

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	リボソームフットプリントの伸長現象を利用した大腸菌の翻訳網羅解析
Title(English)	
著者(和文)	藤田智也
Author(English)	Tomoya Fujita
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11716号, 授与年月日:2022年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田口 英樹,岩崎 博史,木村 宏,中戸川 仁,藤田 尚信
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11716号, Conferred date:2022/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

リボソームフットプリントの伸長現象を利用した
大腸菌の翻訳網羅解析

(Anatomy of footprint extension in ribosome profiling reveals translational
landscape in bacteria)

2021 年 1 月

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系 生命理工学コース

藤田智也

指導教員：田口 英樹

目次

略語一覧.....	6
概論.....	7
1. 序論.....	10
1.1. リボソームの翻訳伸長反応	10
1.2. リボソームに作用する翻訳阻害剤.....	11
1.3. S1 タンパク質の構造と機能	12
1.4. RNA の構造解析.....	13
1.5. リボソームの翻訳速度制御機構	13
1.6. 翻訳一時停止の解析	15
1.7. リボソームプロファイリング法	16
図	18
第一部	20
2. <i>Rotated state</i> のリボソームは <i>Non-rotated state</i> のリボソームに比べて長いリ ボソームフットプリントを生み出す.....	20
2.1. 翻訳阻害剤とリボソームフットプリントの長さの関係性の解析.....	20
2.2. ロングフットプリントはリボソームフットプリント様の挙動を示す.....	23
2.3. クライオ電子顕微鏡を用いた翻訳阻害剤処理を行ったリボソームの構造状態解析	25
2.4. リボソームプロファイリングによるフットプリントの長さの違いに基づく翻 訳一時停止位置でのリボソームの構造状態の分類.....	26
3. ロングフットプリントはショートフットプリントに比べて、5'末端側が長い...	34

3.1.	ロングフットプリントの伸長方向の解析	34
3.2.	S1 タンパク質はリボソームが Rotated state のときリボソームフットプリントの 5'端を保護する	36
3.3.	UV-C crosslinking immunoprecipitation sequencing with an infrared labeled linker (irCLIP-seq)による、翻訳伸長中の 70S に結合する S1 と mRNA の相互作用解析	39
4.	S1 タンパク質は長い CDS でリボソームの翻訳伸長反応を促進する	42
4.1.	リボソームプロファイリング法を用いた S1 が翻訳伸長に与える影響の解析	42
4.2.	in vitro 翻訳系を用いた S1 が翻訳伸長に与える役割の検証.....	43
5.	リボソームの構造状態以外でのリボソームフットプリント伸長現象の可能性の検討.....	45
5.1.	リボソームプロファイリング法のデータを用いたロングフットプリントの発生メカニズムの検討.....	45
5.2.	ロングフットプリントが蓄積したコドンの網羅的探索	47
6.	ycbZ の個別解析	51
6.1.	リボソームプロファイリングによって特定した翻訳一時停止の生化学的検証	51
6.2.	ycbZ 遺伝子の CDS 上で生じる翻訳一時停止の解析	52
7.	mRNA の二次構造が RNase の到達範囲を制御する	61
7.1.	ロングフットプリントの蓄積する原因の検討	61
第二部		66
8.	高塩濃度処理法、disome プロファイリング法を組み合わせた大腸菌リボソームの翻訳一時停止位置の網羅的解析	66

9. 種々のリボソームプロファイリング法の組み合わせによって特定されたリボソームの強固な翻訳一時停止位置の生化学定検証.....	71
10. 考察	75
11. 結論	77
12. 材料	79
13. 手法	81
大腸菌株とプラスミド	81
<i>pCA24N-hybA, hybB, ispH, napD, nuoA, plsX, sseA, ykgF, and ycbZ</i>	81
<i>pCA24N-ycbZmotif WT, I557A, E559A, R560A, I561A, W579A, L580A, W579A-L580A, E559A-R560A-I561A, I557A-E559A-R560A-I561A-W579A-L580A, I584A-P585A-N586A, P585A-N586A, and N586A</i>	81
<i>pCA24N-6xHis-HRV3C-ftsQ85-HA-ycbZmotif</i>	81
<i>pCI-neo-1xEGFP-Fluc-EGFP and pCI-neo-2xEGFP-Fluc-EGFP</i>	81
リボソームプロファイリング法	82
データ解析	83
Pause score の計算	83
Polarity score の計算	84
クロラムフェニコール処理サンプルのリボソームフットプリントの分布のフィッティング	84
anti-SD 配列と翻訳停止位置上流配列の ΔG の計算	84
翻訳一時停止位置の上流配列の二次構造予測	85
DMS-seq のデータ解析	85
リボソームプロファイリングによって抽出した翻訳一時停止位置に蓄積したリボソームの peptidyl-tRNA の予想分子量の計算	85
翻訳一時停止遺伝子群の GO 解析	85

tRNA-seq のライブラリー構築.....	85
S1 irCLIP-seq のライブラリー構築.....	86
クライオ電子顕微鏡のサンプル調製.....	88
クロラムフェニコール処理およびカプレオマイシン処理のリボソームの精製	88
RNC (Ribosome nascent-chain complex) 複合体の精製.....	88
クライオ電子顕微鏡を用いたリボソームの単粒子解析	89
Integrated nascent chain profiling (iNP 解析)	90
ウエスタンブロッティング	90
S1 除去リボソームの調製	90
<i>In vitro</i> 翻訳系を用いたルシフェラーゼレポーター解析	91
謝辞.....	92
参考文献.....	94

略語一覽

aa-tRNA : aminoacyl-tRNA
CDS : coding sequence
CBB : Coomassie brilliant blue
EDTA : ethylenediamine-tetraacetic acid
DMS : dimethyl sulfate
DNA : deoxyribonucleic acid
DTT : dithiothreitol
EF-G : elongation factor G
EF-Tu : elongation factor thermo unstable
GFP : green fluorescent protein
GO : gene ontology
mRNA : messenger RNA
M.W. : molecular weight
OB : oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
PCR : polymerase chain reaction
RNA : ribonucleic acid
RNC : ribosome-nascent chain complex
rRNA : ribosomal RNA
SDS : sodium dodecyl sulfate
SD 配列 : Shine-Dalgarno 配列
tRNA : transfer RNA
UTR : untranslated region

概論

細胞内のタンパク質合成装置であるリボソームは RNA にコードされたコドン情報をもとに新生ポリペプチド鎖（以下、新生鎖）を合成する。リボソームが実際に新生鎖を合成する反応のことを翻訳伸長反応という。翻訳伸長反応では、まず EF-Tu がアミノアシル tRNA (aa tRNA) と複合体を形成し、A-site コドンに適切なアミノアシル tRNA を運ぶ。その後リボソームの 50S サブユニットのペプチジルトランスフェラーゼセンター (PTC) の活性により、P site の peptidyl-tRNA からのペプチド転移が生じる。さらに EF-G の働きにより、リボソームを Rotated state と呼ばれる構造状態に安定させ、tRNA がそれぞれ A site から P site、P site から E site に移行する転座が起きる。E site からは tRNA が抜け、A site には次のコドンに適切なアミノアシル tRNA が運ばれ、同様の反応を繰り返す。リボソームはこの反応ステップを終止コドンに達するまで繰り返し、新生鎖を合成する。このようにリボソームは複雑な反応機構によりタンパク質を合成している。翻訳伸長の素過程についてはこれまで 1 分子実験や構造生物学など *in vitro* の実験により詳細な研究が行われてきたが、細胞内でまさに翻訳伸長反応を行なうリボソームの構造状態を知ることは困難であった。

一方で細胞内の翻訳状況を網羅的かつ定量的に解析する手法としてリボソームプロファイリング法がある。リボソームプロファイリング法はリボソームによって強固に保護された mRNA 領域以外の mRNA を RNase によって処理し、リボソーム内に存在する mRNA 配列（以下、リボソームフットプリント）のみを抽出しシーケンスする。これにより、ある時点での細胞内の翻訳をゲノムワイドに解析できる非常に強力な手法である。これまでリボソームプロファイリング法は真核生物および原核生物ともに適用されてきたが、原核生物のリボソームフットプリントは真核生物と比較すると長さにばらつきがあり、その全貌はよくわかっていない。

本論文の第一章ではまず本研究の序論を述べている。次に本研究の第一部ではリボソームプロファイリング法を利用することでリボソームフットプリントの長さの違いからリボソームの構造状態を特定した。

第二章では種々の翻訳阻害剤処理を施し、特定の構造状態で安定化させたリボソームのリボソームプロファイリングおよびクライオ電子顕微鏡による構造解析を行った。結果、リボソームフットプリントの長さの違いがリボソ

ームの構造状態を反映していることを示した。さらに既知の翻訳一時停止が生じる遺伝子に着目して解析を行ったところ、翻訳一時停止位置でのリボソームフットプリントの長さから予想されるリボソームの構造状態と先行の研究によるリボソームの構造状態が一致することを明らかにした。

第三章ではリボソームフットプリントが **Rotated state** で伸長するメカニズムの検証を行った。解析の結果からリボソームフットプリントが伸長するのは 5' 方向であることがわかった。さらにリボソーム小サブユニットを構成する S1 がリボソームフットプリントを伸長させる可能性について検証を行った。

第四章では第三章で示した翻訳伸長中のリボソームの S1 と mRNA の相互作用が翻訳伸長そのものに与える影響について言及した。リボソームプロファイリングの解析及び *in vitro* 翻訳系を用いた解析により S1 は翻訳伸長反応を促進することを示した。これまで S1 は翻訳開始に必須の因子と考えられてきたが、翻訳伸長にも影響を与えることが明らかとなった。

第五章ではリボソームの構造変化に伴う S1 と mRNA の相互作用以外の原因によるリボソームフットプリントの伸長現象に関して詳細な解析を行った。35-40 塩基の長いリボソームフットプリントが蓄積したコドンを多数特定し、それらの遺伝子上でリボソームが実際に翻訳一時停止することを *in vitro* 翻訳系を用いた解析により示した。

第六章では、*ycbZ* をコードした mRNA 上で翻訳一時停止したリボソームに着目して解析を行った。*ycbZ* での翻訳一時停止は *ycbZ* のアミノ酸配列依存的に生じることを示した。また第七章にて翻訳一時停止位置で生じるフットプリントの伸長現象は mRNA の特異的な二重鎖構造状態が RNase 処理を免れることに起因することを示した。さらに他の CDS (coding sequence) 上で長いリボソームフットプリントが蓄積した箇所に関しても *ycbZ* と同様に mRNA が分子内で二重鎖構造を形成していることが示唆された。

第二部ではリボソームの翻訳伸長の過程が著しく停滞した箇所を網羅的かつ、より確かに特定することを目的として研究を行った。種々のリボソームプロファイリング法 (従来法、高塩濃度処理法、disome プロファイリング法) を組み合わせて、リボソームの翻訳一時停止位置をゲノムワイドに特定した。

第八章では各リボソームプロファイリング法を組み合わせた翻訳一時停止位置の網羅解析について言及した。解析の結果、125 箇所の強固な翻訳一時

停止位置を特定した。

第九章では第一章で特定した翻訳停止位置が生化学的な実験によっても再現できるか検証を行った。検証の結果、3 種のリボソームプロファイリング法を組み合わせで特定した翻訳一時停止位置のほとんどは生化学的検証によっても再現された。生化学解析によって検出された **peptidyl-tRNA** の分子量とリボソームプロファイリング法による翻訳一時停止位置から予想される **peptidyl-tRNA** の分子量が高い相関関係にあることが確認されたことから、本手法は強固な翻訳一時停止位置を網羅的に特定していることが示唆された。

1. 序論

1.1. リボソームの翻訳伸長反応

分子生物学におけるセントラルドグマの最終段階である翻訳は、リボソームが mRNA にコードされたコドンを認識し、新生鎖を合成する(Voorhees and Ramakrishnan, 2013)。翻訳は大きく 4 つのプロセスに分かれ、開始、伸長、終結、リサイクリングと呼ばれている。中でも実際に新生鎖を合成する反応は伸長反応と呼ばれ、構造解析、生化学、1 分子実験などによって詳細な研究が行われてきた(Voorhees and Ramakrishnan, 2013) (Fig. 0-1)。大腸菌リボソームは 50S 大サブユニットと 30S 小サブユニットからなり、これらが mRNA を挟み込む形で複合体 (70S) を形成する。形成された 70S リボソームは A、P、E site の 3 つの tRNA 結合部位をもち、翻訳反応中は tRNA がこれらの部位を A、P、E の順に移動しつつ、新生鎖を合成する。実際に翻訳伸長反応が行われる際は Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) がコドンを認識して A site に結合し、P site に存在する peptidyl-tRNA とペプチド転位反応を生じる。転位反応後、新たにペプチド鎖を受け取った A site の peptidyl-tRNA は P site に、P-site tRNA は E site に転座する。この tRNA の転座に大きく寄与しているのが EF-G (elongation factor G) と呼ばれる因子である。EF-G は A site 近傍に結合することでリボソーム大サブユニットと小サブユニット間で回転する Rotated state と呼ばれる状態を安定化させる(Voorhees and Ramakrishnan, 2013)。Rotated state の状態では A、P-site tRNA がそれぞれ P、E site に移動する P/A、E/P の中間状態をとる。そして EF-G は GTP 加水分解依存的に A、P site の tRNA をそれぞれ P、E site へ転座させる。このサイクルを繰り返すことでリボソームは新生鎖を合成する。この間、リボソームは翻訳伸長反応に伴い、2 つの構造状態を行き来することが知られている。通常状態は Non-rotated state、ペプチド転位反応後に転座反応に移行する状態を Rotated state と呼ぶ(Voorhees and Ramakrishnan, 2013)。Rotated state ではリボソームの 30S サブユニットが 50S サブユニットに対して相対的に 3-6° 回転した状態になる(Zhang et al., 2009)。Non-rotated-Rotated 間の構造変化は翻訳伸長反応中の tRNA の転座に極めて重要であり、その素過程について *in vitro* の実験系を用いて精力的に研究が行われてきた。一方で細胞内の各 mRNA 上に存在するリボソームの構造変化のカイネティクスが mRNA やコードされたアミノ酸配列ごとにそれぞれどのように制御されているかの理解はあまり進んでいない。

1.2. リボソームに作用する翻訳阻害剤

リボソームはタンパク質合成の中心を担う装置であり、細胞内のペプチド合成のプラットフォームである。よって多くの抗生物質のターゲットとなっている。リボソームの翻訳伸長反応の項で示したとおり、リボソームはタンパク質を合成するために、開始、伸長、終結、リサイクリングの4つのステップを経てタンパク質合成を行うが、各種翻訳阻害剤はそれぞれ特徴的な作用機序により、これらの反応ステップを阻害することが生化学的解析や構造解析による研究から明らかとなっている(Wilson, 2014)。これらの化合物の多くは翻訳伸長反応を阻害するものであり、アミノグリコシド、クロラムフェニコール、フシジン酸、リンコサミド、マクロライド、オキサゾリジノン、ストレプトグラミン、テトラサイクリンなどに分類される。

クロラムフェニコールはリボソームの PTC 近傍に結合し P site の peptidyl-tRNA から A site に収容された aa-tRNA へペプチドが転移するのを阻害する(Bulkley et al., 2010; Dunkle et al., 2010)。また、リネゾリドもクロラムフェニコールと同様に PTC 近傍に結合することで、リボソームのペプチド転移反応を阻害する(Wilson et al., 2008)。一方でブラストサイジンはペプチド転移反応を阻害する翻訳阻害剤であるが、その作用機序はクロラムフェニコールなどとは異なる。ブラストサイジンはリボソームの P site 近傍に結合する(Svidritskiy et al., 2013)。これにより P site の peptidyl-tRNA が A site 方向にアミノアシル基を向けることができなくなり、peptidyl-tRNA-aa-tRNA 間でのペプチド転移反応が阻害される。

翻訳伸長を阻害する阻害剤の中には tRNA と mRNA の転座を阻害するものもある。カプレオマイシンとバイオマイシンは 50S サブユニットと 30S サブユニット間の境界部分に結合し、デコーディングに重要なリボソームの A1492 と A1493 の構造を反転させる(Stanley et al., 2010)。これによってリボソームが転座反応を行う前の Rotated state で安定化する。さらにスペクチノマイシンは、リボソームの小サブユニットに結合する(Borovinskaya et al., 2007; Carter et al., 2000)。これにより 30S サブユニットの head ドメインと body ドメイン間での構造変化が行えないため、リボソームは Rotated state で安定化する。

1.3. S1 タンパク質の構造と機能

S1 タンパク質は 30S リボソームサブユニットを構成する 68 kDa のリボソームタンパク質である(Boni et al., 1991; Sengupta et al., 2001; Qu et al., 2012; Duval et al., 2013)。S1 は 6 つの oligonucleotide/oligosaccharide-binding (OB)-fold (OB-fold)ドメインから構成される。これらのドメインのうち、N 末端から数えて 1 番目と 2 番目のドメインは 30S の mRNA 出口チャネル近傍に結合する(Byrgazov et al., 2015; Demo et al., 2017; Beckert et al., 2018)。一方で C 末端側の 3-6 番目のドメインは RNA 結合能を持つ(Subramanian, 1983; Aliprandi et al., 2008; Salah et al., 2009; Byrgazov et al., 2012; Duval et al., 2013)。S1 はこの RNA 結合能を利用して SD 配列の上流の非翻訳領域に存在するピリミジンの豊富な配列に 10 塩基程度結合し、30S を翻訳開始領域に近づけることで開始複合体の形成を促進することがわかっている(Qu et al., 2012)。この翻訳開始時における S1 の役割は大腸菌細胞内で非常に重要とされており、S1 は生育に必須のタンパク質である(Duval et al., 2013)。

このように、これまで S1 タンパク質の構造と翻訳開始での役割については詳細な研究が行われてきたが、翻訳伸長中のリボソームでの役割についてはよくわかっていない。

1.4. RNA の構造解析

RNA は一本鎖構造であるため、様々な二次構造をとることができ、その構造が翻訳開始などの機能に影響を与えることがある(Duval et al., 2013)。よって、RNA の二次構造を理解することは細胞内での RNA の機能を理解するために重要であると言える。しかし実験によって全ての RNA の二次構造を決定することは時間および資金の制約により困難なため、これまでは RNA の配列情報をもとに計算機によってその高次構造が予測されてきた(Sato et al., 2009; Lorenz et al., 2011)。一方で近年、二次構造を形成した RNA を網羅的に解析する DMS-seq と呼ばれる実験技術が確立された(Rouskin et al., 2014; Burkhardt et al., 2017)。Dimethyl sulfate (DMS) は塩基対を形成しない残基と高い反応性を示しメチル化修飾を導入するが、塩基対を形成した残基に対しては反応が起きない。すなわち、修飾の導入の有無により、RNA の二次構造形成を判別することが可能である。DMS-seq では DMS 処理を行った RNA をランダムに断片化したのち、種々のライブラリー構築プロセスを経てシーケンスする。アデニンおよびシトシン残基にかかった修飾は、ライブラリーを作製する際の逆転写反応を妨げるため、逆転写がそこで止まる。したがって、取得したリードの 5'末端をマッピングすることで修飾が導入された残基の正確な位置情報を把握することができ、RNA の二次構造情報を知ることができる。

1.5. リボソームの翻訳速度制御機構

これまでリボソームは一定の速度でポリペプチド鎖を合成していると考えられてきた。しかし、リボソームは加速や減速、時には一時停止を生じつつ翻訳を行なっていることがわかってきている。このリボソームの翻訳一時停止現象は、細胞にとって機能的であることもあれば悪影響を及ぼすこともある。リボソームの翻訳一時停止の有益な役割は新生鎖がフォールディングに寄与するシャペロン(Han et al., 2012; Stein et al., 2019)や膜挿入用に寄与する signal recognition particle (SRP) (Walter and Blobel, 1981; Mason et al., 2000; Fluman et al., 2014; Arpat et al., 2020)などの様々な因子と相互作用するための時間的猶予を作り出すことである。対照的に、強固に翻訳停止したリボソームは有害であると認識され、mRNA から除去される。後続のリボソームは、先行の失速したリボソームに到達し、2 つのリボソームが衝突して disome (di-ribosome) を形

成する。酵母および哺乳類では disome のユニークなインターフェースは複数の因子と相互作用し、ribosome-associated quality control (RQC) を引き起こす (Ikeuchi et al., 2018)。RQC はリボソームが翻訳一時停止を伴う mRNA に特異的に生じ、停止したリボソームを解離する。さらに新生鎖と mRNA を分解し、翻訳開始をブロックすることにより、リボソームが新たに翻訳開始するのを抑制する (Ikeuchi et al., 2018; Hickey et al., 2020)。

大腸菌ではこの制御機構とは異なるメカニズムで翻訳停滞リボソームを mRNA 上から取り除く。そのメカニズムは3つ存在する。一つ目は *trans-translation* と呼ばれる機構で、mRNA の分解や不完全な転写によって終止コドンを持たない mRNA の 3'末端でリボソームが停滞した際に、tmRNA (transfer-messenger RNA) が SmpB と翻訳伸長因子依存的に non-stop mRNA から翻訳を引き継ぐ。翻訳が継続したリボソームは tmRNA 上の終止コドンまで進み、翻訳を終結させることで翻訳停滞を解消する (Karzai et al., 1999)。2つ目は ArfA が RF2 をリクルートして翻訳停滞を解消する機構である (Chadani et al., 2010; Chadani et al., 2012)。通常 RF2 は終止コドン (UAA または UGA) を認識して peptidyl-tRNA を加水分解するが、ArfA 存在下では終止コドン非依存的に翻訳停滞が生じたリボソームの新生鎖を解離させることにより翻訳停滞を解消する。3番目は ArfB の機構であり、ArfB はそれ自身が終止コドン非依存的に翻訳停滞したリボソームのペプチドを解離させることが知られている (Handa et al., 2011)。

1.6. 翻訳一時停止の解析

Integrated nascent chain profiling (iNP) 解析(Chadani et al., 2016)では、一時的に停止したリボソームの内部に蓄積した peptidyl-tRNA を ^{35}S メチオニンでラベルし、中性 SDS-PAGE によって検出する。この手法を用いて大腸菌の遺伝子の 4 分の 1 をカバーする約 1000 個の遺伝子について解析を行ったところ、8 割以上の遺伝子でリボソームの翻訳一時停止が発生することが明らかとなっている(Chadani et al., 2016)。一方、リボソームプロファイリングは *in vivo* で mRNA 上を移動するリボソームの動きを測定することでリボソームの翻訳一時停止をコドンレベルで特定することができる(Ingolia et al., 2009; McGlincy and Ingolia, 2017; Iwasaki and Ingolia, 2017)。どちらも翻訳一時停止を特定するための強力な手法だが、これら 2 つの手法による解析結果には大きなギャップがあり、大腸菌リボソームの翻訳一時停止位置は未だ明確に定義できたとはいえない(Chadani et al., 2016)。

1.7. リボソームプロファイリング法

mRNA からタンパク質が合成される翻訳反応は環境の変化に応じてタンパク質の発現量を調節する極めて重要な反応である。よって、細胞内での遺伝子の発現状況の変化を網羅的かつ定量的に解析することは、生命現象を解き明かす上で非常に重要であると言える。近年、リボソームプロファイリングと呼ばれる、細胞内で各リボソームがどの mRNA のどのコドンを翻訳しているのか、次世代シーケンサーを用いて網羅的かつ定量的に解析する手法が確立された (Ingolia et al., 2009; McGlincy and Ingolia, 2017; Iwasaki and Ingolia, 2017) (Fig. 0-2)。リボソームプロファイリング法は、リボソーム内部に保護されることにより、RNase 処理を免れた約 30 塩基の mRNA 断片（以下、リボソームフットプリント）の配列情報を次世代シーケンサーで取得することにより生体内の翻訳状況をゲノムワイドに俯瞰できる。この手法を用いることで、mRNA のどこからどこまでが翻訳領域なのか、その翻訳効率がどの程度か、どのくらいの翻訳速度であるかを網羅的に解析することが可能である。

リボソームは 3 塩基刻み、すなわちコドン単位で mRNA 上を移動するため、リボソームフットプリントも 3 塩基周期で mRNA 上にマッピングされる。またリボソームフットプリントは CDS 内部に一様に分布しているわけではなく、実は偏りがある。この偏りはリボソームがそのコドン上に存在する滞在時間を示しており、リボソームフットプリントの蓄積が顕著な箇所ではリボソームが翻訳一時停止を生じていることが予想される。翻訳一時停止の原因としては tRNA 量や新生鎖とリボソーム出口トンネル内部との相互作用、mRNA の二次構造などが挙げられる (Nakatogawa and Ito, 2002; Lu and Deutsch, 2008; Yanagitani et al., 2011; Dana and Tuller, 2012; Brandman et al., 2012; Charneski and Hurst, 2013; Pop et al., 2014; Hussmann et al., 2015; Weinberg et al., 2016; Zhang et al., 2017; Dao Duc and Song, 2018; Ibrahim et al., 2018; Diamant et al., 2018; Mohammad et al., 2019; Sharma et al., 2019)。

また、リボソームフットプリントは一般的に約 30 塩基程度とされているが、実は取得できるリボソームフットプリントの長さには多様性がある。実際、真核生物を用いたリボソームプロファイリングではリボソームの A site 内の tRNA の存在の有無により、~21 塩基の短いフットプリントと~28 塩基の長いフットプリントの 2 種類の長さのフットプリントが生み出されることが知られている (Lareau et al., 2014; Matsuo et al., 2017; Kurihara et al., 2018; Wu et al., 2019)。

一方で原核生物のリボソームフットプリントは真核生物のリボソームフットプリントと比較してより幅広い長さで分布している(Mohammad et al., 2016; Mohammad et al., 2019)。その要因の一つとして mRNA 内のシャインダルガノ配列 (SD 配列) 様の配列とリボソームの 30S サブユニットを構成する 16S rRNA に存在するアンチシャインダルガノ配列 (anti-SD 配列) が二次構造を形成し、RNase の処理を逃れることが知られている。しかし大腸菌のリボソームフットプリントの長さの多様性とリボソームの構造状態の関係性についての詳細は未だよくわかっていない。本研究では翻訳伸長反応中のリボソームの構造状態、および翻訳伸長中の mRNA の分子内二次構造とリボソームフットプリントの長さの関係性について検証を行なった。

