### .DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY LABORATORY OF SUBCELLULAR BIOGENESIS

The research projects carried out in this laboratory are concerned with post-translational events in the expression of genetic information. Specifically, intracellular processes of protein folding, protein translocation across and integration into the membrane, and protein localization to the cell surfaces, as well as proteolytic control of proteins are investigated by combined molecular genetic, biochemical and structural approaches.

Newly synthesized non-cytoplasmic proteins must traverse the membrane. Instead of directly moving through the lipid bilayer, they utilize proteinaceous components of the membrane. Genetic and biochemical studies of the E. coli system revealed that several integral membrane proteins participate in this reaction. Among them, SecY, SecE and SecG are the principal components, which constitute a channel-like pathway for the trans-bilayer movement of polypeptides. The driving force for translocation is provided by the SecA translocation ATPase as well as by the proton-motive force across the membrane. Our research is aimed at understanding how SecY interacts with other integral and peripheral membrane components, as well as with the translocating polypeptide, thereby facilitating its transit. Recent focuses have been on the architecture of the translocation channel within the membrane and its dynamic interaction with the In order to gain molecular insights that are relevant to the protein-driving SecA ATPase. intracellular functioning, we are taking genetic, biochemical and structural biology approaches. Our studies also include additional aspects of intracellular protein dynamics such as processes of membrane protein integration and proteolytic control of membrane proteins. Nascent protein interactions with the ribosomal internal components, found in SecM (secretion monitor) is also being exploited. Finally, we are investigating into the cellular system that supports correct disulfide bond formation of cell surface proteins.

 Multiple Dimeric Assemblies of SecA: H. MORI, K. ITO and D. G. VASSYLYEV<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Biochemistry and Molecular Genetics, University of Alabama)

Molecular mechanisms, by which SecA drives preprotein movement into the SecYEG translocon remain elusive. SecA is a versatile ATPase assuming multiple cellular localizations and conformations. Whereas it is known that its soluble form is dimeric, we must conclude now that the versatility of SecA extends to the modes of subunit arrangement in dimers. Crystal structures show not only different protomer orientations, including anti-parallel, parallel and intertwined, but also completely different subinit interfases (1-5). Among them, we have determined the parallel dimer structure of SecA from *Thermus thermophilus* (1). By disulfide and other chemical crosslinkings between appropriately introduced cysteine pairs, we have shown that

both *T. thermophilus* and *E. coli* SecAs can assume the parallel, anti-parallel and intertwined dimers in solution and that these structures are in equilibrium such that one of them can be trapped by a covalent linkage. Notably, disulfide-tethered dimers thus prepared proved all inactive as the translocation motor. We suggest that the dimeric forms of SecA must be dissociated substantially or completely (6) before interacting productively with the translocon.

4) Zimmer, J., Li, W. and Rapoport, T. A. (2006) J. Mol. Biol. 364, 259-265;

2) Crystallization and X-Ray Diffraction of the SecYE Translocon From Thermus thermophilus in Complex with a Fab Fragment: T. TSUKAZAKI<sup>1</sup>, H. MORI, S. FUKAI<sup>1</sup>, R. ISHITANI<sup>1</sup>, A. PEREDRERINA<sup>2</sup>, D. G. VASSYLYEV<sup>2</sup>, K. ITO and O. NUREKI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, <sup>2</sup>Biochemistry and Molecular Genetics, University of Alabama, U.S.A.)

The SecYE complex in prokaryotes functions as the core component of translocon, the polypeptide-conducting channel in the membrane. Prompted by possible advantages of thermal stability of proteins from thermophilic bacteria, we have been attempting at determining the structure of the *Thermus thermophilus* Sec machinery. Our initial crystals of *T. thermophilus* SecYE (TSecYE) alone never diffracted beyond 6 Å, despite the thorough optimization of the sample preparation-crystallization conditions. To circumvent the difficulty, we prepared a specific monoclonal antibody against TSecYE, with an expectation that the antibody binds TSecYE and provides additional hydrophilic surfaces for crystal contacts. We have indeed succeeded in crystallization of a TSecYE-Fab complex, which gave markedly improved diffractions, at least 3.2 Å, revealing a space group of C2. We anticipate the first three-dimensional structure of a translocon that utilizes SecA as a translocation-driving device to be solved in the near future.

