세균의 번역 스트레스 반응

서울대학교 생명과학부 노정혜 · 유지선

1. 개요

세균에서 유래하는 의약품의 대부분은 세균의 2차 대사 산물 (secondary metabolite)로서, 이들은 대부분 영양분이 고갈되는 정체성장기에 생성된다. 또한, 이들 이차대사 산물 중 항생능력이 있는 antimicrobial compound들의 상당수는 그 항생기작이 리보좀에 의한 번역을 저해하는 역할을 한다. 최근 들어 세균의 번역을 조절하는 여러 인자들이 발견되었고, 특히 정체성장기나 빈 영양 상태에서 리보좀의 활성이 어떻게 조절되는 지에 대한 새로운 연구 결과들이 축적되고 있다. 본 리뷰에서는 다양한 스트레스에 대응하는 인자들 중에서도 특히 세균의 번역과정에서 리보좀과 상호작용하는 단백질 인자에 대해 초점을 맞추어 연구동향을 보고고자 한다.

리보좀과 결합하여 번역과정을 조절하는 인자들로는, 영양분이 부족한 상황에서 리보좀과 상호작용하여 ppGpp를 합성하여 stringent 반응을 매개하는 RelA를 비롯하여 생장에 불리한 상황에서 리보좀에 결합하여 번역을 멈추거나 (RelE, pY, RMF, HPF, EttA) 재프로그램하는 (MazF, EF4, BipA) 다양한 인자들이 있다. 또한 절단된 mRNA (tmRNA, ArfA, ArfB)나 선호되지 않는 단백질 서열의 번역 과정 (EF-P), 혹은 항생제의 방해 (TetM, FusB)에 의해 일어나는 리보좀 정체 현상을 해결하는데 필요한 인자들도 있다 (표 1 참조).

세균이 번역 스트레스에 어떻게 대응하는지 이해하는 것은 번역 조절에 대한 기반 지식을 제공한다. 뿐만 아니라 알려진 항생제들 중 다수가 세균의 번역 과정을 저해함으로써 작용하기 때문에, 세균의 번역 스트레스 전반에 대한 이해는 새로운 항생 물질의 개발에도 중요한 의미를 지닌다. 몇 가지 대표적인 스트레스 조건과 관여 인자들에 대한 내용을 소개한다.

Factor	Stress/ Condition	Function
ArfA (YhdL)	mRNA damage	stop codon이 없는 mRNA에 stuck된 ribosome release (RF2 recruit)
ArfB (YaeJ)	mRNA damage	ArfA와 유사.
BipA (TypA)	항생펩타이드, 저온, 산성, 산화적 스트레스, 등	미상, 아마도 specific mRNA의 번역 조절
EF4 (LepA)	tellurite(산화제), penicillin G등	non-productive translocation으로 stall된 리보좀에 결합, 번역재개
EF-P	리보좀 stalling	반복된 proline codon에서 멈춘 리보좀에 결합, 번역재개
EttA (YjjK)	ADP/ATP비율	ADP농도가 높을 때 리보좀 E-site에 결합, 번역억제
FusB/FisC	항생제 스트레스	fusidic acid에 의해 trap된 리보좀 EF-G에 결합, EF-G release, 번역재개. fusidic acid 내성부여
HPF (YrfH)	정체성장	Hybernation promotion factor. 90S disome에 결합하여 번역활성이 없는 100S particle형성
Hsp15	고온	50S 리보좀 subunit,에 결합, peptidyl tRNA안정화
MazF toxin	정체성장	mRNA와 rRNA의 ACA 서열 절단, SD와 anti-SD sequence를 제거, 번역을 reprogram
Obg	정체성장	리보좀 biogenesis의 마지막단계에 작용. SpoT활성의 억제조절자
pY (YfiA, RaiA)	정체성장	정체성장기나 저온쇼크시 70S 리보좀에 결합, 번역억제
RelA	영양분결핍	A site가 비어있는 리보좀에 결합, ppGpp생성
RelE toxin	정체성장	리보좀 A site에 결합, mRNA절단
RMF	정체성장	ribosome modulation factor. 90S disome형성을 통해 리보좀 불활성화
RsfS (YbeB)	정체성장/영양결핍	ribosome silencing factor S. 50S의 L14에 결합. subunit합체 방해
SmpB	mRNA damage	tmRNA에 결합. truncated mRNA에 stall된 ribosome구출. trans-translation
SRA (S22)	정체성장	stationary phase ribosome-associated protein. 리보좀 불활성화
TetM, TetO	항생제 스트레스	리보좀에 결합된 tetracycline을 떼어내어, tetracycline에 대한 내성부여.
YqjD	정체성장	내막단백질. 70S와 100S ribosome에 결합. 정체성장기 리보좀을 내막에 위치시킴

