

研究終了報告書

「温故知新、翻訳装置に内在する微生物環境応答機構の理解」

研究期間：2021年10月～2024年3月

研究者：高田 啓

1. 研究のねらい

翻訳反応はロバストなものではなく、抗菌薬や翻訳途上鎖の特性によって停滞するなど脆弱性を内包しており、その補完機構に関する研究はこの10年来のホットピックの一つである。当該研究者はこれまでにモデル微生物・枯草菌を用いた解析から、翻訳の曖昧さを補う**翻訳品質管理機構 RQC** (Ribosome associated Quality Control) の分子メカニズムが明らかにしてきた。さらなる遺伝学的解析から RQC 機能不全を抑圧する変異をリボソームサブユニット遺伝子 *rpsU* の ORF 内に見出した(未発表データ)。*rpsU* 欠失変異はバイオフィーム形成の亢進を引き起こすものとして当該研究者が以前に報告したものであり、当時はその分子メカニズムを説明するまでに至らなかった。この一連のユニークな現象に関して、“*rpsU*欠失によるリボソームの質的な変化が翻訳停滞の回避を助長し、更にその結果バイオフィーム形成を亢進する”と考察した。この偶然のめぐり合わせにより、翻訳速度や品質管理機構の状況を通して、生長環境における栄養状態を感知し、バイオフィーム形成などの環境応答機構へとつながるバクテリアの生き残り戦略”が存在するのではないかという着想に至った。加えて、翻訳品質管理機構 RQC の関連因子やその標的となる翻訳停滞産物に関しては理解が進んでおらず、特に翻訳停滞産物の実態を解明することは、これまで見過ごされてきた遺伝情報に内在する翻訳停滞誘発エレメントの理解につながる非常に重要な挑戦的課題であった。そこで本研究では、①**翻訳品質管理機構の全貌の理解**、②**翻訳装置におけるリボソームタンパク質 RpsU の機能の解明**、③**バイオフィーム形成における RpsU の役割の検討**、の3点を通して微生物の翻訳装置に内在する新規の環境応答機構の概念化を目指した。翻訳品質管理機構の解明は生命活動の根幹に関わる重要なプロセスの理解につながるだけでなく、モデル微生物における異種遺伝子発現を目的とした遺伝子工学的設計に新しい視点を付与する、バイオテクノロジーの発展に寄与する大きな可能性を秘めていると考えた。また、翻訳品質管理機構と環境応答機構をつなぐ新しいコンセプトを提案することは、微生物制御の観点からも非常に重要な知見になると考えた。

2. 研究成果

(1) 概要

研究計画は、上記の“研究のねらい”で掲げた①**翻訳品質管理機構の全貌の理解**②**翻訳装置におけるリボソームタンパク質 RpsU の機能の解明**、③**バイオフィーム形成における RpsU の役割の検討**の3点であり、一部を除き、おおよそ当初の予定通り遂行することができた。また、当初の計画に加え、④**非モデル微生物のリボソームの単離と生化学的な比較活性評価**を実施し、予想外の結果を得ることができた。これら成果をもって、“微生物の翻訳装置に内在する新規の環境応答機構の概念化”という目標を概ね達成できたと考える。

① **翻訳品質管理機構の全貌の理解**

遺伝情報に内在する翻訳停滞誘導配列の網羅的な同定法の確立を第一優先課題に挙げ

初年度から取り組んできたが、当初提案した方法では上手く行かず、試行錯誤に想定よりも多くの時間を要した。最終的には、翻訳停滞産物であるペプチジル tRNA がタンパク質と RNA の両方の特性を持っていることに着目し、単離・解析手法を確立することで、当初の目標通り翻訳停滞誘導配列の候補をリスト化することができた。

翻訳品質管理機構の関連因子の探索については、遺伝学的な解析から新規の関連因子 X を同定し、生化学的解析・Cryo-EM を用いた構造解析によってその作用機序を解明した。

その他の補完機構の探索については抗菌薬に起因する翻訳の破綻をレスキューする抗生物質耐性因子 ABCF に関する発現制御機構とその多様性に関する筆頭及び共同筆頭論文の2報を成果として出すことができた(JST との共同プレスリリース)。

② 翻訳装置におけるリボソームタンパク質 RpsU の機能の解明

翻訳動態をモニターするレポーター系による評価の結果、翻訳終結異常(ストップコドンの読み飛ばし)が *rpsU* 欠失変異体で上昇していることを発見し、“10 年来の課題であった RpsU の機能”が翻訳終結など、リボソームの一時停滞と密接に関係していることを突き止めた。さらに、これまでの常識を覆す“ストップコドンの読み飛ばしのルール”の一端を明らかにすることができた。

