

氏名	さい かわ なお や 才 川 直 哉
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2632 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	FtsH の 活 性 中 心 と 細 胞 内 存 在 状 態 の 解 析

(主 査)  
論文調査委員 教授 伊藤 維昭 教授 三木 邦夫 教授 井上 丹

### 論 文 内 容 の 要 旨

FtsH は大腸菌の細胞質膜に存在する ATP 依存性のプロテアーゼであり、膜透過装置の中心的サブユニットである SecY や H<sup>+</sup>-ATPase の  $\alpha$  サブユニットなどの膜内在性タンパク質が複合体を形成し損なった場合にそれらを分解除去する。また、熱ショック転写因子  $\sigma^{32}$  や  $\lambda$ C II など、いくつかの短寿命の細胞質タンパク質も分解することが知られている。亜鉛プロテアーゼは HEXXH モチーフを活性中心に持つことが知られており、このモチーフの His 残基は Zn<sup>2+</sup> の配位に必要である。FtsH は His<sup>417</sup>-Glu-Ala-Gly-His 配列を持ち、その His<sup>421</sup> 残基と Glu<sup>418</sup> 残基はプロテアーゼ活性に必須であることから、亜鉛プロテアーゼと考えられている。亜鉛プロテアーゼにおいては、HEXXH モチーフの二つの His 残基とともに亜鉛の配位にかかわる第3のアミノ酸残基が存在する。Gluzincin と呼ばれる一群では HEXXH モチーフの20~120残基 C 末端側にこの第3のアミノ酸に相当する Glu 残基が存在する。申請者はこの第3の亜鉛配位残基を同定した。FtsH ホモログのアミノ酸配列の比較によると大腸菌 FtsH の479番目と585番目に相当する Glu 残基が保存されていることに基づき、これらの残基の変異解析を行った。In vivo において、Glu<sup>585</sup> 残基の他のアミノ酸への置換変異体の多くは、機能を保持していたが、Glu<sup>479</sup> 残基に置換変異を導入した場合には、大部分の変異体が明らかな機能低下を示した。いくつかの Glu<sup>479</sup> 置換変異体を精製し、その活性を測定した。これらの変異タンパク質は ATPase 活性を保持しているにもかかわらず、明らかなプロテアーゼ活性の低下がみられた。変異体のプロテアーゼ活性は高濃度の Zn<sup>2+</sup> 存在下では部分的に回復した。精製 Glu<sup>479</sup> 変異体タンパク質の CD スペクトルを測定し、またそのトリプシン感受性を調べたところ、いずれにおいても野生型との間に有意な差異が見られなかった。すなわち、Glu<sup>479</sup> に導入したアミノ酸置換は、FtsH に非特異的な変性などの大幅な構造変化をもたらさないものと考えられる。また、Glu<sup>479</sup> 変異体タンパク質における Zn<sup>2+</sup> の含有量を測定し、野生型酵素に比べて有意な減少を観察した。これらの結果から、申請者は、大腸菌 FtsH において Glu<sup>479</sup> が、亜鉛の結合に直接関わる第3の残基であると結論した。

次に、申請者は細胞内において FtsH がどのような複合体を形成しているかなど、その存在状態をしらべた。FtsH はホモオリゴマーを形成すると共に、膜貫通部位を1個持つ膜タンパク質である HflK と HflC の複合体 (HflKC) との結合能を持つことが知られていた。しかし、細胞内で FtsH がどのような存在状態にあるかは、基礎的な情報であるにもかかわらず研究がなされていなかった。申請者は、野生株大腸菌細胞の膜画分を n-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside により可溶化し、ショ糖密度勾配遠心を行うことにより、沈降速度によって分画した。この実験により、細胞内の FtsH はその大部分が 41S, 1300 kDa 程度の巨大な複合体として沈降することが明らかとなった。このフラクションには HflK, HflC も存在し、 $\Delta$ ftsH,  $\Delta$ hflKC 何れの変異によってもこの複合体は消失した。これらの結果から、申請者はこの巨大複合体が FtsH-HflKC からなっていることを明らかにし、それを FtsH ホロ酵素と命名した。FtsH ホロ酵素は、大腸菌の内膜において例外的に大きなタンパク質複合体であり、ショ糖密度勾配遠心のみで他の膜タンパク質可溶化物から分離精製できることを示した。FtsH ホロ酵素は基質膜タンパク質を結合できることから、生理的に意味のある構造体であることを示唆した。また、ADP