# 3) Use of the *in vivo* Site-Specific Crosslinking Approach for Analyzing SecG Nearest Neighbors: G. KOBAYASHI, K. ITO and H. MORI

Following our success in applying the *in vivo* site-specific crosslinking procedures to the analysis of interaction between translocon (SecY) and traslocation motor (SecA) (1), we now applied this method to characterize the interacting properties of SecG, an auxiliary and dynamic

<sup>1)</sup> Vassylyev, D. G., Mori, H., Vassylyeva, M. N., Tsukazaki, T., Kimura, Y. Tahirov, T. H. and Ito, K. (2006) J. Mol. Biol. 364, 248-258

<sup>2)</sup> Hunt, J. F., Weinkauf, S., Henry, L., Fak, J. J., McNicholas, P., Oliver, D. B. and Deisenhofer, J. (2002) Science 297, 2018-2026;

<sup>3)</sup> Sharma, V., Arockiasamy, A., Ronning, D. R., Savva, C. G., Holzenberg, A., Braunstein, M. Jacobs, W. R., Jr. and Sacchettini, J. C. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 2243-2248

<sup>5)</sup> Papanikolau, Y., Papadovasilaki, M., Ravelli, R. B. G., McCarthy, A. A., Cusack, S., Economou, A. and Petratos, K. (2007) J. Mol Biol., in press

<sup>6)</sup> Osborne, A. R., Clemons, W. M. and Rapoport, T. A. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 10937-10942

component of the bacterial translocon. It was found that the cytosolic loop of SecG approaches SecY and SecA alternately, in such a way that it is adjacent to the azide-fixed state of SecA, being consistent with the notion that it facilitates the SecA's ability to undergo translocation-driving conformational changes.

1) Mori, H. and Ito, K. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 16159-16164

# 4) Proline Receives Slow Transpeptidation by the PURE SYSTEM Translation Reaction: H. MUTO and K. ITO

During our characterization of the *in vitro* translation of SecM in the PURE SYSTEM translation mixture, composed of purified translation/transcription factors, we noticed that ribosome nascent polypeptide complex directed by any mRNA that was truncated after a proline codon was only slowly released upon reaction with puromycin. If this phenomenon is specific for this translation system, then it is possible that *E. coli* contains a factor that accelerates the formation of a Pro-X peptide bond.

## 5) The *E. coli* Rhomboid Protease, GlpG, Has an Intramembrane But Accessible Active Site that Can Hydrolyze an Extramembrane Peptide Bond: S. MAEGAWA, K. KOIDE, K. ITO and Y. AKIYAMA

RIP (regulated intramembrane proteolysis) proteases including the rhomboid family members are suggested to catalyze proteolysis of a transmembrane region of substrate membrane proteins within the lipid bilayer. However, little is known about how they carry out hydrolysis of a peptide bond in a hydrophobic lipid environment. To gain insights into this problem, we examined the reactivity of cysteine residues introduced around the active site of GlpG, the E. coli rhomboid protease, with membrane-permeable and impermeable thiol-alkylating reagents. Our results indicate that the active site residues of GlpG are open to the periplasmic aqueous milieu. This notion obtained with native, membrane-integrated states of GlpG complements the recently reported crystal structures of this enzyme, in which the active site dyad is embraced within a hydrophilic cavity inside the membrane in a manner segregated from the lipid components. We examined similarly the environment of the cleavage site regions of model membrane protein substrates. Unexpectedly, they proved to be located in a completely accessible and hydrophilic environment, namely outside the membrane. We also have evidence that a kink of the substrate transmembrane region facilitates presentation of the periplasmically-exposed cleavage site to the intramembrane active-site cavity of GlpG.

## 6) Environment of the Active Site Region of RseP, an *E. coli* RIP Protease, Assessed by Site-Direct Cysteine Alkylation: K. KOIDE, S. MAEGAWA, K. ITO and Y. AKIYAMA

RIP plays important roles in a variety of cellular processes in diverse organisms, but its molecular mechanisms remain unclear. We have been characterizing RseP, a RIP protease of *E. coli* belonging to the S2P family. While structural information is not yet available for the S2P family RIP proteases, we employed the site-specific cysteine modification assays as described last year and in the preceding report by Maegawa et al to probe the environment that surrounds the RseP active site. Our results suggest that the active site residues of RseP reside within a folded proteinaceous structure at the membrane-cytoplasm interface (1), revealing a contrasting feature to the GlpG active site that is located in the intramembrane cavity open to the aqueous milieu. 1) Koide, K., Maegawa, S., Ito, K., and Akiyama, Y. (2007) J. Biol. Chem, in press