표1. 스트레스 조건에서 리보좀에 결합하는 인자들

2. 양분 고갈에 대한 리보좀의 반응

Stringent response는 영양분이 고갈된 상황 중에서도 특히 아미노산이 부족한 상황에서 일어나는 유전자 발현 조절 반응이다. 아미노산이 부족하게 되면 세포 내에 uncharged 혹은 deacetylated tRNA이 늘어난다. 증가한 uncharged/deacetylated tRNA가 리보좀 A-site에 결합하면 리보좀은 더 이

상 번역을 진행하지 못하고 정체되는데, RelA는 이렇게 멈춰있는 리보좀을 인지하고 (p)ppGpp를 합성한다. (p)ppGpp를 합성한 후 RelA는 리보좀으로부터 떨어져 나와서 또 다른 정체된 리보좀과 결합하여 (p)ppGpp를 합성하기를 반복한다 (그림 1).

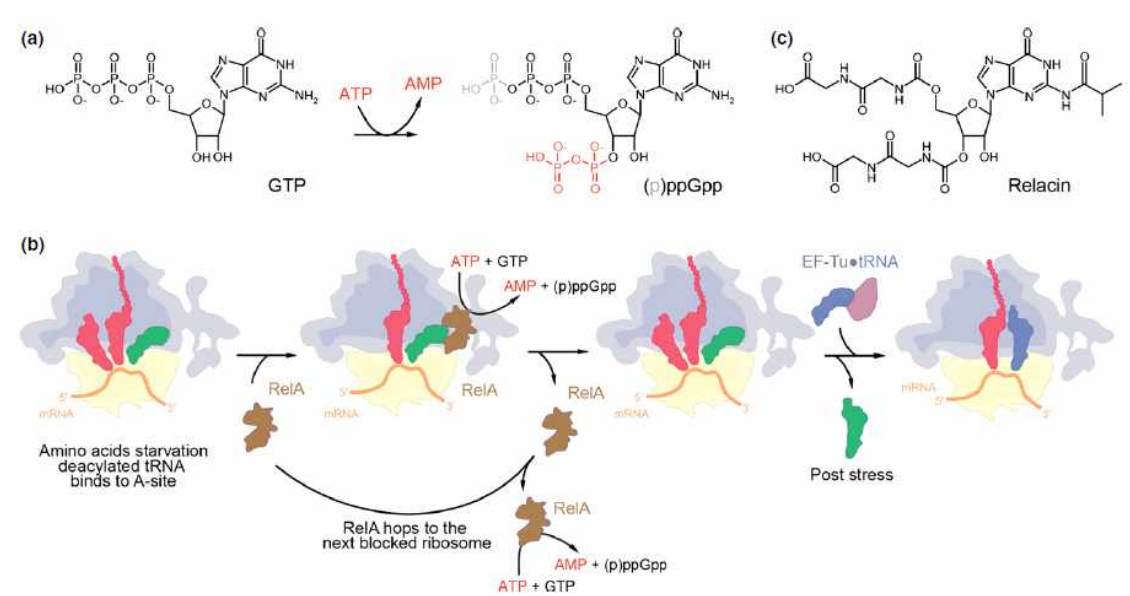

그림 1. 리보좀과 RelA에 의한 ppGpp 합성 (Starosa 등, 2014)

3. 펩타이드로부터 유발되는 번역 멈춤 현상에 대한 반응

번역 과정의 폴리펩타이드 합성 중에는 모든 아미노산이 동일 속도로 들어가지 않는다. 그 중에서도 특히 프롤린은 imino 기를 가지고 있기 때문에 amino 기를 가지는 다른 아미노산들에 비해 A-site 수용자로써 기능이 약하고, 실제로 다양한 프롤린 stretch에서 리보좀의 진행이 멈추는 현상 (ribosome stalling)이 일어나는 것이 밝혀졌다. 이러한 polyproline에서의 멈춤을 극복하기 위해 세균은 특화된 번역 신장인자인 EF-P를 가지고 있다. EF-P는 연속된 proline에서 멈춰있는 리보좀을 인지하고 결합하여 펩타이드 형성을 촉진함으로써 멈춘 리보좀을 계속 번역 진행하도록 한다 (그림 2).

