

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

研究課題

「タンパク質の細胞内ダイナミズムの原理と制御装置」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成19年10月

研究代表者：伊藤 維昭

(大阪大学蛋白質研究所 招聘教授)

1 研究実施の概要

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構の実体解明を目的とする。モデル生物として、種々の情報の集積している大腸菌を用い、遺伝学、生化学、構造生物学の手法を統合して、関与する因子のダイナミックな振る舞いを解明する。膜透過モーター蛋白質 SecA や膜透過チャネル(トランスロコン)SecYEG の構造・機能と制御、膜プロテアーゼによる膜蛋白質品質分解やシグナル伝達制御、ジスルフィド結合導入装置の反応機構と構造解析などの解明を目的とする。構造解析(木村)グループは、当プロジェクトの精製タンパク質に関し、通常の或いは極低温電子顕微鏡を用いて観察(一分子観察)を行い、個々の或いは複合体の構造を解析する。また、変異タンパク質等も利用して基質複合体を作り、その構造を解析する。細胞におけるタンパク質の動的な振る舞いがいかに制御されているのかに関する総合的な知識を得ることを目的としたこのような研究により、以下に示すような具体的な成果を得ることができた。

1. SecA の構造と機能。高度好熱菌 SecA の新たな2量体結晶構造を決定し、SecA は複数の2量体構造を取り得るが、機能するためには2量体の大幅な解離が必要であることを示した。SecA に存在する長い α ラセンが ATPase 機能の機械的な動きへの転換を媒介する役割をもつとの膜透過駆動分子機構を提唱した。部位特異的 in vivo クロスリンク実験により、SecA が二つの異なる様式で SecYEG に結合することを示し、そのうちの一つにおいて膜透過に伴って SecA が SecY の C 末端領域へ近接すること示した。
2. SecY トランスロコンの構造と機能。SecY や SecE の変異解析により、トランスロコン機能の制御や膜貫通ドメインの役割に関して情報を多数得た。SecY-SecG, SecY-SecE の近接部位を決定した。複数の SecYE トランスロコンが機能単位となることを示唆する遺伝学的証拠および蛍光エネルギー転移実験の結果を得た。分泌蛋白質と膜タンパク質は異なる様式で SecY トランスロコンを利用していること、および DsbA は他の分泌蛋白質とは異なり膜タンパク質と同様の経路でトランスロコンに標的化されることを示した。細胞表層ストレス応答機構は細胞質膜蛋白質の異常をも感知することを示した。SecY は膜タンパク質の膜挿入以降の構造形成過程においても重要な役割を有することを示した。高度好熱菌の SecDF 蛋白質を結晶化し予備的な X 線回折データセットを取得した。
3. SecM の機能。SecM は翻訳途上でリボソームトンネルと相互作用し翻訳伸長アレストを起こすこと、この性質が SecA の翻訳とその制御に必須であることを示した。さらに SecM は SecA 生合成の場を膜・トランスロコンの近傍に局在化することにより SecA の機能獲得を助けるとの Cis-chaperone 説を提唱した。SecM の翻訳アレスト機構を解析し、リボソーム A サイトにおいてフリーの prolyl-tRNA が翻訳伸長アレストに寄与することを発見した。
4. 膜プロテアーゼの研究。FtsH が膜蛋白質の両端から分解を開始しうることを示し、その基質 dislocation を伴う分解を精製・再構成した人工膜において再現することに成功した。また、FtsH が HflKC と巨大な複合体として存在することを示した。大腸菌には HflKC とは逆の配向をもつ prohibitin 類似の膜蛋白質が存在することを発見した。HtpX を精製し、膜タンパク質の細胞質領域を切断することを明らかにした。RseP が RseA の2段階目の切断を触媒することによって σ E 経路表層ストレス応答に必須の役割を果たすことを発見した。また RseP が広い特異性を持って膜蛋白質を切断する潜在能力をもつことを示し、その抑制に関わる要素を明らかにした。GlpG を精製し、切断基質となるモデル膜タンパク質の膜貫通部位とペリプラズム領域の境界付近を切断することを見いだした。RseP および GlpG の活性部位近傍に Cys 残基を導入しそれらの膜不

透過性修飾試薬に対する反応性から、RsePの活性部位は膜内或いは膜表面付近でのタンパク質折り畳み構造の内部に存在すること、GlpGの活性部位はペリプラズムに連なる親水性部位にあることを示唆した。

5. ジスルフィド結合形成装置の構造と機能。DsbBの酸化還元電位がDsbAより低いにも関わらずDsbAを酸化できることを、キノンを含まない系での実験を組み立てることにより示した。DsbBのシステイン残基の一つCys44がキノンと電荷移動錯体、次いで付加生成物を過渡的に形成することによって、DsbB分子内にジスルフィド結合が創生されることを、実験と理論を統合して示した。さらにDsbB-DsbA複合体の結晶構造解析に成功し、DsbBにおけるジスルフィド創生の構造基盤を明らかにすると同時に、DsbBがシステイン再配置機構によって、DsbA酸化能力を獲得することを提唱した。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

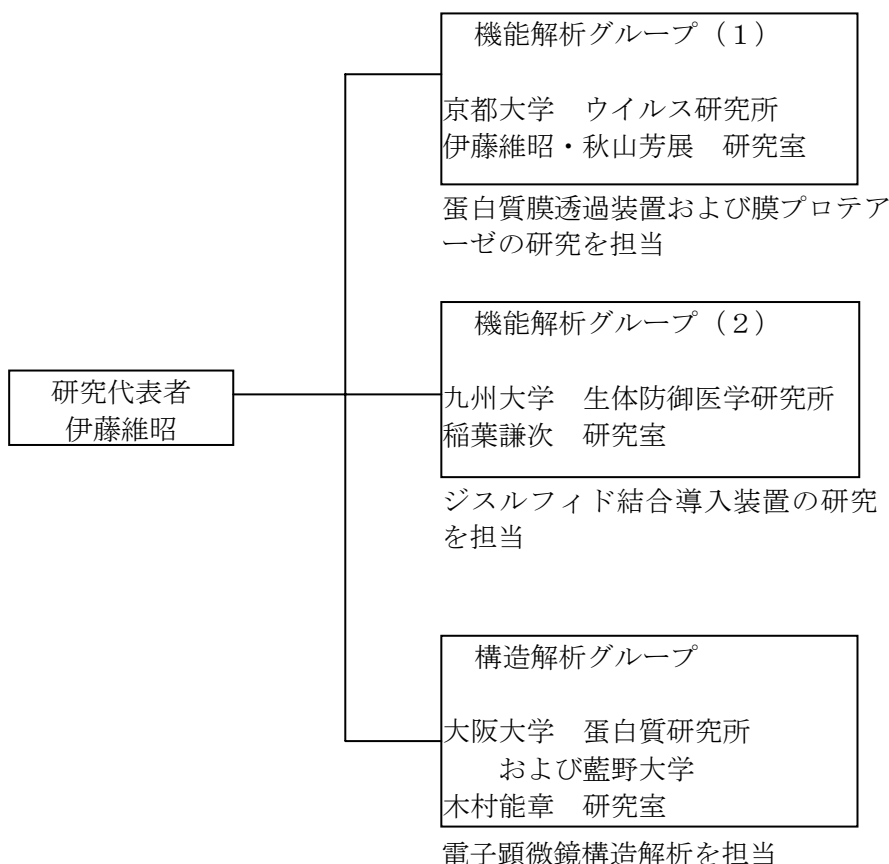
ゲノムに書き込まれた遺伝情報にはタンパク質のアミノ酸配列と言う一次元情報のみが含まれている。しかし、タンパク質は合成されてから、細胞内外の特定の場所への配置、立体構造の形成、他の細胞成分との複合体形成などのステップを経て初めて生物機能を発揮することができる。また、このような過程は遺伝子から細胞へという生命現象の基盤となり、細胞の成り立ちの根本を成すものであると言える。また、近年タンパク質の制御された分解や切断過程の生命活動における重要性が認識されるに至った。このようなタンパク質の細胞内での動的な振る舞いの原理を解き明かすことは、ポストゲノム時代において、ゲノム情報・プロテオーム情報を理解し有効に利用するために必須であることから、本研究を構想した。