7) Crystal Structure of DsbB-DsbA Complex Reveals a Mechanism of Disulfide Bond Generation: K. INABA,<sup>1</sup> S. MURAKAMI,<sup>2</sup> M. SUZUKI,<sup>3</sup> A. NAKAGAWA,<sup>3</sup> E. YAMASHITA,<sup>3</sup> K. OKADA,<sup>4</sup> and K. ITO (<sup>1</sup>Presently, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu Univ., <sup>2</sup>Institute for Sciencetific and Industrial Research, Osaka Univ., <sup>3</sup>Institute for Protein Research, Osaka Univ., <sup>4</sup>Nara Institute of Science and Technology)

DsbB is an *E. coli* membrane protein that oxidizes DsbA, the periplasmic dithiol oxidase. To understand how disulfide bonds are generated and introduced into secreted proteins, we have been attempting at determining the three dimensional structure of DsbB for the past several years. Now, we have succeeded in solving the crystal structure of DsbB in a complex with DsbA and endogenous ubiquinone at 3.7 Å resolution (1). The structure of DsbB contained four transmembrane helices and one short horizontal helix juxtaposed with Cys130 in the mobile periplasmic loop. Whereas DsbB in the resting state contains a Cys104-Cys130 disulfide, Cys104 in the binary complex was engaged in the intermolecular disulfide bond and captured by the hydrophobic groove of DsbA, resulting in its separation from Cys130. This cysteine relocation prevents the backward resolution of the complex and allows Cys130 to approach and activate the disulfide-generating reaction center composed of Cys41, Cys44, Arg48 and ubiquinone (2). We propose that DsbB is converted by its specific substrate, DsbA, to a super-oxidizing enzyme capable of oxidizing exclusively this extremely oxidizing oxidase.

- 1) Inaba, K., Murakami, S., Suzuki, M., Nakagawa, A., Yamashita, E., Okada, K. and Ito, K. (2006) Cell 127, 789-801
- 2) Inaba, K., Takahashi, Y.-h., Ito, K. and Hayashi, S. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 287-292

## 8) Functional Studies of Membrane-Integrated DsbB Using Reconstituted DsbB Proteoliposomes: Y.-h. TAKAHASHI, K. INABA<sup>\*</sup> and K. ITO (<sup>\*</sup>Presently, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu Univ.)

Whereas the quinone-coupled DsbA oxidation activity of DsbB has been assayed *in vitro* using purified components, such assays invariably use detergent-solubilized DsbB preparations. Although we showed that menaquinone, a supposed electron acceptor from DsbB in anaerobically growing cells, can support the DsbB-mediated DsbA oxidation *in vitro*, the reaction rate was extremely low as compared to the ubiquinone-supported reaction (1). This raised a possibility that menaquinone might be much more effective *in vivo*, where the reaction should take place in the presence of the topological and diffusion constraints given by the membrane. We have succeeded in reconstituting proteoliposomes containing purified DsbB, which were then subjected to reaction with a quinone and reduced DsbA. In this assay system, the rate of menaquinone-dependent DsbA oxidation was much more closer to that of the ubiquinone-dependent one, in comparison with the assays after detergent solubilization. Membrane-integrated DsbB may interact readily with membrane-partitioned menaquione molecules.

1) Takahashi, Y., Inaba, K. and Ito, K. (2004) J. Biol. Chem. 279, 47057-47065

## LIST OF PUBLICATIONS Department of Cell Biology Laboratory of Subcellular Biogenesis

- Tsukazaki, T., Mori, H., Fukai, S., Numata, T., Perederin, A., Adachi, H., Matsumura, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Mori, Y., Sasaki, T., Vassylyev, D., Nureki, O. and Ito, K. (2006) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of SecDF, a translocon-associated membrane protein, from *Thermus thermophilus*. Acta Cryst. F62, 376-380.
- Vassylyeva, M. N., Mori, H., Tsukazaki, T., Yokoyama, S., Tahirov, T. H., Ito, K. and Vassylyev, D. G. (2006) Cloning, expression, purification, crystallization and initial crystallographic analysis of the preprotein translocation ATPase SecA from Thermus thermophilus. Acta Cryst. F62, 909-912
- Vassylyev, D. G., Mori, H., Vassylyeva, M. N., Tsukazaki, T., Kimura, Y., and Ito, K. (2006) Crystal structure of the translocation ATPase SecA from *Thermus thermophilus* reveals a parallel, head-to-head dimer. J. Mol. Biol. 364, 248–258
- Mori, H. and Ito, K. (2006) Different modes of SecY-SecA interactions revealed by site-directed in vivo photo-crosslinking. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 16159-16164

