

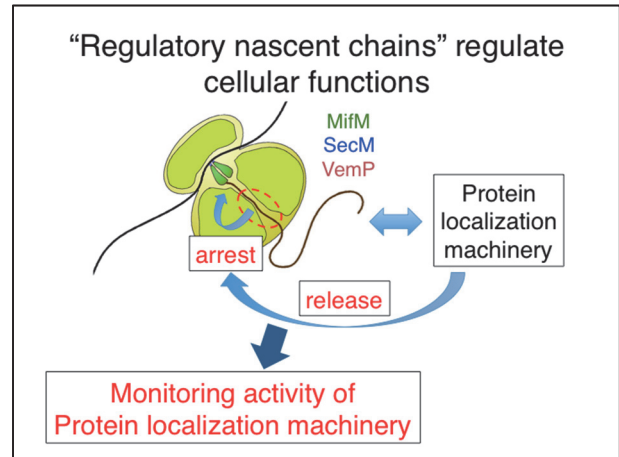
タンパク質バイオジェネシス研究室 Laboratory of Protein Biogenesis

准教授 千葉 志信 Associate Prof. Shinobu Chiba, Ph.D.

助教 藤原 圭吾 Assist. Prof. Keigo Fujiwara, Ph.D.

1. 研究概要

「4文字の羅列からなる遺伝情報がいかにして生命を生み出すのか」という問題は、生物学の中心的な問いであり続けている。単純に述べるならば、生命活動は主にタンパク質が駆動する生化学的反応の集合体と見なすことができ、DNAはタンパク質の設計図であるのだから、その設計図に基づいてタンパク質が合成されれば自ずと生命は誕生するということになる。ところが、実際には、タンパク質やその他必要な生体分子やエネルギー源を人為的に混ぜただけでは生命は誕生しない。他にも様々な要素が必要であり、例えば、生命現象の場である細胞や身体という構造体の構築のための生体分子の合成と配置の時空間制御も必要である。

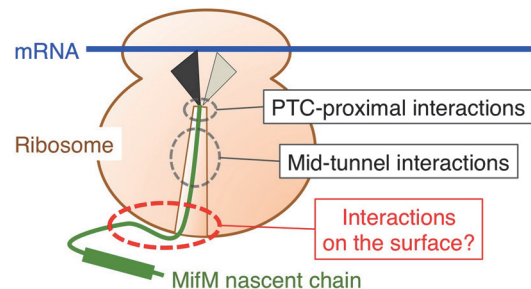


当研究室では、タンパク質の合成と成熟、さらには、その空間配置（局在化）の分子機構を明らかにすることを目指し研究を進めている。生命活動の実働部隊であるタンパク質が合成され機能を獲得するこの過程は、情報が生命へと変換される最初の重要なプロセスであり、このメカニズムを理解することは、遺伝情報が生命活動へと変換される機構を理解することに繋がる。加えて、我々は、合成の途上で生理機能を発揮するユニークなタンパク質を見出した。例えば、枯草菌 MifM は、翻訳の途上で自身を合成するリボソームに働きかけ、自らの翻訳伸長を一時停止（アレスト）する性質を持つ。この性質を利用し、タンパク質膜組込装置である YidC の活性をモニターし、その合成量をリアルタイムに調整する役割を担っている。MifM の発見に先駆け共同研究者である伊藤維昭氏らが見出した大腸菌 SecM も、翻訳の途上で機能を発揮する因子のひとつである。それらの「働く翻訳途上鎖」の発見は、遺伝子の機能発現についての我々の理解を拡張するものであり、我々は、「翻訳途上鎖が主役を演じる生命現象」にも着目している。その研究を通じて、「翻訳途上鎖の分子生物学」という新たな学術分野の創成と発展に貢献したい。なお、千葉研究室は 2014 年 4 月に発足以来、シニアリサーチフェローである伊藤維昭氏との協力関係の下、研究を遂行している。本年報では、伊藤維昭氏の活動のうち、当研究室の活動に関連するものも併せて報告する。

