

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04788

研究課題名(和文)非チャ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

研究課題名(英文)Molecular mechanism of channel-independent protein translocation machinery

研究代表者

千葉 志信(CHIBA, Shinobu)

京都産業大学・生命科学部・教授

研究者番号：20523517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質を正しく膜に組み込むしくみは細胞の生育に必須である。本研究課題では、タンパク質膜組込装置YidCによるタンパク質膜組込の分子機構の解明を目指した。以前、我々のグループは、YidCの細胞質領域のヘリックス構造の重要性を見出していたが、この領域のどのような性質が重要であるのかは不明であった。本研究では、YidCの機能に必須な細胞質ヘリックスの重要性を遺伝学的に検討した。その結果、この領域の塩基性残基の重要性が示唆された。また、YidCの活性を阻害する低分子化合物の探索も行った。その結果、YidC活性を阻害することが示唆された化合物が複数見出されつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の膜への組込は全ての細胞の生育に必須であるため、その分子機構を理解することは、重要である。タンパク質の膜への組込には、チャネル(孔)構造を持つタンパク質の働きが必須であると信じられてきたが、最近、チャネル構造を持たないタンパク質膜組込機構の存在が示唆された。本研究は、理解の進んでいないチャネル非依存的なタンパク質膜組込機構を理解するため、そのひとつであるYidCの解析を行った。その結果、細胞質側ヘリックスの重要な性質の一端が明らかとなり、また、YidCを阻害することが示唆された化合物も幾つか見出された。これらの発見は、YidCの分子機構を理解する上で有用な情報や研究ツールになり得る。

研究成果の概要(英文)：Biogenesis of membrane proteins is an essential cellular function. This study aimed to understand molecular mechanism of YidC, a channel-independent protein translocation machinery, which mediates biogenesis of a class of membrane proteins. We have previously found importance of cytoplasmic helices of YidC for its membrane protein insertase function. In this study, we performed genetic analysis and found the importance of basic residues in this region. We also tried to search for small molecule compounds that inhibit YidC activity and were identifying some compounds that might inhibit the activity of YidC.

研究分野：タンパク質バイオジェネシス

キーワード：YidC タンパク質膜組込 膜タンパク質 バイオジェネシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の膜への組込は細胞の生育に必須の機能である。その過程は、タンパク質膜組込装置によって媒介される。以前は、タンパク質膜組込装置はタンパク質の通り道である孔(チャンネル)構造を持つものと考えられていたが、最近になって、チャンネル構造を持たないタンパク質膜組込装置の存在が、我々、および、東大、奈良先端大のグループの共同研究により明らかにされた。チャンネル依存的なタンパク質膜組込装置の分子機構の解明は進んでいたが、チャンネル非依存的なタンパク質膜組込装置の分子機構には、研究開始当初の段階でも不明な点が多かった。

非チャンネル型タンパク質膜組込装置である YidC は、細菌からヒトまで広く保存されている重要な因子である。2014 年に前述の共同研究により、その原子分解能での立体構造が解明され、非チャンネル型の膜組込装置であることが明らかにされた。当研究室が行った遺伝学的な解析から、膜貫通領域によって形成される膜内の溝構造、細胞質側のヘリックス構造の重要性がそれぞれ示唆された。溝構造については、その親水性や塩基性が機能上重要な役割を果たすことが示唆されたが、細胞質側のヘリックス構造については、その領域のどのような性質が重要であるのか不明であった。

YidC は細菌の生育に必須であるため、その活性を阻害する低分子化合物は、抗菌薬としての適用が期待される。また、そのような低分子化合物は、YidC の研究ツールとしても有用である。ところが、YidC の特異的な阻害剤は見出されていなかった。

以前当研究室では、枯草菌 YidC の活性をモニターし、その第二のホモログである YidC2 の発現を制御する因子として MifM を見出した。MifM による YidC2 のフィードバック制御機構を利用し、細胞の YidC 活性を LacZ 活性を指標に簡便に測定するレポーター株 (*yidC2-lacZ*) を構築した。このレポーター株を使えば、網羅的な変異解析や YidC 阻害剤のスクリーニングが可能になるとの着想を得ていた。

2. 研究の目的

前述のような背景を受け、本研究では、非チャンネル型タンパク質膜組込装置 YidC の分子機構の解明を目指した。その目的のために、機能上重要であるにも関わらず未だその役割が解明されていない細胞質領域について、詳細な解析を行った。また、YidC の機能の特異的に阻害する活性を持つような低分子化合物の探索を目指した。