- Mori, H. and Ito, K. (2006) The long α-helix of SecA is important for the ATPase coupling of translocation. J. Biol. Chem. 281, 36249-36256
- Muto, H., Nakatogawa, H. and Ito, K. (2006) Genetically encoded but non-polypeptide prolyltRNA functions in the A-site for SecM-mediated ribosomal stall. Mol. Cell 22, 545-552.
- Chiba, S., Ito, K. and Akiyama, Y. (2006) The *Escherichia coli* plasma membrane contains two PHB (prohibitin homology) domain protein complexes of opposite orientations. Mol. Microbiol. 60, 448-457
- Inaba, K., Takahashi, Y.-h., Ito, K. and Hayashi, S. (2006) Critical role of a thiolate-quinone charge transfer complex and its adduct form in *de novo* disulfide bond generation by DsbB. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 287-292
- Takahashi, Y.-h., Inaba, K. and Ito, K. (2006) Role of the cytosolic loop of DsbB in catalytic turnover of the ubiquinone-DsbB complex. Antioxid. Redox Signal., 8, 743-752
- Ito, K. (2006) Redox Control of Protein Processing: From Electrons to Cells. Antioxid. Redox Signal. 8, 729-730
- Inaba, K., Murakami, S., Suzuki, M., Nakagawa, A., Yamashita, E., Okada, K. and Ito,K. (2006) Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a mechanism of disulfide bond generation. Cell 127, 789–801
- 森博幸 (2006) せなかあわせより、向かい合わせの方が好都合? トランスロコンのアセンブリー 様式 蛋白質核酸酵素 51,169-170

稲葉謙次(2006) 細胞における蛋白質ジスルフィド結合創生の基本化学原理 生物物理 46,257-262 武藤洋樹、伊藤維昭 (2006) 分泌モニターSecMが明らかにした新しい概念 蛋白質核酸酵素(増 刊「RNAと生命」) 51,2583-2589

- Chiba, S., Ito, K. and Akiyama, Y. The Escherichia coli plasma membrane contains two PHB (prohibitin homology) domain protein complexes of opposite orientations. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Abstract p. 682, Jun 18-23, 2006
- Inagaki, K., Uemura, Y., Ito, K. and Tamura, T. Combinatorial mutagenesis of the active-site dipeptide of DsbA. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Abstract p. 159, Jun 18-23, 2006
- Ito, K., Shimohata, N., Nagamori, S., Kaback, H.R., Sakoh, M., Chiba, S., Mori, H. and Akiyama,
  Y. Protein quality control devices in the Escherichia coli plasma membrane. 20th IUBMB
  International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Symposium Quality Control of
  Proteins and Proteolysis, Abstract p. 75, Jun 18-23, 2006
- Koide, K., Ito, K. and Akiyama, Y. Environments of the protease active site of RseP as assessed by site-specific cysteine modification. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Abstract P. 695, Jun 18-23, 2006,2006