2. 本年度の研究成果

(1) 枯草菌 MifM による翻訳アレスト機構の解明

枯草菌の調節性新生鎖である MifM は、翻訳の途上で、自身の翻訳伸長をアレストする。この翻訳アレストは、MifM の C 末端付近に存在する特定のアミノ酸配列（アレストモチーフ）がリボソームの大サブユニットにあるペプチド鎖排出トンネルの内壁やリボソーム活性中心付近の成分と相互作用することで引き起こされることが以前示されていた。今回、遺伝学的、生化学的解析から、MifM とリボソームとの相互作用が、トンネルの内部にとどまらず、リボソームの表面を含めた非常に広範囲にわたる領域で起こるものであることが示唆された (Fujiwara 2018 Sci. Rep.)。



(2) 新規翻訳アレスト因子の同定

真正細菌において過去に見出された翻訳アレスト因子のうち3つ (SecM、MifM、VemP) は、タンパク質局在化装置に関連する遺伝子上流にコードされている。今回、400種類以上の真正細菌のゲノム情報を網羅的に探索し、タンパク質局在化装置遺伝子上流にコードされている翻訳アレスト因子を、新たに3つ見出した。大腸菌、枯草菌の翻訳系を用いた遺伝学、生化学的な解析から、これらはいずれも翻訳アレストを引き起こすことが示された。いずれも、ある特定のコードンで1回のみ翻訳停止を引き起こすことも示された。また、変異解析から、翻訳アレストに重要な配列も同定した。興味深いことに、細菌の進化の過程でそれぞれ独立に生じたと思われるこれらのアレスト因子には、共通のアミノ酸配列が見出された。この意味合いについて、現在解析を進めている。

(3) 枯草菌タンパク質膜組込装置 YidC の新規基質の探索

枯草菌には、それぞれ SpoIIIJ、YidC2 と呼ばれる2つの YidC ホモログが存在する。枯草菌の YidC 経路で膜挿入されることが明確に示されている基質は、MifM のみである。枯草菌における YidC 依存的タンパク質膜組込経路の重要性や生理的意義、分子機構を理解するために、枯草菌 YidC の新規基質を探索している。MifM の翻訳アレストモチーフを C 末端側に付加する事により、膜挿入を感知できる系を構築し、様々な枯草菌膜タンパク質の膜挿入における YidC 依存性を検証した。その結果、SpoIIIJ 依存性を示す膜タンパク質を複数見出した。現在、さらに基質の探索を進めるとともに、これらの膜タンパク質が YidC のどのような機能に依存して膜挿入されるのかを解析している。

3. Research projects and annual reports

Since our discovery of *Bacillus subtilis* MifM, which monitors the activity of the YidC-mediated membrane insertion pathway, we have been interested in and studying this class of proteins called ‘regulatory nascent chains’, which function while they are still in the midst of the process of biosynthesis on the ribosome. A remarkable property of this class of gene products is that they interact cotranslationally with components of the ribosome including those comprising the polypeptide exit tunnel, and thereby arrest their own translation elongation. The arrested state of translation elongation affects translation of the downstream target gene either positively (in the case of MifM) or negatively. Importantly, these regulatory nascent chains serve as a co-translational substrate of the protein localization pathway to be monitored, such that the arrest can be stabilized or canceled in response to changes in the effectiveness of the localization machinery under given conditions of the cell. Thus, these nascent chains represent unique biological sensors that enable real-time feedback regulation of the target machinery. In the MifM regulatory system, its translation arrest is released when the nascent MifM chain, as a monitoring substrate of YidC (the regulatory target), engages in the YidC-mediated insertion into the membrane. The regulated elongation arrest of MifM enables cells to maintain the capacity of membrane protein biogenesis. As introduced above, our interests are also focused more generally on the mechanisms of protein localization and biogenesis, the biological processes where nascent substrates undergo dynamic interactions with the machineries of translation, targeting and translocation. We envision that our research activities should ultimately lead to the development of a new research area that might be called “nascent chain biology”, which aims at understanding the still hidden principle of the central dogma of gene expression, where nascent chains are likely to play key roles.

