

## 科学研究費助成事業(科学研究費補助金)研究成果報告書

平成24年 4月 4日現在

機関番号：14301

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19058007

研究課題名(和文) 大腸菌膜タンパク質の機能発現と秩序維持機能

研究課題名(英文) Quality control of *E. coli* membrane proteins

研究代表者

秋山 芳展 (AKIYAMA YOSHINORI)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：10192460

研究成果の概要(和文)：大腸菌膜タンパク質品質管理機構に関わる因子の作用メカニズムと相互作用、並びに生理的役割の全体像を解明することを目的として研究を行い、膜内タンパク質切断に関わる膜プロテアーゼ (RseP, GlpG) の細胞機能及び基質認識機構等について明らかにし、また、分泌タンパク質の膜透過に関わる膜複合体、SecYE (トランスロコン) 及び SecDF の構造を解明して、その作用機構を提唱した。さらに新たな膜ストレス応答関連因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：We studied the structures and functions of cellular factors participating in quality control of *E. coli* membrane proteins. We revealed the cellular functions and substrate recognition mechanisms of intramembrane cleaving proteases, RseP (S2P family) and GlpG (Rhomboid family). We also elucidated the structures of SecYE (translocon) and SecDF, membrane complexes involved in protein translocation, and proposed the mechanism of their actions. In addition, we identified proteins whose functions would be related to 'membrane stress responses'.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	14,400,000	0	14,400,000
2008年度	14,400,000	0	14,400,000
2009年度	14,400,000	0	14,400,000
2010年度	14,400,000	0	14,400,000
2011年度	14,400,000	0	14,400,000
総計	72,000,000	0	72,000,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：膜タンパク質、品質管理、膜プロテアーゼ、ストレス応答、タンパク質膜透過

## 1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は、膜構造を構築する基本的構成因子であるとともに、機能分子として膜を越えた情報や物質の移行を媒介し、膜機能に必須の役割を果たしている。従って、膜タン

パク質が正しく機能を発現するための「品質管理」は、膜機能、ひいては細胞機能の維持に欠くことが出来ない。しかしながら、細菌膜におけるタンパク質の品質管理や動態についての知見は極めて限られたものであった。我々は、本研究に先立って行ってきた、

大腸菌における膜タンパク質の生合成や分解の過程に関する研究を統合・発展させ、膜ストレスに対する細胞の応答も含め、より広い視野から膜タンパク質の品質管理機構を明らかにし、理解することを意図して研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では、膜タンパク質の生合成、機能維持と制御、分解等の諸過程をグローバルな「品質管理機構」としてとらえ、これに関わる因子の作用メカニズムと生理的役割の全体像を解明することを目的とした。特に、膜タンパク質の正しい膜組み込みと機能的構造の形成における他タンパク質膜透過装置と関連因子の役割、膜プロテアーゼによる膜タンパク質の分解・切断による膜からの除去や機能制御等の過程、さらには異常な膜タンパク質の蓄積等により生じる「膜ストレス」の実態とそれに対する細胞の応答に注目し、その分子機構とこれに関わる緒因子の相互作用に注目して研究を進めた。

## 3. 研究の方法

モデル生物大腸菌を材料とし、対象タンパク質の精製、*in vitro*再構成実験、クロスリンク実験、パルスチェイス実験、変異株の分離と変異タンパク質の解析といった、様々な生化学、細胞生物学、遺伝学的手法に加え、X線結晶構造解析等による構造生物学的手法やコンピューターシミュレーションも駆使した幅広いアプローチにより、以下問題に取り組んだ。

(1) 表層タンパク質の biogenesis/assembly 機構の解析。膜タンパク質の正しい膜組み込みや分泌タンパク質膜透過に働くトランスロコン (SecYE (G)) と関連因子 (SecDF) の構造を決定し、構造・機能相関を明らかにすることで、トランスロコンの役割の解明を目指した。

(2) 表層 (膜) ストレス応答機構と膜プロテアーゼの役割の解析。膜タンパク質の特異的切断による機能制御に関わる RIP プロテアーゼ RseP・GlpG、や、膜タンパク質品質管理に関わるプロテアーゼ FtsH・HtpX とその相互作用因子の構造と機能制御機構の解明、さらに、異常な膜タンパク質によるストレス応答誘導機構の解明を目指した。

