

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840033

研究課題名(和文) 膜内タンパク質切断に着目した表層ストレス応答システムの細胞内可視化と新規機能探索

研究課題名(英文) Live-cell imaging of a bacterial extracytoplasmic stress response and exploration of a novel function of an intramembrane protease that regulates the stress response

研究代表者

檜作 洋平 (HIZUKURI, Yohei)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：70568930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細菌の生存戦略に関わる、E経路表層ストレス応答の中心因子である膜内切断プロテアーゼRsePの研究を進めることで表層ストレス応答システムを総合的に理解することを目的とした。大腸菌RsePの機能解析を通して、基質認識・切断制御機構に関わる新規機能調節領域としてMRE ループ領域、C1N領域を発見した。これはヒトまで保存される膜内切断プロテアーゼ研究において新たな知見を与える。またRsePの未知の機能に関わりうるいくつかの新規切断基質を同定した。また、RsePによるモデル基質切断のリアルタイム蛍光顕微鏡観察系を確立し、今後の表層ストレス応答システムのダイナミクス解析の基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：An intramembrane protease RseP is a key regulator in the E-pathway extracytoplasmic stress response (ESR) which is critical for bacterial survival under stressed conditions. In this research project, I have aimed to understand a whole picture of the ESR system. Through a detailed functional analysis of the Escherichia coli RseP, I have revealed that two novel regions in RseP, the MRE-loop and the C1N regions, play a crucial role for substrate recognition and cleavage mechanism. This finding gives us new insight into intramembrane cleaving proteases highly conserved from bacteria to human. We have identified some novel proteolytic substrates of RseP, which might taught us possible new roles of RseP. I have also established a live-cell imaging system for visualizing an RseP-dependent substrate cleavage event by fluorescent microscopy. This system must be useful for a kinetic analysis for the ESR system in the future.

研究分野：膜タンパク質科学

キーワード：大腸菌 プロテアーゼ 表層ストレス応答 S2P 蛍光イメージング GFP 生化学 生物物理学

### 1. 研究開始当初の背景

細菌は、様々な外環境変化に対処するための「表層ストレス応答」機構を持つ。表層ストレス応答は細菌の生存戦略の一端を担うと共に、例えばサルモネラ菌などの病原性細菌が、宿主生物に感染・侵入した際の防御応答に対抗するための主要な機構の1つでもあり、その解明は医学的見地からも重要である。大腸菌の主要な表層ストレス応答経路の一つ、<sup>E</sup>経路表層ストレス応答では、熱ストレスなどによって引き起こされる異常外膜タンパク質 (OMP) や外膜リポ多糖 (LPS) の蓄積を感知し、2つの膜プロテアーゼ DegS と RseP が膜貫通型アンチ<sup>E</sup>タンパク質 RseA を連続的に切断することで、通常時は細胞質内で不活性に保たれているストレス応答転写因子<sup>E</sup>を活性化させる。二段階目の切断を担う RseP は、脂質二重層内部でペプチド結合の加水分解を触媒するという極めて特徴的な性質をもった「膜内切断プロテアーゼ (I-CLiP)」の一員である。RseP は通常、完全長の RseA は切断できず、DegS による切断を受けた「RseA 分解中間体」のみを切断するという厳密な基質切断制御を受けていることが知られている。

近年、厳密に制御された RseA の二段階切断機構について研究が進められ、RseP の基質切断制御・基質選別機構について興味深い事実が明らかとなりつつある。従来、RseP の生理的切断基質は RseA しか知られておらず、RseA に特異的なプロテアーゼであると信じられてきたが、RseP が様々な分泌タンパク質前駆体が膜透過した後に膜中に残されるシグナルペプチド (SP) を切断、分解することが明らかとなった (Saito et al., 2011, Proc. Natl. Acad. Sci. USA)。つまり RseP は<sup>E</sup>活性化能のみならずシグナルペプチドペプチダーゼ能 (SPP 能) も持ち合わせた多機能性プロテアーゼといえる。また、RseP のペリプラズム領域に位置し、基質切断制御に関与するとされる2つの PDZ ドメイン (PDZ-N と PDZ-C) の結晶構造解析及び生化学的解析から、PDZ タンデムが形成するポケット様構造がサイズ排除フィルターのように働き、ペリプラズム領域の大きな膜貫通タンパク質を排除することで配列非特異的に切断基質を選別するという機構が提案された (Hizukuri et al., 2014, Structure)。この制御機構は<sup>E</sup>経路表層ストレス応答における RseA の二段階切断制御や、SP 切断制御を上手く説明するものであるが、同時に RseP の切断基質が多岐に渡り、それぞれに対応する未知の機能を有している可能性を示唆している。また、RseP はペリプラズム領域の小さな膜タンパク質全てを切断できるわけではないことから、PDZ ドメインによるサイズ排除フィルター機構以外にも基質選別機構が存在する可能性が示唆されていた。

