

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) 新規翻訳アレスト因子の同定と解析

翻訳アレスト因子は、翻訳途上鎖の状態で生理機能を発揮するユニークなタンパク質である。近年、当研究室では、真正細菌において過去に見出された翻訳アレスト因子に共通の特徴を手がかりとし、3 万種以上のバクテリアゲノムを対象に、アレスト因子の網羅的探索を行った。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。その中には、RAPP や RGPP といったアミノ酸配列（RAPP 様モチーフ）を持つものが少なからず含まれていた。一方で、既知のアレスト因子と配列の類似性の全く見られないモチーフを含むものも見出された。今年度は、これらの因子の翻訳アレストの分子機構を解明するための手がかりを得るために、変異解析や生化学的な解析を進め、アレスト位置の決定や重要な配列の同定などを行った。また、RAPP 様配列を含むタンパク質をモチーフ検索することで、新たなアレスト因子を同定した。これらの解析から、バクテリアは、翻訳アレストという共通の機構を利用しつつ、多様な細胞制御機構を実現している可能性が示唆されつつある。

(2) RAPP モチーフを含むアレスト因子 ApdA/ApdP のアレスト機構の解明

前述したとおり、近年当研究室で行われた網羅的スクリーニングから、多数のアレスト因子が同定されたが、その多くに共通のアミノ酸配列（RAPP 様モチーフ）が見出された。放線菌由来の ApdA、根粒菌由来の ApdP も、我々の初期のスクリーニングから同定されたアレストペプチドであり、アレストに必須の RAPP 配列を含む。これらのアレスト機構を理解するために、ハンブルク大学の Daniel Wilson 教授らと国際共同研究を行い、クライオ電子顕微鏡を用いた ApdA、ApdP のリボソーム複合体の構造決定並びに変異解析を行った。ApdA、ApdP は、それぞれ、枯草菌、大腸菌のリボソームとの複合体を解析したが、この両者の RAPP モチーフは、それぞれのリボソーム内で同一の立体構造を取ることが示唆された。さらに、この構造は、かつて伊藤維昭博士らが発見した SecM のものとも共通であることが明らかとなった。この一連の発見は、異なる細菌種が、共通の分子機構を介してアレストを起こす因子を進化の過程で独立に獲得したことを示唆しており、アレストモチーフの収斂進化が起こったことを示唆している。

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) Identification and Analysis of Novel Translation Arrest Factors

Translation arrest peptides are unique proteins that exert their physiological functions while in the state of a nascent polypeptide chain. In recent years, our laboratory has conducted a comprehensive search for arrest peptides across more than 30,000 bacterial genomes, using common features shared by previously identified translation arrest peptides in bacteria as clues. We then identified more than 10 genes that code for novel arrest peptides. Among these, several contained amino acid sequences with motifs similar to RAPP and RGPP (the RAPP-like motif). Meanwhile, we also identified those having motifs with no sequence similarity to known arrest peptides. Currently, to gain insights into the molecular mechanisms of translation arrest by these arrest peptides, we conducted mutational and biochemical analyses, determining arrest sites on mRNA and identifying critical sequences. Additionally, by searching for proteins containing RAPP-like sequences, we further identified novel arrest peptides. These studies suggest that bacteria might utilize a common mechanism of translation arrest to achieve diverse cellular regulation.

2) Analysis of the Arrest Mechanism of the RAPP Motif-Containing Arrest Peptides ApdA/ApdP

As mentioned above, recent comprehensive screenings conducted in our laboratory identified numerous arrest peptides, many of which shared a common amino acid sequence (RAPP-like motif). ApdA, derived from actinomycetes, and ApdP, derived from alphaproteobacteria, were also those identified in our initial screenings and contained the arrest-essential RAPP sequence. To understand the arrest mechanisms of these arrest peptides, we engaged in international collaboration with Prof. Daniel Wilson at the University of Hamburg. We determined the structure of the ribosome complexes with ApdA and ApdP using cryo-electron microscopy and conducted mutational analyses. The analyses

of ApdA and ApdP complexes with the ribosomes of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, respectively, suggested that the RAPP motifs in both arrest peptides adopt the same conformation within their respective ribosomes. Furthermore, it was revealed that this structure is also common with that of SecM, discovered previously by Koreaki Ito and colleagues. These studies suggest that different bacterial species have independently acquired arrest peptides that induce arrest through a common molecular mechanism during evolution, indicating the occurrence of convergent evolution of arrest motifs.