This year's accomplishments

1) Extensive interactions between MifM and the ribosome contribute to the elongation arrest

MifM is a regulatory nascent chain that monitors cellular activity of membrane protein insertase, YidC, by a mechanism involving regulated translation elongation arrest. Our current

analysis revealed that elongation arrest of MifM involves extensive interactions between the MifM nascent polypeptide chain and the ribosomal components including those on the ribosomal external surface (Fujiwara 2018 Sci. Rep.).

2) Identification of novel translation arrest peptides in eubacteria

Three regulatory arrest peptides previously found in eubacteria (SecM, MifM and VemP) function as a cis-regulator of the protein translocation machinery. They are encoded by a gene that resides upstream of the gene that encodes possible target component of the protein translocation machinery. We searched for novel regulatory arrest peptides from more than 400 bacterial genome sequences, resulting in the establishment of three novel arrest peptides. We confirmed that they were able to stall *B. subtilis* or *E. coli* ribosomes at a single specific site of the coding sequence. Systematic mutagenesis allowed us to identify amino acid residues that are required for the arrest-provoking function of the nascent peptides. Interestingly, they seem to illuminate some common amino acid sequence features.

3) Identification of YidC substrates in *B. subtilis*

B. subtilis has two YidC homologs, SpoIIIJ and YidC2, but their substrates have not been identified, except for MifM, which is known to engage in either insertase function. To further understand the physiological roles and molecular mechanisms of the YidC pathways of membrane protein insertion in this bacterium, we are attempting at identifying novel YidC substrates. We use the translation arrest element of MifM followed by LacZ as a *cis* sensor of membrane insertion of membrane proteins predicted to span the membrane once or twice. So far, we have identified several putative YidC substrates.

4. 論文, 著書など

原著論文

Yura, T., Miyazaki, R., Fujiwara, K., Ito, K., Chiba, S., Mori, H. and Akiyama, Y. Heat shock transcription factor $\sigma(32)$ defective in membrane transport can be suppressed by transposon insertion into genes encoding a restriction enzyme subunit or a putative autotransporter in *Escherichia coli*. **Genes Genet Syst.** (2018) **93**, 229-235.

Fujiwara, K., Ito, K. and Chiba, S. MifM-instructed translation arrest involves nascent chain interactions with the exterior as well as the interior of the ribosome. **Sci Rep.** (2018) **8**, 10311.

英文総説

Ito, K., Mori, H. and Chiba, S.: Monitoring substrate enables real-time regulation of a protein localization pathway. **FEMS Microbiol Lett.** (2018) **365**, 11.

日本語解説記事

田口英樹、茶谷悠平、千葉志信、伊藤維昭 (2018) 終止コドンに依らず翻訳を途中終了させる酸性アミノ酸の連続配列. バイオサイエンスとインダストリー (B&I) 76, 239-241.

千葉志信 (2018) 調節性翻訳アレストペプチドによる細胞機能の制御. 生化学 第90巻第2号, 147-157.

茶谷悠平、千葉志信、伊藤維昭、田口英樹 (2018) 翻訳途上の新生ポリペプチド鎖が引き起こすリボソームの不安定化とその生理的意義. 実験医学 Vol. 36, No. 8 (5月号) 1364-1367.

伊藤維昭 (2018) タンパク質を配置する細胞の仕組み. 日本の科学者 53, 12-17.

伊藤維昭 (2018) 蛋白質の居場所決定における生体膜への組込み. 医学のあゆみ 267, 959-965.

