

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K15091
研究課題名(和文)細菌ロンボイドプロテアーゼGlpGによるべん毛 III型分泌装置の機能制御機構の解析
研究課題名(英文)Analysis of regulation mechanism of flagellar type III secretion apparatus mediated by bacterial rhomboid intramembrane protease GlpG
研究代表者
檜作 洋平(Hizukuri, Yohei)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教
研究者番号：70568930
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は大腸菌RhomboidプロテアーゼGlpGの生理的切断基質候補として見出されたべん毛III型分泌装置構成因子FliOについて、GlpGによるFliO切断の詳細な分子機構を明らかにしつつ、その切断の生理的意義を追求するものである。本研究によりGlpGがFliOの切断を介して膜中での品質管理を担う可能性を示唆した。また、特筆すべき点として、本研究過程において、FliOが切断だけでなく、膜外空間でのN末端アシル化修飾を受けることを見出した。このような翻訳後修飾は例がなく、FliO、ひいては膜タンパク質の新奇な翻訳後機能調節機構研究へと展開するための基盤となりうる成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜内切断プロテアーゼはアルツハイマー病やパーキンソン病などの重大な遺伝病の発症メカニズムや微生物病原性などに深く関わるが、その普遍的メカニズムや細胞機能における役割の理解は未だ十分ではない。その分子的・酵素的理解は創薬開発にもつながる重要な課題である。本研究では大腸菌RhomboidプロテアーゼGlpGの新奇基質FliOの切断の詳細な分子機構とともにその機能調節に関わる生理的役割を明らかにした。FliOはO157など病原性細菌の毒性発揮にも関与するIII型分泌装置の形成に必須の因子であり、その機能発現・維持機構の一端を明らかにすることは細菌感染医療分野においても大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：Regulated intramembrane proteolysis are found in all kingdoms of life from bacteria to human and known to be involved in various important cellular events. FliO, one of the components of the flagellar type III secretion apparatus, has been found to receive proteolytic cleavage by the rhomboid intramembrane protease homologue GlpG in *Escherichia coli*. Purpose of this study is to clarify the detailed mechanism and its physiological role of the intramembrane proteolysis of FliO by GlpG. This study revealed that GlpG may have a role for quality control of FliO in the membrane through its cleavage. Surprisingly, this study uncovered that FliO receives not only intramembrane proteolysis by GlpG but also novel N-terminal modifications in the extramembrane space. Such post-transcriptional modification has never been reported. These findings will become the basis for the research on a novel mechanism for post-transcriptional regulation of function of FliO and other membrane proteins.

研究分野：膜タンパク質動態化学

キーワード：膜タンパク質 膜内切断プロテアーゼ Rhomboid ベん毛 III型分泌装置 翻訳後修飾 アシル化 品質管理

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は翻訳された後に修飾や切断などの様々な翻訳後プロセッシングを受ける。この翻訳後プロセッシングはタンパク質の機能発現、品質管理、細胞機能調節等において重要な役割を持つ。RIP (Regulated Intramembrane Proteolysis: 制御された膜内部でのタンパク質分解) は、膜内切断プロテアーゼによって膜タンパク質が膜貫通領域内部で加水分解されるという特殊な現象であり、例えば不要な膜タンパク質の除去による膜の品質管理や、情報伝達分子の膜内切断を介した生体膜を越えたシグナル伝達システムなどに利用される。RIP はコレステロール代謝制御やアルツハイマー病の病原因子となるアミロイド前駆体の生成に関与するなど遺伝病との関連が深く、また多様な病原性微生物の病原性発揮に関与するなど、医学的・社会的にも重要性の高い多彩な生体プロセスに関与する。

Rhomboid ファミリー膜内切断プロテアーゼは、真核生物では EGF シグナリングの活性化やパーキンソン病の病原因子ともなる PINK1 の機能調節に関わるなど、その切断基質及びその切断の生理的意義が数多く報告されている。一方で、原核生物ではその生理的切断基質やその切断の意義についてはほとんどわかっていなかった。Rhomboid プロテアーゼの研究は、大腸菌ホモログである GlpG において、その基質認識・切断機構の解析や、酵素学的・構造学的解析が積極的に進められてきたが、研究開始当時は GlpG の本来の生理的切断基質は未だ同定されておらず、その機能に関しても一切不明であった。本研究代表者の所属する研究室では大腸菌を材料とした膜内切断プロテアーゼの研究を精力的に続けており、世界に先駆けて GlpG の機能・構造解析を手掛けてきた。そこで大腸菌全遺伝子から選別した 200 種程の膜タンパク質を対象とした網羅的スクリーニングにより GlpG の生理的切断基質の同定を試み、その候補としてべん毛 III 型分泌装置の構成因子である FliO を見出した。

