

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06053

研究課題名(和文)非チャネル型タンパク質膜組込装置YidCの分子機構

研究課題名(英文)Study of non-channel type membrane protein insertase, YidC

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：YidCは、Sec複合体と異なり、チャネル(孔)を持たないタンパク質膜組込装置である。チャネルを持たないYidCが膜タンパク質を膜に挿入する分子機構についてはまだ十分理解されていない。本研究では、まだあまり解明が進んでいないYidCの細胞質領域の変異解析、YidCの阻害剤の探索、枯草菌YidCホモログであるSpoIIIJの新規基質の同定と解析をそれぞれ行った。その結果、YidCの細胞質領域の塩基性残基の重要性が示された。また、YidCの阻害効果を持つことが示唆された低分子化合物を複数同定することができた。また、枯草菌SpoIIIJの新規基質として、8種類の膜タンパク質を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

YidCの細胞質領域は、基質やリボソームと相互作用することで新規に合成されたタンパク質がYidCに受け渡される過程に関与することが予想される。そのため、この領域の塩基性残基の重要性を明らかにした本研究成果は、YidC依存的な膜挿入の初期過程を理解するうえで重要な知見となると思われる。YidCの阻害剤の同定は、タンパク質局在化経路の研究ツールとして有用であり、また、抗菌剤開発へと繋がる可能性がある。YidCの新規基質の同定は、YidC依存的な膜挿入の生理的な意義の理解や、分子機構のさらなる理解を促すものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Unlike the Sec complex, YidC is a membrane protein insertase that does not possess a transmembrane channel (pore). The molecular mechanism by which YidC, which lacks a channel, inserts membrane proteins into the membrane is not yet fully understood. In this study, we performed mutational analysis of the cytoplasmic region of YidC, which is not well elucidated, explored inhibitors of YidC, and tried to identify and analyze novel substrates of SpoIIIJ, a YidC homolog in *Bacillus subtilis*. As a result, the importance of basic residues in the cytoplasmic region of YidC was demonstrated. Additionally, we were able to identify several small molecules with inhibitory effects on YidC. Furthermore, we identified eight membrane proteins as novel substrates of *Bacillus subtilis* SpoIIIJ.

研究分野：分子生物学

キーワード：タンパク質局在化 膜タンパク質 YidC

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質の生合成は細胞の生育に必須である。真正細菌の細胞質膜には、SecYEG 複合体と YidC の 2 種類のタンパク質膜組込装置が存在する。これらはいずれも細菌からヒトまで保存されている。SecYEG 複合体は、脂質二重層を貫通する孔 (チャネル) を介してタンパク質の膜透過、膜組込を行う。一方、YidC は、チャネル構造を持たない、いわば「非チャネル型」膜組込装置であることが、最近明らかとなった。真核生物の小胞体で最近見出され、膜タンパク質の生合成に関与することが示唆されている EMC3 や Get1 複合体なども、非チャネル型膜組込装置であることが示唆されており、非チャネル型タンパク質膜組込装置が生物種を超えて普遍的に存在することも示唆されていた。そのため、YidC のような非チャネル型膜組込装置の詳細な解析が、細胞の基本的な機能のひとつである膜タンパク質の生合成を理解する上で重要であると考えられた。

YidC は、細胞質側に口を広げた「溝」を膜内に形成しており、さらに、この溝は、脂質二重層という疎水的環境下にあるにもかかわらず、その内部が、親水性残基に富んでいた。一方、YidC の細胞質側には、膜に平行に走る特徴的な 2 本の α -ヘリックス構造 (平行ヘリックス) が存在した (図 1)。我々の遺伝学、生化学的解析から、YidC の溝は、水分子がアクセスできるような親水的な局所環境を形成しており、溝内の親水性や塩基性残基がタンパク質膜組込に重要であることが示唆されていた。一方、細胞質側の平行ヘリックスについても、その欠失変異が活性を喪失したことから、機能的に重要であることが示唆されたが、その具体的な役割は不明であった。