3. 研究の方法

まず、YidC の細胞質ヘリックス構造の役割を理解するため、その領域のどのような化学的性質が重要であるのかを変異解析により明らかにすることを試みた。以前、YidC の溝内の塩基性が重要であること、また、基質膜タンパク質の酸性残基が膜組込に必要であることが示されていた。そのため、YidC と基質との相互作用には、YidC 側の塩基性残基が重要な役割を果たすことが考えられた。また、YidC の細胞質ヘリックスには、多数の塩基性残基が存在する。そこで、この細胞質ヘリックスの塩基性残基の数や位置を変えたような様々な変異体を作成し、その活性を測定した。YidC 活性の測定には、以前我々が開発した LacZ レポーター株 (*yidC2-lacZ*) の系を用いた。

YidC の活性を阻害する低分子化合物の探索にも、*yidC2-lacZ* 株を用いた。この株は、YidC の活性低下に呼応して LacZ を発現するため、YidC の阻害活性を持つ化合物は、この株の LacZ 活性を上昇させる効果を持つことが期待される。化合物ライブラリは、東大の創薬機構から提供を受けた。

4. 研究成果

(1) YidC の細胞質ヘリックスの変異解析

枯草菌 YidC ホモログの 1 つである SpoIIIJ (YidC1) の細胞質ヘリックス領域に存在する塩基性残基を全てアラニンに置換すると、タンパク質膜組込の活性を損なうことを示唆する結果が得られた。一方、酸性残基をなくした変異体は、その活性が低下したものの、完全に活性を失うことはなかった。これらのことは、細胞質ヘリックス領域の塩基性残基の重要性を示唆している。次に、この領域の塩基性残基の数を段階的に減らしたような各種変異株を構築した。その結果、塩基性残基の数の低下におおむね呼応して、YidC の活性が低下することを示唆する結果を得た。細胞質ヘリックスのどの領域に塩基性残基が存在すると YidC の活性を維持出来るのかについても検討を行った。塩基性残基の存在する領域を変えたような各種変異体を作成し、その活性を LacZ レポーターを用いて測定した。その結果、塩基性残基の存在する位置については、特定の領域が特に重要ではないことを示唆する結果が得られた。

過去に結晶構造解析により構造が明らかにされた *Bacillus halodurans* 由来の YidC2 (Bh YidC2) についても、同様の解析を行った。Bh YidC2 を、spoIIIJ を欠失し、かつ、lacZ レポーター遺伝子を持つような枯草菌株で発現したところ、LacZ 活性の低下が観察された。このこ

とは、枯草菌中で発現した Bh YidC2 が蛋白質の膜組込活性を保持していることを示唆している。そこで、Bh YidC2 の細胞質ヘリックスに、塩基性残基の数、位置をそれぞれ様々に変化させた各種変異体を作成し、枯草菌レポーター株中で発現した。その結果、塩基性残基の重要性が再び示唆された。また、塩基性残基が特定の位置に存在することはさほど重要ではないことを示唆する結果も得られた。

以上の結果は、YidC の細胞質ヘリックスの塩基性残基の重要性を示唆している。以前、YidC の基質の酸性残基の膜挿入における重要性が示唆されたが、YidC のこの領域の塩基性残基は、基質と静電的相互作用をするために必要であることが考えられるが、この可能性については、今後さらに検証する必要がある。

(2) YidC 活性を阻害する低分子化合物の探索

YidC の活性を阻害する低分子化合物を探索するために、まず、東大創薬機構から、化合物ライブラリを入手した。前述の YidC 活性をモニター可能な枯草菌レポーター株を用い、その LacZ 活性を上昇させるような化合物を探索することで、YidC 活性を阻害する低分子化合物を探索した。9,600 化合物からなるコアライブラリおよび、21 万化合物からなるフルライブラリの一部について、それぞれ探索を行ったところ、MifM-YidC2-LacZ レポーター株（以下、YidC レポーター株）の LacZ 活性を数倍上昇させる化合物を複数得ることができた。

次に、これらの候補化合物について、以下のネガティブコントロールを用いて、阻害効果の YidC 経路特異性を検討した。以前我々は、MifM-YidC2-lacZ レポーター（YidC 活性の測定が可能なレポーター）を改変し、YidC とは別のタンパク質膜組込や膜透過に関わる Sec 経路をモニターできるレポーターを構築した。このレポーター株（以下、Sec レポーター株）は、Sec 依存経路の阻害によって LacZ 活性を上昇させる。YidC レポーター株および Sec レポーター株は、それぞれ、タンパク質の局在化経路の阻害が LacZ の翻訳レベルでの上昇をもたらす。これらのレポーターは、mifM プロモーターの制御下にあるため、mifM プロモーターの活性の変動がないことを確認するためにネガティブコントロールとして、mifM と lacZ のプロモーター融合遺伝子を持つ株（以下、MifM レポーター株）も用意した。