べん毛は細菌の持つ遊泳器官であり、細菌は菌体外に生えたらせん状のべん毛を回転させることで自由に遊泳する。べん毛の構築にはその根元にあるべん毛基部体に含まれる III 型分泌装置が必須である。III 型分泌装置は何十種もの遺伝子群が協同して構築される超分子複合体であり、べん毛構築に必須であると共に、O157 などの病原性大腸菌やサルモネラ菌などの毒素分泌などにも関与する。FliO は III 型分泌装置に含まれる膜タンパク質の一つであり、III 型分泌装置の構築に必須の因子とされる。べん毛 III 型分泌装置の構築過程に関しては不明な点が多く、研究開始当時は、FliO の役割もあまり良くわかっていなかった。本研究代表者は GlpG の生理的切断基質候補として予備的に FliO の遺伝学的、生化学的解析を進め、FliO が確かに GlpG の活性依存的に切断を受けることを示唆する結果を得ていた (Hizukuri et al., unpublished)。FliO はべん毛構築過程に必須の因子であるため、GlpG による FliO の膜内切断には生理的な意義があると予測した。

2. 研究の目的

これまでの背景に基づき、本研究では大腸菌 Rhomboid プロテアーゼホモログ GlpG の生理的切断基質候補として新たに見出されたべん毛 III 型分泌装置構成因子である膜タンパク質 FliO について、GlpG による FliO の切断の詳細な分子機構を明らかにするとともに、FliO の切断がべん毛 III 型分泌装置の機能発現・維持にどう関与するのかという生理学的意義を追求する。また、Rhomboid プロテアーゼを含めた膜内切断プロテアーゼ、膜関連プロテアーゼの酵素学的性質の解明も目指す。

3. 研究の方法

本研究では、これまでの予備的結果を受け、大腸菌 Rhomboid プロテアーゼホモログ GlpG による生理的切断基質候補 FliO の切断の解析を中心に研究を進める。パルスチェイス法による細胞内タンパク質動態解析、質量分析によるタンパク質性状解析、光架橋法による生体内タンパク質相互作用解析、系統的変異解析といった遺伝学的、生化学的、生物物理学的解析を進めることで、GlpG による FliO の切断の詳細な分子機構を明らかにする。また、GlpG のみならず膜内切断プロテアーゼ、膜関連プロテアーゼの *in vivo*、*in vitro* 両面での定量的プロテアーゼ活性評価系を構築し、酵素反応速度論的解析に取り組む。

4. 研究成果

(1) GlpG による FliO 切断における基質認識・切断機構の解明とその生理的意義の追求

① *in vivo* における FliO 分子種の動態解析

in vivo において FliO は GlpG のプロテアーゼ活性依存的に SDS-PAGE 上で移動度の異なる複数の分子種を生じる。そこで 35S で放射線標識した FliO のパルスチェイス解析系を構築し、

大腸菌細胞内における各分子種の挙動を追跡したところ、FliOはGlpGの活性非依存的になんらかの修飾を受け、一方で活性依存的に切断断片を生じることが示唆された。そこでFliO-His10のNi-affinity精製系を構築し、理化学研究所の堂前直博士との共同研究により、精製したFliO各分子種の質量分析(MALDI-TOF MS, LC-MS/MS)を行った。その結果、FliOは複数のN末端アシル化修飾を受け得ること、そしてGlpGによって膜貫通領域近傍で二か所切断を受け得ることを見出した。これらの結果から、FliOは細胞質内で発現し、膜挿入された後、複数のN末端修飾とGlpGによる切断を独立あるいは連続的に受ける、というモデルを立てた(図)。この結果は、FliOがGlpGによる切断だけでなく、予想もしなかった全く新奇な膜外空間でのN末端アシル化修飾を受けることを示唆する。このような翻訳後多段階プロセッシングは世界にも報告例のない現象であり、FliO、ひいては細菌膜タンパク質の新奇な翻訳後機能調節機構の研究へと展開するための基盤となるうる成果である。