### 2. 研究の目的

本研究では大腸菌の生存戦略に関わる<sup>E</sup>経路表層ストレス応答を題材に、その中心因子であり、多機能性プロテアーゼともいえる膜内切断プロテアーゼ RseP を主軸として研究を行い、RseP の新規機能調節機構を明らかにするとともに、表層ストレス応答全体を視野に入れた従来の解析手法とは異なるアプローチを用いることで、RseP の新たな生理的機能を探索しつつ細菌の表層ストレス応答システムの包括的な理解を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) RseP の PDZ ドメインに主眼を置き、<sup>E</sup>経路表層ストレス応答に関わる新規ストレスシグナルを探索・同定・解析することで、<sup>E</sup>経路表層ストレス応答の制御機構の全容を分子レベルで解明する。同時に遺伝子変異解析、生化学的解析による詳細な分子機構の解析を行うことで RseP の新規機能調節機構にもアプローチする。

(2) RseP を中心とし、関連因子群の蛍光顕微鏡観察による表層ストレス応答システムの細胞内可視化を行う。新たな視点から RseP の未知の機能にアプローチするとともに、膜タンパク質ダイナミクスのリアルタイム解析などを通して細胞全体のダイナミックなイベントとしての表層ストレス応答イベントを理解する。

### 4. 研究成果

(1) 細菌の持つ<sup>E</sup>経路ストレス応答における新規の<sup>E</sup>活性化経路の探索を目的として解析を行った( )。一方、その過程で当初の研究実施計画にはないアプローチから<sup>E</sup>活性化の中心的役割を果たす膜内切断プロテアーゼ RseP の機能解析を試み、いくつかの成果が得られた( )。

新規<sup>E</sup>活性化ストレスの探索と解析：  
サルモネラ菌を用いた DegS 非依存的<sup>E</sup>活性化ストレス応答の解析の一環として、先行研究で報告された酸性ストレス添加によるストレス応答を検証した。サルモネラ菌を用いて様々な培養条件や背景株、発現系を検討し、特定の条件下で酸性ストレス添加を行った時に DegS 非依存的に全長 RseA の切断が起きることを定量化により示した。これは DegS に依存しない新たな<sup>E</sup>活性化ストレスとして、新たな研究材料となりうるものである。また、サルモネラ菌を用いることで、病原性細菌による病原性発揮と<sup>E</sup>経路ストレス応答との関連性の解明にアプローチすることが可能となる。

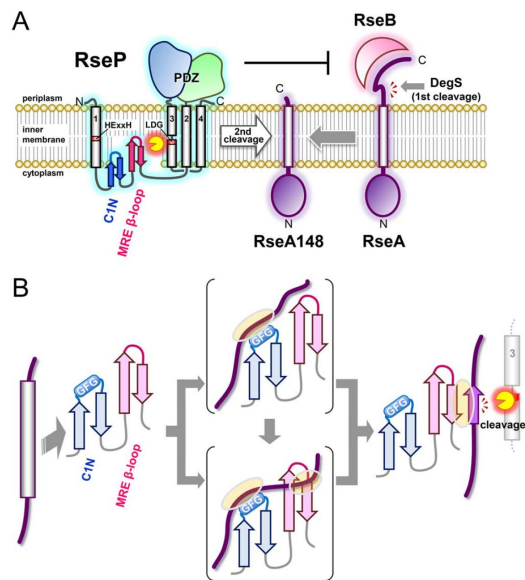
RseP MRE ループ領域の機能解析：  
RseP ホモログの構造及び配列比較から、RseP の細胞質領域に位置する保存されたヘア

ピン様ループ構造を見出し、membrane reentrant  $\beta$ -loop (MRE ループ) と命名した。このループ領域の変異は基質特異的な切断阻害を示し、この領域が選択的基質切断に関わることが示唆された。また、共免疫沈降実験やクロスリンク実験から、MRE ループ領域が基質の膜貫通領域と直接相互作用することが強く示唆された。さらに、基質膜貫通領域のヘリックス構造を不安定化させる変異により、MRE ループ領域の変異体による基質切断がアリル特異的に回復した。これらの結果を踏まえ、「MRE ループは、基質の膜貫通領域と特異的に相互作用することで、切断を受けにくいヘリックス構造から伸びたストランド構造への変化を促し、RseP 活性部位へと提示することで、基質の選択的切断に必須の役割を果たす」とのモデルを提唱した。この MRE ループの機能は、PDZ ドメインのサイズ排除フィルターによる基質選別に加えて第二の基質選別チェックポイントとして働くものと考えられる。この内容は学術雑誌 *eLife* において報告した (Akiyama et al., 2015)。

#### RseP C1N 領域の機能解析：

RseP の MRE ループに隣接する領域には、保存された挿入配列が存在する。この領域は RseP の C1 ループ内の N 末端側に位置することから C1N と命名し、その機能を解析した。C1N の中でも特に保存性が高い GFG モチーフ周辺に高次構造を不安定化させるアミノ酸置換変異を導入することで RseP の機能が低下したことから、MRE ループと同様 C1N も高次構造が重要であるものと考えられる。また、RseP の C1 領域に導入した Cys 残基に対する膜不透過性チオール基修飾試薬 AMS による修飾を指標とした系統的変異解析から、MRE ループと C1N が共に部分的に膜ドメイン内部に挿入されていることが示唆された。C1N と MRE ループのある変異は、単独では RseP の機能にほとんど影響を及ぼさないが、それらを組み合わせることで著しい機能の低下が見られたことから、これらの領域が物理的又は機能的に相互作用することが示唆された。更に、共免疫沈降実験やクロスリンク実験から、C1N の GFG モチーフ内の残基が基質と直接相互作用することが示唆された。MRE ループと基質の相互作用が C1N 変異と MRE ループ変異のいずれによっても著しく低下したのに対し、C1N と基質の相互作用は C1N 変異では低下するが MRE ループ変異では低下しなかった。これらは、C1N が MRE ループとは独立に基質と相互作用し得ること、そして C1N での基質との相互作用が MRE ループにおける相互作用よりも上流に位置づけられることを示唆する。以上の結果から、C1N は、1) MRE ループが正常な機能や構造を取ることをサポートし、一方、2) MRE ループとは別に基質と相互作用する、という 2 つの役割を果たしているものと考えら

れる。RseP は、MRE ループ領域と C1N 領域以外にも、活性触媒残基を含む TM3 で基質と相互作用する。以上の結果を総合して、「RseP の基質膜貫通領域はまず C1N と相互作用し、その後 MRE ループ/TM3 に移動し、最終的に活性部位へと提示されることで切断を受ける」という、RseP の基質認識・切断機構についての新たなモデルを提案した (図)。この内容は学術雑誌 *Molecular Microbiology* において報告した (Akiyama et al., 2017)。



図：RseP による基質認識・切断機構モデル。(A) RseP による RseA の切断。(B) C1N と MRE ループを介した基質認識・切断様式。Akiyama et al., 2017, *Mol. Microbiol.* より転載。