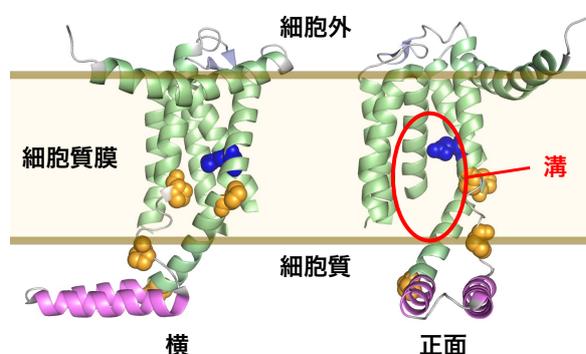


図 1 : YidC の構造の模式図。

2. 研究の目的

上記のような背景を受け、本研究では、以下の (あ) から (う) の目標を設定した。

- (あ) 構造情報に基づいた変異解析から、YidC の細胞質領域の役割を解明する。
- (い) 研究ツールとしても、抗菌薬としても有用であることが期待される YidC 阻害剤 (YidC の活性を阻害する低分子化合物) を同定する。
- (う) 新規 YidC 基質を同定し、その変異解析から、YidC-基質間相互作用を解明する。

これらの解析を通じて、非チャネル型膜組込装置の分子機構を解明することが本研究の目的であった。

3. 研究の方法

(あ) YidC の細胞質領域の解析

YidC の細胞質にある、 α -ヘリックス構造を含む領域 (細胞質ヘリックス領域) は、塩基性残基に富む。YidC の溝内部にも塩基性残基があり、重要な役割を果たしていたことから、細胞質ヘリックス領域の塩基性残基もタンパク質の膜挿入に重要な役割を果たしていると仮定し、その仮説を、変異解析を用いて検討した。枯草菌は、YidC ホモログとして、SpoIIIJ と YidC2 を持つ。YidC2 は、SpoIIIJ の活性低下に呼応して発現が誘導される。yidC2 遺伝子を lacZ に置き換えたレポーター (yidC2'-lacZ) を持つ株は、SpoIIIJ の活性低下に呼応して LacZ 活性を上昇させる。これを用いると、SpoIIIJ 変異の膜挿入活性に対する効果を検証できる。SpoIIIJ の細胞質領域の塩基性残基や酸性残基の数や位置を変えた各種変異体を、このレポーター株に導入し、LacZ 活性を測定することで、SpoIIIJ 変異体の膜挿入活性を評価した。

(い) YidC 阻害剤の探索

yidC2'-lacZ 株をレポーターとし、LacZ 活性を上昇させる低分子化合物を、化合物ライブラリから探索した。

(う) 新規 YidC 基質の同定

yidC2'-lacZ レポーターの上流には、YidC の基質として知られる MifM がコードされている。枯草菌は、*yidC2* の上流にコードされた MifM が膜挿入されたか否かをモニターし、*yidC2* の発現を調節している。この MifM の膜貫通領域を、他の枯草菌膜タンパク質の膜貫通領域の置き換えた各種変異体を作成し、その下流の *yidC2'-lacZ* に由来する LacZ 活性を測定すると、対象とする膜タンパク質の膜挿入に呼応したかたちで LacZ 活性が変動する。膜挿入が阻害されると、LacZ 活性が上昇するため、例えば、対象とする膜タンパク質が SpoIIIJ の基質であれば、*spoIIIJ* 遺伝子の欠失株で、膜挿入が損なわれ、*yidC2'-lacZ* に由来する LacZ 活性が上昇するはずである。この原理を利用し、枯草菌膜タンパク質から、新規 YidC 基質の同定を試みた。

4. 研究成果

(あ) YidC の細胞質領域の解析

枯草菌 SpoIIIJ の細胞質ヘリックス領域の塩基性残基に変異を導入することでその数を減少させると、SpoIIIJ が活性を低下させることが示唆された。また、各種変異解析から、SpoIIIJ の細胞質ヘリックス領域の特定の塩基性残基が重要なのではなく、複数の塩基性残基が存在することが重要であることも示唆された。同様の結果は、枯草菌 SpoIIIJ のみならず、*Bacillus halodurans* の YidC2 についても観察された。以上のことから YidC の細胞質ヘリックス領域が複数の塩基性残基を持つことが、その機能に重要であることが示唆された。

(い) YidC 阻害剤の探索

各種低分子化合物で処理した枯草菌 *yidC2'-lacZ* レポーター株について、LacZ 活性を測定し、この株の LacZ 活性を上昇させる低分子化合物をスクリーニングした。それらについて、濃度依存性やタンパク質局在化経路依存性など、更に詳細な検討を重ねた。その結果、最終的に、10 種ほどの低分子化合物を、YidC 活性を阻害するものとして同定した。

