

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770125

研究課題名（和文） 枯草菌蛋白質膜組込をモニターする翻訳途上鎖

研究課題名（英文） Nascent polypeptide chain that monitors membrane protein biogenesis in *Bacillus subtilis*.

研究代表者

千葉 志信（CHIBA SHINOBU）

京都産業大学・総合生命科学部・助教

研究者番号：20523517

研究成果の概要（和文）：枯草菌リボソームが駆動する *in vitro* 精製再構成翻訳系を構築した。その系を用い、枯草菌 MifM の翻訳アレストを *in vitro* で再現した。他の種のリボソームやアレスト因子などを用いた解析と合わせ、リボソームと翻訳途上鎖の相互作用が生物種間で多様性であることを示した。一方、MifM の翻訳アレスト解除の経路特異性が低い（アレストモチーフが部分的である）ことを示した。

研究成果の概要（英文）：We constructed an *in vitro* translation system composed of each purified translation component and *Bacillus subtilis* ribosome. This system allowed us to reproduce elongation arrest of *B. subtilis* MifM *in vitro*. We also demonstrated that interactions between the ribosome and nascent polypeptide could be species-specific. We showed modularity of translation elongation arrest motif of MifM.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：翻訳アレスト 膜蛋白質分解 リボソーム 蛋白質膜組込

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質の合成中間体である翻訳途上鎖は機能を持たないものと見なされてきたために、翻訳途上鎖の生理機能に着目した研究は全くといってよいほど行われてこなかった。近年、本研究代表者らの研究グループは、翻訳途上の状態で機能する因子を複数（SecM

及び MifM) 同定し、それらの因子が、それぞれ蛋白質の分泌や膜組込の活性をモニターしていることを見いだしていた。このことにより、翻訳途上鎖が主役となるような、全く新しい遺伝子発現制御機構が存在することを示した。

このような因子が複数見いだされたこと

で、この現象が生物界で普遍的なものであるという可能性が示唆されるとともに、アレスト配列やアレスト機構の多様性や、類似の機構を用いた未知の細胞機能制御機構が他にも多く存在する可能性が示唆された。しかしながら、翻訳アレスト機構の多様性や普遍性、システムの経路及び種間での互換性などはほとんど解析されていない状態にあった。

## 2. 研究の目的

枯草菌 MifM を中心に、翻訳アレスト及びその解除機構の解明を目的とし、また、それらの知見から、翻訳アレスト機構の共通性、多様性等を理解し、翻訳アレストを用いた細胞機能の制御機構の全体像を理解する手がかりを得ることを目指した。

## 3. 研究の方法

大腸菌の翻訳因子及びリボソームなどを精製し、再構成することで構築された *in vitro* 転写翻訳カップリング系 (PURE system) を改変し、枯草菌リボソームにより駆動される *in vitro* 翻訳系 (Bs PURE system) を構築した。その系を用いて、*in vitro* における MifM の翻訳アレストの再現を試みた。また、その系を利用し、各種生化学アッセイを行うことで、翻訳途上でアレストとした MifM の生化学的性質を解析した。具体的には、中性条件下で電気泳動を行うことで、ポリペプチジル-tRNA のポリペプチド鎖と tRNA 間のエステル結合を保持させたまま解析する NuPAGE 電気泳動システムを用い、Western blotting や Northern blotting 等で、*in vitro* 翻訳産物を解析した。一方、枯草菌細胞に MifM のキメラ体等を発現させ、MifM の翻訳アレスト状態に呼応して発現のスイッチを切り替えるレポーター遺伝子 (yidC2-lacZ) を指標に用いることにより、細胞内に於ける翻訳アレ

トやその解除機構の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 大腸菌の *in vitro* 精製再構成翻訳系 PURE system を改変し、枯草菌リボソームで駆動される *in vitro* の精製再構成系からなる転写翻訳カップリング系 (Bs PURE system) を構築した。

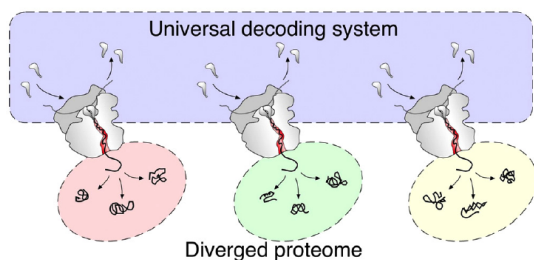
(2) Bs PURE system を用いて、MifM の翻訳アレストを *in vitro* で再現した。この結果及び、過去の遺伝学的解析などから、MifM の翻訳アレストが、翻訳必須因子との直接的相互作用のみで引き起こされ、細胞質に存在する補助因子の助けを必要としないことを示した。特に、リボソームのポリペプチド鎖排出内でのリボソーム成分と翻訳途上鎖との相互作用が重要であるというモデルを支持する結果となった。

