

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                      |    |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----|--------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 博 士 ( 理 学 )                          | 氏名 | 秋山 光市郎 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 大腸菌 S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の基質認識機構 |    |        |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                      |    |        |
| 1. 序論                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                      |    |        |
| <p>脂質二重層内部に活性部位を持ち、膜タンパク質の膜貫通領域(TM)を切断する一群のプロテアーゼが存在し、膜内切断プロテアーゼ(I-CLiPs; <u>I</u>nt<u>r</u>am<u>e</u>mb<u>r</u>ane-<u>C</u>leav<u>i</u>ng <u>P</u>roteases)と呼ばれている。多くの場合、I-CLiPsは1回膜貫通型膜タンパク質を切断する。I-CLiPsは<math>\gamma</math>-セクレターゼ/SPP(Signal Peptide Peptidase)、ロンボイド、S2P(Site-2 Protease)の3つのファミリーに大きく分類される。I-CLiPsによる基質切断は、コレステロールの生合成、ストレス応答、細菌の芽胞形成や病原性発現といった多様な生命現象に関わり、細胞の機能や生育等に重要な役割を果たす。また、I-CLiPsの機能不全はアルツハイマー病やパーキンソン病などの原因となる。近年、I-CLiPsの研究が様々な面から進められているが、その基質認識、切断機構はいまだ不明点が多い。大腸菌のS2PホモログであるRsePは、1回膜貫通型アンチ<math>\sigma^E</math>因子RseAの膜内切断を通して<math>\sigma^E</math>経路表層ストレス応答に関わる。<math>\sigma^E</math>経路においては、まず表層ストレスを感知した内膜プロテアーゼDegSがRseAをペリプラズムドメインで切断し、続いてRsePがDegSによる切断で生じた「RseA分解中間体」を膜内部で切断することで、最終的に転写因子<math>\sigma^E</math>が活性化する。RsePによるRseAの切断は厳密に制御されており、DegSによる1段階目の切断を受けたRseA中間体のみがRsePの基質となる。また、RsePはRseA以外にも、分泌タンパク質の膜透過後に内膜に残留したシグナルペプチドを切断する。我々は以前にRsePによる基質選別機構に関して、「RsePのペリプラズム領域に存在するPDZドメインが、大きなペリプラズムドメインを持つ基質の切断を、立体障害によって防ぐサイズ排除フィルターとして働く」というモデルを提唱した。一方で我々は、ペリプラズムドメインが小さいにもかかわらずRsePによる切断を受けない基質が存在することも見出しており、RsePにはサイズ排除フィルター以外にも基質を選別する機構が備わっていることが推測されていた。</p> |                                      |    |        |
| 2. 結果                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                      |    |        |
| 2-1. MRE $\beta$ -loopを介した基質選別機構                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                      |    |        |
| <p>好熱菌のS2PホモログであるmjS2Pの結晶構造には、<math>\beta</math>-ヘアピン様の構造が細胞質側から膜ドメイン内部の活性部位近傍に挿入されている領域が存在する。一般的にポリペプチド鎖は膜内部では<math>\alpha</math>-ヘリックスを形成しやすいにもかかわらず、この領域は<math>\beta</math>-ストランドを形成している点が特徴的である。我々はこの領域をMRE <math>\beta</math>-loop (Membrane-reentrant <math>\beta</math>-loop)と名付けた。MRE <math>\beta</math>-loopのアミノ酸配列はホモログ間で保存されており、大腸菌RsePもTM1とTM2の間の細胞質側ループ領域(C1ループ)にMRE <math>\beta</math>-loopを持つ。我々は、MRE <math>\beta</math>-loopがRsePの機能において重要な役割を果たしている可能性があると考え、その機能解析を行った。まず、MRE <math>\beta</math>-loop領域を対象にシステマティックな変異解析を行い、C末端側の<math>\beta</math>-ストランド周辺に高次(二次)構造を不安定化するアミノ酸置換変異を導入することでRsePの機能切断能が著しく低下することを見出した。このことから、MRE <math>\beta</math>-loopの高次構造がRseP機能に重要であることが示唆された。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                      |    |        |

