

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04350

研究課題名(和文) 膜内切断プロテアーゼRsePの選択的基質切断機構と新規細胞機能

研究課題名(英文) Mechanism of selective substrate cleavage and novel cellular functions of intramembrane protease RseP

研究代表者

秋山 芳展 (Akiyama, Yoshinori)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：10192460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌RsePは、S2Pファミリーに属する膜内切断プロテアーゼであり、大腸菌 E経路表層ストレス応答における膜越えたシグナル伝達やシグナルペプチドの分解除去等により、細胞表層機能の維持に必須の役割を果たす。本研究では、細胞質側に存在するMRE<sup>1</sup>-loop領域とC1N領域が基質と直接相互作用し、ペリプラズム側にPDZドメインによるサイズ排除フィルターとともに選択的な基質認識に重要な働きを素子とを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Intramembrane cleaving proteases (I-CLiPs) are known to act in a variety of important cellular processes in diverse organism. RseP, an Escherichia coli S2P family intramembrane cleaving protease, is involved in regulation of the extracytoplasmic stress response and membrane quality control through specific cleavage of substrates within the lipid bilayer. We have shown that, in addition to the periplasmic PDZ domain that acts as a size-exclusion filter, the cytoplasmic MRE<sup>1</sup>-loop region and the C1N region play critical roles in specific recognition and substrate cleavage.

研究分野：分子生物学

キーワード：生体膜 プロテアーゼ 膜内切断 表層ストレス応答 膜タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

「制御された膜内部でのタンパク質切断 (RIP: Regulated Intramembrane Proteolysis)」は、膜タンパク質分解の新たな様式であり、膜タンパク質機能調節や膜を越えたシグナル伝達に働くが、基質の特異的な認識・切断やその調節機構は不明の点が多い。

本研究で対象とする大腸菌 RseP は、S2P ファミリーに属する膜内切断プロテアーゼである。S2P protease は、真核細胞の脂質代謝や、細菌の環境応答・病原性発現等多様なプロセスに関わり、その機能欠損は疾病の原因となる。我々はこれまでに、RseP が大腸菌  $\sigma^E$  経路表層ストレス応答における膜越えたシグナル伝達に必須の役割を果たすことを明らかにした。細菌では、環境変化により生じる表層ストレスに応答して、種々の遺伝子の発現が誘導される。この「表層ストレス応答」は、環境変化への適応に重要である。 $\sigma^E$  表層ストレス応答は膜タンパク質 RseA の 2 段階切断により誘導される。膜プロテアーゼ DegS は「ストレスセンサー」として表層ストレスを感知して活性化し、RseA のペリプラズム領域を切断する。これが引き金となり、RseP が RseA を膜内部でさらに切断し、最終的にストレス応答転写因子  $\sigma^E$  が膜から遊離して機能する。RseP は、全長の (DegS による切断を受けていない) RseA は切断をしないよう抑制する負の制御を受けている。RseP の負の制御は、DegS センサーに依存した  $\sigma^E$  の活性化に重要である。RseP は 2 つの PDZ ドメイン (PDZ タンデム) を持つ。PDZ ドメインは、一般にタンパク質相互作用に関わる機能モジュールである。我々は、変異解析等から、RseP の負の制御に PDZ タンデムが関与することを示した。さらに、PDZ タンデムの構造及び機能解析から、PDZ タンデムが「サイズ排除フィルター」として働くことで、大きなペリプラズム領域を持つ膜タンパク質が RseP 活性部位へアクセスすること妨げること、これが RseA 分解中間体のみを切断する「基質特異性」を RseP に付与することを示した。また、RseP が分泌タンパク質のシグナル配列 (SP) の分解にも働くことを見出したが、この場合もペリプラズム側の分泌タンパク質本体が SP から切り離されることが、SP の分解には必要である。このように、PDZ タンデムは、RseP による選択的基質切断に働き、RseP の負の制御によるストレスに依存した  $\sigma^E$  の活性化に寄与する。

## 2. 研究の目的

大腸菌には RseA や SP と似た一回膜貫通型低分子膜タンパク質 (Small Membrane Protein: SMP) が数十個存在するが、その中のあるものは RseP による切断を受けることを見出した (未発表)。興味深いことに SMP の中には、