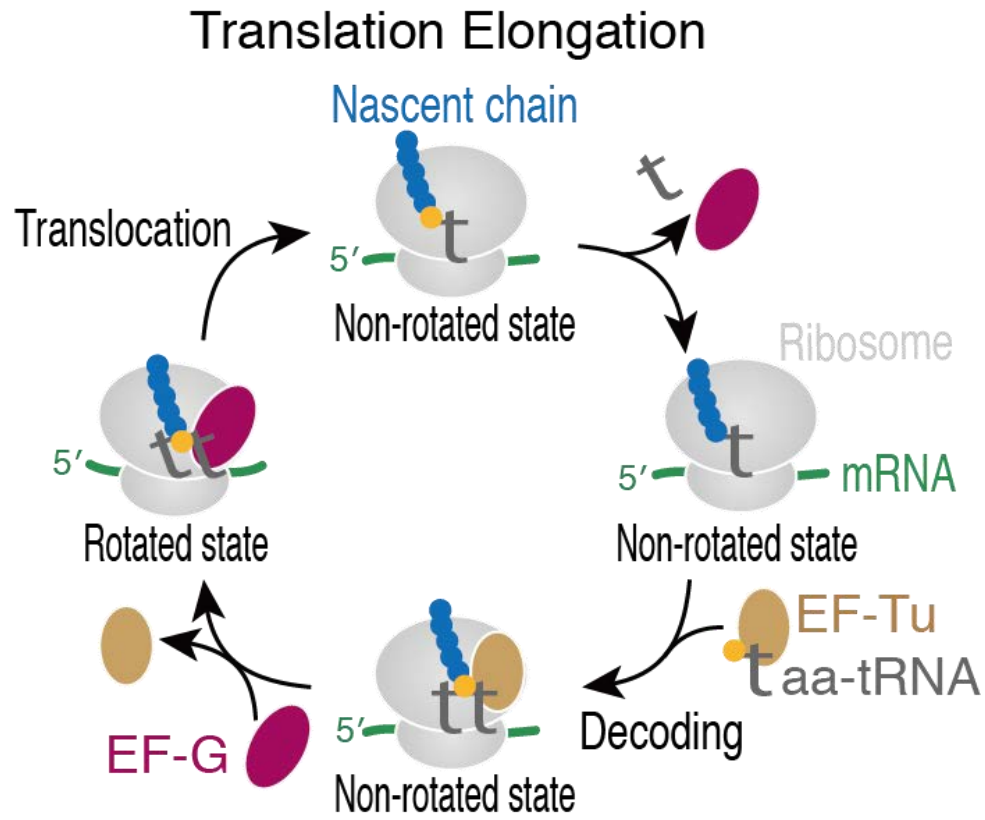


Fig. 0-1: 翻訳伸長反応の概略

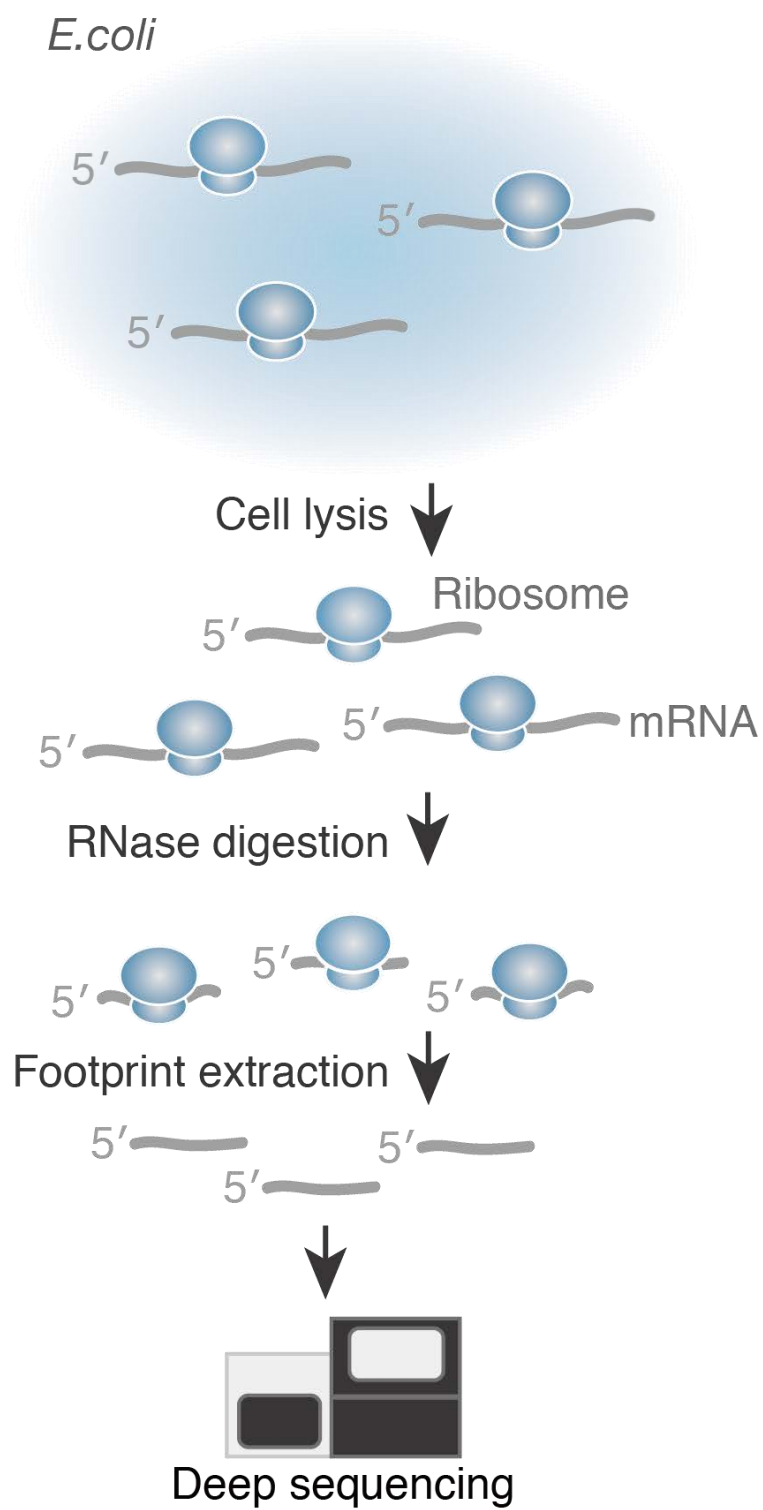


Fig. 0-2: リボソームプロファイリング法の概略

第一部

2. Rotated state のリボソームは Non-rotated state のリボソームに比べて長いリボソームフットプリントを生み出す

2.1. 翻訳阻害剤とリボソームフットプリントの長さの関係性の解析

リボソームの翻訳伸長反応中の構造変化の素過程は 1 分子実験や構造解析による *in vitro* の解析が行われてきた。しかし *in vivo* でのリボソームの構造変化についての理解は乏しい。そこで細胞内の翻訳状況を網羅的に解析できるリボソームプロファイリング法を利用して各 mRNA 上の各コドン上に存在するリボソームの構造状態を判別できないか大腸菌をモデル生物として検証を行うことにした。

先行研究によると、大腸菌のリボソームフットプリントの長さは広域に渡ることが知られている(Mohammad et al., 2016; Mohammad et al., 2019)。これはライブラリーを構築する際の RNase の感受性が翻訳伸長中のリボソームの構造状態によって変化することが原因ではないかと考えられる。

この仮説を検証するため、それぞれ作用機序の異なるバクテリアリボソームの翻訳阻害剤である、クロラムフェニコール(Bulkley et al., 2010; Dunkle et al., 2010)、リネゾリド(Wilson et al., 2008)、ブラストサイジン(Svidritskiy et al., 2013)、カプレオマイシン(Stanley et al., 2010)、バイオマイシン(Ermolenko et al., 2007; Cornish et al., 2008; Stanley et al., 2010; Wang et al., 2012)、スペクチノマイシン(Carter et al., 2000; Borovinskaya et al., 2007)を用いてリボソームを特定の構造状態で固定し、リボソームプロファイリングを行った。翻訳阻害剤は培地に直接加えるとリボソームが停止する位置にコドンバイアスが生じるという報告がある(Ingolia et al., 2012; Hussmann et al., 2015)。そこで翻訳阻害剤は菌体を破砕する過程で加えた(詳細は手法の章を参照)。また先行研究より、大腸菌のリボソームフットプリントは広域に分布することが知られているため、今回は 17-50 塩基のサイズをリボソームフットプリントとして切り出し、ライブラリー作製を行った(Mohammad et al., 2016)。

まず、各翻訳阻害剤で処理した際のリボソームフットプリントの長さの分布を解析したところ、二つのグループに分類された。一つ目のグループ(クロラムフェニコール、リネゾリドおよびブラストサイジンで処理を行ったグループ)は薬剤処理を施さなかった場合と同様に~28 塩基のピークが検出された

(Fig. 1-1)。このリボソームフットプリントの分布は先行研究で観測された結果と類似した傾向であった(Mohammad et al., 2016; Mohammad et al., 2019)。一方で第二グループ(カプレオマイシン、バイオマイシンおよびスペクチノマイシンで処理を行ったグループ)では 35-40 塩基の既報よりも長いリボソームフットプリントが観測された (Fig. 1-1)。また、各翻訳阻害剤の作用機序に着目したところ、各グループは翻訳阻害剤の作用機序に基づいて分類されることがわかった。第一グループの翻訳阻害剤(クロラムフェニコール、リネゾリド、ブラストサイジン)は 50S サブユニットの PTC に結合し、ペプチド結合を阻害する。結果リボソームは Non-rotated state で安定化する(Wilson et al., 2008; Bulkley et al., 2010; Dunkle et al., 2010; Svidritskiy et al., 2013)。一方で第二グループの翻訳阻害剤(カプレオマイシン、バイオマイシン)は 30S サブユニットに位置する 16S rRNA のデコーディングセンターに結合し、mRNA と tRNA の転座を阻害することが知られている(Ermolenko et al., 2007; Cornish et al., 2008; Stanley et al., 2010; Dunkle et al., 2011; Wang et al., 2012)。また、スペクチノマイシンは 30S 小サブユニットの head ドメインの近傍に結合し(Borovinskaya et al., 2007; Carter et al., 2000)、サブユニットの回転後の head ドメインの旋回を阻害し、最終的にリボソームを Rotated state で安定化させる。つまり翻訳阻害剤の作用機序に伴うリボソームの構造状態の変化がリボソームフットプリントの長さを変化させることが示唆された。また、リボソームフットプリントの伸長現象は翻訳阻害剤の濃度依存的であることからリボソームフットプリントがリボソームの構造状態を反映していると考えられる (Fig. 1-2)。次に新たに長いリボソームフットプリントが観測された第二グループに着目すると、全ての翻訳阻害剤でリボソームフットプリントの伸長は観測されたが、スペクチノマイシンが伸長に与える影響は他の翻訳阻害剤と比べ弱かった。これはリボソームを Rotated state で安定化させる作用機序が他の翻訳阻害剤と異なることに起因するものと考えられる。

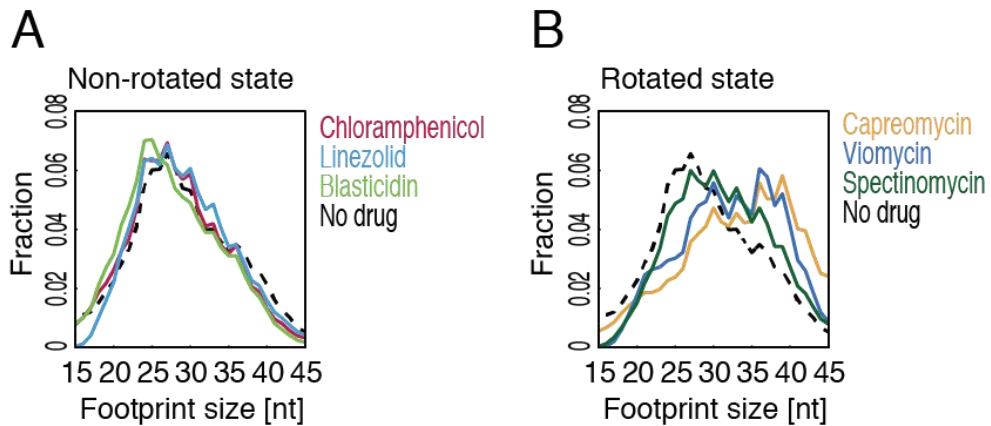


Fig. 1-1: 翻訳阻害剤依存的に異なる長さのリボソームフットプリントが産み出される。ペプチド転移阻害剤 (A) と転座阻害剤 (B) を用いたリボソームプロファイリング法でのリボソームフットプリントのサイズ分布。

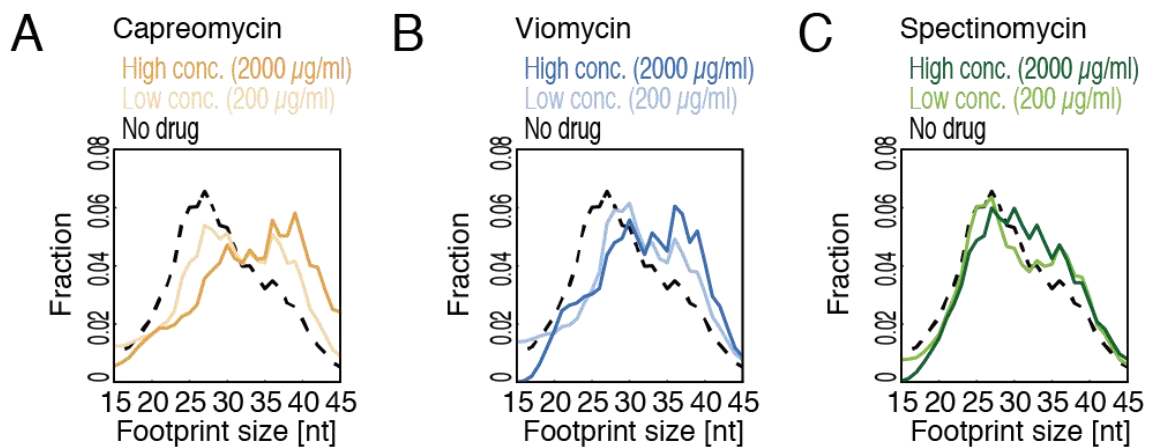


Fig. 1-2: リボソームフットプリントの長さは翻訳阻害剤の種類によって変化する。カプレオマイシン (A)、バイオマイシン (B)、スペクチノマイシン (C) を低濃度および高濃度で処理した際のリボソームフットプリントの長さの分布。

2.2. ロングフットプリントはリボソームフットプリント様の挙動を示す

次に伸長したフットプリントについて詳細な解析を行うため、リボソームフットプリントをショートフットプリント (23-28 塩基) とロングフットプリント (35-40 塩基) に分類しメタジーン解析を行った。メタジーン解析はすべての CDS 上のリードの分布の平均的な挙動を示したものである。メタジーン解析の結果より、カプレオマイシン処理ではクロラムフェニコール処理と比較してロングフットプリントが CDS 全体に多く分布しているのが観測された (Fig. 1-3)。すなわち、カプレオマイシン処理によって生じたロングフットプリントは CDS 全体に由来することがわかった。さらにロングフットプリントは 3 塩基周期性の挙動を示していることから、ショートフットプリントと同様に翻訳伸長中のリボソームが 1 コドンずつ (3 塩基ずつ) mRNA 上を動くことを反映していると考えられる。次にロングフットプリントのリードが特定の CDS に偏っていないか確認を行った。各 CDS 上のフットプリントのリード数をショートフットプリント (23-28 塩基) とロングフットプリント (35-40 塩基) に分けて比較したところ顕著な偏りは観測されなかった (Fig. 1-4 (A))。またカプレオマイシン処理のロングフットプリントとクロラムフェニコール処理のショートフットプリントを用いて各コドン上に蓄積するフットプリントの平均値を算出したが特定のコドン特異的にリボソームを mRNA 上に固定することもなかった (Fig. 1-4 (B))。以上の結果から、カプレオマイシンはすべての転写産物のすべてのコドン上のリボソームのリボソームフットプリントを伸長させることが示された。

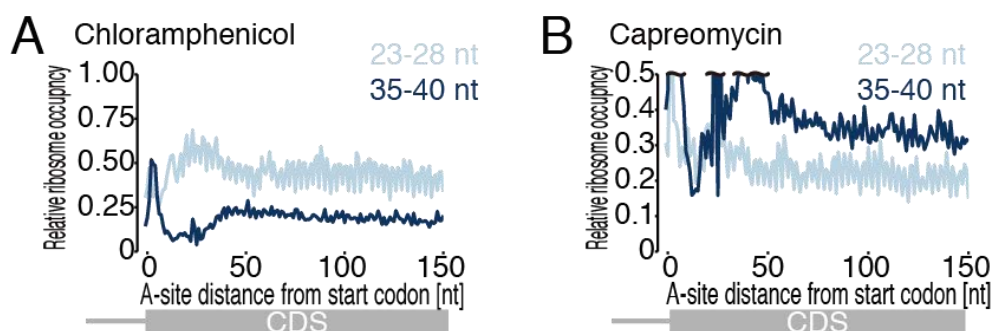


Fig. 1-3: クロラムフェニコール処理 (A) とカプレオマイシン処理 (B) でのフットプリントの長さごとの開始コドン周辺のリボソームフットプリントのマッピング状況。

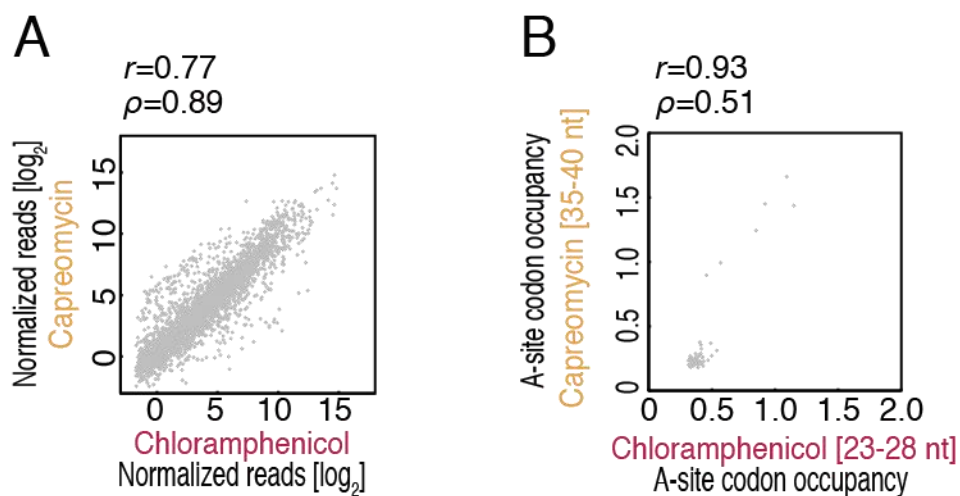


Fig. 1-4: (A) カプレオマイシンとクロラムフェニコールで処理したサンプルの CDS 上にマップされるリボソームフットプリントの相関。(B) カプレオマイシン処理のロングフットプリントとクロラムフェニコール処理のショートフットプリントの A site に対応するコドンのリボソーム占有率の相関。r: Pearson's correlation, ρ : Spearman's rank correlation。

2.3. クライオ電子顕微鏡を用いた翻訳阻害剤処理を行ったリボソームの構造状態解析

本研究におけるリボソームプロファイリングの条件でリボソームが予期した構造状態で安定化しているか確認するためにクライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析を行った (Fig. 1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10、表 1)。解析は東北大学 横山武司助教に行っていただいた。取得した 70S リボソームの 3D 分類ではカプレオマイシンで処理されたリボソームの大部分 (52%) が 2 つの tRNA がそれぞれハイブリッドに位置し (P/E、A/P site)、リボソームは Rotated state であった (Fig. 1-5 (B)、Fig. 1-6 (B))。カプレオマイシンの明確な密度が 16SrRNA のデコーディングセンターに観測された (Fig. 1-6 (B))。またカプレオマイシンが安定的に結合することで、コドンの正確な読み取りに重要な A1492 と A1493 が反転していた。カプレオマイシンの作用機構は *Thermus thermophilus* の 70S を用いた構造解析のみ構造状態が明らかにされていたが (Stanley et al., 2010)、本構造解析にて大腸菌 70S でも先行の *T. thermophilus* の 70S を用いた構造解析と一致する結果が得られた (Stanley et al., 2010)。

一方でクロラムフェニコール処理した大腸菌 70S はリボソームフットプリントの長さから予想される通り Non-rotated state であった (Fig. 1-5 (A)、Fig. 1-6 (A))。また、かなり低い電子密度の A/P tRNA が付随した、P/E tRNA-70S 複合体が Rotated state で観測された (Fig. 1-7、1-9、1-10、1-11、1-12)。この構造状態は tRNA が P site から E site に移動する過程でクロラムフェニコールがリボソームに結合すれば可能であるが、頻繁に起こりうる構造状態ではないと考えられる。したがって、これらの結果より、翻訳阻害剤によって固定されたリボソームの構造状態はリボソームフットプリントの長さの変化と対応していることが示唆された。

2.4. リボソームプロファイリングによるフットプリントの長さの違いに基づく翻訳一時停止位置でのリボソームの構造状態の分類

次にリボソームフットプリントのサイズとリボソームの構造状態が特定の mRNA の特定のコドン上でも適用可能か解析を行った。解析対象には既知の翻訳停止配列を用いた。従来のリボソームプロファイリングでは翻訳阻害剤によってリボソームを特定の構造状態に固定してしまう。そこで細胞内のリボソームの構造状態を反映させるため、翻訳阻害剤未処理のリボソームプロファイリングを行った。*tnaC* 遺伝子上ではリボソームの A site が終止コドンに到達した時点で翻訳一時停止を生じることが知られている。リボソームがこの位置に到達すると二つの L-トリプトファン分子が新生鎖とリボソーム出口トンネルで形成された空間に入り込み、リボソームを Non-rotated state で翻訳停止させる (Gong et al., 2001; Bischoff et al., 2014)。*tnaC* の CDS 内のリボソームフットプリントのリードの分布を見ると、翻訳一時停止位置に 23-28 塩基の短いリボソームフットプリントの蓄積が観測された (Fig. 1-12 (A))。すなわちリボソームは Non-rotated state で翻訳一時停止していると予想される。よって、先行の構造解析による知見と構造状態が一致した。

2 番目の例として *secM* での翻訳一時停止にも着目して解析を行った。*secM* を翻訳中のリボソームは 166 番目のアミノ酸である Pro が A site に到達した際に翻訳一時停止を生じる (Nakatogawa and Ito, 2001; Nakatogawa and Ito, 2002; Muto et al., 2006; Zhang et al., 2015)。この際、新生鎖とリボソーム出口トンネルが相互作用するなどして PTC での反応に遅延が生じ、peptidyl-tRNA が A/P のハイブリッドな状態で翻訳一時停止を引き起こす (Zhang et al., 2015)。結果的にリボソームは Non-rotated state と Rotated state の二つの構造状態を取りうる (Zhang et al., 2015)。該当の翻訳停止位置のリボソームフットプリントを解析した結果、*secM* の翻訳停止位置からはロングおよびショートフットプリントの両方の蓄積が観測され、構造解析の結果と一致した (Fig. 1-12 (B))。これらの結果より、リボソームフットプリントの長さの違いによって翻訳一時停止位置でのリボソームの構造状態を判別できることが示された。

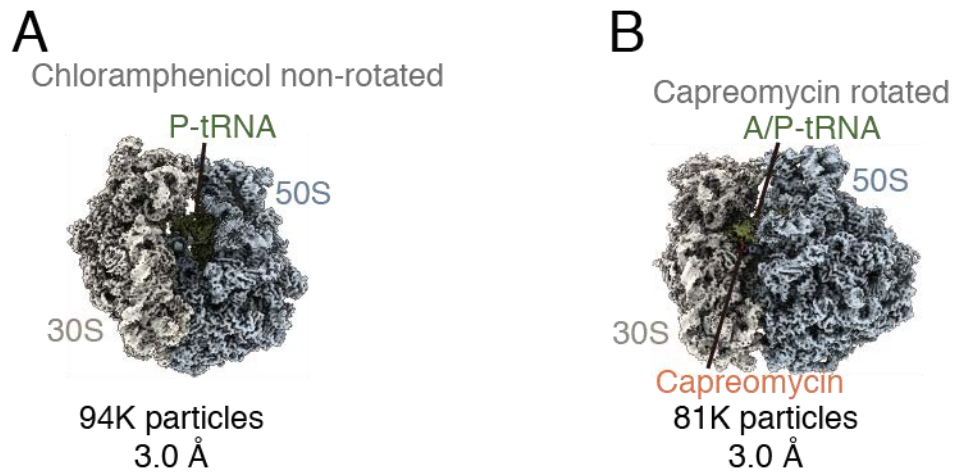


Fig. 1-5: クライオ電子顕微鏡を用いたクロラムフェニコール (A) とカプレオマイシン処理 (B) でのリボソームの構造解析。

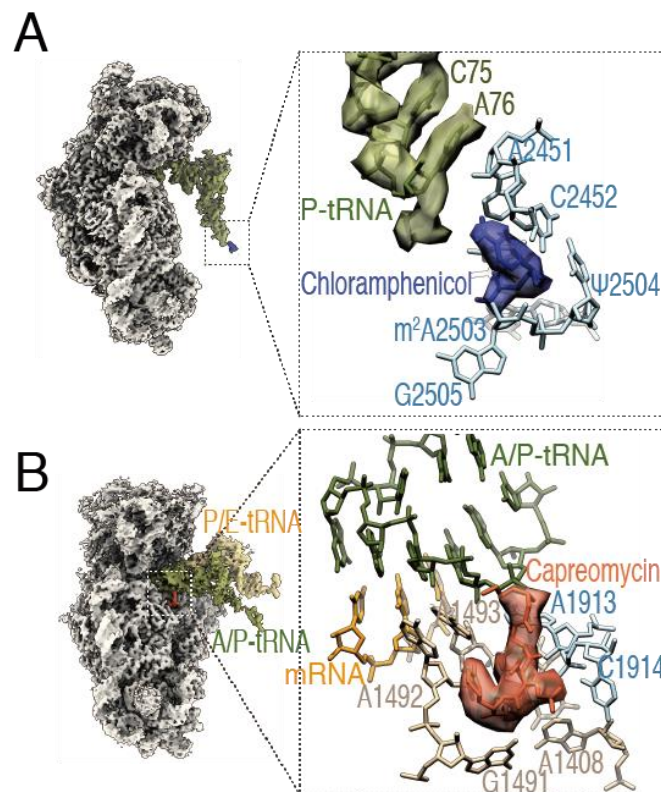


Fig. 1-6: (A) クロラムフェニコールが結合した PTC の拡大図。詳細を示すため 50S サブユニットを取り除いてある。(B) カプレオマイシンが結合した 16S デコーディングセンターの拡大図。詳細を示すため 50S サブユニットを取り除いてある。

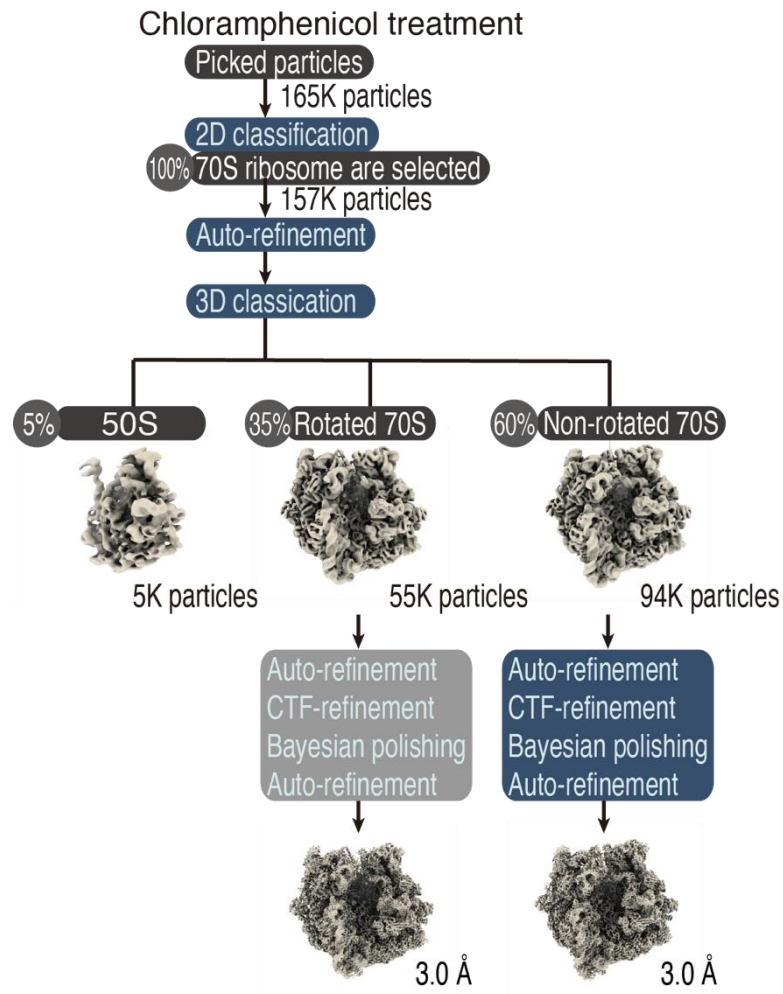


Fig. 1-7: 翻訳阻害剤で構造状態を安定化させたリボソームのクライオ電顕での構造解析。クロラムフェニコール処理を行った 70S リボソームの画像プロセッシング。