4. 論文, 著書など

原著論文

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.** 51, 4536–4554.

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.** 435, 168172.

Ugajin, N., Imami, K., Takada, H., Ishihama, Y., Chiba, S., Mishima, Y.: Znf598-mediated Rps10/eS10 ubiquitination contributes to the ribosome ubiquitination dynamics during zebrafish development. (2023) **RNA**. 29, 1910-1927.

Morici, M., Gabrielli, S., Fujiwara, K., Paternoga, H., Beckert, B., Bock, L. V., Chiba, S.#, Wilson, D. N.#: RAPP-containing arrest peptides induce translational stalling by short circuiting the ribosomal peptidyltransferase activity. (2024) **Nat Commun.** 15, 2432. (# corresponding authors)

Gersteuer, F.*, Morici, M.*, Gabrielli, S., Fujiwara, K., Safdari, H. A., Paternoga, H., Bock, L. V., Chiba, S., Wilson, D. N.: The SecM arrest peptide traps a pre-peptide bond formation state of the ribosome. (2024) **Nat Commun.** 15, 2431. (* contributed equally)

Fujiwara, K.#, Tsuji, N., Yoshida, M., Takada, H., Chiba, S.# (2024) Patchy and widespread distribution of bacterial translation arrest peptides associated with the protein localization machinery. **Nat Commun.** in press. (# corresponding authors)

5. 学会発表など

高田啓:「微生物における翻訳研究の魅力と将来展望」 ノボザイムズジャパンセミナー, 2023.5.18, ノボザイムズジャパン株式会社 (招待講演)

千葉志信:「グラム陽性菌における翻訳の品質管理機構の解明」 第17回発酵研究所助成研究報告会, 2023. 6. 9, 千里ライフサイエンスセンター (大阪)

千葉志信:「機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構」 第4回マルチファセットプロテインズ領域会議, 2023. 6. 16, 東工大すずかけ台キャンパス

高田啓:「微生物における翻訳研究の魅力と将来展望」 IAB セミナー, 2023.6.28, 慶応義塾大学生命先端研究所 (山形) (招待講演)

藤原圭吾、辻奈緒子、吉田真悠、千葉志信:「新規翻訳アレスト因子のバクテリアワイドな探索」 第19回21世紀大腸菌研究会, 2023. 6. 29-30, 湯野浜温泉 亀や

辻奈緒子、藤原圭吾、千葉志信:「アルテロモナス属由来新規翻訳アレスト因子の下流遺伝子発現制御機構の解析」 第19回21世紀大腸菌研究会, 2023. 6. 29-30, 湯野浜温泉 亀や

吉田真悠、藤原圭吾、高田啓、千葉志信:「クロストリジウム綱に由来する新規翻訳アレスト因子の分子機構の解明」 第19回21世紀大腸菌研究会, 2023. 6. 29-30, 湯野浜温泉 亀や

千葉志信:「翻訳アレストを利用した細胞の機能制御の分子機構 Mechanism of cellular regulation by translation arrest」 第23回日本蛋白質科学会年会, 2023. 7. 5-7, 名古屋国際会議場

藤原圭吾、辻奈緒子、吉田真悠、千葉志信：「Bacteria-wide search for translational arrest peptides」 第 24 回日本 RNA 学会年会, 2023. 7. 5-7, 那覇文化芸術劇場なはーと

Tsuji Naoko, Fujiwara Keigo, Takada Hiraku, Chiba Shinobu: 「Identification of Novel Translation Arrest Peptides with RAPP and RGPP sequence Motifs」 第 24 回 日本 RNA 学会 年会, 2023. 7. 5-7, 那覇文化芸術劇場 なはーと

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・分野融合セミナー, 2023.7.11, 京都産業大学（京都）

高田啓, Helge Paternoga, 藤原圭吾, Esther Park, Jose Nakamoto, Allen R Buskirk, Gemma C Atkinson, Daniel N Wilson, Vasili Haurlyuk, 千葉志信：「枯草菌における新規 RQC 関連因子の解析」 マルチファセットプロテインズ領域会議・第 2 回若手の会, 2023. 10. 23-24, 定山溪（札幌）