ペリプラズム領域を殆ど持たないにも拘わらず、RseP による切断を受けないものも存在する。このことは、PDZ タンデム機能以外にも RseP の基質特異性を決める機構が存在することを強く示唆する。S2P protease では、PDZ ドメインを持たない古細菌ホモログ MjS2P のみ立体構造が明らかになっている。MjS2P では、膜ドメイン内部の protease 活性部位近傍に、細胞質側から挿入したループ領域が存在する。通常ポリペプチドは膜内で  $\alpha$ -helix 構造をとるが、上記ループ領域は  $\beta$ -hairpin 様構造 (以下 MRE  $\beta$ -loop: membrane re-entrant  $\beta$ -loop) をとる点で極めてユニークな特徴を持ち、また、保存されていることから酵素機能に関与することが推定される。実際、MRE  $\beta$ -loop 領域の欠損は、RseP の基質切断機能を失わせる (未発表)。RIP の基質となる膜タンパク質の膜貫通 (Trans-Membrane: TM) 領域も  $\alpha$ -helix を形成するが、一般に  $\alpha$ -helix はプロテアーゼ耐性であり、基質 TM 領域は伸びた状態へと変換されて切断されると考えられるが、詳細は不明である。本研究の目的は、MRE  $\beta$ -loop が基質 TM 領域の特異的認識において果たす役割を明らかにすることである。加えて、MRE  $\beta$ -loop に隣接する C1N 領域も複数の  $\beta$ -strand を持つことが予想され、これについても解析を行う。

## 3. 研究の方法

S2P ファミリープロテアーゼに保存された特異な膜内  $\beta$ -loop 構造並びに隣接する C1N 領域に注目し、以下のアプローチにより、基質の特異的認識や切断に果たす役割を分子レベルで明らかにする。

(1) RseP の基質認識における MRE  $\beta$ -loop の機能の解析

**基質切断機能と特異性への影響:** MRE  $\beta$ -loop 領域を対象にスキニングによる変異導入を行い基質切断への効果をシステムティックに調べる。一般的な Ala、Cys 残基等への置換とともに、特に MRE  $\beta$ -loop の 2 次 (高次) 構造変化の影響を調べるために 2 次構造を壊す Pro 残基への置換を行う。解析には、定量的な切断解析が可能であるモデル基質 HA-MBP-RseA148 (RseA の細胞質領域を | HA(haemagglutinin tag)-MBP(maltose binding protein)ドメイン (約 40 kDa) に置換した RseA の派生体で、RseA ペリプラズム側領域の欠失により DegS 非依存的に切断を受ける) をベースとして、TM 領域のみを他の切断可能な配列に入れ替えた複数のモデル基質を用いる。切断可能な TM 領域としては、これまでに見出した RseA TM や LacY TM1 に加え、別途見出している small membrane protein を含む新規基質の TM も用いる。MRE  $\beta$ -loop が基質選択性に関わるならば、変異の中には基質特異的な影響を示すものが存在することが期待される。実際予備的に、RseA TM の切断を強く阻害するにも拘わらず、

LacY TM1 の切断には影響しない MRE  $\beta$ -loop 変異を見出し、MRE  $\beta$ -loop が基質選択性に関わる可能性は極めて高い。変異の効果は、pulse-chase 実験により詳細に調べる。なお、上記実験は、既に確立しているプロテアーゼ感受性試験や膜不透過性試薬を用いた修飾実験により MRE  $\beta$ -loop 変異が RseP 構造に大きな影響を及ぼさないことを確認したうえで行う。