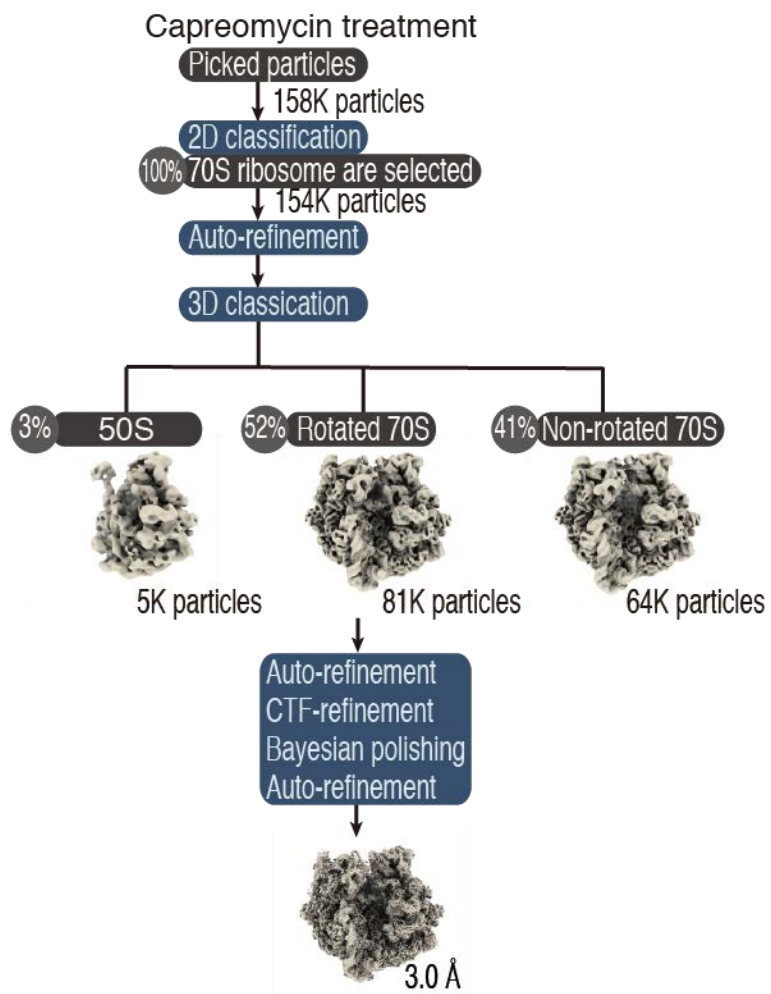


Fig. 1-8: 翻訳阻害剤で構造状態を安定化させたリボソームの構造解析。カプレオマイシン処理を行った 70S リボソームの画像プロセッシング。

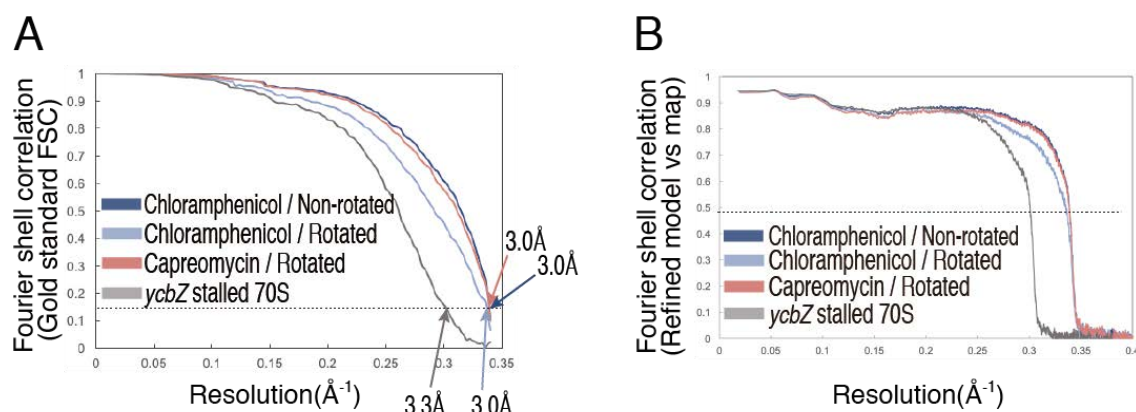


Fig. 1-9: クライオ電子顕微鏡による4つの構造 (A) のモデルとクライオ電子顕微鏡によるマップ (B) のフーリエシェルの相関曲線。

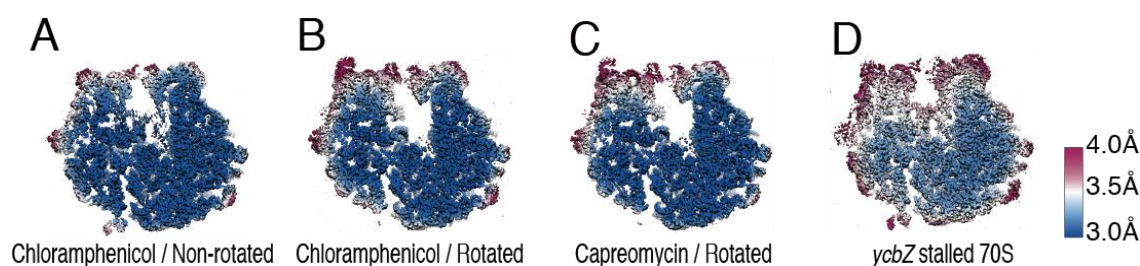


Fig. 1-10: クライオ電子顕微鏡の局所解像度分布。クロラムフェニコールの Non-rotated state (A)、クロラムフェニコールの Rotated state (B)、カプレオマイシンの Rotated state (C)、*ycbZ* 翻訳一時停止リボソーム (D)。

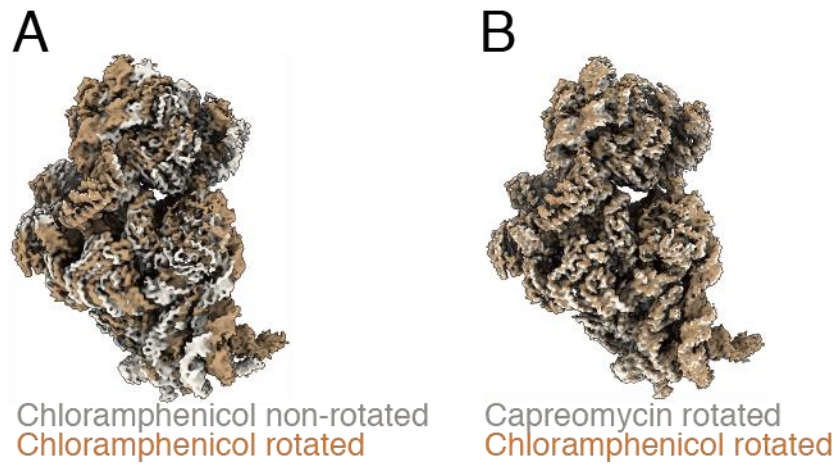


Fig. 1-11: クロラムフェニコールが結合した Non-rotated state と Rotated state の 70S リボソームの構造比較 (A) とカプレオマイシンが結合した Rotated state と クロラムフェニコールが結合した Rotated state の構造比較 (B)。2 つの構造は 50S サブユニットを基準に整列させ、30S サブユニットのみ表示した。

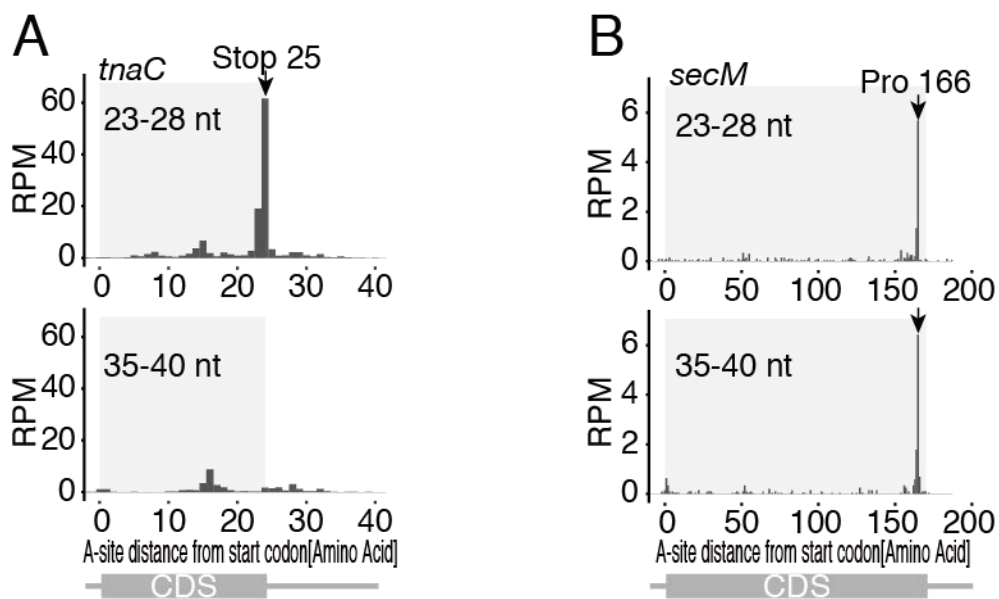


Fig. 1-12: *tnaC* (A) と *secM* (B) の A-site に対応するフットプリントの分布。図内で示した長さのフットプリントを描写した。既知の翻訳一時停止位置を矢印で示す。RPM: reads per million mapped reads

表 1: Cryo-EM data collection, model building, refinement, and validation statistics.

	(Chloramphenicol/ Nonrotated)	(Chloramphenicol/ Rotated)	(Capreomycin/ Rotated)	(ycbZ-stalled)
Data collection and processing				
Magnification	23,500			
Voltage (kV)	200			
Electron exposure (e ⁻ /Å ²)	50			
Defocus range (μm)	0.5-3.0		0.5-3.5	1.0-3.0
Pixel size (Å)	0.735		0.735	1.47
Symmetry	C ₁			
Initial particle images (no.)	164,655		158,017	77,002
Final particle images (no.)	94,218	54,801	80,606	40,231
Map resolution (Å)	3.0	3.0	3.0	3.3
FSC threshold	0.143	0.143	0.143	0.143
Map sharpening <i>B</i> factor (Å ²)	-33.52	-31.28	-34.78	-64.57
Refinement				
Model composition				
Non-hydrogen atoms	146,057	146,057	146,277	145,941
Protein residues	5,949	5,949	5,949	5,951
RNA residues	4,645	4,645	4,654	4,639
R.m.s. deviations				
Bond lengths (Å)	0.005	0.006	0.009	0.010
Bond angles (°)	0.663	0.701	0.815	0.884
Validation				
MolProbity score	2.26	2.33	2.34	2.26
Clashscore	14.79	16.68	17.11	12.63
Poor rotamers (%)	0.04	0.12	0.31	0.29
RNA pucker outliers (%)	0	0	0	0
Ramachandran plot				
Favored (%)	88.83	87.84	87.55	85.70

Allowed (%)	10.74	11.73	11.94	13.82
Disallowed (%)	0.43	0.43	0.51	0.48

3. ロングフットプリントはショートフットプリントに比べて、5'末端側が長い

3.1. ロングフットプリントの伸長方向の解析

次にリボソームフットプリントが Rotated state の時にのみ伸長するメカニズムを明らかにすることを目的とし、解析を行った。ロングフットプリントがリボソームに対して相対的に伸長する方向は 5'方向と 3'方向の 2つの可能性が考えられる。そこでまず、どちらの方向にリボソームフットプリントが伸長しているか明らかにするために、終止コドン周辺に蓄積したリボソームフットプリントを 5'端及び 3'端から描画し比較検討を行った。一般的に終止コドン上には翻訳終結反応前のリボソーム由来のリボソームフットプリントが蓄積し、リードがピークとして検出される。よって終止コドン上に存在するリボソームは 5'端から描画した際に検出されるピークと 3'端から描画した際に検出されるピークの間に位置することがわかる (Fig. 2-1)。クロラムフェニコール処理のショートフットプリントとカプレオマイシン処理のロングフットプリントに対し上記解析を行ったところ、3'端から描画した際は同じ位置にピークが観測されるのに対し、5'端から描画した際にはカプレオマイシン処理のロングフットプリントは 5'端方向にピークがシフトした (Fig. 2-1)。これは終止コドン上のリボソームの位置は変わらないことを考慮すると、5'端方向にリボソームフットプリントが伸長したことを示す。すなわちリボソームフットプリントの長さの違いは 5'端起因していることがわかった。なお大腸菌のリボソームプロファイリングで 5'端の長さが変化に富むことは先行の研究においても指摘されており (Woolstenhulme et al., 2015; Mohammad et al., 2016; Mohammad et al., 2019)、本研究による解析結果と一致した。

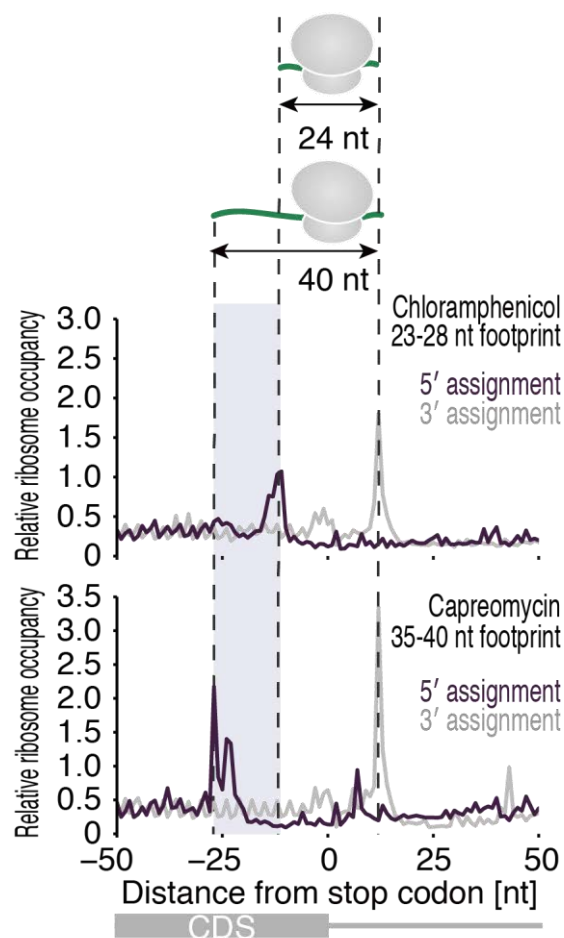


Fig. 2-1: S1 タンパク質はリボソームが Rotated state の時にリボソームフットプリントを伸長させる。終止コドン周辺でのリボソームフットプリントの 5' と 3' 端のメタジーン解析。クロラムフェニコール処理のショートフットプリント (23-28 塩基) (上段)、カプレオマイシン処理でのロングフットプリント (35-40 塩基) (下段) をそれぞれ示す。

3.2. S1 タンパク質はリボソームが Rotated state のときリボソームフットプリントの 5' 端を保護する

リボソームフットプリントの 5' 端の長さがリボソームの構造状態に呼応して変化することから、リボソームの mRNA 出口チャネル近傍に存在する何らかの因子が RNase の感受性に影響を与えていることが予想される。そこでまず 30S 出口チャネル近傍に位置する S1 リボソームタンパク質(Byrgazov et al., 2015; Demo et al., 2017; Beckert et al., 2018)に着目して解析を行うことにした。S1 は RNA 結合タンパク質で 6 つの OB-fold ドメインから構成される。最初の 2 ドメインは 30S サブユニットに直接結合し(Byrgazov et al., 2015)、それに連なる 4 つのドメインが RNA 結合能を持ち(Boni et al., 1991; Sengupta et al., 2001; Qu et al., 2012; Duval et al., 2013)、約 10 塩基の RNA と結合する(Qu et al., 2012)。これはリボソームフットプリントが約 10 塩基程度伸長することと一致する。そこで S1 がリボソームフットプリントの伸長に影響を与えているか検討するために、S1 の変異株を用いて解析を行うことにした。しかし S1 タンパク質は必須のタンパク質であるため完全に欠損させることはできない。一方で RNA 結合ドメインである 5 番目と 6 番目のドメインは欠損させても生育が可能である。そこで生育が可能な S1 の部分欠損株 $\Delta 6$ 株および $\Delta 56$ 株(Duval et al., 2013) (Fig. 2-2、2-3)を用いてリボソームプロファイリングを行い、そのリボソームフットプリントの長さの分布の変化について検証を行った。結果、リボソームを Rotated state で安定化させる capreomycin で処理した際に $\Delta 56$ 株のロングフットプリントが減少した (Fig. 2-4 (B))。一方でリボソームを Non-rotated state で安定化させるクロラムフェニコールで処理した際には野生株—変異株間でリボソームフットプリントの長さに大きな差は見られなかった (Fig. 2-4 (A))。以上の結果より S1 タンパク質がリボソームの構造変化依存的にリボソームフットプリントを伸長させることが示唆された。

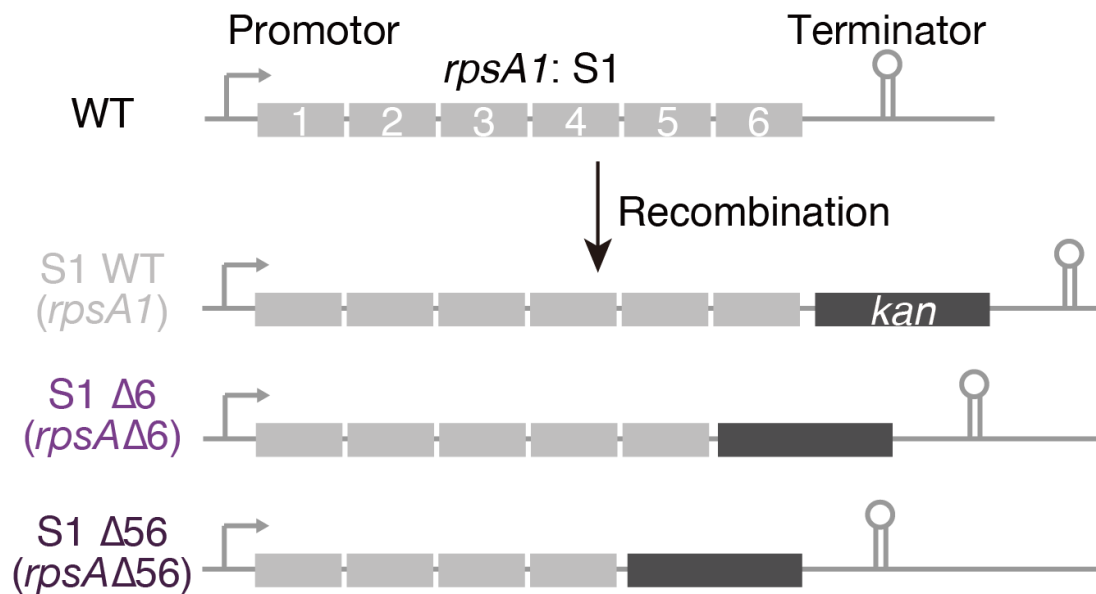


Fig. 2-2: S1 部分欠損株の概略図。内在の S1 欠損領域は kanamycin (kan) cassette に置き換えられている。

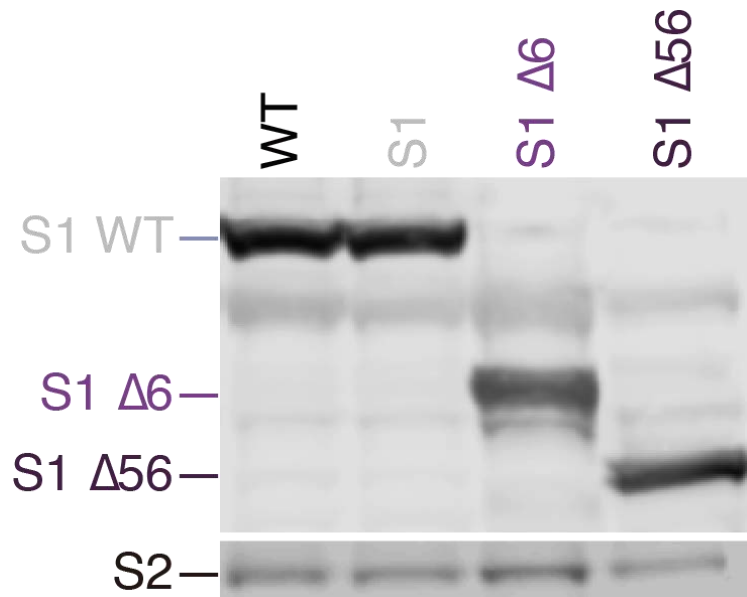


Fig. 2-3: 変異株の S1 タンパク質のウェスタンブロッティング。S1 抗体を用いて検出を行った。S1 部分欠損株（S1 $\Delta 6$ 株、S1 $\Delta 56$ 株）は S1 全長株よりも低い分子量にバンドが観測された。

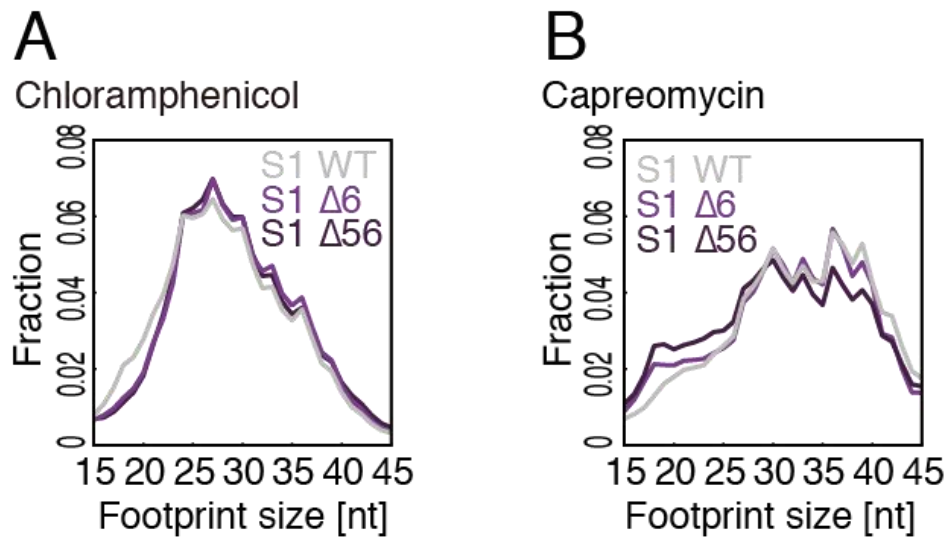


Fig. 2-4: S1 WT、S1 $\Delta 6$ 、S1 $\Delta 56$ 株のクロラムフェニコール処理 (A) とカプレオマイシン処理 (B) でのリボソームフットプリントの長さの分布。

3.3. UV-C crosslinking immunoprecipitation sequencing with an infrared labeled linker (irCLIP-seq)による、翻訳伸長中の 70S に結合する S1 と mRNA の相互作用解析

これまで S1 タンパク質は開始コドン上流に存在する U リッチな領域と結合することで 30S を mRNA に引きつけ、開始コドンの認識を促進する機能を持つと考えられてきた(Duval et al., 2013)。本研究により明らかにした、S1 によるリボソームフットプリントの伸長現象は 70S を構成する S1 が翻訳開始のみならず、翻訳伸長反応中にも mRNA と相互作用することを示す。そこで翻訳伸長中の S1 の役割についてさらに詳細な解析を行うため、UV-C crosslinking immunoprecipitation sequencing with an infrared labeled linker (irCLIP-seq) (Zarnegar et al., 2016)による mRNA と S1 の相互作用解析を行った (Fig. 2-5)。本手法では S1 と相互作用する mRNA 配列を次世代シーケンサーで網羅的に特定することができる。irCLIP-seq を行った結果、従来の知見通り翻訳開始領域の上流に多くのリードが観測された。観測されたピークの位置は開始コドンの上流約 20 塩基であることから 30S リボソームに結合した S1 の位置と一致する(Boni et al., 1991) (Fig. 2-6)。また 5'UTR に加えて、irCLIP-seq のリードは CDS 領域内からも検出された。これにより S1 は 70S が翻訳伸長中にも mRNA と相互作用することが示唆された (Fig. 2-6)。次にカプレオマイシン処理によるリボソームの構造変化に伴い、S1 が mRNA との相互作用を強めているか検証するために、終止コドン周辺のメタジーン解析を行った。解析ではクロラムフェニコール処理に対するカプレオマイシン処理の irCLIP-seq のリードの割合を算出した。結果、Rotated state 由来のロングフットプリントの 5'端の伸長領域と一致する位置にカプレオマイシン処理による irCLIP-seq のリードの増幅が観測された (Fig. 2-7)。以上より、リボソームが Rotate state の状態のとき、S1 はリボソームの mRNA 出口チャネル付近の mRNA と相互作用する確率が高まることが示唆された。そしてこの S1 と mRNA の相互作用が RNase の感受性を変化させ 5'方向に伸長したリボソームフットプリントを生み出していると考えられる。

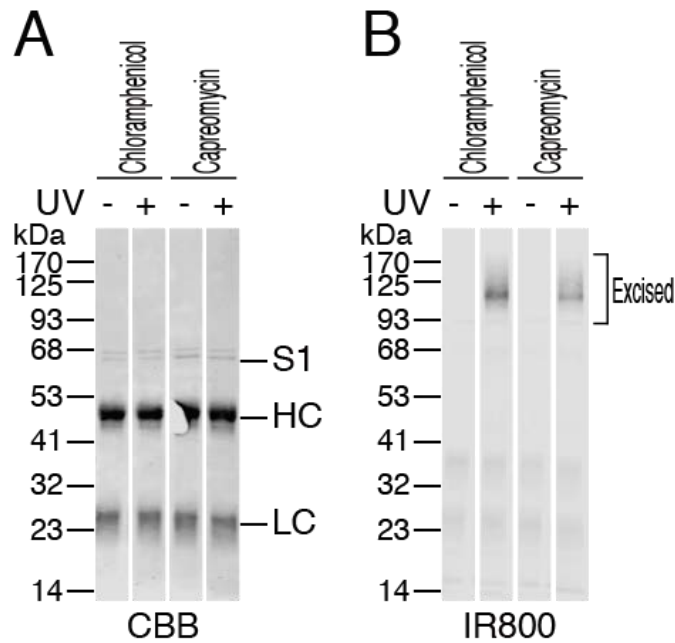


Fig. 2-5: S1 irCLIP の解析結果。免疫精製された S1 タンパク質 (A) と IR800-labeled linker の結合によってバンドシフトした RNA (B)。HC: 抗体重鎖、LC: 抗体軽鎖。CBB: Coomassie Brilliant Blue。

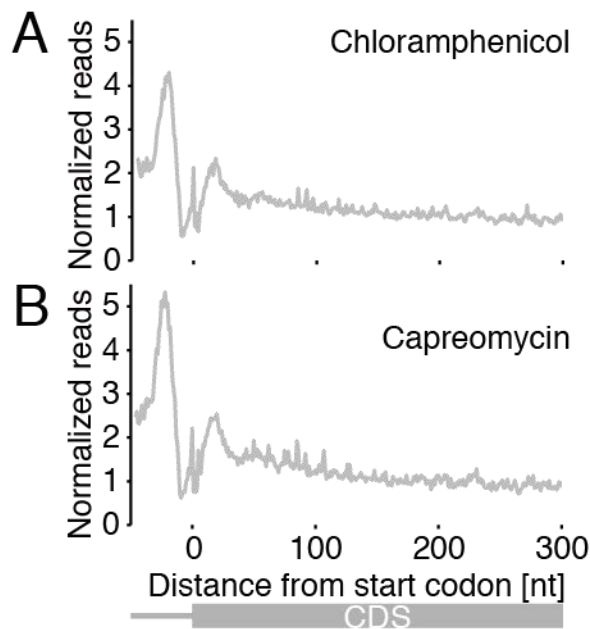


Fig. 2-6: クロラムフェニコールとカプレオマイシン処理による S1 irCLIP-seq の開始コドン周辺のメタジーン解析。5'端付近の解析結果を記載した。

