

氏 名	しも はた のぶ ゆき 下 畑 宣 行
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2903 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	膜タンパク質の構造形成における SecY トランスロコンの役割と異常応答システム

論文調査委員	(主 査) 教 授 伊 藤 維 昭	教 授 藤 井 紀 子	教 授 杉 山 弘
--------	----------------------	-------------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

大腸菌の細胞表層には外膜、ペプチドグリカン層とペリプラズム領域、そして細胞質膜(内膜)がある。そのうち、細胞質膜は直接細胞質を取り囲み様々な重要な膜機能を果たしている。本研究は細胞質膜における SecY トランスロコンを介する膜タンパク質形成とその異常に対する応答に関するものである。細胞は様々なストレスに応答して遺伝子発現を制御する機構を備えているが、大腸菌には表層ストレス応答(extracytoplasmic stress response)機構があり、Cpx, σ^E の二つの信号伝達経路によって制御されることが知られている。従来これらの機構は、ペリプラズムや外膜などにおけるタンパク質の構造異常を感知するとされてきたが、申請者は細胞質膜におけるタンパク質の異常もこれらの機構によって感知されることを示した。異常な膜タンパク質の除去に働く膜結合型プロテアーゼ FtsH の欠失によって表層ストレス応答が誘導され、それは FtsH の基質膜タンパク質の過剰生産によってさらに昂進した。また、膜タンパク質が正常に膜に組み込まれる過程を補助する因子として知られる YidC の欠乏によっても表層ストレス誘導機構が強く活性化された。一方、新生膜タンパク質の膜トランスロコンへのターゲティングステップで働くシグナル認識粒子の欠損によっては表層ストレス応答は誘導されなかった。これらの結果から膜タンパク質が膜内で正しく構造形成することができない場合や、異常膜タンパク質を分解除去できない場合、すなわち細胞質膜に異常タンパク質が蓄積した時、表層ストレス応答機構が発動することが明らかとなった。

一方、SecY トランスロコンの機能は分泌タンパク質の膜を越えた輸送(Export)ばかりでなく、膜タンパク質の膜への組み込み(ingegration)にも必要とされるものと考えられているが、後者の役割に関しては不明の点が多い。膜タンパク質形成においてトランスロコンが果たす役割について変異解析を行った。既存の secY 変異株におけるモデル膜タンパク質(SecY-PhoA3-3, MalF-PSBT)の integration 異常の有無を調べ、secY 変異には export にのみに欠損を持つもの(type I 変異)、integration のみに欠損を示すもの(type II 変異)、そして両方の過程が欠損しているもの(type III 変異)の3種類が存在することを明らかにした。type II の変異株中でも膜タンパク質を過剰に発現すると export 阻害が起こることから、ある種の SecY 機能の不全によりトランスロコンへの挿入後の段階で膜タンパク質の異常が起こり、チャネルの「目詰まり」が引き起こされると解釈された。さらに、integration 不全を示す type II/type III secY 変異株中では、表層ストレス応答が有意に誘起されることがら、これらの SecY 変異は膜タンパク質の膜への挿入後の段階に異常をもたらすものであることが示された。一方、単純に SecY の量が低下した場合には膜挿入段階が不全となり、膜ストレスは誘導されない。これらの結果に基づき、細胞表層ストレス応答の誘起を指標にした新たな変異株スクリーニングを行い、type II/type III 型の新たな secY 欠損変異を複数分離することに成功した。このように、SecY は膜タンパク質のトランスロコンへの挿入のみではなく、その後膜の中で起こる構造形成のステップにも役割を担っていることが明らかになった。SecY トランスロコンは、単に新生タンパク質の受動的な「通路」として存在すると言うより、分泌タンパク質と膜タンパク質を見分けて、それぞれに適切な経路を提供する動的な装置であることが示されたことになる。申請者は、本研究で同定された膜タンパク質の形成を損なう SecY のアミノ酸置換を古細菌由来の SecY 複合体の立体構造に基づく大腸菌 SecY の立体構造モデル上に位

