

「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:分泌蛋白質の膜を越えた輸送反応は、SecAの膜への挿入と脱離サイクル(SecAサイクル)を直接の駆動力として、膜内在性蛋白質複合体SecYEGを介して起こる。平成12年度の研究によりSecAの機能発現にはSecYのC末端近くの第5、第6細胞質領域が特に重要であることを明らかにした。中でも細胞質領域5にあるArg357残基が特に重要であり、生物種間で保存されていることを詳細な変異解析によって示した。また、SecAによるATP加水分解は、高親和性ヌクレオチド結合部位によって触媒され、SecYEGによって活性化を受けていないときのそのATPase活性はC末端ドメインおよびN末端ATPaseドメイン内部の低親和性ヌクレオチド結合領域の働きによって2重に抑制されていることを発見した。SecGの膜内での構造変化を、Cys残基を導入した変異体を利用し、膜非透過性SH基修飾剤によって検出する実験系を構築した。SecGの構造変化を阻害した変異体は、SecAサ

イクルの中間体と考えられる、膜挿入したSecAを蓄積させることを見いだした。中間体を蓄積した反転膜小胞では、SecAを添加しても膜透過反応が促進されない。SecAサイクルのどのステップが、SecGの構造変化によって促進されるかを明らかにする手がかりが得られた。また、分泌モニター蛋白質SecMによるSecAの新しい遺伝子発現制御機構を見いだした。染色体上でsecAの上流に位置するsecMの遺伝子産物は自己翻訳伸長停止能を持つこと、その翻訳停止は合成途上SecM蛋白質自身の膜透過状態によって変化すること、このことによってsecAを翻訳レベルで制御していることが明らかとなった。

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が膜タンパク質基質を分解する反応に関して、分解開始には基質のN末端細胞質領域が20残基以上の長さを持つ必要があることを見いだした。また、FtsHがプロテアーゼ活性を発揮するには多量体化が必須であること、しかし可溶性の多量体は可溶性基質しか分解できず、膜蛋白質の分解には膜貫通領域(必ずしもFtsH本来のものでなくてもよい)を持つことが必須であることを明らかにした。

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モチーフは呼吸鎖成分(キノン)を介して酸素によって強く酸化されている。呼吸鎖による酸化に必須のDsbBの領域を同定し、CXXCモチーフの膜からの距離が重要であるとのモデルを提唱した。

リポタンパク質の選別装置の解析:リポ蛋白質の選別シグナルは、LoiCDEによって認識されることを明らかにした。また、LoiCDEのATPase活性に対するリポ蛋白質選別シグナルの影響を調べ、内膜局在化シグナルはLoiCDEによる認識を避けるシグナルであることを明らかにした。N末端Cys残基のアミノ基に結合しているアシル基は、LoiCDEによる認識に必須であることを明らかにした。リポ蛋白質特異的分子シャペロンLolAの結晶構造を解明し、リポ蛋白質との複合体形成機構の解明に大きく前進した。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

Matsumoto, G., Homma, T., Mori, H. and Ito, K(2000)Mutation in secY that causes enhanced SecA insertion and impaired late functions in protein translocation. J. Bacteriol., 182, 3377-3382

Matsumoto, G., Nakatogawa, H., Mori, H. and Ito, K(2000)Genetic dissection of SecA : suppressor mutations against the secY205 translocase defect. Genes Cells, 5, 991-1000

Nakatogawa, H., Mori, H., Matsumoto, G. and Ito, K(2000)Characterization of a

mutant form of SecA that alleviates a SecY defect at low temperature and shows a synthetic defect with the SecY alteration at high temperature. J. Biochem., 127, 1071-1079

Nakatogawa, H., Mori, H. and Ito, K(2000)Two independent mechanisms down-regulate the intrinsic SecA ATPase activity. J. Biol. Chem. 275, 33209-33212

Chiba, S., Akiyama, Y., Mori, H., Matsuo, E. and Ito, K(2000)Length recognition at the N-terminal tail for the initiation of FtsH-mediated proteolysis. EMBO Reports 1, 47-52.

Akiyama, Y. and Ito, K(2000)Roles of multimerization and membrane association in the proteolytic functions of FtsH(HflB) EMBO J. 19, 3888-3895

Tatsuta, T., Joo, D. M., Calendar, R., Akiyama, Y. and Ogura, T(2000)Evidence for an active role of the DnaK chaperone system in the degradation of σ^{32} . FEBS Lett. 478, 271-275

伊藤維昭 (2000)細胞質膜を舞台としたタンパク質の通過儀礼。タンパク質の一生 - タンパク質の誕生、成熟から死まで シリーズ「バイオサイエンスの新世紀」(中野明彦、遠藤斗志也 編、日本生化学会編集) pp. 75-91.

Yakushi, T., Masuda, K., Narita, S., Matsuyama, S., and Tokuda, H. : A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. Nature Cell Biology, 2, 212-218(2000)

Nagamori, S., Nishiyama, K., and Tokuda, H. : Two SecG molecules present in a single protein translocation machinery are functional even after crosslinking. J. Biochem. 128, 129-137(2000)

Nishiyama, K., Suzuki, H., and Tokuda H. : Role of the non-essential region encompassing the N-terminal two transmembrane stretches of Escherichia coli SecE. B. B. Biochem. 64, 2121-2127(2000)

薬師寿治、松山伸一、徳田 元 : グラム陰性細菌におけるリポ蛋白質の生合成機構 - リポ蛋白質の選別と外膜局在化機構を中心に - : 日本細菌学雑誌, 55, 517-526 (2000)

西山賢一 : 大腸菌における分泌タンパク質の膜透過分子機構 - 膜透過を駆動する SecA-SecGの構造変化 - 生化学, 72, 1383-1397(2000)