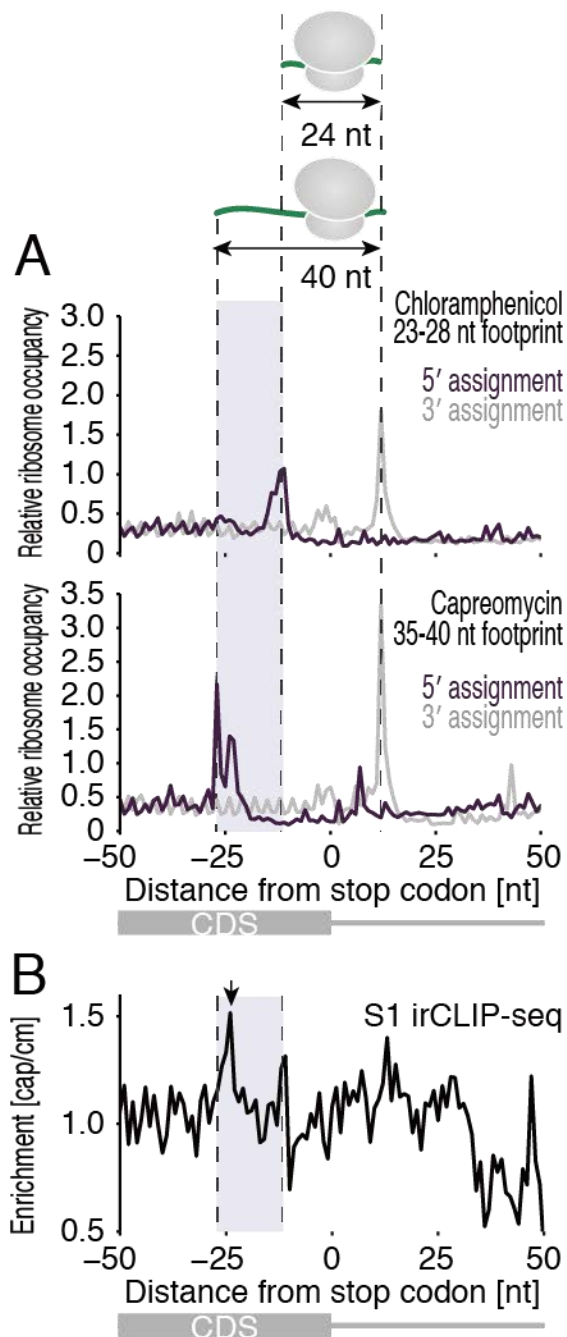


Fig. 2-7: S1 irCLIP-seq での終止コドン周辺のカプレオマイシン処理 (cap) に対するクロラムフェニコール処理 (cm) のリードのエンリッチメント解析 (B)。5' 端を示す。(A) は Fig.2-1 と同様の図。フットプリントの伸長領域とエンリッチした位置が対応する箇所を黒矢印で示す。先に示した Fig. 2-1 でのリボソームフットプリント伸長領域と一致する。

4. S1 タンパク質は長い CDS でリボソームの翻訳伸長反応を促進する

4.1. リボソームプロファイリング法を用いた S1 が翻訳伸長に与える影響の解析

70S を構成する S1 は翻訳伸長中にも CDS 内において mRNA と相互作用する (Fig. 2-6) ことから、S1 は翻訳開始だけでなく伸長にも影響を与えることが考えられる。そこでこの可能性を検証するために Polarity score という計算手法 (Schuller et al., 2017) を用いて全 mRNA 上に存在するリボソームの分布を計算した。Polarity score はリボソームフットプリントから得られるリボソームの位置情報を元に mRNA 上のリボソームの分布の偏りを算出したものである。リボソームが CDS 内に均一に分布している場合には 0 を示す。一方で翻訳伸長中に一時停止や、途上終結が生じるとリボソームの分布が 5' 端側に偏り、Polarity score は負の値を示す。反対にリボソームの分布が 3' 端側に偏った場合には Polarity score は正の値を示す。実際に Polarity score を算出した結果、S1 Δ 56 株は S1 WT 株と比較して、300 コドン以上の長い CDS では Polarity score が低い値を示すことがわかった (Fig. 3-1)。すなわち S1 Δ 56 株では翻訳の遅延、あるいは翻訳が途中で中断している可能性が考えられる。

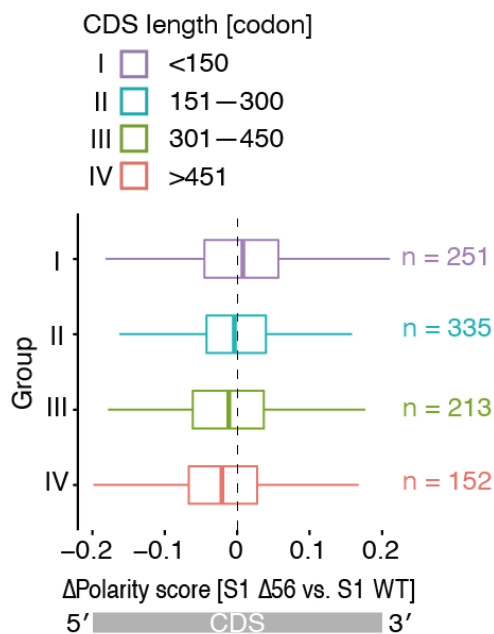


Fig. 3-1: S1 は長い CDS の翻訳を促進する。S1 WT 株に対する S1 Δ 56 株のリボソームフットプリントの Polarity score の差。CDS を長さに基づき、4 つのグループに分けた。n は各グループの解析対象の遺伝子数を表す。

4.2. *in vitro* 翻訳系を用いた S1 が翻訳伸長に与える役割の検証

上記で示した結果についてさらに詳しく検証を行うため、S1 を生化学的に除去したリボソームを用いた *in vitro* 翻訳系を構築し実験を行った。S1 除去リボソームは PolyU Sepharose 4B (GE Healthcare) を用いて PURE flex1.0 (GeneFrontier) のリボソーム 溶液から S1 タンパク質を取り除くことで調整した。また、S1 が翻訳開始へ与える影響を取り除くため、ホタルルシフェラーゼの上流に S1 非依存的に翻訳開始を行う *sodB* の 5'UTR(Duval et al., 2013)を導入したレポーターを構築した (Fig. 3-2 (上段))。GFP を連続で導入し CDS 領域を伸長させたレポーターは、S1 の除去によって翻訳伸長の減衰が生じ、タンパク質の合成量が減少した (Fig. 3-2 (下段))。また、S1 組み換えタンパク質を *in vitro* 翻訳系に補填することによってこの減衰は回復した (Fig. 3-2 (下段))。今回の実験系では S1 除去の処理自体は翻訳に大きな影響を与えなかった。これは他のリボソームタンパク質でも見られたように(Chadani et al., 2017)、PURE system の S1 タンパク質が製品製造段階で脱落していることが要因であると考えられる (Fig. 3-3)。以上の結果をまとめると、S1 は翻訳伸長中のリボソームが Rotated state の際に mRNA と結合し、タンパク質合成を促進することが示唆された。

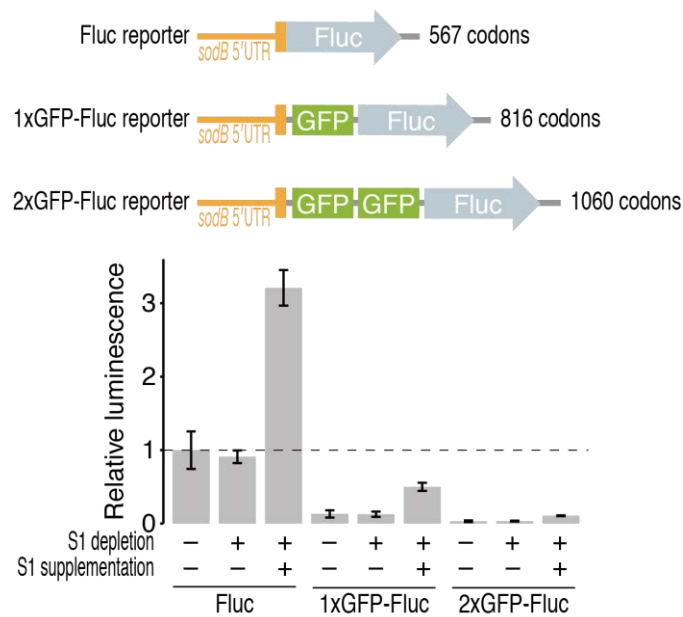


Fig. 3-2: レポーターの構成の概略（上段）。S1 非依存的に翻訳開始配列である *sodB* 5' UTR をホタルルシフェラーゼ（Fluc）の上流に配置した。CDS の長さを伸長させるため GFP を 1~2 個ホタルルシフェラーゼの上流に配置した。これらのレポーターを *in vitro* 翻訳系を用いて S1 除去リボソームで翻訳させた（下段）。棒グラフは $n=3$ の平均および S.D.を示す。

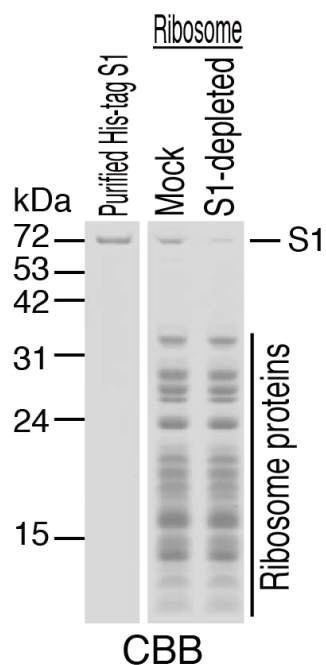


Fig. 3-3: polyU ビーズを用いた S1 の生化学的除去。CBB: Coomassie Brilliant Blue。

5. リボソームの構造状態以外でのリボソームフットプリント伸長現象の可能性の検討

5.1. リボソームプロファイリング法のデータを用いたロングフットプリントの発生メカニズムの検討

これまでの解析によりリボソームのサブユニット間の構造変化が異なる長さのリボソームフットプリントを生み出していることを示した。しかし、それ以外の理由でもリボソームフットプリントが伸長する可能性が考えられる。例えば mRNA の SD 配列は 30S サブユニットを構成する 16SrRNA に存在する anti-SD 配列と分子間二重鎖構造を形成し(Kaminishi et al., 2007)、RNase 処理から保護される(Mohammad et al., 2016; Mohammad et al., 2019)。実際、本研究で用いるリボソームプロファイリングライブラリーでも SD 配列様の G を豊富に含む配列 (UGG) では 16S rRNA が位置する 20-25 塩基下流にてロングフットプリントの蓄積が観測された (Fig. 4-1)。このようなロングフットプリントはショートフットプリントと比較して少数であるがクロラムフェニコール処理を行った際にも検出される。実際、ガウス分布の公式でフィッティングを行うと約 25 塩基にピークをもつ画分と約 35 塩基にピークをもつ画分の二峰性を示す (Fig. 4-2)。すなわち、リボソームの構造変化以外の原因によってもリボソームフットプリントが伸長する可能性がある。

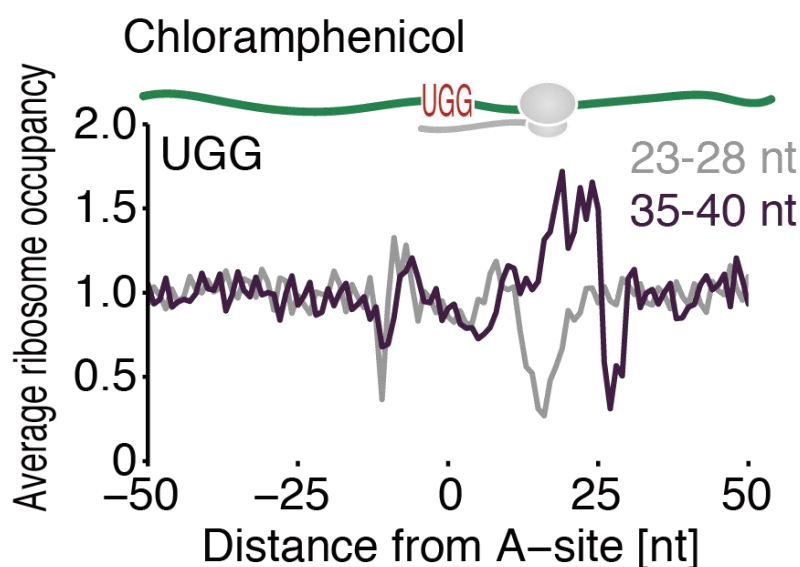


Fig. 4-1: SD 様配列 UGG 周辺のロングフットプリントとショートフットプリントの相対量の解析。

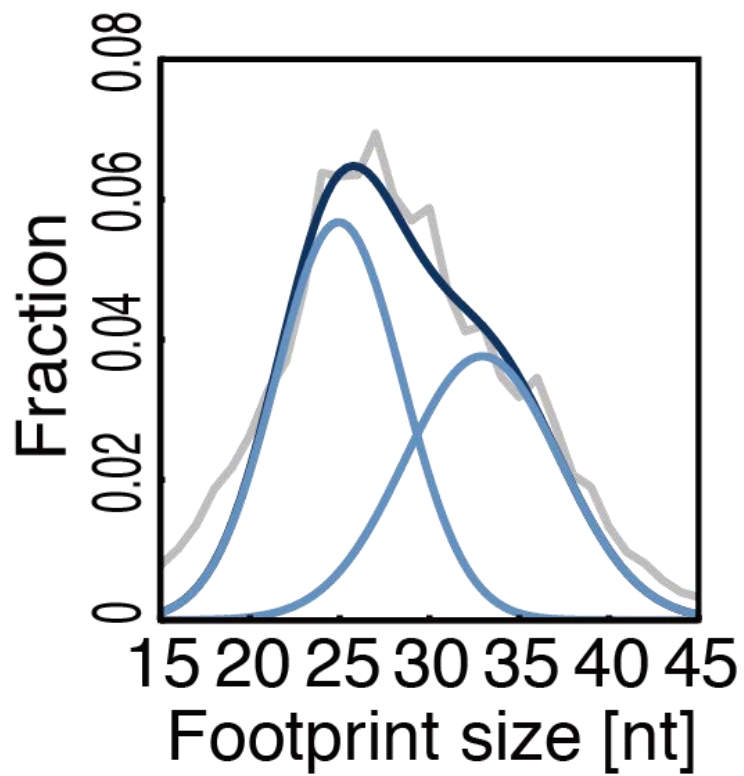


Fig. 4-2: クロラムフェニコール処理のリボソームフットプリントの長さの分布。分布はガウス分布によって2つの分布にフィッティングされた（濃青）。2つの分布のピークは~25 塩基と~35 塩基に位置する。

5.2. ロングフットプリントが蓄積したコドンの網羅的探索

そこでリボソームの構造変化以外にリボソームフットプリントが伸長する機構を探索するため、翻訳阻害剤非依存的にロングフットプリントが生じる特定の mRNA の特定のコドンをゲノムワイドに探索した。翻訳阻害剤によるリボソームの構造変化に伴うリボソームフットプリントの長さの変化を考慮して、翻訳阻害剤未処理のリボソームプロファイリングライブラリーを用いた。ロングフットプリントとショートフットプリントの画分に分類し、リボソームの *Pause score* を算出した(Schuller et al., 2017)。*Pause score* はある mRNA にマップされるリード数の平均に対するリボソームの A-site に対応するコドン上のリード数の割合で算出される (詳細は実験手法の章を参照) (Fig. 4-3)。解析の結果より、ロングフットプリントが多く蓄積した 64 コドンの翻訳停止位置を特定した (Fig. 4-3)。また、これらのコドン上に蓄積したロングフットプリントが構造変化非依存的に生じているか、確認を行うため、クロラムフェニコール処理のライブラリーを使用し、各コドン上のショートフットプリントに対するロングフットプリントの割合を算出した (Fig. 4-4)。これらの翻訳停止位置の多くはクロラムフェニコール処理後もショートフットプリントには移行することなくロングフットプリントの蓄積が観測された (Fig. 4-4)。すなわち、これらのコドン上に蓄積したロングフットプリントはリボソームの構造変化非依存的に生み出されることが示唆された。また翻訳停止位置のロングフットプリントのなかには翻訳停止位置の上流に位置する配列と 16S rRNA 間の自由エネルギー (ΔG) が低いものがあり、これらの翻訳停止位置では SD 配列様の配列がフットプリントの伸長に影響を与えた可能性がある (Fig. 4-5、赤い点線より低い ΔG 値を示す遺伝子群)。しかし *ycbZ* などの翻訳停止位置では anti-SD 配列と相互作用の安定性は低く、SD 配列様の配列による説明だけではリボソームフットプリントの伸長現象を説明することは困難である (Fig. 4-5、上段黒い点線より高い ΔG 値を示す遺伝子群)。よってリボソームフットプリントを伸長させるその他の分子メカニズムが存在することが想定される。

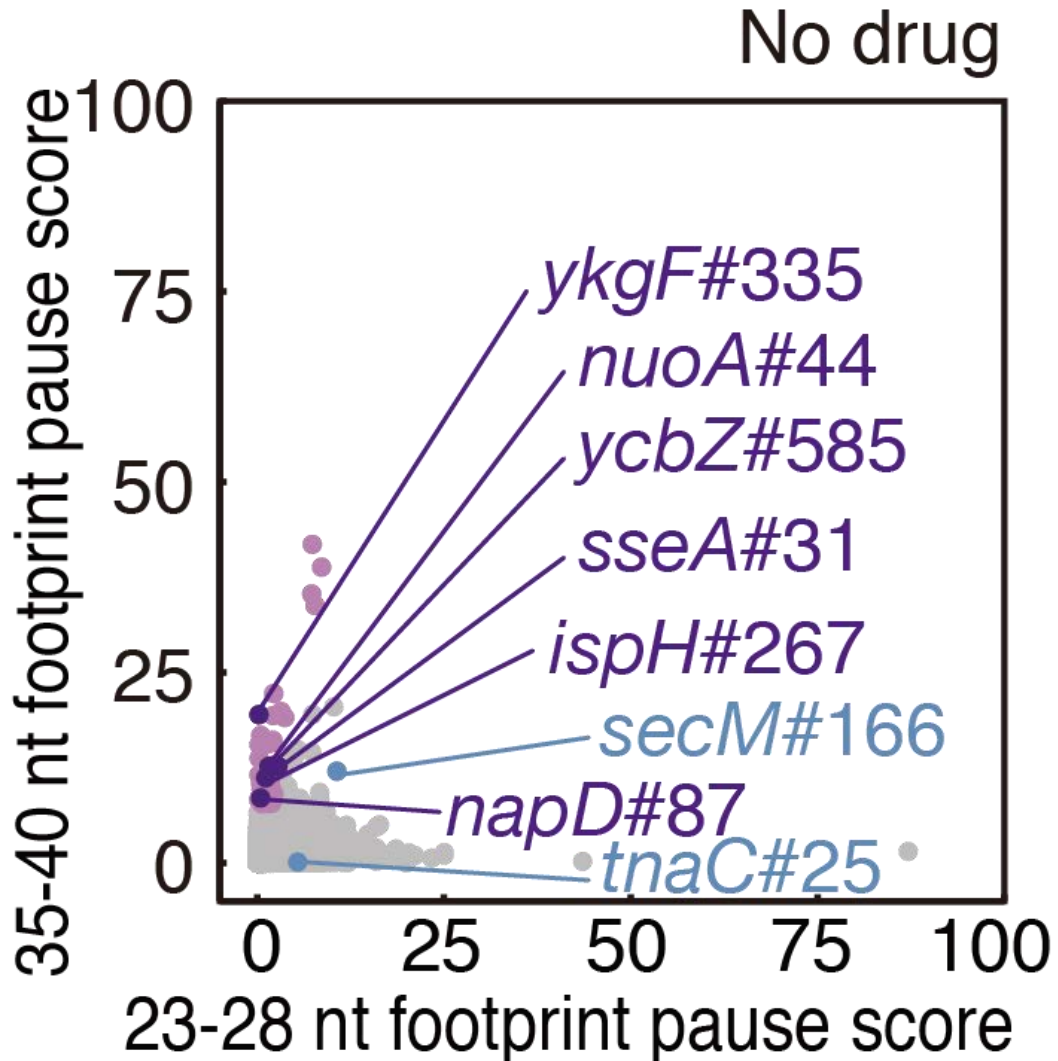


Fig. 4-3: *ycbZ* は長いリボソームフットプリントを保持し翻訳一時停止する。翻訳阻害剤未処理のリボソームプロファイリング法による解析における各 CDS の各コドン上のロングフットプリント (35-40 塩基) とショートフットプリント (23-28 塩基) の蓄積度の散布図。淡紫: ロングフットプリントの蓄積したコドン。ロングフットプリントの Pause score が平均値 + 11.5 S.D.かつロングフットプリント/ショートフットプリントが 0.8 を上回るコドン。濃紫: iNP 解析にて翻訳一時停止を検出した遺伝子群。青: 既知の翻訳一時停止位置。#以下の数値は A-site の位置を示す。

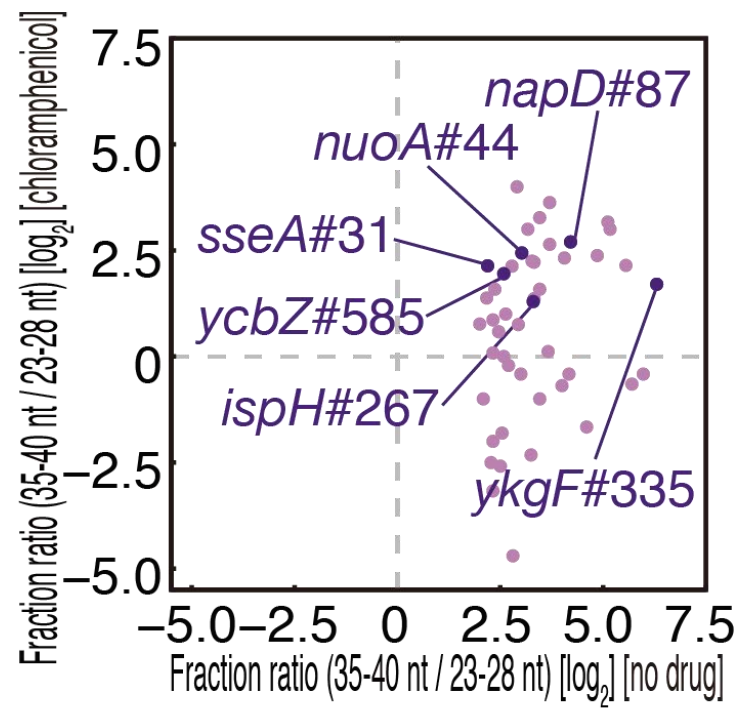


Fig. 4-4: 翻訳阻害剤未処理でロングフットプリントが蓄積したコドンのショートフットプリントに対するロングフットプリントの割合の散布図。横軸が翻訳阻害剤未処理、縦軸がクロラムフェニコール処理によるリボソームプロファイリングの解析結果。

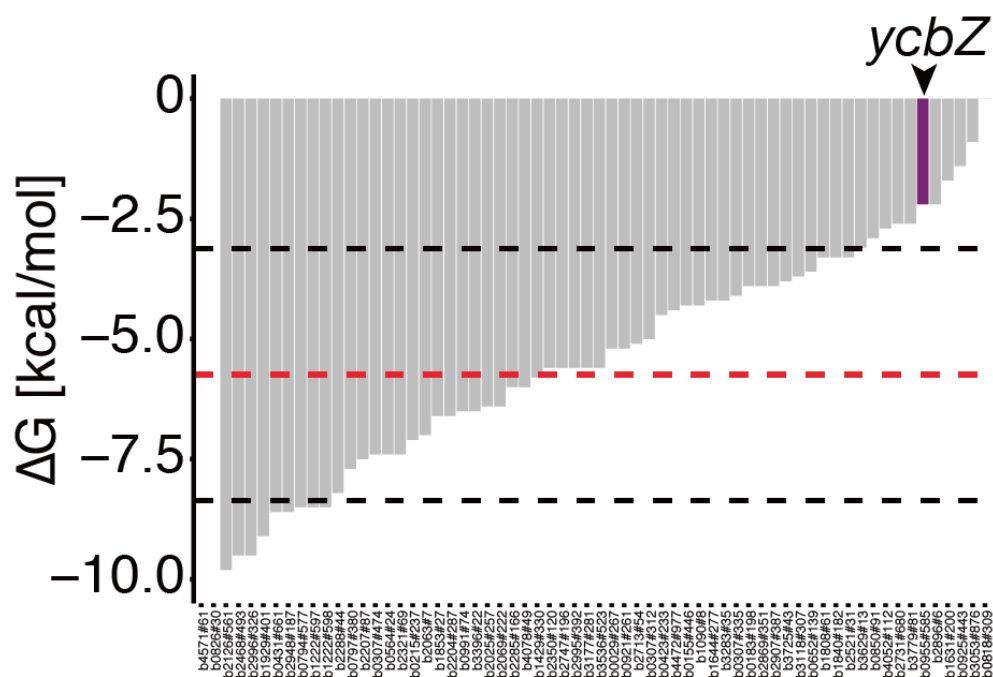


Fig. 4-5: anti-SD 配列 (5'-ACCUCCUUA-3') と翻訳一時停止位置上流 19 塩基間の ΔG の値。赤い破線は全ての遺伝子の上流の SD 配列と anti-SD 配列の ΔG の平均値。黒い破線はその標準偏差の領域を示す。

6. *ycbZ* の個別解析

6.1. リボソームプロファイリングによって特定した翻訳一時停止の生化学的検証

これまでの解析により、翻訳阻害剤非依存的にロングフットプリントが蓄積するコドンを特定した。これらのロングフットプリントが蓄積したコドン上ではリボソームが翻訳一時停止を生じている可能性がある。この仮説を検証するため、³⁵S メチオニンを加えた大腸菌の再構築型無細胞翻訳系(Shimizu et al., 2001)を用いて integrated nascent chain profiling (iNP) 解析(Chadani et al., 2016)を行った。この実験では翻訳一時停止を生じたリボソーム内部に蓄積した peptidyl-tRNA を中性 SDS-PAGE によって検出する。検出されたバンドが peptidyl-tRNA であったかは RNase 処理による tRNA の分解に伴うバンドシフトにより判別が可能である。先行の研究によって翻訳一時停止することがわかっている *secM* を含めた 9 つのロングフットプリントが蓄積した遺伝子(*ispH*、*napD*、*nuoA*、*sseA*、*ycbZ*、*ykgF*、*hybA*、*hybB*、*lpxC*) (Fig. 5-1) を検証したところ 6 つの遺伝子で翻訳一時停止を示す peptidyl-tRNA のシグナルが検出された (Fig. 5-1)。これらのシグナルは RNase 処理による tRNA の分解に伴うバンドの消失が観測された (Fig. 5-1)。

