

学位論文の要約

題目 大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP が有する新奇生理機能の解明

氏名 横山達彦

序論

生命の最小単位である細胞にとって、生体膜は自己と外界を隔てる物理的障壁であるのみならず、物質交換など多彩な生体反応が起こる場であり、また外界と情報をやりとりするためのインターフェイスでもある。これらの役割を主に担うのが、生体膜に数多く存在する膜タンパク質である。細胞はこれら膜タンパク質の機能や量を、外界の環境や細胞の状態に応じて適切に制御しなければならない。このような制御のメカニズムについては不明な点も多いが、近年の様々な研究成果から、プロテアーゼによる膜タンパク質の切断・分解が、その重要な一翼を担っていることが明らかにされつつある。

IMP (*Intramembrane protease*; 膜内切断プロテアーゼ) は、生体膜内部という疎水的な環境で、膜タンパク質を加水分解するユニークなプロテアーゼである。IMP はあらゆる生物種で高度に保存されており、多様な細胞イベントに関与している。本研究は、IMP に属する S2P ファミリープロテアーゼの中で、最も研究が進んでいるものの一つである、大腸菌 RseP を対象としたものである。本研究の目的は、大腸菌 RseP が有する未同定の切断基質を特定し、その切断に如何なる生理的な意義があるかを明らかにすることで、S2P ファミリープロテアーゼの基質認識・切断機構と細胞内機能の理解を推し進めることである。

本論文の構成は次のとおりである。第1章では、RseP が SMP (*Small membrane protein*; 約 50 アミノ酸残基以下の一回膜貫通タンパク質) を切断しうることを実証し、さらに RseP が SMP の切断を介して SMP の機能を制御しうることを明らかにした。第2章では、プロテオーム解析を用いて RseP の基質を探索し、RseP の新たな生理基質として FecR を同定した。さらに RseP が FecR の切断を介して、細胞の鉄取り込みを担う遺伝子群の転写制御に関与することを明らかにした。第3章では、第2章で見出した新奇基質 FecR が、細胞内で多段階の切断を受けることを見出し、その切断制御機構の解析に取り組んだ。

第1章 RseP による多様な SMP の切断とその生理的意義

大腸菌 RseP は (1) RseA の切断を介して σ^E 表層ストレス応答に必須な役割を果たす、(2) signal peptides の切断を介して膜の品質管理に寄与する、という二つの生理機能を有する

ことが明らかにされている。RseP はこれら以外にも未知の基質・機能を有していると考えられてきたが、これまでに見出されている基質には明らかなコンセンサス配列や共通モチーフが存在しないため、基質アミノ酸配列の情報を元に生理基質を予測することは困難である。RseP はペリプラズム領域の小さな II 型 (N_{in}-C_{out}) 一回膜貫通タンパク質を特異的に認識して切断すると考えられていることから、第 1 章ではペリプラズム領域をほとんど持たないタンパク質群として SMP に着目し、RseP が SMP を切断する可能性を検証した。

SMP モデル基質を用いて行なわれた *in vivo* でのスクリーニングの結果、RseP によって切断を受けうる SMP を 12 種類同定した。さらに、当研究室で既に解析された 2 種類の SMP を含む 14 種類の SMP について、*in vivo* および *in vitro* でその切断を検証し、RseP が生理的な環境でも SMP を切断していることを示唆した。また、それら SMP のうち、内在性の toxin である HokB について詳細な解析を行い、RseP が HokB を切断することで、その毒性等の機能を抑制しうることを示した。HokB を発現した細胞は休眠状態となり、抗生物質への感受性が低下したパーシスター細胞となることが報告されていることから、RseP は HokB の切断を介して細胞のパーシスター状態の制御に関与している可能性がある。

以上の結果は、RseP が SMP を切断すること、さらにはその切断を介して SMP の機能を制御しうることを示すものである。細胞内における SMP の安定性や分解についてはほとんど明らかになっておらず、本研究は SMP の研究に新たな視点を供するものである。また、S2P ファミリープロテアーゼは幅広い生物種に保存されており、SMP も大腸菌からヒトに至るまで多様な生物種で見出されている。S2P ファミリープロテアーゼによる SMP の切断は、広く種を跨いで存在する SMP の機能制御機構の一つかもしれない。

