

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06562

研究課題名(和文) 細菌型分泌装置構成因子が受ける新奇な翻訳後多段階プロセシングの分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the novel multistep post-translational processing in the component of the bacterial flagellar type III secretion apparatus

研究代表者

檜作 洋平 (Hizukuri, Yohei)

京都大学・医生物学研究所・助教

研究者番号：70568930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細菌べん毛III型分泌装置関連因子FliOの切断と修飾という翻訳後多段階プロセシングの実態解明を目指すものである。大腸菌膜内切断プロテアーゼGlpGを介したFliOの膜内切断制御機構の解析を行い、二か所の切断部位での認識機構の共通性と相違点を明らかにし、残基レベルの相互作用様式を明らかにするとともに、FliO切断の生理的意義を示した。また、高感度・高親和性のPAタグを用いたタンパク質抗体ラベリング技術の改良を行い、FliOの切断・修飾反応の動態解析技術を進展させた。さらに他ファミリー膜内切断プロテアーゼの新規X線結晶構造を決定し、ゲート構造を介した機能制御機構モデルを提案した。

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等の重大な遺伝病の発症や微生物病原性等に深く関わるため、その分子的・酵素学的理解は創薬にもつながる重要な課題である。本研究ではFliOの多段階翻訳後プロセシングの一端であるGlpGによる膜内切断の分子機構を明らかにした。これは膜タンパク質の翻訳後機能調節機構の新たな側面を示すとともに、細菌の病原性発揮にも関わるべん毛構築の制御機構の解明につながり、細菌感染症治療においても意義がある。また、PAタグを用いたタンパク質の抗体ラベリング技術は、タンパク質への非破壊的な抗体結合を可能とし、高収量・高純度のタンパク質精製や構造解析にも応用しうる。

研究成果の概要(英文)：This project aims to elucidate the post-translational multi-step processing, such as cleavages and modifications, observed in the bacterial flagellar type III secretion apparatus-related protein FliO. We analyzed the regulatory mechanism of FliO cleavages mediated by the E. coli intramembrane protease GlpG, and i) clarified common features and differences in substrate recognition mechanisms at the identified two distinct cleavage sites, ii) elucidated interaction residues between GlpG and FliO, and iii) suggested the physiological significance of FliO cleavage. We also developed the antibody labeling technique for target proteins using highly sensitive and high-affinity PA tags and applied them to analyze the kinetics of FliO cleavage and modification reactions. Furthermore, we determined new X-ray crystal structures of other family intramembrane proteases and proposed a model for the substrate accommodation and cleavage mediated by the gate structure.

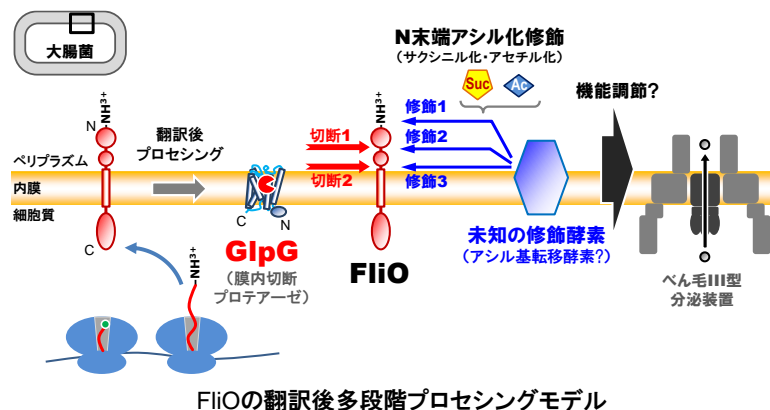
研究分野：膜タンパク質動態化学

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 品質管理 抗体ラベリング

1. 研究開始当初の背景

多くのタンパク質は翻訳された後に修飾や切断等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ことが知られている。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」と呼ばれる特殊な酵素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現象であり、例えば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や、不要な膜タンパク質の除去による膜の品質管理などに利用される。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、またコレラ菌や結核菌等の病原性細菌やマラリア原虫といった多様な病原性微生物の病原性発揮に関与するなど、臨床医学面でも重要性の高い様々な生体プロセスに関与する。

