

氏名 松本 弦  
 学位(専攻分野) 博士 (理学)  
 学位記番号 理博 第 2202 号  
 学位授与の日付 平成 12 年 3 月 23 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 タンパク質膜透過の駆動における SecY と SecA の相互作用

論文調査委員 (主査) 教授 伊藤維昭 教授 井上 丹 教授 三木邦夫

### 論文内容の要旨

大腸菌の表層タンパク質はタンパク質膜透過装置の働きにより膜を越えて輸送される。膜内在性の SecY-SecE-SecG 複合体がチャンネルを形成し、SecA ATPase が前駆体タンパク質の動きを駆動する。SecA によるタンパク質膜透過駆動の分子機構として、insertion/deinsertion モデル (Wickner ら) がある。これによれば、SecA は ATP と前駆体タンパク質の存在下で前駆体タンパク質を伴って膜に挿入し、ATP 加水分解により前駆体を遊離して戻る。従来この反応は、反転膜小胞を用いた *in vitro* 実験系で研究されてきた。申請者は遺伝生化学的アプローチによって、SecA の挿入における膜内在性 SecY タンパク質の役割を明らかにすること、SecA insertion 反応が実際に膜透過を駆動し、この機構が *in vivo* でも働いているのかどうかを明らかにすることを目的に本研究を行った。

既に分離済みの多数の低温感受性 *secY* 変異株から反転膜小胞を調製してスクリーンした結果、SecA の insertion 反応に欠損を持つ変異株 *secY205* を同定した。そして、この欠損が ATP と前駆体タンパク質に呼応した productive な SecA insertion 反応に特異的なものであり、非水解 ATP アナログ存在下で観察される SecA 単独での「空荷 insertion」はあまり損なわれていないことを見出した。SecA の insertion 反応が SecY タンパク質のアミノ酸置換により特異的に損なわれることから、SecA insertion に SecY が重要な役割を果たしていることが強く示唆される。さらに、*secY205* の低温感受性を抑制する *secA* 変異を分離し、そのひとつである *secY36* 変異が *secY205* 変異に特異的な (allele-specific な) サプレッサー変異であることを示し、変異 SecA タンパク質を精製してその活性変化を調べた。SecY205 反転膜小胞は、野生型 SecA との組み合わせでは *in vitro* タンパク質膜透過活性をほとんどもたないが、SecA36 変異タンパク質はこの欠損にうち勝って高い膜透過活性を与え、また SecY205 膜に対しても前駆体と ATP に呼応した insertion 反応を起こすことができた。*In vivo* においても、*secY205-secY36* 二重変異株ではタンパク質分泌能が回復していた。SecY205 膜小胞の機能不全とその SecA36 変異による回復が、膜透過と SecA の productive モードの insertion の二つの *in vitro* 活性において明確に示され、*in vivo* でのこれら二つの変異の表現型とよく一致した。このような結果に基づき、SecA insertion と言う、従来考えられなかったようなダイナミックな蛋白構造の変化が、*in vivo* でも *in vitro* でも実際にタンパク質膜透過に重要な役割を演じていることを明らかにした。

さらに、*secY205* 変異をサプレッスする *secA* 変異を多数、系統的に分離した。それらは、*secY205* 変異に特異的な変異と、*secY205* 以外の様々な *sec* 変異をもサプレッスできる変異 (Super-active SecA) に分類された。前者は SecA の高親和性 ATP 結合部位 (NBS I) あるいは低親和性 ATP 結合部位 (NBS II) の Walker motifA 近くに、後者は NBS II 領域に集中した。後者においては、SecA の機能が異常に昂進していることを提唱した。以上の結果から、SecA の膜への挿入による膜透過機能発現には、2つの ATP 結合ドメインが関与する SecY との相互作用が重要であること、また SecA 機能は通常抑制的に制御されており、この制御には NBS II ドメインが重要であることを示した。そして、SecA の構造と機能に関する考察を行った。

また、本研究では得られた SecA 変異体を利用して、SecYEG チャンネルにおける SecG サブユニットの役割に関して、そ

れが SecA 機能を補助することにより、その結果 ATP エネルギーを効率的に膜透過に利用することを可能にしていることを明らかにした。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、蛋白質の膜透過機構の中心的な問題である膜内在性因子 SecYEG と駆動モーター蛋白質 SecA との相互作用の研究において、顕著な成果を含んでいる。SecA は ATPase として蛋白質の膜を越えた動きを駆動していることは以前から考えられていたが、最近それが膜中に深く挿入し、ATP 加水分解を伴って離脱するとのダイナミックな動きをしていることが明らかになり、注目を集めている。蛋白質の膜透過という問題は前駆体蛋白質と SecA 複合体の膜挿入機構の理解無しには解決しないものと考えられる。申請者はこの SecA の膜挿入反応に注目して種々の変異 SecY の効果を調べ、SecA の挿入を許さない変異 *secY205* を同定した。さらに *secY205* の効果に打ち勝つ SecA のサプレッサー変異を分離、その配列を決定し、変異 SecA 蛋白質が *secY205* の *in vivo* 分泌欠損、*in vitro* 膜透過欠損、*in vitro* SecA 挿入欠損のいずれをも回復させることを見いだした。これらの結果から、SecA の挿入には SecY チャネルの働きが重要であり、SecA 挿入反応が確かに細胞内でも働いて、前駆体を駆動している事が強く示唆された。蛋白質が膜を越えて配置される過程に働く、「膜透過チャネル」には特定の蛋白質の通過を許しつつ、膜の基本的な性質である一般的な透過障壁は保つ性質が要求される。SecA が膜に深く挿入する反応が膜の脂質部分で起こるのか SecYEG チャネルを介して起こるのかは、このようなチャネルに関する基本的な重要問題である。SecY205 変異体は、分泌前駆体タンパク質を伴うモードの SecA 挿入は許さないが、非加水分解 ATP アナログ存在下で観察可能な「空荷の」SecA 挿入は許すとの申請者の結果は、SecA の挿入が実際に SecYEG チャネル中で起こるとの考えを支持するものである。申請者の見出した現象は、まだ不明な点が多いチャネルの性状に関する有る手がかりとなる。以上、膜透過機構の最も重要な問題点の一つに、従来とは異なる方法でアプローチして答えを得たものであり、この分野における貢献度が高い。また、SecY205 変異体は将来の膜透過チャネルの構造生物学的解析において、きわめて有用な研究対象となることが期待される。

さらに、申請者が分離した多数の、*secY205* 変異の低温感受性をサプレッスする *secA* 変異は、SecA の変異体解析としては例を見ない本格的なものであり、変異体コレクションは SecA の構造と機能に関する今後の貴重な材料となり得るものである。それらは、SecY-SecA の相互作用と膜挿入に関する研究に意義を持つ他、SecA 自体の活性制御機構の研究にも貴重なものである。

以上、本研究は、タンパク質の膜透過の駆動の分子機構と細胞機構の解明に極めて重要な貢献をした研究である。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、主論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と判定した。