第 2 章 RseP による FecR の切断と、その切断を介した鉄取り込みの制御

第 1 章では基質探索の対象を SMP のみに絞っていたが、SMP 以外にも RseP によって切断を受ける膜タンパク質は存在する可能性がある。そこで第 2 章では、京都大学薬学部の石濱泰教授のグループとの共同研究によるプロテオミクス解析によって、全膜タンパク質を対象として RseP の基質探索を行った。プロテオミクス解析の結果、RseP の機能欠損に伴って同一のオペロン (*fec* オペロン; 鉄取り込み系の一つである Fec システムを構成する遺伝子がコードされたオペロン) にコードされている 3 種類の膜タンパク質 (FecA、FecD、FecE) の蓄積量が大きく低下することを見出した。RseP が *fec* オペロンの転写制御に関与する可能性を考え、*fec* オペロンの発現レポーター等を構築して解析を進めた結果、鉄クエン酸錯体シグナルに依存した *fec* オペロンの転写活性化には、RseP のプロテアーゼ活性が必要であることが明らかとなった。*fec* オペロンの転写は alternative σ factor である FecI によって制御されており、さらにこの FecI の活性は、一回膜貫通タンパク質 FecR によってコ

ントロールされていると考えられている。これまでに同定された RseP の切断基質と同じく、FecR は II 型の一回膜貫通タンパク質であるため、RseP が FecR の切断を介して、*fec* オペロンの転写活性化に関与している可能性が考えられた。そこで FecR 由来のモデル基質を新たに構築し、それを用いて FecR タンパク質の細胞内動態を解析した。その結果、(1) FecR が内膜において連続的な 3 段階の切断を受けること、(2) そのうち 2 段階目の切断が鉄クエン酸錯体シグナル依存的に生じること、(3) RseP は 3 段階目の最終切断を担い、そこで生じた FecR 断片が FecI を活性化すること、を明らかにした。

第 3 章 鉄クエン酸錯体シグナルに応答した FecR の連続的切断

第 2 章では、2 段階目の切断こそが、以降の FecR の連続的切断とそれに伴う FecI 活性化のトリガーであることを明らかにしたが、肝心の 2 段階目の切断が如何にして制御されているかは不明であった。そこで第 3 章では、この 2 段階目の切断がどのような機構でコントロールされているかを解明するべく、FecR の細胞内における動態をより詳細に調べた。FecR 由来のモデル基質を用いた解析の結果、FecR の 1 段階目の自己切断は細胞質で起こり、さらにそれにより生じる N 末端側断片 CL(a) と C 末端側断片 C-CL(a) が会合することが示唆された。FecR は Tat システムを介して膜挿入されることが最近報告されている。そこで、*tat* 変異株を用いて FecR の膜挿入過程の解析を行った結果、C-CL(a) は CL(a) が膜に挿入されると共役してペリプラズムへ「ヒッチハイク」輸送される可能性が示唆された。さらに、C-CL(a) が CL(a) の切断に対して抑制的に働くことや、C-CL(a) が鉄クエン酸錯体のシグナルに応答して分解されることを見出した。これらの結果・知見に基づいて、CL(a) の 2 段階目切断は C-CL(a) が CL(a) を保護することによって抑制されており、鉄クエン酸錯体のシグナルによってそれが解除されているとの仮説を提唱した。また、CL(a) の分解を担うプロテアーゼの同定にも取り組み、生化学的な解析の結果から、ペリプラズムに存在するセリン・システインプロテアーゼであることが示唆された。

第 2 章および第 3 章は、RseP の新たな生理基質・機能を明らかにしたものであるが、それだけには留まらず、鉄取り込み系の研究としても、長年ミッシングリンクとされてきた Fec システムのシグナル伝達機構の全体像を明らかにしたものである。Fec システムは大腸菌のみならず、グラム陰性細菌に広く保存された鉄取り込み系であり、病原性にも関わることが近年明らかにされつつある。従って本研究は、その病原性発現機構の解明や治療にも貢献しうるものと期待される。