

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370078

研究課題名 (和文) 大腸菌内膜ストレス応答機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of the membrane stress response in *E. coli*

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): 大腸菌における異常膜タンパク質による表層ストレス応答 (膜ストレス応答) 活性化の機構を明らかにするために、(1) 膜層ストレス応答を引き起こす *secY* 変異に対するサプレッサー変異を分離し解析した。(2) DegS 非依存的シグマ E ストレス応答を活性化させる RseP PDZ ドメインの変異を分離・解析して、リガンド結合による機能制御の可能性を示唆した。

研究成果の概要 (英文): To elucidate the mechanism of activation of extracytoplasmic stress response by abnormal membrane proteins ("membrane stress response"), (1) we isolated and analyzed suppressor mutations against a class of the *secY* mutations that elicit membrane stress response, and (2) from the analysis of RseP PDZ domain mutants, we suggest a new Sigma E activation mechanism via ligand binding to the PDZ domains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2009 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：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：生体膜

1. 研究開始当初の背景

細胞膜の膜タンパク質は膜機能の多くを担い、細胞機能に必須の役割を果たしている。細胞膜は細胞それ自身を規定し、また、細胞と環境との相互作用を媒介する点で細胞にとって最も基本的かつ重要な構成要素の一つと言えよう。膜機能の多くは細胞膜に存在する膜タンパク質により担われている。異常な膜タンパク質は、その制御されない暴走的 (部分) 活性の発現や、膜構造に対する物理的なダメージなどにより「内膜ス

トレス」となって、細胞の死をももたらすものである。その様な異常膜タンパク質の生成を極力抑制し、また生成された場合には迅速に修復或いは分解除去することは、正常な膜機能ひいては細胞機能の維持に極めて重要な問題である。

大腸菌の細胞表層は、外側から、外膜、ペリプラズム、細胞質膜 (内膜) の三層からなる。これら表層領域に異常タンパク質が蓄積すると、それらに対処する機能を持つファールディング因子、分子シャペロン、プロテアーゼなどの発現が誘導される。こ

れは表層ストレス応答と呼ばれる。外膜タンパク質の異常は、主として σ^E (シグマE; 転写因子)経路により感知される。この経路では σ^E が上記細胞因子群の転写に働く。 σ^E 経路では、ペリプラズム側に活性部位を持つ膜プロテアーゼ DegS が異常外膜タンパク質を直接認識して活性化し、膜結合型アンチ σ^E タンパク質 RseA (細胞質側で σ^E を結合し不活性化させる)をペリプラズム側で切断すると、引き続いて膜内切断(RIP)プロテアーゼ RseP が RseA を膜貫通領域内部で切断する。これにより最終的に σ^E が細胞質に遊離されて機能する。申請者らは、RseP を同定してその活性・機能を解析し、RseP が細胞質膜を越える表層ストレス情報の伝達にキーとなる役割を果たすことをこれまでに示してきた。一方、ペリプラズムの異常タンパク質は膜結合センサーカインース CpxA と細胞質転写因子 CpxR からなる「二成分系」により感知され¹⁾、一群の遺伝子発現が誘導されることが分かっている。しかしながら、細胞が内膜タンパク質の異常に如何に対応するかはほとんど分かっていなかった。申請者らは、異常な内膜タンパク質の蓄積がこれら σ^E 及び Cpx の両経路を活性化することを発見した。さらに、ATP 依存性膜プロテアーゼ FtsH が異常内膜タンパク質の分解に中心的役割を果たす事⁵⁾、FtsH と Cpx 経路の同時欠損が合成致死となる事、膜プロテアーゼ HtpX が Cpx 経路制御下にあり、FtsH と共に内膜タンパク質分解に関わることなどを見出し、 σ^E 及び Cpx ストレス応答が、内膜タンパク質の異常に対する「防御」に重要な役割を果たすことを示した。また、膜タンパク質特異的シャペロン機能を持つと推定されるプロヒビチンホモログ(PHD タンパク質) QmcA も最近同定した。これら膜タンパク質品質管理に関わる細胞質膜プロテアーゼや膜シャペロン、及び「内膜ストレス応答」の役割についての申請者らの研究は、他に類似研究の少ない先導的且つ世界的にもユニークなものである。

しかしながら、細胞が異常な膜タンパク質を如何にして感知するのか、「内膜ストレス応答」で発現誘導される多数の細胞因子のうちのどれが如何にして細胞質膜タンパク質異常に対処するのか、その全体像やメカニズムのほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、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し、膜タンパク質の正しいアセンブリーに働く機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 内膜タンパク質の生成、異常な内膜タンパク質への対処に働く細胞因子についての解析:異常な膜タンパク質の生成を引き起こす *secY*変異(取得済み)の multicopy suppressor を分離する。又、膜ストレス応答で発現誘導される遺伝子について、網羅的に膜ストレスとの関連を調べる。これらにより、膜ストレス軽減化、ストレス感知、SecY 機能回復にかかわる因子を同定し、その構造・機能を解析する。