## 4. 研究成果

(1) シグマ E 経路表層ストレス応答において膜を越えたストレスシグナルの伝達に必須

の役割を果たす S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP、並びに、膜を基盤とした様々な生体機能に関わる Rhomboid ファミリー膜内切断プロテアーゼのホモログ GlpG の活性部位の環境について、活性部位周辺領域への Cys 残基導入と、その膜不透過性試薬による修飾を指標としたシステムティックな解析を行い、これらプロテアーゼの活性部位が脂質二重層内部に存在するドメイン内にある事を示した。

(2) 構造解析により、RseP が二つの PDZ ドメインを持つこと、これら PDZ ドメインが circular permutate した一次配列を持つことを示した。さらに、変異解析からこれら特に N 末端側の PDZ ドメイン (PDZ-N) へのリガンド結合が RseP の機能制御に関わることを示唆した。また、RseP の基質結合に重要な領域として、3 番目の膜貫通領域 (TM3) を同定し、TM3 が直接基質結合に関わる可能性を示した。さらに、RseP による基質切断に重要な、基質膜貫通部位中の Helix-dstablizing 残基が、RseP の基質との相互作用を促進することを明らかにした。

(3) GlpG の結晶構造から、その第 1 及び第 2 膜貫通領域 (TM1 と TM2) の間に存在するペリプラズムループ L1 が酵素の本体から外側へ大きく突き出した特異な構造を持つことが示された。我々は L1 が部分的に膜に埋もれており、L1 に存在する保存性の高い WR モチーフが GlpG のプロテアーゼ活性発現に重要であることを示し、L1 ループが脂質との相互作用を通じて、GlpG の活性調節に関与する可能性を示唆した。また、GlpG による基質の切断は、基質膜貫通領域の Helix-dstablizing 残基により促進されること、予想外に局所的親水性度の高い領域で基質切断が起こることを示し、Rhomboid プロテアーゼによる新たな基質切断機構を提唱した。

(4) 大腸菌及び枯草菌の S2P ホモログ (RseP 並びに RasP) が *in vivo* で様々な分泌タンパク質のシグナルペプチドを含むモデル基質を切断しうることを見出した。さらに、分泌タンパク質の *in vitro* 膜透過反応に伴って生じるシグナルペプチドを検出する系を構築し、RseP が、真性のシグナルペプチドの分解を行いうることを示した。これらの結果から、細菌においては、S2P プロテアーゼがシグナルペプチド分解に主要な役割を果たすことを提唱し、細菌 S2P プロテアーゼが膜タンパク質品質管理に関わる新たな役割を持つことを示唆した。

(5) GlpG により切断を受けるモデル基質の切

断部周辺領域を対象とした詳細な変異解析を行い、GlpGが他のロンボイドプロテアーゼの解析から提唱された、「ロンボイド基質モチーフ」とは一部異なるモチーフを認識して基質切断を行う事を示唆し、GlpGの生理基質同定の手掛かりを得た。

(6) 高度好熱菌タンパク質透過チャネル（トランスロコン）SecYEの立体構造を、SecYに対するモノクローナル抗体断片との複合体としてX線結晶構造解析によって決定した。解かれたSecYEの構造には、静止型構造にはない凹みが細胞質領域に観察され、この構造をプレオープン構造と命名し、タンパク質膜透過におけるトランスロコンの構造変化を伴う機能モデルを提唱した。

(7) 高度好熱菌タトランスロコンと相互作用し、タンパク質膜透過の後期課程に働くと考えられている膜タンパク質SecD/SecF複合体の立体構造をX線結晶構造解析によって決定した。その結果、SecDFはpseudo-symmetricalな膜領域と二つのペリプラズム側に大きく露出した二つの領域を持つこと、N末端側のペリプラズム領域のhead subdomainは、少なくとも2種類の構造を取り得ることを明らかにした。生化学実験、電子顕微鏡観察、コンピュータシミュレーション等の結果に基づき、このペリプラズムドメインが構造変化を起こしつつ基質と直接相互作用し、プロトン駆動力に依存して分泌タンパク質の膜透過を駆動するとのモデルを提唱した。

