

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657128

研究課題名（和文）

SRP 経路を介した膜局在化による熱ショック転写因子シグマ 32 の分解機構

研究課題名（英文）

Degradation mechanisms of sigma 32 by membrane targeting via SRP pathway

研究代表者

森 博幸 (MORI HIROYUKI)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：10243271

研究成果の概要（和文）：大腸菌の熱ショック応答転写因子シグマ 32 は、短寿命であり、膜結合型 ATP 依存性プロテアーゼ FtsH によって主に分解を受けることが知られているが、そのメカニズムは不明な点が多い。最近、研究協力者の由良は、遺伝学的解析から、膜タンパク質の生合成に関わる SRP 経路が、シグマ 32 の分解に関与するとの知見を得ていた。本研究では、シグマ 32 を対象として、部位特異的 *in vivo* 光架橋法を用い、シグマ 32 と SRP の構成因子 Ffh が、生きた細胞内で直接接近していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In *Escherichia coli.*, a heat shock responsible transcription factor, sigma 32 is mainly and rapidly degraded by a membrane-bound ATP dependent protease, FtsH. However, precise molecular mechanisms of its degradation remain poorly understood. Using genetic analysis, Dr. Takashi Yura, one of our collaborators recently proposed that the SRP pathway involved in membrane protein biogenesis plays a significant role in the sigma 32 degradation. In this study, we carried out site-specific *in vivo* photo crosslinking analysis targeted to the sigma 32 and found that Ffh protein, a member of the SRP is in close proximity to the sigma 32.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・細胞生物学

キーワード：生体膜

1. 研究開始当初の背景

σ^{32} は半減期 1 分と極めて短寿命の熱ショック応答転写因子であり、*in vivo* では膜結合型の ATP 依存性プロテアーゼ FtsH により速やかに分解を受ける。 σ^{32} により制御される遺伝子群（分子シャペロンやプロテアーゼ等をコードしている）の発現は、熱ショックによる発現上昇後、分子シャペロン GroEL や DnaK によってフィードバック阻害を受ける。これら分子シャペロンの働きにより σ^{32} の分解が促進されると考えられているが、この分解制御機構は未だ不明な点が多い。実際、精

製可溶性 FtsH タンパク質を用いた σ^{32} の *in vitro* 実験においては、GroEL, DnaK 等の添加による分解の促進は観察されず、更なる未知因子の存在が示唆されていた。

近年、研究協力者の由良らは、分子シャペロンに依存したフィードバック阻害が起こらなくなる染色体上の変異を分離することにより、膜タンパク質の膜へのターゲットに関わる因子 FtsY (SRP レセプター) がこの制御に関与するとの知見を得た。更に、トランスロコン (タンパク質膜透過装置) の中心因子 SecY 変異体を用いた解析から、膜タンパ

ク質の膜への組み込み反応に異常を持つ *secY* 変異株を用いた時に、分子シャペロンによるフィードバック阻害が起こらなくなることを見いだした。一方、タンパク質の分泌に不全を持つ *secY* 変異株を用いた際にはそうした効果は観察されなかった。また、 σ^{32} は、精製シグナル認識粒子 (SRP) と直接相互作用できるが、フィードバック阻害不全の σ^{32} 点変異体では、SRP との相互作用能が劇的に低下することも明らかとした。以上の結果から、「 σ^{32} は、SRP 経路により細胞質膜上のトランスロコンにターゲットされ、その後 FtsH に受け渡されて速やかに分解を受ける。分子シャペロンは、この過程を促進する。」との全く新しい作業仮説 (右図) を提案した。しかしながら、上記の

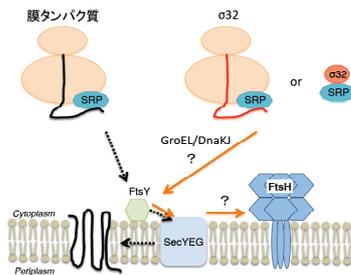
遺伝学的知見は、この新規モデルを強く支持しているものの、各因子との *in vivo* での直接的な相互作用を含めた実験的検証は必ずしも十分とは言えない。加えて、1) σ^{32} と SRP は、いつ相互作用するのか? (翻訳完了後か翻訳途上時か?) 2) 分子シャペロンは、どの段階でどのように機能しているのか? 3) SecY と σ^{32} は、直接相互作用しているのか? 4) 膜へのターゲットの意義は何か? 5) FtsH への σ^{32} 受け渡しの機構は? 等、興味深い疑問点がたくさん残されている。