③ バイオフィーム形成における RpsU の役割の検討

当初の計画より遅れているが、“ストップコドンの読み飛ばし”によって生じた非典型的な翻訳産物がバイオフィーム形成を亢進していると考え、候補遺伝子の探索・解析を継続している。

④ 非モデル微生物のリボソームの単離と生化学的な比較活性評価

研究対象を非モデル微生物へと拡大させる第一歩として、合計 6 種の異なる“クラス”に属する非モデル微生物からリボソームを精製し、大腸菌由来の翻訳関連因子とのハイブリット型 *in vitro* 翻訳系の構築に成功した。“ストップコドンの読み飛ばし”の傾向や頻度に関して検証し、リボソームの特性は不変ではなく種特異性があることを明らかにした。

(2) 詳細

“遺伝情報に内在する翻訳停滞誘導配列の網羅的な同定法の確立”

当初は翻訳停滞産物の C 末端にポリアラニンが付加されることに着目し、抗ポリアラニン抗体を用いて濃縮・精製することを計画していたが、外注をしていた抗ポリアラニン抗体が上手く反応せず、計画の変更を余儀なくされた。一方で、解析を進める中で、①細胞内で生じた翻訳停滞産物である長鎖 pep-tRNA は切断酵素 Pth によって即座に切断されるため、温度感受性変異株を用いて、Pth 不活化条件 45℃ での単離が必要、②長鎖 pep-tRNA が pH7.0 以上で自己切断しまうため、酸性・変性条件での精製が必要、③酸性・変性条件で細胞を破碎するためには、強力なビーズ破碎が必要、の3つ克服点を明らかにした。さらに長鎖 pep-tRNA がタンパク質と RNA の両方の特性を持っていることに着目し、単離した翻訳停滞産物を東工大・丹羽博士の協力により MS 解析で同定することで、最終的に 45 種類の翻訳停滞産物をリスト化した。その内訳は発現量が高いタンパク質が多く含まれ、チャージを持った残基が C 末端に多い傾向なども見られ、また翻訳伸長の初期に停滞を起こしていることがわかった。今後は、この傾向を手がかりに Ribosome-profiling (Ribo-seq) 解析など検出感度の高い手法を用いて、ゲノムワイドに探索することにより、翻訳停滞産物の実態を包括的に理解できると考えている。

“翻訳品質管理機構の関連因子の探索”

これまでに当該研究者は、翻訳の破綻によって生じた50S リボソームサブユニット上で停滞産物に分解タグとして働く“ポリアラニン”を付加する RqcH とその促進因子 RqcP を同定している。そこで、既知遺伝子 *rqcH*, *rqcP* は独立経路で働く *ssrA* 遺伝子と合成致死になることをヒントに、ゲノムワイドなスクリーニング系を用いて、*ssrA* 遺伝子と合成致死になる遺伝子の探索を行い、機能未知遺伝子 X を同定した。また興味深いことに、ゲノム比較解析から X は光合成微生物や陸上植物における主要な翻訳品質管理因子であることを明らかにし、進化的な重要性を示す結果となった。現在ハイ・インパクトジャーナルへ投稿している。

“その他の補完機構の探索”

抗菌薬に起因する翻訳反応の破綻をレスキューする抗生物質耐性因子 ABCF の発現制御機構に関して、枯草菌の ABCF 因子 VmlR に焦点を当て、遺伝学的・生化学的解析を行った。*vmlR* 遺伝子上流(5' UTR)の新規 uORF における抗菌薬特異的な翻訳停滞が VmlR の発現を誘導することを世界で初めて明らかにし、“抗菌薬と翻訳途上鎖の相互作用による翻訳停滞現象”を逆手に使った微生物の抗菌薬耐性機構として論文化した(原著論文1)。さらに、筑波大学・尾花博士らとの共同研究により、抗菌薬使用などによりディフィシル菌(*C. difficile*)が増殖して常在腸内細菌叢がかく乱され下痢などを発症するディフィシル感染症(CDI)において、ABCF 因子 CplR が重要な役割を果たしていることを明らかにし、論文化した(原著論文2, JST との共同プレスリリース)。

