

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

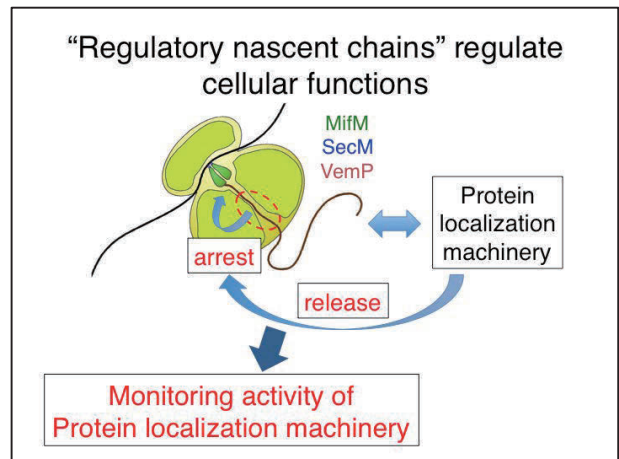
准教授 千葉 志信 Associate Prof. Shinobu Chiba, Ph.D.

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

1. 研究概要

「4文字の羅列からなる遺伝情報がいかにして生命現象に変換されるのか」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必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。

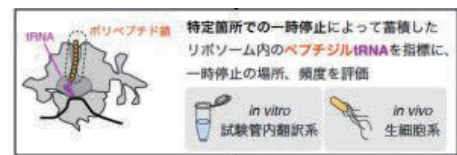
当研究室では、タンパク質の合成と成熟、さらには、その空間配置（局在化）の分子機構を明らかにすることを目指し研究を進めている。生命活動の実働部隊であるタンパク質が合成され機能を獲得するこの過程は、情報が生命へと変換される最初の重要なプロセスと見なすことができ、このメカニズムを理解することは、遺伝情報が生命活動へと変換される機構を理解することに繋がるものと思われる。我々は、合成の途上で生理機能を発揮するユニークなタンパク質を見出した。例えば、枯草菌 MifM は、翻訳の途上で自身を合成するリボソームに働きかけ、自らの翻訳伸長を一時停止（アレスト）する性質を持つ。この性質を利用し、タンパク質膜組込装置である YidC の活性をモニターし、その機能を維持する役割を担っていることが明らかとなった。MifM の発見に先駆け本学シニアリサーチフェローであり共同研究者でも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と考えている。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、伊藤維昭シニアリサーチフェローの活動のうち、当研究室の活動に関連するものも併せて報告する。



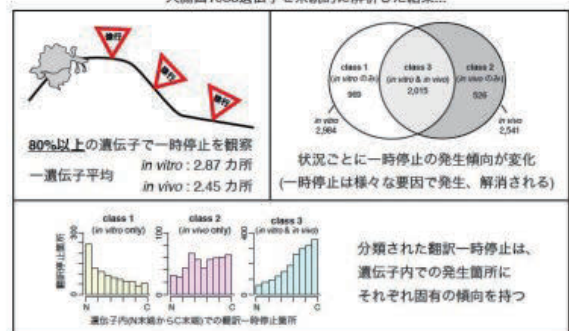
2. 本年度の研究成果

(1) 大腸菌翻訳途上鎖の網羅的プロファイリング

翻訳途上のタンパク質はC末端にtRNAが共有結合したペプチジル tRNAの状態にある。そのため、tRNAの有無を調べることで、翻訳が完了したタンパク質と翻訳途上鎖とを区別することができる。以前、当研究グループは、C末端 tRNAの有無を指標に翻訳途上鎖を合成完了鎖と電気泳動上で区別する方法を開発し、以来、細胞内における翻訳途上鎖の集団（nascentome と命名）を直接的に観察する試みを進めてきた。今回、東京工業大学田口英樹研究室との共同研究で、大腸菌の個々の遺伝子産物から合成される翻訳途上鎖を *in vivo* および *in vitro* で網羅的に解析した。1つの遺伝子から生じる翻訳途上鎖はその伸長の途上では多様



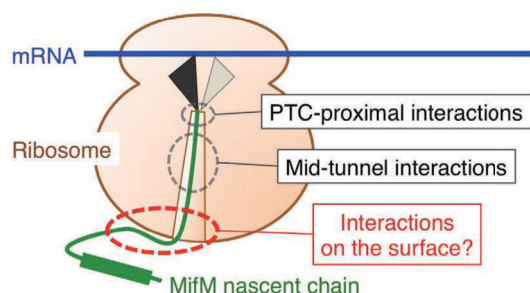
大腸菌1038遺伝子を系統的に解析した結果...