タンパク質の細胞内ダイナミズムの中でも、細胞膜への組込みや膜を越えた輸送過程は、遺伝子から細胞へという生命の原理を支えるものであり、そのメカニズムの解明は急務である。このような過程においてはそれぞれのタンパク質のアミノ酸配列によって規定される特性および膜などの細胞構造体の特性に加えて、それぞれの過程を促進し司る特異的な細胞装置の働きが重要であり、それらの細胞における統合・制御された機能と、それを支える構造を解明する必要がある。これらの装置自体タンパク質を主体に構築されており、それら自体がダイナミックな動きを伴って働くことも特筆しておかなければならない。

本研究の目的は、上記のようなタンパク質の細胞におけるダイナミズムを総合的に理解するため、モデル生物大腸菌を用い、これまでになされた申請者等の独自の発見を基盤として、それらを発展させることである。申請者等は、大腸菌のSecYを発見し、その構造と機能、SecAとの相互作用に関して一貫した研究を行ってきた。また、FtsHプロテアーゼやジスルフィド結合導入に働くDsbシステムなど独自の系を用いて膜におけるタンパク質の動態を研究してきた。これまでの蓄積を生かして、遺伝学、生化学、構造生物学の手法を組み合わせた研究を行った。特に、遺伝学・生化学的研究の成果・知識を構造生物学的研究と融合させることによって、各因子の構造をダイナミズムの各局面に対応して解き明かすことを目指し、成果を挙げる事ができた。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構の実体解明を目指し、膜透過モーター蛋白質SecAや膜透過チャネルSecYEGの構造と機能機能の研究、新たに見出したSecM (Secretion Monitor)の翻訳制御の解析を通じた、タンパク質翻訳制御と合成途上ポリペプチドによるリボソーム機能へのフィードバック機構とその意義、翻訳制御機構の研究、タンパク質にジスルフィド結合を導入する細胞機構の解明、さらに、膜プロテアーゼによる膜蛋白質品質分解やシグナル伝達制御の研究を行った。本研究が対象とするタンパク質は疎水性の強い膜タンパク質が多く、結晶構造解析は極めて困難であったが、研究期間内に、SecA、DsbBなどの構造決定を終了することができ、SecYE、SecDFなどの構造に関しても著しい進展をみせた。構造に基づくメカニズムの解明が可能となったことは特筆

すべき成果と言える。本研究では、機能解析グループと構造解析グループを設けて生化学・細胞生物学のアプローチと構造生物学のアプローチを分担することとしたが、実際には両グループの密な連絡により総合的に取り組んできた。また最終年にかけて人事異動のためチームメンバーの勤務部署の変更があったが、基本的にはチーム構成を維持して研究を継続した。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 蛋白質膜透過装置および膜プロテアーゼの研究 (京都大学 機能解析グループ)

(1)研究実施内容及び成果

研究のねらい

タンパク質の膜透過、膜組込みと言う細胞構築における基本的過程を司る細胞システムの解明を行う。そのため、膜内在性タンパク質 SecYEG からなるトランスロコンがどのようなタンパク質相互作用によって構築されるのか、膜透過駆動 ATPase SecA とどのような動的相互作用をしてそのダイナミックな動きを可能にしているのかの2つの問題を中心に、細胞生物学、生化学、構造生物学の観点から総合的に解明する。併せて逆方向のタンパク質膜輸送と膜タンパク質の分解制御、膜透過後のタンパク質構造形成補助機構を解明する。申請者等は、大腸菌の SecY を発見し、その構造と機能、SecA との相互作用に関して一貫

した研究を行ってきた。また、FtsH プロテアーゼやジスルフィド結合導入に働く Dsb システムなど独自の系を用いて膜におけるタンパク質の動態を研究してきた。このような蓄積を生かして、遺伝学、生化学、構造生物学の手法を組み合わせた研究により、タンパク質の細胞内ダイナミズムの原理と制御装置という、ポストゲノム研究における重要な知識の確立を目指すものである。

研究実施方法

当研究室独自の実験系を用いて、タンパク質膜透過装置などのダイナミックな動きとその機能的な意義の解明を行う。遺伝学、生化学、構造生物学の手法を組み合わせた研究により、タンパク質の細胞内ダイナミズムの原理と制御装置という、ポストゲノムの研究に必須の知識を提供する。このため以下のテーマを設定しつつ総合的に研究を進める。

(1) SecYEG 複合体の構造機能および SecA による膜透過駆動機構の解明

膜透過駆動 ATPase である SecA に関して、その立体構造に基づいた、詳細な変位解析と SecYE との相互作用の研究を継続する。高度好熱菌 SecYE および SecDF の構造決定を進めると同時に SecYE-SecA 複合体の結晶化と構造解析にも取り組む。膜タンパク質組み込みにおける SecY の役割について研究する。

(2) 翻訳初期におけるタンパク質のダイナミズムと SecA の発現制御に関する研究

SecM のアレスト配列による翻訳伸長阻害機構、SecM が SecA の存在状態に及ぼす効果を明らかにする。

(3) FtsH による異常膜タンパク質の逆輸送と分解除去機構の解明

FtsH が細胞内において形成する FtsH-HflKC 複合体 (FtsH ホロ酵素) の構造解析を進める。FtsH と協調して働く細胞因子を同定し、その機能を解析する。

