

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名: タンパク質の細胞内ダイナミズムの原理と制御装置

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

伊藤 維昭 (大阪大学蛋白質研究所 招聘教授)

主たる共同研究者

木村 能章 (藍野大学医療保健学部 特任教授)(平成 14年11月 ~)

3. 研究内容及び成果

タンパク質が細胞の特定の場所に配置され細胞を形づくる際の、膜を越えた分泌輸送、膜組み込み、局在化、構造形成、分解過程などを司る細胞機構の実体解明を目的とし、モデル生物として種々の情報の集積している大腸菌を用い、遺伝学、生化学、構造生物学の手法を統合した研究を展開した。膜透過モーター蛋白質 SecA や膜透過チャネル(トランスロコン)SecYEG の構造・機能と制御、膜プロテアーゼによる膜蛋白質品質分解やシグナル伝達制御、ジスルフィド結合導入装置の反応機構と構造解析を行った。細胞におけるタンパク質の動的な振る舞いがいかに制御されているのかに関する総合的な知識を得ることを目的としたこのような研究により、以下に示すような具体的な成果を得た。

3-1. SecA の構造と機能。高度好熱菌 SecA の新たな2量体結晶構造を決定し、SecA は複数の2量体構造を取り得るが、機能するためには2量体の大幅な解離が必要であることを示した。SecA に存在する長いらせんが ATPase 機能の機械的な動への転換を媒介する役割をもつとの膜透過駆動分子機構を提唱した。部位特異的 in vivo クロスリンク実験により、SecA が二つの異なる様式で SecYEG に結合することを示し、そのうちの一つにおいて膜透過に伴って SecA が SecY の C 末端領域へ近接すること示した。

3-2. SecY トランスロコンの構造と機能。SecY や SecE の変異解析により、トランスロコン機能の制御や膜貫通ドメインの役割に関して情報を多数得た。SecY-SecG, SecY-SecE の近接部位を決定した。複数の SecYE トランスロコンが機能単位となることを示唆する遺伝学的証拠および蛍光エネルギー転移実験の結果を得た。分泌蛋白質と膜タンパク質は異なる様式で SecY トランスロコンを利用していること、および DsbA は他の分泌蛋白質とは異なり膜タンパク質と同様の経路でトランスロコンに標的化されることを示した。細胞表層ストレス応答機構は細胞質膜蛋白質の異常をも感知することを示した。SecY は膜タンパク質の膜挿入以降の構造形成過程においても重要な役割を有することを示した。高度好熱菌の SecYE 複合体をモノクローナル抗体との複合体として結晶化し、構造を決定した。これは、SecA によって駆動されるポリペプチド透過チャネルの構造の最初のものであり、モノクローナル抗体の細胞質側からの結合によって、機能状態に近い pre-open 型構造の存在をしめすものとなった。また、同一生物から SecDF 蛋白質も結晶化し構造決定を進めた。

3-3. SecM の機能。SecM は翻訳途上でリボソームトンネルと相互作用し翻訳伸長アレストを起こすこと、この性質が SecA の翻訳とその制御に必須であることを示した。さらに SecM は SecA 生合成の場を膜・トランスロコンの近傍に局在化することにより SecA の機能獲得を助けるとの Cis-chaperone 説を提唱した。SecM の翻訳アレスト機構を解析し、リボソーム A サイトにおいてフリーの prolyl-tRNA が翻訳伸長アレストに寄与することを発見した。

3-4. 膜プロテアーゼの研究。FtsH が膜蛋白質の両端から分解を開始しうることを示し、その基質 dislocation を伴う分解を精製・再構成した人工膜において再現することに成功した。また、FtsH が HflKC と巨大な複合体として存在することを示した。大腸菌には HflKC とは逆の配向をもつ prohibitin 類似の膜蛋白質が存在することを発見した。HtpX を精製し、膜タンパク質の細胞質領域を切断することを明らかにした。RseP が RseA の2段階目の切断を触媒することによって E 経路表層ストレス応答に必須の役割を果たすことを発見した。また RseP が広い特異性を持って膜蛋白質を切断する潜在能力をもつことを示し、その抑制に関わる要素を明らかにした。GlpG を精製し、切断基質となるモデル膜タンパク質の膜貫通部位とペリプラズム領域の境界付近を切断することを見いだした。RseP および GlpG の活性部位近傍に Cys 残基を導入しそれらの膜不透過性修飾試薬に対する反応性から、RseP の活性部位は膜内或いは膜表面付近でのタンパク質折り畳み構造の内部に存在すること、GlpG の活性部位は膜内であるがペリプラズムに連なる親水性の溝にあることを示した。

