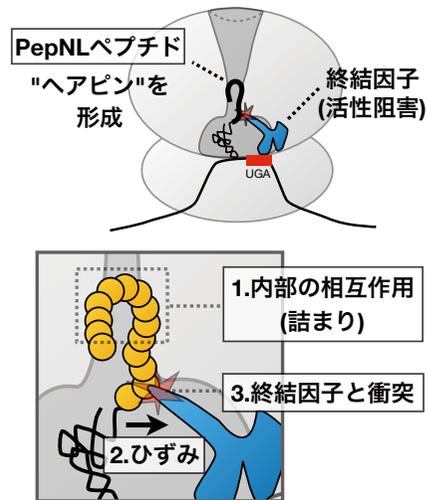


図 5 PepNL 新生ペプチドが引き起こすトンネル内での「ドミノ倒し」

さらに、この N 末端側の詰まりが、C 末端側の構造にも影響を及ぼしていることが分かった。特に、C 末端から 2 番目に位置するイソロイシン残基が、通常とは異なる方向に突き出しており、本来であれば翻訳終結因子による加水分解に重要な GGQ モチーフが配置するポケットに入り込んでいた。この結果、終結因子

はリボソームに正しく結合できず、終結反応が阻害されていたのである。

このように、PepNLによる翻訳停止のメカニズムには、TnaCといくつかの共通点が見られた。

1. トンネル内での新生ペプチド鎖の構造形成が発端

TnaCでは、遊離トリプトファンが構造形成と翻訳アレスト発生に不可欠だが、PepNLは自身の配列だけでこれを実現している。しかしどちらも、トンネル内での異常な構造形成が、後の翻訳阻害のきっかけとなっている。

2. C末端側の構造変化が終結反応を阻害

N末端側がトンネル内で詰まることで、C末端部分に構造的な「ひずみ」が生じ、その結果、終結因子が本来あるべき場所に結合できなくなる。特に、TnaC、PepNLともにC末端から2番目のアミノ酸残基が、終結因子の働きを直接、あるいは間接的に妨げていた。

PepNLとTnaCは、アミノ酸配列は全く異なるにもかかわらず、構造レベルで見ると共通する「作動原理」を持っていることは興味深い(図6)。以前から、終止コドン直前のアミノ酸配列の並びが、終結反応の効率に影響を与えることは示唆されていたが、その分子基盤は十分に解明されていなかった。今後、PepNLやTnaCのような終結反応を阻害するアレストペプチドの構造情報がさらに蓄積されることで、終結反応に関わる「隠れたルール」がより明確になると期待される。

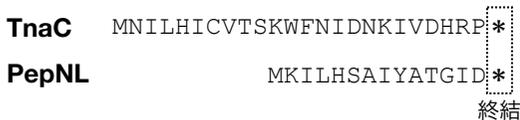


図6 アレストペプチドのアミノ酸配列

7. 新生ペプチド鎖が実現する、さまざまな翻訳制御

新生ペプチド鎖の役割は、アレストペプチドのように翻訳反応を停止させるだけにとどまらない。近年の研究から、新生ペプチド鎖が翻訳の原則すら書き換えて、より多様な遺伝子発現を実現していることも示れつつある(図7)。

通常、翻訳はmRNAの開始コドンから終止コドンまでを3つの塩基ごとに読み取り、それに対応したアミノ酸を順番につなげていく過程である。この基本ルールに沿った場合のみ、正確なタンパク質が作られるが、このルールを「意図的に」破り、遺伝子制御の一部とする事例が明らかにされている。

その一例が、SARS-CoV-2(新型コロナウイルス)の遺伝子発現で見られる「フレームシフト」である。このウイルスの遺伝子発現では、ORF1aという領域の翻訳中にリボソームの読み取り枠が1塩基ずれて、続くORF1b領域へと翻訳をつなげていく。このフレームシフト現象は、リボソーム外のmRNAが形成する構造、そして内部の新生ペプチド鎖が連携してリボソームの動きを阻害することで実現される。ウイルスが限られた遺伝情報を最大限活用するために、翻訳制御を柔軟に活用している例である。

同様の現象として、終止コドンや開始コドンを介さず翻訳が一時中断され、再び同じ場所から再開される「リボソームスキッピング(自己切断)」という現象もある。これはウイルスの遺伝子において、複数のタンパク質を一つのmRNAから作るための手段として用いられている。また、mRNAの一部を読み飛ばす「リボソームホッピング」や、終止コドン以外で翻訳を途中終了させる現象も報告されており、いずれも教科書的な「原則」からは明確に逸脱している。

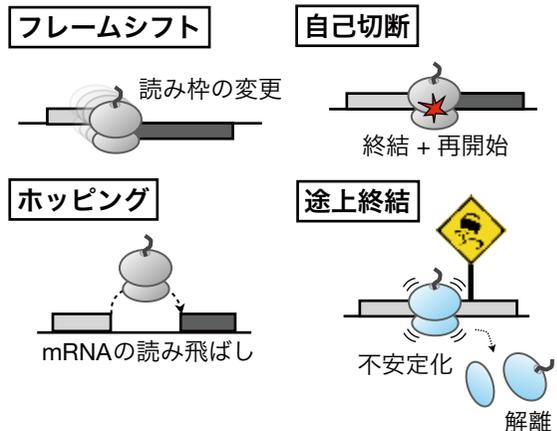


図7 新生ペプチド鎖が引き起こす「型破り」な翻訳

8. おわりに

このように、新生ペプチド鎖はリボソームとさまざまな「対話」し、自身の合成過程を能動的にコントロールするプレイヤーとして振る舞う場合がある。つまり、新生ペプチド鎖は、教科書的な原則を書き換える、新たな遺伝情報物質である可能性が浮かび上がりつつあるのである。今後、これまで見過ごされがちだった翻訳途上のダイナミクスが解明されていくことで、疾患治療、物質生産などに新たな展開がもたらされることを期待したい。