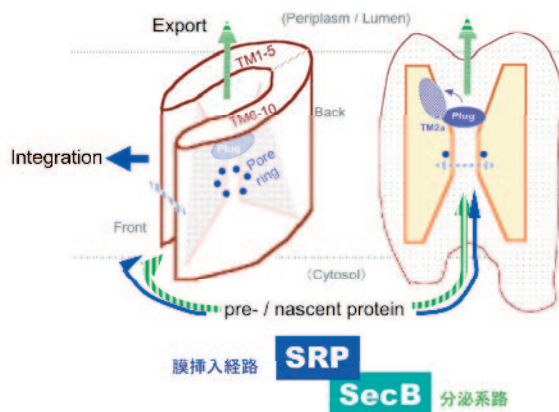
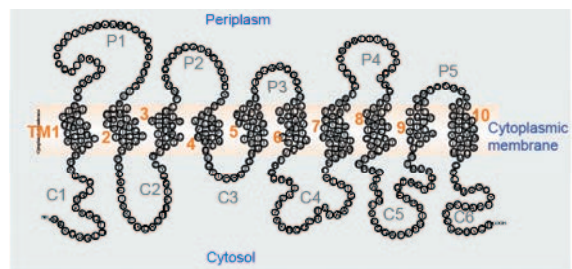
(4) 膜におけるタンパク質分解系の細胞機能制御における役割

RseP による RseA の切断調節機構における各ドメインの役割を解析し、また、RseP の膜タンパク質切断特異性と制御機構に関して詳しく調べる。また、RIP に関わると思われる新たな膜プロテアーゼ GlpG (Rhomboid ファミリーの一員) についても解析を行う。

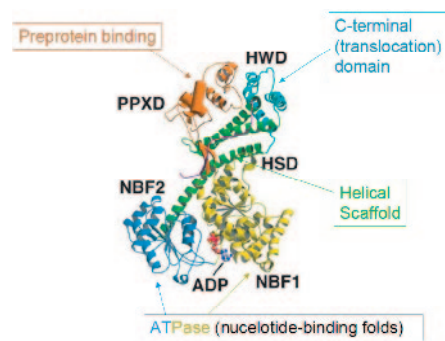
研究結果

1. タンパク質膜透過・組み込み装置の研究

トランスロコンの中心的なサブユニットである SecY は 10 個の膜貫通領域 (TM1-TM10) で膜に組み込まれている。なお、SecY は進化的に保存されており、真核細胞では小胞体膜に存在する Sec61 α がトランスロコンの中心成分である。我々は以前に、6 個の細胞質ドメイン (C1-C6) のうち、C5 領域が SecA ATPase の活性化に重要であることや、C6 領域が SecA の「膜挿入」による膜透過に重要であることなどを見いだしている。2004 年にトランスロコンの結晶構造の唯一の報告がなされ、膜透過機構の理解が大きく進んだ。ただし、これは SecA を持たない Archaea のものであり、SecA 駆動型トランスロコンの構造解明が待たれている。結晶構造によれば、SecY はその N 末端側半分、C 末端側半分が二枚貝のような疑似対象を成して縦向けに膜に組み込まれている。この疑似対象



構造の中央に砂時計型の中央部が狭まったポリペプチド膜透過チャネルが存在する。チャネルは非使用時には短い α らせんにより蓋をされている（垂直方向のゲート）。二枚貝の口側には水平方向のゲートがあり、膜タンパク質が脂質層に組み込まれるときにここを通過してトランスロコンから脱出すると考えられている。SecA の結晶構造も知られている。二つの ATPase fold からなる ATPase 部分、基質結合ドメイン、C 末端ドメインなどからなり、長い α らせんが骨格のようにこれらを買っている。



① SecYEG 複合体の分子構築と機能

蛋白質膜透過チャネル（トランスロコン）の中心的成分である SecEYG 複合体における、SecY-SecE, SecY-SecG 各結合部位を部位特異的クロスリンク実験により残基レベルで同定した。その結果大腸菌の SecYEG 複合体において、SecE は、SecY の後半部（C 末端側）の C4, C5 ドメインと近接していることがわかった。これらの SecY ドメインは SecA との相互作用部位でもあることは興味深い事実であり、SecYEG に対する SecA の高親和性結合部位の形成に SecE が必要とされるとの以前の報告とも関連するものと思われる。一方、SecG は SecY の前半部（N 末端側）の細胞質領域、膜貫通領域と近接していた。SecG は SecA の反応サイクルを促進する役割があると言われている。この時 SecG は膜組込みの方向を逆転するとも言われている。SecG 結合部位に近い SecY の膜貫通領域 TM3 と TM4 が SecY の機能に重要であることも示した。また、SecY 機能を損ねる C5 領域の変異体を用いた解析により、プロトン駆動力が膜透過の初期過程を促進することを見出した。SecYEG のポリペプチド透過チャネルをよりオープン状態に遷移させる変異を SecY および SecE の変異として同定し、トランスロコンチャネルの制御に関する情報を得た。また、SecE の変異で優性欠損を示すものを分離し、その解析から SecYEG 複合体は 2 ユニット以上が一つの機能単位となることを示唆した。一方、高度好熱菌の SecYE 複合体を用いて、SecY 複合体は膜に組み込まれると、2 ユニット以上が会合することを蛍光エネルギー転移実験によって示し、複数の SecY 複合体が集合して機能を発揮することを示唆した。

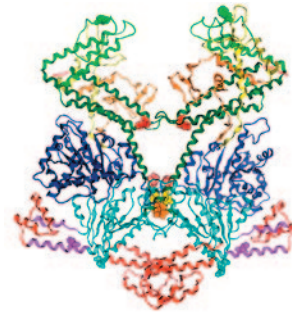
② 高度好熱菌 SecYE-Fab 複合体の結晶構造解析。

高度好熱菌 Sec 膜タンパク質複合体の立体構造を決定するため、東工大・濡木研究室、アラバマ大・Vassilyev 研究室との共同研究を進めた。高度好熱菌 SecYE (TSecYE) に対するモノクローナル抗体を作製し、Fab 断片を調製した。TSecYE-Fab 複合体を用いて、蒸気拡散法により良質の結晶を得た。放射光(Spring8 BL41)を用いて 3.2 Å 分解能の X 線回折パターンを得、さらに Se-Met 型 TSecYE-Fab 結晶の回折データを用いた多波長異常分散解析によって初期位相を決定した。その結果、SecYE-Fab 複合体の結晶構造を、3.14 Å 分解能で決定することができた。SecA 依存型トランスロコンの立体構造としては、世界で初めての成果である。全体構造は、膜透過チャネルの立体構造として唯一報告がなされている、メタン生成 Archaea 由来のトランスロコンの構造と類似しているものの、SecA 結合部位と考えられる SecY 細胞質突出領域への Fab 断片の結合に伴い、膜貫通領域の一部が大きく移動し、チャネルの細胞質側が部分的により開いた構造となっている。実際に TSecYE が膜に組み込まれた生理的な状態で、この新規なオープンコンフォーメーション状態をとっていることを、ジスルフィド結合形成を指標にした分子内架橋実験により検証した。