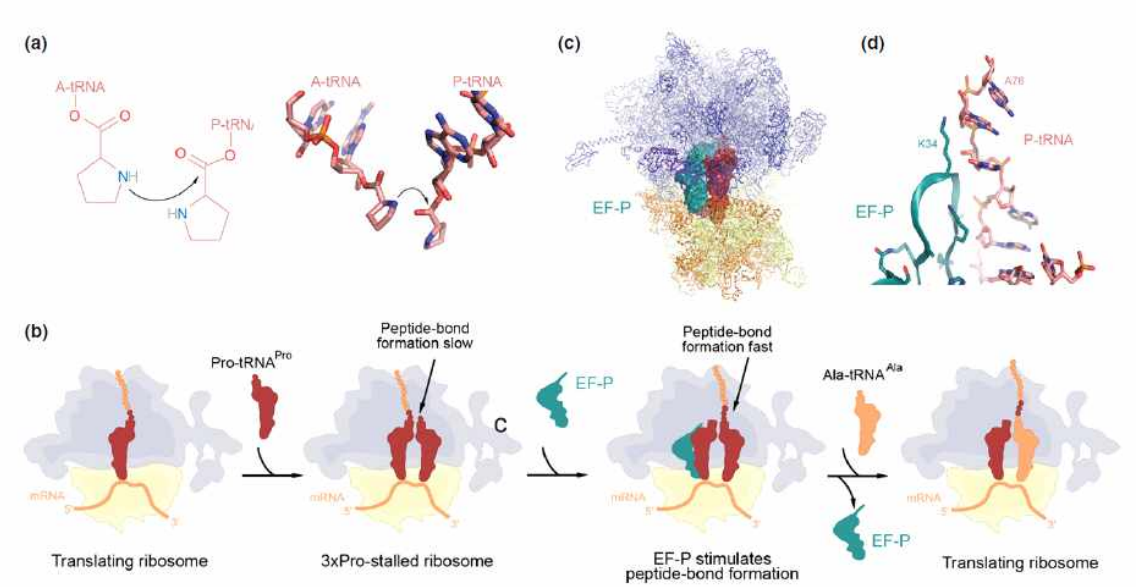

그림 2. 프롤린 stretches에서 일어나는 리보좀 멈춤 현상 극복 : EF-P

4. 리보좀에 작용하는 toxin-antitoxin (TA) 시스템

TA 시스템은 일반적으로 안정한 toxin 단백질과 불안정하지만 toxin을 불활성화하는 antitoxin의 두 gene으로 구성되어있으며, 특정 조건에서 antitoxin이 분해되어 toxin이 활동가능하게 된다. TA 시스템은 프로그램된 세포 사멸, 영양 고갈 스트레스, 세균의 persistence 등에 관여한다고 알려져 있으며, antitoxin의 특징에 따라서 TA types I~V으로 구분한다. 이 중 type Ⅱ system은 리보좀을 타겟하며 MazEF, RelB/E, YefM/YoeB 등이 있다.

MazEF toxin-antitoxin 시스템

MazEF는 ppGpp에 의해 조절되는 type Ⅱ TA system으로 그 기작이 비교적 잘 알려져 있다. MaxEF는 그람음성균과 그람양성균 모두에 널리 분포되어 있으며 chromosome 내에서 relA 유전자와 비교적 가까운 down stream에 위치하고 있다. 스트레스가 없는 상황에서는 MazE가 MazF와 선형 hetero hexamer를 형성함으로써 MazF의 toxin 작용을 방해하고 있다. 그러나 항생제, 열, 산화 스트레스, ppGpp의 증가 등 여러 스트레스 상황에서 ClpAP

protease나 Lon protease에 의해 MazE가 분해되고, MazF는 MazE로부터 풀려나서 toxin으로 작용할 수 있게 된다. MazF는 ACA sequence 등의 mRNA를 자르고 이로 인해 세포내 90%의 단백질 합성이 저해된다. 특히 MazF는 AUG 개시 코돈 앞의 ACA를 선호하여 자르는데 이는 leaderless 혹은 짧은 leader를 가지는 mRNA를 만들고 이러한 mRNA는 MazF에 의해 16S rRNA가 변형된 '스트레스 리보좀'에 의해 특이적으로 인지된다 (그림 3).

