

氏 名 さ 酒 向 ま ち こ
 学位(専攻分野) 博 士 (理 学)
 学 位 記 番 号 理 博 第 2898 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 膜におけるタンパク質の動態へのアプローチ：膜プロテアーゼおよびチャネル形成ポリペプチドの反応性について

論文調査委員 (主 査) 助教授 秋 山 芳 展 教 授 三 木 邦 夫 教 授 杉 山 弘

論 文 内 容 の 要 旨

膜タンパク質は、膜を超えた物質の選択的輸送や情報（シグナル）の伝達に働き、生体膜の機能に重要な役割を担っている。膜におけるタンパク質の動態を理解することは、膜機能を理解する上で極めて重要なものである。本研究ではこの目的に向けて、二つのアプローチを行った。まず、ペプチドと膜の相互作用について生物物理学的手法による研究を行い、抗生ペプチドのひとつアラメチシンの膜内におけるチャネル形成機構を解析した。さらに、より生物学的視点から研究を行い、大腸菌における異常な膜タンパク質の分解・除去に関わる膜プロテアーゼについての解析を行った。

アラメチシンは、人工脂質二分子膜に電圧依存性のイオンチャネルを形成することが見いだされ、生体のイオンチャネルのモデルとして、その構造とイオン透過メカニズムが研究されてきた。本研究では、平面脂質二分子膜に形成させたチャネルを通るイオンを微小電流（チャネル電流）として検出することによって、アラメチシンチャネルの動態について調べた。アラメチシンは膜電位によって膜に挿入され、会合してチャネルを形成するが、その際ペプチドのどちらの末端から膜に挿入されるかについては十分検討がなされていなかった。二つのチャンバーの間に平面脂質二分子を作製し、N末端をジスルフィド結合で繋いだ二量体化アラメチシンを片側のチャンバーに加えて膜に挿入させた。ジスルフィド結合を切断後、アラメチシンを添加したのとは反対側のチャンバーに膜不透過性のチオール修飾試薬を加えて、チャネル電流の変化を調べたところ、大幅なチャネル電流の変化が観測された。このことは、N末端のチオール基が修飾されたことを示している。これらの結果から、アラメチシンは膜電位によって、N末端から膜に挿入され、イオンチャネルを形成することが明らかになった。

異常な膜タンパク質が膜に蓄積すると正常な膜機能を阻害し、ついには細胞を死に至らしめることもある。このため、それらは迅速に分解・除去されねばならない。大腸菌では、膜結合型 ATP 依存性プロテアーゼである FtsH が異常膜タンパク質の分解に中心的な役割を果たすが、この分解に関わるその他の膜プロテアーゼについてはほとんど分かっていない。HtpX は亜鉛プロテアーゼモチーフを持つ細胞質膜タンパク質であり、その発現は細胞質（熱ショック）ストレス応答と細胞表層ストレス応答によって制御されている。当研究室で行われてきた遺伝学的研究から、HtpX は FtsH と重複したあるいは相補的な機能を持ち、膜タンパク質の分解に関わることが示唆されていた。しかしながら、HtpX のプロテアーゼ活性は直接示されておらず、膜タンパク質分解に関わるとの直接的証拠も得られていなかった。そこで、HtpX を精製し、そのプロテアーゼ活性と膜タンパク質分解能について調べた。

HtpX を過剰生産し、精製を試みたが、HtpX は超音波による細胞破碎や界面活性剤による膜の可溶化に伴って自己切断することが分かった。そこで、変性条件下で精製することで自己切断を防ぎ、亜鉛キレート剤存在下でリフォールディングさせた。これにより、完全長の HtpX を精製することができた。精製した HtpX は *in vitro* で自己切断活性を有し、 β -casein も分解した。さらに、HtpX が膜タンパク質 SecY を、*in vitro* および *in vivo* において切断することを発見した。自己切断や SecY の切断により、これら基質の分子内部での切断により生じたと考えられる安定な切断断片が蓄積した。以

上の結果から、HtpX が endopeptidase であり、細胞内において膜タンパク質分解に働き得ることを示した。

論文審査の結果の要旨

生体膜は透過障壁としての性質により細胞そのものを規定し、また細胞内を、固有の機能を持つコンパートメントに区別している。一方、生体膜は物質や情報を選択的に輸送・伝達する機能も併せ持っており、そのような機能には膜タンパク質が必須の役割を果たしている。細胞内で多くを占める可溶性タンパク質のみならず、膜タンパク質も、合成や分解、また構造変化など、ダイナミックな動きを伴って、その機能を果たしている。このような膜タンパク質の動態の解明は細胞機能を理解する上で欠くことが出来ないものである。

アラメチシンは、菌類 *Trichoderma viride* から単離された抗生ペプチドの一つであり、人工脂質二分子膜に陽イオン選択性のイオンチャネルを形成する。アラメチシンは20残基の短いペプチドで、扱いが比較的容易であることから、生体のイオンチャネルのモデルとして様々な研究が行われてきており、特に、イオン選択性のメカニズムに関しては多くの知見が得られている。しかしながら、アラメチシンのチャネル形成機構やチャネル構造などについては不明な点も残されている。申請者は、本研究において、アラメチシン N 末端に導入したチオール基の膜不透過試薬による特異的修飾を利用して、アラメチシンがチャネル形成時、N 末端を膜電位のマイナス側に向けて配向していることを示した。この結果は、解析が困難な、膜電位存在下でのチャネルの構造に関する知見として有用なものである。

申請者はさらに、より生物学的な視点から膜タンパク質の動態について研究するため、大腸菌における膜タンパク質分解に関わると考えられる膜プロテアーゼの解析を行った。

異常な膜タンパク質の蓄積は膜機能を損ない、ついには細胞を死に迫りやることもある。従って、このような異常膜タンパク質の迅速な分解は、細胞にとって極めて重要な問題である。しかしながら、膜タンパク質の分解機構についての理解は、膜タンパク質の取り扱いが実験上難しいこともあり、その重要性にも関わらず遅れている。大腸菌では、FtsH が膜タンパク質の分解に中心的な役割を果たすことが示唆されているが、膜タンパク質分解に関わる他の細胞因子、特に他のプロテアーゼの関与についてはほとんど分かっていなかった。HtpX タンパク質は、遺伝学的解析から、FtsH とともに膜タンパク質の分解・品質管理に関与することが示唆されていたが、そのプロテアーゼ活性は示されておらず、膜タンパク質の分解に関わるとの直接的証拠も得られていなかった。申請者は、HtpX を精製し、生化学的解析を行って、HtpX が実際にプロテアーゼ活性を持ち、膜タンパク質に対して endopeptidase として働くことを示した。FtsH による膜タンパク質の分解には ATP のエネルギーが必要であり、プロセッシブな分解を行うため、分解中間体の蓄積は見られない。一方、申請者は、HtpX による膜タンパク質の切断では、ATP のエネルギーは必要ではなく、膜タンパク質基質をその内部で切断して安定な切断断片を生じることを示した。このことは、HtpX が FtsH とは異なる様式で膜タンパク質を分解していることを示すものであり、大腸菌における膜タンパク質分解機構の理解に貢献するものとして、高く評価できる。本研究により確立した HtpX の *in vitro* 解析系は、HtpX による膜タンパク質分解機構の詳細を解明するための重要な手段になるものと考えられる。

以上のように、本研究は膜タンパク質の動態解明について多くの有用な知見をもたらしたものと判断し、本論文が博士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。