藤原圭吾、辻奈緒子、吉田真悠、千葉志信：「タンパク質局在化装置に関連する翻訳アレスト因子のバクテリアワイドサーチ」 マルチファセットプロテインズ領域会議・第 2 回若手の会, 2023. 10. 23-24, 定山溪（札幌）

赤岡大暉、高田啓、丹羽達也、田口英樹、千葉志信：「枯草菌における翻訳途上鎖依存的な翻訳途中終了現象の解析」 マルチファセットプロテインズ領域会議・第 2 回若手の会, 2023. 10. 23-24, 定山溪（札幌）

吉田真悠、藤原圭吾、高田啓、千葉志信：「クロストリジウム綱由来の新規アレスト因子の分子機構と下流遺伝子制御の解明」 マルチファセットプロテインズ領域会議・第 2 回若手の会, 2023. 10. 23-24, 定山溪（札幌）

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信：「配列モチーフの探索による新規アレスト因子の同定」 マルチファセットプロテインズ領域会議・第 2 回若手の会, 2023. 10. 23-24, 定山溪（札幌）

千葉志信：「機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構」 第 5 回マルチファセットプロテインズ領域会議, 2023. 10. 24-26, 定山溪（札幌）

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信：「RAPP 様配列を含む新規翻訳アレスト因子の同定」 第 96 会日本生化学会大会, 2023. 10. 31-11.2, 福岡

Shinobu Chiba: 「Regulated translation arrest: a regulation mechanism of genes for bacterial protein localization machinery」 BACELL2023, 2023/11/20-23, 神戸商工会議所

千葉志信：「新生ポリペプチド鎖によるタンパク質バイオジェネシスのモニタリング」 新資源生物変換研究会, 45271, オンライン（招待講演）

千葉志信：「翻訳アレストを介した細胞の機能制御」 第 2 回タンパク質関連シンポジウム, 2024. 1. 24-25, 日本科学未来館（お台場）（招待講演）

Keigo Fujiwara: 「Bacterial domain-wide search for translation arrest peptides, and potential application in the research of protein biogenesis」 The 2166th NIG Biological Symposium, 2024. 1. 26, 国立遺伝学研究所（招待講演）

高田啓：「翻訳研究の魅力と将来展望：微生物はリボソームをどのようにハンドリングしているのか？」 第 18 回日本ゲノム微生物学会年会, 2024. 3. 12-14, かずさアカデミーホール

赤岡大暉、高田啓、藤原圭吾、千葉志信：「新規 uORF による枯草菌 Mg²⁺ transporter MgtE の発現制御機構の解析」 第 18 回日本ゲノム微生物学会年会, 2024. 3. 12-14, かずさアカデミーホール

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信：「海洋性バクテリア *Alteromonas macreodii* の多様な翻訳アレスト因子」 第 18 回日本ゲノム微生物学会年会, 2024. 3. 12-14, かずさアカデミーホール

高田啓：「微生物を対象とした翻訳研究の魅力と将来展望」 日本農芸化学会 2024 年度東京大会, 2024. 3. 26, 東京農業大学世田谷キャンパス

藤原圭吾：「細菌界横断的ゲノム解析から見る翻訳一時停止因子の共通性と多様性」 遺伝研研究会「微生物の細胞複製システムから紐解く生命のデザイン」, 2024. 3. 28-29, 国立遺伝学研究所（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）

科研費補助金・基盤研究（C）

課題名：ABC-F タンパク質ファミリーの機能から読み解く翻訳制御機構の新展開

研究代表者：高田啓、取得年度：R5-R7 年（3 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）アウトリーチ活動

高大接続授業（京都産業大学附属高等学校）（2023/11/10）

3）シンポジウム・セッションオーガナイザー

第 23 回日本蛋白質科学会年会, 2023. 7. 5-7, 名古屋国際会議場

4）受賞

優秀発表賞（吉田真悠）：マルチファセットプロテインズ領域会議・第 2 回若手の会

優秀発表賞（赤岡大暉）：第 18 回日本ゲノム微生物学会年会

優秀発表賞（辻奈緒子）：第 18 回日本ゲノム微生物学会年会

研究奨励賞（高田啓）：第 18 回日本ゲノム微生物学会年会