(2) 細胞質膜タンパク質異常の感知システムについての解析: σ^E 経路における異常膜タンパク質感知システムを明らかにするため、遺伝学的、生化学的解析により、異常膜タンパク質と σ^E 経路構成因子との相互作用を調べる。さらに、膜タンパク質の感知に関わることが示唆される、「DegS 非依存的ストレスシグナル」の同定と解析、「RseP の PDZ ドメイン」の機能・構造解析及びリガンドの同定を行う。

4. 研究成果

(1) 細胞膜の膜タンパク質は膜機能の多くを担い、細胞機能に必須の役割を果たしている。膜タンパク質が正しく形成・維持され、また、異常な膜タンパク質を迅速に修復或いは分解除去することは正常な膜機能の維持に欠くことの出来ないプロセスである。また、異常な膜タンパク質の生成によって、細胞表層のタンパク質折りたたみや品質管理に関わる細胞因子の発現が誘導される、いわゆる「表層ストレス応答」が活性化されるが、この活性化の仕組みや、どのような細胞因子がどのように膜タンパク質の異常に対処するのかについてもほとんど不明である。本研究では、(a)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、(b)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、(c)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、ことを目的とする。本年は、まず、この目的を達成するために、大腸菌の全 ORF を含む遺伝子ラブラリー(ASKA library)を取得し、これを用いて、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)変異の高温感受性と、膜組み込み異常に起因するストレス応答を抑制する遺伝子クローンの探索を行うためのスクリーニングシステムを作成した。また、そのシステムを用いてシステムティックなスクリーニングを進め、複数の候補を得た。そのマルチコピーサプレッサーに

より実際に secY351 変異株中での表層ストレス応答レポーターの発現が低下し、モデル膜タンパク質の幕見込みが回復していた。

(2) "RIP (制御された膜内部でのタンパク質切断 :regulated intramembrane proteolysis)" に関わるプロテアーゼは様々な生物種で広く保存され、膜を越えた情報伝達等に重要な役割を果たしているが、その作用・制御メカニズムの詳細は不明である。本研究ではこれまでの成果を踏まえて、大腸菌 RIP プロテアーゼ RseP と GlpG を対象とし、それらの細胞機能と制御の分子メカニズムの解明を目指す。国内においては細菌の膜プロテアーゼ・膜タンパク質分解の研究は極めて限られており、特に細菌 RIP プロテアーゼの研究は、申請者らのもの以外ほとんど無い。本研究は、大腸菌という系を生かした総合的なアプローチにユニークな特徴を持つものであり、細菌における RIP プロテアーゼ機能制御メカニズムやストレス応答調節などの細胞機能の解明と共に、

広い視野からのタンパク質分解による細胞・個体機能制御の統合的理解という本領域目的に貢献するものと考え。これまで、RseP の機能制御機構を明らかにするため、RseP の機能制御(抑制)に関わるペリプラズム領域の PDZ 様ドメインに関するシステムティックな変異解析や RseP アミノ酸配列の解析を行い、二つの連続した RseP 様領域(PDZ-N と PDZ-C)を持つことを見出していたが、それぞれを単独で発現・精製して X 線解析により構造を毛呈した。その結果、これらが circularly permuted した配列を持つ PDZ フォールドをとり、そのうちの N 末端側の PDZ-N ドメインのリガンド結合領域に変異が集中することから、RseP 機能がリガンド結合により制御されていることを示唆した。又、RseP の基質である RseA の DegS/RseP による 2 段階切断を *in vitro* で再現する事に成功した。

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 5 件)

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

2) 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 【査読

無】

3) 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】

4) Tsukazaki, T.^{a)}, Mori, H.^{a)}, 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.

^{a)} These authors contributed equally to this work. 【査読有】

5) 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】

[学会発表](計 52 件)

1) 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.

2) 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 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, Japan, September 13-16, 2010

3) 檜作 洋平、秋山芳展: 大腸菌表層ストレス応答に関わる S2P 膜内プロテアーゼ RseP の PDZ ドメイン機能の解析. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010 年 12 月 7 日-10 日

4) Inaba, K., Suzuki, M., Maegawa, K.-i., Akiyama, S., Ito, K. and Akiyama, Y.: A pair of circularly permuted PDZ domains control RseP, the S2P family intramembrane protease of *E. coli*. 第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009 年 10 月 21 日-24 日

5) 秋山芳展. 大腸菌 RIP プロテアーゼの機能と制御. ワークショップ「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

6) 齋藤 啓、秋山芳展. 大腸菌 S2P プロテアーゼ RseP の膜タンパク質品質管理における新たな役割. 第 5 回 21 世紀大腸菌研究会
藤枝 2008 年 7 月 28-29 日

〔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：