

氏 名	佐藤 康成
学位の種類	博士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2780 号
学位授与の日付	平成 16 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	大腸菌のタンパク質膜透過装置 SecYEG 複合体の分子解剖

論文調査委員 (主 査) 教授 伊藤 維昭 教授 三木 邦夫 教授 藤井 紀子

論 文 内 容 の 要 旨

大腸菌の表層に局在するタンパク質は、細胞質における合成の後細胞質膜を超えて輸送される。細胞質膜において、SecY/SecE/SecGから成るヘテロ膜タンパク質複合体が、基質となる分泌タンパク質前駆体の通り道（膜透過チャネル）を形成している。申請者は、SecYEG複合体の各サブユニットが、どのように相互作用して、膜透過チャネルを構成しているかという問題に取り組んだ。SecYは、10個の膜貫通領域（アミノ末端よりTM1～TM10と呼ぶ）と6つの細胞質領域（C1～C6）、5つのペリプラズム領域（P1～P5）を持ち、SecE、SecGとそれぞれ独立に相互作用することが知られている。SecYとSecEに関しては、SecYの細胞質領域4が関与する相互作用や互いの膜貫通領域及びペリプラズム領域における近接部位に関する情報はあっても、細胞質領域間の物理的近接に関する情報はなかった。またSecYとSecGの相互作用領域は特定されていなかった。膜透過装置の細胞質領域は、基質の膜透過チャネルへの結合やSecA ATPaseによる基質の膜透過反応の開始といった重要なイベントを支える重要な領域であるため、申請者は、システインを1個のみ持つSecY変異体を多数作製して、チオール基特異的な架橋試薬を用いた部位特異的な架橋実験による解析を行い、SecYEG複合体における各領域間の近接部位をアミノ酸残基レベルで明らかにした。

モノシステインSecY変異体を発現させた細胞から調製した膜画分をチオール基と一級アミンに対して反応を持つ架橋試薬によって処理したところ、C2領域、C3領域の残基111、117および179に導入したシステインがSecGとの架橋を生じた。この架橋はSecGの細胞質領域のリジン残基（Lys26）との間で形成されたものであることが明らかになった。またSecGのAla28をシステインに置換すると、上記の位置に導入したSecYのシステインとの間で特異的にジスルフィド結合を形成した。これらの結果から、SecYEG複合体において、SecYのC2領域（Ser111, Ser117）、C3領域（Thr179）とSecGの細胞質ドメインC末端側の領域（Lys26, Ala28）が互いに近接していることが明らかとなった。SecYの各ペリプラズム領域にシステインを導入した変異体を用いた解析から、Ala155（P2領域）に導入したシステインがSecGと架橋を形成し、この残基がSecGのカルボキシ末端領域と近接していることが示された。さらに、SecY、SecG両分子の膜貫通領域間での相互作用について検討するため、SecYのTM3領域、TM4領域の様々な残基に導入したシステインと、SecGのTM1領域、TM2領域の様々な残基に導入したシステインの間でのジスルフィド結合形成を調べた。SecYの残基134（TM3領域）とSecGの残基68（TM2領域）の間でジスルフィド結合が形成された。これらの結果より、SecYのC2-TM3-P2-TM4-C3領域がSecGとの分子結合のインターフェイスとなっていることが示唆された。C3領域に変異を持つ低温感受性*secY104*変異株の生育欠損が、*secG*変異によって特異的に抑制され、この抑制変異はSecGの膜貫通領域にマップされるとの当研究室の遺伝学的知見も上記の結論を支持した。

SecYのシステイン変異体を利用した部位特異的な架橋実験により、SecEとの近接領域についての知見も得られた。C4領域（Ile244）、C5領域（Pro354）のシステイン置換体は、SecEのC2領域のLys81と架橋され、SecEのVal79をシステインで置換した変異体は、システイン間を架橋する試薬によって、SecYの残基244（C4領域）、残基362（C5領域）と架橋