3-5. ジスルフィド結合形成装置の構造と機能。DsbB の酸化還元電位が DsbA より低いにも関わらず DsbA を酸化できることを、キノンを含まない系での実験を組み立てることにより示した。DsbB のシステイン残基の一つ Cys44 がキノンと電荷移動錯体、次いで付加生成物を過渡的に形成することによって、DsbB 分子内にジスルフィド結合が創生されることを、実験と理論を統合して示した。さらに DsbB-DsbA 複合体の結晶構造解析に世界で初めて成功し、DsbB におけるジスルフィド創生の構造基盤を明らかにすると同時に、DsbB がシステイン再配置機構によって、DsbA 酸化能力を獲得することを提唱した。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

平成19年10月現在で、43件の原著論文、37件の総説等、127件の口頭発表を行っている。特許出願はない。口頭発表の半数以上は国際学会におけるものであり、招待講演が内外合わせて78件に上る。原著論文はどれも一流の国際学術雑誌に発表されたものである。この中には、DsbBの結晶構造を初めて報告しジスルフィド結合形成システムの作動原理の全貌を解明することになったCell誌(2006)の論文、分泌モニタータンパク質SecMのリボソームへの作用機構を解明したMolecular Cell誌(2006)の論文、SecMのもつ新たなシスシャペロン機能を記載したGenes and Development誌(2005)、細胞内におけるSecA-SecY相互作用を解析したProceedings of National Academy of Science誌(2006)の論文、膜内切断型プロテアーゼRsePの作用機構を解析したEMBO Journal誌(2004)の論文など特筆すべきものが多く含まれている。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究は、タンパク質の細胞におけるダイナミズムを総合的に理解に大きく貢献した。申請者等は、大腸菌のSecYを発見し、その構造と機能、SecAとの相互作用に関して一貫した研究を行ってきた。また、FtsHプロテアーゼやジスルフィド結合導入に働くDsbシステムなど独自の系を用いて膜におけるタンパク質の動態研究にあたり、遺伝学、生化学、構造生物学の手法を組み合わせた研究を有効に行った。特に、遺伝学・生化学的研究の成果・知識を構造生物学的研究と融合させることによって、各因子の構造をダイナミズムの各局面に対応して解き明かす目的を高度に達成した。本研究が対象としたタンパク質は疎水性の強い膜タンパク質が多く、結晶構造解析等が極めて困難であったが、研究期間内に、SecA、DsbBの構造決定を発表した。SecYEの構造決定も達成し、SecDFの構造解析に関しても著しい進展をみせた。これらの成果により、構造に基づくメカニズムの解明と生理機能のより深い理解が可能となったことは特筆すべき成果と言える。

同一生物(高度好熱菌)からのSec膜透過装置の構造決定に成功しているのは、本研究グループのみである。また、DsbB-DsbAの研究において、細胞に於けるジスルフィド結合創生の化学機構とその構造的基盤の全貌を明らかにしたことは高く評価される。また、SecMの研究では、リボソームトンネルと相互作用するタンパク質とそれを用いたタンパク質機能発現の新たな制御機構を世界に先駆けて解明し、翻訳制御における新たなパラダイムを形成することに成功した。また、膜内切断型のプロテアーゼの分子機構解明においても学界をリードする成果を挙げている。いずれも大腸菌を用いることによって、精緻な情報を得ているが、それぞれが高等生物における相当する過程の理解にも貢献する普遍的な価値を持つものである点は特筆に値する。本研究の成果は、細胞内に於けるタンパク質の動的な存在様式を支える機構を解明した点にあり、今後工学的・医学的応用などを支えるものとして活用されていくものとなるであろう。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

本研究は遺伝学、生化学の方面からタンパク質の細胞内動態に迫る研究グループを主体としたものであったが、高度好熱菌の実験系を立ち上げ、構造生物学者との緊密な共同研究を積極的に進めた結果、1)SecAの新規2量体構造の決定に成功、2)SecYEの立体構造解析を完了、3)膜透過補助因子SecDFの構造解析も完了間近まで到達するなど、次々と着実かつ世界的に見ても有数の成果を収めてきた。膜透過反応に関わる主要な因子の立体構造決定を、同一生物種(高度好熱菌)由来の因子に統一して、網羅的に成功しているのはこのグループだけである。構造解析の材料として高度好熱菌を選定した事が成功に繋がり、この種の装置の動的な構造の解明が達成され見通しがつけられたと言える。また、ジスルフィド結合形成装置の構造解析は、有能な研究者を投入して生化学解析から地道に積み上げたことと研究室全体の膜タンパク質に関するノウハウがしっかりしていたために、専門家との共同研究が有効に進み可能となったものである。日本国内で遂行する比較的小規模なCREST・さがけ研究によるサイエンスが世界と対等以上に戦えることを示す一例になったと言える。上記の研究者である稲葉謙次博士は九州大学特認准教授として独立グループを形成している。また、本研究開始時点では、膜プロテアーゼの研究として品質管理プロテアーゼが主であったが、全生物において新たな制御機構として注目されている膜内切断型のプロテアーゼ研究をいち早く取り上げ、構造決定(2006末-2007年末)こそ外国が先行したが、それと相補的な分子解析をタイムリーに行った。プロテアーゼ研究担当の秋山芳展博士は京都大学教授に就任した。