

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

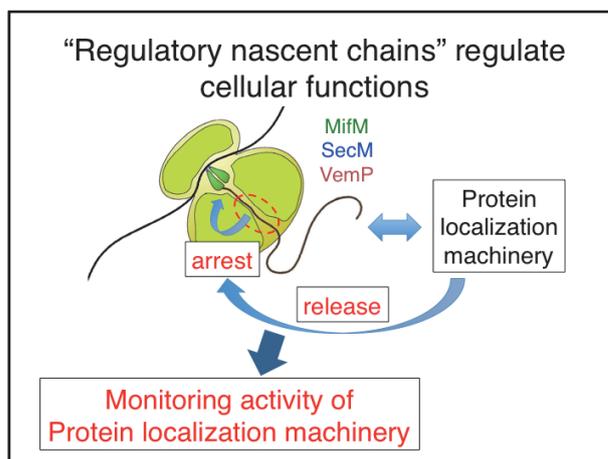
准教授 千葉 志信 Associate Prof. Shinobu Chiba, Ph.D.

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

1. 研究概要

生命活動は主にタンパク質が触媒する生化学的反応の集合体と見なすことができるが、タンパク質をはじめとする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。細胞内では、これらの因子の個々の働きが高次に連携することでひとつの生命体として組織化されている。このような生体分子の組織化を支える要素のひとつが、生体分子の合成と配置の時空間制御である。

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。また、最近、翻訳の品質管理に関する新たな研究プロジェクトも始動し、成果が得られつつある。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) フォースレポーターを用いた新生タンパク質の動的挙動の網羅的検出

枯草菌 MifM は、C 末端付近に存在するアレストモチーフを介してリボソーム成分と相互作用することで自身の翻訳伸長をアレストする。この翻訳アレストは、アレスト配列が N 末端側から引っ張られることで解除される。このアレストモチーフを、「引っ張り力レポーター」として使い、トランスポゾンを利用して様々なタンパク質の N 末端断片と融合したライブラリを作成した。その中から、アレストが解除されるものを選択することで、翻訳の途上で引っ張り力を伴う新生鎖を網羅的に探索することを試みた。その結果、膜局在や、co-translational なフォールディング、複合体形成などが引っ張り力を伴って進行すること、また、そのような動的な過程を経て多くのタンパク質が合成されることが示唆された（論文投稿中）。同様の解析を大腸菌でも進めている。

(2) 枯草菌新規リボソームレスキュー因子の同定と解析

終止コドンに欠いた異常 mRNA (non-stop mRNA) をリボソームが翻訳すると、翻訳終結が行われずに mRNA 上でリボソームが停滞する。この停滞リボソームをレスキューする主要な因子として tmRNA-SmpB 複合体が知られているが、今回我々は、枯草菌における第 2 のリボソームレスキュー因子として、BrfA を同定した。遺伝学、生化学および、Wilson 博士らとの共同研究による構造生物学的な解析から、BrfA は、翻訳終結因子 RF2 依

存的に、終止コドン非依存的な翻訳終結を促進することが示された。BrfA は、グラム陽性菌の RF 依存的リボソームレスキュー因子としての初めての報告例となった (Shimokawa-Chiba et al., Nat. Commun. 2019)。

(3) 枯草菌タンパク質膜組込装置 YidC の阻害剤の探索

以前我々は、YidC 活性の阻害に呼応して LacZ 活性を上昇させる枯草菌レポーター株を作製した。この株を用い、東大創薬機構から提供された化合物ライブラリを対象に、YidC 依存的なタンパク質膜組込を阻害する低分子化合物のスクリーニングを進めてきた。YidC の活性が阻害されれば、このレポーター株の LacZ 活性が上昇することが期待されたが、今回のスクリーニングで、濃度依存的にレポーター活性を上昇させる化合物を複数得た。今後、これらの化合物が本当に YidC の活性を阻害しているのかどうかについて、他のアッセイ系を用いて検証を進める予定である。

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) Proteome-wide capture of co-translational protein dynamics using a transposable force reporter (*TrFR*)

The elongation arrest of MifM is force-sensitive and is canceled when the MifM nascent chain is pulled from the N-terminus. We took advantage of such a force-sensitivity to capture co-translational pulling force on nascent chains in a proteome-wide fashion. Using transposon, we constructed a gene-fusion library, in which the N-terminal regions of proteins were fused N-terminally to the arrest sequence of MifM and then screened proteins that canceled elongation arrest. We indeed identified hundreds of proteins that canceled the elongation arrest of the force reporter, most probably reflecting their abilities to initiate the maturation and/or localization process co-translationally.

2) Identification and characterization of a novel ribosome rescue factor in *B. subtilis*

Ribosome stalls on mRNA when it translate mRNA that lacks an in-frame stop codon (non-stop mRNA). Ribosome rescue factors mediate rescue of the ribosomes on the non-stop mRNA. In addition to previously-identified primary ribosome rescue factor, tmRNA-SmpB complex, we here identified BrfA as a secondary ribosome rescue factor in *B. subtilis*. We demonstrated that BrfA recruits RF2 to the stalled ribosome to facilitate a stop codon-independent translation termination on the non-stop mRNA. BrfA is the first reported example of RF-dependent ribosome rescue factor in Gram-positive bacteria.

