

氏 名	つか ざき とも や 塚 崎 智 也
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3028 号
学位授与の日付	平 成 18 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	高度好熱菌 Sec 膜タンパク質複合体の精製、結晶化および予備的 X 線解析

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

原核生物の細胞質膜には、進化的に保存された SecYE 膜タンパク質複合体が存在し、タンパク質の膜透過・膜組込みのためのチャンネルを構成している。新規合成タンパク質が細胞質から SecYE チャンネルを介してペリプラズム側に移行する動きは SecA ATPase により駆動される。膜タンパク質 SecDF は SecYE チャンネルと複合体を形成し、タンパク質膜透過や膜組込みに関与するとされている。このような細胞内過程の分子機構の理解の為には、これら Sec タンパク質の立体構造の解明が必要不可欠である。申請者は、高度好熱菌 SecYE (TSecYE) 複合体、SecDF (TSecDF) の立体構造決定を目指して、これらタンパク質の発現、精製、結晶化の系を確立した。このため、*TsecY*, *TsecE* の遺伝子をクローニングし、TSecYE 複合体を大腸菌内膜に効率よく蓄積させることに成功し、界面活性剤で可溶化した後、高度に精製した。精製 TSecYE を proteoliposome に再構成して、それが高度好熱菌 SecA (TSecA) と ATP に依存して前駆体タンパク質を膜透過させる活性を有することを示した。界面活性剤で可溶化した精製 TSecYE は SecYE のモノマー状態 (TSecYE)₁ として存在するが、脂質二重層に組込まれた状態ではオリゴマー (TSecYE)_n を形成することが明らかとなった。SecA は膜に組みこまれた SecYE のオリゴマー状態には高親和性で結合するが、溶液中では安定な SecA-SecYE 複合体は形成されない。可溶化状態でも TSecYE のオリゴマー状態を安定化させ、さらには、原核細胞型膜透過装置を理解する上でブレイクスルーとなり得る SecYE-SecA 複合体の構造解析を可能とする目的で、TSecYE2 分子が共有結合で連結した TSecYE-dimer の構築、精製を行った。そして、TSecYE-dimer は溶液中で安定に TSecA との複合体を形成することを示した。

申請者は、さらに TSecYE の結晶化条件を詳細に検討し、結晶の取得に成功した。TSecYE に付加したタグの除去やアミノ酸置換による安定化、最適な界面活性剤の検索等を行った結果、分解能 6Å を示す X 線回折データを得た。また、*TsecDF* の遺伝子を高度好熱菌の genomic DNA からクローニングし、TSecDF の大腸菌における過剰発現と精製を行った。蒸気拡散法による結晶化条件を探索した結果、8 面体型の結晶を得ることに成功し、放射光を用いた X 線回折実験によって、4.2Å 分解能の回折データを得た。Micro-stirring technique, Laser irradiation technique, Dehydration を組み合わせて結晶の良質化を試み、分解能 3.7Å のデータセットの収集を成し遂げた。さらに、Se-Met 型の結晶の調製とその X 線回折像の取得をおこない、SAD (single wavelength anomalous diffraction) 法を用いた解析による予備的電子密度マップの構築を可能にした。本研究によって、膜タンパク質 TSecDF の立体構造が初めて決定されることとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

細胞におけるタンパク質の膜透過や膜組込みは、遺伝子産物の配置という細胞生物学の基本問題の一つとして、活発な研究が行われている。原核細胞の Sec 因子によるタンパク質膜透過機構について、遺伝学的・生化学的アプローチで関与する因子やその作用機作の詳細な研究がなされている。しかし、タンパク質膜透過チャンネル (トランスロコン) を形成する膜内在性 SecYE 複合体の構造—機能相関、特に膜透過駆動 ATPase である SecA との相互作用や、膜タンパク質組込みにお

ける機能の分子機構など、不明の点が多い。やはり内在性膜タンパク質因子である SecDF は、SecYE チャネルのタンパク質の膜透過および膜組込み機能を促進する役割を持つと考えられているが、その解明はほとんどなされていない。これらの課題の解決には、これらの因子の立体構造を解明することが必要である。申請者が取り組んだ SecYE, SecDF はいずれも疎水性が高い内在性膜タンパク質であり、一般的な取り扱い、結晶化とも困難な研究対象である。2004年に SecYE ホモログである古細菌 SecYE β の立体構造が報告された。しかし、原核細胞に特徴的な SecA によって駆動されるタンパク質膜透過の解明には、原核細胞由来の SecYE の構造決定は必要不可欠である。本研究で申請者は、タンパク質の安定性が高いと考えられる高度好熱菌由来の SecYE, SecDF に着目し、それらのクローニングから結晶化まで、忍耐強い研究を一貫して展開した。各ステップにおける様々な条件検討を経て結晶化を成し遂げたことは、困難な材料であることを考えると、高く評価されるべき成果である。申請者は既に、TSecYE の 6Å 回折データを得ており、さらに高解像度データの収集のための具体的な方策を提案している。一方、TSecDF の結晶解析では位相決定に成功し、初期の構造決定段階に入っている。今後のモデリングによって膜タンパク質 TSecDF の構造が初めて解かれるものと思われ、申請者のこれまでの努力のこの分野への貢献は極めて大きなものである。申請者は同時に高度好熱菌のタンパク質膜透過装置の基礎的 characterization を進めてきた。TSecYE トランスロコンの精製と人工膜への再構成、その活性測定とオリゴマー状態の解析を経て、界面活性剤を用いた可溶化によるオリゴマーの解離を避ける方法として、TSecYE-dimer の構築を行い、それが溶液中で TSecA と安定な複合体を形成する能力を持つことを示した。トランスロコンチャネル (SecYE) と駆動因子 (SecA) の複合体の構造を決定することは、この分野の最優先事項の一つとして世界的に取り組まれているが、申請者の実験系は有力な足がかりとなるものと期待される。同一生物種からの SecA, SecYE, SecDF からなる超分子複合体の構造決定も具体性を帯びてきた。このような細胞装置は動的な構造変化を伴って働くものであり、その理解には単一成分の静止構造のみでなく、基質タンパク質をも含む様々な組み合わせの複合体や変異体の利用が重要である。高度好熱菌における構造解析は大腸菌で蓄積している膨大な研究情報と組み合わせることで有効に進展させることのできる系と考えられ、申請者がこの実験系を開発してきた意義は高い。

以上のように、本論文は、高度好熱菌のタンパク質膜透過装置の構造解析を、実験系の開発から結晶化と構造解析の初期にわたり成し遂げたものであり、この分野を大きな進展に導くものと評価される。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。