(3) 枯草菌 MifM および、大腸菌 SecM の翻訳アレストは、全ての細菌種のリボソームで駆動されるわけではなく、それぞれの因子が由来するリボソームとより強く相互作用し、翻訳アレストを引き起こすことが出来ること、すなわち、翻訳アレスト配列の種特異性が存在することを示した。

(4) MifM アレストモチーフの経路特異性は低く、センサーモチーフとの組み合わせによって、蛋白質膜組込経路のみならず、蛋白質分泌経路をモニターすることも出来ることを示した。このことは、MifM の翻訳アレストモチーフが部品性を有しており、センサーモチーフとの組み合わせがアレスト因子の細胞

内での機能を決定することを示している。

翻訳アレストを起こすアミノ酸配列の中には種特異性を持つものがあることを示した今回の結果は、リボソームのポリペプチド鎖排出トンネルが進化の過程で多様化し、それに伴い、トンネルと翻訳途上鎖の相互作用の多様化が進行したことを示唆している。リボソームが極めてユニバーサルな翻訳装置であることを考えると、今回見出された多様性は、リボソームの持つもう一つの側面にスポットライトを当てる興味深い知見かも知れない（下図）。また、細胞が翻訳アレストを用いた遺伝子発現調節機構を獲得する上で、翻訳アレスト配列そのものではなく分子内のモチーフの組み合わせが、細胞内のどの機能をモニターするのかを決定するのに重要であることを示す今回の結果は、このようなセンサーの分子デザイン上の柔軟性を示しており、生物界に多様なアレストセンサーを比較的容易に生み出すことを可能にする性質として興味深い。



##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

①伊藤維昭、茶谷悠平、中森健太、千葉志信、秋山芳展、阿保達彦、Nascentome analysis uncovers futile protein synthesis in

*Escherichia coli*, PLoS ONE、査読有り、6、2011、e28413、

DOI: 10.1371/journal.pone.0028413

②斎藤啓、檜作洋平、松尾英一、千葉志信、森博之、西村紀、伊藤維昭、秋山芳展、Post-liberation cleavage of signal peptides is catalyzed by the site-2 protease (S2P) in bacteria, Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、査読有り、108、2011、13740-13745、

DOI: 10.1073/pnas.1108376108

③千葉志信、金森崇、上田卓也、秋山芳展、Kit Pogliano、伊藤 維昭、Recruitment of a species-specific translational arrest module to monitor different cellular processes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、査読有り、108、2011、6073-6078、

DOI: 10.1073/pnas.1018343108

④ White, R.、千葉志信、Pang, T.、Dewey, J. S.、Savva, C. G.、Holzenburg, A.、Pogliano, K. and Young, R. (2011) Holin triggering in real time. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、査読有り、108、798-803、

DOI: 10.1073/pnas.1011921108

[学会発表] (計7件)

①千葉志信、翻訳途上鎖 MifM によるタンパク質膜組込のモニタリング、第1回 Ribosome Meeting、2012年3月15日、広島

②千葉志信、翻訳途上鎖のダイナミズムによる翻訳伸長の制御とそれを利用した蛋白質局在化モニタリング機構、第37回生体エネルギー研究会、2011年12月21日、京都

③千葉志信、In vitro study of translation arrest of MifM, a regulatory nascent chain

that monitors membrane protein biogenesis in *Bacillus subtilis*、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日、横浜

④ 千葉志信、Modularity and species-specificity of translation arrest motifs in translocation monitor proteins、Cold Spring Harbor Asia Conference、2011 年 9 月 28 日、蘇州（中国）

⑤ 千葉志信、タンパク質膜組込をモニターする枯草菌翻訳アレスト因子 MifM の *in vitro* 解析、グラム陽性菌ゲノム機能会議、2011 年 8 月 26 日、福山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

千葉 志信 (CHIBA SHINOBU)  
京都産業大学・総合生命科学部・助教  
研究者番号：20523517

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし