

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370054

研究課題名(和文) 膜内タンパク質切断による新規な細胞機能調節機構の研究

研究課題名(英文) A novel regulation mechanism of cellular functions by intramembrane proteolysis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌表層ストレス応答 E 応答経路細胞表層におけるタンパク質の品質管理に重要な役割を果たす。E 応答経路においては、膜プロテアーゼ DegS が、異常な外膜タンパク質の蓄積によって活性化されて、まず 1 回膜貫通型 anti-E タンパク質 RseA のペリプラズム領域を切断する。これが引き金となり、S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP が RseA をその膜貫通領域内部で切断する我々は PDZ タンデムの構造・機能解析から、PDZ タンデムがペリプラズム領域で切断を受けた RseP のみ活性部への近接を許すサイズ排除フィルターとして働くことを示唆している

研究成果の概要(英文)：The Escherichia coli E extracytoplasmic stress response monitors and responds to folding stress in the cell envelope. A protease cascade directed at RseA, a membrane-spanning anti-E that inhibits E activity, controls this critical signal-transduction system. Stress cues activate DegS to cleave RseA; a second cleavage by RseP releases RseA from the membrane, enabling its rapid degradation. We also analyzed the three-dimensional structure of the two tandemly arranged PDZ domains (PDZ tandem) present in the periplasmic region of RseP. Our results suggest that the PDZ tandem serves as a size-exclusion filter to accommodate the truncated form of RseA into the active center.

研究分野：分子生物学

キーワード：大腸菌 膜プロテアーゼ 膜内タンパク質切断 表層ストレス応答 S2Pプロテアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

近年、膜タンパク質分解の新たな様態として、「膜内部における制御されたタンパク質切断 (RIP: Regulated Intramembrane Proteolysis)」が見出された。<sup>1)</sup> RIP では、一般に、特定のシグナルにตอบสนองして膜の脂質二重層内部で基質膜タンパク質の切断が起こり、可溶性ドメインが膜から遊離して、成長因子や転写因子などの生理活性を持つ分子として働く。RIP は、高等真核生物から原核生物まで広く生物界で見出されており、多様な生体プロセスで必須の役割を果たす、新たな膜を越えたシグナル伝達の機構として注目されているが、基質切断のメカニズムや調節機構は不明の点が多い。RIP に働く「膜内切断プロテアーゼ (I-CLIP: Intramembrane Cleaving Protease)」は、S2P、Rhomboid、 $\square$ -secretase/SPP (signal peptide peptidase) の 3 つの family に分類される。

大腸菌 S2P プロテアーゼ RseP は「膜内部における制御されたタンパク質切断 (RIP: Regulated Intramembrane Proteolysis)」に働くプロテアーゼであり、「 $\sigma^E$  経路表層ストレス応答」におけるシグナル伝達に必須の役割を果たす。 $\sigma^E$  は表層ストレス応答に働く転写因子であるが、通常は膜タンパク質 RseA の細胞質ドメインに結合して不活性な状態に保たれている。RseA は細胞表層ストレスにตอบสนองして、まずペリプラズム領域で DegS プロテアーゼによる切断を受け、次いで RseP が膜内部で切断することで、 $\sigma^E$  が活性化される。RseP は完全長の RseA は切断できない。申請者等は、RseP のペリプラズム領域にある二つの PDZ ドメイン (PDZ-N と PDZ-C) がこの府の制御に関わることを見いだしていたが、その機構は不明であった。

一方、RseP の生理的基質は、当初 RseA しか知られていなかったが、我々は、分泌タンパク質のシグナル配列 (SP) を分解することを明らかにし、RseA 以外の基質が存在することが示唆された。このことは、未知の基質が他に存在する可能性を示唆するものである。