#### RseP の新規機能調節領域 (PCT 領域) の解析：

RseP ペリプラズム領域の PDZ ドメインと TM3 の間には機能未知の大きな領域が存在する。これを periplasmic C-terminal (PCT) 領域と命名し、解析を行った。PCT 領域の欠失変異や点変異体解析から、この領域が RseP のプロテアーゼ活性は基質切断制御に関与することを見出した。また、PCT 領域の二次構造予測から、この領域に特徴的な両親媒性 Helix が含まれることが明らかとなった。この Helix に着目し、点変異体解析を行った所、いくつかの変異体でプロテアーゼ活性の低下や安定性の低下が見られることを見出した。これらの成果は RseP の新たな機能制御領域の発見へとつながる重要な知見である。

#### RseP の新規切断基質 SMP の解析：

RseP の新たな切断基質の探索を目的とし、42 種の分子量の小さな推定一回膜貫通タンパク質 (small membrane protein: SMP) を対象として網羅的基質切断スクリーニングを行った。その結果、12 種の SMP モデル基質に

において RseP のプロテアーゼ活性依存的に切断断片を生じることを見出した。そこで候補として見出した SMP 群が RseP によって切断を受ける真の基質であることを確定させるため、5 種の SMP に着目し、より本来の状態に近い小タグを付加した状態で RseP による切断能を検証した。精製した RseP と無細胞合成系で合成した SMP とを反応させて *in vitro* での切断を調べた所、2 種の SMP において RseP のプロテアーゼ活性依存的に SMP が切断断片を生じることが示した。これらの結果から、SMP のいくつかは RseP によって確かに切断を受けることを強く示唆する。候補として挙げた 12 種の SMP の中には機能未知のものも多く、RseP の新規機能の解明につながる可能性がある。また、これらの新規切断基質候補はそれぞれが独立の解析対象となりうるため、本研究の目的である新規の<sup>E</sup>活性化経路の解明につながるだけでなく、<sup>E</sup>活性化ストレス応答の全容解明に向けてより多面的な解析へと発展させることが可能と考えられる。

(2) 蛍光顕微鏡観察による表層ストレス応答システムの細胞内可視化とそれによる膜ダイナミクス解析の実現を目指し、大腸菌において蛍光顕微鏡観察系の確立を試みた。RseP 及び RseA に緑色蛍光タンパク質 EGFP を融合させた蛍光融合体をいくつか作製し、分解が少なく安定で蛍光強度の強い蛍光顕微鏡観察に適した融合体を得た。RseP-GFP 融合体はモデル基質の切断能を有していた。作製した融合体は細胞膜上に蛍光局在した。また EGFP よりも蛍光効率の良い改変体である msfGFP (monomeric super-folder GFP) を導入し、より効率よく蛍光を発する GFP-RseA 融合体を取得した。次に、*rseP* 欠失株中で GFP-RseA 融合体を発現させ、そこに RseP を発現誘導させたところ、時間経過とともに細胞膜上に蛍光局在を示す菌体の割合が減少し、細胞質内に蛍光局在を示す菌体が増加することを示した。さらに、アガーで作製したパッド上に菌体を固定し、同一の菌体をタイムラプスで長時間観察したところ、RseP の発現誘導に依存して細胞膜上から細胞質内へ蛍光局在シフトしていく様子を観察した。これは RseP による RseA の膜内切断反応を一細胞でリアルタイム観察した初の例と言える。これらの結果は、表層ストレス応答関連因子の膜ダイナミクス解析の基盤となるものと考えられる。

本研究全体を通じて RseP の基質認識・切断制御機構に関わる新規機能調節領域として MRE ループ領域、C1N 領域を発見し、それぞれ学術雑誌に発表するとともに、さらに PCT 領域という新たな領域も見出した。これはヒトまで保存される膜内切断プロテアーゼ研究において新たな知見を与える重要な成果

である。また新規切断基質として同定された SMP 群は RseP の未知の機能に関わる可能性があり、細菌表層ストレス応答の枠組みを越えた新たな研究への展開が期待される。また、表層ストレス応答システムの細胞内可視化に向けて RseP によるモデル基質切断のリアルタイム蛍光顕微鏡観察系を確立した。今後のストレス応答のダイナミクス解析への展開が期待される。