(8) 細胞による異常内膜タンパク質（内膜ストレス）の感知機構を明らかにすること、膜ストレスに対抗する機能を持つ細胞因子を同定しその働きを明らかにすること、膜タンパク質の正しいアセンブリーに働く細胞装置の構造・機能を解明することを目的として、大腸菌の全ORFを含む遺伝子ラブラリー（ASKA library）を用いて、膜タンパク質の膜組み込みが特異的に不全となるsecY（トランスロコンの中心的サブユニットをコード）変異（secY35I）による、高温での生育阻害と、膜組み込み異常に起因するストレス応答を軽減するマルチコピーサプレッサーの分離を行った。その結果、secY35I変異株の温度感受性を抑制し、モデル膜タンパク質の膜組み込みを回復させるクローン複数を同定し、これらが上記膜タンパク質の正しいアセンブリーや膜ストレス応答に働く可能性を示唆した。

## 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24件）

1. Ito, K., Chadani, Y., Nakamori, K., Chiba, S., Akiyama, Y., and Abo, T. (2011) Nascentome analysis uncovers futile protein synthesis in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 6, e28413. (査読有り)

2. Saito, A., Hizukuri, Y., Matsuo, E.-i., Chiba, S., Mori, H., Nishimura, O., Ito, K., and 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. (査読有り)

3. Tsukazaki, T.<sup>a</sup>, Mori, H.<sup>a</sup>, Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassilyev, D. G., Kohno, T., Maturana, A. D., Ito, K. and Nureki, O. (2011) Structure and function of SecDF, a protein export-enhancing membrane component. *Nature*, 474, 235-238. (査読有り)

<sup>a</sup>These authors contributed equally to this work.

4. Chiba, S., Kanamori, T., Ueda, T., Akiyama, Y., Pogliano, K. and Ito, K. (2011) Recruitment of a species-specific arrest module to monitor different cellular processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 6073-6078. (査読有り)

5. Akiyama, Y. (2009) Quality control of cytoplasmic membrane proteins in *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, 46, 449-454. (査読有り)

6. Ito, K. and Mori, H. (2009) The Sec protein secretion system. pp. 3-22, in *Bacterial Secreted Proteins*, Ed. K. Wooldridge, Caister Academic Press, Norfolk, UK

7. Koide, K., Ito, K., and Akiyama, Y. (2008) Substrate recognition and binding by RseP, an *Escherichia coli* intramembrane protease. *J. Biol. Chem.*, 283, 9562-9570. (査読有り)

8. Tsukazaki, T.<sup>a</sup>, Mori, H.<sup>a</sup>, Fukai, S., Ishitani, R., Mori, T., Dohmae, N.,

Perederina, A., Sugita, Y., Vassilyev, D. G., Ito, K. and Nureki, O. (2008) Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures. *Nature*, 455, 988-991. (査読有り)

<sup>a)</sup> These authors contributed equally to this work.

9. Inaba, K., Suzuki, M., Maegawa, K., Akiyama, S., Ito, K., and Akiyama, Y. (2008) A pair of circularly permuted PDZ domains control RseP, the S2P family intramembrane protease of *E. coli*. *J. Biol. Chem.*, 283, 35042-35052. (査読有り)

10. Wang, Y. <sup>a)</sup>, Maegawa, S. <sup>a)</sup>, Akiyama, Y. and Ha, Y. (2007) The role of L1 loop in the mechanism of rhomboid intramembrane protease GlpG. *J. Mol. Biol.*, 374, 1104-1113. (査読有り) <sup>a)</sup>These authors contributed equally to this work.

11. Akiyama, Y. and Maegawa, S. (2007) Sequence features of substrates required for cleavage by GlpG, an *Escherichia coli* rhomboid protease. *Mol. Microbiol.*, 64, 1028-1037. (査読有り)

12. Maegawa, S., Koide, K., Ito, K., and Akiyama, Y. (2007) The intramembrane active site of GlpG, an *Escherichia coli* rhomboid protease, is accessible to water and hydrolyzes an extramembrane peptide-bond of substrates. *Mol. Microbiol.*, 64, 435-447. (査読有り)

13. Koide, K., Maegawa, S., Ito, K., and Akiyama, Y. (2007) Environments of the active site region of RseP, an *Escherichia coli* RIP protease, assessed by site-directed cysteine alkylation. *J. Biol. Chem.*, 282, 4553-4560. (査読有り)

14. Shimohata, N., Nagamori, S., Akiyama, Y., Kaback, H.R., and Ito, K. (2007) SecY alterations that impair membrane protein folding and generate a membrane stress. *J. Cell Biol.*, 176, 307-317. (査読有り)

[学会発表] (計 70 件)

1. Akiyama, Y.: Post-liberation cleavage of signal peptides is catalyzed by the site-2 protease (S2P) in bacteria. The 18th East Asia Joint Symposium on

Biomedical Research, Shanghai, China, December 7-9, 2011.