Rhomboid ファミリーに分類される膜内切断プロテアーゼ群は、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ミトコンドリア 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切断の意義についてはほとんどわかっていなかった。研究代表者は、これまで生理的な切断基質が不明だった Rhomboid ファミリープロテアーゼの大腸菌ホモログである GlpG が、べん毛 III 型分泌装置の関連因子 FliO を切断しうることを見出した (論文未発表)。べん毛は細菌の持つ遊泳器官であり、その構築には 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シャペロン因子とされる。代表者は、FliO の解析過程で、FliO が膜挿入後に GlpG により複数か所で切断を受けると共に、細胞膜外に露出する N 末端アミノ基が複数のアシル化修飾 (サクシニル化、アセチル化) を受けることも見出した (図, 論文未発表)。アシル基転移酵素やアシル基供与体 (アセチル CoA 等) は細胞質内に存在することから、アシル化修飾も細胞質内で起こるものと信じられている。代表者は、これらの解析から FliO が新奇の修飾を含む予想外に複雑な翻訳後プロセッシングを受けうることを見出し、FliO がべん毛構築過程に必要な因子であることから、このような膜内切断や新奇の修飾がなんらかの生理的意義を持つものと予測した。



2. 研究の目的

本研究では、これまでの背景で述べた知見に基づき、複雑な翻訳後多段階プロセッシングを受ける大腸菌べん毛 III 型分泌装置関連因子 FliO をモデルタンパク質とし、Rhomboid 膜内切断プロテアーゼホモログである GlpG による FliO の切断及び他に類を見ない新奇な細胞膜外での N 末端アシル化修飾現象の分子機構に焦点を当てた解析を行うことで、FliO の成熟・機能発現過程における翻訳後多段階プロセッシングの生理的意義を明らかにし、さらに膜タンパク質の新たな翻訳後機能調節機構としての可能性を追求することを目的とした。

3. 研究の方法

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 FliO の切断についてはこれまでに予備的解析を行ってきた。そこで本研究ではこれまでに得られた知見を受けて、GlpG 及び FliO の系統的変異体を用いた基質切断解析、様々な架橋法を用いた生体内タンパク質相互作用解析、放射線標識を利用したパルスチェイス法による細胞内タンパク質動態解析等の遺伝学的、生化学的、細胞生物学的解析を進め、GlpG による FliO 基質の認識及び膜内切断制御を中心に、FliO の翻訳後プロセッシングの詳細な分子機構の解明を目指した。また、*in vitro* 再構成系を用いた GlpG による FliO 切断の反応速度論的解析や、FliO の修飾反応の生化学的解析等に必要となるタンパク質のタグ標識と精製技術の確立を目的として、タンパク質の抗体ラベリング

技術の改良を行った。また、GlpGのみならず RIP における膜内切断の分子機構の共通性の理解のために他ファミリーの膜内切断プロテアーゼの構造学的・生化学的解析に取り組んだ。

4. 研究成果

本研究において以下の(1)~(3)の研究成果を得た。

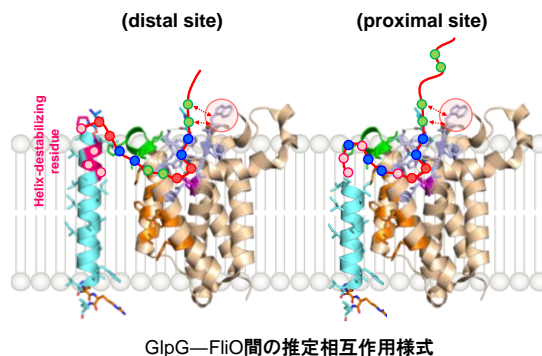
(1) GlpG を介した FliO の翻訳後多段階切断における基質認識・切断機構と生理的意義の解明