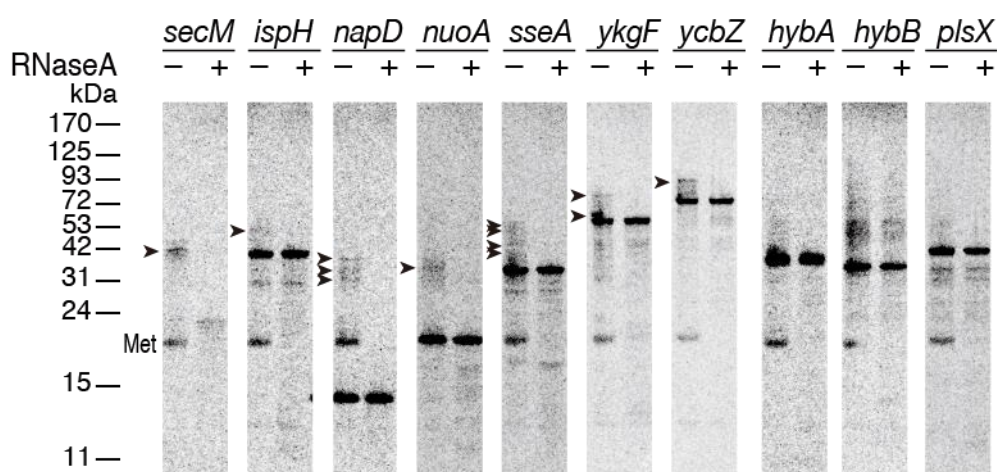


Fig. 5-1: ロングフットプリントが蓄積した遺伝子の iNP 解析による翻訳一時停止の検証。peptidyl-tRNA を矢頭で示す。

6.2. *ycbZ* 遺伝子の CDS 上で生じる翻訳一時停止の解析

さらにこれらのロングフットプリントが蓄積した翻訳一時停止位置群から、iNP 解析の際に、最も強い翻訳停止シグナルを示した *ycbZ* に焦点を当てて解析を行うことにした (Fig. 5-1、5-2)。*ycbZ* は終止コドンの直前のコドンで翻訳一時停止を生じる。この翻訳一時停止位置とちょうど同じコドン上 (Pro585 P site Asn586 A site) では2つのリボソームが渋滞を起こすことで生じる disome に由来する~60塩基のリボソームフットプリント (Subramaniam et al., 2014) も検出された。すなわち *ycbZ* 転写産物の該当の翻訳一時停止位置では先行するリボソームに後続のリボソームが追いついてしまう程の強い翻訳一時停止が生じることが示唆された (Fig. 5-2 (B)、Fig. 5-3 (B))。この翻訳一時停止が生じるのに必要な最小限の領域を特定するため、レポーターを構築し、*in vitro* 翻訳系によって検証を行った。翻訳一時停止現象は翻訳一時停止位置周辺のアミノ酸配列や RNA 配列の影響を受けて生じる (Nakatogawa and Ito, 2002; Lu and Deutsch, 2008; Yanagitani et al., 2011; Dana and Tuller, 2012; Brandman et al., 2012; Charneski and Hurst, 2013; Weinberg et al., 2016; Dao Duc and Song, 2018) ことを考慮し、A site からリボソーム出口トンネル内に相当する翻訳一時停止位置から上流の30アミノ酸をレポーターに導入した (Fig. 5-4 (上段)、Fig. 5-5)。翻訳産物は翻訳停止位置の上流に導入した HA-tag のウエスタンブロッティングにより検出された。また、翻訳の一時停止を示す peptidyl-tRNA のシグナルも同様に検出された (Fig. 5-4 (下段))。さらにこの *ycbZ* 翻訳一時停止モチーフ配列をタグ配列 (streptavidin binding protein or SBP) に置換すると翻訳一時停止を示す peptidyl-tRNA のシグナルが検出されなくなった (Fig. 5-6) ことから、*ycbZ* 翻訳一時停止モチーフ配列は翻訳一時停止を生じるのに十分な翻訳領域といえる。次に翻訳一時停止に重要な要因を特定するため、アミノ酸配列に着目して解析を行った。生物種間のアミノ酸配列の保存性 (*e.g.*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Klebsiella*, and *Salmonella*) (Fig. 5-5) と翻訳一時停止位置近傍のアミノ酸配列を考慮して、変異解析を行った。結果、翻訳一時停止位置でリボソームの A site の位置に相当する Asn586 が翻訳一時停止に必須のアミノ酸であることがわかった (Fig. 5-6)。次に翻訳一時停止位置が予測した位置であるか、さらなる検証を行うために、翻訳一時停止したリボソーム内部の tRNA に着目して解析を行った。翻訳一時停止位置上のリボソーム-新生鎖複合体 (RNC) を新生鎖に導入した His-tag およびショ糖密度勾配遠心によって精製した (Fig. 5-7、5-8、5-9)。精製した翻訳一時停止リボソーム内部の tRNA

の配列を次世代シーケンサーで解析したところ、翻訳一時停止位置上のリボソームの A site と P site のコドンに対応する、 $\text{tRNA}^{\text{Asn}}_{\text{GUU}}$ and $\text{tRNA}^{\text{Pro}}_{\text{CGG}}$ が豊富に検出された (Fig. 5-10)。さらに、この翻訳一時停止位置上の RNC を用いてクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行なった (Fig. 1-9、1-10、5-11、5-12)。結果、P site に $\text{peptidyl-tRNA}^{\text{Pro}}_{\text{CGG}}$ が結合した Non-rotated state の 70S であることが確認された (Fig. 5-12)。これはリボソームプロファイリング、tRNA-seq および生化学実験の結果と一致した (Fig. 5-6、5-10)。したがって *ycbZ* を翻訳中のリボソームは Pro585-Asn586 が P-A sites にそれぞれ位置する状態で翻訳一時停止を生じていることが示唆された (Fig. 5-2、5-3)。

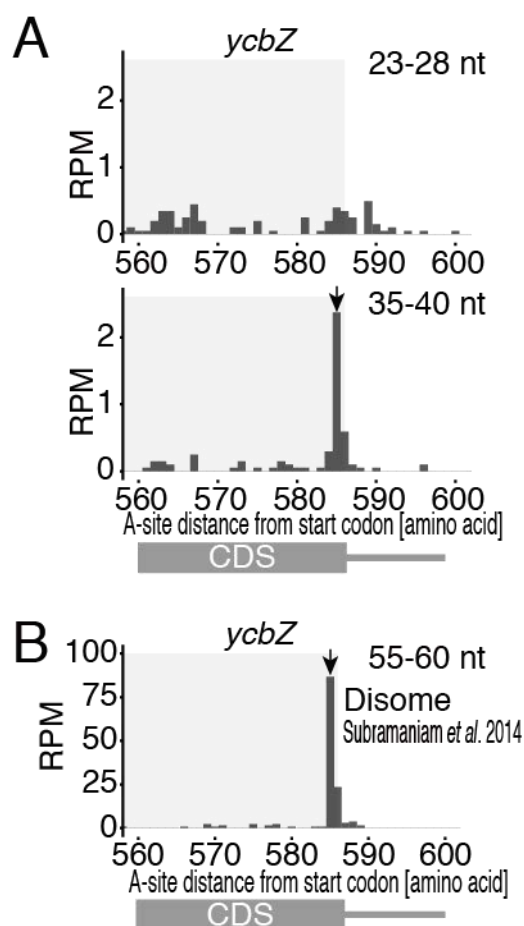


Fig. 5-2: *ycbZ* 上でのリボソームフットプリントの分布。リードは A site の位置でマッピングした (A)。図で示した長さのリボソームフットプリントをマッピングしている。検証した翻訳一時停止位置を矢印で示す。同様にして先行の研究で報告されている disome フットプリント (Subramaniam et al., 2014) の分布を示した (B)。

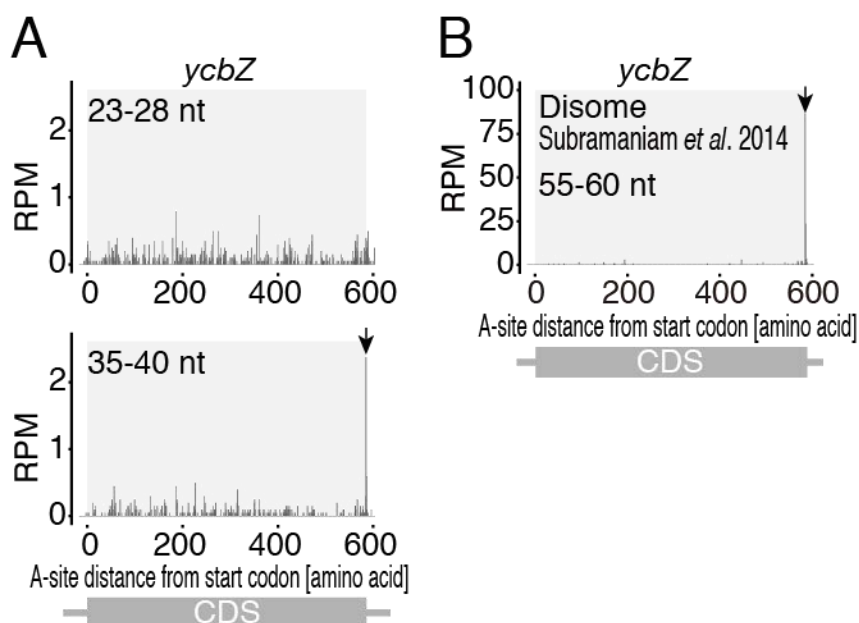


Fig. 5-3: ロングフットプリントが蓄積した *ycbZ* の翻訳一時停止配列の解析。
ycbZ のリボソームプロファイリング (A) および disome プロファイリング (B)
 のマッピングの全体像。

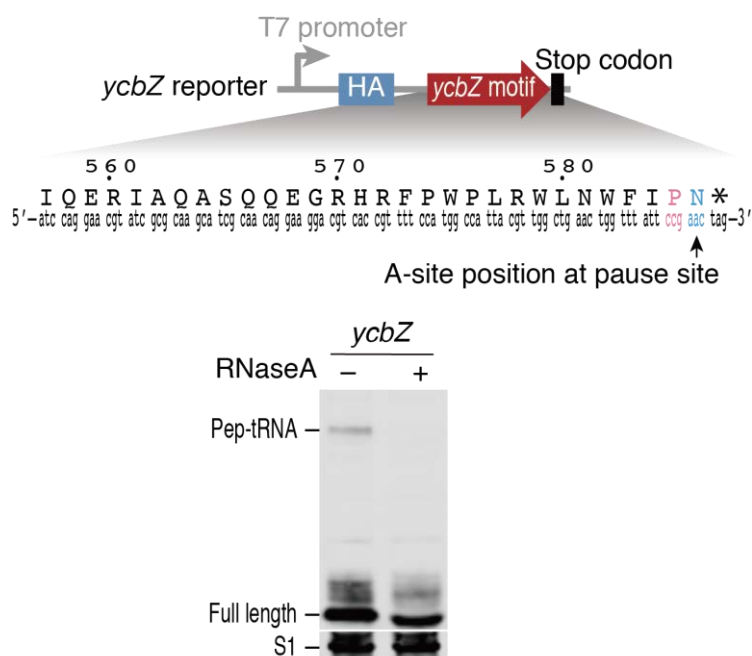


Fig. 5-4: 実験に用いたレポーターの概略 (上段) とそのレポーターを用いた中性
 SDS-PAGE のウェスタンブロッティングによる HA エピトープによる peptidyl-
 tRNA の検出結果 (下段)。RNase 処理は peptidyl-tRNA の有無を検証するために
 用いた。

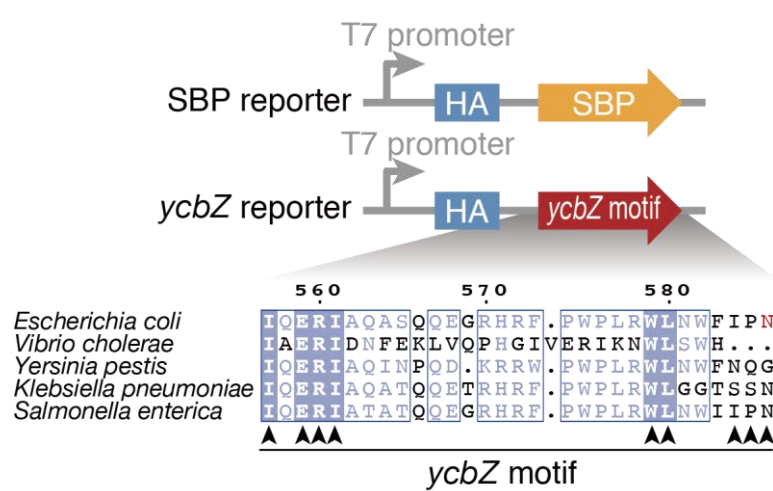


Fig. 5-5: *ycbZ* の翻訳一時停止配列モチーフ（大腸菌のアミノ酸配列を示す）の生物種間での保存性。変異を導入したアミノ酸を矢頭で示す。

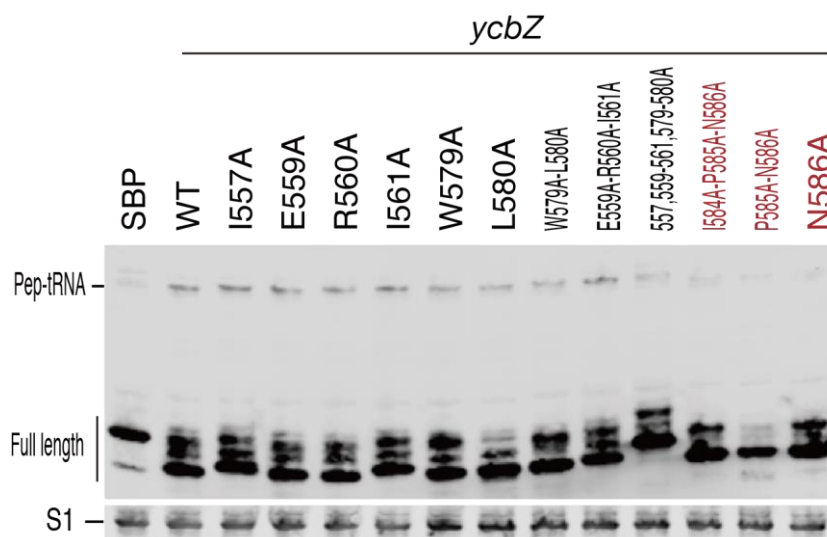


Fig. 5-6: レポーターを用いた peptidyl-tRNA の検出実験。中性 SDS-PAGE で泳動した後、HA 抗体によるウエスタンブロッティングを行なった。

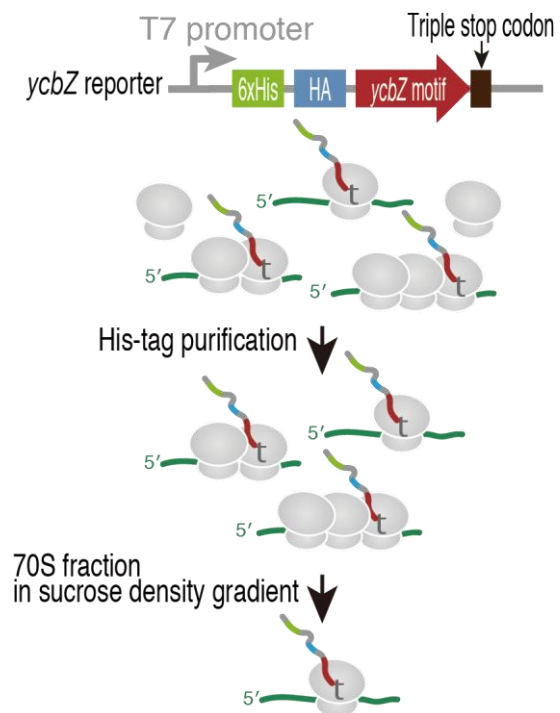


Fig. 5-7: RNC（リボソーム-新生鎖複合体）の精製プロセスの概略。

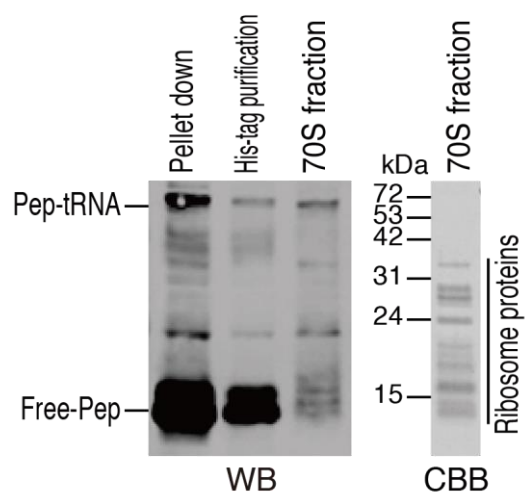


Fig. 5-8: クライオ電子顕微鏡の解析に用いた RNC を用いたウエスタンブロッティングによる peptidyl-tRNA の検出 (左図) および CBB 染色 (右図)。ウエスタンブロッティングは HA エピトープを用いて行なった。

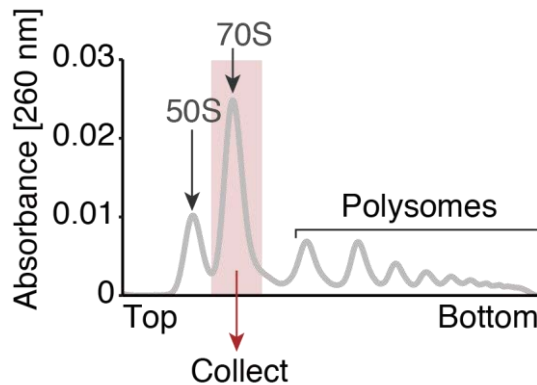


Fig. 5-9: His タグ精製後の RNC を用いたショ糖密度勾配による 70S リボソームの精製。精製した 70S をクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析に使用した。

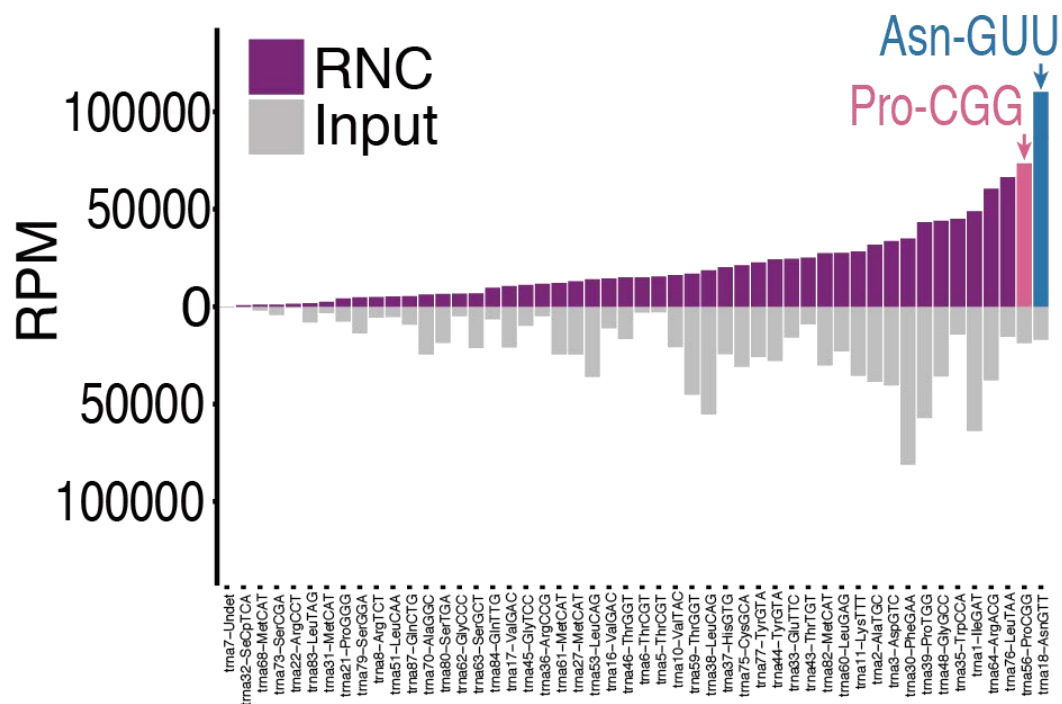


Fig. 5-10: *ycbZ* 上で翻訳一時停止を生じた RNC 内に格納された tRNA の tRNA-seq。

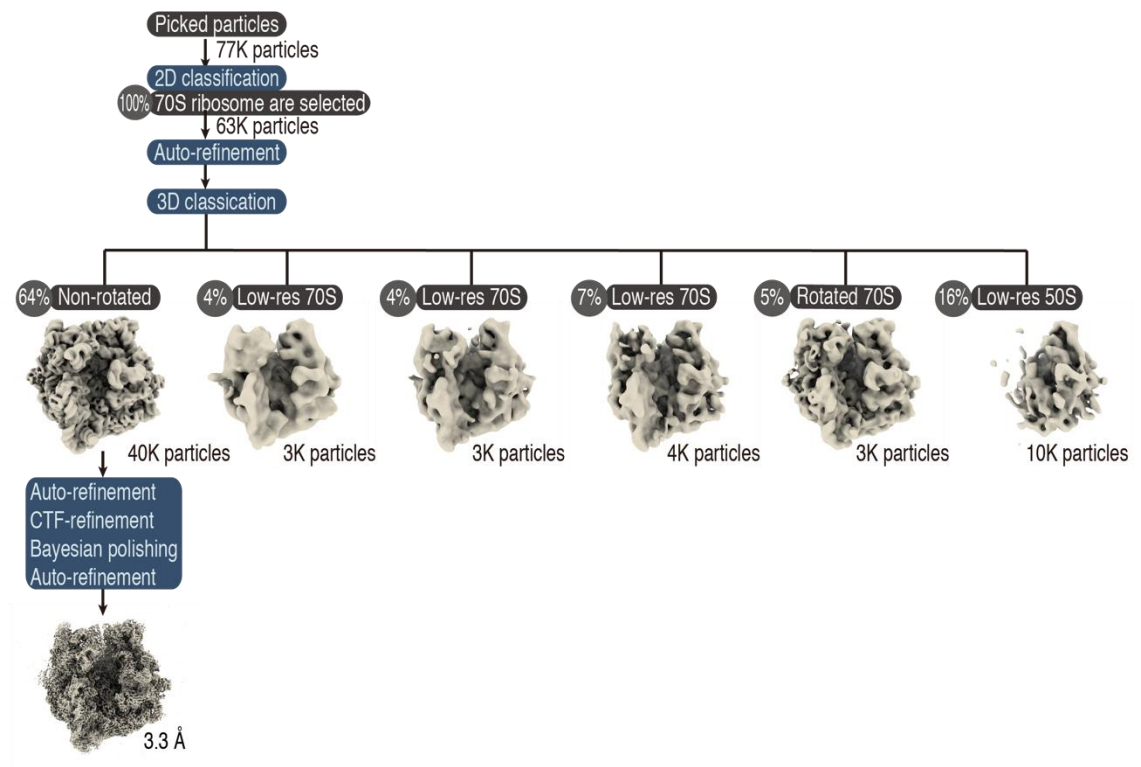


Fig. 5-11: *ycbZ* の翻訳途中で一時停止を生じたリボソームの構造解析の画像プロセッシング。

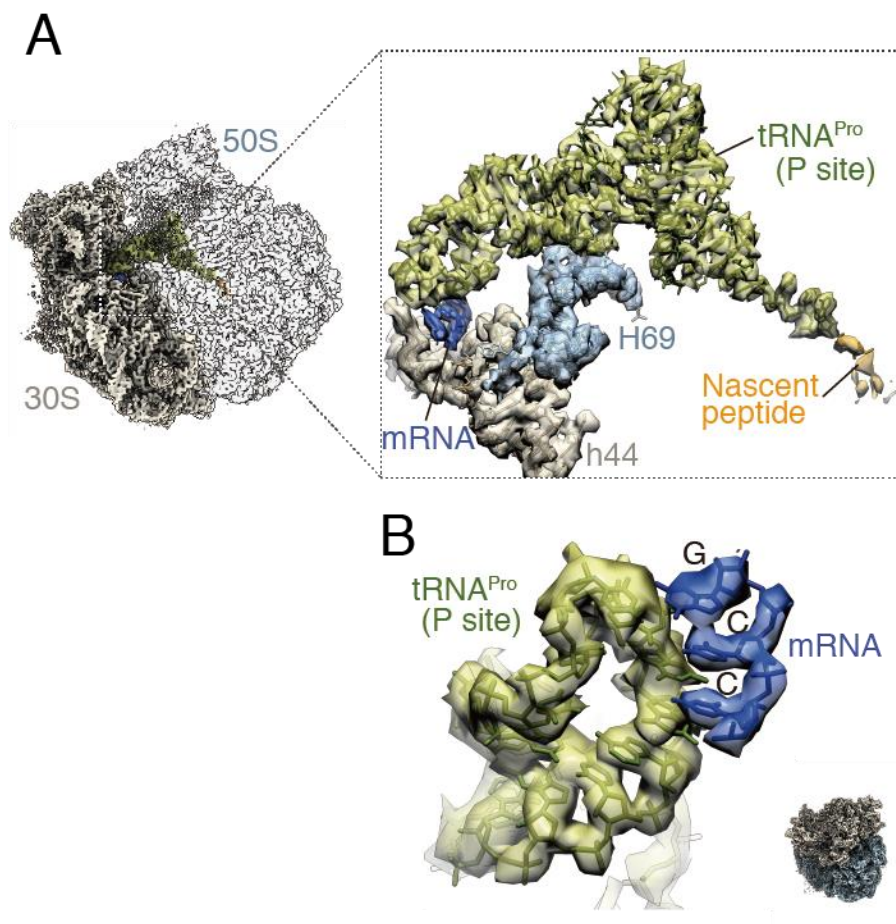


Fig. 5-12: クライオ電子顕微鏡による *ycbZ* 上での翻訳一時停止リボソームの構造解析。新生鎖の結合した P-site tRNA のクライオ電子顕微鏡によって検出された電子密度に基づく $\text{tRNA}_{\text{Pro}}^{\text{CGG}}$ の構造モデル (A)。P-site tRNA のコドン-アンチコドン対合の詳細を示す (B)。

7. mRNA の二次構造が RNase の到達範囲を制御する

7.1. ロングフットプリントの蓄積する原因の検討

YcbZ 翻訳一時停止リボソームの構造解析を行ったものの、その構造状態は P-site tRNA を含んだ Non-rotated state であった。すなわち、構造的特徴からリボソームフットプリントを伸長させる要因を特定することはできなかった。そこで *ycbZ* mRNA 自体が特徴的な高次構造を形成し SD/anti-SD 二重鎖のように RNase 処理による分解を逃れているのではないかと考え、検証を進めていくことにした。これを検証するために DMS-seq (Burkhardt et al., 2017) のライブラリーを用いて RNA の二次構造を解析した。DMS 修飾は二次構造を形成していない mRNA にはメチル化修飾を導入するが、二次構造を形成した箇所は修飾を逃れる。この修飾が導入された箇所を次世代シーケンサーによって解析することにより、mRNA の二次構造を特定することができる。結果、翻訳停止位置の上流に二次構造を形成する領域が検出された (Fig. 6-1)。さらに CentroidFold (Sato et al., 2009) による予測でもリボソームフットプリントの伸長領域に二次構造が示された (Fig. 6-2)。同様の二重鎖領域が翻訳阻害剤非依存的にロングフットプリントの蓄積が観測された位置でも観測された (Fig. 6-2、6-3)。これらの結果をまとめるとリボソームプロファイリングでのフットプリントの伸長現象は翻訳伸長に伴うリボソームの構造変化、mRNA の二次構造など多様な要素に起因することが示唆された (Fig. 6-4)。

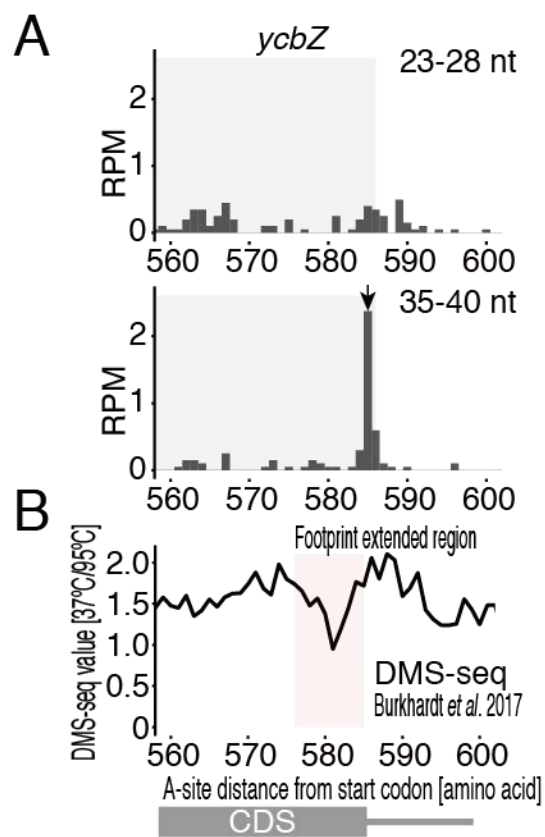


Fig. 6-1: DMS-seq (Burkhardt et al., 2017) による *ycbZ* の翻訳一時停止位置（翻訳一時停止位置を矢印で示す）近傍の RNA 対合（下段）。リードは 33 塩基の枠で足し合わせ、ノーマライズした。赤い囲み枠は A site の上流からリボソームフットプリントが伸長した領域を示す。上段中段のグラフは Fig. 5-2 と同様で矢頭は *ycbZ* での翻訳一時停止位置を示す。