置づけ、膜タンパク質形成に関わる SecY 機能を考察した。

論文審査の結果の要旨

原核細胞の細胞質膜は真核細胞の形質膜 (plasma membrane) と小胞体膜の両者の機能を併せ持っていると言うことができ、細胞機能と同時にゲノムから細胞へという細胞自体の形成・形質発現においておいてキーとなる構造体である。本研究は、細胞質膜を構成する膜タンパク質の動態に関する二つの方向からのアプローチを総合したものであり、独自性の高い情報を多く含んでいる。膜タンパク質の正しい形成に必要とされる Sec トランスロコンの機能解析と膜タンパク質の正しい構造形成過程が損なわれた場合のストレス応答系の働きを相互に関連づけた研究の展開は独創的なものと評価できる。

本研究で発見された重要な結論の一つは、従来外膜やペリプラズム領域でのタンパク質異常を感知するとされてきた表層ストレス応答機構 (σ^E および Cpx) が細胞質膜タンパク質の異常にも応答することを明確に示したことである。申請者は、この結論を異常膜タンパク質除去による品質管理を司る酵素 (FtsH) の欠損状態、および正しい膜タンパク質形成を司る因子 (YidC) の欠損状態における細胞を用いることによって得ることができた。従来細胞質におけるタンパク質異常に応答する熱ショックストレス応答機構、および外膜やペリプラズムなど細胞質外におけるタンパク質異常に応答する表層ストレス応答機構の研究は詳細になされてきた。しかし、それらの境界に位置する細胞質膜におけるタンパク質異常がどのように感知されるのかに関する直接的な研究がなされていなかった。本研究において、申請者が「細胞質膜ストレス」の存在を明らかにしたことは、細胞の恒常性維持制御機構を理解する上できわめて重要な知見であり、今後の研究に大きな影響をもつものと考えられる。

SecY トランスロコンは細胞質膜タンパク質の膜組込みにも機能する。SecY は SecE, SecG と共にポリペプチド透過チャネルを膜に形成するトランスロコンの中心的構成因子である。分泌タンパク質の膜透過 (export) 及び膜タンパク質の膜への組み込み (integration) の過程において、前者はトランスロコンの働きによりペリプラズム側に完全に移行するが、後者はトランスロコンに挿入した後、膜貫通部位となる領域が垂直方向の動きを停止して水平方向に (脂質層に向けて) 脱出すると考えられる。しかし、このような新生タンパク質がたどる 2 つの経路がどのように使い分けられるのかといった基本的な疑問は未解決である。申請者は SecY の変異による機能異常により分泌タンパク質と膜タンパク質は異なる影響を受けることを明らかにした。膜透過装置としてのトランスロコン機能を考えると、SecY 異常による膜タンパク質の組み込み欠損は膜 (トランスロコン) への挿入の段階で起こることが考えやすい。しかし、申請者は自ら見いだした細胞質膜における膜ストレスの誘導の有無を指標にすることによって、欠損が第一義的には膜挿入の段階にあるのか、トランスロコンへの挿入に引き続く膜内での何らかの過程にあるのかを区別することに成功し、同定された多くのアミノ酸置換は実際には後者の過程に異常をもたらすものであることを発見した。さらにストレス誘導を指標にした変異株スクリーニング法を考案して、膜タンパク質の構造形成を損なう SecY 変異を新たに分離することにも成功した。最近になってようやくトランスロコンに関する構造生物学が成果を見せ始めたが、真の機能を理解するためには、細胞内動態との橋渡しをする本研究のようなアプローチは必須である。申請者は上記のように、トランスロコン機能のうちで膜タンパク質の形成という生物学的に重要な過程を促進する機能に関して重要な発見をし、その構造に基づく理解にも取り組んだことは高く評価することができる。

以上のように本論文の研究は、細胞の膜に関わるストレス応答機構、および膜タンパク質の形成における SecY トランスロコンの役割に関する新たな発見を含むものであり、独創性の高い貢献として高く評価できる。よって、博士 (理学) の学位論文として価値あるものとして認める。なお、主論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と判定した。