

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

教授 千葉 志信 Prof. Shinobu Chiba, 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。

2. 本年度の研究成果

(1) タンパク質ダイナミク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。この引っ張り力感受性に基づいた「タンパク質ダイナミクスレポーター」を構築した。さらに、それをトランスポゾンに導入した Transposable protein-dynamics reporter (TnDR) を構築し、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製した。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 (Fujiwara et al., Cell Rep. 2020)。この TnDR と次世代 DNA シーケンス技術を組み合わせることで網羅性を大きく向上させた、第二世代の TnDR (TnDR-seq) の開発も進めている。

(2) 新規翻訳アレスト因子の同定と解析

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をコード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ゲノムを網羅的に探索し、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、さらに 3 つ見出し、それぞれ、ApcA, ApdA, ApdP と命名した。ApcA, ApdA は放線菌に由来し、ApdP は根粒菌に由来する。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、また、その翻訳アレストは、ある特定のコドン 1 カ所で起こることもそれぞれ示された。網羅的な変異解析を行い、それぞれのアレスト因子による翻訳アレストに重要な配列を同定した。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が、互いに類似のアミノ酸配列 (RAPG もしくは RAPP) に依存するかたちで翻訳アレストを起こすことも見出された (Sakiyama et al., Nucleic Acids Res. 2021)。

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 protein-dynamics reporter (TnDR)

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 protein-dynamics reporter, most probably reflecting their abilities to initiate the maturation and/or localization process co-translationally (Fujiwara et al., 2020. Cell Rep.). We are also developing a second generation of TnDR or TnDR-seq, which greatly improves coverage by combining the current version of TnDR with the next-generation DNA sequencing technology.

2) Identification and characterization of novel translation arrest factors

Three of the translation arrest factors previously found in eubacteria (SecM, MifM, and VemP) are encoded upstream of genes encoding components of the protein localization machinery. Using this and other information, we comprehensively searched more than 400 eubacterial genomes and found three more translation arrest factors encoded upstream of genes for the protein localization machinery, and named ApcA, ApdA, and ApdP, respectively. ApcA and ApdA are encoded by actinobacteria genome, whereas ApdP is encoded by a-proteobacterial genome. Genetic and biochemical analyses using the *E. coli* and *B. subtilis* translation systems showed that they all arrest translation elongation at a specific codon. Comprehensive mutational analysis allowed us to identify the sequences that are crucial for translational arrest. Interestingly, these arrest factors, which likely have occurred independently during bacterial evolution, were also found to cause translational arrest in a manner depending on amino acid sequences (RAPG or RAPP) that are similar to each other (Sakiyama et al., *Nucleic Acids Res.* 2021).

4. 論文, 著書など

原著論文

Fujiwara, K., Katagi, Y., Ito, K. and Chiba, S. (2020) Proteome-wide capture of co-translational protein dynamics in *Bacillus subtilis* using TnDR, a transposable protein-dynamics reporter. *Cell Rep.* 33, 108250.

doi: 10.1016/j.celrep.2020.108250.

Sakiyama K, Shimokawa-Chiba N, Fujiwara K, Chiba S. (2021) Search for translation arrest peptides encoded upstream of genes for components of protein localization pathways. *Nucleic Acids Res.* 49, 1550-1566.

doi: 10.1093/nar/gkab024.

5. 学会発表など

Shinobu Chiba: Proteome-wide detection of nascent chain dynamics. Nascent Chains 2020 (4th Annual Conference on Protein Folding on the Ribosome). 2021/ 12/11-12. Zoom Webinar (国際会議・招待講演)

6. その他特記事項

1) 外部資金

科研費補助金・学術変革領域研究 (A) 計画研究

課題名: 機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構

研究代表者: 千葉志信、取得年度: R2-R6 年 (5 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) アウトリーチ活動

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・京産大生命科学部教授) に協力 2020 年 2 月 18 日-20 日