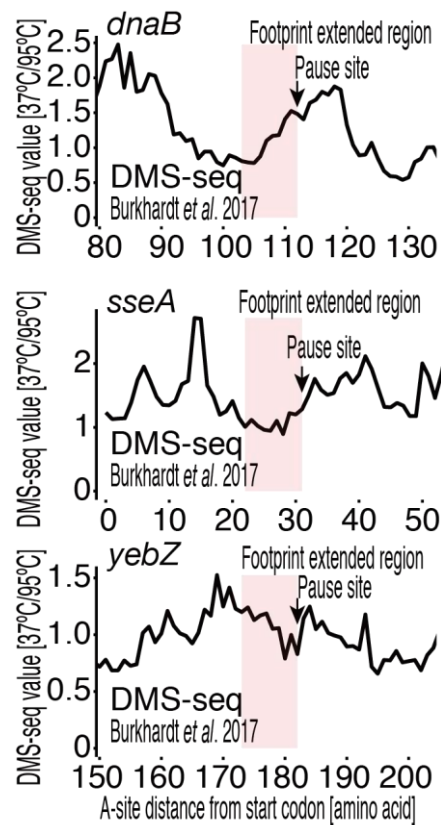


Fig. 6-3: DMS-seq (Burkhardt et al., 2017) によるロングフットプリントが蓄積した各翻訳停止位置近傍の二次構造解析。矢印は翻訳停止位置を示す。リードは 33 塩基の枠で足し合わせ、ノーマライズした。赤い枠は A site の上流からリボソームフットプリントが伸長した領域を示す。

Short footprint

Long footprint

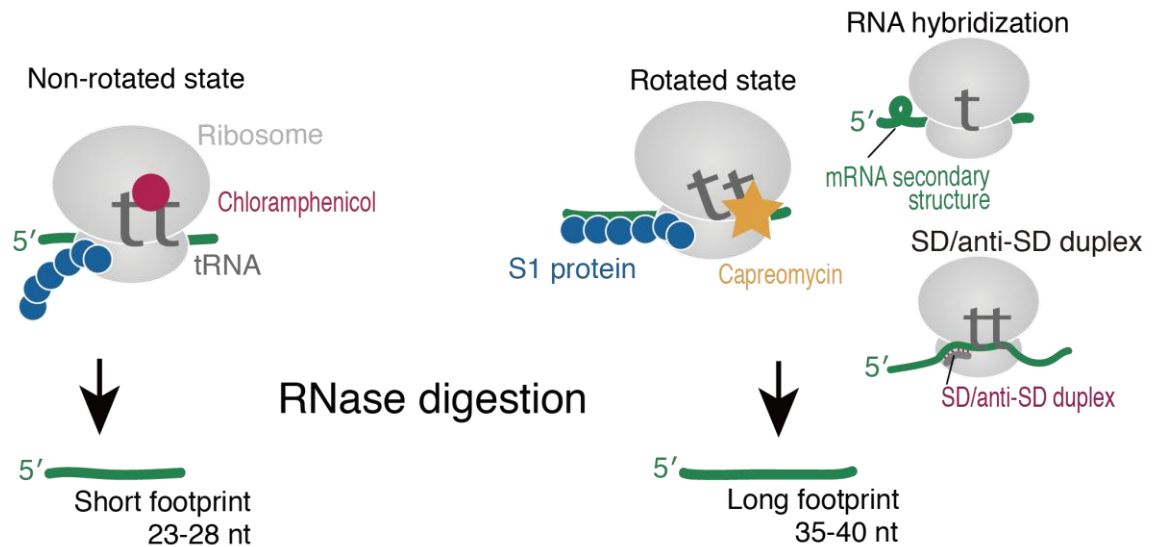


Fig. 6-4: 大腸菌のリボソームフットプリントの伸長現象の概略図。

大腸菌のリボソームプロファイリング法ではショートフットプリント（23-28 塩基）はクロラムフェニコールによって固定された Non-rotated state のリボソームに由来する。一方でロングフットプリント（35-40 塩基）はサブユニット間の回転を伴う構造変化により生み出される。カプレオマイシン処理により固定された Rotate state のリボソームでは S1 が mRNA と相互作用する確率が高まり、RNase からリボソームフットプリントを保護する。またロングフットプリントの一部は分子内あるいは SD/anti-SD 配列のような分子間の塩基対を形成することにより RNase 処理から保護される。

第二部

8. 高塩濃度処理法、disome プロファイリング法を組み合わせた大腸菌リボソームの翻訳一時停止位置の網羅的解析

大腸菌のリボソームの翻訳一時停止位置を網羅的に特定するために、リボソームプロファイリング法を行い、全ての mRNA の各コドン上のリボソームの pause score を算出した。顕著なリボソームフットプリントの蓄積が観測されたコドンのリボソームの翻訳一時停止位置と定義づけした（詳細は方法を参照）(Fig. 7-1 (A))。以前に報告されたように(Nakatogawa and Ito, 2002; Muto et al., 2006; Zhang et al., 2015; Li et al., 2012)、*secM* の Pro166 の既知のリボソーム翻訳一時停止位置 (Fig. 7-1 (A)) が含まれていた。定義された翻訳停止位置 (1923 部位) の中には、終止コドン上でリボソームが翻訳一時停止する箇所が多く (8.4%) 見つかった (Fig. 7-1 (B))。

終止コドンで失速したリボソームは、P site での peptidyl-tRNA の終結反応途上のリボソームと、リサイクリングを待つ、終結後のリボソーム (P 部位で脱アシル化が行われた後のリボソーム) の 2 つの状態に分類される(Buskirk and Green, 2017)。終止コドンで一時停止したリボソームがこれら 2 つのどちらの状態かを区別するために、ライセートに高塩濃度処理を施した。高塩濃度処理を行うと、終止コドン上の翻訳終結反応後の新生鎖を含まないリボソームが mRNA から解離することが知られている(Zylber and Penman, 1970; Blobel and Sabatini, 1971; Mills et al., 2016; Saito et al., 2020) (Fig. 7-2 (A))。高塩濃度処理を行った後のライセートを用いてリボソームプロファイリングを行ったところ、終止コドンで一時停止したリボソームの約 20%が除去された (Fig. 7-2 (B-D))。したがって、終止コドンで失速したリボソームの多くが、peptidyl-tRNA 加水分解後、リサイクリングを待つ 70S リボソームであることが明らかとなった。

終止コドン上で一時停止するリボソームだけでなく、CDS の途中で一時停止したリボソームも高塩濃度処理によって mRNA から解離するものがあった。これらの塩感受性翻訳一時停止位置には *rfbC* の Asp21 (Fig. 7-3 (A)) などが例示される。一方で *secM* および *tnaC* でのリボソームの一時停止は高塩濃度処理耐性であった (Fig. 7-3 (B, C))。高塩濃度処理感受性のリボソームの翻訳一時停止のすべてを説明することはできないが、これらの中には *rfbC* 一時停止サイトの -1 フレームのように異なる読み枠に終止コドンがある翻訳一時停止位置が含まれていることがあった (Fig. 7-3 (A))。すなわち、リボソームフットプ

リントのピークがフレームシフトしたリボソームに由来する可能性がある。よって上流でのフレームシフトあるいは従来の翻訳開始位置以外の開始コドンからタンパク質を合成していることが示唆された。これらの翻訳一時停止位置のリボソーム占有率は相対的に高い傾向にあったが (Fig. 7-4)、高塩濃度処理によってリボソームが mRNA 上から取り除かれた。

解析したリボソームの翻訳一時停止位置の堅牢性と強度を確認するために、disome プロファイリングのライブラリーを用いた検証を行った (Subramaniam et al., 2014; Guydosh and Green, 2014; Han et al., 2020; Meydan and Guydosh, 2020; Arpat et al., 2020)。disome フットプリントの蓄積は、後続のリボソームが先行のリボソームに追いつく程度の強い翻訳伸長反応の遅延を示す。高塩濃度処理と disome プロファイリング (Subramaniam et al., 2014) を組み合わせることにより、最終的にリボソームの翻訳一時停止位置を 125 箇所に絞り込んだ (Fig. 7-5)。

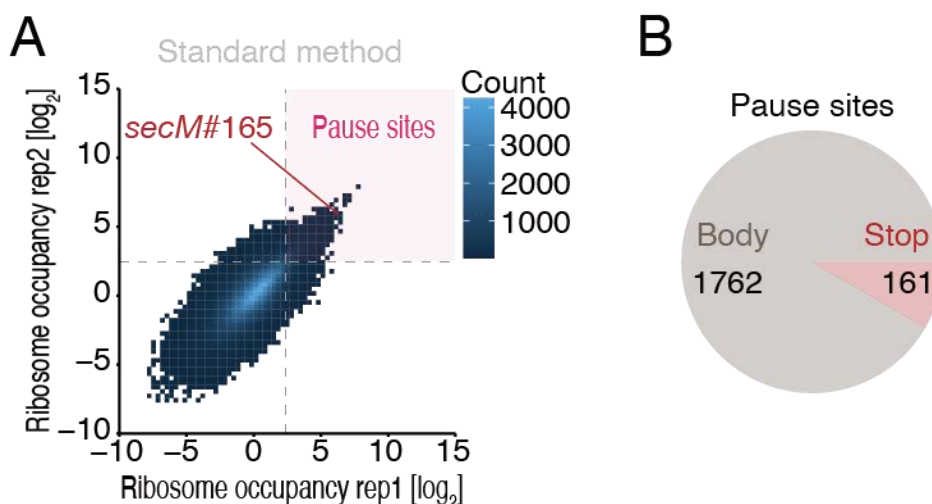


Fig. 7-1: (A) 大腸菌を用いたリボソームの翻訳一時定位置の網羅的解析。X 軸、Y 軸はそれぞれ replicate1、2。リボソームの翻訳一時停止位置は各 replicate で共に pause score が mean + 1.5 s.d 以上を満たすコドンを抽出した。赤で示した箇所は既知の翻訳一時停止である *secM* の 165 番目のコドンを示す。#以降の数値は A site の位置を示す。(B) 網羅的解析によって明らかにした翻訳一時停止位置の内訳。

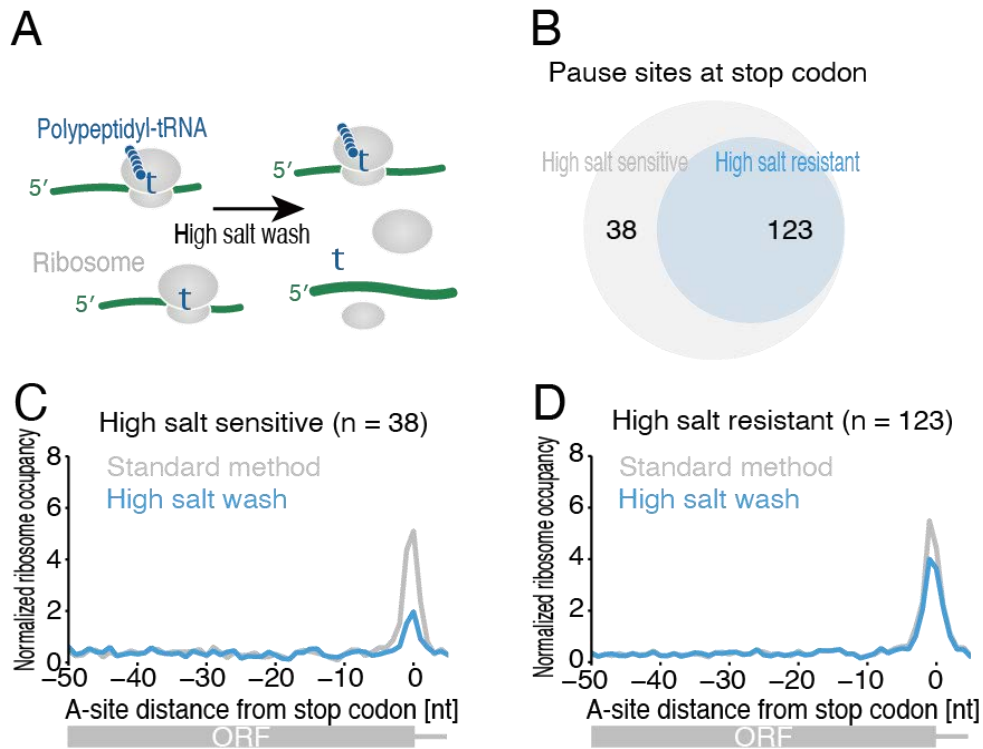


Fig. 7-2: (A) 高塩濃度処理を施したリボソームプロファイリングの概要。
 (B) 終止コドン上の高塩濃度処理感受性の翻訳一時停止位置の内訳。(C、
 D) 従来法と高塩濃度処理法によるリボソームプロファイリングの終止コドン
 周辺のメタジーン解析。(C) は高塩濃度処理感受性、(D) は高塩濃度処理抵抗
 性の翻訳一時停止位置を示す。

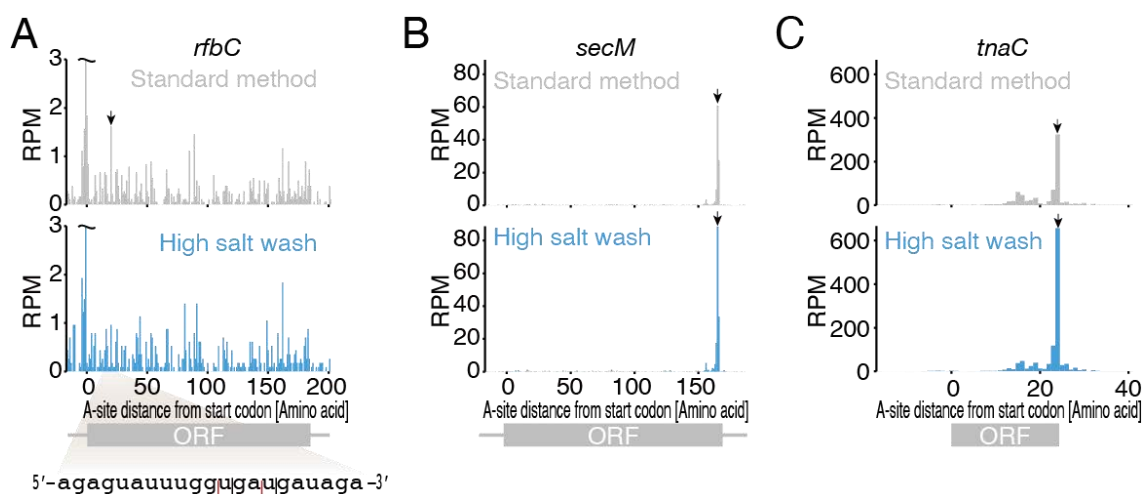


Fig. 7-3: *rfbC* (A)、*secM* (B)、*tnaC* (C) でのリボソームフットプリントの分布。リードは A site の位置でマッピングした。灰色は従来法、水色は高塩濃度処理法のマッピング結果を示す。(A) の塩基配列の黒い囲みは翻訳一時停止位置のコドンを示し、赤い囲みは終止コドンを伴う -1 コドンフレームシフトを示す。

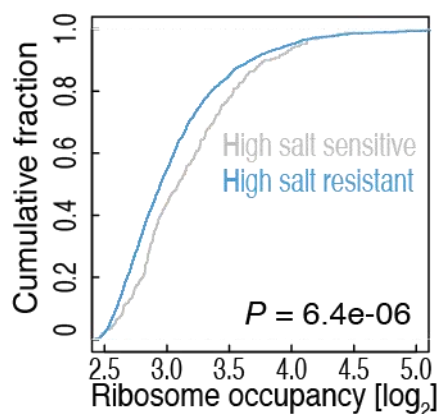


Fig. 7-4: CDS 内で特定された翻訳一時停止位置の累積度数分布。灰色が従来法、水色は高塩濃度処理法を示す。有意差は Mann-Whitney *U* test によって算出した。

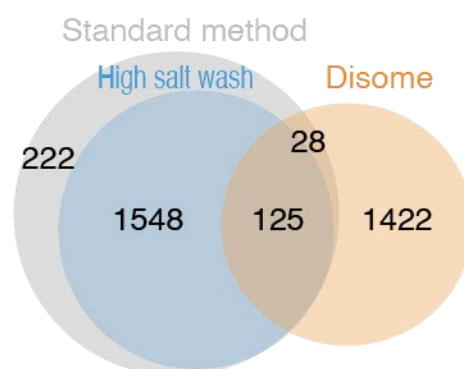


Fig. 7-5: 従来法、高塩濃度処理法、disome プロファイリング法によるリボソームの翻訳一時停止位置の網羅的解析結果。

9. 種々のリボソームプロファイリング法の組み合わせによって特定されたリボソームの強固な翻訳一時停止位置の生化学的定検証

次に第一章で特定した翻訳一時停止位置でリボソーム内部に蓄積した peptidyl-tRNA が検出されるか生化学的な検証を行った。翻訳停止遺伝子群の中から *nuoA*、*ispH*、*ycbZ*、*secM* について *in vitro* 翻訳系(Shimizu et al., 2001)を用いて iNP 解析を行ったところ、peptidyl-tRNA を示すシグナルが検出された (Fig. 5-1, *nuoA*, *ispH*, *ycbZ*, *secM*)。

さらに、先行の研究で行われた *in vitro* 及び *in vivo* による iNP の網羅的解析(Chadani et al., 2016)にて検出された翻訳一時停止位置との比較を行ったところ、9 割近い翻訳一時停止位置が再現できることがわかった (Fig. 8-1)。また、iNP によって検出された peptidyl-tRNA の分子量とリボソームプロファイリング法によって算出された翻訳一時停止位置から予想される peptidyl-tRNA の分子量は高い相関関係があった (Fig. 8-2)。しかし、個々のリボソームプロファイリング法のみを用いて特定した翻訳一時停止位置と iNP 解析によって特定された翻訳一時停止位置の相関は、三種の手法を組み合わせた際ほど高い相関を示さなかった (Fig. 8-3)。よって、三種のリボソームプロファイリング法を組み合わせた解析及び iNP によって特定された翻訳一時停止位置は、リボソームの翻訳一時停止を高い確率で特定していることが示された。また第一部でも翻訳一時停止が確認された *ycbZ* mRNA 上での翻訳一時停止が本解析においても特定された。第一部の五章の結果からも、今回行った三種のリボソームを組み合わせた解析はリボソームが強固に翻訳一時停止している箇所をコドンレベルの解像度で特定できていると言える。

本研究結果は、複数のリボソームプロファイリングの技術 (標準、高塩洗浄、および disome プロファイリング) と生化学的手法を組み合わせることによって、コドンレベルの解像度でリボソームが翻訳一時停止した箇所の確かな位置を抽出した。また、GO 解析による解析では、リボソーム/rRNA およびアセチル CoA カルボキシラーゼの遺伝子群で翻訳一時停止の偏りが観測された (Fig. 8-4)。これらの翻訳一時停止は発現調節などの何らかの機能的意味を持つものと考えられる。

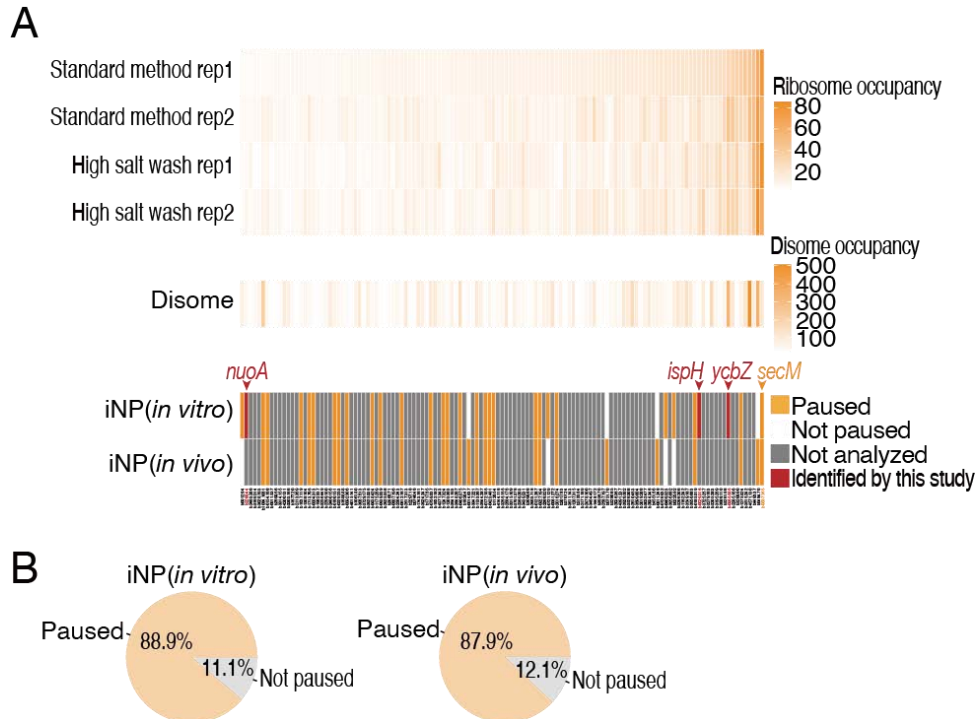


Fig. 8-1: (A) 3 種のリボソームプロファイリング法を組み合わせることで特定した翻訳一時停止位置のリボソーム占有率のヒートマップ。上段が高塩濃度処理法、中断が disome プロファイリング法の結果。先行の iNP 解析の(Chadani et al., 2016)の解析結果を下段に示す。(B) リボソームプロファイリングにより特定した翻訳一時停止位置の iNP 解析での翻訳一時停止の有無を示した円グラフ。

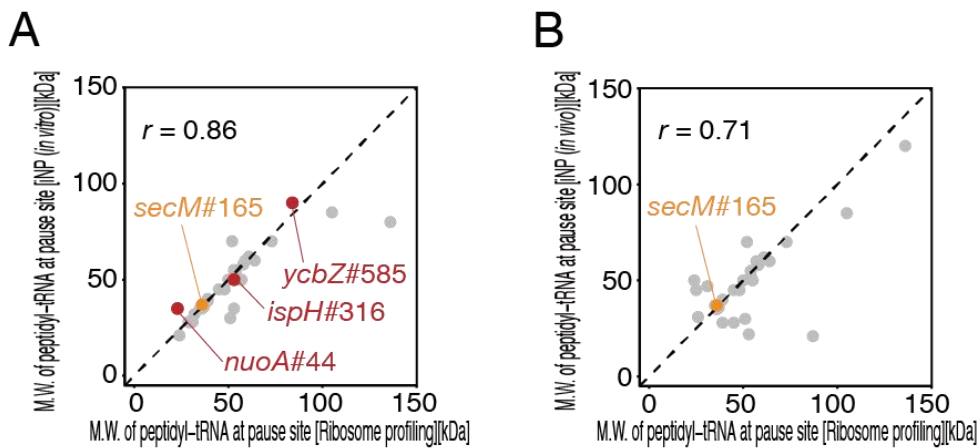


Fig. 8-2: *in vitro* (A) および *in vivo* (B) の iNP 解析によって特定された翻訳一時停止シグナルから算出された peptidyl-tRNA の分子量と 3 種のリボソームプロファイリングを組み合わせることにより定義された翻訳一時停止位置から予想される peptidyl-tRNA の分子量の相関。#以降の数字は翻訳一時停止リボソームの A site の位置を示す。M.W.は分子量。

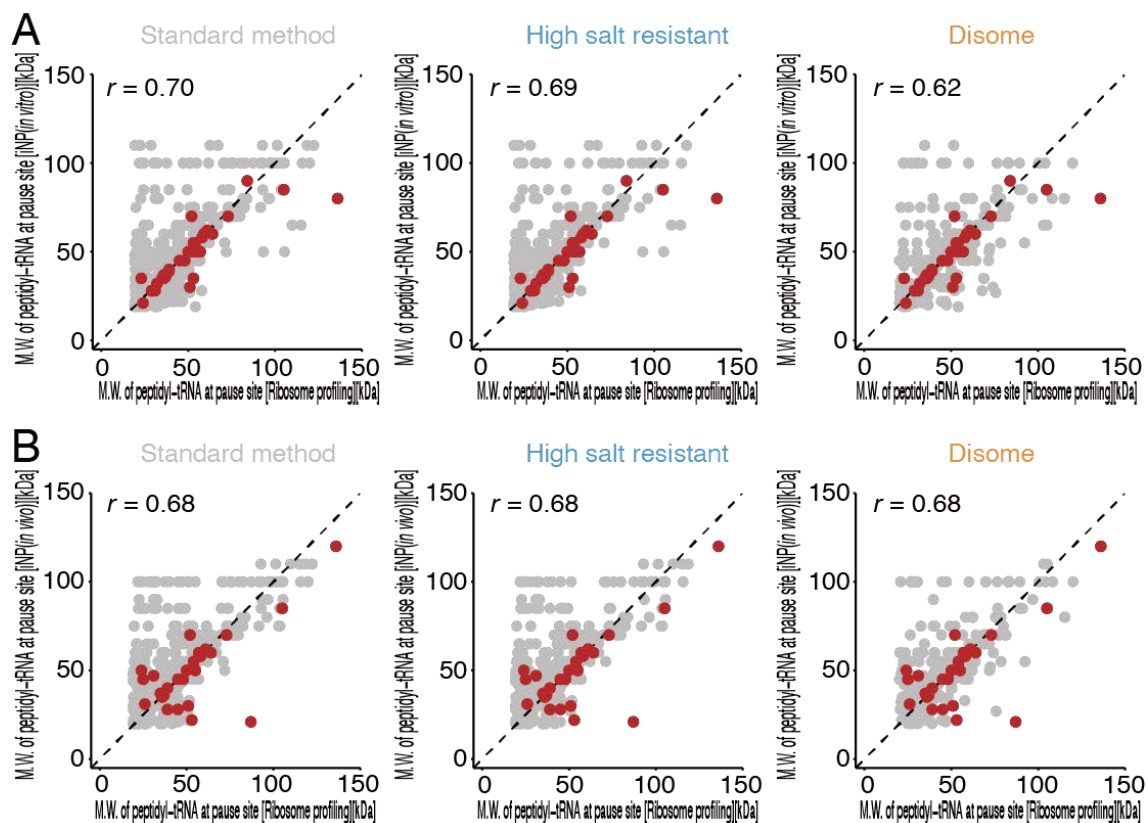


Fig. 8-3: *in vitro* (A) および *in vivo* (B) の iNP 解析によって特定された翻訳一時停止シグナルから算出された peptidyl-tRNA の分子量と各種のリボソームプロファイリングにより定義された翻訳一時停止位置から予想される peptidyl-tRNA の分子量の相関。赤い点は3種のリボソームプロファイリングを組み合わせることにより定義された翻訳一時停止位置を示す。M.W.は分子量。

