

「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

遺伝子産物が機能的構造体をして細胞構造を形づくる過程の中で、タンパク質の細胞内での折りたたみ、分泌、膜組み込み、局在化、および分解などをとりあげて、このような過程が的確に起こるために細胞に備えられている仕組みを解析している。SecYEG 複合体の分子構築とダイナミズム、ジスルフィド結合導入装置の構造と機能、膜におけるプロテオリシスについて新たな発展につながる成果をいくつか挙げた。

1. タンパク質膜透過・組み込み装置の研究

① 高度好熱菌 SecYE-Fab 複合体の結晶構造解析。高度好熱菌 Sec 膜タンパク質複合体の立体構造を決定するため、東工大・濡木研究室、アラバマ大・Vassylyev 研究室との共同研究を進めている。高度好熱菌 SecYE (TSecYE)に対するモノクローナル抗体を作製し、Fab 断片を調製した。TSecYE-Fab 複合体を用いて、蒸気拡散法により良質の結晶を得た。放射光(Spring8 BL41)を用いて 3.2 Å分解能の X 線回折パターンを得、さらに Se-Met 型 TSecYE-Fab 結晶の回折データを用いた多波長異常分散解析によって初期位相を決定した。トランスロコンの高解像度立体構造は、SecA をもたない古細菌のものが唯一報告されているが、我々は近い将来、SecA 依存型トランスロ

コンの立体構造を、世界で初めて明らかにできるものと期待している

② 膜透過駆動因子 SecA の構造と機能の解析。 生きた細胞内で働いている状態のタンパク質間の相互作用を解析するユニークな方法として、光反応性のアミノ酸アナログ (pBPA) を目的タンパク質の特定の部位に取り込ませ、紫外線を照射することにより、導入した pBPA とそれに近接するタンパク質との間を架橋させる方法があり、細胞内における残基レベルのタンパク質相互作用とその変化を追跡する方法として強力な武器となる。この方法を用いて、トランスロコンの中心的な成分である SecY のアミノ酸残基の内、駆動因子 SecA と近接する複数の部位を同定した。SecA と恒常的に結合する部位の他に、SecA が膜透過駆動状態で近接する SecY の領域を捉えることに成功した。さらに、SecY と共に膜透過チャンネルを構成する SecG や SecE の残基を標的にした光架橋解析も行い、SecG 分子内の SecY, SecA 近接部位を同定した。また、SecA の変異解析により、SecA 分子を貫く特徴的な長い α ラセンが ATPase ドメインの構造変化を基質タンパク質の動きに変換する重要な役割を持つことを提唱した。一方、Vassylyev 研究室との共同研究による SecA の X 線結晶解析により SecA が平行型2量体構造を取り得ることを示した。これと並行して SecA の異なる2量体構造がさらに2種類発表され、現在5種類の2量体構造が報告されているおり、これらは全て異なるインターフェイスで会合している。我々は SecA が溶液中で平行型を含む複数の2量体構造を取り得ること、それらが平衡状態にあることを示したが、2量体構造を共有結合で固定化すると普く活性の喪失に至ることを示した。SecA が機能するためには2量体の大幅な解離あるいは単量体化が必須であると考えられる。

③ 膜タンパク質の形成における SecY の役割。ある種の SecY 変異によって膜タンパク質の正しい構造形成が損なわれることを、それらの変異によって「膜ストレス」応答が惹起されること、LacY の in vitro 翻訳・膜組込み反応において、変異型 SecY は膜への挿入自体は許すが、立体構造を認識するモノクローン抗体に対する反応性の獲得を許さないこと (Kaback 研究室との共同研究) から示した。トランスロコンの機能は膜タンパク質を正しくフォールディングさせることに必要であることがわかった。

④ SecM における翻訳伸長停止機構。in vitro 翻訳系を用いて、*secM* mRNA 上におけるリボソームの停止位置を決定し、アレスト状態の polypeptidyl-tRNA を分析した。その結果、リボソームの A サイトには 166 番目のコドンに対応する prolyl-tRNA が結合しており、Gly165 との間にペプチド結合が形成されていないことがわかった。

2. 膜プロテアーゼの分子機構と制御

RIP プロテアーゼは複数の膜貫通領域で膜に組み込まれた膜タンパク質で、基質となる膜タンパク質をその膜貫通領域内部で切断する機能によって、様々な生物で多様な細胞機能に関わっている。大腸菌には S2P プロテアーゼファミリーに属する RseP と Rhomboid ファミリーに属する GlpG という2種類の RIP プロテアーゼが存在する。RIP プロテアーゼの活性部位は膜内部に存在すると推測されているが、我々は RseP と GlpG 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調べた。RseP の活性部位付近は脂質環境と水溶性環境の境界付近においてタンパク質主体の折り畳み構造の内部に存在することを示した。GlpG に関し

では、Bla-LacYTM2-MBP 融合タンパク質が基質となることを発見し、GlpG プロテアーゼ活性を精製標品を用いて証明した。また、切断部位を同定し、GlpG がこの基質を膜貫通部位の内部ではなく、ペリプラズムに露出し始める部位の親水性残基間で切断することを見いだした。一方、我々は、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、二つの膜プロテアーゼ FtsH と HtpX が重要な役割を持っていることを示してきたが、FtsH の制御因子として従来知られていた *hflKC* 以外に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 QmcA を同定した。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が明らかとなった。