2. 研究の目的

上記のように由良らによって提案された上記作業仮説の実証を目指して、 σ^{32} 分子をターゲットとして、網羅的な部位特異的 *in vivo* 光架橋実験を進める。

本研究においては、米国のシュルツらが開発した手法を利用する。変異型 tRNA 合成酵素と変異型 tRNA を発現する菌株を利用する事で、目的タンパク質内に導入した amber 変異の位置に、部位特異的に光反応性アミノ酸アナログ pBPA (p ベンゾイルフェニルアラニン) を取り込ませる事が出来る。この pBPA 導入型タンパク質を発現する大腸菌を、直接紫外線照射する事により、*in vivo* で、タンパク質上の pBPA に近接する因子との間に化学架橋を形成させる事が可能となる。この実験系を利用することで、生きた細胞内で生じている一過的なタンパク質間相互作用をアミノ酸残基の空間分解能で解析できることが、我々の先行実験等から明らかとなっている。

上記実験手法に加え、タンパク質合成の途



中の状態をミミックした翻訳途上鎖を *in vivo* で安定に作製する方法 (方法の項で詳しく記載) を組み合わせることで、合成途上の色々な段階の σ^{32} 翻訳途上鎖と相互作用するタンパク質分子を光架橋の手法により網羅的に同定する。平行して、完全長 σ^{32} を用いて同様の実験を進める。

以上の実験により、 σ^{32} と SRP の因子や SecY トランスロコンとの物理的近接を明らかにする。

更には、Pulse-chase 実験と光架橋法を組み合わせる事により、分子シャペロン GroEL, DnaK と σ^{32} が相互作用するタイミングを明らかにし、分子シャペロンによるフィードバック阻害の作用機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

目的の項でも記したように、以下の2つの方法により解析を進める。

(1) 合成途上鎖を用いた解析

SRP による膜タンパク質のトランスロコンへのターゲットは、タンパク質の合成と共役して起こると考えられている。よって、 σ^{32} の膜へのターゲット機構も同様に翻訳と共役して生じている可能性が考えられる。そこで、SecM タンパク質が持つ翻訳停止配列 (リボソーム内壁との特異的相互作用を介して、生細胞内でタンパク質合成を停止させるアミノ酸配列) を σ^{32} の C 末端領域に付加した融合タンパク質を構築する。これらを細胞内で発現させることにより、長さの異なる合成途上鎖を安定かつ系統的に作製する。この際、 σ^{32} の色々な部位に amber 変異を導入することにより、光反応性アミノ酸アナログ pBPA を様々な部位に取り込ませる。その後、*in vivo* 光架橋実験を行う事で、タンパク質合成の各ステップで、近接するタンパク質因子を同定する。系統的な解析を通して、 σ^{32} の合成から分解に到る細胞内イベントをスナップショットとして切り取り、各ステップでのタンパク質間相互作用を網羅的に解析する。

(2) 完全長 σ^{32} を用いた解析

一般的な膜タンパク質の場合と異なり、 σ^{32} の分解における SRP の関与が、 σ^{32} の翻訳完了後に生じている可能性も十分に考えられる。そこで、完全長の σ^{32} 分子に対しても同様に網羅的な *in vivo* 光架橋実験を進める。

既に述べたように、DnaK, DnaJ, GroEL, SRP, SecY, FtsH 等の因子が σ^{32} の分解に関与する可能性が考えられる。そこで、これらの変異株中で上記架橋実験を行い、変異の架橋形成効率に与える影響等を調査する事で、各因子の役割を検討する。

更には、pulse-chase 実験と組み合わせる事により、架橋形成における時間経過も検討し、相互作用の順序等についても考察を行う。

4. 研究成果

本研究期間中においては、簡便に実験を進める事が可能な完全長の σ^{32} 分子を対象にした *in vivo* 光架橋実験を行った。特に、 σ^{32} 分子内の、シャペロンによるフィードバック制御に関与することが知られている 2.1 領域 (σ^{32} のアミノ末端近傍の領域) に着目して、この領域に系統的に pBPA 変異体を作製し解析を進め、以下のような成果を得た。

(1) 2.1 領域内の幾つかのアミノ酸残基を pBPA に置換した変異体において、これまで相互作用することが知られていた DnaK, DnaJ との架橋に加えて、SRP の構成因子である Ffh と σ^{32} との架橋を検出することに成功した。

(2) Ffh との架橋形成の効率や、架橋バンドの SDS-PAGE 上のパターンは、SRP の膜上レセプターとして働く *ftsY* の変異株や、タンパク質の膜組み込みに関与する *secY* の変異株を用いた際に変化することも見いだした。

