

「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

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的とする。モデル生物として、種々の情報の集積している大腸菌を用い、遺伝学、生化学、構造生物学の手法を統合して、関与する因子のダイナミックな振る舞いを解明する。膜透過モーター蛋白質 SecA や膜透過チャネル（トランスロコン）SecYEG の構造・機能と制御、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、ジスルフィド結合導入装置の反応機構と構造解析などで、新たな知見を得た。構造解析（木村）グループは、当プロジェクトの精製タンパク質に関し、通常の或いは極低温電子顕微鏡を用いて観察（一分子観察）を行い、個々の或いは複合体の構造を解析する。また、変異タンパク質等も利用して基質複合体を作り、その構造を解析する。

2. 研究実施内容

機能解析グループ

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、SecA の立体構造、膜透過駆動機構、SecYEG との相互作用などについて新たな知見を得た。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。SecY の膜タンパク質形成における役割解明、SecDF の構造決定においても進展があった。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、HtpX, RseP, GlpG の生化学解析を行った。また、大腸菌細胞質膜にはプロヒビチンドメインをもつ異なる膜タンパク質複合体が膜の両側に存在することを発見した。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、DsbB の構造決定を進めた。

主な成果

1. SecYEG 複合体と SecA の分子構築と機能： 高度好熱菌 SecA の立体構造を決定し、新たな逆並行型の 2 量体構造の存在を明らかにした。SecA 単量体の中央を突き抜ける長い α ラせんおよびそれとイオン結合を形成する ATPase ドメインの変異によって、ATPase の分泌基質と SecYEG による活性化は正常に起こるが、膜透過駆動が選択的に損なわれることを発見した。これに基づき SecA は ATPase エンジン部分と膜透過駆動部分からなり、長

い α らせんがエンジンの出力を機械的な動きに転換する役割をもつとの膜透過駆動分子機構を提唱した。また、SecA と SecY の *in vivo* での相互作用を *in vivo* クロスリンク実験によって調べる方法を確認し、SecA が二つの異なる様式で SecYEG に結合することを示した。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ターゲティング様式に応じて異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いだした。そして、上記の SecY 変異により膜タンパク質 LacY の正しい構造形成が損なわれることを示し、SecY は膜タンパク質の膜への挿入ばかりではなくそれ以降の構造形成過程においても機能することを示した。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、SecDF に関してはX線回折データセットを取得し予備的電子密度マップを得た。

2. 分泌モニターSecM による SecA の機能発現制御機構： 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。この現象を *in vitro* 蛋白合成系で再現することに成功し、mRNA 上で停止したリボソームの位置および伸長停止 polypeptidyl-tRNA の最終残基を決定した。その結果、(i) リボソームはアレストに必須な Pro166 のコドンがAサイトに位置した状態で停止すること、(ii) Gly165 と Pro166 間のペプチド結合は形成されていないこと、(iii) アレスト状態の翻訳複合体はピューロマイシンの作用を受けず、リボソームAサイトには prolyo-tRNA が位置していることがわかった。secM mRNA 上に遺伝情報として書き込まれている Pro166 コドンは、「ポリペプチドの一部としてのプロリンをコードしている」以外に、「リボソーム活性中心で、組み込まれることなく伸長抑制に寄与する Prolyl-tRNA をコードしている」ことにその生物学的使命の重要な部分があることが明らかとなった。また、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： 膜に組み込まれたプロテアーゼとして、FtsH, HtpX, RseP および GlpG の解析を進めている。HtpX を精製し、それが endopeptidase 活性をもつこと、膜タンパク質 SecY の細胞質領域を切断することができることを明らかにした。また、GlpG を精製し、切断基質となるモデル膜タンパク質を構築した。GlpG はこのモデル基質の膜貫通部位とペリプラズム領域の境界付近を切断することを見いだした。しかし、この切断は GlpG が膜貫通部位を認識することによって起こることも明らかとなった。RseP の活性部位近傍に Cys 残基を系統的に導入しそれらの膜不透過性修飾試薬に対する反応性を、界面活性剤と Chaotropic 変性剤の効果を含めて調べた。RseP の活性部位付近は完全に露出しているわけでも脂質層に埋もれているわけでもなく、膜内或いは境界付近でのタンパク質主体の折り畳み構造の内部に存在することが示唆された。異常な膜タンパク質を分解・除去することによる膜タンパク質の「品質管理」に、大腸菌では膜プロテアーゼ FtsH と HtpX が重要な役割を持つ。FtsH と HtpX の二重欠失株は条件致死となるが、そのマルチコピーサプレッサーとして、FtsH の制御因子として従来知られていた hflKC 以外に qmcA 遺伝子を同定した。HflKC も QmcA もプロヒビチンホモロジー (PHB) ドメインを持つ膜タンパク質であるが、QmcA は HflKC とは逆にそのプロヒビチンドメインを含む大部分を細胞質側に配向していること、すなわち膜タンパク質の品質管理プロテアー

