

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	横山 達彦
論文題目	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		
(論文内容の要旨)			
<p>IMP (<i>Intramembrane protease</i>; 膜内切断プロテアーゼ) は、疎水的なリン脂質二重層内部で、膜タンパク質の加水分解を行う。IMPは大腸菌からヒトに至るまで幅広い生物種で保存されているが、その生理機能の全貌は未だ不明である。本研究は、IMPに属するS2Pファミリープロテアーゼの細胞機能と基質切断の理解を目的としたものである。申請者は大腸菌が有するS2PファミリープロテアーゼであるRsePを対象として、RsePが有する新たな基質を特定し、さらにその切断の詳細な解析を通して、RsePの新たな細胞機能を解明した。本論文は以下の3章から構成される。</p>			
<b>第1章 RsePによる多様なSMPの切断とその生理的意義</b>			
<p>RsePは (1) RseAを切断することで表層ストレス応答に関与する、(2) 分泌タンパク質から生じるシグナルペプチドを切断することで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報告されていた。RsePの基質配列特異性は低いことが示唆されているため、RsePは更なる生理基質・機能を有することが想定されていたが、その実態は不明であった。RsePはペリプラズム領域が小さいII型 (<math>N_{in}-C_{out}</math>) 一回膜貫通タンパク質を認識して切断することを踏まえ、第1章では、申請者は大きなペリプラズム領域を持たないタンパク質であるSMP (<i>Small membrane protein</i>; 約50アミノ酸残基以下の一回膜貫通タンパク質) がRsePによる切断を受ける可能性を検討した。SMP由来のモデル基質を用いて、<i>in vivo</i>においてスクリーニングを実施し、12種類のSMPがRsePによって切断されうることを示唆した。さらに<i>in vivo</i>および<i>in vitro</i>の両面からRsePによるこれらSMPの切断を詳細に検証し、生理的な環境においてもRsePがSMPを切断することが示唆された。さらにこれらSMPのうち、内在性toxinであるHokBに着目し、RsePがHokBの切断を介してその機能を抑制しうることを明らかにした。以上の結果は、SMPがRsePによって切断を受ける新たな基質群であり、RsePはSMPの切断を介してそれらの機能制御に関与しうることを強く示唆するものである。</p>			
<b>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</b>			
<p>第1章ではSMPという限られた一群のタンパク質のみを基質探索の対象としたため、第2章では、申請者はプロテオーム解析を用いることで、より網羅的にRsePの基質を探索した。プロテオーム解析は、京都大学薬学部の石濱泰教授のグループとの共同研究として実施した。プロテオーム解析の結果、大腸菌が有する鉄獲得系の一つであるFecシステムを構成するタンパク質群の蓄積量が、RsePの機能不全に伴って有意に低下することを見出した。これらFecシステムを構成する遺伝子群は、同一の<i>fec</i>オペロンにコードされており、さらにこの<i>fec</i>オペロンの転写がalternative <math>\sigma</math> factor</p>			

であるFecIによって制御されていることから、RsePがFecIの活性制御に関与する可能性が示唆された。そこで、*fec*オペロンの発現レポーター等を用いて解析を行い、

RsePのプロテアーゼ活性が、FecIの鉄クエン酸錯体シグナル依存的な活性化に必要であることを示した。また、一回膜貫通タンパク質であるFecRが、FecIの活性制御に関与していることから、申請者はFecRがRsePの切断基質である可能性を考え、検討した。FecR由来モデル基質等を新たに構築して詳細な解析を進めた結果、(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)うち2段階目の切断が鉄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、の諸点を明らかにした。

### **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**

FecRの連続的切断とそれによるFecI活性化のトリガーは、鉄クエン酸錯体シグナルに依存して起こる2段階目の切断であることを第2章では明らかにしたが、その分子機構は不明であった。そこで第3章では、申請者はFecRの細胞動態をさらに詳細に調べることにより、この2段階目の切断がどのようなメカニズムにより制御されているかを解析した。FecRがTat経路を介して内膜に挿入されるとの先行研究を踏まえ、Tat経路の欠損株とFecR由来のモデル基質等を用いてFecRの膜挿入状態を解析し、(1)FecRの1段階目の切断は細胞質で起こりうること、(2)1段階目の切断で生じたFecRのN末端側断片CL(a)とC末端断片側C-CL(a)が会合すること、(3)C-CL(a)はCL(a)がTat経路で膜に挿入されるのに伴い、ペリプラズム空間へ「ヒッチハイク輸送」されることを示唆した。さらに、C-CL(a)がCL(a)の切断に対して抑制的に働き、シグナル依存的なCL(a)の2段階目の切断に必要であることも見出した。以上の結果を基に、申請者はCL(a)の切断は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)の切断を担うプロテアーゼがペリプラズムに存在するセリン、あるいはシステインプロテアーゼであることを示唆する結果も得た。

以上のように本論文において申請者は、多面的なアプローチでRsePの未知切断基質の探索に取り組み、複数の新奇基質を同定した。また、その切断反応を詳細に解析することで、RsePの新たな細胞機能を明らかにし、さらにRsePが関与する新奇な環境適応分子システムを解明するに至った。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

IMPはあらゆる生物種で高度に保存されているが、その生理機能には未だ不明な点が多く残されており、その解明は重要な課題である。申請者は大腸菌が持つIMPの一つであるRsePを対象として、RsePが有する未知基質・生理機能の探索を行った。

まず、RsePが様々なSMPを切断し、さらにRsePがSMPの切断を介してSMPの機能制御に関わりうることを示した。これらの知見は、RsePの新たな細胞機能を明らかにしたものであり、さらにSMP機能の理解に重要であるにもかかわらずほとんど研究がなされてこなかった細胞内における代謝や安定性の一端を明らかにしたのものである点において、高く評価される。

また、鉄獲得系のシグナル伝達を担う一回膜貫通タンパク質FecRがRsePの新奇切断基質であることを突き止め、更にFecRの細胞内動態の詳細を明らかにした。本成果は、RsePの更なる生理機能を明らかにしたものであると同時に、Fecシステムの発見以後、約30年間に亘って実態が不明であったFecシステムにおけるシグナル伝達機構の全体像を明らかにしたものである点において、高く評価出来るものである。

以上のように本論文は、IMPの細胞内機能の理解を推し進めるものであると同時に、大腸菌の細胞表層に存在する環境適応システムの理解にも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、令和5年1月17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