② 翻訳装置におけるリボソームタンパク質 RpsU の機能の解明

“*rpsU* 欠失によるリボソームの質的な変化が翻訳停滞の回避を助長する”という仮説のもと、様々な翻訳動態をモニターするレポーター系による評価を行った。試行錯誤の結果、*gfp* 遺伝子内にストップコドンを導入した独自のレポーター系を構築することで、翻訳終結異常(ストップコドンの読み飛ばし)が *rpsU* 欠失変異体で上昇していることを発見し、“10 年来の課題であった RpsU の機能”が翻訳終結など、リボソームの一時停滞と密接に関係していることを突き止めた。さらに独自のレポーター系を構築する中でストップコドン上流にコードされているアミノ酸配列の特性によって翻訳終結の効率が大きく異なることを発見し、これまでの常識を覆す“ストップコドンの読み飛ばしのルール”の一端を明らかにすることができた。

③ バイオフィルム形成における RpsU の役割の検討

rpsU 欠失変異体では翻訳終結異常(ストップコドンの読み飛ばし)によって遺伝子下流(3' UTR)にコードされた余分な配列が付加された非典型的な翻訳産物がバイオフィルム形成の亢進を引き起こしていると考え、候補遺伝子の探索・解析を行った。しかし、原因遺伝子が複数ある可能性もあり、個別の解析では原因遺伝子を見つけるに至っていない。今後は、ゲノムワイドにリボソーム動態を可視化できる Ribo-seq 解析を用いた探索が課題である。この点に関しては当初予想していなかった成果が出る見込みであり、研究計画に新たな内容を追加することにより、ACT-X の成果が新たな挑戦につながることを期待できると判断し、予算のチャレンジ枠・増額を受けて、Ribo-seq 解析の立ち上げ及び改良に取り組んでいる。現在、原因遺伝子の同定まであと一歩のところまで来ている。

④ 非モデル微生物のリボソームの単離と生化学的な比較活性評価

合計 6 種の異なる“クラス”に属する非モデル微生物からリボソームを精製し、市販の大腸菌由来の翻訳関連因子とのハイブリット型 *in vitro* 翻訳系の構築に成功し、モデル基質 GFP の発現を確認した。さらに、独自に構築したレポーター系を用いて“ストップコドンの読み飛ばし”の傾向や頻度に関して検証し、種特異性があることを明らかにした。これら想定外の結果は、翻訳途上鎖が相互作用するリボソーム内部の構造の違いに起因すると考えられ、リボソームの特性は不変ではなく、種ごとに多様であることを示している。

【ACT-X 研究領域内外の研究者や産業界との連携に関して】

オンサイト領域会議を契機に、領域内での交流が活発化し、2023 年度に入り個別のワークショップや合同セミナーへの参加が増加した。これにより、異分野との交流を通じて研究の視点が広がり、新たなアプローチやアイデアが生まれる貴重な場となった。特に、試験管内翻訳系を用いた実験に関する具体的なアドバイスを受けることで、応用研究に向けた新しいアイデアの創出につながった。さらに、ナノスケール計測・構造解析・構造制御に関する多様な提案を受け、基礎研究の成果をどのように応用展開するかについて深く考える機会となった。こうした交流を通じて得られた知見は、今後の研究活動に大いに役立つと確信している。ACT-X 研究領域内での共同研究は始まったばかりではあるが、自身の強みである“生化学的解析”や“翻訳反応”を主軸に据え、引き続き「環境とバイオテクノロジー」の分野に貢献すべく、精力的に分野横断的な共同研究を推進したい。

3. 今後の展開

本研究では、モデル微生物・枯草菌を対象に、翻訳途上鎖とリボソーム内部の特異的な相互作用による翻訳破綻の実態の解明や新規翻訳品質機構関連因子 X の発見、翻訳反応の破綻を誘導する現象の理解とその不完全さを補完するメカニズムの解明に大きく貢献できた。また、リボソーム内部と翻訳途上鎖の相互作用を逆手に利用した抗菌薬応答機構やストップコドン読み飛ばしなど、翻訳装置が曖昧さを内在させているその生理学的意義の理解に大きく貢献できた。そこでまずは、本研究の成果で得られた、翻訳途上鎖とリボソーム内部の特異的な相互作用による“翻訳破綻”や“ストップコドン読み飛ばし”現象をゲノムワイドに解析し、その法則性を理解する発展的なアプローチを実施する必要がある。特に、当該研究者の 10 年来の研究課題であった“リボソームタンパク質 RpsU の解離を介したバイオフィーム形成制御”に関して、ストップコドンの読み飛ばしによって生じた非典型的な翻訳産物の解明を目指し、ゲノムワイドにリボソームの動態を可視化する Ribo-seq 解析を実施する(1年以内)。現行の微生物を対象にした Ribo-seq 解析は、プロトコルの問題上、翻訳動態の可視化が不十分であることが課題である。現在、プロトコルの改良をおこなっており、解析の高精度化の実現までもう一步の所まで来ている(1年以内)。非モデル微生物のリボソームの単離と生化学的な比較活性評価の結果から、“リボソームの特性は不変ではなく、種ごとに多様である”ことが明らかになった。今後さらなる解析を進める上で、現在使用している市販の *in vitro* 翻訳系では buffer 組成や構成タンパク質が不明確であり、また、他の翻訳因子(例えば、非モデル微生物由来のユニークな翻訳因子)に置き換えることができず、生化学的に大きな