ぜに関連する複数のプロヒビチンドメインタンパク質が大腸菌の細胞質膜の両側に存在することが明らかとなった。

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。DsbB は、ユビキノンの強い酸化力を巧妙な仕掛けによりジスルフィド結合に変換し、創生されたジスルフィドは DsbA を介して多くの基質蛋白質に受け渡される。我々は、DsbB のシステイン残基の一つ Cys⁴⁴ がキノンと電荷移動錯体、次いで付加生成物を過渡的に形成することによって、DsbB 分子内にジスルフィド結合が形成されることを、実験と理論を統合して示した。この過程では Cys⁴⁴ と共に、 α ヘリックス上でその近傍に存在する進化的に保存された Arg⁴⁸ の正電荷が必須の役割を果たすことも明らかとなった。このような低分子酸化還元キャリアーに依存したジスルフィド結合創生のスキームは、真核細胞においては FAD に依存した機構として存在し、FAD 結合型のジスルフィド酸化還元酵素中では、システイン残基と FAD との間で電荷移動錯体および付加生成物が形成され、その際、近傍に存在する NADP⁺ などの正電荷が重要な役割を担っていることを提唱した。

構造解析グループ

細胞の生存には、細胞膜自身の構築や細胞膜を隔てた構造体の保守・管理・分解が必須となる。分泌も含め細胞膜外に存在する分子や分子群の構造形成を調べるためには、膜蛋白質や膜近傍分子群の構造や集合様式を調べるために直接的な構造観察が欠かせない。生きているときの細胞に近い状態での構造観察と観察から導かれる結論やモデルの検証のためには、電子顕微鏡特に氷に閉じこめた状態で観察するクライオ電子顕微鏡による構造観察を必要とする。膜透過駆動機構に関連するタンパク質に関しては、透過初期状態および終了状態を捕捉もしくは近似的状態の複合体の再構成系での一分子観察を行う。もちろん複合体として単離できれば結晶化による（電子線、X線）構造決定を高い分解能でできることも期待できる。しかし電子顕微鏡の低分解能像でも各反応状態での集合様式のトポロジーを解き明かすことを目的として個々の構成要素をラベルにより特定できれば、各構成要素間の配置の変化や道筋の機能解析への土台が提供できる。これらの目的のために、集合様式に適した試料の単離とその構造観察、さらにはより生体膜に近い状態での観察法の開発を進めながら観察し観察事実に基づく仮説・モデル化と検証を行う。膜透過装置の構造観察は、世界的に X 線結晶解析を中心とした進展を遂げている過程にあり、電子顕微鏡での構造観察や機能解析は一時中断している。いくつかの分子群の構造解析が一段落つけばまた電子顕微鏡による観察が求められるだろう。一方膜蛋白質の管理・分解装置は自己分解を含み、なかなか複合体の単離は難しい。それでも、大腸菌の膜局在唯一の ATP 利用プロテアーゼ FtsH は可溶化状態での単離から 2 種類の観察象が得られている 1 種について 3 次元再構成像が得られておりこの両者の生理的意義を追求している。また FtsH は HflK, HflC と複合体を作りそれに伴い膜タンパクの分解から可溶性タンパクへ対象をシフトすることが知られているが、これに対応すると思われる複合体の構造観察ができています。これから導き出される複合体の様式と意義に関しても新しい実験系を計画しているが、現状の観察事実をありのままにレポートすることも大切と考え発表準備中である。