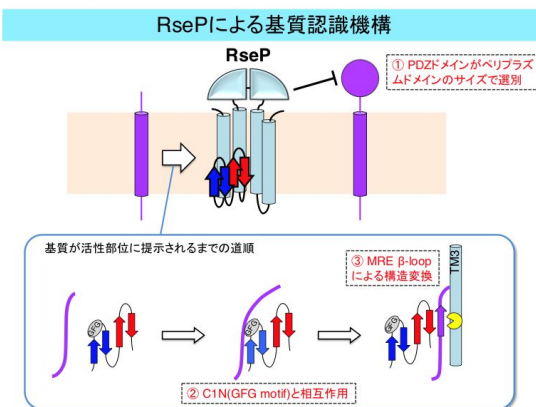
**RseP-基質相互作用への影響:** 上記で作製した MRE  $\beta$ -loop 変異体について、基質との相互作用を以下の方法で調べることで、RseP-基質相互作用に及ぼす変異の効果を明らかにする。(a) 共免疫沈降実験。上記のモデル基質と C 末端に His<sub>6</sub>-Myc タグを持つ RseP を共発現した株から膜分画を調整し、界面活性剤で可溶化した後、基質或いは RseP に付加したタグの抗体で沈殿回収し、共沈降を調べる。(b) *in vivo* 光架橋法による解析。MRE  $\beta$ -loop 領域にシステムティックに pBPA を導入し、共発現したモデル基質との架橋を検出する。(c) ジスルフィド結合形成による解析。光架橋法で架橋が確認された MRE  $\beta$ -loop の残基を Cys 残基に置換した RseP と、TM 領域にシステムティックに Cys 残基を導入したモデル基質を共発現し、細胞を酸化剤処理することでジスルフィド結合形成を誘導し、検出する。これにより、MRE  $\beta$ -loop が基質 TM のどの部位と直接相互作用するかを明らかにする。上記(b), (c)いずれにおいても  $\beta$ -strand 付加により MRE  $\beta$ -loop と基質が相互作用していれば、架橋は  $\beta$ -構造を反映して規則的な位置で観察されることが推測される。

#### 4. 研究成果

(1) 変異解析の結果 RseP MRE  $\beta$ -loop のいくつかの変異は、基質特異的な切断阻害を示し、この領域が選択的基質切断に関わることが示唆された。また、共免疫沈降実験やクロスリンク実験の結果、ループ領域が基質の膜貫通領域と直接相互作用することが強く示唆された。さらに、基質膜貫通領域のヘリックス構造を不安定化させる変異により、RseP のループ領域の変異体による基質切断がアリル特異的に回復した。これらの結果等を踏まえ、「MRE  $\beta$ -loop は、基質の膜貫通領域と  $\beta$  ストランド付加機構により特異的に相互作用することで切断を受にくい  $\alpha$  ヘリックス構造から伸びた  $\beta$  ストランド構造への変化を促し、RseP 活性部位へと提示する」とのモデルを提唱した。MRE  $\beta$ -loop の機能は、PDZ フィルターに加えて基質選別チェックポイントとして働くものと考えられる。

(2) 上記の結果を踏まえてさらに解析を進め、RseP の MRE  $\beta$ -loop に隣接する領域には、*mjS2P* にはない挿入配列が存在すること、この領域が group I サブファミリーに属するバクテリアの S2P ホモログにおいて保存されて

いることを見出した。この領域が RseP の C1 ループ内の N 末端側領域に存在することから C1N と命名し、その機能を解析した。その結果、C1N が、a) MRE  $\beta$ -loop が正常な機能や構造を取ることをサポートし、一方、b) C1N 領域内部の GFG モチーフ領域で MRE  $\beta$ -loop とは別に基質と相互作用する、という 2 つの役割を果たしている事を示し、MRE  $\beta$ -loop と  $\beta$  シート様構造を作って機能する可能性を示唆した。



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

- ① Mori, H., Sakashita, S., Ito, J., Ishii, E., and Akiyama, Y. (2018) Identification and characterization of a translation arrest motif in VemP by systematic mutational analysis. **J. Biol. Chem.** 293, 2915-2926. DOI: 10.1074/jbc.M117.816561
- ② Miyazaki, R., Myougo, N., Mori, H. and Akiyama, Y. (2018) A photo-cross-linking approach to monitor folding and assembly of newly synthesized proteins in a living cell. **J. Biol. Chem.** 293, 677-686. DOI:10.1074/jbc.M117.817270
- ③ Daimon, Y., Iwama-Masui, C., Tanaka, Y., Shiota, T., Suzuki, T., Miyazaki, R., Sakurada, H., Lithgow, T., Dohmae, N., Mori, H., Tsukazaki, T., Narita, S.-i., and Akiyama, Y. (2017) The tetratricopeptide repeat (TPR) domain of BepA is required for productive interaction with substrate proteins and the  $\beta$ -barrel assembly machinery (BAM) complex. **Mol. Microbiol.** 106, 760-776. DOI:10.1111/mmi.13844
- ④ Akiyama, K., Hizukuri, Y., and Akiyama, Y. (2017) Involvement of a conserved GFG motif region in substrate binding by RseP, an *Escherichia coli* S2P protease. **Mol. Microbiol.** 104, 737-751.