候補化合物について、Sec レポーター株および MifM レポーター株への効果を検証したところ、いずれも、YidC レポーターで見られたような顕著な LacZ 活性の上昇は見られなかった。このことは、これらの化合物が、YidC 経路を特異的に阻害していることを示唆している。今後は、レポーターアッセイ以外の方法で、これらの化合物が YidC 経路を特異的に阻害していることを確認する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito Koreaki, Shimokawa-Chiba Naomi, Chiba Shinobu	4. 巻 8
2. 論文標題 Sec translocon has an insertase-like function in addition to polypeptide conduction through the channel	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 F1000Research	6. 最初と最後の頁 2126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12688/f1000research.21065.1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimokawa-Chiba Naomi, Müller Claudia, Fujiwara Keigo, Beckert Bertrand, Ito Koreaki, Wilson Daniel N., Chiba Shinobu	4. 巻 10
2. 論文標題 Release factor-dependent ribosome rescue by BrfA in the Gram-positive bacterium <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13408-7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yura Takashi, Miyazaki Ryoji, Fujiwara Keigo, Ito Koreaki, Chiba Shinobu, Mori Hiroyuki, Akiyama Yoshinori	4. 巻 93
2. 論文標題 Heat shock transcription factor ³² defective in membrane transport can be suppressed by transposon insertion into genes encoding a restriction enzyme subunit or a putative autotransporter in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 229 ~ 235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.18-00040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujiwara Keigo, Ito Koreaki, Chiba Shinobu	4. 巻 8
2. 論文標題 MifM-instructed translation arrest involves nascent chain interactions with the exterior as well as the interior of the ribosome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-28628-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ito Koreaki, Mori Hiroyuki, Chiba Shinobu	4. 巻 365
2. 論文標題 Monitoring substrate enables real-time regulation of a protein localization pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fny109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 千葉 志信	4. 巻 90
2. 論文標題 調節性翻訳アレストペプチドによる細胞機能の制御	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 147~157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900147	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 田口英樹、茶谷悠平、千葉志信、伊藤維昭	4. 巻 76
2. 論文標題 終止コドンに依らず翻訳を途中終了させる酸性アミノ酸の連続配列	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 B&I	6. 最初と最後の頁 239~241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 茶谷悠平、千葉志信、伊藤維昭、田口英樹	4. 巻 36
2. 論文標題 翻訳途上の新生ポリペプチド鎖が引き起こすリボソームの不安定化とその生理的意義	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1364~1367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chadani Yuhei, Niwa Tatsuya, Izumi Takashi, Sugata Nobuyuki, Nagao Asuteka, Suzuki Tsutomu, Chiba Shinobu, Ito Koreaki, Taguchi Hideki	4. 巻 68
2. 論文標題 Intrinsic Ribosome Destabilization Underlies Translation and Provides an Organism with a Strategy of Environmental Sensing	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 528 ~ 539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2017.10.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 塩田成未、千葉志信
2. 発表標題 枯草菌タンパク質膜組込装置YidCを阻害する化合物の探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 Nascent polypeptide chain-mediated translation elongation arrest in bacteria
3. 学会等名 BPS2020 (64th Annual Meeting of the Biophysical Society) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 A release factor-dependent ribosome rescue mechanism in Gram-positive bacteria
3. 学会等名 EMBO Conference (Protein synthesis and translational control) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 Identification and characterization of novel translation-arrest peptides in bacteria
3. 学会等名 International symposium Proteins; from the cradle to the grave (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 新規翻訳アレスト因子の探索
3. 学会等名 2018 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 Characterization of novel translation-arrest peptides encoded upstream of genes for protein localization machinery
3. 学会等名 CSHL meeting: Translational control (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 Translation-arrest peptides encoded upstream of genes for protein localization machinery
3. 学会等名 BACTERIAL PROTEIN EXPORT 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 新規調節性アレストペプチドの探索
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 Screening of translation arrest-releasable elements
3. 学会等名 新学術領域「新生鎖の生物学」主催・国際シンポジウム「Protein Quality Control」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinobu Chiba
2. 発表標題 Nascent chain-mediated monitoring of the membrane protein biogenesis factor.
3. 学会等名 Nascent Biology and Ribosome Functions. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Shinobu Chiba, Eiji Ishii, Yoshinori Akiyama, Koreaki Ito, Hiroyuki Mori
2. 発表標題 Nascent chain-mediated monitoring of protein localization machineries.
3. 学会等名 EMBO Ribosome Structure and Function 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Naomi Shimokawa-Chiba, Shun Minobe, Koreaki Ito, Shinobu Chiba
2. 発表標題 A nascent chain-based reporter to study the mechanism of membrane protein insertion.
3. 学会等名 Nascent Chain Biology Meeting 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本遺伝学会第88回大会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 千葉志信、Daniel Sohmen、Daniel Wilson、藤原圭吾、下川(千葉)直美、伊藤維昭
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第4回リボソームミーティング
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 千葉志信、下川(千葉)直美、美濃部隼、伊藤維昭
2. 発表標題 チャ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
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉研究室HP

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

「リボソームがタンパク質を作る時に、自身（リボソーム）の構造不安定化のリスクを負うこと」を発見！

http://www.kyoto-su.ac.jp/news/20171107_850_tanpaku.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----