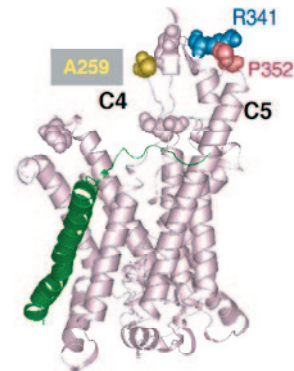
③ 膜透過駆動因子 SecA の構造解析

理研(現アラバマ大)の Dmitry Vassylyev 研究室との共同研究により、高度好熱菌 SecA の X 線結晶構造を決定した。その結果、SecA が平行型2量体構造を取り得ることが明らかとなった。従来は SecA の逆平行2量体構造が知られており、これが機能的構造であると言われていた。我々の発見と並行して他の研究室から、SecA のさらに異なる2量体構造がさらに2種類発表され、現在では5種類の2量体構造が報告されるに至った。特筆すべきことは、これらは全て異なるインターフェイスで会合していることである。我々は SecA が溶液中で平行型を含む複数の2量体構造を取り得ること、それらが単量体を含む平衡状態にあることを明らかにした。一方、2量体構造を共有結合で固定化すると普く活性の喪失に至ることが判明し、SecA が機能するためには2量体の大幅な解離あるいは単量体化が必須であると考えられる。

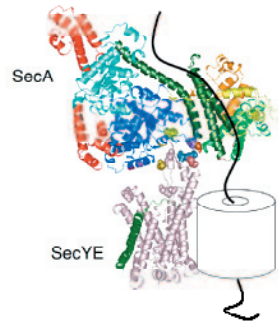


④ SecA-SecY 相互作用と SecA による膜透過駆動の分子機構の解析

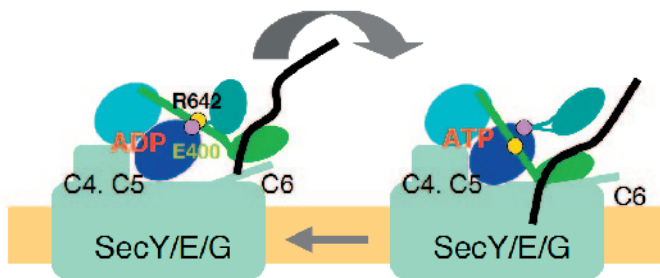
生きた細胞内で働いている状態のタンパク質間の相互作用を解析するユニークな方法として、光反応性のアミノ酸アナログ (pBPA) を目的タンパク質の特定の部位に取り込ませ、紫外線を照射することにより、導入した pBPA とそれに近接するタンパク質との間を架橋させる方法がある。これは細胞内における残基レベルのタンパク質相互作用とその変化を追跡する方法として強力な武器となる。この方法を用いて、トランスロコンの中心的な成分である SecY のアミノ酸残基の内、駆動因子 SecA と近接する複数の部位を同定した。SecY の C4, C5 領域は SecA と恒常的に近接していること、C6 は SecA が膜透過駆動状態で近接する SecY の領域であることが明らかになった。前者は、SecY 複合体の立体構造中において特徴的な細胞質突出領域の先端部位に集中的に局在しており、この手法の高い空間分解能と信頼性を示している。



さらに、TSecA, TSecYE の立体構造情報と、in vivo 光架橋実験より得られた SecY 分子内の SecA 近接部位の情報に基づき、SecA-SecY 分子間のジスルフィド結合による架橋実験を進めた。幾つかの部位特異的な組み合わせにおいて SecY-SecA 架橋複合体形成を確認した。これらの架橋複合体は、タンパク質膜透過装置の機能構造に近い SecA-SecYE 複合体の立体構造解析の有力な材料として期待できる。複合体形成時に導入した Cys 残基の立体構造上の位置を基に、膜透過チャネルに対する SecA の結合様式を考察し、以下に述べる遺伝学的解析と相俟って SecA によるタンパク質膜透過駆動のモデル(ATPase エンジン- α らせんトランスミッション説)を提唱するに至った。



SecA 中央を突き抜ける長い α らせんに注目した変異体の作成と解析により、この α らせん上の残基 Arg642 あるいはそれとイオン結合を形成する ATPase ドメインに存在する残基 Glu400 の変異体では分泌基質と SecYEG による ATPase の活性化は正常に起

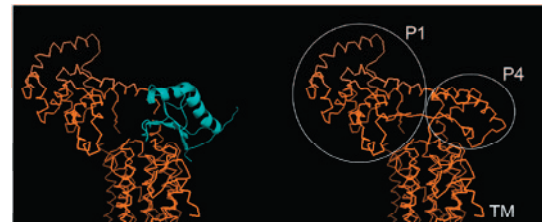


A working hypothesis for SecA-mediated protein translocation

こるものの、膜透過駆動能力が失われることを発見した。SecA ATPase は実際の膜透過駆動を伴わなくても、それ自体がトランスロコンと基質タンパク質の結合に呼応して活性化を受ける。しかしそれを膜透過駆動に結びつけるためには、 α らせんの正常な機能が必要であることが考えられる。このような知見から、SecA の ATPase 部分自体がパワー制御機能を有するエンジンユニットのように働き、その出力が長い α らせんによって膜透過駆動部分に伝わることにより、ATP のエネルギーが基質ポリペプチドの機械的な動きに転換されるとの膜透過駆動分子機構を提唱した。分子間架橋により同定した C4, C5 領域と SecA の相互作用は ATPase 活性化の役割をもち、上記のようにして伝わる構造変化の結果、SecA の膜透過駆動部分 (C 末端領域と考えられる) が SecY の C6 部位等に近接するものと考えている。上で述べた in vivo 光架橋の実験手法を用いて、SecA の長い α らせんの構造変化を追求した結果、ATP の結合、加水分解、離脱に呼応して α らせん上の残基 642 と ATPase ドメインとの分子内架橋効率が変化することを見いだした。 α らせんと ATPase ドメインとの相対的位置関係の変化が実証され、SecA の ATPase サイクルと共役した α らせんの動きによって基質タンパク質の動きが駆動されるとのモデルがさらに支持された。

⑤高度好熱菌 SecDF の高次構造解析

高度好熱菌 SecDF (TSecDF)の立体構造解析を X 線結晶構造解析により進めてきたが、分解能の低さにより、ペリプラズム領域の2つのドメイン (P1, P4)のモデリングは不可能であった(右図)。そこで、東工大・濡木研究室、三菱生命研・河野研究室との共同研究により、P1 ドメイン、P4 ドメインの立体構造を、各々、X 線結晶解析、NMR 解析により進めている。どちらも順調に解析が進んでおり、SecDF の立体構造の全容の解明まで後一步の所まで迫っている。



⑥トランスロコンの使い分けと膜タンパク質の形成に於ける役割

分泌蛋白質 DsbA は他の分泌蛋白質と異なり、シグナル認識粒子 (SRP) によってトランスロコンにターゲットされること、SecY の機能依存性も他の分泌蛋白質とは異なり、SecA 活性化能を欠損させる変異の影響を受けず、膜タンパク質の組込み・構造形成を損なう変異(下記参照)によって影響されることを発見した。このことおよび以下に述べる結果から、SecY トランスロコンは基質のターゲティング様式に応じて異なる経路を提供していることが考えられる。