- Mitomo, H., Ishizu, Y., Furusawa, H., Tsukazaki, T., Mori, H., Ito, K. and Okahata, Y. Preparation of supported lipid membrane for analyses of membrane proteins on a quartz-crystal microbalance (QCM). 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Abstract p. 337, Jun 18-23, 2006
- Muto, H., Nakatogawa, H. and Ito, K. Genetically encoded but non-polypeptide prolyl-tRNA functions in the A-Site for SecM-mediated ribosomal stall. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Abstract. p. 141, Jun 18-23, 2006
- Ito, K., Nagamori, S., Shimohata, N., Mori, H., Akiyama, Y. and Kaback, H.R. SecY alterations that impair membrane protein folding and generate a membrane stress. ASM-FEMS Concrence Protein Traffic in Prokaryotes. Abstract p. 14, May 6-10, 2006
- Mori, H., Shimokawa, N. and Ito, K. Site-specific crosslinking studies of in vivo SecY-SecA interactions. ASM-FEMS Concrence Protein Traffic in Prokaryotes. Abstract p. 53, May 6-10, 2006
- Muto, H., Nakatogawa, H. and Ito, K. Mechanism of the SecM-mediated ribosomal stall. ASM-FEMS Concerence Protein Traffic in Prokaryotes. Abstract p. 49-50, May 6-10, 2006
- Symersky, J., Mori, H., Vassylyev, M.N., Tsukazaki, T., Kimura, Y., Tahirov, T.H., Ito, K. and Vassylyev, D. Crystal structure of the translocation ATPase SecA from Thermus thermophilus reveals a parallele, head-to-head dimer. ASM-FEMS Conerence Protein Traffic in Prokaryotes. Abstract p. 14, May 6-10, 2006
- Muto, H., Nakatogawa, H. and Ito, K. Mechanism of the SecM-mediated ribosomal stall. Cold Spring Harbor Meeting Translational Control. Abstract p. 228,September 6-10, 2006. Cold Spring Hrabor Laboratory, N.Y., USA,2006
- Mori, H. and Ito, K. Structure, function and regulation of the protein translocation machine of E. coli. Discussion on Theory and Simulation of Biomolecular Nano-machines, December 12-16, Kobe, Japan, 2006
- Inaba, K. and Ito, K. Crystal structure of DsbB-DsbA complex revealing a cysteine relocation mechanism. FASEB Summer Research Conferences Protein Folding in the Cell, July 29-August 3, Vermont Academy, Vermont, USA, 2006
- Nagamori, S., Shimohata, N., Akiyama, Y., Kaback, H.R. and Ito, K. Mutations in secY alter insertion and folding of lactose permease in the membrane of E. coli. Gordon Research Conference on Bacteria Cell Surfaces. June 25-30 2006, Colby-Sawyer College, New London, NH USA,2006
- Inaba, K., Murakami, S., Suzuki, M., Nakagawa, A., Yamashita, E., Okada, K. and Ito, K. Crystal structure of DsbB-DsbA complex revealing a cysteine relocation mechanism. Joint Conference of the Asian Crystallographic Association and the Crystallographic Society of Japan. Abstract p. 77, November, Tsukuba, Japan, 2006
- Koide, K., Ito, K. and Akiyama, Y. Environments of the protease active site of RseP as assessed

by site-specific cysteine modifications. Kyoto University 21th Century COE Program. The 4th International Student Seminar, Abstract p. 84, March, Kyoto, 2006

- Muto, H., Nakatogawa, H. and Ito, K. Genetically encoded but non-polypeptide prolyl-tRNA functions in the A-site for SecM-mediated ribosomal stall. Kyoto University 21th Century COE Program. The 4th International Student Seminar. Abstract p. 88, March, Kyoto, 2006
- Tsukazaki, T., Mori, H., Fukai, S., Numata, T., Perederina, A., Adachi, H., Matsumura H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Mori, Y., Sasaki, T., Vassylyev, D., Nureki, O. and Ito, K. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of SecDF, a translocon-associated membrane protein, from Thermus thermophilus. Kyoto University 21th Century COE Program. The 4th International Student Seminar. Abstract p. 86, March, Kyoto, 2006
- Inaba, K. and Ito, K. Structure and molecular mechanisms of a disulfide bond generation machinery. Revisiting Life Science from Half Century of Virus Research. Abstract p. 17, May, Kyoto, 2006
- Muto, H., Nakatogawa, H. and Ito, K. Mechanisms of the SecM-mediated ribosomal stall. RNA 2006 Izu. Functional RNAs and Regulatory Machinery. Abstract p. 10, December, Izu, 2006
- Inaba, K., Murakami, S., Suzuki, M., Nakagawa, A., Yamashita, E., Okada, K. and Ito, K. Crystal structure of the DsbB-DsbA complex revealing a cysteine relocation process for disulfide bond generation. Switzerland-Japan Symposium on Structural Bilogy 2006. Abstract p. 30, September, Brunnen, Switzerland, 2006
- Inaba, K., Murakami, S., Suzuki, M., Nakagawa, A., Yamashita, E., Okada, K. and Ito, K. Crystal structure of DsbB-DsbA complex revealing a cysteine relocation mechanism. Switzerland-Japan Symposium on Structural Bilogy 2006. Abstract p. 45, September, Brunnen, Switzerland, 2006
- Akiyama, Y., Maegawa, S., Koide, K., and Ito, K. Regulatory and reaction mechanisms of E. coli RIP proteases. The Ringberg Symposium on Regulated Intramembrane Proteolysis. November, Rottach-Egern, Germany, 2006
- 伊藤維昭. タンパク質を膜を越えて動かし、また膜に組み込ませる装置の働きと制御. 生化学若い研究者の会 第46回夏の学校. 要旨集 p 30-31, 東京大学, 2006
- 三友秀之、古澤宏幸、塚崎智也、森博幸、伊藤維昭、岡畑恵雄. 水晶発振子を用いた膜タンパク 質の機能解析系の構築. 第 21 回生体機能関連部会,題9回バイオテクノロジー部会,第9回 生命化学研究会 合同シンポジウム.京大桂キャンパス,2006
- 稲葉謙次、村上聡、鈴木守、中川敦史、山下栄樹、岡田健吾、伊藤維昭. 大腸菌におけるジスル フィド結合導入システムの構造的基盤. 第33回生体分子科学討論会.名古屋,2006
- 小出佳代、前河早希、伊藤維昭、秋山芳展. 大腸菌 RseP プロテアーゼの活性部位が存在する環境. 第3回21世紀大腸菌研究会「モデル生物大腸菌の統合的理解をめざして」. 要旨集 p. 10, 近江八幡, 2006
- 武藤洋樹、中戸川仁、伊藤維昭. SecM 翻訳伸長アレストの分子メカニズム. 第3回21世紀大