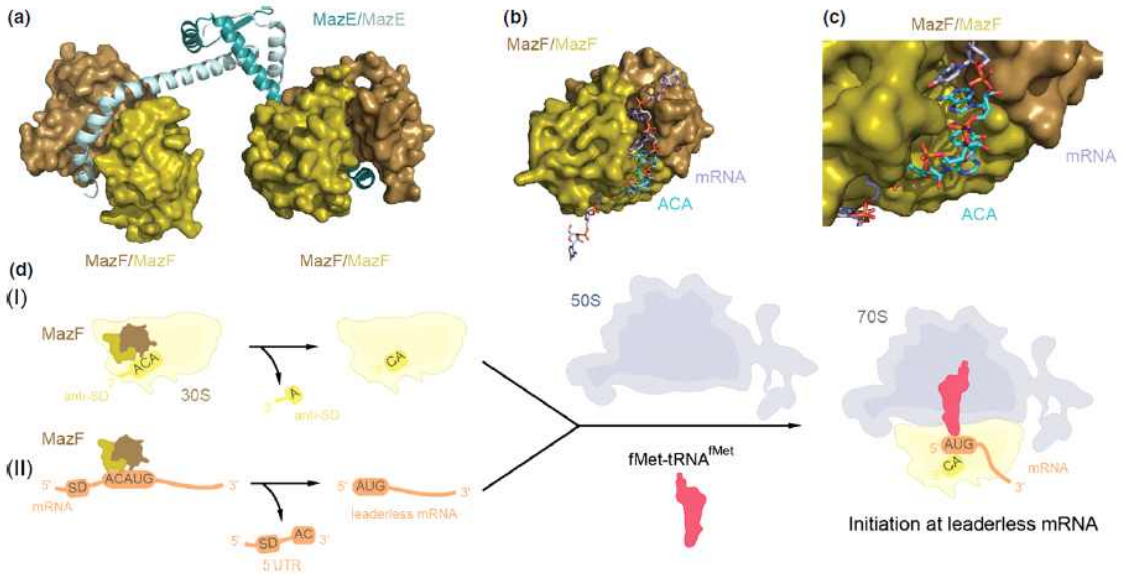

그림 3. MazF가 매개하는 번역 reprogramming

RelBE toxin-antitoxin 시스템

RelE는 mRNA를 잘라 번역을 저해하는 toxin으로 보통 상황에서는 antitoxin인 RelB에 의해 active site가 감싸져 있다. 그러나 영양 고갈 상황에서는 Lon protease에 의해 RelB가 분해되고 풀려나온 RelE는 리보좀에 결합하여 A-site의 UAG, UGA, UCG, CAG codon mRNA를 자른다. 앞서 언급한 MazF는 리보좀과 상관없이 mRNA interferae 활성을 가지는데 비해, RelE는 mRNA 절단을 하기 위해 리보좀 결합을 필요로 한다. RelE에 의한 mRNA 절단이 일어나면 A-site에 끝이 잘린 mRNA가 남기 때문에 더 이상 번역이 진행되지 못한다 (그림 4).

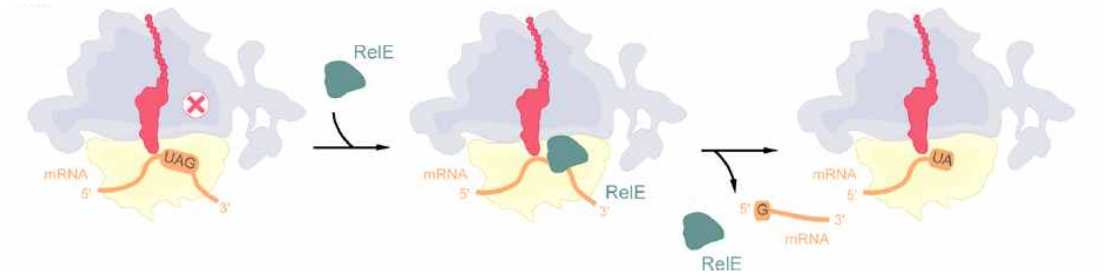

그림 4. 리보좀과 RelE에 의한 A-site codon의 절단

5. mRNA 절단 스트레스에 대한 리보좀의 반응

tmRNA와 SmpB에 의한 trans-translation

Trans-translation은 A-site에 codon이 없거나 불완전한 mRNA와 리보좀이 결합하면 이를 인지한 tmRNA와 SmpB이 결합하여 시작된다. tmRNA는 tRNA와 mRNA의 hybrid 형태로 alanine charged tRNA domain과 짧은 mRNA domain으로 구성되어 있다. trans-translation 반응에는 tmRNA 뿐만 아니라 SmpB도 필요한데, SmpB는 tmRNA와 결합하여 반감기를 세 배 정도 늘어나게 하고, tmRNA와 멈춰있는 리보좀의 결합을 안정하게 하며, alanyl-tRNA에 의해 tmRNA가 charging되는 것을 촉진한다. 이렇게 짧아진 mRNA 때문에 번역이 진행되지 못하고 멈춰 있는 리보좀과 결합한 tmRNA는 번역이 제대로 끝나지 못해 짧아진 단백질의 카르복시 말단에 degradation sequence라는 꼬리표를 달아서 분해되도록 한다 (그림 5).

