

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16044

研究課題名(和文) 翻訳と共役して起こる新生タンパク質の動的過程の系統的調査

研究課題名(英文) Proteome-wide capture of co-translational protein dynamics

研究代表者

藤原 圭吾 (FUJIWARA, Keigo)

京都産業大学・タンパク質動態研究所・研究員

研究者番号：10814907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内でco-translationalなタンパク質の成熟化がどのように進行しているのかについて、プロテオームワイドな理解はされていない。本研究では、枯草菌MifMの翻訳アレスト配列を新生鎖の動的挙動センサーとして活用し、トランスポゾンと組み合わせて、細胞内でco-translationalな成熟化に伴う動的挙動を示すタンパク質配列を捕捉できるTnDR法を確立した。実際に膜透過や膜挿入、タンパク質間相互作用やタンパク質-RNA間相互作用による複合体形成を本システムで捉えられていることがわかり、細胞内で実際に数百種類ものタンパク質が合成の途中で成熟化や局在化を開始することを示すことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能的なタンパク質に成熟化する機構の理解はタンパク質科学において重要である。本研究により、細胞内で実際に多くのタンパク質がco-translationalに局在化や複合体形成を起こし得ることがわかり、基礎生物学的に重要な知見が得られたと考えられる。また、TnDR法を用いて細胞内でおきるco-translationalなタンパク質動態を捉えることができた。この技術をより発展させることで、将来的にタンパク質科学において有用な技術になることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：There is no proteome-wide understanding of the extent to which nascent proteins progress to cotranslational maturation in the cell. In this study, we constructed and used an engineered transposon, TnDR, which carries translation arrest sequence of *Bacillus subtilis* MifM, to capture co-translational protein dynamic in the cell. We identified hundreds of proteins that cancel the elongation arrest, most probably reflecting their ability to initiate the maturation/localization process co-translationally. Case studies identify *B. subtilis* proteins that initiate assembly with a partner molecule before completion of translation. These results suggest that cotranslational maturation is a frequently occurring event in protein biogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：新生ポリペプチド鎖 翻訳アレスト co-translational リボソーム TnDR法 枯草菌 MifM

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全てのタンパク質はリボソームでポリペプチド鎖として合成され、成熟化(立体構造形成、局在化、複合体形成など)し、機能的なタンパク質となる。近年、成熟化は co-translational、つまり合成途上で開始されることが一部のモデルタンパク質でわかってきた。しかし、翻訳途上の新生鎖の動的挙動を調べる手段は限られており、co-translational な成熟化をプロテオームワイドに理解する試みはほとんどなされておらず、細胞内におけるその全体像が不明であった。

枯草菌の MifM は、co-translational なタンパク質の膜組込を感知するユニークな性質を持つ。MifM は、リボソームの成分と相互作用して自身の翻訳を一時停止(翻訳アレスト)させるアレスト配列を持つ。翻訳アレストは、MifM の N 末端側の膜挿入シグナルが YidC 依存的に膜組込されると解除される。すなわち、MifM 翻訳途上鎖は自らの co-translational な膜組込を感知して、翻訳アレストを解除する。この性質を利用すると、新生鎖の膜組み込みに限らない多様な動的イベントを検出できるという着想を得ていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、MifM のアレスト配列を「新生鎖の動的挙動センサー」として用いて、細胞内で新生鎖が示す動的挙動を系統的に捕捉し、どういった co-translational な動的挙動がどの程度起きているのか、その実態を把握することを目的とした。

### 3. 研究の方法

新生鎖の動的挙動を捕捉するため、MifM アレスト配列の C 末端側に LacZ を融合したダイナミクスレポーター遺伝子を用いた。ダイナミクスレポーターの N 末端にさらに融合したタンパク質配列が動的な挙動を示すと、翻訳アレストが解除されて LacZ が合成され、細胞の  $\beta$  ガラクツシダーゼ活性が上昇する。このようなダイナミクスレポーターを、トランスポゾンを利用して枯草菌の染色体 DNA にランダムに挿入し、ダイナミクスレポーターの N 末端側にプロテオーム由来の様々なタンパク質配列が融合されるようにした。トランスポゾンが挿入された枯草菌ライブラリを、XG を含むプレート上で培養し、 $\beta$  ガラクツシダーゼ活性が上昇して青色を呈したコロニーを単離した(図 1)。青色を呈した細胞における標的遺伝子と融合部位を DNA シーケンシングで同定した。また、それらの各細胞における翻訳アレストの解除メカニズムを調べるために各種変異解析を行った。さらに、翻訳アレストの解除メカニズムを生化学的に調べるために、精製再構成系の *in vitro* 翻訳システムを活用した。

