

「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、生化学的解析を行い、SecYの膜貫通領域の役割と膜タンパク質の形成における役割に関する解析を進めた。またSecMによるSecAの機能調節に関して新たな機構を発見した。そして、高度好熱菌由来のこれら装置を構成する因子の結晶化と構造解析をすすめている。膜におけるプロテアーゼに関して、FtsHホロ酵素複合体の構造解析、RseP (YaeLより改名)の生化学解析を行った。さらに蛋白質にジスルフィド結合を導入するDsbシステムの反応機構を詳細に解明した。

主な成果

**1. SecYEG 複合体とSecAの分子構築と機能：** 蛋白質膜透過チャンネル(トランスロコン)の中心的成分であるSecYの膜貫通領域(TM)の役割に関して、TM3とTM4の重要性を示した。分泌蛋白質DsbAは他の分泌蛋白質と異なり、シグナル認識粒子(SRP)によってト

ランスロコンにターゲットされること、SecYの機能依存性も他の分泌蛋白質とは異なることから、SecYトランスロコンは基質の導入路によってことなる経路を提供していることを示唆した。また、膜タンパク質の膜組込みに必要なYidCの機能欠損やSecYのある種の変異によって細胞表層ストレス応答が誘導されることを見だし、SecY機能は膜タンパク質形成において単なる膜への挿入以降の段階にも必要とされることを示した。高度好熱菌のSecYE複合体および関連するSecDF蛋白質の結晶化に成功し、高解像度X線回折像が得られる条件の検討を進めた。

**2. 分泌モニターSecMによるSecAの機能発現制御機構：** 蛋白質分泌装置の駆動ATPaseであるSecAは、分泌モニター蛋白質SecMによって巧みな制御を受けていることを発見した。SecAは、細胞質にも膜に結合した状態でも存在し、複数のオリゴマー構造をとり得る特異なタンパク質であり、大きな構造変化を伴ってポリペプチド鎖の動きを駆動する。一方、新生ポリペプチドはリボソームのトンネルを通過して細胞質に出現するが、このトンネルは合成されたポリペプチドと相互作用しないような設計になっているとされる。しかし、secM-secAオペロンの先頭の遺伝子産物であるSecMはそのC末端付近に特異な「アレスト配列」をもち、それが翻訳途上でトンネル構成成分と相互作用することにより自らの翻訳伸長を停止する。これによりmRNA上のsecA遺伝子のリボソーム結合サイトが露出し、別のリボソームによるSecAの翻訳が可能となる。SecM自身分泌蛋白質であり、その合成途上鎖が分泌装置によって「引っ張られる」と翻訳停止が解除される。このように細胞の分泌活性がモニターされ、分泌活性の低下はSecAの合成を促す。SecMがリボソームトンネル内で翻訳伸長アレストを起こす性質を持つことは、SecAの基底レベルの発現、したがって大腸菌の生存、に必須であり、またSecAの翻訳が細胞の分泌活性に応答して制御を受けることにも必須であることを明らかにした。さらに、SecM翻訳複合体が膜にターゲットされる仕組みによって、同一mRNAの下流域でコードされるSecAが膜分泌装置の近傍で合成されることが保証され、新生SecAが直ちに働くことができるような構造をとりやすくなるとの全く新しいSecA機能の制御機構を発見した。

**3. 膜タンパク質の品質管理・分解制御機構：** 膜プロテアーゼFtsHがHflKCと細胞内で巨大な複合体（ホロ酵素）を作っていることを示した。また、FtsHの電子顕微鏡像の解析により、本酵素が6量体構造をとっていることを確認した。一方、RseP (YaeL)は大腸菌の転写因子 $\sigma^E$ を不活性状態に保つ一回膜貫通蛋白質RseAを切断することにより表層ストレス応答に必須の役割を果たす。表層ストレスに曝されると、RseAはDegSプロテアーゼによるペリプラズム領域での切断に引き続きRsePによる切断を受けることを見だしこの反応の解析を行った。RsePは「制御された膜内部での蛋白質切断 (RIP)」に関わるS2P proteaseファミリーに属するが、この種のプロテアーゼの性状は不明の点が多い。RsePは完全長の (DegSによる切断を受けていない) RseAは切断出来ないが、この抑制には、RsePのPDZドメインと基質RseAのGln残基に富む領域、両者が重要であることを明らかにした。また、RsePによる切断反応の解析に有利なモデル基質 (HA-MBP-RseA140) を作成し、そのRsePによる切断部位を同定し、RsePが実際に膜貫通配列の内部を切断することを示した。

また、RsePはRseAの膜貫通領域のみならず無関係な膜貫通配列をもその内部で切断しうること、その切断には膜貫通配列中のhelix-breaking residueが重要であることを見出した。さらに、精製蛋白質を用いたin vitro可溶化条件下でRsePが基質膜タンパク質の膜貫通配列を切断する活性を持つことを証明した。また、膜に組み込まれたプロテアーゼとして、HtpXおよびGlpGの解析を進めた。

**4. Dsbシステムの解析：** ジスルフィド結合導入経路において膜タンパク質DsbBはペリプラズムの酸化酵素DsbAの活性部位システインを酸化状態に保つ。この反応において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、メナキノンが、DsbA再酸化反応中にそれぞれ特徴的な可視吸収を示す電子状態に遷移することを見出した。この遷移状態は、DsbA酸化反応中にDsbBのcysteine残基のrearrangementによりCys44が還元状態になることによって誘起されることを明らかにした。そして、DsbBによるDsbA酸化経路には少なくとも2種類が存在することを見だし、その反応機構を詳細に解析した。

### 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・構造機能相関の解明

### 4. 主な研究成果の発表

#### (1) 論文（原著論文）

- Mori, H., Shimokawa, N., Satoh, Y. and Ito, K. (2004) Mutation analysis of transmembrane regions 3 and 4 of SecY, a central component of protein translocase. *J. Bacteriol.* 186, 3960-3969
- Murakami, A., Nakatogawa, H. and Ito, K. (2004) Translation arrest of SecM is essential for the basal and regulated expression of SecA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 12330-12335
- Nakatogawa, H., Murakami, A., Mori, H. and Ito, K. (2005) SecM facilitates translocase function of SecA by localizing its biosynthesis. *Genes Dev.* 19, 436-444
- Saikawa, N., Akiyama, Y. and Ito, K. (2004) FtsH exists as an exceptionally large complex containing HflKC in the plasma membrane of *Escherichia coli*. *J. Struct. Biol.* 146, 123-129
- Akiyama, Y., Kanehara, K. and Ito, K. (2004) RseP (YaeL), an *E. coli* RIP

protease, cleaves transmembrane sequences. EMBO J. 23, 4434-4442

- Inaba, K., Takahashi, Y.-H., Fujieda, N., Kano, K., Miyoshi, H. and Ito, K. (2004) DsbB elicits a red-shift of bound ubiquinone during the catalysis of DsbA oxidation. J. Biol. Chem. 279, 6761-6768
- Takahashi, Y., Inaba, K. and Ito, K. (2004) Characterization of menaquinone-dependent disulfide bond formation pathway of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 279, 47057-47065