

「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 所長・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れなければならない。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 13 年度の研究により SecY の C 末端領域の必須領域を同定し、SecA の機能発現との関係を調べた。また、SecY の膜貫通領域の役割を調べ、必須機能を持つ膜貫通領域、無関係な配列に置き換え可能な膜貫通領域を同定した。SecY の Arg357 残基の重要性を明らかにした。また、SecYEG 複合体間の相互作用について、クロスリンク実験により、残基レベルの知見を得た。高度好熱菌の SecA および SecYE の精製に成功し、構造解析の準備を進めた。また、分泌モニター蛋白質 SecM にある配列がリボソームの内部で脱出トンネル成分と相互作用することを見いだした。SecDF/YajC を欠失させると、SecG レベルが野生株の約 50% に低下することを見いだした。SecDF/YajC と SecG 間には機能的相互作用があり、SecA サイクルの促進にはこれらの因子間の相互作用が重要と考えられる。蛋白質膜透過反応を促進する新因子は、分子シャペロン機能をもつ膜表在性の因子であることを示唆する結果を得た。

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、基質のN末端細胞質領域のみではなく、C末端領域から分解が開始し得ることを示した。FtsH の亜鉛配位に関わる新たなグルタミン酸残基を同定した。膜結合状態の SecY による蛋白質分解活性を測定する系を開発し、プロトン駆動力の効果などを調べた。新たな膜結合型プロテアーゼ YaeL が細胞生育に必須の役割を持つことを見だし、その膜におけるトポロジーを決定した。膜における異常蛋白質に応答するストレスレスポンスを発見し、プロテアーゼの関係に関して研究を開始した。

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。DsbB の活性部位に存在するシステイン残基の酸化還元ポテンシャルを測定し、変異による変化を調べた。その結果酸化還元ポテンシャル自体よりもキノン分子との共役が DsbB の反応性には重要であることを示した。

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、N末端 Cys 残基の脂質修飾に影響を持たないこと、+2位の Asp が内膜残留シグナルとして特異的に重要であること、Asp 以外であればアミノ酸以外の構造であっても外膜移行シグナルになることを明らかにした。LolA 変異体の機能解析から、LolA と LolCDE はリポ蛋白質遊離時に相互作用す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 と、外膜受容体 LolB の結晶構造を解明し、LolA には LolCDE から伝達された ATP のエネルギーを利用して開く蓋があること、この蓋の開閉がリポ蛋白質の結合と LolB への受け渡しに重要であることを明らかにした。一方、LolB のリポ蛋白質結合部位は常に開いた構造であるため、リポ蛋白質は LolA から LolB に受け渡されると考えられる。LolD ホモログ間で強く保存されているモチーフは、膜サブユニット(LolC/E)との相互作用に関与していることを明らかにした。これらの研究成果により、リポ蛋白質の選別と膜局在化機構が分子レベルで一層明らかになった。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 細胞機能グループ

研究担当グループ長:伊藤維昭(京都大学ウイルス研究所 教授)

研究項目:膜透過装置の解析

膜タンパク質分解系の解析

ジスルフィド結合形成装置の解析

#### (2) 分子機能グループ

研究分担グループ長名:徳田元(東京大学分子細胞生物学研究所・教授)

研究項目:膜透過装置の解析

リポタンパク質の選別装置の解析

#### 4. 研究成果の発表

##### (1) 論文発表

- Mori, H. and Ito, K. (2001) An essential amino acid residue in protein translocation channel revealed by targeted random mutagenesis of SecY. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 5128-5133
- Mori, H. and Ito, K. (2001) The Sec protein-translocation pathway. Trends Microbiol. 9, 494-500
- Akiyama, Y. and Ito, K. (2001) Roles of the homo-oligomerization and membrane association in the ATPase and the proteolytic activities of FtsH *in vitro*. Biochemistry 40, 7687-7693.
- Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (2001) Revisiting the lysogenization control of bacteriophage  $\lambda$ : Identification and characterization of a new host component, HflD. J. Biol. Chem. 276, 13695-13700
- Kanehara, K., Akiyama, Y. and Ito, K. (2001) Characterization of the *yaeL* gene product and its S2P-protease motifs in *Escherichia coli*. Gene, 281, 71-79
- Kobayashi, T., Takahashi, Y., and Ito, K. (2001) Identification of a segment of DsbB essential for its respiration-coupled oxidation. Mol. Microbiol. 39, 158-165
- Sugai, R., Shimizu, H., Nishiyama, K., and Tokuda, H., Overexpression of *yccL* (*gnsA*) and *ydfY* (*gnsB*) increases unsaturated fatty acids, and suppresses both the temperature-sensitive *fabA6* mutation and cold-sensitive *secG* null mutation of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **183**, 5523-5528 (2001).
- Tanaka, K., Matsuyama, S., and Tokuda, H., Deletion of *lolB* encoding an outer membrane lipoprotein is lethal for *Escherichia coli* and causes the accumulation of lipoprotein localization intermediates in the periplasm. J. Bacteriol. **183**, 6538-6542 (2001).
- Miyamoto, A., Matsuyama, S., and Tokuda, H. Mutant of LolA, a Lipoprotein-specific molecular chaperone of *Escherichia coli*, defective in the transfer of lipoproteins to LolB. Biochem. Biophys. Res. Commun. **287**, 1125-1128 (2001).
- Terada, M., Kuroda, T., Matsuyama, S., and Tokuda, H. Lipoprotein-sorting signals evaluated as the LolA-dependent release of lipoproteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **276**, 47690-47694 (2001).
- Narita, S., Tanaka, K., Matsuyama, S., and Tokuda, H. Disruption of *lolCDE* encoding an ATP-binding-cassette transporter is lethal for *Escherichia coli* and prevents the release of lipoproteins from the inner membrane. J. Bacteriol. **184**, 1417-1422 (2002).
- 徳田元、松山伸一 脂質で修飾された蛋白質を膜から遊離させる ABC トランスポーター 蛋白質核酸酵素, 46, 1221-1227 (2001)

##### (2) 特許出願

なし