① GlpG による FliO の基質認識機構

Rhomboid 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基質認識及び切断に重要であることが報告されている。そこで FliO の膜外ドメインの2か所の切断部位を、膜貫通領域から遠い部位を *distal site*、近い部位を *proximal site* と定義し、それぞれの切断部位において基質認識条件の重要性を検証した。その結果、i) 基質認識モチーフは *distal, proximal site* ともに切断に極めて重要であること、ii) 基質膜貫通領域のヘリックス不安定性については、膜貫通領域に近い *proximal site* ではヘリックスの不安定化が切断に重要である一方、*distal site* ではそれほど重要ではないことが明らかとなった。また、FliO の基質認識モチーフ及び膜貫通ヘリックス形成領域の系統的変異解析と、各変異体のパルスチェイス法による細胞内動態解析から、FliO の *distal* 及び *proximal site* での切断は連続的ではなく独立に起きうることを示した。

② GlpG—FliO 間の相互作用様式

GlpG と FliO 間の相互作用、すなわち FliO 切断時の GlpG の基質結合様式を明らかにするため、UV 反応性アミノ酸アナログ *pBPA* を推定基質結合領域のアミノ酸残基に導入した GlpG 及び FliO 変異体を作製して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。さらにこの結果を踏まえて GlpG と FliO それぞれのシステイン残基導入変異体間のジスルフィド架橋解析を行った。既知の GlpG とモデル基質ペプチドの共結晶構造から予測した GlpG—FliO 間相互作用残基間の架橋を試み、*distal* 及び *proximal site* それぞれについて効率よく架橋が形成される変異体ペアを見出した。これらの結果は代表的な Rhomboid プロテアーゼである GlpG と、その生理基質である FliO の残基レベルでの相互作用様式を初めて示すものである (図)。



③ 生理環境下での FliO の挙動と GlpG による切断の生理的意義

FliO はべん毛特異的 III 型分泌装置の効率的な形成に必須のシャペロン因子であり、その機能欠損により菌はべん毛形成能が低下し、遊泳できなくなる。これまでの解析により、*glpG* 欠損株でも遊泳能が損なわれないことから GlpG による FliO の切断は FliO の機能には必須ではないことが示唆されていた。一方で GlpG による切断後の断片を模した FliO 変異体は細胞内での蓄積量が大きく低下しており、GlpG による切断によって切除される FliO の膜外領域は FliO タンパク質の安定化に寄与することが示唆されていた。そこで細胞中の生理的条件下での FliO タンパク質を見積もるため、後述の高親和性・高感度の PA タグを利用して大腸菌染色体から PA タグを付加した FliO を発現する改変株を構築し、染色体レベルの FliO の細胞内蓄積量及び切断・修飾動態を調べた。その結果、染色体レベルの FliO は確かに GlpG による切断を受けること、細胞内の FliO の蓄積量は低く保たれており、過剰に発現した FliO は菌の運動能や生育に阻害的に働くことなどが示された。これらの結果から、GlpG による FliO 切断の生理的意義として、菌にとって潜在的なストレスとなりうる過剰な 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及び分解を促し、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 (膜プロテオスタシスの維持) を担うという役割を提案した。

以上の①~③の結果は FliO の翻訳後多段階切断時の基質認識・切断機構の分子的理解を促し、さらに FliO 切断の生理的意義についての仮説を提案するものである。これらの成果について学術論文としてまとめ、投稿準備中である。

(2) タンパク質抗体ラベリング技術の改良

in vitro 再構成系を用いた GlpG による FliO 切断の反応速度論的解析や、FliO の修飾反応の生化学的解析等に必要なたんぱく質のタグ標識と精製技術の確立を目的として、たんぱく質の抗