3. ジスルフィド結合形成システムの構造と分子機構

タンパク質に効率よくジスルフィド結合を導入するために機能する DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の X 線結晶構造解析を継続し、複合体の構造を 3.7 Å 分解能で解くことに成功した。これまでの機構解析の結果と今回の構造情報を総合することによって、ユビキノンを含む DsbB 上の活性中心において、DsbB とユビキノンが共同してジスルフィド結合を創り出す化学スキームが解明された。さらに、極めて酸化力の強い(自身は酸化されにくい)酵素である DsbA を DsbB が酸化する過程において、DsbB は DsbA との会合に伴って巧妙な構造変化(システインの再配置)を引き起こし、両タンパク質間に存在する酸化還元電位の障壁を克服していることを示した。DsbB は、基質である DsbA と出会うことにより、DsbA に特化した超強力酸化酵素に変身すると解釈できる。これらの研究成果により、細胞の中でジスルフィド結合創られ、タンパク質に導入されるメカニズムの全貌が分子レベルで解明された。

構造解析グループ

FtsH は ATP 加水分解依存的に、可溶性蛋白質及び膜蛋白質を分解する細胞質膜プロテアーゼである。その細胞質領域は AAA ATPase ドメインと亜鉛結合型プロテアーゼドメインからなり、他の AAA ATPase ファミリー蛋白質と同様に、ホモ六量体を形成し、リング構造をとると考えられている。細胞内においては、多くの FtsH は HflK/HflC とともに非常に大きな複合体 (FtsH ホロ酵素) を形成している。HflK/HflC はペリプラズム領域に配列の大部分を露出する膜蛋白質であり、FtsH による分解を基質の局在に応じて調節することが示唆されている。FtsH の可溶性ドメインは結晶構造解析がなされたが、膜蛋白基質を dislocation させつつ分解するためには膜貫通ドメインが必須であり、全長の FtsH の構造を決定することは重要である。我々は、全長 FtsH、HflK/HflC 及び、FtsH ホロ酵素の電子顕微鏡構造解析を行った。FtsH の三次元再構成の結果、直径 100 Å 程度で大きさの異なるリングが三層重なった密度マップが得られた。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 ATPase ドメイン (PDB 1LV7) の六量体モデルとほぼ一致した。一方、HflK/HflC では、様々な形状のリング様の像が見られた。また、FtsH ホロ酵素では、「直径約 100 Å の円形とそれを囲むリング様の物体」や「リングが円形を完全には囲まず、尾のように延びた像」が見られた。我々はこれらの像から、HflK/HflC は膜蛋白質を FtsH から隔てる物理的障壁として働くという仮説をたて、その検証を行っている。

3. 研究実施体制

(1) 機能解析グループ

①研究者名

伊藤 維昭 (京都大学・ウイルス研究所 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

(2) 構造解析グループ

①研究者名

木村 能章 (大阪大学バイオ関連多目的研究施設・藍野大学 招聘教授・特任教授)

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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Tsukazaki, T., Mori, H., Fukai, S., Numata, T., Perederin, A., Adachi, H., Matsumura, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Mori, Y., Sasaki, T., Vassylyev, 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).
- Vassylyeva, M. N., Mori, H., Tsukazaki, T., Yokoyama, S., Tahirov, T. H., Ito, K. and Vassylyev, D. G. Cloning, expression, purification, crystallization and initial crystallographic analysis of the preprotein translocation ATPase SecA from *Thermus thermophilus*. *Acta Cryst. F62*, 909-912 (2006)
- Vassylyev, D. G., Mori, H., Vassylyeva, M. N., Tsukazaki, T., Kimura, Y., and Ito, K. Crystal structure of the translocation ATPase SecA from *Thermus thermophilus* reveals a parallel, head-to-head dimer. *J. Mol. Biol.* 364, 248–258 (2006)
- Mori, H. and Ito, K. Different modes of SecY-SecA interactions revealed by site-directed in vivo photo-crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 16159-16164 (2006)
- Mori, H. and Ito, K. The long α -helix of SecA is important for the ATPase coupling of translocation. *J. Biol. Chem.* 281, 36249-36256 (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* 22, 545-552 (2006)
- Chiba, S., Ito, K. and Akiyama, Y. The *Escherichia coli* plasma membrane contains two PHB (prohibitin homology) domain protein complexes of opposite orientations. *Mol. Microbiol.* 60, 448-457 (2006)

- 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)
- 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., 8, 743-752 (2006)
- Inaba, K., Murakami, S., Suzuki, M., Nakagawa, A., Yamashita, E., Okada, K. and Ito, K. Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a mechanism of disulfide bond generation. Cell 127, 789–801 (2006)
- Shimohata, N., Nagamori, S., Akiyama, Y., Kaback, H. R. and Ito, K. SecY alterations that impair membrane protein folding and generate a membrane stress. J. Cell Biol. 176, 307-317 (2007)
- Koide, K., Maegawa, S., Ito, K. and Akiyama, Y. Environments of the active site region of RseP, an *E. coli* RIP protease, assessed by site-directed cysteine alkylation. J. Biol. Chem., 282 4553-4560 (2007)
- Maegawa, S., Koide, K., Ito, K. and Akiyama, Y. The intramembrane active site of GlpG, an *E. coli* rhomboid protease, is accessible to water and hydrolyzes an extramembrane peptide-bond of substrates. Mol. Microbiol., in press (2007)
- Maegawa, S. and Akiyama, Y. (2007) Sequence features of substrates required for cleavage by GlpG, an *Escherichia coli* rhomboid protease. Mol. Microbiol., in press