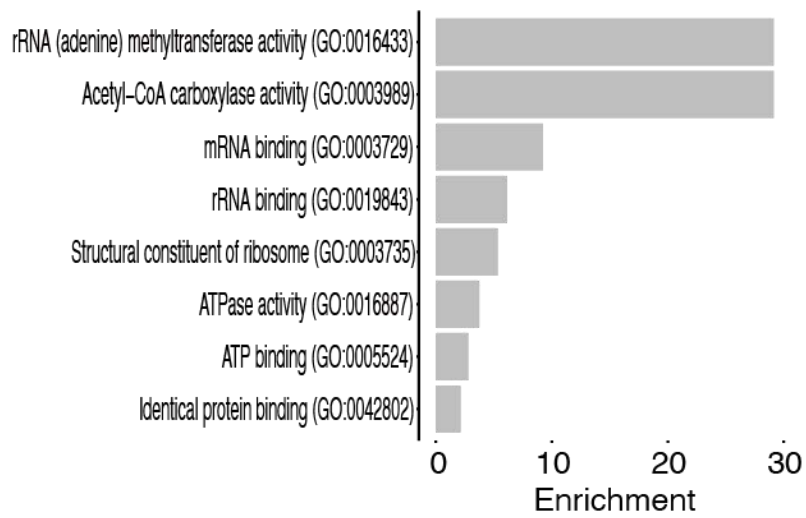


Fig. 8-4: 3 種のリボソームプロファイリングを組み合わせることにより特定した翻訳一時停止位置が存在する遺伝子の GO 解析。

10. 考察

リボソームプロファイリング法(Ingolia et al., 2009)が確立されたことにより、細胞内の各 mRNA の翻訳効率、翻訳領域、翻訳速度の 3 つに網羅的にアプローチできるようになった(Ingolia, 2014; Brar and Weissman, 2015; Fujita et al., 2019)。これに加え、リボソームフットプリントの長さに着目した本研究によってリボソームの回転を伴う構造変化を議論できるようになった。

真核生物のリボソームフットプリントの分布では~21 と~28 塩基の 2 つのピークを持つことが知られている(Lareau et al., 2014; Matsuo et al., 2017; Kurihara et al., 2018; Wu et al., 2019)。最近の報告では、このリボソームフットプリントの長さの違いは、A site に tRNA が収容されているかに依存してリボソームフットプリントの 3'端への RNase の可触性が変化することが原因であるとされている(Wu et al., 2019)。具体的にはリボソームの A site に tRNA が収容されていればその部分は RNase からの処理を逃れ~28 塩基のリボソームフットプリントに、tRNA が A site に存在しなければ RNase がさらに mRNA の 3'端をさらに分解し~21 塩基の短いリボソームフットプリントが生み出される。一方、本研究によって明らかになった大腸菌リボソームフットプリントの長さの違いは 3'端ではなく 5'端の長さの変化に基づくものである。したがって、真核生物のような A-site tRNA の有無によりリボソームフットプリントの長さに変化が生じている可能性は低いと考えられる。また興味深いことに S1 タンパク質はバクテリアリボソーム特有のリボソームタンパク質であることから、真核生物のリボソームでは今回の現象は観測できなかったものと考えられる。

本研究で示したように、大腸菌リボソームではリボソームフットプリントの長さはリボソームの回転を伴う構造状態の変化に相関する。真核生物のリボソームでは、ペプチド転移反応段階 (Non-rotated state で A-site tRNA が収容された状態) と tRNA と mRNA の転座前の段階 (Rotated state で A/P-site tRNA を伴う構造状態) のどちらの構造状態も~28 塩基の長いリボソームフットプリントに対応するため、リボソームの構造状態をリボソームフットプリントの長さから判別することは困難であった。しかし、真核生物では P-site tRNA が E site に転座するのを阻害する翻訳阻害剤、シクロヘキシミドと A site に tRNA が収容されるのを阻害する翻訳阻害剤、チゲサイクリンの二種の翻訳阻害剤を混合し、リボソームプロファイリング法を行うことで pre-ペプチド転移反応 (Non-rotated state) のリボソーム画分を最小限におさえ Rotated state に由来するロングフット

プリントの画分を増加させることができるようになった(Wu et al., 2019)。大腸菌の場合も同様に翻訳阻害剤を組み合わせるリボソームプロファイリングを行うことで細胞内でのリボソームの構造状態を反映したリボソームプロファイリングが行えるようになると思われる。

これまで S1 タンパク質は翻訳開始を促進する因子と考えられてきたが、本研究により翻訳伸長中にも mRNA と相互作用し、リボソームの翻訳伸長反応を促進することが示唆された。解析の結果から S1 を欠損させたリボソームは翻訳の停滞や途上終結を生じていることが考えられるが、本研究ではその具体的なメカニズムを明らかにすることはできなかった。今後は S1 を取り除いたリボソームを用いた *in vitro* 翻訳系でのリボソームプロファイリングや S1 の有無による翻訳途上産物の蓄積度を定量することなどにより、S1 が翻訳伸長反応に与える影響についての詳細が明らかになることが期待される。

本研究では *ycbZ* に着目して長いリボソームフットプリントを保持する翻訳停止位置の解析を行った。クライオ電子顕微鏡による構造解析ではこの翻訳一時停止位置での翻訳伸長反応の減速に関する原因を特定することができなかった。これはおそらく単離されたリボソームの各構造状態の平均値の構造を見ていることが原因であると考えられる。また tRNA-seq では観測できた A-site Asn-tRNA が構造解析では観測できなかったことも翻訳一時停止のメカニズムの要因を探る妨げとなった。YcbZ の機能は未だよくわかっていないが、終止コドンでリボソームがリードスルーするのを抑制することが先行の研究により報告されている(Gagarinova et al., 2016)。将来的には YcbZ の具体的な機能と今回明らかにした YcbZ 合成途上での翻訳の一時停止の間の関係性が明らかになることが期待される。

今回明らかにしたリボソームフットプリントの長さの変化に基づく、リボソームの構造状態の理解は大腸菌のゲノムワイドな翻訳解析を行う上で有益な情報を提供できるものであると言える。

11. 結論

本論文の終わりに、本研究のまとめと展望を述べる。

本研究では、これまでよくわかっていなかった大腸菌のリボソームフットプリントの長さの多様性に着目して研究を行った。解析の結果から、大腸菌リボソームフットプリントの長さのばらつきはリボソームの構造状態や mRNA の二次構造の影響に起因することが明らかとなった。種々の翻訳阻害剤を用いたリボソームプロファイリングの解析結果では、リボソームの **Rotated state** と **Non-rotated state** の構造状態に呼応してリボソームフットプリントの長さが変化することを示した。さらにリボソームフットプリントが伸長するメカニズムについて解析を行ったところ、リボソームが **Rotated state** の際に S1 タンパク質が mRNA と相互作用することで、リボソームフットプリントを RNase 処理から保護していることを示した。またリボソームの構造状態以外にリボソームフットプリントを伸長させる可能性の検証を行った。結果、リボソームの構造状態非依存的に長いリボソームフットプリントが蓄積している翻訳一時停止位置を多数特定することに成功した。さらにこれら翻訳一時停止位置周辺では mRNA が分子内二次構造を形成することにより、RNase の処理を免れ、長いリボソームフットプリントを生み出していることが示唆された。

本研究によりリボソームは多様な構造状態で翻訳一時停止を生じることが明らかとなった。しかし現状では、リボソームフットプリントの伸長現象の要因がリボソームの構造状態依存的か、mRNA の高次構造によるものか、判別することは困難である。これを判別するために、RNase 処理条件を工夫するなど、ライブラリー作製段階での手法の改良が期待される。その他にも DMS-seq などの RNA の二次構造解析と組み合わせて、リボソームフットプリントの伸長現象の要因を特定しつつ解析を行うなど、さらなる工夫が必要であると考えられる。

また、リボソームフットプリントの伸長現象の要因が明確に切り分けられた場合、各構造状態での翻訳一時停止のメカニズムを解明することができると期待される。具体的には A、P、E site、リボソーム出口トンネル内のアミノ酸配列やリボソーム出口トンネル内の新生鎖の二次構造などに着目して解析を行うことで、何らかの特徴が観測されることが考えられる。

さらに、各構造状態で翻訳一時停止することの生理学的意義についても明らかになることが期待される。例えば、特定した翻訳一時停止リボソームとリボソームの品質管理機構の関係性を解析した際、どちらかの構造状態では品質管理機構に対して抵抗性を示すなどの違いが見られることが予想される。この仮説が正しければ品質管理機構がターゲットとするリボソームを判別するメカニズムの解明にも繋がると考えられる。

12. 材料

本研究で用いた大腸菌株、及びプラスミドを表 2、表 3 に示す。

表 2: 本研究で用いた大腸菌株一覧

Strain	Reference
MG1655	Laboratory stock
MG1655 <i>rpsA1</i> (MS71)	Duval <i>et al.</i> , 2013
MG1655 <i>rpsA</i> $\Delta 6$ (MS72)	Duval <i>et al.</i> , 2013
MG1655 <i>rpsA</i> $\Delta 56$ (MS73)	Duval <i>et al.</i> , 2013

表 3: 本研究で用いたプラスミド一覧

Plasmid	Reference
<i>pCA24N-secM</i>	Kitagawa <i>et al.</i> , 2005
<i>pCA24N-hybA</i>	This paper
<i>pCA24N-hybB</i>	This paper
<i>pCA24N-ispH</i>	This paper
<i>pCA24N-napD</i>	This paper
<i>pCA24N-nuoA</i>	This paper
<i>pCA24N-plsX</i>	This paper
<i>pCA24N-sseA</i>	This paper
<i>pCA24N-ykgF</i>	This paper
<i>pCA24N-ycbZ</i>	This paper
<i>pCA24N-ycbZmotif</i>	This paper
<i>pCA24N-ycbZmotif (I557A)</i>	This paper
<i>pCA24N-ycbZmotif (E559A)</i>	This paper
<i>pCA24N-ycbZmotif (R560A)</i>	This paper
<i>pCA24N-ycbZmotif (I561A)</i>	This paper
<i>pCA24N-ycbZmotif (W579A)</i>	This paper
<i>pCA24N-ycbZmotif (L580A)</i>	This paper
<i>pCA24N-ycbZmotif (W579A-L580A)</i>	This paper
<i>pCA24N-ycbZmotif (E559A-R560A-I561A)</i>	This paper
<i>pCA24N-ycbZmotif (I557A-E559A-R560A-I561A-W579A-L580A)</i>	This paper
<i>pCA24N-ycbZmotif (I584A-P585A-N586A)</i>	This paper
<i>pCA24N-ycbZmotif (P585A-N586A)</i>	This paper
<i>pCA24N-ycbZmotif (N586A)</i>	This paper
<i>pCA24N-6xHis-HRV3C-ftsQ85-HA-ycbZmotif</i>	This paper
<i>pCI-neo-Fluc-EGFP</i>	Gupta <i>et al.</i> , 2011
<i>pCI-neo-1xEGFP-Fluc-EGFP</i>	This paper
<i>pCI-neo-2xEGFP-Fluc-EGFP</i>	This paper

13. 手法

大腸菌株とプラスミド

本研究で用いた大腸菌株とプラスミドのリストを以下に示す。ASKA ライブラリー(Kitagawa et al., 2005)と Keio コレクション(Baba et al., 2006)は国立遺伝学研究所から提供していただいた。

pCA24N-hybA, hybB, ispH, napD, nuoA, plsX, sseA, ykgF, and ycbZ

完全長 ORF がコードされた DNA 断片を MG1655 ゲノムを鋳型として増幅させ In-Fusion HD (TaKaRa)により *pCN24A*(Kitagawa et al., 2005)に導入した。

pCA24N-ycbZmotif WT, I557A, E559A, R560A, I561A, W579A, L580A, W579A-L580A, E559A-R560A-I561A, I557A-E559A-R560A-I561A-W579A-L580A, I584A-P585A-N586A, P585A-N586A, and N586A

ycbZ の終止コドンから上流 30 コドンを MG1655 ゲノムから増幅させ *pCA24N*(Kitagawa et al., 2005)に導入した。アミノ酸変異は site-directed mutagenesis によって導入した。

pCA24N-6xHis-HRV3C-ftsQ85-HA-ycbZmotif

コンストラクトのデザインは先行研究を参考に行った(Bischoff et al., 2014)。*ftsQ* の 85 アミノ酸、HRV3c cleavage site、HA-tag を In-Fusion (TaKaRa) を用いて *pCA24N-ycbZ* モチーフに導入した。さらに連続終止コドン配列を *ycbZ* モチーフ直下に導入した。

pCI-neo-1xEGFP-Fluc-EGFP and pCI-neo-2xEGFP-Fluc-EGFP

Enhanced green fluoresce protein (EGFP) の DNA 断片を *pCI-neo-Fluc-EGFP*(Gupta et al., 2011)から増幅し、In-Fusion HD (TaKaRa) を用いて *pCI-neo-Fluc-EGFP* に導入した。EGFP は *Fluc* の上流に同フレームになるよう配置した。*pCI-neo-2xEGFP-Fluc-EGFP* では EGFP の連続配列を同様の配置で導入した。

リボソームプロファイリング法

大腸菌の菌体回収は先行の大腸菌を用いたリボソームプロファイリングの知見を参考に行った(Woolstenhulme et al., 2015; Mohammad et al., 2016)。まず前日培養させた MG1655 株を LB 培地で本培養し $OD_{600} = 0.4-0.5$ まで生育させた後、0.45 μm 9mm filter に培地を通過させ集菌、菌体をスクレーパーでかき取り、液体窒素の入ったチューブに入れ、即座に液体窒素で凍結した。液体窒素中の菌体に 0.65 ml の破砕バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NH_4Cl 、10 mM MgCl_2 、5 mM CaCl_2 、1 mM DTT、1 % Triton) を滴下した。また破砕バッファーには翻訳阻害剤 (100 $\mu\text{g/ml}$ クロラムフェニコール、200 $\mu\text{g/ml}$ ブラストサイジン、200 $\mu\text{g/ml}$ リネゾリド、200, 2000 $\mu\text{g/ml}$ バイオマイシン、200, 2000 $\mu\text{g/ml}$ カプレオマイシン、200, 2000 $\mu\text{g/ml}$ スペクチノマイシン) をそれぞれ予め加えた。 -80°C のフリーザー内で菌体ペレットと破砕バッファーの混合粒を YASUI KIKAI Multi Beads Shocker を用いて 1500 rpm、15 秒、rest 10 秒を 2 セットの条件で破砕した。菌体を室温で即時に融解させ、3000 g、 4°C 、10 min 遠心、上清を回収したのち、Turbo DNase I (Thermo Fisher Scientific) を加え 10 min 氷上に静置した。これを 20,000 g、 4°C 、10 min 遠心、上清を回収し、 -80°C で保存した。RNA 濃度は Qbit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。次世代シーケンサーで解析するためのライブラリーの構築は先行研究で用いられている手法(McGlinicy and Ingolia, 2017)を改変し、実験を行った。1 サンプルに用いる RNA 量は 35 μg とし、破砕バッファーで 300 μl になるようメスアップした。150U の S7 Micrococcal nuclease from *Staphylococcus* (Roche) を加えて、 25°C 、45 min 反応させた。その後 0.6 mM EGTA を加えて反応を停止させた。EGTA 処理後のサンプルをそれぞれ 0.9 ml の sucrose cushion にのせ、TLA 110 rotor (Beckman) を用いて 100,000 rpm、 4°C 、1 時間で遠心した。遠心後、上清を捨てた後、Trizol Regent (ThermoFisher Scientific) を加えてリボソームペレットを溶かした。その後、Direct-zol RNA MicroPrep (Zymo Research) を用いて RNA を精製した。これを SuperSep RNA、15%、17-well (Wako Pure Chemical Industries) を用いて泳動した。先行の研究による大腸菌リボソームフットプリントの長さを考慮し 17-50 nt の範囲を切り出した。その後の T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) を用いて脱リン酸化、T4 RNA Ligase 2, truncated KQ (New England Biolabs) を用いてリンカーのライゲーションを行った。リンカーは Mth ligase (New England Biolabs) によってプレアデニル処理したものを使用した。

Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria) (Illumina) による rRNA の除去、ProtoScript II (New England Biolabs) を用いて逆転写酵素反応を行った。プライマーは 5'-(Phos)NNAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAG(iSp18)GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC-3'を用いた。さらに、CircLigaseII ssDNA ligase (Epicentre) による逆転写産物の環状化、Phusion polymerase (New England Biolabs) を用いた PCR による増幅などのライブラリー構築も先行の研究に基づいて実験を行った。プライマーは 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATCACGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG-3' と 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG-3' または 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATACATCGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG-3'を使用した。最後に作成したライブラリーの MultiNA (SHIMAZU BIOTECH) によるクオリティーチェックを行った。

ライブラリーは Hiseq 4000 (illumine) を用いてシーケンシングを行った。マッピングは bowtie2.0 を用いて行った。まずノンコーディング RNA 配列のリードを除去した後、大腸菌ゲノム配列 (NC_000913.2) にマッピングした。フットプリントは 20 -45 塩基までを解析に用い、5'端からの A site までの距離は開始コドンや終止コドンに蓄積したピーク、3 塩基周期性などを考慮し決定した(Woolstenhulme et al., 2015)。

Disome profiling のデータ (GSE51052) は通常のリボソームプロファイリングと同様のプロセスで解析を行った。

データ解析

Pause score の計算

Pause score は先行の解析手法(Schuller et al., 2017)を参考に、それぞれの mRNA に対し、

$$\text{Pause score} = [\text{Reads on the codon} / \text{Average reads per codon}]$$

の計算式により算出した。解析の際に用いた遺伝子は Averages reads per codon >=

0.5 とした。また ORF の開始から 5 コドンは新生鎖が影響している可能性が低いことや、リボソームプロファイリングのサンプル間で誤差が大きく、3 塩基周期性がよくないことから解析に用いらなかった。*secM* や *tnaC* など既知の新生鎖依存的な翻訳停止は終止コドン近傍で生じることから、今回の解析では終止コドン近傍は解析に用いた。

本研究の翻訳停止候補位置は既知のクロラムフェニコール存在下で新生鎖依存的な翻訳停止位置である *tnaC* 24 番目コドンの Pause score より高い値を示し、かつピューロマシン処理での Pause score がクロラムフェニコールの Pause score の 70 %以上の値を示すコドンと定義した。

Polarity score の計算

Polarity score は先行の手法(Schuller et al., 2017)を参考に解析を行った。翻訳伸長中のリボソームのみを解析対象とするために開始コドン以降 10 コドン目までと終止コドンから 10 コドン上流のリードは解析に用いらなかった。全長が l コドンある遺伝子の i 番目のコドンの Polarity score を p_i 、そのコドン上の normalized ribosome density を d_i としたとき、

$$p_i = \frac{d_i w_i}{\sum_{i=1}^l d_i},$$

$$w_i = \frac{2i - (l + 1)}{l - 1}$$

として、計算を行った。各遺伝子の Polarity score は各コドン上にて算出された p_i を合計し、算出した。

クロラムフェニコール処理サンプルのリボソームフットプリントの分布のフィッティング

リボソームフットプリントの分布へのフィッティングは R を用いて行った。

anti-SD 配列と翻訳停止位置上流配列の ΔG の計算

anti-SD 配列は 5'-ACCUCCUUA-3' と定義し、翻訳停止位置から上流 19 塩基を翻

訳停止位置上流配列として抽出した。これらの配列間の ΔG を RNAfold (Lorenz et al., 2011)を用いて算出した。

翻訳一時停止位置の上流配列の二次構造予測

RNA の二次構造予測は CentroidFold (Sato et al., 2009)によって行った。配列は翻訳停止位置から上流 60 塩基までを抽出し、解析に用いた。

DMS-seq のデータ解析

大腸菌の DMS-seq のデータは (GSE77617) (Burkhardt et al., 2017)から取得し、リボソームプロファイリング法と同様にマッピングを行なった。各コドンの上のリードスコアは該当コドンの前後合計 33 塩基の平均値を求め算出した。DMS 処理の反応バイアスを取り除くために上記計算を 37°C で DMS 処理を行なったライブラリーと 95°C で DMS 処理したライブラリーに対して実行し、37°C 条件で算出された値を 95°C で割った値を DMS-seq value とした。

リボソームプロファイリングによって抽出した翻訳一時停止位置に蓄積したリボソームの peptidyl-tRNA の予想分子量の計算

翻訳一時停止位置での peptidyl-tRNA の分子量は、翻訳一時停止位置から上流のアミノ酸配列の分子量に tRNA の分子量 (18 kDa) を加算することにより算出した。

翻訳一時停止遺伝子群の GO 解析

Gene ontology 解析は PANTHER (Mi et al., 2019)を用いて行った。

tRNA-seq のライブラリー構築

mirVanaTM miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて in vitro 翻訳系と RNC (リボソーム-新生鎖複合体) から tRNA を精製した。精製した tRNA をデアシル化バッファー (100 mM Tris-HCl (pH 9.0)) の条件で、37°C、45 分の静置しデアシル化の反応を行った。その後、Oligo clean & Concentrator で精製した。デアシル化処理以降はリボソームプロファイリングのプロトコールと同様に、脱リン酸化、リンカー付加、逆転写、環状化、PCR 増幅を行い HiSeq 4000 (illumine)

でシーケンスングを行った。シーケンスデータは tRNA database (http://lowelab.ucsc.edu/GtRNAdb/Esch_coli_K12/)へマッピングし解析を行った。

S1 irCLIP-seq のライブラリー構築

irCLIP に使用するリンカーは先行研究(McGlinchey and Ingolia, 2017)を参考に変更を加えた。またライブラリー調製は岩崎信太郎主任研究員に行っていただいた。GeneDesign にて DNA オリゴ (5'-/5Phos/NNNNNJJJJJAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAAAAA/N (6) Azide/-3') を合成した (/5Phos/: 5' monophosphate、N: random nucleotide、J: sample barcode sequence、/N (6) Azide/: Azide-PEG4-NHS-Ester conjugated with amino C6 linker)。本実験ではリンカーバーコードを ATCGT、AGCTA、CGTAA、CTAGA とした。Mth ligase (New England Biolabs) によってプレアデニル化を行なった (McGlinchey and Ingolia, 2017)後、クリック反応によって IRDye 800CW DBCO (LI-COR) を PBS 内で共有結合させた。さらにこの DNA リンカーを Oligo Clean & Concentrator Kit (Zymo Research) で精製しリンカーライゲーション反応で使用した。

大腸菌ライセートはリボソームプロファイリングの章と同様に回収した。破碎バッファー内には翻訳阻害剤 (100 µg/ml クロラムフェニコールまたは 2000 µg/ml カプレオマシン) を加えた。20 µg のトータル RNA 量の 100 µl サンプルを Terasaki plate 上に置き、CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP) を用いて氷上で 254 nm UV light を 400 mJ/cm² の条件で UV 照射処理を行なった。その後サンプルを 900 µl のスクロースクッションバッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM、NH₄Cl、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、1 M sucrose、100 µg/ml クロラムフェニコール または 2000 µg/ml カプレオマイシン) 上にのせ、TLA110 rotor (Beckman-Coulter) で 100,000 rpm、4 °C、1 時間の条件で超遠心を行なった。リボソームペレットを 50 µl の破碎バッファーで再懸濁した。切断バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NH₄Cl、10 mM MgCl₂、5 mM CaCl₂、1 mM DTT) で平衡化した 15 µl の Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) に固定した S1 抗体を用いてリボソーム上の S1 タンパク質の精製を行なった。際懸濁リボソーム溶液をビーズと混ぜ合わせ、4°C で 1 時間静置した。その後、ウォッシュ

バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5、1 M NH₄Cl、2 mM EDTA、5 mM CaCl₂、1% Triton X-100、0.5% SDS、0.5% deoxycholate、1 mM DTT) で5回洗ったあと、さらに切断バッファーで2回洗浄した。次にビーズ上で RNase 処理を行なった。100 μ l の切断バッファー内に 0.01 U/ μ l MNase (TaKaRa) を加え Thermomixer (Eppendorf) を用いて 15 秒 1400 rpm、90 秒 休止の条件で 25°C で 45 分攪拌した。CaCl₂ の代わりに 5 mM EGTA を加えた切断バッファーで3回洗浄し、MNase の反応を停止させた。ビーズ上で S1 抗体に結合した RNA を 10 U の T4 PNK (New England Biolabs) を含む 10 μ l の 1 $\times$ T4 Polynucleotide Kinase Reaction Buffer (New England Biolabs) 内で 37°C、1 時間の条件で脱リン酸化した。その後、3.3 U/ μ l T4 RNA Ligase 2, truncated KQ (New England Biolabs)、1 $\times$ T4 RNA Ligase Reaction Buffer (New England Biolabs)、17% PEG8000 (New England Biolabs)、0.25 μ M IR800- labelled linker を含む 20 μ l の反応液内でリンカーライゲーションを行なった。Thermomixer を用いて 15 秒 1400 rpm、90 秒 休止の条件で 16°C で終夜攪拌した。ビーズを切断バッファーで3回洗浄した。沈殿物を 1 $\times$ Bolt LDS sample buffer (Thermo Fisher Scientific) で溶出し、4-12% Bis-Tris Plus Gel (Thermo Fisher Scientific) と Bolt MOPS SDS Running Buffer (Thermo Fisher Scientific) を用いて電気泳動したのち、Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) でニトロセルロースメンブレンに転写した。Odyssey CLx Infrared Imaging System (LI-COR) によって赤外線シグナルを検出し、RNA を含む目的領域を切り出し、0.2 mg of Proteinase K (Roche) を含む 200 μ l の反応液 (100 mM Tris-HCl pH 7.5、50 mM NaCl、1 mM EDTA、0.2% SDS) 内で 50°C 1 時間、Thermomixer 15 秒 1000 rpm、30 秒 休止の条件で攪拌した。RNA を Direct-zol MicroPrep Kit (Zymo Research) で精製した。その後の手順はリボソームプロファイリングの項で示したライブラリー作製法と同様の手順で実験を行った。rRNA は Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria) (Illumina) で除去処理を行った。ライブラリーは HiSeq4000 (Illumina) で配列の解読を行なった。

取得した配列データはリボソームプロファイリングと同様に解析した。各コドン上のリードは各遺伝子上の平均リード数でノーマライズした。

クライオ電子顕微鏡のサンプル調製

クロラムフェニコール処理およびカプレオマイシン処理のリボソームの精製

大腸菌をリボソームプロファイリングと同様にして回収し、ライセートを調製した。ライセートを 20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NH₄Cl、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、100 µg/ml chloramphenicol または 200 µg/ml capreomycin、2 U/ml SUPERase•In RNase inhibitor (Thermo Fisher Scientific) を含む 10-50% のショ糖密度勾配上に載せ P40ST Rotor (HITACHI) を用いて 35,300 rpm、4°C、2.5 時間の条件で遠心した。サンプルは Gradient Station (Biocomp) と MICRO COLLECTOR AC-5700 (ATTO) を用いて回収した。吸光は BIO MINI UV MONITOR AC-5200S (ATTO) を用い検出した。ポリソームの画分を回収したのち、Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters 100K (Millipore) を用いて grid buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NH₄Cl、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、100 µg/ml chloramphenicol または 2000 µg/ml capreomycin) にバッファー置換した。サンプルを液体窒素で凍結させ -80°C で保存した。

RNC (Ribosome nascent-chain complex) 複合体の精製

pCA24N-6xHis-HRV3C-ftsQ85-HA-ycbZmotif を primer1 (5'-GGCCTAATACGACTCACTATAGGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGG-3') and primer3 (5'-AGTCAGTCACGATGAATTCCCCTAGCTTGG-3') を用いて増幅させた PCR 産物を 1.5 ml の PURE flex 1.0 (GeneFrontier) に加え、37°C、30 分間の条件で試験管内転写および翻訳を行なった。180 µl の反応液ごとに 900 µl スクロースクッションバッファー (20 mM Tris-HCl pH 6.8、150 mM NH₄Cl、50 mM MgCl₂、5 mM 2-mercaptoethanol、0.1% (v/v) Nikkol、1 M sucrose) にのせ、100,000 rpm、4°C で TLA110 rotor (Beckman-Coulter) を用いて 1 時間遠心した。上清を除去後、ペレットを 500 µl 再懸濁バッファー (20 mM Tris-HCl pH 6.8、150 mM NH₄Cl、50 mM MgCl₂、5 mM 2-mercaptoethanol、0.1% (v/v) Nikkol) で再懸濁した。RNC を精製するため、1200 µl の TALON Metal Affinity Resin (Clontech) を Mini Bio-Spin Chromatography Columns (Bio-Rad) にのせ、再懸濁バッファーを用いて平衡化した。500 µl の再懸濁したリボソーム画分を平衡化させたカラムにのせ 20 分間静置した。700 xg で 1 分遠心したのち 5 ml の