腸菌研究会「モデル生物大腸菌の統合的理解をめざして」. 要旨集 p. 11, 近江八幡, 2006

- Tsukazaki, T., Hiroyuki, M., Fukai, S., Ishitani, R., Peredrerina, A., Vassylyev, D.G., Ito, K. and Nureki, O. Crystallization and X-ray diffraction of SecYE translocon from Thermus thermophilus with a Fab fragment. 第44回日本生物物理学会年会. 生物物理 46, S235,沖縄, 2006
- 稲葉謙次、高橋洋平、林重彦、伊藤維昭. 細胞における蛋白質ジスルフィド結合創生の基本化学 原理. 第6回日本蛋白質科学会年会. 要旨集 p. 108,京都, 2006
- 塚崎智也、森博幸、深井周也、沼田倫征、A. Perederina、安達宏昭、松村浩由、高野和文、村上 聡、井上豪、森勇介、佐々木孝友、D. Vassylyev、濡木理、伊藤維昭. 高度好熱菌由来トラン スロコン関連膜タンパク質 SecDF の精製・結晶化ならびにX線回折. 第6回日本蛋白質科学 会年会. 要旨集 p.40, 京都, 2006
- 才川直哉、鈴木博文、秋山芳展、伊藤維昭、木村能章. 大腸菌 FtsH 及びその超分子複合体の電 子顕微鏡構造解析から予測される分解調節機構. 第6回日本蛋白質科学会年会 ワークショッ プ「AAA+ タンパク質の高次構造と作用のダイナミクス」. 要旨集 p.18, 京都, 2006
- 秋山芳展、小出佳代、前河早希、伊藤維昭. 大腸菌 RIP (regulated intramembrane proteolysis) プロテアーゼ RseP の機能と制御. 第6回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「水と蛋白 質が織り成す機能発現のメカニズム」. 要旨集 p.23, 京都, 2006
- 秋山芳展. 大腸菌 RIP プロテアーゼの機能とその制御,蛋白質研究所セミナー Membraneproximal proteolysis:膜近傍におけるプロテオリシス研究の最先端. 吹田,2006
- 稲葉謙次、村上聡、鈴木守、中川敦史、山下栄樹、岡田健吾、伊藤維昭. 大腸菌における蛋白質 ジスルフィド結合創生マシーナリーの構造とメカニズム. 日本分子生物学会 2006 フォーラム
  - 「分子生物学の未来」. 要旨集 p.199, 名古屋, 2006
- 森博幸、伊藤維昭. 部位特異的 in vivo 光架橋実験により明らかになった、タンパク質膜透過モ ータ SecA と膜透過チャネル SecY 間の異なる相互作用様式. 日本分子生物学会 2006 フォーラ ム「分子生物学の未来」. 要旨集 p.199, 名古屋, 2006
- 前河早希、小出佳代、伊藤維昭、秋山芳展. 大腸菌 Rhomboid ファミリー膜プロテアーゼ GlpG の活性部位の環境. 日本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」. 要旨集 p.290, 名古屋, 2006
- 伊藤維昭. 蛋白質の細胞内ダイナミズム制御装置の構造に基づく理解. 2006年度 たんぱく 質関連領域 合同シンポジウム. 要旨集 pp.13-16, 東京大学, 2006
- 伊藤維昭. Respiratory component-dependent mechanisms of protein disulfide bond formation. ERATO 吉田 ATP システムプロジェクト成果報告会. 東工大, 2006