なサイズからなる集団である。翻訳伸長が一定速度で進行するならば、特定のサイズの翻訳途上鎖のみが蓄積することはない。一方、翻訳途上の特定の部位で伸長反応が一時停止する場合には、特定の長さの翻訳途上鎖が特異的に蓄積し、電気泳動で1つのバンドとして検出されることが期待される。今回、大腸菌遺伝子の中から 1,038 遺伝子についてパルスラベル実験を行ったところ、in vivo、in vitro とともに、8割以上のタンパク質で1回以上の翻訳伸長のポーズが起こることを示す結果が得られた。このことは、実際の翻訳が多くの場合速度変化の緩急を伴って進行するものであることを示している。また、ピューロマイシン感受性試験から、翻訳伸長のポーズが多様な機構で起こることを示唆する結果も得られた。

(2) 枯草菌 MifM-リボソーム間相互作用の全容解明に向けて

枯草菌 MifM は、翻訳の途上で、自身を合成するリボソームと相互作用することで自らの翻訳伸長をアレストする。この MifM の持つユニークな性質は、MifM によるタンパク質膜挿入装置 YidC の活性のモニタリングとそれを介した YidC 経路によるタンパク質膜組込み活性の恒常性維持に必要である。この翻訳アレストは、MifM の C 末端付近に存在する特定の amino 酸配列 (アレストモチーフ) がリボソームの大サブユニットにあるペプチド鎖排出トンネルの内壁やリボソーム活性中心付近の成分と相互作用することで引き起こされる。今回、さらに N 末端側に位置する領域への



変異導入によっても MifM の翻訳アレストが不安定化されることが見出された。精製再構成翻訳系を用いた解析でもこの領域の変異効果が in vivo と同様に観察されたことから、翻訳装置そのものが関わる現象であり、例えばこの領域が直接リボソームと相互作用することで翻訳アレストを安定化させていることが考えられる。この領域は、amino 酸配列上の翻訳停止位置からの位置関係および構造解析の結果から、リボソームの外部に露出していると判断できる。MifM とリボソームとの相互作用は、トンネルの内部にとどまらず、リボソームの表面を含めた非常に広範囲にわたる領域で起こることが示唆された。

3. Research projects and annual reports

Since our discovery of *Bacillus subtilis* MifM as a regulatory nascent chain that monitors the activity of the YidC-mediated membrane insertion pathway, we have been interested in and studying on a class of proteins called 'regulatory nascent chains', which function while they are still in the midst of the process of biosynthesis. A remarkable property of this class of nascent chains is that they interact cotranslationally with components of the ribosome including those of the polypeptide exit tunnel, and thereby arrest their own translation elongation. The arrested state of translation elongation affects translation of the target gene either positively (in the case of MifM) or negatively. Importantly, the arrest can be stabilized or canceled in response to changes in the cellular physiology that is executed by the target gene function, allowing each nascent chain to serve as a unique biological sensor to feedback-regulate the target gene expression. 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 cellular capacity of membrane protein biogenesis. 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 outlined above may 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) Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling.

Translation is a key biological process where genetic information is converted into functional bio-molecules. Several recent studies have revealed that translation elongation sometimes undergoes transient pausing, which could possibly affect efficiency of cotranslational folding or localization of newly synthesized proteins. To understand whether and how generally the elongation pausing takes place during proteome biogenesis, we carried out systematic profiling of translation elongation of total 1,038 E. coli genes both in vivo and in vitro. Nascent polypeptides were detected based on the existence of the tRNA moiety that is covalently attached to the C-terminal end of nascent peptide chains. Our results revealed that translation elongation of more than 80% of tested genes underwent transient pausing in vitro, in vivo, or both in vivo and in vitro. Our puromycin sensitivity tests suggest that there are several distinct mechanistic modes to induce elongation pause. Our data reveal that elongation pausing is a widespread event during proteome biogenesis.

2) Interactions between MifM and the ribosome for the elongation arrest

MifM is a regulatory nascent chain that monitors cellular activity of membrane protein insertase, YidC, by a mechanism involving regulated translation elongation arrest. The elongation arrest requires cotranslational interactions between a specific amino acid motif (arrest motif) near the C-terminus of the MifM nascent polypeptide and the ribosomal components in the region from the peptidyl transferase center through the polypeptide exit tunnel of the large ribosomal subunit. Our analysis currently under way revealed that mutations in the region N-terminal to the previously determined arrest motif of MifM caused destabilization of the elongation arrest. We reproduced the mutational effects in in vitro translation reactions reconstituted with purified translation components. These results suggest that the region N-terminal to the "arrest motif" also contributes to the stable elongation arrest most likely by directly interacting with the ribosome components. Structural data of the MifM-ribosome complex as well as the primary structure information suggests that such interactions occur probably on the surface of the ribosome rather than within the exit tunnel. Our analyses reveal that the elongation arrest of MifM involves extensive interactions between the nascent chain and the ribosome.

