

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	宮崎 亮次
論文題目	部位特異的 <i>in vivo</i> 光架橋法を利用した細胞内タンパク質動態の研究		
(論文内容の要旨)			
<p>本研究では、細胞のタンパク質恒常性維持機構を理解するために2つの視点から研究を行った。第1章では、細胞がどのようにタンパク質の異常を感知し、それに対処するのかに焦点をあて、大腸菌の熱ショック応答の制御機構の解明を目的に研究を進めた。第2章では、細胞内で如何にしてタンパク質が適切な構造体を形成するのかという点に着目し、細胞内で迅速に起こるタンパク質のフォールディング・複合体形成過程を高時間分解能・高空間分解能で解析可能な手法の構築を行った。</p>			
第1章. 熱ショック転写因子σ^{32}とシグナル認識粒子の相互作用機構			
<p>熱ショック応答は、細菌からヒトに至るまで普遍的に保存された細胞の恒常性維持の機構である。大腸菌においては、転写因子σ^{32}が熱ショック応答における遺伝子発現の誘導に中心的役割を果たす。σ^{32}は短寿命な細胞質タンパク質であり、通常は膜結合型プロテアーゼFtsHにより速やかに分解される。σ^{32}の活性や量はストレスにより一過的に上昇するが、熱ショック誘導性の分子シャペロンがσ^{32}の負の制御 (不活性化・分解促進) に働き、応答は収束する。しかしながら、σ^{32}の負の制御は既知因子のみを用いた<i>in vitro</i>系では再現されず、未知因子の関与が示唆されていた。</p>			
<p>最近、予想外にもSRP (シグナル認識粒子) 等の膜タンパク質の膜への輸送・組込みに働く因子がσ^{32}制御に関わることを見出し、「σ^{32}は、SRP経路により細胞質膜へと運ばれ、活性抑制とFtsHによる分解を受ける。分子シャペロンはこの過程を促進する」という新奇モデルが提唱された。上記モデルでは、σ^{32}がSRPと直接相互作用するものと考えているが、σ^{32}はSRPが通常相互作用する「シグナル配列」や「膜貫通配列」を持たず、SRPがどのようにσ^{32}を認識し、相互作用するかは明らかではなかった。そこで、部位特異的<i>in vivo</i>光架橋を用いてσ^{32}とSRPの相互作用の分子機構を解析した。</p>			
<p>部位特異的<i>in vivo</i>光架橋法は、生細胞内でのタンパク質間相互作用をアミノ酸残基レベルの高分解能で解析できる優れた手法である。この手法では、<i>amber</i>サプレッションを利用して、任意の部位に<i>pBPA</i>等の光反応性非天然アミノ酸を導入した標的タンパク質を細胞内で発現させる。その細胞にUVを照射し、形成された架橋複合体を解析することで、生細胞内で高空間分解能でのタンパク質の相互作用やフォールディングの解析が可能となる。</p>			
<p>σ^{32}の2.1領域のN末端領域 (制御領域) 内の変異が、σ^{32}の制御不全を引き起こすことが報告されており、この領域にSRP等の制御因子が相互作用することが予想された。そこで、σ^{32}の制御領域を標的とした<i>in vivo</i>光架橋解析により、この領域と相互作用する因子を探索し、架橋産物の質量分析解析等から、分子シャペロンだけでなくSRPの構成タンパク質Ffhが架橋相</p>			

手として同定され、細胞内でSRP等が σ^{32} の制御領域と直接相互作用することが強く示唆された。この σ^{32} -Ffh間の架橋は σ^{32} タンパク質の制御不全変異によって変化することを見出し、本研究で見出した σ^{32} とSRPの相互作用が σ^{32} 制御における重要性が示唆された。また、FfhのMドメイン内のシグナル配列相互作用領域を標的とした*in vivo*光架橋解析から、この領域が σ^{32} との相互作用部位であることを支持する結果を得た。さらに、ジスルフィド架橋解析によって、 σ^{32} 制御領域とFfhのMドメインが直接相互作用することが強く示唆された。以上の結果から、SRPは、シグナル配列と同様に、Mドメイン内の疎水的なグルーブを介して σ^{32} の制御領域を認識し相互作用することで、 σ^{32} の機能制御に働くものと考えられる。