制約が生じる。そこで、これまで翻訳研究に従事してきたノウハウを活かし、自身で *In vitro* 翻訳系の構築を計画している(1年以内)。Ribo-seq 解析に必要な菌体量を現行の 20 mL から 1 mL 程度にスケールダウンすることができれば、96 well など多検体での解析が可能となり、翻訳プロセスのスコア化がより簡便になると考えられる(～3年以内)。Ribo-seq 解析と *In vitro* 翻訳系を両輪にして、普遍的な翻訳過程の新しい基本原理、微生物種間での共通性・多様性の理解を通し、新規因子 X に代表されるような新規翻訳制御因子の同定を加速させる(～5年)。また、非モデル微生物のリボソームの特性(正確さ・頑強さなど)を理解し、その分子機構を解明することで、今まで大腸菌などのモデル微生物での知見をベースに構築されてきた“翻訳プロセスの常識”を一変させたい。長期的には、こういった知見をもとに、例えば人エミノ酸を取り込ませた機能性ペプチドなど生産したい分子に応じてベストミックスな翻訳因子の組み合わせやリボソーム自身の改変を可能にし、自在に翻訳プロセスをデザインできる未来を渴望している(～10年)。

社会の持続的発展の実現のため、微生物による有用物質生産の高度化が期待されており、ゲノム編集、転写制御などの技術に関して飛躍的な成果が上がっている。その一方で、翻訳反応に焦点を当てた技術開発の事例は少なく、バイオものづくりを志向した翻訳制御研究は物質生産向上につながるポテンシャルを秘めている。将来的には、微生物ものづくりに特化したバイオベンチャーなどに技術提供することで、スマートセルのような有用物質生産細胞の構築・改良において、上記で挙げた翻訳制御因子を応用した「翻訳プロセスの最適化」と、Ribo-seq 解析を活用した「翻訳プロセスのスコア化」という新しいプロセスの導入によってバイオものづくり産業の加速に貢献したいと考えている(～10年)。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

ACT-X 研究期間内では、以下の成果・知見が得られた。

- ①遺伝情報に内在する翻訳停滞誘導配列の同定法の確立及びリスト化
- ②新規翻訳品質機構関連因子 X の同定
- ③抗菌薬に起因する翻訳反応の破綻をレスキューする抗生物質耐性因子 ABCF の発現制御機構の解明
- ④翻訳装置におけるリボソームタンパク質 RpsU の機能の解明

このうち、②の成果は論文投稿予定であり、③の成果は原著論文として投稿・掲載された。一方で、④の成果をもとに“バイオフィルム形成における RpsU の役割の検討”を計画していたが、原因遺伝子の同定まで至る事ができなかった。今後、Ribo-seq 解析を用いたゲノムワイドな探索が急務である。チャレンジ枠による予算の増額を受けて、Ribo-seq 解析の立ち上げ及び改良に取り組み、原因遺伝子の同定まであと一歩のところまで来ている。今後の研究展開の突破口となることが期待されることから、増額支援の効果を十分に発揮できたと考えられる。一方で、非モデル微生物のリボソームを用いた *in vitro* 翻訳系の確立など、想定していなかった次に繋がる興味深い成果も得られた。本研究の過程で得た想定外の結果や失敗に真摯に向き合い、“好奇心と研究を楽しむマインド”を大切に粘り強く実験に打ち込むことで、今後自身の研究を発展させる新しい発見をすることができた。よって、当初の目的は80%程

度達成できたと考えている

【研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)】

研究実施体制は、主に研究代表者が主体となって、遂行することができた。科研費雇われポスドクとしてメインの業務がある中で本研究課題を遂行することは簡単ではなかったが、東工大・丹羽博士、筑波大・尾花博士、ハンブルグ大の Daniel 博士など共同研究者に恵まれ、効率的に研究を進めることができた。また、当初の計画を一部変更し、クロマトグラフィーシステム ÄKTA start 及びその周辺機器の購入により、タンパク質やリボソームの精製を効率よく行うことができた。よって変更はあったものの、研究実施体制及び研究費執行状況は概ね計画通りに進めることができた。