3) Screening of chemical compound that inhibits YidC

We have previously constructed a reporter strain of *B. subtilis* that exhibits an elevated level of LacZ activity in response to dysfunction of YidC. By screening chemical compounds that elevate the reporter activity, we are searching for those that inhibit the YidC pathway of membrane protein insertion. We now identified several compounds that elevate the reporter activity in a dose-dependent manner.

4. 論文, 著書など

原著論文

Shimokawa-Chiba, N.*, Müller, C.*, Fujiwara, K., Beckert, B., Ito, K., Wilson, D. N.#, Chiba, S.# Release factor-dependent ribosome rescue by BrfA in the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nat. Commun.** (2019) 10, 5397. (*: equally contributed, #: corresponding authors)

Fujiwara, K., Katagi, Y., Ito, K., Chiba, S. Proteome-wide Capture of Co-translational Protein Dynamics in *Bacillus subtilis* Using TnDR, a Transposable Protein-Dynamics Reporter. **Cell Rep.** in press

英文総説

Ito K., Shimokawa-Chiba N, Chiba S. Sec translocon has an insertase-like function in addition to polypeptide conduction through the channel. *F1000Res.* (2019) ;8:F1000 Faculty Rev-2126.

日本語解説記事

千葉志信、田口英樹 (2019) 翻訳途上で機能する新生ポリペプチド鎖. *実験医学* Vol.37, No.18 (11月号), 3048-3054.

5. 学会発表など

Keigo Fujiwara, Yutaro Katagi, Koreaki Ito, Shinobu Chiba: Studying co-translational protein dynamics using force-sensing arrest peptides, RIBOSOME 2019 meeting, 2019. 1/6-1/10, Mérida, Mexico

藤原圭吾、櫻祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: MifM および SecM の翻訳アレストの解除を指標とした新生鎖の動的過程の系統的調査. 第 16 回 21 世紀大腸菌研究会. 2019. 5/29-5/30. 琵琶湖ホテル

Naomi Shimokawa-Chiba, Claudia Müller, Keigo Fujiwara, Bertrand Beckert, Koreaki Ito, Daniel N. Wilson, Shinobu Chiba: A release factor-dependent ribosome rescue mechanism in Gram-positive bacteria, EMBO Conference (Protein synthesis and translational control), 2019. 9/4-9/7, Heidelberg, Germany

藤原圭吾、櫻祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: アレストペプチドによる新生鎖の動態過程の系統的調査. 令和元年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議. 2019. 9/6-9/7. 筑波

崎山歌恋、下川(千葉)直美、千葉志信: 新規翻訳アレストペプチドの変異解析. 第 92 回日本生化学会大会. 2019. 9/18-9/20, パシフィコ横浜

藤原圭吾、榎祐太郎、伊藤維昭、千葉志信：翻訳アレストの解除を指標とした新生鎖の動的過程の系統的調査。第 92 回日本生化学会大会。2019. 9/18-9/20. パシフィコ横浜

Shinobu Chiba: A novel ribosome rescue mechanism in *Bacillus subtilis*. ウイルス・再生医科学研究所セミナー。2019. 11/ 8. 京大・ウイルス再生研

塩田成未、千葉志信：枯草菌タンパク質膜組込装置 YidC を阻害する化合物の探索。第 42 回日本分子生物学会年会。2019. 12/3-12/6. 福岡国際会議場

下川（千葉）直美、Claudia Müller、藤原圭吾、Bertrand Beckert、伊藤維昭、Daniel N. Wilson、千葉志信：枯草菌における新規リボソームレスキュー因子の同定と解析。第 42 回日本分子生物学会年会。2019. 12/3-12/6. 福岡国際会議場

崎山歌恋、下川（千葉）直美、千葉志信：細菌由来の新規翻訳アレスト因子の同定と解析。第 42 回日本分子生物学会年会。2019. 12/3-12/6. 福岡国際会議場

藤原圭吾、榎祐太郎、伊藤維昭、千葉志信：アレストペプチドをフォースセンサーとして利用した新生鎖の動的挙動の網羅的調査。第 42 回日本分子生物学会年会。2019. 12/3-12/6. 福岡国際会議場

榎祐太郎、藤原圭吾、千葉志信：翻訳アレスト因子を利用した大腸菌新生タンパク質の動的挙動の網羅的解析。第 42 回日本分子生物学会年会。2019. 12/3-12/6. 福岡国際会議場

Shinobu Chiba: Nascent polypeptide chain-mediated translation elongation arrest in bacteria. BPS2020 (64th Annual Meeting of the Biophysical Society). 2020. 2/15-2/19. San Diego, USA

6. その他特記事項

1) 外部資金

科研費補助金・基盤研究 (B)

課題名：非チャン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）

科研費補助金・若手研究

課題名：翻訳と共役して起こる新生タンパク質の動的過程の系統的調査

研究代表者：藤原圭吾、取得年度：H31-R2 年（2 年）

2) 学外活動

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 2019 年 7 月 30 日-8 月 5 日