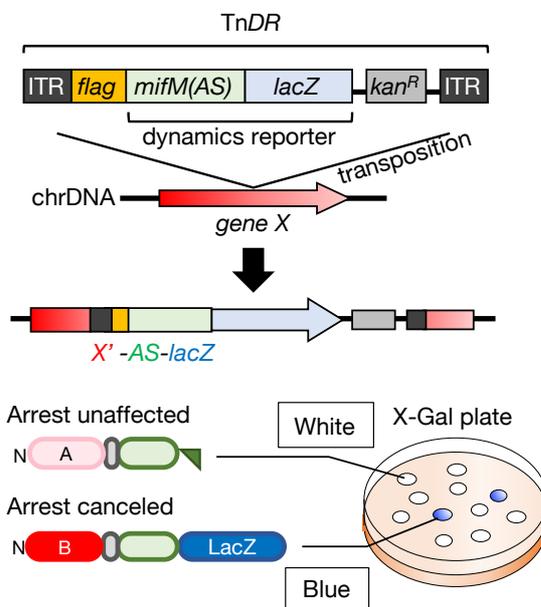


図1 TnDR 法による新生鎖の動的挙動の捕捉方法

### 4. 研究成果

#### (1) 翻訳アレストを解除できる新生鎖配列のリスト化

トランスポゾンを利用してダイナミクスレポーターを枯草菌染色体 DNA に挿入し、翻訳アレストを解除しうる新生鎖配列として、302 遺伝子から由来する 506 の配列を単離した。配列予測から 62.8%は膜タンパク質か分泌タンパク質由来で、残りが細胞内の可溶性タンパク質に分類された(図 2)。膜透過や膜組み込みの過程は翻訳アレストを解除できる動的挙動が新生鎖に起きることが SecM の配列を用いた研究で示されており、それらの配列が本スクリーニングにおいても優先的に捕捉されることが、プロテオオ

ームにおける割合との比較によりわかった。一方で細胞内可溶性タンパク質においても、翻訳アレストを解除できるような新生鎖の動的挙動が起きることが示唆された。これらの結果は、細胞内の様々なタンパク質の成熟化で、co-translational な局在化・成熟化が一般的に起き得ることを示唆した。本スクリーニングシステムを TnDR (transposable protein dynamics reporter) 法と名付けた。

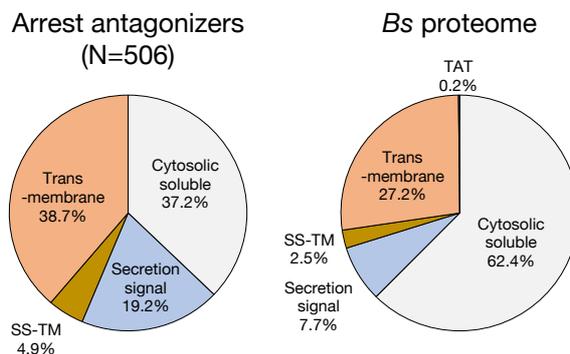


図2 TnDR 法により捕捉された co-translational に動的挙動を起こしうるタンパク質配列の分類

## (2) 翻訳アレストの解除メカニズム解析

(1) で翻訳アレストを解除できる配列として同定した新生鎖の配列が、どのような動的挙動により翻訳アレストを解除するのかを解析するために、変異解析を行った。

まずシグナル配列を持つ配列については、分泌過程による翻訳アレストの解除を想定された。翻訳アレストの解除がシグナル配列依存的か調べるためにシグナル配列を欠失したところ、翻訳アレストの解除効率が低下することが示された。また、タンパク質分泌を行う Sec トランスロコンの変異によっても翻訳アレストの解除効率が低下したことから、分泌過程により翻訳アレストが解除されることがわかった。同様に膜タンパク質においても、膜挿入シグナル依存的に翻訳アレストが解除されることがわかった。したがって、MifM を用いた TnDR 法により、細胞内で起きる新生鎖の膜透過と膜挿入を捕捉できることが確認できた。また、ダイナミクスレポーターを用いて膜透過・膜挿入を検出・解析できることも示された。