## 2. 研究の目的

本研究は、上記の成果・知見を踏まえ、RseP の新規機能を探索するものである。具体的には、大腸菌及びサルモネラで、

(1) PDZ ドメインによる RseP の基質切断制御を介した、新たなストレスシグナルによる  $\sigma^E$  活性化機構を明らかにすること、

(2) RseP の新たな基質を同定し、その切断の意義を明らかにすること、

を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) RseA148 の C 末端 (Val148) のシステムティックな変異体や RseP PDZ ドメインの各種変異体による切断を調べることで、PDZ ドメインによる RseA C 末端残基の認識の重要性を検討する。

(2) PDZ を介した RseP 機能制御機構の解析: RseP の PDZ ドメインの構造を明らかにし、変異解析や、生化学的解析により PDZ ドメインの役割を調べる。

(3) RseP の新規細胞機能の探索と解析: 全細胞内タンパク質を対象とした網羅的解析と共に、特に低分子膜タンパク質 (SMP) や type II 膜タンパク質に焦点を当てた基質探索を行う。

## 4. 研究成果

(1) Li ら (Li et al., 2009) は結晶構造解析と in vitro 実験から、DegS による切断で生じた RseA の新生 C 末端残基 Val148 を、RseP PDZ-C がリガンドとして認識・結合することが、RseP による RseA 分解中間体の切断に必要なであると提唱した。そこで我々は、Li らのモデルが in vivo でも適用できるかを検討した。in vivo では、RseP PDZ の推定リガンド結合部位の変異、あるいは PDZ-NC ドメインの全欠失ですら RseA モデル基質の切断能に有意な変化は及ぼさなかった。また DegS 切断後の RseA 分解中間体を模したモデル基質の C 末端残基 Val148 を、他の 19 種のアミノ酸に置換しても、切断への影響はほとんど見られなかった。これらの結果は、in vivo では PDZ ドメインによる RseA 分解中間体 C 末端残基の認識は、RseP による切断に主要な役割を果たしていないことを示唆している。

(2) 好熱菌 *Aquifex aeolicus* の RseP ホモログの PDZ-N/C ドメイン (PDZ タンデム) の結晶構造解析を行い、2 つの PDZ ドメインがそれぞれの推定リガンド結合領域を向かい合わせて、膜表面側に向けた一つのポケットを構成することを明らかにした。また、PDZ タンデムの欠失により、大腸菌 RseP が全長 RseA を切断するようになることなどを見出した。我々はこれらの結果から、PDZ タンデムが膜表面においてゲート様の構造を形成し、DegS によって切断された RseA のペリプラズム領域のサイズを感知して膜貫通領域の活性部位へ取り込むような、サイズ排除フィルターとして機能すると考えられる。

(3) 細菌染色体には 50 残基以下程度の小さな膜タンパク質が多数コードされていることが最近明らかになった。我々は、これら低分子膜タンパク質 (Small membrane

protein; SMP)が、シグナルペプチドとよく似た構造を持つことから、RsePの基質になる可能性を考え検討した。SMP遺伝子をクローニングし、N末端側に目印としてHA-MBPドメインを融合させた派生体をコードするプラスミドを作成した。これを用いたHA-MBP融合型SMPを野生株並びにrseP欠損株で発現して、RseP依存的な切断の有無を調べた。その結果、抗生物質耐性に関わるBIやProgrammed cell deathに関わるトキシンHok等複数のSMPが、RseP依存的に切断を受けることを見出し。このことから、SMPの中にはRsePの基質が存在することが示唆され

#### 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 13 件)

Arolas, J. L., García-Castellanos, R., Goulas, T., Akiyama, Y. and Gomis-Rüth, F. X. (2014) Expression and purification of integral membrane metallopeptidase HtpX. **Protein Expr. Purif.**, 99C, 113-118.

Hizukuri, Y., Oda, T., Tabata, S., Tamura-Kawakami, K., Oi, R., Sato, M., Takagi, J., Akiyama, Y., and Nogi, T. (2014). A structure-based model of substrate discrimination by a non-canonical PDZ tandem in the intramembrane-cleaving protease RseP. **Structure**, 22, 326-336.

秋山芳展 (2014) 細菌表層ストレス応答システムの新機能の解明 **IFO Res. Commun.** 28, 51-69.

