

氏 名	こ いで か よ 小 出 佳 代
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3274 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 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 RIP プロテアーゼ RseP の活性部位環境と基質結合

論文調査委員 (主 査) 教 授 三 木 邦 夫 教 授 秋 山 芳 展 教 授 藤 井 紀 子

論 文 内 容 の 要 旨

「膜内部における制御されたタンパク質切断 (RIP: Regulated intramembrane proteolysis)」は、細菌から高等生物まではほとんどの生物種で、膜を越えたシグナル伝達を始め、様々な生体プロセスに重要な役割を果たしている。しかしながら、RIPに関わる膜プロテアーゼ (I-CLiP) が如何にして、「疎水的」な膜内部で基質タンパク質を加水分解し得るのか、そのメカニズムは明らかではない。

大腸菌 RseP は I-CLiP の一種 S2P (site-2 protease) ファミリーに属する4回膜貫通型の膜プロテアーゼであり細胞質膜タンパク質 RseA を切断することで σ^E 経路細胞表層ストレス応答誘導に必須の役割を果たしている。申請者は「膜内部での基質切断」のメカニズム解明の手掛かりを得るため、RseP のプロテアーゼ活性部位モチーフである HEXXH モチーフ及び LDG モチーフ近傍の様々な位置に Cys 残基を一つ持つ mono-Cys 型 RseP 変異体を作製し、膜不透過性のチオール基修飾試薬 AMS (分子量約500) によるそれら Cys 残基の修飾を指標として、RseP の活性部位がどのような環境にあるのかを調べた。活性部位モチーフ内に導入した Cys 残基はいずれも、RseP がネイティブな構造で膜に組み込まれている状態では AMS による修飾をほとんど受けなかったが、タンパク質変性剤存在下では効率は低いものの有意に修飾を受けた。タンパク質変性剤存在下で AMS の代わりに、よりサイズの大きなチオール基修飾試薬 malPEG (分子量約5000) を用いて同様の修飾アッセイを行うと、活性部位モチーフ近傍に導入した Cys 残基の修飾効率は、AMS を用いた場合に比べて顕著に低かった。これらの結果は、RseP のプロテアーゼ活性部位が、脂質と水溶性環境 (細胞質) の境界に位置している折り畳まれたドメイン内部に存在し、脂質層及び細胞質から隔離されていることを示唆している。

次に RseP の基質との相互作用の様態について調べるため、基質の結合に関わる RseP の領域の同定を試みた。RseP の 3 番目の膜貫通領域 (TM3) に存在する Asn389 残基の変異が相補活性を失わせ、プロテアーゼ活性も低下させることを見出し、免疫沈降実験によりこの残基の変異が RseP と基質の相互作用を弱めることを明らかにした。また、TM3 の他の 3 つの残基、Asn394、Pro397 及び Pro399 についても同様な解析を行い、それらの変異により RseP と基質の相互作用が弱まることを示した。さらに、Pro397 および Pro399 残基の位置に導入した Cys 残基が、基質である RseA の TM 中央付近に導入した Cys 残基とジスルフィド結合を形成すること、RseP と基質の相互作用を弱める Asn389 残基の変異により上記のジスルフィド結合の形成が抑制されることを見出した。以上の結果は、RseP の TM3 は RseP と基質との相互作用に重要な役割を果たしており、特に Pro397 及び Pro399 を含む領域は基質との直接的結合に関わることを強く示唆している。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

RIP の分子メカニズムの解明は、「膜内タンパク質切断」に関わる多くの重要な生体内プロセスを理解し、また、制御するためには欠くことができない。しかしながら、これまでのところ、その詳細は不明な点が多い。RIP に関わるプロテアーゼ (I-CLiP) は一般に、膜貫通配列と予想される疎水的な領域内に触媒残基を持ち、基質の切断は膜内部で起こると推測

されてきた。一方、ペプチド結合の加水分解は水分子を必要とする反応であり、「実際に膜内（脂質二重層）の疎水的な環境で基質の切断が起こるのか、もし起こるのだとしたら、加水分解反応に必要な水は膜内にあるプロテアーゼ活性部位にどのように供給されるのか」という点は、RIPに関する未解明の重要な問題である。

本申請論文において申請者は、この問題に対する一つのアプローチとして、大腸菌のS2Pファミリーに属するRsePの活性部位近傍に導入したCys残基のチオール基修飾試薬との反応性を指標とした新たなアッセイ方法を考案し、これを用いてRsePの活性部位がどのような環境にあるのかを調べた。申請者はRsePの活性部位が膜と細胞質の境界に位置し、部分的に脂質層に埋もれた、折り畳まれたドメイン内部に存在することを提唱した。本申請論文の提出後、古細菌S2Pの構造が報告された。古細菌S2Pでは、プロテアーゼ活性部位は膜に埋もれ、細胞質側にも露出したタンパク質構造の内部に位置しており、本研究の結果はこの構造とよく一致している。最近、I-CLiPの一種Rhomboidファミリーに属する大腸菌GlpGの構造が明らかとなり、生化学的解析の結果も併せて、その活性部位が水溶性環境に大きく開いたキャビティ内にあることが示されている。本研究の結果は、I-CLiPの活性部位は膜の脂質環境から隔離された環境に存在するという共通点を持つものの、活性部位周辺の構造や水分子の供給メカニズムは個々のファミリーで異なることを示している。申請者の結果は、RIPプロテアーゼの機能や分子メカニズムを理解する上で欠くことのできない成果として評価でき、学界に対する貢献度も高いものと認められる。また、本研究において申請者が自身の研究課題を遂行するため従来の実験手法の欠点を補う汎用性の高い手法を開発した点も高く評価される。

申請者はさらにRsePの基質結合に関わる領域の同定を行った。S2Pファミリープロテアーゼは真核生物においてもコレステロールの代謝や小胞体ストレス応答に重要な役割を果たしているが、基質との相互作用を含めた具体的な作用メカニズムについては全く分かっていない。RsePのTM3領域はS2Pファミリープロテアーゼ間で高度に保存された残基を持っている。申請者はそれらを含む複数の残基について解析を行い、この領域が基質との結合に直接関わることを示唆した。本研究結果は、S2Pプロテアーゼによる基質認識機構解明の基礎となるものと期待される。

以上のように、本研究はRseP/S2Pプロテアーゼの基礎的な性質を明らかにするばかりでなく、今後のRIP機構の理解に貢献するところが大きい。よって博士（理学）の学位論文として価値あるものと認めた。なお、本学位論文に報告されている内容およびこれに関する分野について試問した結果、合格と判定した。