

令和元年6月13日現在

機関番号：34304

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2014～2018

課題番号：26116008

研究課題名（和文）働く新生鎖の生理機能と分子機構

研究課題名（英文）Functions and mechanisms of functional nascent chains

研究代表者

千葉 志信（Chiba, Shinobu）

京都産業大学・総合生命科学部・准教授

研究者番号：20523517

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 71,400,000円

研究成果の概要（和文）：翻訳の途上で生理機能を発揮する機能性新生鎖である枯草菌MifMや大腸菌SecMの機能解析、ならびに分子機構の解析を行った。共同研究により、枯草菌MifMとリボソームの複合体の構造を明らかにし、それに基づいた遺伝学的な解析を併せて、翻訳アレストに必要なMifMとリボソームの相互作用の詳細を明らかにした。さらに、MifMとリボソームとの相互作用が、リボソームの表面を含めた広範囲で起こることを示した。MifMの翻訳アレストの解除には、タンパク質膜組込装置YidCの親水性の溝が重要なはたらきをしていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質は合成が完了した後に生理機能を発揮するのが一般的であるが、合成の途上でのみ生理機能を発揮する風変わりなタンパク質が近年見出された。本研究で対象とした枯草菌MifMや大腸菌SecMもそのような因子である。これらの因子は、自身の合成を途中で一時停止することで生理機能を発揮する。本研究では、構造学、生化学、遺伝学的手法を駆使してその分子機構の解明を目指した。その結果、これらの因子とタンパク質合成装置リボソームとの相互作用様式の詳細が明らかとなった。これらの因子がどうやって合成途上で機能を発揮するのかという基本的な問題を理解する上で意義深いものとなった。

研究成果の概要（英文）： We have studied regulatory nascent chains such as *B. subtilis* MifM and *E. coli* SecM. We collaborated with structural biologists to determine the structure of the MifM-ribosome complexes. Our genetic analysis revealed that MifM interacts with the ribosome, extensively, including the ribosomal surface to arrest translation. We also found that the release of the elongation arrest of MifM depends on the hydrophilic cavity of the membrane protein insertion factor YidC.

研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳アレスト リボソーム 機能性新生鎖 タンパク質局在化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、その全長の合成が完了し、正しい立体構造を形成した後に生理機能を発揮する。このタンパク質の一般的な機能発現の形態に当てはまらないものとして、翻訳の途上で生理機能を発揮する「機能性新生鎖」とよばれる一連の因子が、近年になり、いくつか見出されていた。機能性新生鎖は、リボソームによって合成される途上で自身を合成するリボソームと特異的な相互作用をすることによって、その翻訳伸長を一時停止（アレスト）する。さらに、その翻訳アレストが、細胞内の環境や、細胞性因子の活性によって安定化、もしくは不安定化する性質を内包し、それによって、細胞内の環境や細胞性因子の活性をモニターし、遺伝子発現を調節するセンサーとしてはたらく。これらの機能性新生鎖の発見は、「新生鎖が主体となった細胞機能の調節」という生物学上の新しい概念を生み出すきっかけとなった。

本研究の研究代表者である千葉は、枯草菌において、タンパク質の膜組込装置である YidC 因子の活性をモニターし、その発現をフィードバック制御する機能性新生鎖として MifM を、また、研究分担者である伊藤は、大腸菌において、タンパク質の分泌駆動因子である SecA の発現をフィードバック制御する機能性新生鎖として SecM を、それぞれ見出していた。いずれも、翻訳途上でリボソームと相互作用することで翻訳伸長アレストを引き起こす。一方、タンパク質局在化装置と相互作用することで、この翻訳アレストが解除される。いずれも、翻訳アレストとその解除の分子機構を解明することが重要であるが、とりわけ MifM については、遺伝学、生化学、構造生物学的な解析が不十分であった。

さらに、SecM や MifM は、タンパク質の局在化装置の活性をモニターする性質を持つため、生細胞中でタンパク質局在化装置の活性をリアルタイムに測定するための研究ツールに適用できる可能性も期待されていた。

2. 研究の目的

本研究では、(1) MifM や SecM の翻訳アレスト機構の解明、ならびに (2) 翻訳アレスト解除機構の解明、さらに、(3) これらの機能性新生鎖を、細胞性因子の活性をモニターするツールとして利用する方法を開発することを目的とした。加えて、(4) 翻訳アレストや、翻訳伸長の途中でのポーズが、プロテオーム全体においてどれほど普遍的なものなのかについても明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、大腸菌、枯草菌をモデル生物とし、遺伝学、生化学的な解析を用い、翻訳アレストに必要な新生鎖-リボソーム相互作用を解析した。また、国際共同研究により、低温電子顕微鏡を用いた MifM-リボソーム複合体の構造解析を行った。MifM の系を遺伝的に改変し、タンパク質の局在化装置などの細胞性因子の活性測定系として適用することを試みた。