5. 学会発表など

- 樫祐太郎、千葉志信: 枯草菌 EF-P 修飾酵素の同定とその重要性の解明. 新生鎖の生物学・若手ワークショップ 2018. 2018. 5/14-5/16 蔵王
- 向川結紀子、丹羽達也、田口英樹、藤原圭吾、千葉志信: 新生鎖-リボソームトンネル相互作用が枯草菌プロテオーム構成に果たす役割. 新生鎖の生物学・若手ワークショップ 2018. 2018. 5/14-5/16 蔵王
- 塩田成未、千葉志信: 枯草菌タンパク質膜組込装置 YidC の新規基質の探索. 新生鎖の生物学・若手ワークショップ 2018. 2018. 5/14-5/16 蔵王
- 藤原圭吾、樫祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: MifM の翻訳アレストを解除できるシス因子の探索と解除機構の解析. 新生鎖の生物学・若手ワークショップ 2018. 2018. 5/14-5/16 蔵王
- Koreaki Ito: Dynamic translation entails nascent polypeptides as active players in gene regulation and protein biogenesis. Seminar at Academia Sinica. 2018.6.8 Taipei, Taiwan
- Karen Sakiyama, Naomi Shimokawa-Chiba, Shinobu Chiba: Identification and characterization of novel translation-arrest peptides in bacteria. International symposium Proteins; from the cradle to the grave 2018. 8/26-8/29 滋賀県比叡山延暦寺会館
- Koreaki Ito: Things that I am proud of, ...or rather trivial? International symposium Proteins; from the cradle to the grave 2018. 8/26-8/29 滋賀県比叡山延暦寺会館
- 千葉志信、崎山歌恋: 新規翻訳アレスト因子の探索. 2018 年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議 2018. 8/31-9/1 KKR ホテル熱海
- 藤原圭吾、樫祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: 枯草菌 MifM を利用したタンパク質動態の解析. 2018 年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議. 2018. 8/31-9/1 KKR ホテル熱海
- Karen Sakiyama, Naomi Shimokawa-Chiba, Shinobu Chiba: Characterization of novel translation-arrest peptides encoded upstream of genes for protein localization machinery. CSHL meeting: Translational control 2018. 9/4-9/8 CSHL, NY, USA
- 藤原圭吾、樫祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: 翻訳アレスト配列を用いた新生ポリペプチド鎖の動的挙動の解析. 第5回リボソームミーティング 2018. 9/13-9/14 新潟大学中央図書館ライブラリーホール
- Koreaki Ito, Hiroyuki Mori, Shinobu Chiba: Monitoring substrate enables real-time regulation of a protein localization pathway. BACTERIAL PROTEIN EXPORT 2018. 2018. 9/30-10/3 Leuven, Belgium
- Shinobu Chiba: Translation arrest as a universal mechanism of gene regulation of bacterial protein localization machineries. Seminar in University of Hamburg. 2018. 10/5 Hamburg, Germany.
- Koreaki Ito: Real-time regulation by monitoring substrates and nascent chain handling of the ribosome. Seminar in University of Hamburg. 2018. 10/5 Hamburg, Germany
- 千葉志信: 新規調節性アレストペプチドの探索. Identification and characterization of novel regulatory arrest peptides. 第41回日本分子生物学会年会. 2018. 11/28-11/30 パシフィコ横浜

6. その他特記事項

1) 外部資金

- 科研費補助金・新学術領域「新生鎖の生物学」計画研究
課題名：働く新生鎖の生理機能と分子機構
研究代表者：千葉志信、研究分担者：伊藤維昭、取得年度：H26-30年（5年）
- 科研費補助金・基盤研究（B）
課題名：非チャネル型タンパク質膜挿入マシーナリーの分子機構の解明
研究代表者：千葉志信、取得年度：H28-31年（4年）

2) 学外活動

- 千葉志信：タンパク質動態研究所・新学術領域「新生鎖の生物学」合同国際シンポジウム「Proteins; from the Cradle to the Grave」世話人

伊藤維昭：Member, Faculty of 1000（論文評価システム）

伊藤維昭：生物遺伝資源に関する大腸菌小委員会及び NBRP 原核生物運営委員会委員

3) アウトリーチ活動

千葉志信、藤原圭吾：日本・アジア青少年サイエンス交流事業「さくらサイエンスプラン」（代表者：加藤啓子・京産大総合生命科学部教授）に協力 2018年7月24日-8月1日

千葉志信：模擬授業（常翔学園） 2018年7月9日