4. 論文、著書など

原著論文

Y. Chadani, T. Niwa, S. Chiba, H. Taguchi, K. Ito: Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2016) 113, E829-838.

5. 学会発表など

Shinobu Chiba: Nascent chain-mediated monitoring of a protein localization machinery. The 18th Tokyo RNA Club 2016.

1. 14 東京 (招待講演)

Shinobu Chiba, Naomi Shimokawa-Chiba, Koreaki Ito: Use of Bacillus subtilis MifM to dissect the YidC functions to facilitate membrane protein insertion. Gordon Research Conference: Protein Transport Across Cell Membranes. 2016.

3. 6-11 Galveston, TX

石井英治、千葉志信、橋本成祐、小嶋誠司、本間道夫、伊藤維昭、秋山芳展、森博幸：ヒブリオ属細菌における新生ポリペプチド鎖を介した発現制御機構 第13回21世紀大腸菌研究会 2016. 6. 2-3. 南阿蘇

Shinobu Chiba: Nascent chain-mediated monitoring of the membrane protein biogenesis factor. Nascent Biology and Ribosome Functions. 2016. 6. 27. 京都 (招待講演)

Shinobu Chiba, Eiji Ishii, Yoshinori Akiyama, Koreaki Ito, Hiroyuki Mori: Nascent chain-mediated monitoring of protein localization machineries. EMBO Ribosome Structure and Function 2016. 2016. 7. 6-10 Strasbourg, France

Keigo Fujiwara, Shinobu Chiba: Role of the PTC-distal interactions between the MifM nascent polypeptide and the ribosome on the ribosome stalling. EMBO Ribosome Structure and Function 2016. 2016. 7. 6-10 Strasbourg, France
藤原圭吾, 千葉志信: MifM の翻訳アレストを支える新規相互作用の解明 2016 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 2016. 8. 29-30. 熱海
Naomi Shimokawa-Chiba, Shun Minobe, Koreaki Ito, Shinobu Chiba: A nascent chain-based reporter to study the mechanism of membrane protein insertion. Nascent Chain Biology Meeting 2016. 2016. 9. 1-3. 河口湖
Keigo Fujiwara, Shinobu Chiba: Involvement of peptidyl transferase center-distal molecular interactions in MifM-instructed translation arrest. Nascent Chain Biology Meeting 2016. 2016. 9. 1-3. 河口湖
Koreaki Ito: Dynamic translation entails nascent polypeptides as active players in gene regulation and protein biogenesis. Nascent Chain Biology Meeting 2016. 2016. 9. 1-3. 河口湖 (招待講演)
千葉志信: 上流 ORF による翻訳アレストを介したタンパク質膜組込装置のモニタリングと発現調節 日本遺伝学会第 88 回大会 2016. 9. 7-9. 三島 (招待講演)
千葉志信, Daniel Sohmen, Daniel Wilson, 藤原圭吾, 下川 (千葉) 直美, 伊藤維昭: 自身の翻訳伸長を制御する枯草菌 MifM の分子機構と生理機能 第 4 回リボソームミーティング 2016. 9. 17-18 大阪医大
藤原圭吾, 千葉志信: 枯草菌 MifM の翻訳アレストに関わる新規相互作用の解明 第 4 回リボソームミーティング 2016. 9. 17-18 大阪医大
千葉志信, 下川 (千葉) 直美, 美濃部隼, 伊藤維昭: チャンネル非依存的タンパク質膜挿入装置 YidC の分子機構解明に向けて 第 89 回日本生化学会大会 2016. 9. 25-27 仙台 (招待講演)
伊藤維昭: タンパク質誕生の真実 タンパク質動態研究所開設記念シンポジウム 2016. 10. 26 京都産業大学 (招待講演)
伊藤維昭: 遺伝情報の翻訳に携わる分子の自律性 第 39 回日本分子生物学会年会 シンポジウム「RNA 研究から再考する遺伝情報のセントラルドグマ」 2016. 11.30-12.2. 横浜 (招待講演)
田口英樹, 茶谷悠平, 丹羽達也, 千葉志信, 伊藤維昭: Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing. 第 39 回日本分子生物学会年会 シンポジウム「発現制御装置としてのリボソームの新機能」 2016. 11.30-12.2. 横浜

6. その他特記事項

外部資金

科研費補助金・新学術領域「新生鎖の生物学」計画研究

課題名: 働く新生鎖の生理機能と分子機構 研究代表者: 千葉志信、研究分担者: 伊藤維昭、取得年度: H26-30 年 (5 年)

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)

学外活動

千葉志信: 第 4 回リボソームミーティング (大阪医大) を共催

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