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

翻訳品質管理機構に関しては競争が激しい分野であるが、**新規関連因子 X の発見の科学的インパクトは非常に大きい**。バイオものづくりを志向した翻訳制御研究は物質生産向上につながるポテンシャルを秘めており、本研究課題で得られた知見をもとに、応用展開することで将来的に“社会の持続的発展の実現”に貢献できると考えている。また、本領域内の研究者らと合同セミナーなどを企画し、研究交流を深めたことで、新しい視点や研究アイデアを積極的に自身の研究に取り入れることができた。その結果として、将来的に革新的な技術開発につながり、科学技術の進展に貢献できると確信している。また、領域内で複数の共同研究を開始することで、分野横断的な研究者ネットワークが構築され、これにより得られた知見や技術が産業界や経済界に波及し、社会全体の技術革新と経済発展を促進する基盤になることを期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 6件

1. “Expression of *Bacillus subtilis* ABCF antibiotic resistance factor VmlR is regulated by RNA polymerase pausing, transcription attenuation, translation attenuation and (p)ppGpp”, **Takada H**[®], Mandell MF, Yakhnin H, Glazyrina A, Kurata T, Wu JY, Tresco B, Chiba S, Myers AG, Aktinson GC, Babitzke P[®], Hauryliuk V[®], *Nucleic. Acid. Res.* vol.50, 111 pp. 6174–6189, 2022.6 (®責任著者)

近年、ABCF 因子をコードする遺伝子がリボソーム標的型の抗菌薬に対する耐性遺伝子として注目されており、この遺伝子に起因する多剤耐性菌の拡大と院内感染が世界的に問題となってきている。その一方で抗菌薬に応答して ABCF 遺伝子の発現が誘導され、薬剤耐性が付与される分子メカニズムは不明であった。本論文では枯草菌の ABCF 因子 VmlR に焦点を当て、遺伝学的・生化学的解析によって、*vmlR* 遺伝子上流の新規 uORF における抗菌薬特異的な翻訳停滞が VmlR の発現を誘導することを明らかにした。

2. “Genome-encoded ABCF factors implicated in intrinsic antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: VmlR2, Ard1 and CplR”, Obana N*, **Takada H***, Crowe-McAuliffe C *,

Iwamoto M, Wu JY, Murina V, Tresco B, Nomura N, Myers AG, Atkinson GC, Wilson DN, Hauryliuk V., *Nucleic. Acid. Res.* *Nucleic. Acid. Res.* vol.51, 9 pp. 4536–4554, 2023.3 (* 共同第一著者)

原著論文1で得られた知見をもとに、多くの細菌で見られるこの ABCF 遺伝子の多様性と薬剤耐性の関連が明らかにし、ディフィシル感染症 (CDI) において特に重要であることを示した。さらに、この ARE-ABCF 遺伝子の発現が抗菌薬の投与に応答して誘導されるメカニズムを解明した。CDI は抗菌薬の使用によって引き起こされ、リンコサミド系抗菌薬に対する耐性が高まることが知られており、本研究で得られた知見が CDI の新しい治療法開発への応用が期待される。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のものを含む)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

“学会発表”

1. Hiraku Takada, Gemma C. Atkinson, Vasili Hauryliuk 「Antibiotic resistance mediated by ribosome-associated ABCF ATPase.」, 第 96 回日本細菌学会総会, 姫路, 2023/03/17 (招待講演)
2. 高田啓, Gemma C. Atkinson, Vasili Hauryliuk, 千葉志信 「微生物における新規翻訳品質機構 RQC の解析.」, 2021 年度ゲノム微生物学会, オンライン, 2022/03/03 (口頭発表)

“受賞”

1. 高田啓, 「微生物翻訳装置の動態制御に関する研究」, 2023 年度研究奨励賞 (日本ゲノム微生物学会), 2024/3/13.

“セミナー”

1. 高田啓「微生物を対象とした “翻訳研究” の魅力と将来展望.」, ノボザイムズジャパン・ゲストセミナー, 幕張, 2023/5/18 (招待講演).
2. 高田啓「微生物における “翻訳研究” の魅力と将来展望.」 IAB ゲストセミナー, 鶴岡, 2023/05/10 (招待講演).

“プレスリリース”

1. 高田啓, 尾花望 「細菌の薬剤耐性化の原因となる新たな因子とその発現メカニズムの発見」, 科学技術振興機構 (JST) 2023/ 3/27.
<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20230327/index.html>