

氏 名	まつ お 英 一
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2073 号
学位授与の日付	平 成 11 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	タンパク質膜透過装置における SecY, SecE, SecA 間の相互作用と Syd の作用機構
	(主査)
論文調査委員	教 授 伊 藤 維 昭 教 授 井 上 丹 教 授 三 木 邦 夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

大腸菌において、分泌タンパク質前駆体を膜を越えてペリプラスムへ輸送するために働く膜透過装置の膜内在性成分の内、SecYとSecEは膜透過のための経路(チャンネル)を形成する基本因子である。ATPase活性を持つSecAは膜内在性Sec因子と相互作用しつつ、前駆体タンパク質の動きを駆動する。本研究ではSecYと相互作用して、そのSecEとの相互作用に影響を与えるタンパク質として同定されたSydの持つ、SecY24変異型膜透過装置に与える顕著な阻害作用について解析し、この現象を利用してSecY-SecE相互作用に関わる変異体を得、また、SecYE複合体とSecAとの相互作用の研究を行った。

Sydは過剰発現すると、タンパク質膜透過系に対して、(1)野生型SecYの優先的安定化によるSecYの優性欠損変異体(*secY<sup>d</sup>1*)の分泌阻害効果の抑制、(2)*secY24*変異株の増殖に対する著しい毒性と分泌阻害、などの効果を及ぼす。従来、SecYの第4細胞質領域のアミノ酸置換(*secY24*変異: Gly<sup>240</sup>Asp)により、SecYとSecEの相互作用が低下すること、そしてSydがSecYと直接相互作用することが分かっていたが、申請者は、膜に組み込まれた状態のSecYとSecEの存在状態をトリプシン消化実験によって調べ、SecY24変異タンパク質においては膜中でSecEとの結合がルースになっていることを示し、また、Sydの添加によってSecY24変異体や過剰発現したSecYのトリプシン消化パターンが変化することから、SydはSecEと強固な複合体を作っていない状態のSecYと優先的に結合することを明らかにした。

次に反転膜小胞とSecAを用いた*in vitro*膜透過反応に対するSydの効果を詳しく解析した。Sydは*secY24*変異株から調製した反転膜小胞へのproOmpA(分泌タンパク質前駆体)の透過を速やかに阻害する事を見だし、SecY24膜透過装置の機能を直接阻害することを示した。膜透過を駆動するATPaseであるSecAはATPと前駆体タンパク質に呼応して、自身の一部を膜中に深く挿入させ、ATP加水分解に伴って脱挿入を起こすことが知られる。SecY24変異型膜小胞を用いた場合、Sydは膜小胞のSecAに対する高親和性結合を喪失させ、膜透過反応のサブステップのうち、前駆体タンパク質の膜透過に共役したSecAのtranslocation ATPase活性および膜への挿入を強く阻害することを明らかにした。また、非水解ATPアナログ存在下でSecAの膜挿入状態を安定化させた状態にもSydが作用してSecAを脱離させることを見いだした。これらの結果に基づき、SydはSecY24(SecEとの相互作用が弱まっている)とSecEによって形成される高親和性SecA結合部位を破壊するばかりか、SecAの挿入部位となるチャンネル構造そのものを損ねるとの解釈を提唱した。Sydの上記の*in vitro*作用がSecYとの特異的相互作用によることを、Sydに対する感受性を失わせる第2の変異の分離と、その*in vitro*解析によって示した。*secY24*変異株のSyd感受性を喪失させる変異は野生型への復帰変異を含め4種類に収斂し、*secY249*(Ala<sup>249</sup>Val)変異は*secY24*変異の表現型のうちSyd感受性のみを喪失させるものであり、この残基のSydとの相互作用への関与が示唆された。残基240がAlaに置換したSecY241変異体では、SecEとの相互作用能が野生型よりも強まっていることが*secY<sup>d</sup>1*変異との遺伝学的相互作用の解析から示唆された。SecY-SecE複合体によりSecAの高親和性結合サイトと膜透過チャンネルが形成される過程を研究するため、SecY(野生型・変異型)を単独過剰生産させて精製する方法を確立し、精製したサブユニットを用いた再構成実験系の構築を行った。SecY24とSecY241変異体の挙動から、SecYとSecEの相互作用には、複合体形成に関