幾つかのMRE  $\beta$ -loop変異体は基質特異的な切断阻害効果を示した。また、共免疫沈降実験やクロスリンク実験の結果、MRE  $\beta$ -loopのC末端側の $\beta$ -ストランド上の残基が基質と直接相互作用することが強く示唆された。更に、基質TMに $\alpha$ -ヘリックスを不安定化する変異を導入することで、MRE  $\beta$ -loop変異による基質切断の低下がアシル特異的に回復した。

## 2-2. RsePによる基質切断におけるC1N領域の働き

RsePのMRE  $\beta$ -loopに隣接する領域には、mjS2Pにはない挿入配列が存在する。我々は、この領域がgroup Iサブファミリーに属するバクテリアのS2Pホモログにおいて保存されていることを見出し、RsePのC1ループ内のN末端側領域に存在することから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す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  $\beta$ -loop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システムティックな解析から、MRE  $\beta$ -loopとC1Nが共に部分的に膜ドメイン内部に挿入していることが示唆された。C1N変異とMRE  $\beta$ -loop変異のあるものは、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  $\beta$ -loopと基質の相互作用がC1N変異とMRE  $\beta$ -loop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  $\beta$ -loop変異では低下しなかった。これらは、C1NがMRE  $\beta$ -loopとは独立に基質と相互作用し得ること、C1Nでの基質との相互作用がMRE  $\beta$ -loop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。

## 3. 考察

### 3-1. MRE $\beta$ -loopによる基質選別モデル

MRE  $\beta$ -loopを対象とした解析の結果を踏まえて我々は、「MRE  $\beta$ -loop は $\beta$ -ストランド付加機構で基質TMと特異的に相互作用することで切断を受けにくい $\alpha$ -ヘリックス構造から伸びた $\beta$ -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」というモデルを提唱する。このモデルは、プロテアーゼによる切断を受けにくいとされる $\alpha$ -ヘリックスを形成する基質TMをRsePが如何にして切断するのか、という疑問に対して初めて明確な回答を示したものである。MRE  $\beta$ -loopはPDZサイズ排除フィルターを通過した基質候補を更に選別する為のチェックポイントとして働くのではないかと考えている。

### 3-2. RsePと基質の相互作用

本研究の結果から、C1Nは、1) MRE  $\beta$ -loopが正常な機能や構造を取ることをサポートし、一方、2) MRE  $\beta$ -loop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、本研究で見出したMRE  $\beta$ -loopとC1N以外にも、活性部位構成残基を含むTM3で基質と相互作用する。本研究の結果を総合して「基質TMはまずC1Nと相互作用し、その後MRE  $\beta$ -loop/TM3に移動し、最終的に活性部位へ提示されることで切断を受ける」という、基質とRsePとの相互作用の様態についてのモデルを提案する。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

膜内切断プロテアーゼは特異的な基質タンパク質の切断を通じて様々な生体プロセスに関与する。しかしながら、膜内タンパク質切断の分子機構には不明点が多い。本研究では大腸菌S2Pファミリー膜内切断プロテアーゼRsePに存在する、MRE  $\beta$ -loop及びC1N領域に着目し、その機能解析を行うことでRsePによる特異的な基質認識・切断機構を明らかにした。

MRE  $\beta$ -loopについては、この領域が RsePの膜ドメイン内部に挿入した構造を持ち、RseP機能に必須の役割を果たすこと、その高次構造が重要であり、loopの後半部分が基質膜貫通領域と直接かつ特異的に相互作用することを等を示した。これらの結果から、「MRE  $\beta$ -loopは基質膜貫通領域を特異的に認識して相互作用することで、切断を受けにくい $\alpha$ -ヘリックスから $\beta$ -ストランドへの構造変換を促し、活性部位に提示する」というモデルを提唱した。

また、C1Nは、MRE  $\beta$ -loopと機能的相互作用を持つ一方、保存されたGFGモチーフ領域でMRE  $\beta$ -loopとは独立に基質と相互作用しうること等を示した。これらのことから、基質はまずC1Nと相互作用し、その後MRE  $\beta$ -loopへと移行して切断を受ける可能性を示した。

本研究で提唱されたRsePによる特異的な基質認識・切断機構は新規性が高く、膜内切断プロテアーゼ機能の理解に貢献するものである。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成29年3月23日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日：                      年                      月                      日以降