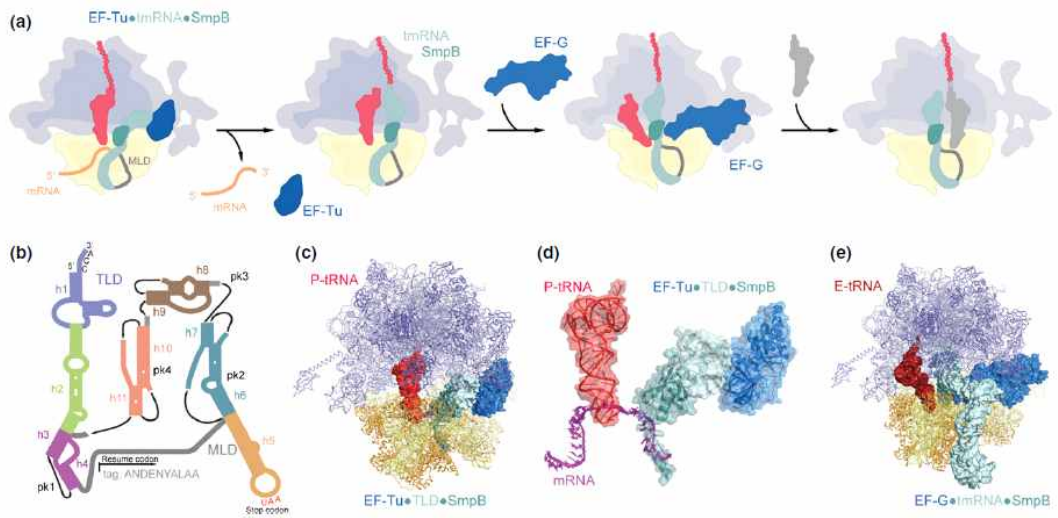

그림 5. 변형 mRNA의 trans-translation : tmRNA와 SmpB

ArfA, ArfB에 의한 대체 기작

짧아진 mRNA 때문에 멈춰있는 리보좀을 구제해주는 시스템으로는 비교적 최근까지도 tm-RNA에 의한 trans-translation 하나만 밝혀져 있었다. 그러나 세균에서 tmRNA가 결손되더라도 생존에는 문제가 없기 때문에, tmRNA에 의한 trans-translation 외에도 대체 시스템이 존재할 것으로 생각되어왔다. 그리고 이에 대해 최근 ArfA와 ArfB도 짧아진 mRNA 때문에 멈춰있는 리보좀을 풀어줄 수 있음이 밝혀졌다. ArfA는 멈춰있는 리보좀에 RF2를 recruit함으로써 폴리펩타이드 사슬을 리보좀으로부터 떨어지게 하는데, ArfA가 리보좀의 어느 부위와 결합하여 작용하는지는 아직 명확히 밝혀지지 않았다. ArfB의 경우, 리보좀이 non-stop mRNA나 드문 코돈을 가진 mRNA 때문에 멈춰있으면 이에 결합하여 리보좀의 PTC에서 peptidyl-tRNA hydrolysis를 촉진하여 리보좀의 recycle을 가능하게 한다 (그림 6).

