

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）タンパク質膜組込装置 YidC の枯草菌における基質の探索

真正細菌におけるタンパク質の膜組込は、主に、Sec 経路と YidC 経路を介して行われる。Sec 経路は、SecYEG 複合体が形成するタンパク質膜透過チャンネルを介し、新生ポリペプチド鎖が膜を超えて輸送される。一方、YidC は、膜内に半分埋まった溝構造を含む特徴的な構造をしており、チャンネルに依存しない膜組込装置として Sec トランスロコンとは異なる機構で膜挿入を行うことが示唆されている。しかしながら、その詳細な分子機構については、まだあまり明らかにされてはいない。YidC と基質膜タンパク質の相互作用を理解する上で、多くの基質を同定することは重要であるが、特にグラム陽性菌においては、限られた数の基質しか同定されていない。そこで、本研究では、枯草菌 MifM の翻訳アレストを利用したユニークな膜挿入アッセイ系を構築し、枯草菌由来の様々な膜タンパク質の膜挿入の YidC 依存性を検討した。その結果、全部で 8 種類の、新規 YidC 基質と思われる膜タンパク質を同定した。それらを用いた解析から、YidC の膜内のアルギニンの普遍的な重要性が示された。

（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、昨年度までに、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。今年度は、それらがアレストを引き起こすか否かを、大腸菌、枯草菌の系を用いて検討し、多くのものが、大腸菌、枯草菌の片方もしくは両方で翻訳アレストを起こすことが示された。また、保存性の高い残基のうち、少なくとも一部はアレストに重要であることも示された。さらに、toeprinting 解析などから、それらのアレスト因子のアレスト部位を決定した。これらの因子の中には、RAPP 様の配列を含むものが多く含まれていた。一方で、新規アレスト配列を持つものもいくつか見出された。この一連の解析から、非常に多くのバクテリアが、*sec/yidC* 遺伝子上流にアレストペプチドをコードしていることが示唆され、タンパク質局在化装置のアレストペプチドを介した制御の普遍性が示唆された。

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) Systematic search for *B. subtilis* YidC substrates

In bacteria, protein membrane insertion is mediated mainly by two pathways: the Sec and YidC pathways. The Sec pathway utilizes the SecYEG membrane protein complex as a protein-conducting channel to translocate polypeptides across the membrane. In contrast, YidC has a functionally crucial membrane-embedded hydrophilic groove instead of a channel. However, the molecular mechanism of how YidC mediates membrane protein insertion remains to be largely unknown. To understand the interaction between YidC and substrate membrane proteins, it is important to identify many substrates. However, particularly in Gram-positive bacteria, only a limited number of substrates have been currently identified. Therefore, to identify novel *B. subtilis* YidC substrates, we now constructed a unique membrane insertion assay system using MifM an arrest peptide and examined the YidC-dependence of membrane insertion for various membrane proteins derived from *Bacillus subtilis*. We then identified a total of eight novel membrane proteins that are likely to be novel YidC substrates. Subsequent analysis using these proteins demonstrated the universal importance of arginine in the membrane-embedded groove of YidC.

2) Identification and characterization of novel translation arrest peptides

Three of the translation arrest peptides previously found in eubacteria (SecM, MifM, and VemP) are encoded upstream of genes encoding components of the protein localization machinery. Based on common features shared by these arrest peptides, we have previously investigated more than 30,000 eubacterial genomes and then identified more than 10 putative novel arrest peptides. Using *E. coli* and *B. subtilis* systems, we currently demonstrated that they indeed induce translation arrest in either one or both of these bacteria. We also demonstrated that at least some of the highly conserved

residues are crucial for the arrest. Our toeprinting analysis determined the arrest sites of these arrest peptides. Interestingly, many arrest peptides contained RAPP-like sequences, while some were found to possess novel arrest-inducing sequences. Our analyses suggests that a wide variety of bacteria encode arrest peptides upstream of the *sec/yidC* genes, highlighting the universality of regulation of protein localization machinery by an essentially shared mechanism involving regulated translation arrest of the upstream gene.

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 VmlR is regulated by RNA polymerase pausing, transcription attenuation, translation attenuation and (p)ppGpp. (2022) *Nucleic Acids Res.* 50, 6174-6189.

Obana, N., Takada, H., Crowe-McAuliffe, C., Iwamoto, M., Egorov, A.A., Wu, K.J.Y., Chiba, S., Murina, V., Paternoga, H., Tresco, B.I.C., Nomura, N., Myers, A.G., Atkinson, G.C., Wilson, D.N., Hauryliuk, V.; Genome-encoded ABCF factors implicated in intrinsic antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: VmlR2, Ard1 and CplR. (2023) *Nucleic Acids Res.* ***in press***

Shiota N., Shimokawa-Chiba, N., Fujiwara, K. Chiba S.: Identification of *Bacillus subtilis* YidC substrates using a MifM-instructed translation arrest-based reporter. (2023) *J. Mol. Biol.* ***in press***

英語総説

Chiba, S., Fujiwara, K., Chadani, Y., Taguchi, H.; Nascent chain-mediated translation regulation in bacteria: translation arrest and intrinsic ribosome destabilization. (2023) *J. Biochem.* 173, 227-236.