第2章. 生細胞内で新規合成されたタンパク質のフォールディング・アセンブリー過程を解析可能な新たな手法の開発

新生タンパク質の成熟化は、リボソームでの合成、細胞内の適切な場所への輸送（局在化）、機能的構造の形成（フォールディング・サブユニットアセンブリー）といった過程を経て起こる。これらの過程において、新生タンパク質は分子シャペロン等、様々な細胞因子と一過的に相互作用する。細胞内でのタンパク質成熟過程を理解するためには、迅速に起こるタンパク質間相互作用の変化を高時間・空間分解能で解析する必要があるが、それを可能とする簡便な手法は存在しなかった。本研究では部位特異的*in vivo*光架橋法を改良することで、そのような解析が可能な手法の開発に取り組んだ。

部位特異的*in vivo*光架橋法は、生細胞内でのタンパク質の動態を高い空間分解能で解析できる優れた手法である。しかしながら、従来の方法では、検出可能な架橋複合体の形成に通常数分以上のUV照射が必要であり、その時間分解能の低さのため、迅速なタンパク質間相互作用の変化を追跡することはできなかった。

我々は、非常に強力なUV照射器を用いることで、1秒程度の照射により従来条件での6分照射時に匹敵する架橋を形成できることを見出した。これとパルスチェイス法を組み合わせることで、迅速に起こるタンパク質相互作用を追跡する手法（PiXie）法を構築した。PiXie法の有用性を実証するために3種のタンパク質複合体をモデルとして解析を行った。まず、PiXie法でペリプラズムのホモ2量体タンパク質PhoAを用い、新規合成後光架橋による生じる2量体の形成速度を解析すると、先行研究と同様の結果が得られ、本手法によって成熟過程におけるタンパク質複合体形成過程を解析できることを示した。また、内膜のSecD/SecF複合体形成過程の解析によって、SecDのペリプラズムドメインの折り畳みがSecD/SecF膜貫通領域のアセンブリー過程に先だって起こることが示唆された。さらに、外膜のLptD/LptE複合体の解析から、LptEは「LptD成熟中間体」と相互作用して複合体形成すること、LptDの成熟中間体は少なくとも二つの異なる状態を取り得ることが示唆された。

本研究で構築したPiXie法によって、これまで解析が困難であった細胞内でのタンパク質の成熟中間体でのフォールディング・相互作用を解析できることが実証された。また、本手法は一般的に成熟過程の解析が困難な膜タンパク質にも適用できることが分かった。PiXie法は、細胞内タンパク質動態を解析し得る、汎用性・有用性の高いツールとなるものと期待される。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

細胞内のタンパク質は適切に合成されて機能を持ち、又それが維持される必要がある。細胞はこのための精緻な機構を有する。本論文では、このような機構を理解するために2つの研究が行われた。

まず、細胞が如何にして異常タンパク質を感知し、それを処理するかに焦点をあてて、大腸菌の熱ショック応答の制御機構の研究が進められた。大腸菌の熱ショック応答は、転写因子 σ^{32} によって制御される。先行研究で、予想外にも膜タンパク質の生合成に働くシグナル認識粒子 (SRP) が σ^{32} の機能制御に働くことが示された。しかしながら、従来の基質タンパク質と異なり疎水的配列を持たない σ^{32} が、SRPにどのように認識されるかは不明であった。宮崎氏は部位特異的*in vivo*光架橋法を駆使して、 σ^{32} とSRPの相互作用機構を解析した。その結果、SRPは、シグナル配列と同様に、Mドメイン内の疎水的なグループを介して、 σ^{32} の制御領域を認識し相互作用することが示し、SRPが両親媒性ヘリック領域を認識し得ることを示唆した。

さらに、本研究では、部位特異的*in vivo*光架橋法の改良に取り組み、これをパルスチェイス法と組み合わせることで、細胞内で合成されたタンパク質のフォールディング・サブユニットアセンブリー過程を高時間・高空間分解能で解析可能な手法 (PiXie法) の構築を行った。これを用いて、異なる3種のタンパク質複合体形成過程を調べ、PiXie法が迅速に起こるタンパク質生合成・複合体形成過程を解析できることを実証した。

SRPと熱ショック転写因子 σ^{32} の相互作用の研究は独創的なもので有り、熱ショック応答を理解する上で重要な知見をもたらした。また、PiXie法は、生細胞内でのタンパク質動態解析の有用なツールになると期待される。これらの研究は、タンパク質動態研究に大きく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30年1月16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