Lim, B., Miyazaki, R., Neher, S., Siegele, D.A., Ito, K., Walter, P., Akiyama, Y., Yura, Y., and Gross, C.A. (2013) Heat shock transcription factor  $\sigma^{32}$  co-opts the signal recognition particle to regulate protein homeostasis in *E. coli*. **PLoS Biology**, 11, e1001735.

Narita, S.-i., Masui, C., Suzuki, T., Dohmae, N., and Akiyama, Y. (2013) Protease homolog BepA (YfgC) promotes assembly and degradation of  $\beta$ -barrel membrane proteins in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 110, E3612-E3621.

Kroos, L., and Akiyama, Y. (2013) Biochemical and structural insights into intramembrane metalloprotease mechanisms. **Biochim. Biophys. Acta**, 1828, 2873-2885.

Ha, Y., Akiyama, Y., and Xue, Y. (2013)

Structure and mechanism of rhomboid protease. **J. Biol. Chem.** 288, 15430-15436

Ogura, T., Okuno, T., Suno, R., and Akiyama, Y. (2013) FtsH Protease. **Handbook of Proteolytic Enzymes 3rd ed.** (ed. Rawlings, N. D. and Salvesen, G.) Elsevier Ltd. pp685-692.

Hizukuri, Y., Ito, K., and Akiyama, Y. (2013) RseP Peptidase. **Handbook of Proteolytic Enzymes 3rd ed.** (ed. Rawlings, N. D. and Salvesen, G.) Elsevier Ltd. pp1546-1550.

Akiyama, Y., and Ito, K. (2013) HtpX Peptidase. **Handbook of Proteolytic Enzymes 3rd ed.** (ed. Rawlings, N. D. and Salvesen, G.) Elsevier Ltd. pp683-685.

Hizukuri, Y. and Akiyama, Y. (2012) PDZ domains of RseP are not essential for sequential cleavage of RseA or stress-induced  $\square^E$  activation *in vivo*. **Mol. Microbiol.** 86, 1232-1245.

Suno, R., Shimoyama, M., Abe, A., Shimodate, N., Watanabe, Y.-h., Akiyama, Y., and Yoshida, M. (2012) Conformational transition of the lid helix covering the protease active site is essential for the ATP-dependent protease activity of FtsH. **FEBS Lett.** 586, 3117-3121.

Xue, Y., Chowdhury, S., Liu, X., Akiyama, Y., Ellman, J. and Ha, Y. (2012) The conformational change in rhomboid protease GlpG induced by inhibitor binding to its S'-subsites. **Biochemistry** 51, 3723-3731.

[学会発表](計 19 件)

檜作洋平、禾 晃和、田畑早苗、川上-田村 恵子、小田 隆、佐藤 衛、高木淳一、秋山 芳展：大腸菌 RIP プロテアーゼ RseP のタンデム PDZ ドメインによる新たな機能制御メカニズム。第 85 回日本生化学会大会、福岡、2012年12月14日-16日

檜作洋平、秋山 芳展：Analysis of a regulatory mechanism of the proteolytic function of RseP by the PDZ domains in extracytoplasmic stress response. 日本生物物理学会第 50 回年会、名古屋、2012年9月22日-24日

檜作洋平、禾 晃和、田畑早苗、川上-田村

恵子、小田 隆、佐藤 衛、高木淳一、秋山芳展：大腸菌表層ストレス応答に關与する膜内切断プロテアーゼ RseP の PDZ ドメインによる新たな機能制御メカニズム。第 6 回細菌学若手コロッセウム、八王子、2012 年 8 月 8 日-10 日

秋山芳展：大腸菌 S2P ファミリープロテアーゼ RseP の機能と制御。2011 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの細胞構築と増殖制御の研究」、三島、2012 年 3 月 20 日-21 日

檜作洋平、小田 隆、田畑早苗、川上-田村恵子、佐藤 衛、高木淳一、禾 晃和、秋山芳展：立体構造解析に基づく大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP のタンデム PDZ ドメインによる切断基質選別機構モデル。第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 3 日