種々の機能欠損型 SecY 変異について、蛋白質分泌(ペリプラズムへの移行)に対する効果とモデル膜タンパク質の膜への挿入に対する効果を比較したところ、多くの変異体において両者には相関が見られないことがわかった。すなわち分泌か、組込みかいずれか一方のみを損なう変異が多数存在した。また、後者の変異の場合、第一義的な欠損が膜(トランスロコン)への挿入以降の膜タンパク質形成のステップにあっても、トランスロコン経路の目詰まり現象のため、膜挿入に失敗した分子が観察されてしまうとの問題点を指摘した。膜に挿入した後のステップにおける欠損を検出できる実験系を模索した結果、異常膜タンパク質の膜に於ける蓄積が、いわゆる表層ストレス応答を引き起こすとの

Membrane protein folding-defective secY mutants				
Defect	Export	Integration	"Membrane stress"	LacY folding
SecY depletion	—	—	—	
missense (I)	—	+	—	+
missense (II)	+	—	—	
missense (III)	+	Abnormal / —	+	—
missense (IV)	—	Abnormal / —	+	—
SRP	(+)	—	—	
YidC	+	abnormal	+	—
SecDF	—	Abnormal / —	+	

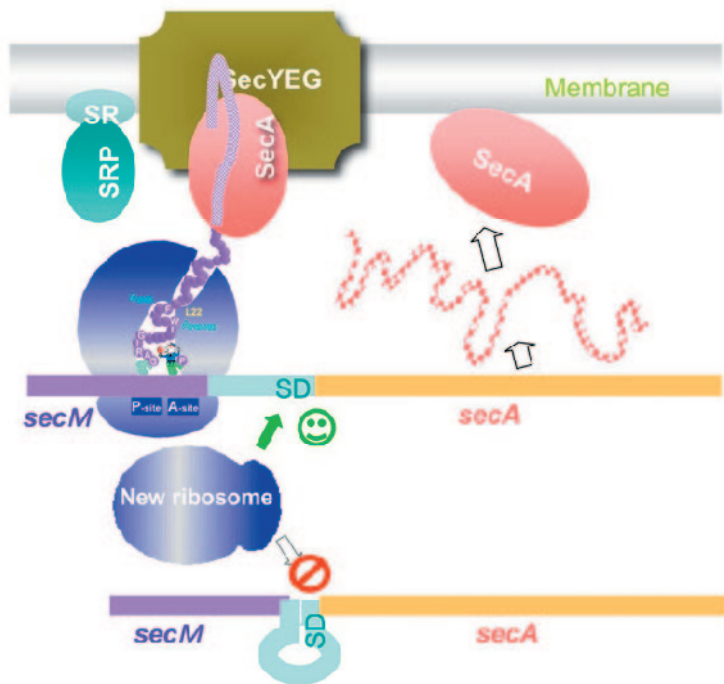
我々の発見を利用できることを突き止めた。実際、膜タンパク質の膜組込みに必要なタンパク質YidCの機能欠損によって、ストレス応答が誘導された。SecYのある種の変異によっても細胞表層ストレス応答が誘導されることを見だし、これらのSecY変異により膜タンパク質LacYの正しい構造形成が損なわれることを米国のKaback研究室との共同研究により明らかとした。すなわち、膜タンパク質LacYのin vitro翻訳・膜組込み反応において、上記のストレス応答を誘起する変異型SecYはLacYの膜への挿入自体は許すが、立体構造を認識するモノクローン抗体に対する反応性の獲得を許さない。SecYは膜タンパク質の膜への挿入ばかりではなくそれ以降の構造形成過程においても機能することがわかった。膜タンパク質を正しくフォールディングさせることに必要であるトランスロコン機能には、膜組込みの方向性決定やYidCへの正しい受け渡しなどの可能性が考えられる。

2. SecMによるSecAの機能発現制御機構

SecAは多様な構造と細胞内局在性をとる「融通無碍な」タンパク質である。secMはsecAの上流に位置してsecAとオペロンを形成するORFで、分泌タンパク質をコードする。一方、SecAの発現は細胞のタンパク質分泌能が低下したとき翻訳レベルで上昇し、この調節にはsecM-secA mRNAの遺伝子間に形成されるステム・ループ2次構造が関わる。我々は、SecMが特異な性質をもつことを発見した。すなわち、SecMの翻訳はストップコドンの少し上流においてpeptidyl-tRNAの状態では伸長を一旦停止(アレスト)する性質を持っている。伸長アレストは通常一過性であるが、sec欠損変異株中や、SecAの阻害剤存在下、あるいはSecM自体がシグナル配列を欠く場合などには長時間持続する。すなわち、SecMの合成途上鎖は自身が膜透過のプロセスに従事しない限り翻訳を完結できない。また、翻訳を完結してペリプラズムに分泌されても、直ちに分解除去される。

我々は、SecMのアレストを起こす配列F¹⁵⁰XXXXWXXXXGIRAGP166を同定した。また、翻訳アレストを起こさなくする変異が、リボソーム大サブユニットのポリペプチド産物の脱出経路となるトンネルの狭窄部位に位置する23S RNAおよびリボソームタンパク質L22の特定の残基に集中して得られることから、アレスト配列はリボソームトンネルと相互作用する結果、伸長アレストを引き起こすことを見いだした。リボソーム脱出トンネルは合成されたポリペプチドと相互作用しないような設計になっているとの考えがあるが、必ずしも当てはまらないことがわかった。また、精製した因子からなるin vitro翻訳系(PURE SYSTEM)を用いて伸長アレストを再現し、アレストを起こした

peptidyl-tRNAの解析と、停止したリボソームの位置をmRNA上に位置づける実験から、伸長アレスト現象によってSecM₁₋₁₆₅-tRNA^{Gly}が生成され、リボソームのP-サイトに存在すること、アレストに必要なPro166残基はポリペプチド鎖に取り込まれることなくprolyl-tRNAとしてA-サイトを占領していることを解明した。このProlyl-tRNAは伸長アレストのeffectorとして機能するものと考えられ、secMのPro166コドンはフリーの



aminoacyl-tRNA をAサイトにリクルートする段階で生物機能を発揮する、特異な遺伝情報であると言える。

我々は、翻訳アレストを起こす SecM の生理的意義についても研究し、SecM は正常細胞における SecA 翻訳の基底レベルの維持に必要とされること、また低温など分泌欠損に応じた *secA* 発現量の制御(上昇)にも必須の役割を担っていることを明らかにした。立ち停まったリボソームが *secM-secA* 間に形成される mRNA の二次構造を破壊して *secA* の翻訳開始配列を露出させる機構が考えられる。一方、正常な *secM* 遺伝子が *secA* 遺伝子の上流に存在する条件下で合成される SecA は、SecM 非存在下や SecM のシグナル配列が欠損している状態で合成される SecA に比べて膜透過駆動活性が有意に高いことがわかった。SecM の翻訳途上に於ける膜透過装置との相互作用によって、*secM-secA* mRNA は膜の近傍に局在化されるだろう。そして、「融通無碍な」性質をもつ新生 SecA ポリペプチドは膜の近傍で合成された場合に機能的な構造を取りやすいものと考えられる。我々は、SecM が SecA の構造形成を助ける機能を cis-chaperone 機能と命名した。SecM は、SecA の翻訳量を制御するばかりではなく、その翻訳の場を機能的な SecA 構造の獲得が容易な膜近傍に限定することによって SecA の機能を正に制御するユニークな制御因子である。最近では、SecM のアレスト配列は in vivo, in vitro で翻訳途上状態を作り出す道具として活用されるようになっている。

