

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成14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)

「タンパク質の細胞内ダイナミズムの原理と制御装置」

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。またタンパク質はその細胞内での分解機構によって量的・質的な調節を受ける必要もある。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指して研究を行う。膜透過モーター蛋白質SecAや膜透過チャンネルSecYEGの構造と機能機能の研究、新たに見出したSecM (Secretion Monitor)の翻訳制御の解析を通じた、タンパク質翻訳制御と合成途上ポリペプチドによるリボソーム機能へのフィードバック機構とその意義、翻訳制御機構の研究、さらに、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の研究を行う。また輸送後の構造形成に関して、細胞表面タンパク質に特徴的なジスルフィド結合導入装置の構造と機能を解明する。

2. 研究実施内容

SecYEG 複合体の分子構築とダイナミズム、膜タンパク質の品質管理機構についての当初計画を順調に進めており、新たな発展につながる成果をいくつか挙げた。タンパク質膜透過装置のうちSecYEG, SecAおよびSecMの遺伝学的、生化学的解析を行った。また高度好熱菌由来のこれら装置を構成する因子の結晶化に成功した。膜におけるプロテアーゼに関して、FtsHの研究に加えて、YaeLの機能解析を行い新たな知見を得た。さらに蛋白質にジスルフィド結合を導入するDsbシステムの機能に関して研究した。

主な成果：

1. SecYEG 複合体とSecAの分子構築と機能。大腸菌のSecEYG複合体における、SecY-SecE, SecY-SecG各結合部位を部位特異的クロスリンク実験により残基レベルで同定した。SecYの膜貫通領域の変異解析を行い、機能に重要な膜貫通領域を複数同定した。プロ

トン駆動力が膜透過の初期過程を促進することを見出した。SecYEGのポリペプチド透過チャンネルをよりオープン状態に遷移させるSecEの変異を見出しその機構を解析した。SecEの変異で優性欠損を示すものを分離し、その解析からSecYEG複合体は2ユニット以上が一つの機能単位となることを示唆した。高度好熱菌のSecYE複合体においても、膜において機能状態の複合体は2ユニット以上が集合したものであることを蛍光エネルギー転移実験によって示した。高度好熱菌SecAの立体構造決定をすすめて、同じくSecYE複合体の結晶化に成功した。

2. 膜タンパク質の品質管理・分解制御機構。膜に組み込まれた状態のFtsHによる、膜に組み込まれた状態の膜タンパク質基質の分解をアッセイする実験系を開発し、精製したFtsHと基質タンパク質のみによって、いわゆる逆輸送を伴う、ATPに依存した基質分解が起こり得ることを示した。YaeLはアンチシグマE因子である膜タンパク質RseAのDegSに引き続く2段階目の切断を司り、表層ストレス応答を可能にすることを発見したが、さらにYaeLのPDZドメインとRseAのグルタミンに富むペリプラズム領域がDegSによる一段階目の切断がない時にYaeLの切断を抑制していることを見出した。また、このプロセスを構造面から解析するために、300 kVの極低温電子顕微鏡に最適な1000 Åと500 Å径によく制御されたりポソーム膜の作成と再構成を、超音波処理後の制御孔処理により再現よく作り出すことに成功した。この方法でFtsH-Hf1K-Hf1Cが確かに組み込まれていることの検証とトポロジーの決定を行い、膜に組み込まれた状態の機能アッセイと構造観察を対比させる実験系を確立しようとしている。
3. Dsbシステムの解析。ジスルフィド結合導入経路においてDsbBに結合して酸化力の源として機能しているユビキノンは、DsbA再酸化反応中に本来の400 nmの弱い可視吸収から500 nmの強い可視吸収へ遷移することを見出し、この特異な電子状態をもつ“活性化”状態のユビキノンは、DsbBと共役して一連の酸化反応を駆動することを提唱した。

3. 研究実施体制

機能解析グループ

- ① 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）
- ② 研究項目：タンパク質膜透過装置と分解装置の機能解析

構造解析グループ

- ① 研究担当グループ長：木村 能章（生物分子工学研究所、主席研究員）
- ② 研究項目：電子顕微鏡による構造観察・構造機能関連の解明

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Mori, H. and Ito, K.: Biochemical characterization of a mutationally altered protein translocase: proton-motive force stimulation of the

initiation phase of translocation. *J. Bacteriol.* 185, 405-412 (2003)

- Mori, H., Akiyama, Y. and Ito, K.: A SecE mutation that modulates SecY-SecE translocase assembly, identified as a specific suppressor against SecY defects. *J. Bacteriol.* 185, 948-956
- Shimokawa, N., Mori, H. and Ito, K.: Importance of transmembrane segments in SecY. *Mol. Gen. Genomics* 269, 180-187 (2003)
- Matsuo, E., Mori, H. and Ito, K.: Interfering mutations provide in vivo evidence that *Escherichia coli* SecE functions in multimeric states. *Mol. Gen. Genomics* 268, 808-815 (2003)
- Mori, H., Tzukazaki, T., Masui, R., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Johnson, A. E., Kimura, Y., Akiyama, Y. and Ito, K.: Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein translocase: SecYE from *Thermus thermophilus* HB8 forms a constitutive oligomer in membranes. *J. Biol. Chem.* 278, 14257-14264
- Akiyama, Y. and Ito, K.: Reconstitution of membrane proteolysis by FtsH. *J. Biol. Chem.* 278, 18146-18153 (2003)
- Satoh, Y., Matsumoto, G., Mori, H. and Ito, K.: Nearest neighbor analysis of the SecYEG complex. I. Identification of a SecY-SecG interface. *Biochemistry* 42, 7434-7441 (2003)
- Satoh, Y., Mori, H. and Ito, K.: Nearest neighbor analysis of the SecYEG complex. II. Identification of a SecY-SecE cytosolic interface. *Biochemistry* 42, 7442-7447 (2003)
- Kanehara, K., Ito, K. and Akiyama, Y.: YaeL proteolysis of RseA is controlled by the PDZ domain of YaeL and a Gln-rich region of RseA. *EMBO J.* 22, 6389-6398 (2003)

(2) 特許出願

なし