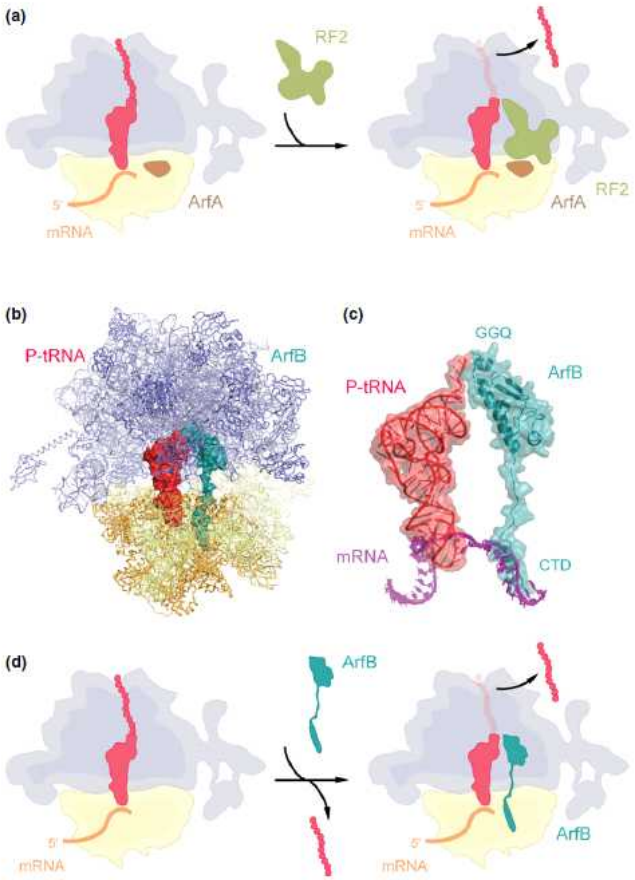

그림 6. ArfA와 ArfB에 의한 변형 mRNA의 구제

6. 생장 정체기에 대한 리보좀의 반응

pY는 세균의 생장 정체기나 저온 스트레스 상황에서 발현되어 70S 리보좀과 결합한다. 리보좀과 결합한 pY는 리보좀의 A-site와 P-site가 tRNA와 잘 결합하지 못하도록 경쟁하여 번역을 저해한다. 환경이 좋아지면 EF-G와 RRF에 의해 pY가 리보좀에서 떨어져 나오고 다시 번역이 재개된다.
RMF는 양분이 부족한 상황에서 발현되어 70S 리보좀이 90S로 dimerization 하는 것을 촉진하고, 90S에 추가적으로 HPF가 결합하여 번역 불활성 상태인 100S을 형성한다. 양분이 다시 주어지면 RMF와 HPF는 100S로부터 떨어져 나오고 리보좀은 다시 번역 가능한 70S 상태가 되는데 이 과정은 1분 내에 일어난다. 100S의 형성은 양분이 부족한 상황에서 리보좀을 보호 또는 저장하는 것으로 '리보좀 동면'이라고 부른다 (그림 7).

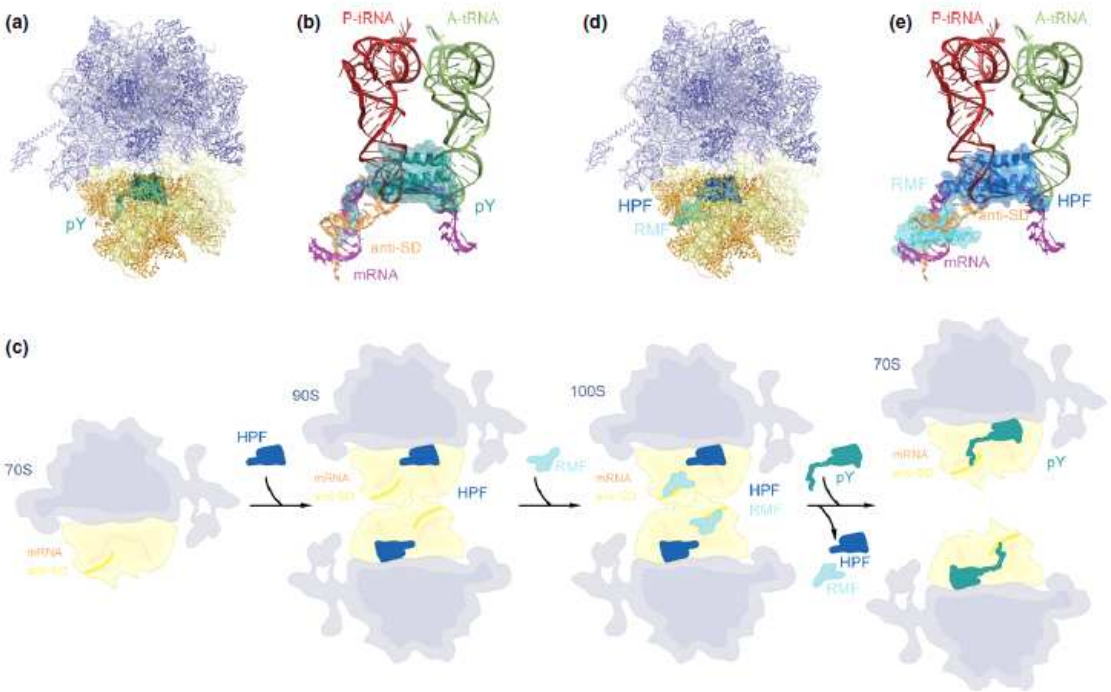

그림 7. 100S 형성에 상반작용을 하는 pY와 RMF/HPF

7. 항생제 스트레스에 대한 리보좀의 반응

TetM과 FusB에 의한 항생제 스트레스 반응

항생제 tetracycline은 리보좀 30S 단위체에 결합하여 A-site로 aa-tRNA가 들어오는 것을 방해하여 번역을 저해한다. tetracycline에 대한 내성을 가지는 기작에는 efflux pump, 16S rRNA의 돌연변이, 항생제의 불활성화가 있고, 이외에도 Ribosome protection protein (RPPs)을 통해 내성을 가질 수 있다. RPPs에 속하는 TetO/TetM은 항생제에 의해 번역을 방해받는 리보좀에 결합해 리보좀으로부터 항생제를 떨어지게 한다. 이 과정에는 GTP가 필요하다 (그림 8).

fusidic acid는 리보좀에서 EF-G가 떨어지지 못하도록 하여 번역 신장을 저해한다. fusidic acid에 대한 내성은 EF-G 유전자인 fusA의 돌연변이와 horizontal transfer를 통해 fusB-유사 유전자를 얻는 것으로 인해 생길 수 있다. fusB는 몇몇 그람양성균에서 발견되는 유전자로 translational attenuation에 의해 발현이 조절된다. fusB의 upstream에 있는 leader peptide를 번역하던 리보좀이 fusidic acid의 방해에 의해 멈추면, mRNA의 이차구조가 바뀌면서 downstream의 SD 서열이 노출되어 fusB가 발현되는 것이 가능해진다. 이렇게 발현된 FusB는 EF-G를 인지하고 결합하여 EF-G가 떨어져나오는 것을 도와 리보좀의 번역이 계속되도록 한다 (그림 8).

