

「生命活動のプログラム」
平成9年度採択研究代表者

伊藤 維昭

(京都大学ウイルス研究所 教授)

「タンパク質の膜を越えたダイナミズムを支える細胞機能の解明」

1. 研究実施の概要

ゲノムから細胞が構築される時、遺伝子に書き込まれた情報に基づいて合成されたタンパク質が細胞内の特定の場所に配置される必要がある。そのためには、タンパク質のかなりのものは、遺伝情報翻訳の場である細胞質から膜を越えて輸送されたり、あるいは膜に組み込まなければならない。タンパク質の膜を越えた分泌、局在化ならびに構造形成は、細胞の機能分化を司る反応であり、多数の因子の関与のもとに成し遂げられ、制御される。輸送や局在化反応に中心的役割を果たしている因子は、膜内で大きな構造変化をし、あるいは膜間を移動する。これら因子のダイナミックな構造変化・動きの実体を解明し、分子的基盤を明らかにするため研究を進めている。分子レベルと細胞レベルを統合した精密な研究が可能な大腸菌を用いて、膜においてタンパク質の膜透過を媒介するチャネル因子 SecYEG 複合体および輸送を駆動する ATPase である SecA などの構造と機能の研究を核として研究している。加えて、膜タンパク質の分解制御にかかわる FtsH 複合体、分泌タンパク質のジスルフィド結合形成装置、リポタンパク質の外膜への局在化装置、などの研究と組み合わせ、総合的な理解を目指している。

2. 研究実施内容

膜透過装置の解析：SecA の膜への挿入と離脱反応が SecY 機能に依存して起こり、大腸菌の分泌タンパク質膜透過を駆動していることを、SecA の挿入を許さない SecY 変異体と、それに打ち勝つ SecA 変異体を用いた実験によって示した。また、SecG は自ら膜内で配向性の反転を繰り返し、SecA の動きを促進していることを SecA 変異体や SecG 遺伝子破壊株などを用いて示した。ATP 濃度が低いときに特に SecG が必須となることから、SecG は SecA の効率よい膜透過駆動を可能にしていることが示唆された。SecG にシステイン残基を導入した変異株を用い、膜透過装置は少なくとも2分子の SecG を含んでいることを明らかにした。分泌タンパク質の膜を超えた輸送は、プロトン駆動力によっても促進されるが、プロトン駆動

力が ATP の加水分解に依存しないで SecA サイクルを促進する働きを持っていることを明らかにした。SecY と相互作用するタンパク質 Syd が SecY-SecE 相互作用が弱まった SecY24 変異株に毒性を発揮するが、これに SecY の残基 249 が関わること、残基 240 の変異により SecE との相互作用が変化することを示し、in vitro で Syd は SecY24 に作用して SecY24EG の高親和性 SecA 結合部位を破壊することを示した。

膜タンパク質分解系の解析：膜結合型 ATP 依存プロテアーゼである FtsH は膜タンパク質基質と可溶性基質を異なる経路で分解すること、その制御に HflKC が FtsH のペリプラズム領域と相互作用することによって関与する事を示した。また、FtsH には分解を伴わない変性タンパク質結合活性が存在することを示した。そして、FtsH は膜タンパク質の膜貫通部位やペリプラズム部位を含む全域を processive に分解することから、膜タンパク質を膜から引きずり出す dislocation 過程の存在を提唱した。

ジスルフィド結合形成装置の解析：大腸菌のペリプラズムにおけるタンパク質のジスルフィド結合形成は、DsbA によって触媒される。DsbA は膜タンパク質 DsbB によって再酸化される。この系において、DsbB の N 末端側ペリプラズム領域にある CXXC モチーフは呼吸鎖を介して酸素によって強く酸化されていることを発見し、タンパク質のフォールディング反応が、細胞の基本的エネルギー代謝に連結していることを示した。

リポタンパク質の選別装置の解析：リポタンパク質の外膜局在化には LolA, LolB 等の因子が必要である。リポタンパク質が選別シグナルに依存して、LolA と複合体を形成し、細胞質膜から遊離する反応を in vitro で調べ、ATP 加水分解が必要であることをみいだした。さらにこの反応に必要な因子の探求を再構成実験によって行い、細胞質膜に存在する新 ATPase である LolCDE 複合体が関与することを明らかにした。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- Matsumoto, G., Mori, H. and Ito, K. (1998) Roles of SecG in ATP- and SecA-dependent protein translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13567-13572
- Matsuo, E. and Ito, K. (1998) Genetic analysis of an essential cytoplasmic domain of *Escherichia coli* SecY based on resistance to Syd, a SecY-interacting protein. Mol. Gen. Genet. 258, 240-249
- Matsuo, E., Mori, H., Shimoike, T. and Ito, K. (1998) Syd, a SecY-interacting protein, excludes SecA from the SecYE complex with an altered SecY24 subunit. J. Biol. Chem. 273, 18835-18840
- Kihara, A. and Ito, K. (1998) Translocation, folding and stability of the HflKC

- complex with signal-anchor topogenic sequences. *J. Biol. Chem.*, 273, 29770-29775.
- Akiyama, Y., and Ito, K. (1998) FtsH. pp. 1502-1504., *Handbook of Proteolytic Enzymes* (ed. Barrett, A. D., Rawlings, and N. D., Woessner, J. F., Jr.). Academic Press
- Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (1998) Different pathways for protein degradation by the FtsH/HflKC membrane-embedded protease complex: an implication from the interference by a mutant form of a new substrate protein, YccA. *J. Mol. Biol.* 279, 175-188
- Akiyama, Y., Ehrmann, M., Kihara, A. and Ito, K. (1998) Polypeptide-binding of *E. coli* FtsH. *Mol. Microbiol.* 28, 803-812.
- Akiyama, Y., Kihara, A., Mori, H., Ogura, T. and Ito, K. (1998) Roles of the periplasmic domain of *Escherichia coli* FtsH (HflB) in protein interactions and activity modulation. *J. Biol. Chem.*, 273, 22326-22333.
- Ukai, H., Matsuzawa, H., Ito, K., Yamada, M. and Nishimura, A. (1998) *ftsE*(Ts) affects translocation of K⁺-pump proteins into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 3663-3670.
- Ito, K., Matsuo, E. and Akiyama, Y. (1999) A class of integral membrane proteins will be overlooked by the "proteome" study that is based on two-dimensional gel electrophoresis. *Mol. Microbiol.* 31, 1600-1601
- Kobayashi, T. and Ito, K. (1999) Respiratory chain strongly oxidizes the CXXC motif of DsbB in the *Escherichia coli* disulfide-bond formation pathway. *EMBO J.* 18, 1192-1198
- Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (1999) Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. *EMBO J.* 18, 2970-2981

他6件