

## 研究課題別事後評価結果

### 1. 研究課題名

タンパク質の膜を越えたダイナミズムを支える細胞機能の解明

### 2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）

研究代表者 伊藤 維昭 京都大学ウイルス研究所 教授

主たる研究参加者 徳田 元 東京大学分子細胞生物学研究所 教授

### 3. 研究内容及び成果

タンパク質が細胞の特定の場所に配置され細胞を形づくる際の、膜を越えた分泌輸送、膜組み込み、局在化、構造形成、分解過程などを司る細胞機能の実体解明を目指して研究した。モデル生物としては大腸菌を用い、タンパク質膜透過チャネル因子SecYEG、輸送ATPase SecA、膜タンパク質の分解制御にかかわるFtsH複合体、YaeLプロテアーゼ等のダイナミックな働きを解明し、また、分泌タンパク質のジスルフィド結合形成装置Dsb、リポタンパク質の外膜への局在化装置Lolなどの構造と機能を明らかにした。

#### 細胞機能グループ（京都大学ウイルス研究所 伊藤維昭研究室）

膜透過装置の解析では、分泌タンパク質の膜を越えた輸送を司るSec膜透過装置の構造と機能を研究した。SecAの膜への挿入と脱離サイクル（SecAサイクル）を直接の駆動力として、膜内在性タンパク質複合体SecYEGを介してこの過程が起こることを示した。この細胞にとって基本的な反応を司る装置の実体解明が進み、構造生物学に結びつける段階に達した。また、研究はリボソームによる翻訳制御に分野にも及び、翻訳と膜タンパク質の組込み機構などへの発展も期待される状況となった。種々のSecY変異、SecAの解析から、SecYEG-SecA複合体におけるサブユニット相互作用やSecA分子内の相互作用によるATPase活性制御機構を明らかにした。同時に、構造生物学的解析に向けて、高度好熱菌のSecA, SecYEの実験系を開発・確立した。

一方、SecAの発現制御の研究を行ない、SecM(Secretion Monitor)を同定し、新生SecMポリペプチドがリボソームの内部で、exit tunnelの成分と相互作用すること、およびこの相互作用が合成途上分子の膜透過状態による制御を受けることを発見した。この研究により細胞の分泌活性の変動に応じたSecAの翻訳制御機構を解明し、同時にリボソーム内部のトンネルによる翻訳制御の新分野を開拓することができた。

膜タンパク質分解系の解析では、膜結合型ATPase・プロテアーゼであるFtsHが異常な膜タンパク質を除去するため、細胞質に一定の長さ以上が露出した末端から分解を開始し、膜から細胞質に逆輸送しつつ加水分解を行なうことを示した。FtsHは、膜という疎水環境にあるタンパク質に対する効率的な加水分解のための装置であるが、膜近傍における制御された切断反応（Regulated Intramembrane Proteolysis）を司る新たな膜結合プロテアーゼYaeLを同定した。YaeLは $\sigma$ E表層ストレス応答経路を、anti- $\sigma$ E(RseA)の2段階目の切断を促すことによって活性化することを発見した。また、大腸菌の表層ストレス応答系が細胞質膜の内在性膜タンパク質の異常に応答することを見出し、膜結合型亜鉛メタルプロテアーゼHtpXがCpxストレス応答経路による発現制御を受けることを見出した。

タンパク質のジスルフィド結合形成装置の研究では、大腸菌のペリプラズムにおけるタンパク質のジスルフィド結合形成を司るDsbAによって導入されたジスルフィド結合が、DsbCによって矯正されること、DsbAは膜タンパク質DsbBによって再酸化されるが、DsbA-DsbB系が働くためには、細胞の呼吸鎖機能が必要であることを発見した。DsbBのCXXCモチーフは呼吸鎖成分（キノン）を介して、酸素によって強く酸化されていることを示し、キノンによる酸化に重要なDsbB領域を同定した。さらに、DsbA-DsbB間の相互作用の生化学解析を行ない、レドックスポテンシャルの逆転現象を見出した。

#### 分子機能グループ（東京大学分子細胞生物学研究所 徳田 元研究室）

輸送装置を構成する因子SecAは、ATPと分泌タンパク質を結合すると膜内に深く挿入し、ATP加水分解で膜から脱離する。この時、膜内在性タンパク質SecGの配向性は反転し、その後、元の配向性を回復する。SecGの構造変化の役割を追求し、以下の知見を得た。secG 欠失変異によって、生育と分泌タンパク質の膜輸送が低温感受性になる。この低温感受性は、リン脂質生合成に関与する遺伝子gnsA（グリセロール-3-リン酸脱水素酵素）やpgsA（ホスファチジルグリセロリン酸合成酵素）を過剰発現すると抑制されることを見出した。pgsAの過剰発現によって酸性リン脂質量が増加し、 $\Delta$  secG 変異だけでなく、低温感受性secA 変異（secAcsR11）も特異的に抑制することを明らかにした。さらに、 $\Delta$  secG-secAcsR11 二重変異は致死的に