体ラベリング技術の改良を試みた。横浜市立大学大学院生命医科学研究科の禾晃和准教授らとの共同研究により、任意のタンパク質に高親和性・高感度のタグ配列である PA タグを導入し、さらに PA タグに対する抗体を結合させる技術を開発した。また、タグ配列やリンカー領域を調節し、タンパク質の構造に与える影響をより低減させたタグの導入法を確立した。このタグは標的とするタンパク質の末端部だけでなく、アミノ酸配列内部、すなわちフォールディングしたタンパク質表面のループ領域等に挿入することも可能である。こうしてタグを導入した酵素タンパク質は、元のタンパク質と同等の酵素活性を保持し、安定なタンパク質として蓄積することを示した。この技術は従来では直接結合する抗体がなかったタンパク質に非破壊的に特異的な抗体を結合させることを可能とし、高収量・高純度のタンパク質精製だけでなく、X 線結晶構造解析や電子顕微鏡単粒子解析などにも応用できる可能性がある。この内容を学術論文にまとめ、学術雑誌 *Acta Crystallographica Section D, Structural Biology* 上で発表した。

本研究ではこの技術を応用し、FliO や GlpG に PA タグを導入することで、高感度で目的タンパク質を検出することを可能にした。さらにこれらを用いて FliO の *in vivo* 切断解析、パルスチェイス動態解析や酵素-基質間相互作用解析、染色体由来の低発現 FliO の動態解析等の生化学的解析技術を進展させた。

