

# 学位論文の要約

題目 部位特異的 *in vivo* 光架橋法を利用した細胞内タンパク質動態の研究

氏名 宮崎 亮次

## 序論

タンパク質は化学的性質の異なる 20 種類のアミノ酸が重合されて形成される生体高分子化合物である。重合されたアミノ酸(ポリペプチド鎖)は構成するアミノ酸の数やその配列によって様々なタンパク質構造へと折り畳まれる。さらに、多くのタンパク質は単独で働くだけでなく、自身または他のタンパク質と安定な複合体を形成して機能する。このように形成された多種多様なタンパク質構造体が、細胞の形成・エネルギー生産・自己複製等の様々な生命現象を担う。そのため、細胞内のタンパク質の機能が損なわれると、細胞は機能不全となり、個体レベルでの重大な疾病や、最悪の場合には死へと繋がる。このような状況を回避するために、細胞は巧みなタンパク質恒常性維持機構を有している。

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進めた。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機能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。

## 第1章. 熱ショック転写因子 $\sigma^{32}$ とシグナル認識粒子の相互作用機構

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  $\sigma^{32}$  が熱ショック応答における遺伝子発現の誘導に中心的な役割を果たす。 $\sigma^{32}$  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。 $\sigma^{32}$  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(DnaKJ 等)が  $\sigma^{32}$  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、 $\sigma^{32}$  の負の制御は既知因子のみを用いた *in vitro* 系では再現されず、未知因子の関与が示唆されていた。

我々は最近、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  $\sigma^{32}$  制御に関わることを見出し、「 $\sigma^{32}$  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」という新奇モデルを提唱した。上記モデルでは、 $\sigma^{32}$  が SRP と直接相互作用するものと考えているが、 $\sigma^{32}$  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  $\sigma^{32}$  を認識し、相互作用するかは明らかではない。そこで、本研究では、部位特異的 *in vivo* 光架橋を用いて  $\sigma^{32}$  と SRP の相互作用の分子機構を解析した。

部位特異的 *in vivo* 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い分解能で解析できる手法である。この手法では、*amber* サプレッションを利用することで、任意の部位に *pBPA* 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によって、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。

$\sigma^{32}$  の 2.1 領域の N 末端領域(制御領域)内の変異が、 $\sigma^{32}$  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、 $\sigma^{32}$  の制御領域を標的とした部位特異的 *in vivo* 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 (DnaKJ) だけでなく SRP の構成タンパク質 Ffh やを架橋相手として同定され、細胞内で SRP 等が  $\sigma^{32}$  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  $\sigma^{32}$ -Ffh (SRP) 間の架橋は  $\sigma^{32}$  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  $\sigma^{32}$  と SRP の相互作用が  $\sigma^{32}$  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  $\sigma^{32}$  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、 $\sigma^{32}$  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  $\sigma^{32}$  の制御領域を認識し相互作用することで、 $\sigma^{32}$  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や輸送装置等、様々な細胞因子と一過的に相互作用する。このような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い時間・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相互作用・フォールディング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、秒スケールで進行する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。

この問題点を克服するために、条件検討を重ねた結果、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。この改良した部位特異的 *in vivo* 光架橋法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。ペリプラズムタンパク質 PhoA は、生化学的解析により、低温 (15°C) では合成後数分程度で成熟化 (ホモ 2 量体形成) することが示されていた。PiXie 法で新生 PhoA の 2 量体架橋形成の速度を解析すると、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/SecE 複合体形成過程の解析によって、SecD の大きな可溶性ドメインのフォールディングが SecD/SecE 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、簡便かつ汎用性・有用性の高いツールとなるものと期待される。