3. 膜タンパク質の品質管理・分解制御機構

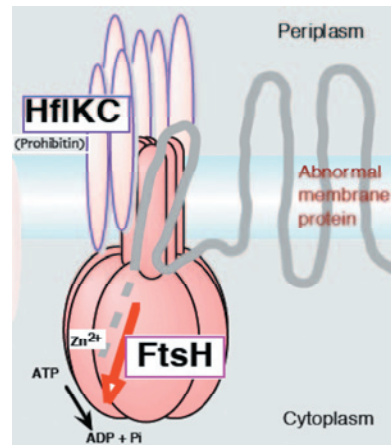
蛋白質の分解は細胞機能の調節や、恒常性の維持、細胞内コンパートメントの品質管理などに重要である。我々は、膜蛋白質に注目してその分解がどのような装置によって、どのように行われるのかを研究してきた。大腸菌の FtsH は、異常膜タンパク質を分解する quality control に関与する ATP 依存プロテアーゼである。我々は、SecY, プロトン ATPase F_0 subunit *a* と言った膜タンパク質複合体構成因子は単独サブユニット状態で安定に存在できず、直ちに分解除去されるが、FtsH がこのような膜タンパク質分解を司ることを見出してきた。FtsH はN末端側の2つの膜貫通部位で膜に結合しているが、その活性ドメイン(AAA ATPase, Zn^{2+} protease の2種類の酵素活性を持つ)は細胞質に配向している。AAA ATPase は一般にリング状の6量体構造をとっているが、FtsH もホモオリゴマーを形成している。我々は、FtsH 自体が基質の細胞質領域のみではなく膜貫通部位やペリプラズム領域と言ったトポロジー上活性中心から隔離された部位をも分解できることを示した。このことから、基質を膜から細胞質側に引きずり出しつつ processive に全域にわたる分解を速やかに行うとの dislocation model を提唱した。FtsH は HflKC というペリプラズム側に配向した膜蛋白質複合体とさらに複合体を形成している。なお、真核細胞のミトコンドリアには FtsH に類似した m-AAA プロテアーゼ、HflKC に相当する prohibitin が存在する。HflKC/prohibitin の役割は蛋白分解活性に対する抑制的制御にあると考えられるが詳細は不明である。

一方、我々は膜内部あるいは膜の近傍で基質膜タンパク質に一カ所切断を起こす現象、regulated intramembrane proteolysis (RIP)にも注目して膜内切断型のプロテアーゼの研究を進めてきた。RIP による膜蛋白基質切断により、切断された断片が重要な細胞制御機能を発揮する現象は生物界に普く存在する重要な細胞機能制御機構となっている。RIP に働くプロテアーゼは I-CLiP (intramembrane-cleaving protease) と呼ばれ、プレセニリン(γ -secretase)、SPP、S2P、Rhomboïd の4種ファミリーに分類される。例えば、プレセニリンは Notch シグナルングに関与する Notch1 を切断し、S2P はステロール合成経路に関与する SREBP を切断する。膜プロテアーゼの問題点として、水分子を要求する加水分解反応である proteolysis が膜の脂質環境でいかに起こるのかという疑問がある。大腸菌には S2P プロテアーゼファミリーに属する RseP と Rhomboïd ファミリーに属する GlpG という2種類の RIP プロテアーゼが存在する。我々は、これら二つのプロテアーゼの構造と機能について研究を進めている。

① FtsH の構造、機能、および制御に関する研究

FtsH は、細胞質膜の ATP 依存性プロテアーゼであり、大腸菌の ATP 依存性プロテアーゼ群の中でも膜蛋白質の分解に携わる点に特徴を持つ。われわれは、FtsH が、膜タンパク質を膜から細胞質側へと引きずり出し(dislocation)ながら、連続的(processive)に、基質分子全体にわたって分解することを提唱してきた。FtsH は一旦分解を開始すると基質全域を素

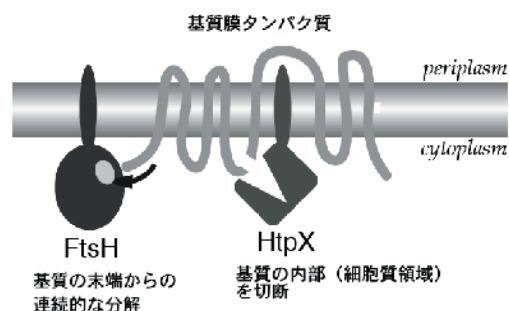
早く分解していくため、分解開始機構は極めて重要である。FtsHが膜タンパク質の分解をどのように開始するのかを詳しく解析した結果、分解は細胞質に露出したある程度以上の長さの末端から起こること、N末端、C末端のいずれもが分解開始部位となり得ることを明らかにした。従来 FtsH の生化学的解析は界面活性剤で可溶化した酵素・基質を用いて行われてきたため、dislocation 過程がバイパスされていた。我々は、新たに反転膜小胞や精製 FtsH と基質膜タンパク質を組み込んだ再構成リポソームを用いるアッセイ系を開発して、*in vitro* で膜に組み込まれた蛋白質の分解を再現することに成功した。FtsHは他の因子の助けを借りず、膜タンパク質を dislocation しつつ ATP に依存して分解できることが示された。また、FtsH とその制御因子 HflKC が、細胞内で極めて巨大な複合体を形成している事を示し、この複合体を、FtsH holo-enzyme と命名した。



② 膜タンパク質の品質管理に関わる第2のプロテアーゼ HtpX

膜結合型 ATP 依存性プロテアーゼ FtsH が膜タンパク質の分解による品質管理に重要な役割を果たしていることに加え、我々は膜タンパク質 HtpX も、この過程に働くことを見いだした。FtsH の欠損により Cpx 細胞表層ストレス応答が誘起される。これは異常膜タンパク質の細胞質膜への蓄積によるものと考えている。HtpX は Cpx 経路による発現制御と細胞質ストレス応答系である σ^{32} による制御の両方を受けていることがわかった。*ftsH*

と *htpX* が重複した、あるいは相補的な機能を持つことが、同時欠損変異の示す合成的な増殖欠損から示唆された。すなわち、HtpX も膜タンパク質の分解による品質管理に関与する。HtpX は FtsH と同様のトポロジーで膜に組み込まれており、細胞質ドメインには Zn^{2+} メタロプロテアーゼの活性部位モチーフがある。我々は HtpX を

