

氏 名	しも かわ なお み 下 川 直 美
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2902 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	タンパク質膜透過装置 SecY の膜貫通領域の機能的役割

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

SecY は、10ヶ所の膜貫通領域（アミノ末端より TM1～TM10 と呼ぶ）を持つ大腸菌細胞質膜タンパク質であり、SecE, SecG と複合体を形成して新生タンパク質の細胞表層への局在化における膜透過チャネルとして機能する。このような膜を越えたポリペプチド鎖の動きを媒介する因子においては、膜内部の領域が重要な機能的役割を担っていることが考えられるが、一般に TM 領域の中には、そのタンパク質の膜組込み状態を確立・維持することが主要な役割であるものもある。SecY に存在する10ヶ所の TM 領域の役割を解明することは、ポリペプチドの膜中での動きの媒介という SecY 機能の本質を理解するために重要である。申請者は本研究において、TM 領域の機能的な重要性を評価するため各 TM の中央部の6 アミノ酸残基をそれぞれ無関係な配列と置き換えた変異型 SecY を作製し、それらの分泌欠損 secY 変異株の増殖およびタンパク質分泌欠損に対する相補活性を系統的に調査した。その結果、TM2, TM3, TM4, TM7 の配列置換により、SecY 機能が損なわれることを見いだした。特に TM3 および TM4 における置換による機能欠損が著しいことより、TM3, TM4 が SecY の機能において特に重要であることが示唆された。一方、TM1, TM5, TM6, TM8, TM9, TM10 の各置換変異体においては、相補活性が保たれた。中でも TM6, TM8 の置換変異による活性低下は見られず、これらの TM 領域は膜透過過程に直接関わるというよりは、膜貫通状態の実現を通して全体の構造的基盤に寄与することに意義があるものと解釈された。このことは、TM6 置換変異型 SecY タンパク質を精製して SecG とともにプロテオリポソームに再構成し、in vitro における SecA 依存分泌前駆タンパク質膜透過促進機能が変異タンパク質においても正常に保たれていることにより証明した。次に、SecY の機能発現のために重要であると示唆された TM4 領域の各アミノ酸残基を一つずつシステインに置換した。その結果、Leu164, Thr168, Phe170, Leu171, Trp173, Phe174, Gly175 各部位 Cys 置換により有意な機能低下が認められた。これらの残基は α ラセンの片面に偏在するような周期性を持って配置していること、また、変異部位が細胞質側に近づくにつれ、分泌機能の低下が激しくなることを指摘した。そして、これらの結果の意義を2004年に発表されたメタン生成古細菌の SecY 複合体の結晶構造や、SecY 複合体の架橋実験結果などの情報に基づいて考察した。機能上重要であると認定された4つの TM 領域は、SecY 複合体においてシグナルペプチドや膜貫通配列のチャネルへのアクセス経路や膜貫通部位の水平脱出経路を構成すると考えられる側に集中しており、特に TM3 と TM4 は膜駆動因子 SecA の機能サイクルを補助すると考えられている SecG と近接した位置にあることが明らかとなった。また、TM4 領域内の機能的に重要なアミノ酸残基を含む α ラセンの側面はポリペプチド鎖透過チャネルの狭窄部位を形成するアミノ酸残基に面するような配向をとっていることがわかった。これらの知見に基づき、TM4 領域は、チャネルの開閉やポリペプチドとの相互作用に重要な役割をもつことを提唱した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

タンパク質の膜透過は、遺伝子産物としてのタンパク質が適切に配置されて細胞を構成するために経なければならない必

須過程である。細胞の成り立ちの根幹を支えるこの反応は、生物種を越えて保存されたトランスロコンと呼ばれる膜タンパク質複合体 (SecY 複合体, 真核細胞では Sec61 複合体) によって媒介されるものである。トランスロコンには膜の透過障壁を損なうことなく巨大分子であるポリペプチド鎖を輸送する特別な機能が想定され、その理解は細胞機能に基づく生命現象の理解にとって重要な問題である。SecY は様々な手法で集中的な研究がなされてきたものの、10個の膜貫通領域 (TM) がどのように機能するのかという重要問題は未だほとんど分かっていない。TM の役割を解明することは、ポリペプチドの膜中での動きの媒介という SecY 機能の本質を理解するために重要であるが、実験的なアプローチは容易ではない。本研究において、申請者は地道な変異解析によって、この問題への取り組みの第一歩を開始したことになる。このこと自体、この分野の進展に寄与したものとして評価に値する。TM 領域の機能的な重要性を評価するため、各 TM の中央部の 6 アミノ酸残基をそれぞれ無関係な配列と置き換えた変異 SecY を作製して解析した結果、SecY の機能上重要な TM 領域 (TM2, TM3, TM4, TM7) を同定することに成功した。逆に TM6 および TM8 領域は膜を貫通して SecY の膜タンパク質としての基本構造に寄与する以上の役割はないことを示唆し、TM6 領域の変異型 SecY の精製・再構成実験によってそれをサポートする分子レベルでの証拠を得た。申請者は TM4 領域が特に重要であることに注目して、この領域の各アミノ酸残基について詳細な変異解析を行い、TM4 領域内の機能的に重要なアミノ酸残基を同定した。これらのアミノ酸残基が α ラセンの片面に集中しており、細胞質領域に近づくにつれその重要度が増加することを明らかにした。このように、申請者は SecY の TM 領域について、まずそれらの重要度の全体像を得た上で、特定領域の詳細な残基レベル解析を実行した。また、遺伝学的手法のみでなくトランスロコン複合体の精製・再構成実験にも取り組んで総合を試みた。一方、2004年に報告された古細菌の SecY 複合体の構造を基に、膜透過機能に重要な TM4 アミノ酸残基のモデリングを行い、構造生物学との橋渡しも実行した。これらの結果は、未だ全 TM 配列の役割解明という目標には至っていないものの、今後の研究への一つのモデルケースを提供したものである。本研究は、従来行われてこなかった SecY の TM 領域の系統的な解析にとりくみ、SecY の機能上重要な TM 領域およびより構造的な役割をもつ TM 領域を分類し、前者の一つに関して詳細な情報を記述した。これらの研究結果は、この分野を一步進展させたものとして評価することができる。

以上のように、本論文はタンパク質の膜透過装置の分子機構解明に有益な情報を多くもたらしたものであり、博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。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。