秋山芳展：膜内部でのタンパク質切断による表層ストレス応答制御機構。京都大学微生物科学寄附研究部門主催第二回シンポジウム「微生物科学研究の多様性と新展開」、京都、2013 年 11 月 8 日

檜作洋平、小田 隆、田畑早苗、川上-田村恵子、佐藤 衛、高木淳一、禾 晃和、秋山芳展：Substrate discrimination mechanism by a PDZ tandem in the intramembrane protease RseP that regulates extracytoplasmic stress response。第 51 回日本生物物理学会年会、京都、2013 年 10 月 28 日

檜作洋平、禾 晃和、小田 隆、田畑早苗、川上-田村恵子、佐藤 衛、高木淳一、秋山芳展：大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の基質認識における PDZ ドメインの役割。第 86 回日本生化学会大会、シンポジウム「非常識なプロテアーゼ反応：膜内部でのタンパク質切断」、横浜、2013 年 9 月 11 日-13 日

Nogi, T., Hizukuri, Y., Oda, T., Tabata, S., Tamura-Kawakami, K., Sato, M., Takagi, J., and Akiyama, Y.: Structural analysis of the PDZ tandem fragment of the bacterial intramembrane-cleaving protease RseP. International Conference on Structural Genomics 2013, Sapporo, Japan, July 29-August 21, 2013

秋山光市郎、禾 晃和、秋山芳展：S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の「膜内部に挿入したヘアピン領域」の機能。第 10 回 21 世紀大腸菌研究会、伊豆、2013 年 6 月 20 日-21 日

檜作洋平、小田 隆、田畑早苗、川上-田村恵子、佐藤 衛、高木淳一、禾 晃和、秋山芳展：膜内切断プロテアーゼ RseP のタンデム PDZ ドメインが介する切断基質選別機構。第 10 回 21 世紀大腸菌研究会、伊豆、2013 年 6 月 20 日-21 日

檜作洋平、小田 隆、田畑早苗、川上-田村恵子、大井里香、佐藤 衛、高木淳一、禾 晃和、秋山芳展：細菌表層ストレス応答制御に關わる膜内切断プロテアーゼ RseP のタンデム PDZ ドメインによる切断基質選別機構の解析。第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月 15 日-18 日

秋山芳展、森 博幸：細菌表層タンパク質の機能発現と秩序維持機能。シンポジウム「分子から生命へ」、京都、2014 年 7 月 26 日

秋山光市郎、水野慎也、檜作洋平、禾 晃和、森 博幸、秋山芳展：大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の保存された膜内挿入ループ領域の機能解析。第 14 回日本蛋白質科学会年会、横浜、2014 年 6 月 25 日-27 日

秋山光市郎、水野慎也、檜作洋平、禾 晃和、森 博幸、秋山芳展：S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の膜内挿入ループ領域の機能解析。第 11 回 21 世紀大腸菌研究会、盛岡、2014 年 6 月 5 日-6 日

檜作洋平、秋山芳展：膜内切断プロテアーゼ RseP による大腸菌 $\sigma^E$ 経路表層ストレス応答の制御機構。2013 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの細胞構築・運動・増殖機構の研究」、三島、2014 年 3 月 25 日-26 日

秋山芳展：膜内部でのタンパク質切断による表層ストレス応答制御機構。分子遺伝学シンポジウム「新しい生命像を導いた大腸菌遺伝学の系譜」、京都、2014 年 3 月 1 日

秋山芳展：大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の特徴的な膜内挿入ループ領域の機能解析。2014 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞の増殖メカニズムの先端的研究」、三島、2015 年 3 月 23 日-24 日

Akiyama, K., Mizuno, S., Hizukuri, Y., Mori, H., Nogi, T., Akiyama, Y.: Analysis of the conserved membrane-reentrant loop of RseP, an intramembrane-cleaving protease. The 13th International Student Seminar, Kyoto, Japan, March 3-7, 2015.

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 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：