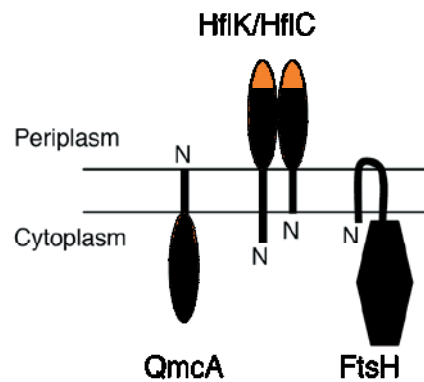


精製し、実際にモデルペプチドや膜タンパク質を切断する Zn^{2+} メタロプロテアーゼ活性を持つこと明らかにした。また、細胞内でも HtpX が膜タンパク質 SecY を FtsH とは異なる様式で切断しうることを見出した。HtpX は FtsH とともに膜タンパク質の分解による品質管理に寄与するが、FtsH とは異なり、ATP を使うことなく、エンドペプチダーゼとして機能する。基質に FtsH に認識される切断末端を生じさせ FtsH による切断開始部位を増やす役割が想定できる。

③ 大腸菌における膜タンパク質の品質管理プロテアーゼに関連する複数のプロヒビチンドメインタンパク質の存在

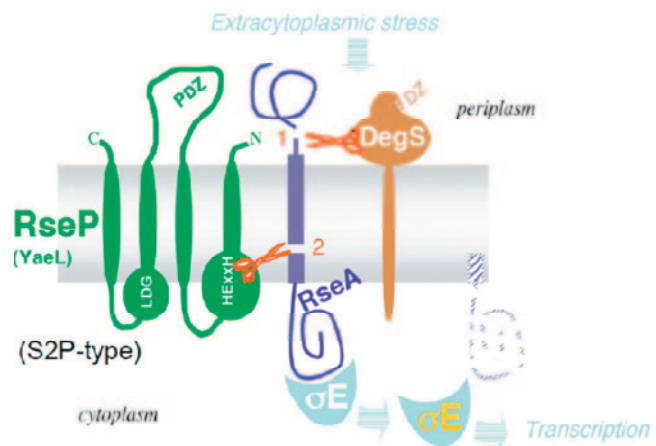
我々は、異常な膜タンパク質を分解・除去することによる膜タンパク質の「品質管理」に、大腸菌では二つの膜プロテアーゼ FtsH と HtpX が重要な役割を持っていることを示し、FtsH と HtpX の二重欠失株は条件致死となることを明らかにした。二重欠失の生育欠損に対するマルチコピーサプレッサーとして、FtsH の制御因子として従来知られていた *hflKC* とともに、新規遺伝子 *qmcA* が機能し得ることを見いだした。HflKC も QmcA もプロヒビチンホモロジー (PHB) ドメインを持つ膜タンパク質であるが、興味深いことに、QmcA は HflKC とは逆にそのプロヒビチンドメインを含む大部分を細胞質側に配向していること、HflK/HflC はヘテロオリゴ

マーであるが、QmcA はホモオリゴマーを形成すること、HflKC と同様、QmcA も FtsH と相互作用しうることがわかった。真核生物ではミトコンドリア膜でプロヒビチンが膜タンパクに対するシャペロンとして機能するとの報告があるが、QmcA や HflKC も膜シャペロン機能を持つ可能性が考えられる。ミトコンドリアには内膜の両側に露出する2種類の AAA プロテアーゼ (FtsH ホモログ) が存在する。ペリプラズム側に ATP が存在せず、細胞質配向の AAA プロテアーゼ (FtsH) のみを持つ大腸菌が2種類のプロヒビチンホモログを膜の両側に持っていることは示唆に富む知見であり、膜タンパク質の品質管理システムは膜を両側からケアできるようにデザインされていると考えることができる。



④ RseP の σ^E 経路ストレス応答機構への関与と抗 σ 因子 RseA の切断活性の制御機構

大腸菌の膜プロテアーゼ RseP が RIP (regulated intramembrane proteolysis) 機能を持ち、細胞表面層ストレス応答調節に働くことを明らかにしてきた。細胞がストレスに曝されると、ペリプラズム側に活性部位を持つ内膜のプロテアーゼ DegS が活性化されて、アンチ σ^E 因子 RseA (一回膜貫通型タンパク質) が切断される。我々は、DegS に引き続いて、RseP が RseA の 2 段階目の切断を行うことを発見した。この連続した切断により



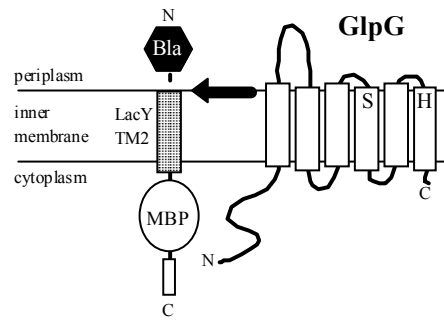
転写因子 σ^E が活性化され、表層ストレスに対処するための一群の遺伝子の発現が誘導される。RseP は完全長の RseA (DegS による切断を受けていない分子) は切断できない。我々は次いで、RseP の完全長 RseA に対する切断の抑制機構について調べた。その結果、ペリプラズム領域に位置する RseP の PDZ 様ドメインと RseA ペリプラズム領域のグルタミン酸に富んだ 2 ケ所の領域 (Q1/Q2) がこの抑制に関わることを見出した。さらに RseP による切断反応の解析に有利なモデル基質 (HA-MBP-RseA140) を作成して用いることにより、RseP が RseA の膜貫通 (TM) 配列内部を切断することを *in vivo* および *in vitro* (精製酵素使用) 生化学実験により示し、切断が Ala108 と Cys109 の間で起こることを突き止めた。これは S2P ファミリーとして始めてその TM 配列切断活性を直接示したものである。さらに、RseP は本来無関係なタンパク質の様々な TM 配列を切断する能力があること、その切断には TM 配列がヘリックス構造を不安定化する残基を持つことが重要であることを見出した。

RseP の機能制御機構を明らかにするため、RseP の機能制御 (抑制) に関わるペリプラズム領域の PDZ 様ドメインに関するシステムティックな変異解析や RseP アミノ酸配列の解析を行った。これまで、RseP はペリプラズム領域に一つの PDZ ドメインを持つと考えられていたが、解析の結果、二つの連続した RseP 様領域 (PDZ-N と PDZ-C) を持つこと、そのうちの N 末端側の PDZ-N ドメインが機能抑制に特に重要な役割を持つことを見出した。また、PDZ-N ドメインの結晶構造解析を行い、PDZ-N が他の PDZ ドメインとの相同性は低いもの実際にこれまでに知られていない新たな円順列型配列構成の PDZ フォールドをとり、強い効果を示す変異は PDZ ドメインの「リガンド結合領域」やその近傍にマップされることが分かり、RseP がその PDZ 様ドメインへの何らかのリガンドの結合を通じて機能制御を受けることが示唆された。

