

論文の内容の要旨

論文題目

膜タンパク質 YidC によるタンパク質膜組み込み機構の構造基盤
(Structural basis for membrane protein insertion by YidC,
a membrane protein chaperone and insertase.)

氏名 熊崎 薫

すべての細胞は細胞膜により自己と外界を隔てており、この細胞膜を介した物質や情報の輸送は、細胞が生命活動を営む上で必要不可欠である。このような細胞と外界とのやり取りは、細胞膜に埋め込まれた膜タンパク質によって担われている。膜タンパク質はリボソームにより合成され細胞膜へと運ばれたのち、「タンパク質膜組み込み装置」によって細胞膜へと組み込まれることで初めて本来の機能を発揮することができる。YidC は細菌からミトコンドリアまで広く保存された YidC/Oxa1/Alb3 ファミリーの膜タンパク質であり、真正細菌の内膜においてタンパク質膜組み込み装置として機能する。YidC は単独でタンパク質膜組み込みを行うほか、タンパク質の膜透過チャネルである Sec トランスロコンにより細胞膜に組み込まれた膜タンパク質の正しい折りたたみを促進するシャペロンとしての機能をもつ。しかし、これまでに YidC の膜貫通ドメインを含んだ詳細な立体構造は報告されておらず、YidC がどのようにタンパク質を細胞膜に組み込むのか、その分子メカニズムには不明な点が多く残されていた。そこで本研究の第一の目的として、YidC の立体構造を X 線結晶構造解析により原子レベルで明らかにし、さらに構造情報に基づいた機能解析を行うことで、YidC がタンパク質膜組み込みを行う分子機構を解明することを目指した。

まず、*Bacillus halodurans* 由来 YidC (BhYidC) を精製・結晶化し、2.4 Å 分解能で BhYidC の結晶構造を決定した。結晶構造から、YidC が新規のタンパク質フォールドをもつ 5 回膜貫通型のタンパク質であることが明らかとなった。細胞内側では、5 本の膜貫通ヘリックス同士は緩やかに相互作用しており、分子内部には膜貫通ヘリックスで形成された溝が存在していた。この溝の内側には親水的なアミノ酸残基が多く含まれており、溝の中心部に位置する保存されたアルギニン残基によ

って、溝の内部の分子表面はプラスの電荷を帯びていた。この親水的な溝は細胞内側と細胞膜側に向かって開いており、疎水的な細胞膜の中に親水的な環境を作り出していることが示唆された。この親水的な溝が YidC の機能に重要であるかどうかを調べるために、枯草菌を用いた遺伝学的な手法により枯草菌 YidC の変異体解析を行った。その結果、溝の中心に位置するアルギニン残基をアラニン残基に変えた枯草菌 YidC 変異体では、基質タンパク質である MifM を細胞膜に組み込む活性は大きく低下した。さらに、このアルギニン残基を様々なアミノ酸残基に変異させたところ、その多くで活性が低下したが、アルギニン残基と同じくプラスの電荷を持つ、リシン残基に変えた変異体では、活性の低下はわずかであった。このことから、親水的な溝に存在するプラスの電荷が YidC の機能に重要であることが明らかとなった。さらに、YidC が基質タンパク質とどこで相互作用しているかを調べるため、部位特異的光クロスリンク実験を行った。その結果、BhYidC の親水的な溝の内側のアミノ酸残基に光架橋剤を導入した際に BhYidC と MifM との光架橋産物が検出され、BhYidC が MifM と親水的な溝を介して相互作用していることが明らかとなった。以上の結果から、YidC が親水的な溝によって疎水的な細胞膜内に親水的な環境を形成し、基質タンパク質の細胞外領域と細胞膜の内部で相互作用することで基質タンパク質を細胞膜内に引き込み、タンパク質の膜組み込みを達成するという、YidC の分子メカニズムを提唱した。

これまでの研究から、YidC と Sec タンパク質が複合体を形成することが、効率的なタンパク質の膜組み込みや膜透過に必要であることが知られている。YidC はファミリー間で保存された膜貫通領域をもつが、グラム陰性菌の YidC は膜貫通領域に加えて、Sec トランスコロンとの複合体形成に関与する細胞外ドメインをもつ。これまでに YidC の細胞外ドメインと Sec タンパク質の相互作用領域が複数同定されている。しかし、細胞外ドメインのみの結晶構造は報告されているが、グラム陰性菌 YidC の膜貫通ドメインを含んだ立体構造は報告されておらず、どのような複合体が形成されているかには不明な点が多く残されていた。そこで本研究の第二の目的として、グラム陰性菌である *Escherichia coli* 由来 YidC (EcYidC) の立体構造を X 線結晶構造解析により原子レベルで明らかにし、YidC と Sec タンパク質の複合体への構造的な示唆を得ることを目指した。

まず、これまでによく研究が進められている EcYidC を精製・結晶化し、3.2 Å 分解能で EcYidC の結晶構造を決定した。EcYidC の結晶構造に対し、これまでに報告された基質タンパク質との相互作用部位をマッピングしたところ、その相互作用部位は Sec トランスコロンに依存する、あるいは依存しない基質タンパク質のいずれにおいても、YidC の親水的な溝に集中していることがわかった。このことから、Sec トランスコロンと共役してシャペロンとして機能する際にも、単独で機能する際と同様に、親水的な溝が重要な役割をもつという考えが支持された。さらに、Sec トランスコロンとの相互作用部位をマッピングすることにより、YidC がシャペロンとしての機能する際に形成する Sec トランスコロン-YidC 複合体についての構造的な示唆が得られた。複合体中では、YidC の親水的な溝が、Sec トランスコロンがもつ、基質タンパク質を細胞膜へリリースするためのラテラルゲートに対して向かい合うように位置していると考えられた。これにより、YidC が組み込み途中の膜貫通ヘリックスを Sec トランスコロンから受け取り、一時的に相互作用することで、非特異的な相互作用による基質タンパク質の凝集を防ぎ、膜タンパク質の正しい折りたたみを促進していると考えられた。