なることから、両因子の構造変化は協調して起きることが示唆された。そこでpgsA 過剰発現による酸性リン脂質量の上昇と、SecGの有無がSecAの膜挿入に与える影響を調べ、SecGはSecAの膜挿入を促進すること、SecGがない時は酸性リン脂質の増加によって、SecAの膜挿入が促進されること、これにはSecAのATPase活性促進が伴うことを明らかにした。これらの知見により、SecAの膜挿入・脱離サイクルを促進することがSecGの構造変化の重要な役割であることが明らかとなった。SecGの構造変化をシステイン特異的の化学修飾によって検出する実験系を確立した。さらに、SecGは膜内配向性を反転した時、SecAと膜中で強く相互作用することを見出した。膜透過反応は、プロトン駆動力によって強く促進されるが、この機構はこれまで不明であった。SecAサイクルに対するプロトン駆動力の影響を調べ、プロトン駆動力はSecAの膜からの脱離過程を促進することを明らかにした。これらの研究によって、膜輸送反応の駆動力であるSecAサイクルがSecG、酸性リン脂質、プロトン駆動力によって促進される機構を解明した。

外膜特異的リポタンパク質を内膜から遊離させるLolCDE複合体を発見し、遺伝子の塩基配列を明らかにし、大量発現・精製ならびに再構成実験系を確立した。LolCDEはABCトランスポーターファミリーに属するが、前例のない膜からの遊離を触媒する特異なABCトランスポーターであることを示した。これによって、リポタンパク質の選別と膜局在化機構に関与する5種類の因子(LolABCDE)がすべて解明された。また、すべての因子が大腸菌に必須であることを、遺伝子破壊株を構築して明らかにした。+2位がAspのリポタンパク質は内膜に、Asp以外のアミノ酸を+2位にもつリポタンパク質は外膜に局在化する。+2位のAspが内膜シグナルとして機能するためには、+3位のアミノ酸が重要であること、天然の内膜特異的シグナルとして機能するためには、+3のアミノ酸が重要であること、天然の内膜特異的リポタンパク質はすべて、+2位のAspを内膜シグナルにするためのアミノ酸を+3位にもっていることを明らかにした。リポタンパク質の膜局在化シグナルは、LolCDE複合体によって選別されていること、内膜シグナルはLolCDEの認識を回避するシグナルであるため、リポタンパク質は遊離せず内膜にとどまることを明らかにした。このような性質のシグナルは、他のタンパク質局在化系では知られていない。大腸菌に存在にする90種以上のリポタンパク質は、すべてLol システムによって選別され膜に局在化すると考えられることを明らかにした。外膜特異的主要リポタンパク質(Lpp)が誤って内膜に局在すると致死的作用を示すことを見出した。ペリプラズムの分子シャペロンLolA変異体を分離し、リポタンパク質、LolCDE、LolBとの相互作用を解析し、Lol システムの分子機構の詳細を明らかにした。さらに、LolAとLolBの結晶構造を解明し、アミノ酸配列に相同性がないにもかかわらず、両因子の結晶構造は極めてよく似ていることを明らかにした。これらの研究成果によって、Lol システムによるリポタンパク質の選別と膜局在化機構の全体像解明に大きく前進した。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

先ず、発表論文のデータを以下に記す。

欧文誌論文 61報

2001年 Impact Factor Ranking の Original Article 38位、Review Article 30位までの雑誌に掲載された論文

Cell	1 報
Genes Dev.	1 報
Moll. Cell	1 報
Nature Cell Biol.	1 報
EMBO J.	5 報
Proc. Natl. Acad. Sci. USA	4 報

上記以外の50数個の発表も、十分上位にある国際誌(例えばMol. Cell BiolやJ.B.Cなど)に発表している。Cell, Genes Dev. および Nature Cell Biol. の論文は特に優れており評価が高い。極めてproductiveなグループである。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

「研究内容および成果」に述べられている如く、このグループは細胞の形づくりの際の膜を越えるタンパク質の移動や配置の分子機構を、大腸菌を用い、鍵となるタンパク質をクローン化することによって見事に解明した。この学問的価値はもとより、用いられた手法も優れており、日本の科学技術への貢献も甚大である。よって、戦略目標を十二分に達成したものと云えよう。

##### 4-3. その他の特記事項

今回のCRESTの成果が認められ、平成14年度CRESTの新領域「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」に採択されている。

この分野の世界的リーダー格となった事は、日本の科学を評価させる事にも大きく役立っていよう。受賞は特にない。

[<<生命活動トップ](#)

---

This page updated on September 12, 2003

Copyright(C)2003 [Japan Science and Technology Corporation](#)