主な成果

ネガティブ染色法により電子顕微鏡で、detergent 可溶化状態における完全長 FtsH の構造解析を行った。色々な方向を向いた FtsH の画像から三次元像を再構成したところ、その

構造は直径 100Å 前後のリング三層から成っていた。最も直径の大きい二層目のリングは、X 線結晶解析から得られた大腸菌 FtsH の六量体モデルにほぼ一致した。FtsH 単独での構造解析では対称性の高い構造と非対称な構造とが混在することが証明できた。対称性のある構造はこれまで部分的に知られている X 線構造解析の結果をよく説明する。一方、非対称な構造は、対称な構造からどのような構造変化が可能かについて示唆に富む形をしていることが示せた。さらに HflK, HflC 存在下では均一な構造を取らず多様な形態を取っているがおおむね、FtsH 6 量体の周りを取り囲むような形態が見られている。この観察から HflK, HflC がどのように FtsH の分解対象を膜タンパク質と可溶タンパク質との間で変化させるという仮説を提唱した。いずれも膜蛋白質の分解に関して柔軟な構造を示唆しており、剛体モデルとはことなる。検証には時間的柔軟性を評価する 1 分子観察と電子顕微鏡の単粒子観察とを有機的に組み立てる必要がある。

3. 研究実施体制

機能解析グループ

- ①研究分担グループ長：伊藤維昭（京大・ウイルス研、教授）
- ②研究項目：SecYEG の分子解剖と構造機能相関、SecA の構造機能相関と制御、SecM の機能と作用機構、FtsH の構造機能相関と制御、RseP の機能と制御、HtpX の機能と制御、GlpG の機能と制御、DsbB の分子機構と構造機能相関

構造解析グループ

- ①研究分担グループ長：木村能章（生物分子工学研究所、主席研究員）
- ②研究項目：電子顕微鏡等による構造解析、FtsH 複合体の構造解析

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- Nakatogawa, H., Murakami, A., Mori, H. and Ito, K. SecM facilitates translocase function of SecA by localizing its biosynthesis. *Genes Dev.* 19, 436-444 (2005)
- Shimohata, N., Akiyama, Y. and Ito, K. Peculiar properties of DsbA in its export across the *E. coli* cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* 187, 3997-4004 (2005)
- Ito, K. and Akiyama, Y. Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 211-231 (2005)
- Inaba, K., Takahashi, Y.-h. and Ito, K. Reactivities of quinone-free DsbB from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 280, 33035-33044 (2005)
- Sakoh, M., Ito, K. and Akiyama, Y. Proteolytic activity of HtpX, a membrane-bound and stress-controlled protease of *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 280, 33305-33310 (2005)
- Maegawa, S., Ito, K. and Akiyama, Y. Proteolytic action of GlpG, a rhomboid protease in the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Biochemistry* 41, 13543-13552 (2005)
- Inaba, K., Takahashi, Y.-h., Ito, K. and Hayashi, S., Critical role of a thiolate-quinone

- charge transfer complex and its adduct form in *de novo* disulfide bond generation by DsbB. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 287–292 (2006)
- Chiba, S., Ito, K. and Akiyama, Y. (2006) The *Escherichia coli* plasma membrane contains two PHB (prohibitin homology) domain protein complexes of opposite orientations. Mol. Microbiol. 60, 448–457 (2006)
 - Tsukazaki, T., Mori, H., Fukai, S., Numata, T., Perederin, A., Adachi, H., Matsumura, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Mori, Y., Sasaki, T., Vassilyev, D., Nureki, O. and Ito, K., Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of SecDF, a translocon-associated membrane protein, from *Thermus thermophilus*. Acta Cryst. F62, 376–380 (2006)
 - Muto, H., Nakatogawa, H. and Ito, K., Genetically encoded but non-polypeptide prolyl-tRNA functions in the A-site for SecM-mediated ribosomal stall. Mol. Cell, in press
 - Takahashi, Y.-h., Inaba, K. and Ito, K., Role of the cytosolic loop of DsbB in catalytic turnover of the ubiquinone–DsbB complex. Antioxid. Redox Signal., in press