2. Akiyama, Y. and Hizukuri, Y.: Function and regulation of RseP, the S2P family intramembrane protease of *E. coli*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 5-10, 2011.

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

4. 森 博幸: バクテリアの蛋白質膜透過チャネル SecYEG と相互作用する因子の解析 理研シンポジウム「第 3 回生体分子の分離・解析法の進展-膜タンパク質への応用-」和光 2011 年 10 月 28 日

5. 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」京都 2011 年 9 月 21 日-24 日

6. 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」大阪 2011 年 6 月 7-9 日

7. Hizukuri, Y. and Akiyama, Y.: Roles of the two PDZ domains of RseP, the S2P family intramembrane protease of *Escherichia coli*, in regulation of its protease function. The 3<sup>rd</sup> International Symposium on Protein Community, Nara, Japan, September 13-16, 2010.

8. Mori, H., Tsukazaki, T., Nureki, O., Ito, K. and Akiyama, Y.: A functionally important intramolecular interaction in SecA: involvement of hydrophobic amino acids in motif IV and anti-parallel beta sheet in translocase activation. The 3<sup>rd</sup> International Symposium on Protein Community, Nara, September 13-16, 2010.

9. Mori, H., Tsukazaki, T., Akiyama, Y., Nureki, O. and Ito, K.: Structure, function and evolution of bacterial protein translocation machinery. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生

学会大会合同大会 ワークショップ「進化からみたタンパク質社会」、神戸、2010年12月7日-10日

10. 斎藤 啓、千葉志信、松尾英一、西村 紀、伊藤維昭、秋山芳展： Fate of signal peptides in bacteria: post liberation cleavage by S2P protease. 第33回日本分子生物学会大会・第83回日本生化学会大会合同大会 ワークショップ「膜タンパク質の構造・機能から見るオルガネラの進化」、神戸、2010年12月7日-10日

11. 森 博幸：細菌のタンパク質膜透過装置の構造と機能. 第4階細菌学若手コロッセウム、修善寺、2010年8月26日-28日

12. Akiyama, Y.: New function of RseP, the *E. coli* S2P family protease. Gordon Research Conference on Proteolytic enzymes & their inhibitors, Lucca, Italy, May 2-7, 2010.

13. 森 博幸、塚崎智也、濡木理、伊藤維昭：Molecular mechanisms of SecA mediated protein translocation. 第47回日本生物物理学会年会 シンポジウム「タンパク質の膜透過輸送の最前線」、徳島、2009年10月30日-11月1日

14. 森 博幸、塚崎智也、越前友香、濡木理、伊藤維昭：バクテリアのタンパク質膜透過装置の構造と機能. 第82回日本生化学会大会シンポジウム「タンパク質膜透過装置の構造とダイナミックな機能」、神戸、2009年10月21日-24日

15. Mori H., Tsukazaki T., Echizen, Y., Ishitani, R., Nureki, O. and Ito, K.: Functional dissection of bacterial Sec translocation machinery. International Symposium 'Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomembranes', Kyoto, Japan, September 8-10, 2009.

16. Mori, H.: How does SecA ATPase interact with translocon and drive protein translocation? G-COE in Chemistry "Frontier of Organelle Dynamics and Protein Functions" March 11-13, Nagoya, Japan, 2008.

17. 秋山芳展：大腸菌 RIP プ「直接性、不可逆性を特徴とする新しいシグナル伝達のメカニズム」第31回日本神経科学大会 東

京 2008年7月9-11日

18. Mori, H. and Ito, K.: How does SecA ATPase drive protein translocation? The 14th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Tokyo, Japan, November 14, 2007.

19. Akiyama, Y.: Function and regulation of *E. coli* membrane metalloproteases. Gordon Research Conference on Matrix metalloproteinases. Lucca, Italy, June 3-8, 2007.

[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

秋山 芳展 (AKIYAMA YOSHINORI)  
京都大学・ウイルス研究所・教授  
研究者番号：10192460

### (2) 研究分担者

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

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：