細胞生物学研究部門 構造形成学研究分野

当分野では、遺伝子産物が機能的構造体をして細胞構造を形づくる過程を研究していま す。タンパク質の細胞内での折りたたみ、分泌、膜組み込み、局在化、および分解などを とりあげて、このような過程が的確に起こるために細胞に備えられている仕組みを解析し ています。以下、2006年における研究の中からいくつかをとりあげ、担当者に説明し てもらいます。

### ★構造より明らかとなったタンパク質ジスルフィド結合が創りだされる仕組み

細胞には、フォールディング途上のタンパク質に効率よくジスルフィド結合を導入するための 機構が存在し、大腸菌では DsbA-DsbB-ユビキノン酸化システムが働いています。この数年間、 我々はこの酸化システムの分子メカニズムを理解するため、DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体 のX線結晶構造解析を進めてきました。DsbB は膜タンパク質であり、構造解析は困難を極めま したが、ついに我々は複合体の構造を 3.7 Å分解能で解くことに成功しました。我々がこれまで 積み重ねてきた機構解析の結果と今回の構造情報を総合することによって、ユビキノンを含む DsbB 上の活性中心において、DsbB とユビキノンが共同してジスルフィド結合を創り出す化学ス キームが解明されました(図参照)。さらに、極めて酸化力の強い(自身は酸化されにくい)酵 素である DsbA を DsbB が酸化する過程において、DsbB は DsbA との会合に伴って巧妙な構造 変化(システインの再配置)を引き起こし、両タンパク質間に存在する酸化還元電位の障壁を克 服していることが強く示唆されました。つまり DsbB は、基質である DsbA と出会うことにより、 DsbA に特化した超強力酸化酵素に変身すると解釈できます。一方、大腸菌のペリプラズムには、

ジスルフィド結合を導入す る酸化経路に加え、ジスル フィド結合組換えに働く還 元経路が存在します。逆の 酸化還元制御の下で働くこ れら二つの経路を分断する 巧妙な機構も明らかとなり ました。これらの研究成果 により、細胞の中でジスル フィド結合がどのように創 られ、タンパク質に導入さ れるのか、そのメカニズム の全貌が分子レベルで解明 されたと言えます。



図 DsbA-DsbB複合体の結晶構造とジスルフィド結合創生の分子機構

(稲葉謙次)

#### ★タンパク質膜透過・組込み装置の研究

タンパク質の膜を越えた輸送や膜への挿入は、進化的に保存された SecY/Sec61 複合体(トランスロコン)を介して行われます。大腸菌などの真性細菌では、膜透過駆動 ATPase SecA が、 SecYEG 複合体と相互作用し、ダイナミックな構造変化により、膜透過を駆動すると考えられていますが、反応の分子メカニズムは不明な点が多く残されています。

#### ① 高度好熱菌 SecYE-Fab 複合体の結晶構造解析

私たちは、高度好熱菌 Sec 膜タンパク質複合体の立体構造を決定するため、東工大・濡木研究 室、アラバマ大・Vassylyev 研究室との共同研究を進めています。本年度は SecYE 複合体の結 晶構造解析で大きな進展がありました。高度好熱菌 SecYE (TSecYE)に対するモノクローナル抗 体を作製し、安定な抗原・抗体複合体を形成するものを見つけ、抗体の Fab 断片を調製しました。 この TSecYE-Fab 複合体を用いて、蒸気拡散法による結晶化条件を探索した結果、良質の結晶を 得ることに成功しました(右図)。TSecYE-Fab 複合体の結晶に放射光(Spring8 BL41)を照射