さらに、細胞内可溶性タンパク質においても変異解析を行い、翻訳アレストの解除メカニズムを調査した。その結果、ダイナミクスレポーターの N 末端側に融合された転写促進因子 SigF に、その活性抑制因子である SpoIIAB が相互作用することで翻訳アレストが解除されることが、in vivo 及び in vitro の解析でわかった。他にも、ダイナミクスレポーターの N 末端側に融合されたリボソームタンパク質 bL25 が 5S リボソーム RNA と相互作用することで翻訳アレストが解除されることが in vivo の解析で示唆された。これらの結果は、MifM を用いた TnDR 法により、細胞内可溶性タンパク質の新生鎖とタンパク質、あるいは RNA との相互作用を捕捉できることが示唆された。

ここまでの研究成果から、TnDR 法を用いることで、細胞内でおきる多様な新生鎖の動的挙動を捕捉できることがわかった。その動的挙動にはタンパク質の膜透過・膜組み込みといった局在化や、タンパク質間相互作用、タンパク質-RNA 間相互作用が含まれることもわかった。そのような動的挙動が細胞内で一般的に起きているということが示唆され、タンパク質科学における基礎生物学的な知見が得られた。これらの成果を論文にして発表した (Fujiwara et al., Cell Reports, 2020)。

一方で、MifM の翻訳アレストを解除できる新生鎖の動的挙動が非常に多くあり、LacZ を用いた TnDR 法では捕捉しきれないという課題も浮上した。よりハイスループットな系の構築ができると、新生鎖の成熟化に伴う動的挙動を網羅的かつ効率的に解析できる有用な技術になると考えられる。例えば、ダイナミクスレポーターの lacZ 部分を抗生物質耐性遺伝子に置換することで、翻訳アレストが解除されるような新生鎖の配列とダイナミクスレポーターが融合された遺伝子を持つ細胞を、抗生物質でセレクションできるようにする。さらに、細胞ライブラリー中のトランスポソンの挿入位置を一括して同定するために、次世代シーケンサーを用いた Tn-seq 法の導入が考えられる。予備的にこれらの改変を導入したところ、動的挙動を示した新生鎖配列を網羅的かつ効率的に同定できる TnDR-seq が構築可能であることが示唆された。この次世代型手法はタンパク質成熟化の解析に有用な技術になると考えられ、新たな科研費研究計画 (21K15020) で進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimokawa-Chiba Naomi, Mueller 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 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 該当する

1. 著者名 Fujiwara Keigo, Katagi Yutaro, Ito Koreaki, Chiba Shinobu	4. 巻 33
2. 論文標題 Proteome-wide Capture of Co-translational Protein Dynamics in <i>Bacillus subtilis</i> Using TnDR, a Transposable Protein-Dynamics Reporter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.108250	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 Sakiyama Karen, Shimokawa-Chiba Naomi, Fujiwara Keigo, Chiba Shinobu	4. 巻 49
2. 論文標題 Search for translation arrest peptides encoded upstream of genes for components of protein localization pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 1550 ~ 1566
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab024	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原圭吾、櫻祐太郎、伊藤維昭、千葉志信
2. 発表標題 翻訳アレストの解除を指標とした新生鎖の動的過程の系統的調査
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原圭吾、櫻祐太郎、伊藤維昭、千葉志信
2. 発表標題 アレストペプチドをフォースセンサーとして利用した新生鎖の動的挙動の網羅的調査
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 藤原圭吾、櫻祐太郎、伊藤維昭、千葉志信
2. 発表標題 アレストペプチドによる新生鎖の動態過程の系統的調査
3. 学会等名 令和元年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原圭吾、櫻祐太郎、伊藤維昭、千葉志信
2. 発表標題 Mi fMおよびSecMの翻訳アレストの解除を指標とした新生鎖の動的過程の系統的調査
3. 学会等名 第16回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------