#### <引用文献>

Akira Saito, Yohei Hizukuri, Ei-ichi Matsuo, Shinobu Chiba, Hiroyuki Mori, Osamu Nishimura, Koreaki Ito, Yoshinori Akiyama, Post-liberation cleavage of signal peptides is catalyzed by the site-2 protease (S2P) in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108 巻, 33 号, 2011, 13740 13745

Yohei Hizukuri, Takashi Oda, Sanae Tabata, Keiko Tamura-Kawakami, Rika Oi, Mamoru Sato, Junichi Takagi, Yoshinori Akiyama, Terukazu Nogi, A structure-based model of substrate discrimination by a non-canonical PDZ tandem in the intramembrane-cleaving protease RseP, *Structure*, 22 巻, 2014, 326 336

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計2件)

Koichiro Akiyama, Yohei Hizukuri, Yoshinori Akiyama, Involvement of a conserved GFG motif region in substrate binding by RseP, an *Escherichia coli* S2P protease, *Molecular Microbiology*, 査読有, 104 巻, 5 号, 2017, 737 751  
DOI:10.1111/mmi.13659

Koichiro Akiyama, Shinya Mizuno, Yohei Hizukuri, Hiroyuki Mori, Terukazu Nogi, Yoshinori Akiyama, Roles of the membrane-reentrant -hairpin-like loop of RseP protease in selective substrate cleavage, *eLife*, 査読有, 4 巻, 2015, e08928  
DOI:10.7554/eLife.08928

##### [学会発表](計8件)

檜作 洋平、照島 功祐、秋山 芳展、細菌 Rhomboid プロテアーゼ GIpG の生理的切断基質の探索及びべん毛 III 型分泌装置との関係、第 89 回日本生化学会大会、2016、9 月 27 日、仙台国際センター/東北大学 川内北キャンパス(宮城・仙台)

檜作 洋平、細菌膜内切断プロテアーゼの総合的理解に向けて：～機能制御機構を

中心に～、ウイルス感染症・生命科学先端  
融合的共同研究拠点セミナー、2016、11  
月24日、京都大学 ウイルス・再生医科学  
研究所（京都・京都）

檜作 洋平、照島 功祐、秋山 芳展、  
Screening of physiological substrates  
of E. coli rhomboid protease GlpG:  
possible involvement of GlpG in the  
flagellar function、第54回日本生物物理  
学会年会、2016、11月27日、つくば国  
際会議場（茨城・つくば）

檜作 洋平、秋山 芳展、Live-cell imaging  
of a proteolytic event by an  
intramembrane protease RseP that  
regulates extracytoplasmic stress  
response、第53回日本生物物理学会年会、  
2015、9月15日、金沢大学 角間キャンパ  
ス 自然科学本館（富山・金沢）

檜作 洋平、秋山 芳展、細菌表層ストレ  
ス応答を制御する S2P ファミリー膜内切  
断プロテアーゼの細胞内イメージング解  
析、BMB2015、2015、12月3日、4日、神  
戸ポートアイランド（兵庫・神戸）

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  
ス応答制御に関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、2014、10月18日、国立京都  
国際会館/グランドプリンスホテル京都(京  
都・京都)

〔図書〕(計2件)

Yohei Hizukuri、Koichiro Akiyama、  
Yoshinori Akiyama、Elsevier Inc.、  
Methods in Enzymology、vol.584、  
Enzymology at the Membrane Interface:  
Intramembrane Proteases ( Edited by  
Michael H. Gelb ) 内、Chapter One -  
Biochemical Characterization of  
Function and Structure of RseP, an  
Escherichia coli S2P Protease、2017、  
総ページ数 496 ( 内 1-33 ページ )

檜作 洋平、秋山 芳展、医歯薬出版株式  
会社、別冊・医学のあゆみ「レドックス  
UPDATE ストレス制御の臨床医学・健康  
医学」(監修:平家 俊男,淀井 淳司)内、  
膜内部での蛋白質分解とストレス応答制  
御、2015、総ページ数 344 ( 内 69-74 ペ  
ージ )

〔その他〕

ホームページ等  
京都大学ウイルス・再生医科学研究所 秋山

研究室ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜作 洋平 (Hizukuri, Yohei)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・  
助教

研究者番号：70568930