した結果、3.2Å分解能のX線回折パターンを得ました。さらにSe-Met型TSecYE-Fab結晶の回折データを用いた多波長異常分散解析 によって初期位相を決定しました。更なる位相の改善とTSecYEの 構造モデルの構築を進めています。現在トランスロコンの高解像度 立体構造は、SecAをもたない古細菌のものが唯一報告されています。 我々は近い将来、SecA依存型トランスロコンの立体構造を、世界で 初めて明らかにできると確信しています。(塚崎智也)



## ② 部位特異的 *in vivo* 光架橋実験による、タンパク質膜透過装置における分子間相互作用と構造変化の解析

生きた細胞内で働いている状態のタンパク質間の相互作用を解析するユニークな方法として、 昨年「部位特異的*in vivo*光架橋実験」を紹介しました。光反応性のアミノ酸アナログ (pBPA) を目的タンパク質の特定の部位に取り込ませ、紫外線を照射することにより、導入したpBPAとそ れに近接するタンパク質との間を架橋させる方法です。細胞内における残基レベルのタンパク質 相互作用とその変化を追跡する方法として強力な武器となると考えられます。既にこの方法を用 いて、トランスロコンの中心的な成分であるSecYのアミノ酸残基の内、駆動因子SecAと近接す る複数の部位を同定しました。SecAと恒常的に結合する部位の他に、SecAが膜透過駆動状態で 近接するSecYの領域を捉えることにも成功し、報告しました。2006年には、SecYと共に膜透過 チャネルを構成するSecGやSecEの残基を標的にした光架橋解析も行い、SecG分子内のSecY, SecA近接部位を同定しました。我々は、SecAにおいて、分子を貫く特徴的な長いαらせんが ATPaseドメインの構造変化を基質タンパク質の動きに伝える重要な役割を持つことを提唱してい ますが、このαらせん上に同定した機能上重要な部位にpBPAを導入し、膜透過駆動に共役すると 思われるSecAの構造変化を分子内架橋効率の変化としてモニターすることに成功しています。 SecAは特異な性質を多く持つ融通無碍なタンパク質として知られており、我々の得た手がかりが 機能状態においてSecAがとる分子の状態を理解する突破口になることを期待しています。(森 博幸、小林 元)

#### ★膜プロテアーゼの分子機構と制御

RIP プロテアーゼは複数の膜貫通領域で膜に組み込まれた膜タンパク質で、基質となる膜タンパク質をその膜貫通領域内部で切断するという興味深い機能を持っており、真核生物から原核生物まで様々な生物で多様な細胞機能に関わっています。大腸菌にはS2P プロテーゼファミリーに属する RseP と Rhomboid ファミリーに属する GlpG という2種類の RIP プロテアーゼが存在します。私達は、これら二つの膜内プロテアーゼの構造と機能について研究を進めています。

RIP プロテアーゼの活性部位は膜内部に存在すると推測されています。これは、RIP プロテア ーゼが基質を膜貫通領域内部で切断することと話が合いますが、一方、基質切断が膜内部で起こ るとすれば、水を必要とするペプチド結合の加水分解が如何にして疎水的な膜内環境で起こるの かと言う、RIP プロテアーゼに共通する大きな謎を問題点として提示しています。2006 年に私 たちは、生化学的手法を用いて、GlpG の活性部位周辺の環境を調べ、活性部位が、細胞質外の 可溶性スペース (ペリプラズム) に開いた「溝(cavity)」の内部に存在すること、従って、水が 自由に近づけることを見出しました。最近、RIP プロテアーゼとして初めて GlpG の結晶構造が 明らかにされましたが、その構造は、私達の解析結果と良く符合しています。そして、私達の結 果は、GlpG が生理的な、膜に組み込まれた状態において、結晶構造と同様な構造を持つことを 示しています。一方、我々は RseP についても同様に活性部位周辺の環境を調べました。RseP で は、活性部位が折りたたまれたタンパク質ドメイン内部に存在することがわかり、RIP プロテア ーゼはその種類によって、異なる方法で「膜内切断」を行っていることが推測されます。「溝」 やドメイン内部の活性部位にどのように基質が接近し提示されるかと言う点も含めて、膜内切断 型のプロテアーゼの作動原理の解析を進めて行く予定です。(前河早希、小出佳代、秋山芳展)

> 図: GlpG の立体構造 (Wang et al., Nature 444, 179-183, 2007: PDB データ ベースより取得)。活性部位残基の側鎖を示 し、見やすくするために TM1-TM2 間のルー プ表示していない.