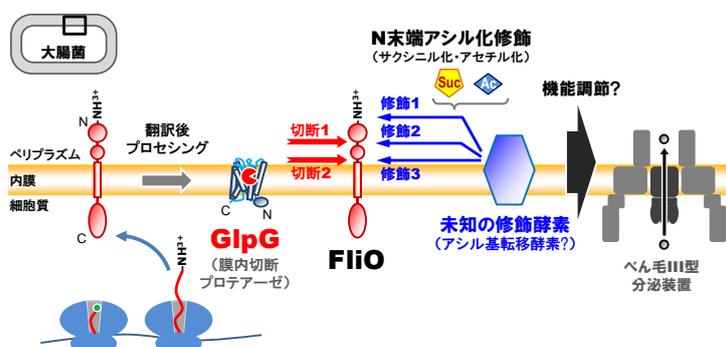


図. FliOの翻訳後多段階プロセッシングモデル

② FliOの基質認識モチーフ、ヘリックス不安定化領域の解析
Rhomboïdファミリープロテアーゼの基質認識条件として、切断部位周辺の特定のアミノ酸配列(基質認識モチーフ)及び基質膜貫通領域のヘリックス不安定性の二点が重要であることが知られている。これらを検証するために定量的な解析が可能なFliOモデル基質を構築し、それを用いて変異体解析を行うことで、これら二点の条件がGlpGによるFliOの効率的な切断に重要であることを示した。この結果はFliOがGlpGの切断基質であることを支持するものである。

② FliOの基質認識モチーフ、ヘリックス不安定化領域の解析

Rhomboïdファミリープロテアーゼの基質認識条件として、切断部位周辺の特定のアミノ酸配列(基質認識モチーフ)及び基質膜貫通領域のヘリックス不安定性の二点が重要であることが知られている。これらを検証するために定量的な解析が可能なFliOモデル基質を構築し、それを用いて変異体解析を行うことで、これら二点の条件がGlpGによるFliOの効率的な切断に重要であることを示した。この結果はFliOがGlpGの切断基質であることを支持するものである。

③ 部位特異的 *in vivo* 光架橋法による相互作用解析

UV反応性アミノ酸アナログpBPAを任意のアミノ酸残基に導入したGlpG及びFliO変異体を用いた生体中における部位特異的光架橋解析を行い、GlpGとFliO間の相互作用を示唆する架橋結果を得た。この結果はGlpGがFliOを直接的に切断することを示唆する。また、未同定のGlpGとの架橋産物も複数得ており、未知の切断基質や機能調節因子等、GlpGによる基質切断の分子機構解明の手掛かりとなることが期待される。

④ GlpGがFliOを切断することの生理的意義の追求

軟寒天培地上での菌の遊泳を指標にFliOのIII型分泌装置形成能を評価する系を用いて、FliOの機能に対するGlpGによるFliO切断の影響を検証した。その結果、GlpGによるFliOの切断はFliOの機能、すなわちべん毛形成能には必須ではないことが分かった。一方で、FliOは細胞内の蓄積量が低く保たれ、過剰なFliOは菌の運動能や生育に阻害的に働く性質を持つことが示唆された。また、GlpGによる切断後の断片を模したFliO変異体は機能(III型分泌装置形成促進能)を保持していたが、これらの変異体は細胞内での蓄積量が大きく減少していた。これらの結果からGlpGによる切断によって切除されるFliOのN末端領域は、FliOの機能には必須ではないが、タンパク質の安定性に寄与することが示唆された。これらの実験事実から、GlpGによるFliO切断の生理的意義として、運動能や生育の阻害を引き起こすなど菌にとって潜在的に負の要因となりうる過剰なFliOが細胞内に蓄積した場合などに、GlpGがFliOを切断することで不安定化・分解を促し、細胞内FliOの蓄積量と品質を調節することで膜中での品質管理を担うといった役割が考えられる。

以上、①~④の成果は、本研究の目的であるGlpGによるFliOの詳細な切断機構の理解を促すと共に、FliO切断の生理的意義について一つのモデルを提案するものである。これらの内容をまとめ、学術雑誌に投稿準備中である。

(2) *in vitro* 再構成系での膜内切断プロテアーゼによる基質切断の反応速度論的解析の構築

GlpG同様に膜内切断プロテアーゼに分類される大腸菌RsePの*in vitro*切断アッセイ系の構築を試みた。FRET蛍光ペプチドをデザイン・合成し、精製RsePタンパク質を用いて、RseP活性を定量的に評価するリアルタイム蛍光測定アッセイ系を確立した。また、上記①の解析においてFliOの精製系を確立している。これらの結果は*in vitro*でのGlpGによるFliO切断の再構成系を用いたkinetics解析の方法論的基盤となる。

(3) 大腸菌膜結合型プロテアーゼHtpXの*in vivo*プロテアーゼ活性解析系の構築

大腸菌の膜タンパク質の品質管理に関わる膜結合型プロテアーゼHtpXにおいて、モデル基質を改良し、定量的かつ簡便な*in vivo*プロテアーゼ活性解析系を確立した。この内容で学術雑