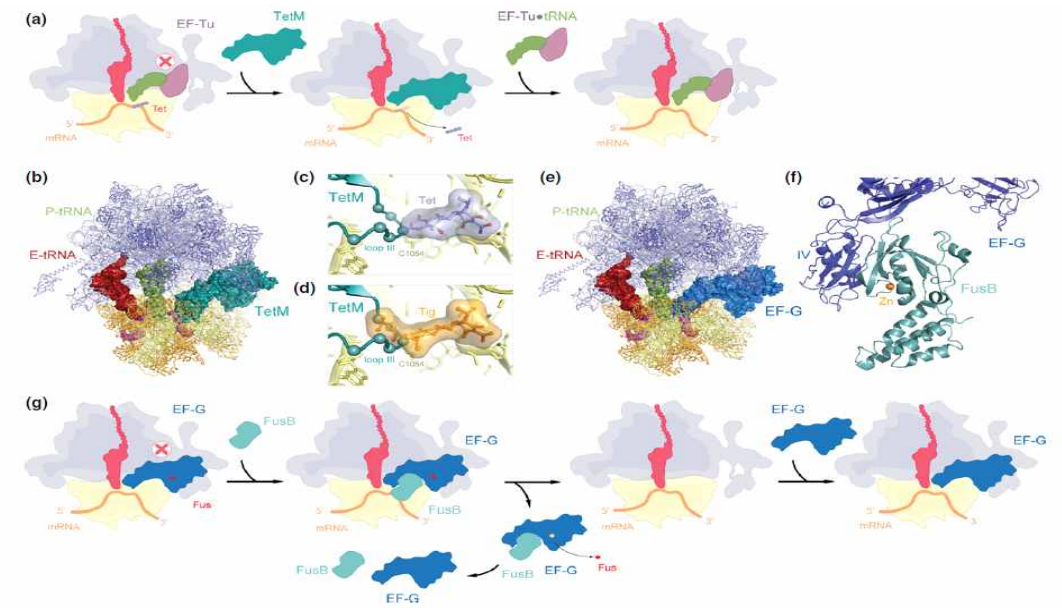

그림 8. TetM과 FusB에 의한 항생제 스트레스 반응

8. 리보좀과 결합하는 다른 스트레스 인자

Obg는 생존에 필수적인 GTPase로 모든 생물계에서 그 homolog를 가지고 있다. Obg는 리보좀 50S 단위체와 결합하여 70S 리보좀을 형성하는데 관여하며, ppGpp와 결합하여 그 합성을 조절한다. EF4는 EF-G의 paralog로써 EF-G와 경쟁적으로 리보좀과 결합하여 post-translocational 시기에 back-translocation을 일으킨다. 이는 높은 마그네슘 농도와 같이 non-productive한 translocation이 유도되는 상황에서 멈춰있는 리보좀과 EF-G가 원활히 prodcutive한 번역을 진행할 수 있도록 해줄 것으로 여겨진다. 또 다른 EF-G의 paralog로인 BipA는 평상시에는 70S 리보좀과 결합하고 영양 고갈, 저온, 고온 스트레스 상황에서는 30S 단위체와 결합하여 여러 스트레스 반응을 매개한다 (그림 9).

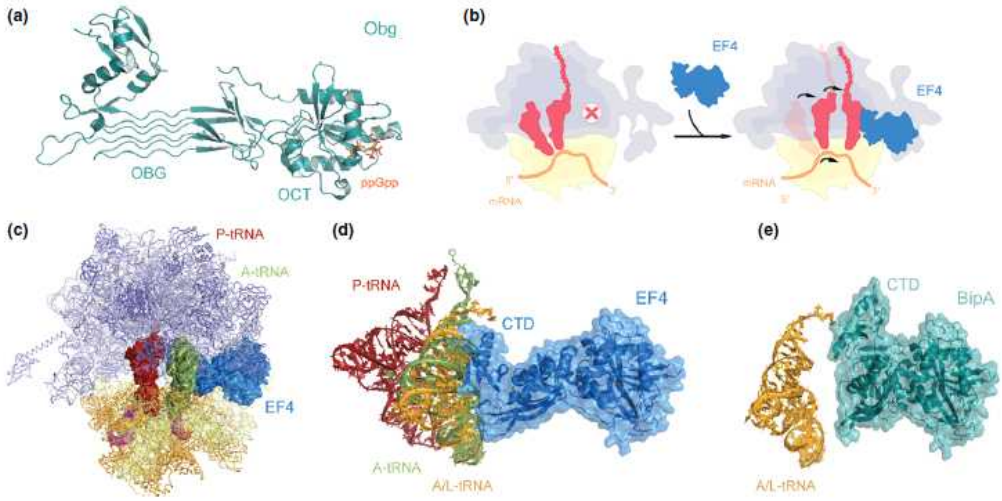

그림 9. 리보좀에 결합하는 스트레스 인자 : Obg, EF4, BipA

참고문헌

1. Agata L. Starosta, J€urgen Lassak, Kirsten Jung & Daniel N. Wilson (2014) The bacterial translation stress response. FEMS Microbiol Rev 38: 1172–1201.