(う) 新規 YidC 基質の同定

yidC2'-lacZ レポーター遺伝子の上流にコードされた MifM の膜貫通領域を、枯草菌膜タンパク質由来の膜貫通領域に置き換えた各種キメラレポーターを作成した。具体的には、N 末端に 1 回膜貫通領域を持つ膜タンパク (1TM) 44 種類と、2 回膜貫通領域を持つ膜タンパク質 (2TM) 72 種類について、それぞれキメラレポーターを作成した (図 2)。それらのキメラレポーターを持つ株について、*spoIIIJ* 欠失による LacZ 活性の上昇の有無を検証した。その結果、1TM のカテゴリーから 4 種類、2TM のカテゴリーから 4 種類の、合計 8 種類の膜タンパク質が、上記のスクリーニングから SpoIIIJ の基質の候補として同定された (図 3)。これらはいずれも、SpoIIIJ の溝の内部にあるアルギニン残基の置換により、その膜挿入が損なわれた。このことから、SpoIIIJ の溝の塩基性の一般的な重要性が示唆された。一方、これら新規 YidC 基質の膜貫通領域やその周辺の酸性残基の重要性を検討したところ、基質側の酸性残基の重要性は、基質によって異なっていることも示唆された。以上のことから、YidC-基質相互作用を支える相互作用の多様性が示唆された。

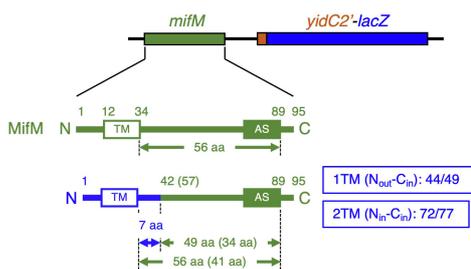


図 2 : キメラレポーター遺伝子の構築

MifM の N 末端膜貫通領域を、枯草菌膜タンパク質由来の各種膜タンパク質の N 末端膜貫通領域に置き換えたキメラレポーターを構築した。下流にある *yidC2'-lacZ* レポーター遺伝子由来の LacZ 活性を測定することで、上流にコードされた膜タンパク質の膜挿入効率を評価することが出来る。

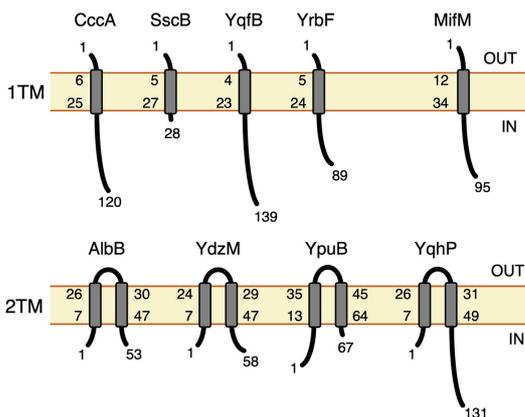


図 3 : 枯草菌 YidC の新規基質

キメラレポーターを用いた解析から、以前同定されていた MifM に加え、新たに 8 種類の新規 YidC 基質が同定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chiba Shinobu, Fujiwara Keigo, Chadani Yuhei, Taguchi Hideki	4. 巻 173
2. 論文標題 Nascent chain-mediated translation regulation in bacteria: translation arrest and intrinsic ribosome destabilization	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 227 ~ 236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad007	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 Shiota Narumi, Shimokawa-Chiba Naomi, Fujiwara Keigo, Chiba Shinobu	4. 巻 435
2. 論文標題 Identification of Bacillus subtilis YidC Substrates Using a MifM-instructed Translation Arrest-based Reporter	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 168172 ~ 168172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2023.168172	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 Morici Martino, Gabrielli Sara, Fujiwara Keigo, Paternoga Helge, Beckert Bertrand, Bock Lars V., Chiba Shinobu, Wilson Daniel N.	4. 巻 15
2. 論文標題 RAPP-containing arrest peptides induce translational stalling by short circuiting the ribosomal peptidyltransferase activity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-024-46761-3	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 Gersteuer Felix, Morici Martino, Gabrielli Sara, Fujiwara Keigo, Safdari Haaris A., Paternoga Helge, Bock Lars V., Chiba Shinobu, Wilson Daniel N.	4. 巻 15
2. 論文標題 The SecM arrest peptide traps a pre-peptide bond formation state of the ribosome	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-024-46762-2	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