日本語総説

千葉志信、藤原圭吾 (2022) 新生ポリペプチド鎖が制御する翻訳動態. 実験医学増刊 Vol.40 No.12 セントラルドグマの新常識〜転写・翻訳の驚きの新機構と再定義されるDNA・RNA・タンパク質の世界

5. 学会発表など

千葉志信、吉田真悠、辻奈緒子、藤原圭吾：タンパク質局在化装置に関連した翻訳アレスト因子の探索と解析：第 68 回日本生化学会近畿支部例会：2022. 5. 28

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信：放線菌由来の新規アレスト因子の探索と解析：第 68 回日本生化学会近畿支部例会：2022. 5. 28

藤原圭吾、千葉志信：TnDR 法による新生鎖の動的挙動のプロテオームワイドな検出：第 68 回日本生化学会近畿支部例会：2022. 5. 28

千葉志信、崎山歌恋、吉田真悠、下川-千葉直美、藤原圭吾：タンパク質局在化装置と翻訳アレスト因子の進化的な繋がり：第 18 回 21 世紀大腸菌研究会：2022. 6. 27-28

藤原圭吾、赤岡大暉、千葉志信：TnDR-seq による新生鎖の動的挙動の網羅的検出：第 18 回 21 世紀大腸菌研究会：2022. 6. 27-28

高田啓、藤原圭吾、Gemma C. Atkinson、Vasili Hauryliuk、千葉 志信：微生物における新規翻訳品質管理機構 RQC の分子メカニズムの解明：第 18 回 21 世紀大腸菌研究会：2022. 6. 27-28

赤岡大暉、高田啓、藤原圭吾、千葉志信：枯草菌における翻訳途上鎖依存的な翻訳終了現象の解析：第 18 回 21 世紀大腸菌研究会：2022. 6. 27-28

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信：放線菌の新規翻訳アレスト因子の探索と解析：第 18 回 21 世紀大腸菌研究会：2022. 6. 27-28

藤原圭吾：モデル細菌における新生鎖ダイナミクスの網羅的検出：第 15 回 小胞体ストレス研究会・若手の会：2022.07.29

千葉志信：真正細菌の翻訳アレスト因子の網羅的探索：第 15 回 小胞体ストレス研究会：2022. 7. 30-31

藤原圭吾、千葉志信：モデル細菌における新生鎖ダイナミクスの網羅的検出：第 15 回 小胞体ストレス研究会：2022. 7. 30-31

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信：放線菌由来の翻訳アレスト因子の探索と in vitro での解析：2022 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議：2022. 8. 25-26

赤岡大暉、高田啓、藤原圭吾、千葉志信：枯草菌における新生鎖依存的な翻訳終了現象：2022 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議：2022. 8. 25-26

藤原圭吾、千葉志信：TnDR-seq による新生鎖挙動の検出：2022 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議：2022. 8. 25-26

高田啓：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：ACT-X「環境とバイオテクノロジー」第 3 回領域会議：2022. 9. 29

藤原圭吾、千葉志信：TnDR-seq による新生鎖挙動の網羅的検出：第 4 5 回日本分子生物学会年会：2022.12.1

高田啓、藤原圭吾、千葉志信：微生物翻訳研究のこれから：第 1 回マルチファセットプロテインズ・若手ワークショップ：2022. 12. 6

藤原圭吾、千葉志信：真正細菌における翻訳アレストの解析と応用：第 1 回マルチファセットプロテインズ・若手ワークショップ：2022. 12. 6

千葉志信：機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構：第 3 回マルチファセットプロテインズ領域会議：2022.12. 7-8

藤原圭吾、千葉志信：TnDR-seq による新生鎖挙動の検出：第 3 回マルチファセットプロテインズ領域会議：2022.12. 7-8

千葉志信：翻訳アレストを応用したタンパク質動態解析：マルチファセットプロテインズ・ランチョンセミナー：2022. 12. 20

高田啓：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：ACT-X「環境とバイオテクノロジー」第 4 回領域会議：2023. 1. 22

千葉志信：非チャネル型タンパク質膜挿入装置 YidC の解析：サントリー生命科学財団セミナー：2023. 3. 10（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（学部学科説明会）「生命科学の魅力」（大谷中学・高校）（2022/2/14）

4）学会主催

2022 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議（摂南大学・福山大学と共催）：2022/8/25-26 大阪工業大学梅田キャンパス OIT 梅田タワー

5）受賞

優秀発表賞（辻奈緒子）：第 68 回日本生化学会近畿支部例会