(3) 他ファミリー膜内切断プロテアーゼの新規 X 線結晶構造に基づく機能制御機構の解析

GlpG を含むタンパク質膜内切断制御の分子機構の共通性を理解する一環として、代表者らは S2P ファミリーに属する大腸菌膜内切断プロテアーゼである RseP 及び異種の細菌の RseP ホモログと、阻害剤 Batimastat の複合体の X 線結晶構造を明らかにした。これらの複合体構造に基づいた変異体機能解析や阻害剤感受性アッセイを行い、阻害剤作用機序及び基質結合様式を明らかにした。また、RseP ホモログ間の立体構造比較や修飾実験から RseP がゲート様構造を持つことを示し、基質取り込み時にこのゲート構造が開閉することで、基質の触媒部位への提示及び切断を制御するという RseP の新たな切断制御モデルを提案した。これらの成果を論文にまとめ、学術雑誌 *Science Advances* 上で発表した。ゲート様構造を介した基質認識・切断制御機構は S2P ファミリーのみならず、Rhomboid ファミリーを含む他の膜内切断プロテアーゼファミリーでも示唆されており、RIP に共通する分子機構であることが窺える。GlpG による FliO の切断においても、GlpG のゲート様構造を介して FliO を認識し、多段階の切断を促すと推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yokoyama Tatsuhiko, Niinae Tomoya, Tsumagari Kazuya, Imami Koshi, Ishihama Yasushi, Hizukuri Yohei, Akiyama Yoshinori	4. 巻 296
2. 論文標題 The Escherichia coli S2P intramembrane protease RseP regulates ferric citrate uptake by cleaving the sigma factor regulator FecR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamura-Sakaguchi Risako, Aruga Rie, Hirose Mika, Ekimoto Toru, Miyake Takuya, Hizukuri Yohei, Oi Rika, Kaneko Mika K., Kato Yukinari, Akiyama Yoshinori, Ikeguchi Mitsunori, Iwasaki Kenji, Nogi Terukazu	4. 巻 77
2. 論文標題 Moving toward generalizable NZ-1 labeling for 3D structure determination with optimized epitope-tag insertion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 645 ~ 662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2059798321002527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Daimon Yasushi, Narita Shin-ichiro, Miyazaki Ryoji, Hizukuri Yohei, Mori Hiroyuki, Tanaka Yoshiki, Tsukazaki Tomoya, Akiyama Yoshinori	4. 巻 117
2. 論文標題 Reversible autoinhibitory regulation of Escherichia coli metallopeptidase BepA for selective -barrel protein degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.	6. 最初と最後の頁 27989-27996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2010301117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyake Takuya, Hizukuri Yohei, Akiyama Yoshinori	4. 巻 11
2. 論文標題 Involvement of a Membrane-Bound Amphiphilic Helix in Substrate Discrimination and Binding by an Escherichia coli S2P Peptidase RseP	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 607381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.607381	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 Yoshitani Kohei, Hizukuri Yohei, Akiyama Yoshinori	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Imaizumi, K. Takanuki, T. Miyake, M. Takemoto, K. Hirata, M. Hirose, R. Oi, T. Kobayashi, K. Miyoshi, R. Aruga, T. Yokoyama, S. Katagiri, H. Matsuura, K. Iwasaki, T. Kato, M. K. Kaneko, Y. Kato, M. Tajiri, S. Akashi, O. Nureki, Y. Hizukuri, Y. Akiyama, T. Nogi	4. 巻 8
2. 論文標題 Mechanistic insights into intramembrane proteolysis by E. coli site-2 protease homolog RseP	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabp9011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abp9011	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12件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 檜作洋平
2. 発表標題 立体構造に基づく膜内切断プロテアーゼRsePの基質取り込み・切断制御機構
3. 学会等名 2021年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの複製と維持における生体高分子の機能」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 檜作洋平、横山達彦、三宅拓也、小林達也、今泉友希、高貫一徳、大井里香、禾晃和、秋山芳展
2. 発表標題 細菌パーシスター化における膜内切断プロテアーゼRsePの役割：生理学的及び構造学的アプローチ
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会 シンポジウム02：「バクテリアの表層変化と生存戦略」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 檜作洋平、横山 達彦、秋山芳展
2. 発表標題 大腸菌膜内切断プロテアーゼRsePを介したTA systemの制御：細胞休眠・覚醒における意義
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（公募シンポジウム「TAシステムを介した細菌の休眠と覚醒：生化学と一細胞解析の融和を目指したアプローチ」内講演）（招待講演）
4. 発表年 2020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（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今泉友希、高貫一徳、大井里香、坂口(田村)梨沙子、三好賢一、有賀理江、廣瀬建、片桐静夏、三宅拓也、檜作洋平、秋山芳展、禾晃和
2. 発表標題 膜内タンパク質切断の制御機構の解明に向けた細菌由来Site-2 proteaseの構造生物学的研究
3. 学会等名 第18回大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅拓也、今泉友希、高貫一徳、小林達也、横山達彦、大井里香、檜作洋平、禾晃和、秋山芳展
2. 発表標題 全長結晶構造に基づく細菌膜内切断プロテアーゼRsePの基質取り込み・切断機構の解析
3. 学会等名 第18回大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅拓也、今泉友希、高貫一徳、小林達也、横山達彦、大井里香、檜作洋平、禾晃和、秋山芳展
2. 発表標題 細菌膜内切断プロテアーゼRsePの基質取り込み・切断時におけるダイナミックな構造変化モデル
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林達也、三宅拓也、今泉友希、高貫一徳、横山達彦、大井里香、檜作洋平、禾晃和、秋山芳展
2. 発表標題 大腸菌膜内切断プロテアーゼRsePのTM4領域に着目した基質エントリーゲートの制御機構の検証
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 檜作洋平、古味大雄、秋山芳展
2. 発表標題 大腸菌S2Pファミリー膜内切断プロテアーゼRsePの切断基質の系統的解析による基質認識・切断特異性の検証
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022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のゲーティング機構モデルの検証と基質特異的認識に関する解析
3. 学会等名 2022年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞生物に見られる生体プロセスの恒常性維持システム」(招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学プレスリリース「細胞膜の中ではたらく特殊なタンパク質分解酵素の構造を解明～細菌感染症の新たな治療法の開発へ期待～」 https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2022-08-25</p> <p>京都大学医生物学研究所HP 研究成果「細胞膜の中ではたらく特殊なタンパク質分解酵素の構造を解明～細菌感染症の新たな治療法の開発へ期待～」 https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/post-2986/</p> <p>京都大学プレスリリース「タンパク質の抗体ラベリング技術を改良し、構造解析をアシスト - 電子顕微鏡やX線結晶解析による構造決定を加速化 - 」 https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-04-20-0</p> <p>京都大学 医生物学研究所 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/</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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------