

氏 名	まえがわ さ き 前 河 早 希
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3284 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 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	大腸菌の Rhomboid ファミリー膜プロテアーゼ GlpG の作用機構

論文調査委員 (主 査) 教 授 三 木 邦 夫 教 授 秋 山 芳 展 教 授 藤 井 紀 子

論 文 内 容 の 要 旨

膜を介したシグナル伝達とその調節は、環境の変化や細胞間相互作用に応答した遺伝子発現の調節を始め、様々な生体内プロセスにおいて重要な役割を担っている。「膜内部におけるタンパク質切断：RIP (regulated intramembrane proteolysis)」は、原核生物からヒトを含む高等真核生物まで広く見出され、膜を介したシグナル伝達や膜タンパク質の機能調節の新たな様式として注目を受けている。RIPに働く膜プロテアーゼは、I-CLiPs (intramembrane-cleaving proteases) と呼ばれ、その触媒残基が膜貫通配列と予測される領域内に存在することから、膜 (脂質二重層) 内部で標的膜タンパク質の膜貫通配列を切断すると推測されてきた。しかしながら、実際に切断が膜内部で起こるのかという点も含め、その作用機構の詳細はほとんど分かっていない。大腸菌 GlpG は、I-CLiPs のひとつである Rhomboid ファミリーに属するタンパク質である。本申請論文において申請者は、GlpG を Rhomboid プロテアーゼのモデルとして、その作用機構の解明を目指して研究を行った。

本研究を開始した時点で、*glpG* 遺伝子についての知見は極めて限られていたが、申請者はまず、*glpG* が non-essential 遺伝子であり、以前の報告と異なって *glpG* が *glp* レギュロンに属さないことを示した。また、GlpG が細胞質膜の 6 回膜貫通タンパク質であることも明らかにした。GlpG の生理的基質は不明であるが、申請者は、LacY の 2 番目の膜貫通配列 (LacYTM2) を持つモデル基質膜タンパク質 Bla-LacYTM2-MBP-His₆ を作製し、*in vivo* でこのモデル基質が GlpG に依存して膜貫通領域付近で切断を受けることを見出した。また、精製した GlpG とモデル基質を用いて、GlpG がプロテアーゼ活性を持つことを生化学的に示した。さらに、GlpG のセリンプロテアーゼ活性部位様モチーフの変異解析を行い、GlpG の触媒残基が Ser201-His254 から成る catalytic dyad であることを示唆した。モデル基質の GlpG による切断部位を同定した結果、GlpG がモデル基質のペリプラズムと膜の境界領域に位置する親水性残基に富む領域を切断することを明らかにし、GlpG が基質膜タンパク質の膜貫通配列を特異的に認識して切断することを示唆した。

次に申請者は、GlpG の活性部位領域の様々な位置にシステイン残基をひとつ持つ single-Cys 変異体を多数作製し、導入したシステイン残基の膜透過性やサイズの異なる種々のチオール基修飾試薬に対する反応性を指標として、活性部位がどのような環境に存在するかを調べた。その結果、GlpG の活性部位が、膜平面内部に位置するペリプラズム側に開いた親水性 cavity 内に存在することを示唆した。モデル基質の GlpG による切断部位についても、同様の解析から、ペリプラズムの親水性環境に露出していることを示した。これらの結果は、GlpG は、その活性部位が膜平面内部に位置するにもかかわらず、基質の膜外領域を切断し得ることを示唆している。以上の結果および所属する研究室で得られた他の知見も併せて、申請者は、GlpG による基質切断機構のモデルを提唱した。

申請者は、さらに、GlpG の TM1 と TM2 の間に存在するペリプラズムループ (L1) 領域についても解析を行い、L1 ループが部分的に膜に埋もれた構造を持つことを示し、この領域が GlpG の活性制御に関わることを示唆した。

論文審査の結果の要旨

膜タンパク質は膜機能の多くを担っており、その分解や切断は、膜タンパク質の品質管理や機能制御に重要な役割を果たしている。この中で、近年、RIP (regulated intramembrane proteolysis) と呼ばれる「膜内部におけるタンパク質切断」が様々な生体内プロセスに関与していることが明らかになり、多くの研究が行われている。RIPに働くプロテアーゼはI-CLiPs (intramembrane-cleaving proteases) と呼ばれ、膜 (脂質二重層) 内部で基質の膜貫通配列を切断すると推測されてきた。しかしながら、その作用機構の詳細は、実際に基質の切断が膜内部で起こるのか、起こるとすればそのような疎水的環境でどのようにして加水分解に必要な水分子が供給されるのかといった基本的な点を含め、ほとんど分かっていなかった。

Rhomboid ファミリーは、I-CLiPsのひとつであり、発生、アポトーシス、寄生原虫の宿主細胞侵入などに重要な機能を果たしている。本申請論文において申請者は、Rhomboidのプロテアーゼ機能の分子機構を明らかにするため、大腸菌のRhomboidホモログGlpGをモデルとして、その作用機構の解析を行った。申請者は、モデル基質膜タンパク質を作製し、*in vivo*, *in vitro*においてGlpGがこのモデル基質を切断することを明らかにした。この結果は、同時期に報告された他のグループの結果と共に、Rhomboidが実際にプロテアーゼ活性を持つことを初めて生化学的に示したものである。申請者はさらに、GlpGの活性部位が、膜平面内部に位置するペリプラズム側に開いた親水性cavity内に存在することを示唆した。つまり、基質の加水分解に必要な水分子は、活性部位に比較的自由にアクセスできるものと考えられる。これらの結果は、2006年に報告された大腸菌GlpGの結晶構造と良く一致しており、膜に組み込まれた「生理的」な状態のGlpGも結晶構造と同様の活性部位構造を持つことを示している。これらは、Rhomboidの作用機構解明の基礎となるだけでなく、I-CLiPsの作用機構に共通かつ中心的な問題である活性部位への水分子の供給についてのひとつの解答を与えるものであり、広い意義を持つ。また、「Rhomboidは基質の疎水的な膜貫通配列を切断する」との予想に反して、GlpGがモデル基質の膜外領域を切断することを明らかにした。すなわち、GlpGは、活性部位が膜平面内部に位置するにもかかわらず、基質の膜外領域を切断し得るものと考えられる。申請者は、所属する研究室で得られた他の知見と併せて、GlpGがこのトポロジカルミスマッチを克服して、基質の切断を行う機構のモデルを提唱した。この知見およびモデルは、I-CLiPsの理解に新たな視点をもたらす重要なものである。さらに申請者は、GlpGのL1ループ領域が部分的に膜に埋もれていること、L1ループに保存されているWRモチーフがGlpGの活性に重要であることを示し、L1ループがGlpGの機能調節に関わる可能性を示唆した。GlpGを含め、Rhomboidプロテアーゼの活性調節機構はほとんど分かっておらず、本研究の結果は重要な手掛かりとなることが期待される。

以上のように、申請者による一連の研究成果は、基礎生物学的視点のみならず医学的にも重要なRhomboidによる基質切断機構の理解を大いに深め、この研究分野の進展に貢献するものである。よって、博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認めた。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。