

氏 名	しら い よし のり 白 井 良 憲
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 1844 号
学位授与の日付	平成 9 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 生 物 物 理 学 専 攻
学位論文題目	タンパク質の膜組み込みにおけるストップトランスファーの解析

(主 査)
論文調査委員 教授 藤吉好則 教授 高橋 敏 教授 伊藤維昭

論 文 内 容 の 要 旨

本申請論文において、申請者は膜タンパク質の生合成におけるタンパク質の膜への組み込み機構の解明を目指して、その基本反応の一つである「ストップトランスファー」過程の基礎的研究を行った。

大腸菌の分泌タンパク質が細胞質膜を越えて配置されるために起こる、いわゆる膜透過の機構の研究は近年著しい進展を見せ、膜透過反応に必要な蛋白因子 (Sec 因子) の同定とその作用の分子機構の解明がなされた。一方、膜タンパク質がいかにして特定の方向性を持って膜に組み込まれるかについての機構は未だ不明な点が多い。膜タンパク質の膜組み込み様式の一つとして、膜透過装置によって駆動されるポリペプチド鎖の膜内輸送過程が、膜貫通部位となるべき疎水性配列で停止され、膜透過経路 (SecYEG チャンネル) から脱出して、脂質 2 重層に安定に組み込まれるとの機構が想定されており、ストップトランスファー機構による膜組み込みと言われる。このような過程がいかなる細胞因子の媒介のもとに起こるのか等の問題を設定し、大腸菌細胞由来の *in vitro*, *in vivo* での実験系を用いて研究を行った。

まず、以前の研究により、ある種のモデルたんぱく質のストップトランスファー過程に異常をもたらす変異として分離された *ftsH* 変異に関する、マルチコピーサプレッション解析を行った。*FtsH* は膜蛋白質であり、最近ある種のタンパク質に対する選択的分解活性を持つことが明らかにされているが、申請者は *FtsH* の枯渇や機能欠損変異によってもたらされる増殖欠損やタンパク質局在異常が分子シャペロン *HtpG* (*Hsp90*) あるいは *GroE* (*Hsp60*) の過剰発現により回復する事を見だし、*FtsH* はこれらの分子シャペロンとオーバーラップした機能を持つことを示唆した。しかしながら、分子シャペロン機能が直接ストップトランスファー過程に必須のものであるかどうかは、不明である。その為、申請者はストップトランスファー反応の素反応を解析する系を構築し、それを利用して最小限必要とされる因子や反応条件を特定した。膜透過過程が詳細に研究されている分泌 (外膜) タンパク質である *OmpA* を膜透過を起こさせる母体として用い、その C 末端付近に内在性細胞質膜タンパク質として確立しているラクトース透過酵素の 12 番目の膜貫通配列 (TM12) を付加した。このようなモデルタンパク質 (*proOmpA-TM-*

Myc)は大腸菌細胞質膜由来の反転膜小胞を用いて *in vitro* で膜透過反応を起こさせると、TM12 付近で膜透過停止を効率よく起こすことを見いだした。さらに膜内在性膜透過因子である、SecYEG 複合体を部分精製し、人工膜に組み込ませたプロテオリボソームと膜透過駆動 ATPase である SecA を用いた膜透過反応において、ストップトランスファーを効率よく起こさせることに成功した。同じモデルタンパク質を生細胞で発現させ、*in vitro* で起こったものと同様な位置での透過停止が生理的条件下で起こることを確認した。これらの結果から、ストップトランスファーにおける膜透過停止反応は、主要膜透過因子からなる膜透過装置において起こり得るものであることを明らかにした。同時に、proOmpA-TM-Myc が、*in vivo* で過剰発現した場合、細胞に強い毒性をもたらし、分泌タンパク質 β ラクターゼの分泌を阻害することを見だし、このような人工的蛋白質が、膜組み込み過程を完全には遂行できない可能性を指摘した。

論文審査の結果の要旨

遺伝情報の翻訳産物としてのタンパク質がどのような過程を経て、機能を持った細胞構成要素となるのか、という問題は細胞生物学の今日的な研究課題として、集中的に研究されており、タンパク質の膜との相互作用を介した配置の問題もその中心課題の一つである。その過程がどのような細胞因子によって補助され、あるいは司られているのかは重要な問題である。従来、タンパク質の膜透過の研究に比べ、膜組み込みの研究は、限られており、本研究はこの分野への意義ある貢献の一つと位置づけることができる。

分子シャペロンが可溶性タンパク質の折り畳み制御、構造形成補助の役割を担っていることは、広く認識されるに至ったが、膜タンパク質の構造形成に関わる分子シャペロン機能に関しては、詳しい解析がなされていない。申請者は、膜結合 ATPase / protease である FtsH が分子シャペロンと一部オーバーラップした機能を持つことを示唆する遺伝学的証拠を見いだした。この研究により、細胞内において FtsH が膜タンパク質の形成において何らかの役割を果たしていることが更に示唆されたことは、今後の FtsH タンパク質の機能解析及び膜タンパク質生合成の研究に重要な知見である。一方で、申請者は膜タンパク質形成の基本過程の一つであるストップトランスファーの分子機構解明も目指して、最小限の要素への還元を試み、膜透過装置自体に疎水性アミノ酸配列を認識して膜透過を停止させる働きが備わっていることを見いだした。この結論は、解析に適した新たなモデルタンパク質の構築、アッセイシステムの確立、膜透過装置の再構成などを駆使して導かれたものであり、評価に値する。

膜透過装置を基盤とするストップトランスファー膜組み込み過程には、「膜透過チャンネルを介したポリペプチド鎖の膜に対する垂直方向へのトポロジー形成」および「疎水性領域の膜透過装置からの脱出と水平方向への移動および脂質 2 重層への安定な取り組み」という二つの問題がある。本研究では、前者(膜タンパク質のどの部分が膜透過を起こして、どのような配向で膜に組み込まれるかという問題)に属する、疎水性アミノ酸配列による膜透過停止機構に関して、重要な結論を得たものである。後者の問題に関して、本研究でもアプローチはなされたが、解析を行うための的確な実験方法が現段階では知られていないため、明快な結論は得られていない。申請者は、本研究で見いだした人工的膜タンパク質の細胞毒性など *in vivo* におけるこのような後者の問題解決への手がかりになることを提唱しており、評価に値する。

以上のように、申請者は、膜タンパク質の膜への組み込み機構に関して、基本的な反応に分解したアプローチを行う一方、遺伝学的・生理学的研究を同時に組み合わせて、生体内反応との対応および生理的な意義の追求を行った。これらの研究により、膜タンパク質の組み込み過程の理解が前進し、また、新たな問題提起がなされた。以上の審査結果を総合して、本論文が理学博士の学位取得に十分な内容をもつものと結論した。