〔学会発表〕 計36件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構
3. 学会等名 第4回マルチファセットプロテインズ領域会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原圭吾、辻奈緒子、吉田真悠、千葉志信
2. 発表標題 新規翻訳アレスト因子のバクテリアワイドな探索
3. 学会等名 第19回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻奈緒子、藤原圭吾、千葉志信
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第19回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田真悠、藤原圭吾、高田啓、千葉志信
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第19回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 翻訳アレストを利用した細胞の機能制御の分子機構
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原圭吾、辻奈緒子、吉田真悠、千葉志信
2. 発表標題 Bacteria-wide search for translational arrest peptides
3. 学会等名 第24回日本RNA学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tsuji Naoko, Fujiwara Keigo, Takada Hiraku, Chiba Shinobu
2. 発表標題 Identification of Novel Translation Arrest Peptides with RAPP and RGPP sequence Motifs
3. 学会等名 第24回日本RNA学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原圭吾、辻奈緒子、吉田真悠、千葉志信
2. 発表標題 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
3. 学会等名 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
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田真悠、藤原圭吾、高田啓、千葉志信
2. 発表標題 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
3. 学会等名 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
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信
2. 発表標題 配列モチーフの探索による新規アレスト因子の同定
3. 学会等名 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
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構
3. 学会等名 第5回マルチファセットプロテインズ領域会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信
2. 発表標題 RAPP様配列を含む新規翻訳アレスト因子の同定
3. 学会等名 第96会日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinobu Chiba
2. 発表標題 Regulated translation arrest: a regulation mechanism of genes for bacterial protein localization machinery
3. 学会等名 BACELL2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 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
3. 学会等名 新資源生物変換研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 翻訳アレストを介した細胞の機能制御
3. 学会等名 第2回タンパク質関連シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信
2. 発表標題 海洋性バクテリア <i>Alteromonas macreodii</i> の多様な翻訳アレスト因子
3. 学会等名 第18回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 千葉志信、吉田真悠、辻奈緒子、藤原圭吾
2. 発表標題 タンパク質局在化装置に関連した翻訳アレスト因子の探索と解析
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信
2. 発表標題 放線菌由来の新規アレスト因子の探索と解析
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原圭吾、千葉志信
2. 発表標題 TnDR 法による新生鎖の動的挙動のプロテオームワイドな検出
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉志信、崎山歌恋、吉田真悠、下川-千葉直美、藤原圭吾
2. 発表標題 タンパク質局在化装置と翻訳アレスト因子の進化的な繋がり
3. 学会等名 第18回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原圭吾、赤岡大暉、千葉志信
2. 発表標題 TnDR-seq による新生鎖の動的挙動の網羅的検出
3. 学会等名 第18回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田啓、藤原圭吾、Gemma C. Atkinson、Vasili Haurlyliuk、千葉 志信
2. 発表標題 微生物における新規翻訳品質管理機構 RQC の分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第18回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤岡大暉、高田啓、藤原圭吾、千葉志信
2. 発表標題 枯草菌における翻訳途上鎖依存的な翻訳終了現象の解析
3. 学会等名 第18回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信
2. 発表標題 放線菌の新規翻訳アレスト因子の探索と解析
3. 学会等名 第18回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 真正細菌の翻訳アレスト因子の網羅的探索
3. 学会等名 第15回 小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原圭吾、千葉志信
2. 発表標題 モデル細菌における新生鎖ダイナミクスの網羅的検出
3. 学会等名 第15回 小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信
2. 発表標題 放線菌由来の翻訳アレスト因子の探索と in vitro での解析
3. 学会等名 2022年度グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤岡大暉、高田啓、藤原圭吾、千葉志信
2. 発表標題 枯草菌における新生鎖依存的な翻訳終了現象
3. 学会等名 2022年度グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原圭吾、千葉志信
2. 発表標題 TnDR-seq による新生鎖挙動の検出
3. 学会等名 2022年度グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原圭吾、千葉志信
2. 発表標題 TnDR-seq による新生鎖挙動の網羅的検出
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田啓、藤原圭吾、千葉 志信
2. 発表標題 微生物翻訳研究のこれから
3. 学会等名 第1回マルチファセットプロテインズ・若手ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原圭吾、千葉志信
2. 発表標題 真正細菌における翻訳アレストの解析と応用
3. 学会等名 第1回マルチファセットプロテインズ・若手ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構
3. 学会等名 第3回マルチファセットプロテインズ領域会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原圭吾、千葉志信
2. 発表標題 TnDR-seqによる新生鎖挙動の検出
3. 学会等名 第3回マルチファセットプロテインズ領域会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 非チャネル型タンパク質膜挿入装置YidCの解析
3. 学会等名 サントリー生命科学財団セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 千葉志信
2. 発表標題 タンパク質局在化装置に関連した翻訳アレスト因子の多様性と共通性
3. 学会等名 2021年度遺伝研研究会（招待講演）
4. 発表年 2022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>

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			
ドイツ	ハンブルク大学			