

論文内容の要旨

申請者氏名 古川 新

全ての生物は、生体膜によって外部から隔離された細胞システムを持つ。その生体膜へのタンパク質の膜組込みや膜を越えた輸送は、生命に必須の現象である。細胞質で合成された膜タンパク質の多くは、全ての生物に保存されているタンパク質を通すチャンネルである Sec トランスロコン (バクテリアでは SecYEG 複合体) により輸送される。しかし、SecYEG や他の因子によって達成されるタンパク質膜輸送の機構は未だ不明な点が多い。本研究では、バクテリアにおいて SecYEG と協力してタンパク質膜組込みを行う YidC の機能解析およびタンパク質膜透過を駆動する SecDF の X 線結晶構造解析・機能解析を行い、膜を介したタンパク質輸送メカニズムの解明を目指した。

共同研究により決定された YidC の結晶構造から YidC の膜貫通領域には親水性の内溝が存在することが明らかとなった。生化学的な機能解析により、この内溝にある保存された正電荷をもつアミノ酸が YidC の活性に重要であること、ならびに膜組込み基質タンパク質がこの溝と相互作用することを明らかとした。これらの情報は、YidC が膜へと挿入されるタンパク質を静電的な相互作用により親水的な溝の内部へと一時的に取り込み、細胞膜への挿入のエネルギー障壁を低くする役割を持つという YidC の機能モデルを支持する。

SecDF は、12 本の膜貫通ヘリックスとペリプラズム側に突出した P1-head, P1-base, P4 ドメインから構成される。SecDF はプロトン流入に伴うエネルギーを利用して P1-head が動き、タンパク質を細胞外へと牽引するとされていた。先行研究では全長 SecDF の構造は P1-head が膜に近づいた F 型のみが報告されていた。本研究では X 線結晶構造解析により、P1-head が膜から離れた I 型と、F 型構造よりもさらに膜に近づいた超 F 型構造を決定した。I 型構造のひとつでは、膜貫通領域を貫通するトンネル構造がみられた。生化学的な実験や分子動力学計算により、このトンネル内に水分子が入り込み、プロトンの流入が起こること、またトンネルに存在する保存されたアスパラギン酸残基がトンネルの開閉に重要な役割を果たすことが示唆された。超 F 型構造の決定から、P1-base 領域と P4 領域が β シートから β バレルに変化することが示唆された。変異体解析によって、 β バレルへの遷移は膜貫通領域の保存されたアルギニン残基とアスパラギン酸残基が重要であることを示し、膜貫通領域の相互作用とペリプラズム側の領域が連動していることを示した。これらの結果から、SecDF はプロトン流入に伴うエネルギーを利用してすべてのドメインがダイナミックに連動した構造変化を起こすことによりタンパク質膜透過反応が駆動されるという詳細な作業仮説を提唱した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 古川 新

本研究では、細菌のタンパク質の細胞膜を介した輸送を行う膜タンパク質である YidC 及び SecDF を対象として、構造生物学的な手法を用いた研究を進めた。細菌の膜タンパク質を細胞膜へと挿入する YidC については、遺伝学的、生化学的な解析から、YidC の膜貫通領域の内側に形成された親水的な溝の中心に存在する生物種間で保存された正電荷をもつアミノ酸残基が YidC の活性に重要であること、この YidC の溝と膜へと挿入される基質タンパク質とが相互作用することを明らかとした。これらの結果は、YidC の溝を経由する 1 回膜貫通タンパク質の膜組み込みモデルを補強した。YidC は真核生物の小胞体膜、ミトコンドリア膜にも保存されており、生物に共通した膜組み込みの分子メカニズムの提唱は学術的に高い価値がある。

細菌のタンパク質を細胞外への分泌を行う SecDF は、プロトンの濃度勾配を利用してペリプラズム側のドメインの構造変化を繰り返すことで機能すると提唱されていたが、SecDF の全長構造の報告が F 型 1 例しかなく、その理解は妨げられていた。本研究において、全長 SecDF の I 型および超 F 型の構造決定と続く機能解析によって、SecDF の理解が大幅に進んだ。I 型構造では細胞膜を縦断するチャンネルを保持しており、コンピュータによる分子動力学計算などの解析から、このチャンネルを介してプロトンが透過することを示した。超 F 型構造と I 型と F 型との構造を比較することで、SecDF のペリプラズム側のドメインがベーターシート構造とベータバレル構造へとの間をフォールディング変化することが示唆された。生化学的な解析によってこれらの構造遷移は、膜貫通領域の構造変化と関連することが示された。プロトン駆動型のモーターには SecDF のようにプロトンの通り道と実際に機能するドメインが離れてリモートカップルしているものが多い。本研究では、このリモートカップリングメカニズムの基本原則を示した。また、I 型、超 F 型のペリプラズム側の領域のくぼみに結合していた小分子の情報を手掛かりに、生化学的な相互作用解析により、分泌タンパク質の結合部位を同定した。以上の結果を統合して、SecDF の分子メカニズムの詳細を提唱した。SecDF のメカニズムの解明は、基本的な生命現象を明らかにするだけでなく SecDF をターゲットとした新規抗生物質の開発を可能とする成果である。

以上のように、本論文は生物にとって必須の機構であるタンパク質膜透過現象を理解する上で新たな知見を提供し、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。