

|         |                         |
|---------|-------------------------|
| 氏 名     | かね はら かず え<br>金 原 和 江   |
| 学位の種類   | 博 士 (理 学)               |
| 学位記番号   | 理 博 第 2699 号            |
| 学位授与の日付 | 平 成 15 年 7 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  | 膜結合型プロテアーゼ YaeL の機能解析   |

論文調査委員 (主 査) 教授 伊 藤 維 昭 教授 井 上 丹 教授 藤 井 紀 子

### 論 文 内 容 の 要 旨

細胞内タンパク質分解・切断は、細胞機能の維持・調節に重要な役割を果たしている。最近、種々のシグナル伝達機構における、膜タンパク質の膜内部での切断による機能調節が注目されている。このような膜タンパク質の制御された切断は RIP (regulated intramembrane proteolysis) と呼ばれ、細菌から高等生物まで広く存在する。RIP としては、ステロール合成に関わる SREBP (sterol response element binding protein) や、アルツハイマー病に関連する APP (amyloid precursor protein)、胚発生等において様々な情報伝達に関わる Notch などの切断反応が知られていた。これらのタンパク質は膜結合型前駆体タンパク質として合成され、ある生物現象に応答して、膜の内部、或いは膜近傍で切断を受ける。その結果、生理活性をもつタンパク質ドメインが膜から遊離し、機能するという特徴をもっている。例えば、SREBP は、S1P (site-1 protease) と S2P (site-2 protease) による連続的切断を受けて、細胞質ドメインが膜から遊離し、転写因子として機能する。このように RIP は、膜を超えたシグナル伝達の新たな様式のひとつである。

大腸菌は、ヒト S2P のホモログをコードする *yaeL* 遺伝子 (ORF) を持つが、その機能は分かっていなかった。申請者は、*yaeL* の機能の解明を目指し研究を行った。まず、*yaeL* が大腸菌の生育に必須であることを明らかにし、YaeL タンパク質が内膜に局在する内在性膜タンパク質であることを示して、その膜における配向を決定した。また、YaeL の持つ亜鉛プロテアーゼモチーフや、PDZ モチーフ変異体が YaeL の機能を失わせることを示して、YaeL が亜鉛プロテアーゼであり、その活性が細胞の生育に重要であることを示唆した。さらに、*yaeL* 欠失変異をマルチコピー状態で制御する遺伝子 (マルチコピーサプレッサー) として、 $\sigma^E$  をコードする *rpoE* 遺伝子を分離した。 $\sigma^E$  は平常アンチシグマ因子である内膜タンパク質 RseA の細胞質ドメインと結合することで膜にアンカーされ不活性状態にあるが、ペリプラズム空間や外膜に異常タンパク質が蓄積することにより活性化され、一群のストレス応答遺伝子の転写を促す。この活性化には、膜結合型プロテアーゼ DegS による RseA の切断に関わることが知られている。申請者は、*rseA* 遺伝子の欠失が *yaeL* 遺伝子の欠失を抑制することも見出し、上記の結果と併せて *yaeL* が  $\sigma^E$  活性化に必要であることを示した。さらに、*yaeL* 欠失株では、RseA のペリプラズム領域を失った分解中間体が蓄積することを見出した。RseA 及び分解中間体の分解・蓄積に対する *degS*, *yaeL* 変異の効果を調べた結果から、RseA は DegS によりまずペリプラズム側で切断をされ、引き続いて YaeL により膜内部、或いは近傍での切断を受けることを提唱し、この RseA の連続した 2 段階切断がストレスに応答した  $\sigma^E$  の活性化に必須であることを示した。本研究は、初めて RIP 機構による遺伝子発現調節が大腸菌に存在することを明らかにし、新規膜プロテアーゼ YaeL の生理機能を解明したものである。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

膜機能の理解はポストゲノム研究の重要な研究課題であり、膜タンパク質の動態・分解機構は、そのための重要な基礎となるものである。細胞内におけるタンパク質の分解や切断は、異常なタンパク質の除去のみならず、特定の基質タンパク質

の調節された切断・分解による機能発現の制御においても細胞機能に重要な役割を果たしている。膜タンパク質の切断による機能調節も、様々な生物現象に重要な役割を演じていることは、近年認識されつつあり、特に Regulated Intramembrane Proteolysis (RIP) と呼ばれる膜内部での切断が注目を集めている。

大腸菌 YaeL は真核生物で RIP による遺伝子発現調節に関わる膜プロテアーゼ S2P のホモログである。本申請論文において申請者は、その構造と機能について研究し、YaeL が膜プロテアーゼであり、そのプロテアーゼ機能により  $\sigma^E$  経路表層ストレス応答の調節に必須の役割を果たすことを明らかにした。申請者は、まず、YaeL が大腸菌の生育に必須であることを示し、その膜上での構造（トポロジー）を明らかにし、また YaeL の持つプロテアーゼモチーフや PDZ モチーフの変異解析から、それらの YaeL 機能における重要性を示すなど、YaeL の基礎的解析を行った。さらに、表層ストレス応答に関わる転写因子  $\sigma^E$  と結合してその機能を負に制御する膜結合型アンチ  $\sigma^E$  タンパク質 RseA が、ペリプラズム側及び膜内部で連続した切断を受けること、その第 2 段階目の切断に YaeL が働くことを明らかにした。そして、この RseA の 2 段階切断が表層ストレス応答の誘起に必須の役割を果たしていることを示した。これらの結果は、大腸菌における膜を越えたシグナル伝達の新たなメカニズムを明らかにしたものであり、高く評価される。本研究により YaeL と真核生物ホモログの S2P が、全く異なる生物において異なるシグナル伝達において機能しているにも関わらず、その作用機序は非常に類似していることが示された。RIP は、哺乳類細胞ではアルツハイマー病に関わるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) や Notch タンパク質の切断（プレセニリンが関与）、SREBP や ATF6 の二段階切断（S1P/S2P プロテアーゼが関与）など、生命機能に極めて重要な役割を果たしており、細胞生物学的観点から、さらには医生物学的応用の観点からも、その詳細なメカニズムや制御機構の解明はきわめて重要と考えられるが、分子レベルの研究は限られている。今後、本研究結果に基づき、大腸菌というモデル生物を利用して YaeL の生化学的研究を進めていくことは、高等生物を含めた RIP システムの解明にも役立つであろう。RIP メカニズムの解明は膜を越えた細胞内外の情報伝達メカニズムに新たな光を当てるものであり、ストレス応答に留まらず、広い意義を持つ物である。本研究はそのような研究の先導的モデルとしても評価できる。

以上、本研究は、大腸菌における膜プロテアーゼ YaeL の機能を明らかにするばかりでなく、今後の RIP 研究の進展に貢献することが大いに期待される。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、本学位論文に報告されている内容、及びこれらに関連する分野について試問した結果、合格と判定した。