再懸濁バッファーで洗った。さらに 2.5 ml の溶出バッファー (20 mM Tris-HCl pH 6.8、150 mM NH₄Cl、50 mM MgCl₂、5 mM 2-mercaptoethanol、0.1% (v/v) Nikkol、250 mM imidazole pH 7.0) を加え RNC を溶出させ、上記と同様にスクロースクッションを行なった。ペレットは 5 mM 2-mercaptoethanol を 10 mM DTT に置き換えた 100 μ l の再懸濁バッファーに溶かした。RNC 溶液を 20 mM Tris-HCl pH 6.8、150 mM NH₄Cl、50 mM MgCl₂、10 mM DTT、0.1% (v/v) Nikkol を含む 10-50%のショ糖密度勾配の上のせ、P40ST Rotor (HITACHI) を用いて 14,400 rpm、4°C で 15 時間遠心した。70S 画分を回収し、上記と同様にスクロースクッションを行なった。最後にペレットを 50 μ l のグリッドバッファー (20 mM Tris-HCl pH 6.8、150 mM NH₄Cl、50 mM MgCl₂、2 mM DTT、0.1% (v/v) Nikkol) で懸濁し、液体窒素で凍結させて、実験で使用するまで -80°C で保存した。

クライオ電子顕微鏡を用いたリボソームの単粒子解析

クライオ電子顕微鏡を用いた解析は東北大学 横山武司助教に行っていた。クライオ電子顕微鏡のグリッドのサンプル準備では、クロラムフェニコールを含む 70S、カプレオマイシンを含む 70S、および *ycbZ* で失速した 70S を含む 3 つのリボソーム検体の濃度を 50nM に調製した。自家製の薄いアモルファスカーボン層でコーティングされた Quantifoil R1.2 / 1.3 300 メッシュ Cu グリッド (Quantifoil) に、3 μ L のリボソーム標本をのせた。グリッドは、使用前に PID-10 プラズマイオンボンバーダー (真空装置) を使用し、5mA で 10 秒間グロー放電処理を行った。過剰量の溶液を濾紙で拭き取り、Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific) を使用してガラス化するために直ちに液体エタンに浸した。その後 K2 サミット直接電子検出器 (Gatan) を備えた Tecnai Arctica 透過型電子顕微鏡 (Thermo Fisher Scientific) を使用して画像化を行った。自動画像取得は、シリアル EM プログラム (Mastrorade, 2005, [DOI:10.1002/1522-2675\(200503\)27:3<575::AID-JEMB57503>3.0.CO;2-1](#)) を使用して、公称倍率 x23,500 で実行した。抗生物質を含む検体のデータ収集は、超解像モードで実行した。したがって、ピクセルサイズは 2 倍細くなり、表 S1 に示す 0.735Å に相当する。試料レベルでの電子の総曝露量は約 50e⁻/Å² であり、線量は 40 フレームに分割された (表 1)。画像処理は、RELION3 (Zivanov et al., 2018) を使用して実行した。

Integrated nascent chain profiling (iNP 解析)

先行の実験条件を参考に実験を行った (Chadani et al., 2016)。PCR 反応の増幅産物を 1/5 希釈したものを 10 μ M [35 S]methionine (PerkinElmer) が入った PURE system の全量の 1/10 になるように加えた。37°C で 30 分インキュベート後、10 μ l の PURE system 反応液に対して 150 μ l の 5% TCA を加え氷上で 10 分以上静置した。その後 20,000 xg、4 °C で 10 分遠心し、上清を除去した。900 μ l のアセトンを加え、20,000 xg、4 °C で 3 分遠心し、上清を除去した。その後、十分に乾燥させアセトンを飛ばしたのち、サンプルバッファー (62.5 mM Tris·HCl (pH 6.8)、2% SDS、10% glycerol、50 mM DTT) で再懸濁した。サンプルは Bolt 12% Bis-Tris Plus gel (Thermo Fisher Scientific) と Bolt MES SDS Running Buffer (Thermo Fisher Scientific) を用いて泳動した。泳動後、ゲルドライヤー (Bio Rad) を用いて 80 °C で 1 時間、ゲルを乾燥させた。乾燥させたゲルをイメージングプレートで挟み、4 日間放置した。Amersham Typhoon scanner IP システム (Cytiva) を用いて画像解析を行なった。

ウエスタンブロッティング

peptidyl-tRNA のシグナルを検出するためにウエスタンブロッティングを行った。サンプルは iNP 解析の際と同様にして作成した。Anti-S1 (Christian Spahn 研究室より提供, 1:1000) (Duval et al., 2013)、anti-S2 (Abcam, ab193293, 1:1000)、anti-HA-tag (MBL science, M180-3, 1:1000) を第一抗体として使用した。第二抗体には IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody (LI-COR) または IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody (LI-COR) 用い、Odyssey CLx Imaging System (LI-COR) にて検出した。

S1 除去リボソームの調製

先行研究(Duval et al., 2013)を参考に S1 をリボソームから取り除いた。PolyU Sepharose 4B (GE Healthcare) とコントロール用の Pierce Control Agarose Resin

(Thermo Fisher Scientific) を Mini Bio-Spin Chromatography Columns (Bio-Rad) に移し、平衡バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NH₄Cl、50 mM MgCl₂、1 mM DTT) で平衡化させた。1 μM になるよう再懸濁させた PURE flex1.0 (GeneFrontier) を平衡化させたレジンと混ぜ 4°C で 1 時間インキュベートした。その後、カラムを 700 xg で 1 分遠心しフロースルー画分を回収した。

***In vitro* 翻訳系を用いたルシフェラーゼレポーター解析**

pCI-neo-Fluc-EGFP から forwad primer 5'-

TAATACGACTCACTATAGGatacgcacataaggctattgtacgtatgcaaattaataaaaggagagtagc

aatgtcattcgaattacctgcaatggaagacgccaaaaaca -3' と reverse primer 5'-

GTTATTGCTCAGCgggttagcgccgcgataggcggtgatcccggttt -3'を用いて DNA 断片を増

幅させた。CI-neo-1xEGFP-Fluc-EGFP と pCI-neo-2xEGFP-Fluc-EGFP は forward

primer と し て 5'-

TAATACGACTCACTATAGGatacgcacataaggctattgtacgtatgcaaattaataaaaggagagtagca

atgtcattcgaattacctgcaGGGTCGACCTGCAGC -3'を使用した。これらの DNA 断片を

鋳型として T7-Scribe Standard RNA IVT Kit (CELLSCRIPT) をもちいてレポ

ーターmRNA を作製した。*In vitro* 翻訳実験は PURE flex 1.0 (GeneFrontier) をベ

ースに S1-depleted あるいは mock-treated リボソームを用いて 37°C で 30 分イン

キュベートさせた。発光強度は dual-luciferase reporter assay system (Promega)

と GloMax (Promega) によって計測した。

謝辞

本研究を行うにあたり、東京工業大学 科学技術創成研究院・細胞制御工学センター 田口研究室の田口英樹教授、丹羽達也助教、茶谷悠平特任助教には詳細なディスカッション及び実験指導など、大変お世話になりました。田口教授は実験当初、リボソームプロファイリング法を研究室で立ち上げるゼロの段階から日々のディスカッションを通して様々なアドバイスをいただくことができました。博士課程以降は研究指導委託により理化学研究所に活動の拠点を移したため、直接ご指導いただく機会は減ってしまいましたが、進捗状況の報告に伺った際には建設的なアドバイスを数多くいただくことができました。また丹羽助教には *in vitro* 翻訳系に関する技術の的確なアドバイスをいただくことができました。茶谷特任助教には、*in vitro* 翻訳系を用いた実験など生化学的手法の基礎を多く学ばせていただきました。

理化学研究所 岩崎システム RNA 生化学研究室 岩崎信太郎主任研究員にも感謝申し上げます。当初は共同研究として岩崎研究室にお世話になっていましたが、最終的には研究指導委託により直属のメンターになっていただきました。リボソームプロファイリングを用いた網羅解析の指導及び、日々の研究の詳細についてのディスカッションまで多岐に渡りお世話になりました。実験がうまくいかない際なども的確な助言をいただくことができ、円滑に研究プロジェクトを進行させることができました。また、実験のみならず、プレゼンテーションのスキルや論文の執筆方法など研究者としての作法を一から丁寧に教えていただくことができました。同研究室の七野悠一基礎科学特別研究員および水戸麻里様にも実験の基本的な技術に関して多くの助言をいただきました。

S1 抗体は、Christian Spahn 教授、山本紘研究員に提供していただきました。カプレオマイシン、スペクチノマイシンは東京大学の長尾翌手可助教に提供していただきました。S1 欠損株は Stefano Marzi 教授に提供していただきました。

本研究を進めるにあたり共同研究者の方々にもお世話になりました。クライオ電子顕微鏡の解析にて理化学研究所 生命科学研究機能センター 伊藤拓宏チームリーダー、東北大学 横山武司助教にお世話になりました。横山先生は様々な研究プロジェクトを抱えており、大変多忙にも関わらずリボソームの構造解析を担当してくださいました。

田口研究室秘書の福田麗様および理化学研究所 岩崎研秘書の横山理

恵様には学会参加の事務手続きなど様々な書類の手続きをサポートしていただきました。

最後に岩崎研及び田口研の皆様全員に感謝申し上げます。日々の生活を含め、充実した研究室生活を送る事ができたのも、雑談から活気のあるディスカッション、その他様々な面で自分を支えてくれた岩崎研及び田口研のメンバーのおかげです。みなさまに心より感謝申し上げます。

参考文献

- Arpat, A. B., Liechti, A., De Matos, M., Dreos, R., Janich, P., and Gatfield, D. (2020). Transcriptome-wide sites of collided ribosomes reveal principles of translational pausing. *Genome Res* 30, 985-999.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2, 2006.0008.
- Beckert, B., Turk, M., Czech, A., Berninghausen, O., Beckmann, R., Ignatova, Z., Plitzko, J. M., and Wilson, D. N. (2018). Structure of a hibernating 100S ribosome reveals an inactive conformation of the ribosomal protein S1. *Nat Microbiol* 3, 1115-1121.
- Bischoff, L., Berninghausen, O., and Beckmann, R. (2014). Molecular basis for the ribosome functioning as an L-tryptophan sensor. *Cell Rep* 9, 469-475.
- Blobel, G., and Sabatini, D. (1971). Dissociation of mammalian polyribosomes into subunits by puromycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 390-394.
- Boni, I. V., Isaeva, D. M., Musychenko, M. L., and Tzareva, N. V. (1991). Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Res* 19, 155-162.
- Borovinskaya, M. A., Shoji, S., Holton, J. M., Fredrick, K., and Cate, J. H. D. (2007). A steric block in translation caused by the antibiotic spectinomycin. *ACS Chem Biol* 2, 545-552.
- Brandman, O., Stewart-Ornstein, J., Wong, D., Larson, A., Williams, C. C., Li, G. W., Zhou, S., King, D., Shen, P. S., Weibezahn, J., Dunn, J. G., Rouskin, S., Inada, T., Frost, A., and Weissman, J. S. (2012). A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* 151, 1042-1054.
- Brar, G. A., and Weissman, J. S. (2015). Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 651-664.
- Bulkley, D., Innis, C. A., Blaha, G., and Steitz, T. A. (2010). Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17158-17163.
- Burkhardt, D. H., Rouskin, S., Zhang, Y., Li, G. W., Weissman, J. S., and Gross, C. A. (2017). Operon mRNAs are organized into ORF-centric structures that predict translation

efficiency. *Elife* 6, e22037.

Buskirk, A. R., and Green, R. (2017). Ribosome pausing, arrest and rescue in bacteria and eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372,

Byrgazov, K., Grishkovskaya, I., Arenz, S., Coudevylle, N., Temmel, H., Wilson, D. N., Djinovic-Carugo, K., and Moll, I. (2015). Structural basis for the interaction of protein S1 with the *Escherichia coli* ribosome. *Nucleic Acids Res* 43, 661-673.

Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407, 340-348.

Chadani, Y., Ito, K., Kutsukake, K., and Abo, T. (2012). ArfA recruits release factor 2 to rescue stalled ribosomes by peptidyl-tRNA hydrolysis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 86, 37-50.

Chadani, Y., Niwa, T., Chiba, S., Taguchi, H., and Ito, K. (2016). Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E829-38.

Chadani, Y., Niwa, T., Izumi, T., Sugata, N., Nagao, A., Suzuki, T., Chiba, S., Ito, K., and Taguchi, H. (2017). Intrinsic Ribosome destabilization underlies translation and provides an organism with a strategy of environmental sensing. *Mol Cell* 68, 528-539.e5.

Chadani, Y., Ono, K., Ozawa, S., Takahashi, Y., Takai, K., Nanamiya, H., Tozawa, Y., Kutsukake, K., and Abo, T. (2010). Ribosome rescue by *Escherichia coli* ArfA (YhdL) in the absence of trans-translation system. *Mol Microbiol* 78, 796-808.

Charneski, C. A., and Hurst, L. D. (2013). Positively charged residues are the major determinants of ribosomal velocity. *PLoS Biol* 11, e1001508.

Cornish, P. V., Ermolenko, D. N., Noller, H. F., and Ha, T. (2008). Spontaneous intersubunit rotation in single ribosomes. *Mol Cell* 30, 578-588.

Dana, A., and Tuller, T. (2012). Determinants of translation elongation speed and ribosomal profiling biases in mouse embryonic stem cells. *PLoS Comput Biol* 8, e1002755.

Dao Duc, K., and Song, Y. S. (2018). The impact of ribosomal interference, codon usage, and exit tunnel interactions on translation elongation rate variation. *PLoS Genet* 14, e1007166.

Demo, G., Rasouly, A., Vasilyev, N., Svetlov, V., Loveland, A. B., Diaz-Avalos, R., Grigorieff, N., Nudler, E., and Korostelev, A. A. (2017). Structure of RNA polymerase bound to ribosomal 30S subunit. *Elife* 6, e28560
e28560.

Diament, A., Feldman, A., Schochet, E., Kupiec, M., Arava, Y., and Tuller, T. (2018). The extent of ribosome queuing in budding yeast. *PLoS Comput Biol* 14, e1005951.

Dunkle, J. A., Wang, L., Feldman, M. B., Pulk, A., Chen, V. B., Kapral, G. J., Noeske, J., Richardson, J. S., Blanchard, S. C., and Cate, J. H. (2011). Structures of the bacterial ribosome in classical and hybrid states of tRNA binding. *Science* 332, 981-984.

Dunkle, J. A., Xiong, L., Mankin, A. S., and Cate, J. H. (2010). Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17152-17157.

Duval, M., Korepanov, A., Fuchsbaauer, O., Fechter, P., Haller, A., Fabbretti, A., Choulier, L., Micura, R., Klaholz, B. P., Romby, P., Springer, M., and Marzi, S. (2013). *Escherichia coli* ribosomal protein S1 unfolds structured mRNAs onto the ribosome for active translation initiation. *PLoS Biol* 11, e1001731.

Ermolenko, D. N., Spiegel, P. C., Majumdar, Z. K., Hickerson, R. P., Clegg, R. M., and Noller, H. F. (2007). The antibiotic viomycin traps the ribosome in an intermediate state of translocation. *Nat Struct Mol Biol* 14, 493-497.

Fluman, N., Navon, S., Bibi, E., and Pilpel, Y. (2014). mRNA-programmed translation pauses in the targeting of *E. coli* membrane proteins. *Elife* 3,

Fujita, T., Kurihara, Y., and Iwasaki, S. (2019). The plant translatoome surveyed by ribosome profiling. *Plant Cell Physiol* 60, 1917-1926.

Gagarinova, A., Stewart, G., Samanfar, B., Phanse, S., White, C. A., Aoki, H., Deineko, V., Beloglazova, N., Yakunin, A. F., Golshani, A., Brown, E. D., Babu, M., and Emili, A. (2016). Systematic genetic screens reveal the dynamic global functional organization of the bacterial translation machinery. *Cell Rep* 17, 904-916.

Gong, F., Ito, K., Nakamura, Y., and Yanofsky, C. (2001). The mechanism of tryptophan induction of tryptophanase operon expression: tryptophan inhibits release factor-mediated cleavage of TnaC-peptidyl-tRNA(Pro). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8997-9001.

Gupta, R., Kasturi, P., Bracher, A., Loew, C., Zheng, M., Villella, A., Garza, D., Hartl, F. U., and Raychaudhuri, S. (2011). Firefly luciferase mutants as sensors of proteome stress. *Nat Methods* 8, 879-884.

Guydos, N. R., and Green, R. (2014). Dom34 rescues ribosomes in 3' untranslated regions. *Cell* 156, 950-962.

Han, P., Shichino, Y., Schneider-Poetsch, T., Mito, M., Hashimoto, S., Udagawa, T., Kohno, K., Yoshida, M., Mishima, Y., Inada, T., and Iwasaki, S. (2020). Genome-wide survey of ribosome collision. *Cell Rep* 31, 107610.

Han, Y., David, A., Liu, B., Magadán, J. G., Bennink, J. R., Yewdell, J. W., and Qian, S. B. (2012). Monitoring cotranslational protein folding in mammalian cells at codon resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 12467-12472.

Handa, Y., Inaho, N., and Nameki, N. (2011). YaeJ is a novel ribosome-associated protein in *Escherichia coli* that can hydrolyze peptidyl-tRNA on stalled ribosomes. *Nucleic Acids Res* 39, 1739-1748.

Hickey, K. L., Dickson, K., Cogan, J. Z., Replogle, J. M., Schoof, M., D'Orazio, K. N., Sinha, N. K., Hussmann, J. A., Jost, M., Frost, A., Green, R., Weissman, J. S., and Kostova, K. K. (2020). GIGYF2 and 4EHP inhibit translation initiation of defective messenger RNAs to assist ribosome-associated quality control. *Mol Cell* 79, 950-962.e6.

Hussmann, J. A., Patchett, S., Johnson, A., Sawyer, S., and Press, W. H. (2015). Understanding biases in ribosome profiling experiments reveals signatures of translation dynamics in yeast. *PLoS Genet* 11, e1005732.

Ibrahim, F., Maragkakis, M., Alexiou, P., and Mourelatos, Z. (2018). Ribothrypsis, a novel process of canonical mRNA decay, mediates ribosome-phased mRNA endonucleolysis. *Nat Struct Mol Biol* 25, 302-310.

Ikeuchi, K., Izawa, T., and Inada, T. (2018). Recent progress on the molecular mechanism of quality controls induced by ribosome stalling. *Front Genet* 9, 743.

Ingolia, N. T. (2014). Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. *Nat Rev Genet* 15, 205-213.

Ingolia, N. T., Brar, G. A., Rouskin, S., McGeachy, A. M., and Weissman, J. S. (2012). The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc* 7, 1534-1550.

- Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R., and Weissman, J. S. (2009). Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* 324, 218-223.
- Iwasaki, S., and Ingolia, N. T. (2017). The growing toolbox for protein synthesis studies. *Trends Biochem Sci* 42, 612-624.
- Kaminishi, T., Wilson, D. N., Takemoto, C., Harms, J. M., Kawazoe, M., Schlutzen, F., Hanawa-Suetsugu, K., Shirouzu, M., Fucini, P., and Yokoyama, S. (2007). A snapshot of the 30S ribosomal subunit capturing mRNA via the Shine-Dalgarno interaction. *Structure* 15, 289-297.
- Karzai, A. W., Susskind, M. M., and Sauer, R. T. (1999). SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). *EMBO J* 18, 3793-3799.
- Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., and Mori, H. (2005). Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res* 12, 291-299.
- Kurihara, Y., Makita, Y., Kawashima, M., Fujita, T., Iwasaki, S., and Matsui, M. (2018). Transcripts from downstream alternative transcription start sites evade uORF-mediated inhibition of gene expression in. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 7831-7836.
- Lareau, L. F., Hite, D. H., Hogan, G. J., and Brown, P. O. (2014). Distinct stages of the translation elongation cycle revealed by sequencing ribosome-protected mRNA fragments. *Elife* 3, e01257.
- Li, G. W., Oh, E., and Weissman, J. S. (2012). The anti-Shine-Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria. *Nature* 484, 538-541.
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner Zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., and Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol* 6, 26.
- Lu, J., and Deutsch, C. (2008). Electrostatics in the ribosomal tunnel modulate chain elongation rates. *J Mol Biol* 384, 73-86.
- Mason, N., Ciufo, L. F., and Brown, J. D. (2000). Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle. *EMBO J* 19, 4164-4174.
- Matsuo, Y., Ikeuchi, K., Saeiki, Y., Iwasaki, S., Schmidt, C., Udagawa, T., Sato, F.,

- Tsuchiya, H., Becker, T., Tanaka, K., Ingolia, N. T., Beckmann, R., and Inada, T. (2017). Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control. *Nat Commun* 8, 159.
- McGlinchy, N. J., and Ingolia, N. T. (2017). Transcriptome-wide measurement of translation by ribosome profiling. *Methods* 126, 112-129.
- Meydan, S., and Guydosh, N. R. (2020). Disome and trisome profiling reveal genome-wide targets of ribosome quality control. *Mol Cell* 79, 588-602.e6.
- Mi, H., Muruganujan, A., Huang, X., Ebert, D., Mills, C., Guo, X., and Thomas, P. D. (2019). Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nat Protoc* 14, 703-721.
- Mills, E. W., Wangen, J., Green, R., and Ingolia, N. T. (2016). Dynamic regulation of a ribosome rescue pathway in erythroid cells and platelets. *Cell Rep* 17, 1-10.
- Mohammad, F., Green, R., and Buskirk, A. R. (2019). A systematically-revised ribosome profiling method for bacteria reveals pauses at single-codon resolution. *Elife* 8, e42591.
- Mohammad, F., Woolstenhulme, C. J., Green, R., and Buskirk, A. R. (2016). Clarifying the translational pausing landscape in bacteria by ribosome profiling. *Cell Rep* 14, 686-694.
- Muto, H., Nakatogawa, H., and Ito, K. (2006). Genetically encoded but nonpolypeptide prolyl-tRNA functions in the A site for SecM-mediated ribosomal stall. *Mol Cell* 22, 545-552.
- Nakatogawa, H., and Ito, K. (2001). Secretion monitor, SecM, undergoes self-translation arrest in the cytosol. *Mol Cell* 7, 185-192.
- Nakatogawa, H., and Ito, K. (2002). The ribosomal exit tunnel functions as a discriminating gate. *Cell* 108, 629-636.
- Pop, C., Rouskin, S., Ingolia, N. T., Han, L., Phizicky, E. M., Weissman, J. S., and Koller, D. (2014). Causal signals between codon bias, mRNA structure, and the efficiency of translation and elongation. *Mol Syst Biol* 10, 770.
- Qu, X., Lancaster, L., Noller, H. F., Bustamante, C., and Tinoco, I. (2012). Ribosomal protein S1 unwinds double-stranded RNA in multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 14458-14463.
- Rouskin, S., Zubradt, M., Washietl, S., Kellis, M., and Weissman, J. S. (2014). Genome-

wide probing of RNA structure reveals active unfolding of mRNA structures in vivo. *Nature* *505*, 701-705.

Saito, K., Green, R., and Buskirk, A. R. (2020). Ribosome recycling is not critical for translational coupling in. *Elife* *9*,

Sato, K., Hamada, M., Asai, K., and Mituyama, T. (2009). CENTROIDFOLD: a web server for RNA secondary structure prediction. *Nucleic Acids Res* *37*, W277-80.

Schuller, A. P., Wu, C. C., Dever, T. E., Buskirk, A. R., and Green, R. (2017). eIF5A functions globally in translation elongation and termination. *Mol Cell* *66*, 194-205.e5.

Sengupta, J., Agrawal, R. K., and Frank, J. (2001). Visualization of protein S1 within the 30S ribosomal subunit and its interaction with messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 11991-11996.

Sharma, A. K., Sormanni, P., Ahmed, N., Ciryam, P., Friedrich, U. A., Kramer, G., and O'Brien, E. P. (2019). A chemical kinetic basis for measuring translation initiation and elongation rates from ribosome profiling data. *PLoS Comput Biol* *15*, e1007070.

Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., and Ueda, T. (2001). Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol* *19*, 751-755.

Stanley, R. E., Blaha, G., Grodzicki, R. L., Strickler, M. D., and Steitz, T. A. (2010). The structures of the anti-tuberculosis antibiotics viomycin and capreomycin bound to the 70S ribosome. *Nat Struct Mol Biol* *17*, 289-293.

Stein, K. C., Kriel, A., and Frydman, J. (2019). Nascent Polypeptide Domain Topology and Elongation Rate Direct the Cotranslational Hierarchy of Hsp70 and TRiC/CCT. *Mol Cell* *75*, 1117-1130.e5.

Subramaniam, A. R., Zid, B. M., and O'Shea, E. K. (2014). An integrated approach reveals regulatory controls on bacterial translation elongation. *Cell* *159*, 1200-1211.

Svidritskiy, E., Ling, C., Ermolenko, D. N., and Korostelev, A. A. (2013). Blastocidin S inhibits translation by trapping deformed tRNA on the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 12283-12288.

Voorhees, R. M., and Ramakrishnan, V. (2013). Structural basis of the translational elongation cycle. *Annu Rev Biochem* *82*, 203-236.

Walter, P., and Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic

reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* *91*, 557-561.

Wang, L., Pulk, A., Wasserman, M. R., Feldman, M. B., Altman, R. B., Cate, J. H., and Blanchard, S. C. (2012). Allosteric control of the ribosome by small-molecule antibiotics. *Nat Struct Mol Biol* *19*, 957-963.

Weinberg, D. E., Shah, P., Eichhorn, S. W., Hussmann, J. A., Plotkin, J. B., and Bartel, D. P. (2016). Improved ribosome-footprint and mRNA measurements provide insights into dynamics and regulation of yeast translation. *Cell Rep* *14*, 1787-1799.

Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol* *12*, 35-48.

Wilson, D. N., Schlutzenzen, F., Harms, J. M., Starosta, A. L., Connell, S. R., and Fucini, P. (2008). The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 13339-13344.

Woolstenhulme, C. J., Guydosh, N. R., Green, R., and Buskirk, A. R. (2015). High-precision analysis of translational pausing by ribosome profiling in bacteria lacking EFP. *Cell Rep* *11*, 13-21.

Wu, C. C., Zinshteyn, B., Wehner, K. A., and Green, R. (2019). High-resolution ribosome profiling defines discrete ribosome elongation states and translational regulation during cellular stress. *Mol Cell* *73*, 959-970.e5.

Yanagitani, K., Kimata, Y., Kadokura, H., and Kohno, K. (2011). Translational pausing ensures membrane targeting and cytoplasmic splicing of XBP1u mRNA. *Science* *331*, 586-589.

Zarnegar, B. J., Flynn, R. A., Shen, Y., Do, B. T., Chang, H. Y., and Khavari, P. A. (2016). irCLIP platform for efficient characterization of protein-RNA interactions. *Nat Methods* *13*, 489-492.

Zhang, J., Pan, X., Yan, K., Sun, S., Gao, N., and Sui, S. F. (2015). Mechanisms of ribosome stalling by SecM at multiple elongation steps. *Elife* *4*, e09684.

Zhang, S., Hu, H., Zhou, J., He, X., Jiang, T., and Zeng, J. (2017). Analysis of ribosome stalling and translation elongation dynamics by deep learning. *Cell Syst* *5*, 212-220.e6.

Zhang, W., Dunkle, J. A., and Cate, J. H. (2009). Structures of the ribosome in

intermediate states of ratcheting. *Science* 325, 1014-1017.

Zivanov, J., Nakane, T., Forsberg, B. O., Kimanius, D., Hagen, W. J., Lindahl, E., and Scheres, S. H. (2018). New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *Elife* 7,

Zylber, E. A., and Penman, S. (1970). The effect of high ionic strength on monomers, polyribosomes, and puromycin-treated polyribosomes. *Biochim Biophys Acta* 204, 221-229.