2. Blaha G, Stanley RE & Steitz TA (2009) Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. Science 325: 966–970.

3. Doerfel LK, Wohlgemuth I, Kothe C, Peske F, Urlaub H & Rodnina MV

(2013) EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. Science 339: 85–88.
4. Gagnon MG, Seetharaman SV, Bulkley D & Steitz TA (2012) Structural basis for the rescue of stalled ribosomes: structure of YaeJ bound to the ribosome. Science
5. Gao YG, Selmer M, Dunham CM, Weixlbaumer A, Kelley AC & Ramakrishnan V (2009) The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state. Science
6. Gerdes K, Christensen SK & Lobner-Olesen A (2005) Prokaryotic toxin–antitoxin stress response loci. Nat Rev Microbiol 3: 371–382.
7. Gutmann S, Haebel PW, Metzinger L, Sutter M, Felden B & Ban N (2003) Crystal structure of the transfer-RNA domain of transfer-messenger RNA in complex with SmpB. Nature 424: 699–703.
8. Hogg T, Mechold U, Malke H, Cashel M & Hilgenfeld R (2004) Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response. Cell 117: 57–68.
9. Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JR & Weissman JS (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. Science 324:218–223.
10. Keiler KC (2008) Biology of trans-translation. Annu Rev Microbiol
11. Kint C, Verstraeten N, Hofkens J, Fauvart M & Michiels J (2014) Bacterial Obg proteins: GTPases at the nexus of protein and DNA synthesis. Crit Rev Microbiol
12. Li W, Atkinson GC, Thakor NS, et al. (2013) Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). Nat Commun 4: 1477.
13. Maisonneuve E, Castro-Camargo M & Gerdes K (2013) (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin–antitoxin activity. Cell 154
14. Moore SD & Sauer RT (2007) The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue. Annu Rev Biochem
15. Neubauer C, Gao YG, Andersen KR, Dunham CM, Kelley AC, Hentschel J, Gerdes K, Ramakrishnan V & Brodersen DE (2009) The structural basis for mRNA recognition and cleavage by the ribosome-dependent

endonuclease RelE. Cell 139
16. Neubauer C, Gillet R, Kelley AC & Ramakrishnan V (2012) Decoding in the absence of a codon by tmRNA and SmpB in the ribosome. Science 335: 1366–1369.
17. Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, D€onh€ofer A & Wilson DN (2014) Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. Biol Chem
18. Pedersen K, Zavialov AV, Pavlov MY, Elf J, Gerdes K & Ehrenberg M (2003) The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. Cell 112: 131–140.
19. Polikanov YS, Blaha GM & Steitz TA (2012) How hibernation factors RMF, HPF, and YfiA turn off protein synthesis. Science
20. Qin Y, Polacek N, Vesper O, Staub E, Einfeldt E, Wilson DN & Nierhaus KH (2006) The highly conserved LepA Is a Ribosomal elongation factor that back-translocates the ribosome. Cell 127: 721–733.
21. Ramrath DJ, Yamamoto H, Rother K, et al. (2012) The complex of tmRNA-SmpB and EF-G on translocating ribosomes. Nature
22. Starosta AL, Qin H, Mikolajka A, Leung GY, Schwinghammer K, Nicolaou KC, Chen DY, Cooperman BS & Wilson DN (2009) Identification of distinct thiopeptide-antibiotic precursor lead compounds using translation machinery assays. Chem Biol 16: 1087.1096.
23. Ude S, Lassak J, Starosta AL, Kraxenberger T, Wilson DN & Jung K (2013) Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. Science 339: 82–85.
24. Vesper O, Amitai S, Belitsky M, Byrgazov K, Kaberdina AC, Engelberg-Kulka H & Moll I (2011) Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in Escherichia coli. Cell
25. Wilson DN (2014) Ribosome-targeting antibiotics and bacterial resistance mechanisms. Nat Rev Microbiol 12: 35–48.
26. Yamamoto H, Qin Y, Achenbach J, Li C, Kijek J, Spahn CM & Nierhaus KH (2014) EF-G and EF4: translocation and back-translocation on the bacterial ribosome. Nat Rev Microbiol 12: 89–100.