誌 *FEBS Letters* に発表した。

本研究開始時点では **FliO** は **GlpG** の新規切断基質候補として捉えられていたが、パルスチェイス解析及び質量分析による詳細な解析により、**FliO** が予想外に複数の **N** 末端の修飾を受けること、さらに **GlpG** による切断も二か所で起こることが示唆された。**FliO** が膜挿入後に多段階のプロセッシング（修飾及び切断）を受け得るということは全く予期していなかったことであり、**FliO** がこのような非常に複雑な成熟・分解過程を経ることがべん毛 **III** 型分泌装置の構築・機能においてどのような意義を持つのか、という新たな学術的視点を与えるものである。また、今回明らかにした膜タンパク質の **N** 末端アシル化修飾という現象はこれまでほとんど報告例がなく、どのような修飾酵素が、どのような分子機構で、何のためにこのような修飾反応を起こすのか、現時点では全く不明である。これらの疑問を明らかにしていくことは、膜タンパク質の機能発現・秩序維持機構について新しい概念を生み出す可能性がある。これらの知見は膜タンパク質の新たな翻訳後機能調節機構という新奇性の高い研究分野の分子的基盤となりうるものであり、本研究課題の特筆すべき研究成果であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 檜作 洋平	4. 巻 59
2. 論文標題 膜内切断プロテアーゼの基質認識・切断機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 079 ~ 083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.59.079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamano K, Wang C, Sarraf SA, Munch C, Kikuchi R, Noda NN, Hizukuri Y, Kanemaki MT, Harper W, Tanaka K, Matsuda N, Youle RJ.	4. 巻 7
2. 論文標題 Endosomal Rab cycles regulate Parkin-mediated mitophagy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e31326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.31326	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshitani K, Hizukuri Y, Akiyama Y	4. 巻 593
2. 論文標題 An in vivo protease activity assay for investigating the functions of the Escherichia coli membrane protease HtpX	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 842 ~ 851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13368	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yohei Hizukuri, Takehiro Suzuki, Kosuke Terushima, Naoshi Dohmae, Yoshinori Akiyama
2. 発表標題 Multistep post-translational proteolysis/modification of a component of the bacterial flagellar type III secretion apparatus
3. 学会等名 International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yohei Hizukuri, Takehiro Suzuki, Kosuke Terushima, Naoshi Dohmae, Yoshinori Akiyama
2. 発表標題 A component of the bacterial flagellar type III secretion apparatus receives multistep post-translational processing
3. 学会等名 第56回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 檜作 洋平, 鈴木 健裕, 照島 功祐, 堂前 直, 秋山 芳展
2. 発表標題 細菌べん毛III型分泌装置構成因子の翻訳後多段階プロセッシング
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 檜作 洋平
2. 発表標題 膜内切断プロテアーゼRsePの新規切断基質の探索及びkinetics解析の試み
3. 学会等名 2018年度遺伝研研究会「単細胞生物における細胞装置の機能と連携」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yohei Hizukuri, Takehiro Suzuki, Kosuke Terushima, Naoshi Dohmae, Yoshinori Akiyama
2. 発表標題 A Component of the Bacterial Flagellar Type III Secretion System Receives Proteolysis by a Rhomboid Family Protease in the Membrane
3. 学会等名 International Symposium 'Harmonized supramolecular motility machinery and its diversity' (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 檜作 洋平、照島 功祐、秋山 芳展
2. 発表標題 A component of the flagellar type III secretion system receives proteolytic cleavage by rhomboid protease GlpG inside the membrane
3. 学会等名 日本生物物理学会第55回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 檜作 洋平、照島 功祐、秋山 芳展
2. 発表標題 細菌RhomboidファミリープロテアーゼGlpGはべん毛III型分泌装置の構成因子の分解に関与する
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 檜作 洋平、秋山 芳展
2. 発表標題 FRET蛍光ペプチドを用いた細菌S2Pファミリー膜内切断プロテアーゼのリアルタイム切断kinetics計測系の構築
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 檜作 洋平、秋山 芳展
2. 発表標題 Kinetic analysis of the proteolytic reaction catalyzed by S2P family intramembrane protease RseP using a FRET-based real-time assay system
3. 学会等名 第57回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 檜作 洋平
2. 発表標題 大腸菌膜内切断プロテアーゼRsePの切断基質探索から明らかとなってきた新奇生理機能
3. 学会等名 宮崎大学 第1回微生物化学研究室セミナー
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学ウイルス・再生医科学研究所 生命システム研究部門 生体膜システム分野ホームページ https://infront-biomembrane.jp/ 京都大学ウイルス・再生医科学研究所秋山研究室ホームページ http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/akiyama/index.html</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考