4. 研究成果

(1) 機能性新生鎖の翻訳アレスト機構の解明: ミュンヘン大学・Roland Beckmann 博士、Daniel Wilson 博士 (現ハンブルク大学) との共同研究により、翻訳アレストを起こした MifM とリボソームの複合体の立体構造を、低温電子顕微鏡により明らかにした。また、その構造に基づいた遺伝学的な解析から、翻訳アレストに必要な MifM-リボソーム相互作用を詳細に解析した。この一連の研究により、MifM が、リボソームのトンネル成分および活性中心 (ペプチジル転移酵素中心: PTC) 付近の残基と相互作用していること、その相互作用の結果、リボソームの活性中心付近の特定の残基がユニークな配置をとり、A サイトへのアミノアシル tRNA や翻訳終結因子の結合をブロックすることが示唆された (Sohmen 2015 Nat. Commun.)。この構造解析では、MifM の C 末端付近のみが可視化できたが、この領域よりもさらに N 末端領域も、リボソームのトンネルやリボソーム表面の成分と相互作用することで翻訳アレストを安定化していることが、さらなる変異解析により示唆された (Fujiwara 2018 Sci. Rep.)。これらの研究により、MifM が、当初予想されていたよりも広範囲にわたってリボソームと相互作用することで翻訳アレストを引き起こしていることが示唆された。

(2) 機能性新生鎖の翻訳アレスト解除機構の解明: 大腸菌 SecM は、タンパク質分泌装置に引張られることで翻訳アレストが解除されることが示唆されていたが、SecM (全長 170 アミノ酸残基) の 100-110 番目のアミノ酸配列が、翻訳アレスト解除に必要であることが、SecM の変異解析から明らかとなった (Nakamori 2014 FEBS Lett.)。in vivo 光架橋実験により、この領域と相互作用する因子が存在することも示唆された (未発表)。

(3) 機能性新生鎖の細胞性因子モニターツールとしての応用: MifM は、タンパク質膜組込装置 YidC の活性をモニターする。この性質を利用し、YidC の機能解析を行った。まず、MifM は、枯草菌の 2 つの YidC ホモログのうち、第一のホモログである SpoIIIJ の活性をモニターしていることを以前明らかにしていたが、今回、第二のホモログである YidC2 の活性も同時にモニターしていることを、遺伝学的な解析から示した。このことは、MifM が、SpoIIIJ と YidC2 の 2 つの YidC ホモログのトータルの活性をモニターしつつ、YidC2 の量をフィードバック的に調節していることを示唆している (Chiba 2015 J. Bact.)。タンパク質膜組込装置 YidC は、Sec 複

合体のようなチャンネル型（タンパク質の通り道の孔を持つ）ではなく、膜内に親水性アミノ酸残基に富んだ溝を持つユニークな構造を持つ、非チャンネル型膜組込装置である。YidC 活性を簡単に測定出来る lacZ レポーター系（MifM の翻訳アレストを利用している）を用い、YidC の溝領域の網羅的な変異解析を行ったところ、YidC の溝構造の親水性残基の重要性が示された。このことから、YidC は、本来疎水的な脂質二重層に親水的な微小環境を作り出すことでタンパク質膜組込に必要なエネルギー障壁を低減していることが示唆された（Shimokawa-Chiba 2015 PNAS）。

（４）翻訳伸長のアレスト・ポーズの普遍性の解明：翻訳アレストや翻訳伸長のポーズがプロテオーム全体においてどれほど普遍的であるのかを、大腸菌遺伝子のおよそ4分の1を対象に、網羅的に調査した。この網羅的なプロファイリングの結果、少なくとも大腸菌遺伝子の8割以上が、翻訳伸長の途上の特定の部位で翻訳のポーズを経験していることが示された。このことは、翻訳伸長が、多くの場合、緩急を伴って進行する速度変化に富んだプロセスであることを示している（Chadani 2016 PNAS）。この研究は、領域代表の田口ら（東工大）との共同研究で行われた。

（５）新規翻訳アレスト因子の発見：京大・秋山、森らは、海洋性ビブリオ菌においてタンパク質膜透過駆動因子 SecDF の発現制御に関わる機能性新生鎖として VemP を同定した。VemP の発見を受け、秋山、森らと共同研究を行い、VemP がある特定のコードンでペプチド鎖転移反応を阻害することで翻訳アレストを引き起こしていることを示した（Ishii 2015 PNAS）。また、バイオインフォマティクス的手法を駆使し、放線菌や根粒菌から、新たに3種の翻訳アレスト因子を見出した（未発表）。これらの新規アレスト因子の発見は、研究開始時には予想されていなかったものであった。