DOI: 10.1111/mmi.13659

- ⑤ Miyazaki, R., Yura, T., Suzuki, T., Dohmae, N., Mori, H., and Akiyama, Y. (2016). A novel SRP recognition sequence in the homeostatic control region of heat shock transcription factor  $\sigma^{32}$ . **Sci. Rep.** 6, 24147. DOI: 10.1038/srep24147
- ⑥ Akiyama, K.<sup>a</sup>, Mizuno, S.<sup>a</sup>, Hizukuri, Y., Mori, H., Nogi, T., and Akiyama, Y. (2015). Roles of the membrane-reentrant  $\beta$ -hairpin-like loop of RseP protease in selective substrate cleavage. **eLife** 4, e08928. <sup>a</sup> equally contributed DOI:10.7554/eLife.08928
- ⑦ Ishii, E., Chiba, S., Hashimoto, N., Kojima, S., Homma, M., Ito, K., Akiyama, Y., and Mori, H. (2015). Nascent chain-monitored remodeling of the Sec machinery for salinity adaptation of marine bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 112, E5513–E5522. DOI:10.1073/pnas.1513001112
- ⑧ Daimon, Y., Narita, S.-i., and Akiyama, Y. (2015). Activation of TA system toxins suppresses lethality caused by the loss of  $\sigma^E$  in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 197, 2316-2324. DOI:10.1128/JB.00079-15.

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① 三宅拓也、檜作洋平、秋山芳展：細菌の表層ストレス応答活性化を担う膜内切断プロテアーゼ RseP の新規機能調節領域の解析。「新生鎖の生物学」第 4 回若手ワークショップ、京都、2017 年 8 月 29-31 日
- ② Akiyama, Y.: Regulation of *E. coli* heat shock response regulator  $\sigma^{32}$  via SRP protein targeting pathway. 23rd East Asia Joint Symposium/15th Cross-Strait Symposium on Biochemical Research/ 13th Symposium of the Frontiers of Biomedical Sciences, Taipei, Taiwan, October 18-20, 2016.

Akiyama, K., Mizuno, S., Hizukuri, Y., Mori, H., Nogi, T., and Akiyama, Y.: Analysis of the conserved membrane-reentrant loop of RseP, an intramembrane-cleaving protease. The 13th International Student Seminar, Kyoto, Japan, March 3-7, 2015.

秋山芳展：大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の特徴的な膜内挿入ループ領域の機能解析。2014 年度国立遺伝学研究所

研究会「単細胞の増殖メカニズムの先端的研究」<sub>3</sub>、三島、2015 年 3 月 23 日 - 24 日

秋山光市郎、水野慎也、檜作洋平、森 博幸、禾 晃和、秋山芳展：S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の膜内挿入ループ領域を介した基質選別。第 12 回 21 世紀大腸菌研究会、大津、2015 年 6 月 4 日-5 日

Akiyama, K., Mizuno, S., Hizukuri, Y., Mori, H., Nogi, T., Akiyama, Y.: Analysis of the conserved membrane-reentrant loop of RseP, an intramembrane-cleaving protease. The 22nd East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Okinawa, Japan, November 11-14, 2015.

秋山光市郎、水野慎也、檜作洋平、森 博幸、禾 晃和、秋山芳展：S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の膜内挿入ループ領域を介した基質選別。第 38 回日本分子生物学会大会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2015 年 12 月 1 日-4 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 芳展 (AKIYAMA, Yoshinori)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：10192460

(2)研究分担者

森 博幸 (MORI, Hiroyuki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・  
准教授

研究者番号：10243271