(3) フィードバック制御が不全となった σ^{32} 分子内のシスの変異を組み合わせることにより、Ffh との架橋形成の効率やパターンに変化が観察された。

以上の知見は、由良博士によって提案された作業仮説を強く支持する結果であると共に、 σ^{32} と SRP が生きた細胞内で直接近接していることを示す最初の例となった。

(4) 上記の架橋バンドに加え、未同定の架橋バンドも多数検出している。 σ^{32} の分解に、未知の因子が関与している可能性が強く示唆される。これら架橋産物を精製し、質量分析等の手法により相手因子を同定する事により、 σ^{32} の分解過程の全容が明らかにできるものと期待される。現在、架橋複合体の精製系の確立を進めている。

(5) 非常に強力な UV 照射装置を用いた pulse-chase 実験の条件検討も平行して進めている。予備的な実験結果ではあるが、極めて短時間 (1 秒以内) の光照射により有意な架橋バンドを検出することに成功しており、架橋形成効率の時間依存的な変化も確認している。更なる条件検討により、経時的な相互作用の変化を調べる事が可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

代表的なもののみ記載

① 森 博幸、塚崎智也 細菌のタンパク質分泌を促進する膜タンパク質 SecDF の

構造と機能、化学と生物、査読有、51 巻、2013、28-35

- ② Hizukuri, Y. & Akiyama, Y. (2012) PDZ domains of RseP are not essential for sequential cleavage of RseA or stress-induced σ^F activation *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **86**, 1232-1245. 査読有
- ③ Tsukazaki, T.*, Mori, H.*, Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassylyev, D. G., Kohno, T., Maturana, A. D., Ito, K. & Nureki O. (2011) Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature* **474**, 235-238., doi: 10.1038/nature09980. 査読有 *同等貢献
- ④ Saito, A., Hizukuri, Y., Matsuo, E.-i., Chiba, S., Mori, H., Nishimura, O., Ito, K. & Akiyama, Y. (2011) Post liberation cleavage of signal peptides is catalyzed by the S2P protease in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13740-13745., doi: 10.1073/pnas.1108376108. 査読有、
- ⑤ Ito, K., Chadani, Y., Nakamori, K., Chiba, S., Akiyama, Y. & Abo, T. (2011) Nascentome analysis uncovers futile protein synthesis in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, **6**, e28413. 査読有
- ⑥ Chiba, S., Kanamori, T., Ueda, T., Akiyama, Y., Pogliano, K. & Ito, K. (2011) Recruitment of a species-specific translational arrest module to monitor different cellular processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 6073-6078. 査読有

[学会発表] (計 19 件)

代表者が発表した招待講演のみ記載

- ① 森 博幸、塚崎智也、町田裕紀子、三登一人、濡木理、伊藤維昭、秋山芳展、Structure and function of SecDF, a membrane integrated protein translocation enhancing factor. 第 86 回日本細菌学会ワークショップ「細胞構造研究の新展開」2013 年 3 月 19 日、千葉
- ② 森 博幸、橋本成祐、小嶋誠司、本間道夫、秋山芳展、ビブリオ菌のタンパク質分泌マシナリー: SecDF パラログの発現制御機構 第 85 回日本生化学会大会シンポジウム「運動超分子マシナリーの機能メカニズム」2012 年 12 月 15 日、福岡
- ③ 森 博幸、細菌の蛋白質膜透過装置の構造・機能・病原性との関わり、第 48 回細菌学会中部支部会(特別講演)名古屋 2011 年 10 月 21 日-22 日、名古屋
- ④ 森 博幸、塚崎智也、越前友香、秋山芳展、濡木 理、伊藤維昭: 蛋白質膜透過を促

進する膜内在性因子 SecDF の構造と機能
第 84 回日本生化学会大会シンポジウム
「生体膜エネルギー変換装置の超分子科
学」2011 年 9 月 21 日-24 日、京都

- ⑤森 博幸、塚崎智也、越前友香、濡木 理、
伊藤維昭：プロトン駆動力を用いた
SecDF による蛋白質膜透過の昂進機構
第 11 回日本蛋白質科学会年会ワークショ
ップ「細胞膜ダイナミクス：In vitro 再構
成系によるアプローチ」2011 年 6 月 7-9
日、大阪

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/akiyama/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 博幸 (MORI HIROYUKI)
京都大学・ウイルス研究所・准教授
研究者番号：10243271

(2) 連携研究者

秋山芳展 (AKIYAMA YOSHINORI)
京都大学・ウイルス研究所・教授
研究者番号：1092460

(3) 連携研究者

伊藤維昭 (ITO KOREAKI)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：90027334