

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

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。伊藤維昭元京産大教授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。

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

当研究室で同定した枯草菌 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。ここ数年で、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」を構築してきた。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てきた。(Fujiwara et al., Cell Rep. 2020)。最近、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) の開発も進めてきており、それを用い、タンパク質の co-translational な動的挙動をゲノムワイドに検出できるようになった。

(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の上流にコードされている。これらに共通の特徴を手がかりとし、前年度までに、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の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 (Sakiyama et al., Nucleic Acids Res. 2021)。今回、そのサーチをさらに拡張し、30,000 種以上のバクテリアゲノムを対象にアレスト因子の探索を行った。その結果、新規アレスト因子をコードする可能性のある遺伝子が 10 種以上同定された。現在、これらがアレストを引き起こすか否かを検討中である。

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 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 have recently 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 currently developed 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. This new method indeed allowed us to detect co-translational dynamics of nascent proteins in a genome-wide fashion.

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 have previously 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 (Sakiyama et al., Nucleic Acids Res. 2021). We now continued our search across more than 30,000 eubacterial genomes and identified more than 10 candidate genes that may encode novel arrest peptides.

4. 論文, 著書など

原著論文

Takada H., Mandell Z., Yakhnin H., Glazyrina A., Chiba S., Kurata T., Wu K., Tresco B., Myers A., Atkinson G., Babitzke P., Hauryliuk V.; Expression of *Bacillus subtilis* ABCF antibiotic resistance factor VmIR is regulated by RNA polymerase pausing, transcription attenuation, translation attenuation and (p)ppGpp. Nucleic Acids Res. (2022) *in press*

日本語総説

千葉志信、茶谷悠平 (2021) 翻訳途上で機能する新生ポリペプチド鎖. 月刊細胞 53巻9号 (2021年8月号), 525-528.

5. 学会発表など

高田啓、Gemma C. Atkinson、Vasili Haurlyliuk、千葉志信：フィブロネクチン結合因子ホモログが駆動する新規翻訳品質管理機構の解析：2021年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 (2021. 8. 30-31) オンライン

高田啓、Gemma C. Atkinson、Vasili Haurlyliuk、千葉志信：細胞内における動態を活写することで明らかとなってきた新規微生物翻訳品質機構の全貌：第19回 微生物研究会 (2021. 10. 13) オンライン (招待講演)

高田啓、Gemma C. Atkinson、Vasili Haurlyliuk、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 (2022. 3. 2-4) オンライン

千葉志信：タンパク質局在化装置に関連した翻訳アレスト因子の多様性と共通性：2021年度遺伝研研究会 (2022. 3. 8-9) 三島 (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・基盤研究 (C)

課題名：非チャンネル型タンパク質膜組込装置 YidC の分子機構

研究代表者：千葉志信、取得年度：R3-R5年 (3年)

発酵研究所一般研究助成

課題名：グラム陽性菌における翻訳の品質管理機構の解明

研究代表者：千葉志信、取得年度：R3-R4年 (2年)

科研費補助金・若手研究

課題名：次世代型 TnDR 法による新生鎖動的挙動の網羅的解析

研究代表者：藤原圭吾、取得年度：R3-R4年 (2年)

戦略的創造研究推進事業・ACT-X (環境とバイオテクノロジー)

課題名：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

研究代表者：高田啓、取得年度：R3-R5 (3年)

2) 学外活動

日本生化学会「生化学」誌・企画協力委員

3) アウトリーチ活動

模擬授業「私たちの生命活動を支えるタンパク質の世界」(三重県立上野高校) (2021/3/11)：Zoom オンライン会議