された。SecY-SecE間の架橋は、SecYE間相互作用を損なう *secY24* 変異 (Gly240Asp) の導入により損なわれた。SecYのC4領域とSecEとの物理的近接を示す結果は、C4領域がSecEとの相互作用に重要であるとの知見とよく一致する。C5領域にはSecAの活性化に必須であると考えられる Arg357 残基が存在するが、Arg357周辺の残基 (Pro354, Thr362) がSecEのC2領域と近接しているという結果から、SecYのC5領域がSecEと協調してSecAとの相互作用に関わるなどの可能性が考察された。

研究の結果から、SecYEG複合体において、SecYのC2-TM3-P2-TM4-C3領域がSecGとC4、C5領域がSecEの二番目の細胞質領域と互いに近接していることが明らかとなった。このような結果は、SecYEG複合体のアーキテクチャーを考える上の重要な基礎知識を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

分泌タンパク質の原核細胞における細胞質からペリプラズム空間への膜を超えた輸送や、真核細胞における小胞体内腔への膜透過には、生物種間を越えて保存されているタンパク質膜透過装置が関わっている。大腸菌においては、膜内在性タンパク質であるSecYEG複合体とSecA ATPaseがその主要成分である。これらのSec因子が、どのようにして分泌タンパク質のような巨大な分子の膜透過を可能とするのかに関して、これまでに多くの研究がなされてきたが、その詳細な分子メカニズムは未だ不明な点が多い。申請者は、分泌タンパク質前駆体の通り道である膜透過チャネルは、SecY, SecE, SecG 3種類の膜タンパク質がどのようなローカルな相互作用をすることによって形づくられているのかを研究するため、残基レベルでの部位特異的架橋実験による系統的な解析を行った。そして、SecYEG複合体におけるSecY-SecGインターフェイスとSecY-SecE細胞質インターフェイスを同定することに成功した。10個の膜貫通領域を持つSecYの2番目の細胞質領域 (C2) から3番目の細胞質領域 (C3) にかけての部位 (C2-TM3-P2-TM4-C3) がSecGとのインターフェイスとして機能し、この領域のいくつかのアミノ酸が物理的に近接していることを明らかにした。SecGは膜透過装置複合体中に含まれ、膜透過を促進する機能を持つことは知られていたものの、SecYEG複合体でどのような位置にあるのかについてはわかっておらず、本研究によるその具体的な解明は高く評価できる。申請者は自らの結果の機能的な意義を遺伝学的解析結果と組み合わせ考察しており、併せてSecGの機能を解明する上の重要な知見となっている。

SecYEG複合体の必須成分はSecYとSecEであり、これらがSecAに対する高親和性結合部位を形成すると言われている。申請者は、残基レベルの架橋実験によってSecYのC4領域とC5領域がSecEのC2領域と近接していることを明らかにした。SecYのC4領域はSecEとの相互作用に重要であることが遺伝生化学解析によって知られていたが、本研究は両サブユニットがこの細胞領域によって物理的に近接していることを明らかにしたものであり、膜透過チャネルの理解に貢献するものである。申請者は、膜透過チャネルの開閉状態を変化させる変異によって、SecY-SecE架橋効率が変動することも見出している。SecYのC5領域、SecEのC2領域には、生物種間で保存され膜透過促進機能に重要な部位がある。これらの部位がSecYのC4領域によるSecEとの相互作用によって近接し、SecAとの機能的相互作用部位、すなわち膜透過チャネルの「活性部位」、を形成するとの作業仮説を提唱しており、今後の研究にインパクトを与えている。これらの成果は高く評価できる。申請者は、架橋実験のような生化学的アプローチと、変異体を用いる遺伝学的アプローチを組み合わせ地道な研究を展開しており、これらの努力は今後のSecY複合体の立体構造に基づく膜透過機構の理解にも資するものである。

以上のように、本論文の研究結果は、タンパク質膜透過装置がどのように構成されているかという重要問題の理解へ大きく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。