の存在下では FtsH ホロ酵素複合体の解離が促進されることも見出し、FtsH ホロ酵素は動的な構造体であることを示唆した。

### 論文審査の結果の要旨

細胞には、新たに合成されたタンパク質の正しい高次構造形成を促進する因子群と同時に、異常な構造をとったタンパク質を分解するというタンパク質の分解による品質管理機構も備わっている。このような機構は、生物種を越えて普遍的に存在しており、近年、様々な方向から研究が進められている。しかし、可溶性タンパク質の分解機構に比べて、膜タンパク質の分解や品質管理の研究は限られている。本研究の題材である FtsH は膜タンパク質を分解する ATP 依存プロテアーゼであり、自身も膜に組み込まれている。その細胞質ドメインには進化的に保存された AAA ATPase 活性中心と亜鉛プロテアーゼ活性中心モチーフをもっている。FtsH は膜タンパク質の品質管理において重要な役割を担っていると考えられるが、膜タンパク質に対する効果的な加水分解がどのような機序で可能になっているのかなど、根本的で興味深い問題を内包している。当研究室の研究により、FtsH は基質膜タンパク質を細胞質に引きずり出しつつプロセッシブな分解を行うとの機構が提唱されているが、このようなプロセスの分子機構やその制御を理解するためには、酵素の活性中心を明らかにしたり、その細胞内での他の成分との相互作用や存在状態の解明といった基礎的な知識を整備することは重要である。

本申請論文において申請者は、FtsH のプロテアーゼ活性中心を形成するアミノ酸残基のうち、従来不明であった第 3 の亜鉛配位残基を同定した。そして FtsH が Gluzincin 型の亜鉛プロテアーゼであることを明らかにした。これまで、FtsH によるタンパク質加水分解触媒の分子的理解は立ち後れており、亜鉛プロテアーゼと考えられていたものの、 $Zn^{2+}$  の結合に関与する残基の直接的な同定はなされていなかった。本研究による  $Zn^{2+}$  配位残基の同定は、FtsH の機能解析の基礎として欠くことのできない成果として評価でき、学界に対する貢献度も高いものと認められる。

後半部分においては、申請者は FtsH の細胞内における存在状態を解明するため、野生株細胞の膜を界面活性剤で可溶化した後しよ糖勾配遠心によって分画するという単純な実験を取って行い、この酵素が従来知られていなかった巨大な FtsH-HflKC 複合体 (FtsH ホロ酵素) として存在することを発見した。申請者の結果は、大腸菌の細胞質膜において FtsH ホロ酵素が例外的に大きな複合体であることを示している。ハイテク実験技法に目を奪われがちなこの時代にあって基本に立ち返った問を發する非凡さは高く評価されるべきであろう。FtsH はホモオリゴマーを作ることが知られていたが、細胞内でこれほど大きな複合体として存在していることは知られていなかった。HflKC はこれまで、FtsH の活性制御因子である考えられてきたが、今回細胞内の FtsH はほとんど全て HflKC と複合体として存在することがわかったため、FtsH の機能やその制御を理解するためには、HflKC の存在を常に意識して研究しなければならないこととなり、今後のこの分野に及ぼす影響は多大である。因みに、HflKC は全ての高等生物においてもそのホモログ (prohibitins) が FtsH ホモログとともにミトコンドリアに存在することがわかっており、本研究は生物種を越えた膜タンパク質の品質管理機構の研究に寄与するものである。申請者の結果は FtsH ホロ酵素は ADP 型で不安定化することを示唆しており、FtsH の ATPase 反応サイクルがホロ酵素の部分的弛緩を伴って、本酵素の活性発現に関与するとの新たな問題点を提起するものである。

以上、本研究は、FtsH プロテアーゼの基礎的な性質を明らかにするばかりでなく、今後の研究の道筋を示すものでもあり、膜タンパク質の分解機構の理解に貢献するところが大きい。よって、博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位論文に報告されている内容およびこれに関連する分野について諮問した結果、合格と判定した。