（６）新生鎖依存的な翻訳終結機構の発見：東工大・田口らとの共同研究の過程で、ある種のアミノ酸配列が合成されると、その新生鎖がリボソームに働きかけ、翻訳中のリボソームのサブユニット間相互作用を不安定化（intrinsic ribosome destabilization; IRD）し、終止コードンに依存せずに翻訳伸長を強制終了する現象を見出した。さらに、この翻訳の強制終了現象が、細胞内のマグネシウムイオン濃度を感知して遺伝子発現制御を行うメカニズムとして機能していることも見出した（Chadani 2016 Mol. Cell）。このことは、新生鎖の生理機能が、翻訳アレストのみならず、翻訳の強制終了という別の現象を介して発揮される場合もあることを示している。この新たな新生鎖の翻訳調節機構の発見も、研究開始時には予想されていなかったものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 9 件）

全て査読有り

- ① Fujiwara, K., Ito, K. and Chiba, S. (2018) MifM-instructed translation arrest involves nascent chain interactions with the exterior as well as the interior of the ribosome. **Sci Rep.** 8, 10311. doi: 10.1038/s41598-018-28628-y.
- ② Ito, K., Mori, H. and Chiba, S. (2018) Monitoring substrate enables real-time regulation of a protein localization pathway. **FEMS Microbiology Letters**, 365, 11. doi: 10.1093/femsle/fny109.
- ③ Chadani, Y., Niwa, T., Izumi, T., Sugata, N., Nagao, A., Suzuki, T., Chiba, S., Ito, K. and Taguchi, H. (2017) Intrinsic ribosome destabilization underlies translation and provides an organism with a strategy of environmental sensing. **Mol Cell.** 68, 528-539.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.020.
- ④ Chadani, Y., Niwa, T., Chiba, S., Taguchi, H. and Ito, K. (2016) Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 113, E829-E838. doi: 10.1073/pnas.1520560113
- ⑤ Ishii, E., Chiba, S., Hashimoto, N., Kojima, S., Homma, M., Ito, K., Akiyama, Y. and Mori, H. (2015) Nascent chain-monitored remodeling of the Sec machinery for salinity adaptation of marine bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 112, E5513-E5522. doi: 10.1073/pnas.1513001112.
- ⑥ Sohmen, D., Chiba, S., Shimokawa-Chiba, N., Innis, A., Berninghausen, O., Beckmann, R., Ito, K. and Wilson, D. (2015) Structure of the Bacillus subtilis 70S ribosome reveals the basis for species-specific stalling. **Nat. Commun.** 6, 6941. doi: 10.1038/ncomms7941.
- ⑦ Shimokawa-Chiba, N., Kumazaki, K., Tsukazaki, T., Nureki, O., Ito, K. and Chiba, S. (2015) Hydrophilic microenvironment required for the channel-independent insertase function of YidC protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 112, 5063-5068. doi: 10.1073/pnas.1423817112.
- ⑧ Chiba, S. and Ito, K. (2015) MifM monitors total YidC activities of Bacillus subtilis including that of YidC2, the target of regulation. **J Bacteriol.** 197, 99-107. doi: 10.1128/JB.02074-14.
- ⑨ Nakamori, K., Chiba, S. and Ito, K. (2014) Identification of a SecM segment required for

〔学会発表〕 (計 38 件)

- ① Karen Sakiyama, Naomi Shimokawa-Chiba, Shinobu Chiba: Translation-arrest peptides encoded upstream of genes for protein localization machinery. BACTERIAL PROTEIN EXPORT 2018. 2018. 9/30-10/3. Leuven, Belgium
- ② Karen Sakiyama, Naomi Shimokawa-Chiba, Shinobu Chiba: Characterization of novel translation-arrest peptides encoded upstream of genes for protein localization machinery. CSHL meeting: Translational control 2018. 9/4-9/8 CSHL, NY, USA
- ③ 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)
- ④ 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
- ⑤ 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)
- ⑥ 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
- ⑦ 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)
- ⑧ 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 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)
- ⑨ Shinobu Chiba: Nascent chain-mediated monitoring of the membrane protein biogenesis pathway Nascent Chain Biology Meeting 2015 in Tokyo 2015, 10, 1 東京 (招待講演)
- ⑩ 千葉志信、千葉(下川)直美、伊藤維昭: 枯草菌 MifM とリボソームトンネルとの種特異的な相互作用 第 3 回 RIBOSOME MEETING 2015, 3, 17-18, 宮崎市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~k4563/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：伊藤 維昭

ローマ字氏名：(ITO, Koreaki)

所属研究機関名：京都産業大学

部局名：研究機構

職名：シニアリサーチフェロー

研究者番号 (8 桁)：90027334

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：