

「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とき、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11年度の研究によりSecAの機能発現にはSecYとの相互作用が重要であること、それにはSecYのC末端近くの細胞質領域が特に重要であることを明らかにした。また、多くのSecA変異を分離解析し、特にその機能が昂進したsuper active型変異がSecAの低親和性ATP結合部位近くに起こることから、この領域がSecAの機能制御に重要である事を見出した。SecGは膜内で構造を変化させることでSecAサイクルを促進する。平成11年度の研究により、SecGの構造変化は相互作用する因子の変化によって維持されていることを明らかにした。また、構造変化を完全に阻害したSecGは強い優性欠損変異を示す事を見出した。更に、SecGの1番目と2番目の膜貫通領域は性質が異なり、2番目の膜貫通領域の方がより親水的な環境に

あることを示す結果を得た。これらの研究により、SecGの構造変化の実態と構造変化を可能にしている構造上の特徴を解明する手がかりが得られた。また、SecYの第一ペリプラズム領域の変異で膜透過後期過程に欠損を持つがSecAの挿入や膜透過初期過程は昂進している変異を同定し、膜透過後期過程の研究の重要な手がかりを得た。SecYEGの構造生物学的解析に向けて、準備を進めた。

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YccAやSecYを分解する過程を詳しく調べた。FtsHは基質のN末端側領域から分解を開始し、ペリプラズム側ドメインに融合させたアルカリ性ホスファターゼドメインを含み全域にわたって速やかなprocessive degradationを行うことをみだし、この分解過程には、膜タンパク質を膜から引きずり出すdislocation反応が含まれることを提唱した。また、FtsHのC末端側領域の自己切断とそれを利用した切断のアミノ酸残基特異性に関する知見を得た。プロテアーゼ活性中心の亜鉛配位に関わる残基の同定を行った。

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。DsbBの呼吸鎖成分による酸化に重要な領域を変位解析によって同定した。

リポタンパク質の選別装置の解析：平成11年度の研究により、リポ蛋白質が内膜から遊離する反応は、新規ABCトランスポーター LolCDE複合体であることを明らかにした。この研究成果によって、大腸菌のリポ蛋白質の選別と外膜局在化に関与する因子はほぼすべて明らかになったと考えられる。更に、Lolシステムはグラム陰性細菌に広く備わった機構であることも明らかになった。各因子の役割を解析するため、5種類のLol因子（ABCDE）それぞれについて変異体を構築した。また、リポ蛋白質の選別シグナルは+2位だけでなく、+3位のアミノ酸残基も重要であることを見出した。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- Ito, K., Matsuo, E. and Akiyama, Y.: 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 (1999)
- Matsuo, E., Sampei, G., Mizobuchi, K. and Ito, K.: The plasmid F OmpP protease, a homologue of OmpT, as a potential obstacle to E. coli-based protein production. *FEBS Lett.* 461, 6-8 (1999)

- Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K.: Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. *EMBO J.* 18, 2970-2981 (1999)
- Akiyama, Y.: Self-processing of FtsH and its implication for the cleavage specificity of this protease. *Biochemistry* 38, 11693-11699 (1999)
- Kobayashi, T. and Ito, K.: Respiratory chain strongly oxidizes the CXXC motif of DsbB in the *Escherichia coli* disulfide-bond formation pathway. *EMBO J.* 18, 1192-1198 (1999)
- Nishiyama, K., Fukuda, A., Morita, K., and Tokuda, H. Membrane-deinsertion of SecA underlying proton motive force-dependent stimulation of protein translocation. *EMBO J.* 18, 1049-1058 (1999).
- Yokota, N., Kuroda, T., Matsuyama, S., Tokuda, H. Characterization of the LolA-LolB system as the general lipoprotein localization mechanism of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274, 30995-30999 (1999).
- Suzuki, H., Nishiyama, K., and Tokuda, H. Increases in acidic phospholipid contents specifically restore protein translocation in a cold-sensitive secA or secG null mutant. *J. Biol. Chem.* 274, 31020-31024 (1999).
- 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 Biol.* 2, 212-218 (2000).