わる初期相互作用と、最終的複合体の安定性に関わる相互作用の二つの異なるフェイズがあることを提唱した。

## 論文審査の結果の要旨

タンパク質膜透過機構において、膜内在性タンパク質（大腸菌ではSecYEG）によって構成される膜透過「チャンネル」の実体とタンパク質の膜を越えた動きの駆動機構は重要な問題である。原核生物では、SecA ATPaseがそのダイナミックな構造変化によってタンパク質を動かしている。SecYとSecEがチャンネルの基本成分であり、SecAと相互作用する事により膜透過装置が構築されるものと考えられるが、SecYとSecEの会合によって高親和性SecA結合部位と機能的なチャンネル構造が形成される過程と「チャンネル」の実体、また、そのSecAとの相互作用の分子機構など、重要な問題が未解明である。また、膜透過チャンネルは必要と時のみオープンするなど厳密な制御下にあるものと考えられるが膜透過系の制御についてはほとんど知見がない。申請者の研究は、SecYとSecEの相互作用およびこれらの複合体とSecAの相互作用の問題に、遺伝学的手法と生化学的手法を組み合わせることで取り組んだものである。もう一つの特徴はSecYと相互作用するタンパク因子Sydの作用を利用したユニークなアプローチをとったことである。Sydは過剰生産したときにsecYの優性欠損変異を抑制する因子として同定されたが、申請者はこれがサブユニット状態のSecYと優先的に結合し、SecEとの相互作用が低下した変異体SecY24の機能を激しく阻害することを、*in vitro* 膜透過系での解析により明らかにした。そして、この阻害機構として、膜上のSecAに対する高親和性結合部位の喪失を見いだした。SecYとSecEによってSecA結合部位がどのように構築されるのかという問題に対して有用な実験系を見いだしたことは高く評価できる。SecAの膜への挿入は、SecYEGチャンネル中に起こるものと考えられているが、その分子的な実体は分かっていない。通常、ATPの加水分解が起こらなければSecAは膜に挿入した状態で動きを停止して、挿入状態が安定化されるが、申請者はSecY24変異サブユニットを持つ膜小胞では高濃度のSydによって、ATP加水分解に共役することなくSecAが膜から排除されることを見いだした。この時、SecYEチャンネル構造に顕著な変化がおきていることが考えられ、この現象は膜透過チャンネルの構造の解析に寄与するものと期待される。

申請者がsecY24変異株に対するSydの毒性を利用して単離したSecYの第4細胞質領域の変異には、Sydとの相互作用に関わるものとSecEとの相互作用を変化させるものの2者があった。前者は膜透過系の制御に関わる可能性があるSydの役割解明に、後者は膜透過チャンネル構築の研究に役立つものである。申請者が*in vivo*ではSecEとの相互作用が強まっていることを遺伝学的手法で明らかにした変異体（SecY241）は、界面活性剤で可溶化した状態ではむしろSecEとの結合が弱まっていた。申請者は、この原因を解明し、またSecY-SecE相互作用に関する基本的な研究を行うため、精製膜タンパク質を用いる再構成系で変異の影響を調べる実験系を構築した。疎水性の強いSecYはその過剰生産、可溶化、精製のいずれも困難なタンパク質であるが、一つ一つ条件を検討・最適化し、様々な変異体タンパク質を再構成することに成功したことは、重要な貢献であり、今後の研究発展を可能にしたことは評価できる。SecY-SecE相互作用に関して、膜に組み込まれて複合体を確立するまでに必要とされる相互作用と確立した複合体における相互作用が同一ではない可能性を指摘したことは、膜透過チャンネルの理解に留まらず、膜中におけるタンパク質複合体の形成機構という未開拓の領域にも貢献するものである。

以上、申請者はタンパク質膜透過系におけるタンパク質相互作用とその制御に関して、新たな知見を得ると同時に、今後の研究に役立つ系を開発し、膜タンパク質相互作用に新たな概念を提唱するなどの貢献をしたものと評価できる。よって本論文は博士（理学）の学位論文として充分価値あるものと認められる。

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、合格と認めた。