⑤ GlpG のプロテアーゼ活性の解析

大腸菌 GlpG は、Rhomboid ファミリーに属している。Rhomboid は膜結合型セリンプロテアーゼとされ、ゲノムが解読されたほぼ全ての生物に存在する。例えば、*Drosophila* の Rhomboid-1 は、翅形成に関わり、膜結合型 EGF 前駆体を切断することにより、活性型 EGF を遊離させる。Rhomboid プロテアーゼによる切断では、シグナル分子が細胞外もしくは小胞内腔へ放出される特徴がある。大腸菌 GlpG の機能は不明である。我々は、GlpG が細胞質膜に局在する 6 回膜貫通タンパク質であること、*glpG* は通常の条件下では、大腸菌の生育に必須ではないことを示した。真核生物の rhomboid は I 型 ($N_{out}-C_{in}$) 膜タンパク質の切断に関与することが知られている。我々は、I 型モデル膜タンパク質 Bla-LacYTM2-MBP-His₆ を構築し、これが *in vivo* で GlpG に依存して膜貫通領域付近で切断を受けることを見いだした。次いで、GlpG および上記のモデル膜タンパク質を精製し、GlpG が膜タンパク質切断活性を持つことを、*in vitro* 反応系で示した。モデル膜タンパク質基質のペリプラズムドメイン、細胞質ドメインおよび膜貫通領域を欠失あるいは他の配列と置換した誘導体を作製し、それらの GlpG による切断を調べた結果、GlpG は基質の膜貫通領域を認識して切断することが示唆された。

Rhomboid に保存されているプロテアーゼ活性に必要な 2 つのアミノ酸残基 (Ser201, His254) は、アミノ酸配列上は膜貫通領域内に存在すると考えられる。一方、基質タンパク質中の GlpG による切断部位を決定したところ、GlpG はペリプラズム・膜境界領域の親水性残基に富む領域を切断することが明らかとなった。このように、GlpG による膜タンパク質の切断部位と、基質認識部位および酵素の活性中心の局在性には見かけ上の topological mismatch が見られた。



⑥ RIP プロテアーゼの切断環境と立体構造との関係

RIP プロテアーゼの活性部位は膜内部に存在すると推測されている。我々は RseP の活性部位近傍に Cys 残基を系統的に導入しそれらの膜不透過性修飾試薬に対する反応性を調べることで、それらの位置がどのような環境に置かれているかを評価した。RseP の活性部位付近は完全に露出しているわけでも脂質層に埋もれているわけでもなく、脂質環境と水溶性環境の境界付近においてタンパク質主体の折り畳み構造の内部に存在することが明らかとなった。

同様のアプローチで GlpG の活性部位領域の環境を調べたところ、RseP とは異なり、GlpG の活性部位はペリプラズムに開いた親水性の環境に有ることが示唆された。最近、RIP プロテアーゼとして初めて GlpG の立体構造が解明され、活性部位はペリプラズムに開いた膜平面内に位置するタンパク質のキャビティー内部に存在することが明らかになった。我々の結果は上記の構造と良く一致しており、また、GlpG が結晶中のみならず生理的な条件、即ち膜に組み込まれた状態でも、活性部位がペリプラズムからアクセス可能な環境にあることを示している。一方、モデル基質の GlpG による切断部位についても導入した Cys 残基の修飾性を調べた結果、切断部位は膜外に露出していることが分かった。膜外部にある基質切断部位が、如何にして膜平面内部の GlpG 活性部位



GlpG の立体構造

に提示されるのかを調べるため、モデル基質の膜貫通部位の系統的な変異体を作製して、切断に必要な配列上の特徴を調べた。Rhomboid 基質の切断には切断部位周辺の“substrate motif”が重要であること示唆されていたが、それに加え、GlpG による効率のよい基質の切断には、基質の膜貫通配列が helix を不安定化し湾曲させるプロリンなどの残基を持つことが必要であることを見出し、基質膜貫通領域の折れ曲がり、切断部位の GlpG 活性部位への効率の良い提示に関わることを示唆した。我々のこのような結果は、RIP プロテアーゼはその種類によって、異なる戦略で膜という「障害物」を回避し、加水分解の条件を満たしつつ「膜内切断」を行っていることを示すものである。活性部位への基質の接近と提示がどのように行われるのか、は興味深い問題として今後に残されている。

(2)研究成果の今後期待される効果

タンパク質膜透過・組込み装置の研究について

我々は SecY の発見に源を発するこの研究を継続的に行ってきた。世界的に見ても深いバックグラウンドを持ち、遺伝学的アプローチ、生化学的アプローチを総合した研究は、最先端を行くものであると自負している。Wickner, Beckwith, Silhavy などの米国の有力研究室はこの主題から撤退しつつあるが、Driessen, Economou, Doung などの若手グループが精力的に研究を行っている。注目すべきことは、T. Rapoport (ハーバード大医学部) のように真核細胞を扱ってきた研究室が膜透過装置の研究においては大腸菌など原核細胞の系を開始し、力を入れていることである。これは、構造生物学と細胞生物学・生化学との融合を目指して、この重要課題に迫る戦略と思われる。我々は、本クレスト研究開始当初は、構造生物学的アプローチで出遅れている面は否めなかったが、高度好熱菌の実験系を立ち上げ、構造生物学者との緊密な共同研究を進めた結果、1) SecA の新規2量体構造の決定に成功、2) SecYE の立体構造解析を完了、3) 膜透過補助因子 SecDF の構造解析も完了間近まで到達するなど、次々と着実かつ世界的に見ても有数の成果を収めてきている。膜透過反応に関わる主要な因子の立体構造決定を、同一生物種(高度好熱菌)由来の因子に統一して、網羅的に成功しているのは我々だけである。構造解析の材料として高度好熱菌を選定した事が成功に繋がったと考えられる。因みに、膜タンパク質組み込み因子 YidC の構造解析もこの生物種を使って進行中である。このように、今回のクレスト研究によって、膜透過装置複合体の全体像を構造に基づいて理解し、その真の作用機構を解明する基盤を築くことができた。

各因子単独の構造情報だけでは、真の分子機構の解明にはほど遠いが、我々は、SecA, SecYE の立体構造情報に、生化学的解析結果に基づいた両者の近接部位情報を組み合わせることにより、SecAとSecYE間の特異的な複合体の形成にも既に成功している。これらの複合体は、タンパク質膜透過反応中間体 SecA-SecYE の立体構造解析に向けての材料として極めて有望であり、膜透過反応の全容解明に向け明確な足がかりが得られたと考えている。SecA, SecY 間のダイナミックな相互作用の解析を目指して、本研究では in vivo 光架橋実験を利用した。この手法は、生きた細胞内でのダイナミックな相互作用変化をモニターできると同時に、非常に高い空間分解能を有する。この手法を他の Sec 因子に適応することにより、膜透過装置複合体間の相互作用解明に役立つと期待できる。例えば、膜タンパク質組み込み因子 YidC と SecY 間の相互作用や、SecDF と SecY 間の相互作用を明らかにできると期待される。我々は大腸菌を用いた膨大な遺伝学的知識の集積があることに加えて、今回、構造生物学との総合へのステップを乗り越えることができた。「動的かつ高解像度の構造レベルの知識の取得」という、今後の生物学の方向性の一つを切り開いていくことになることが期待される。これから有用膜タンパク質の利用技術も開発されていくことと思われるが、膜タンパク質の正しい構造形成にトランスロコン機能が必要とされるとの我々の発見の応用面での意義も今後増していくものと考えている。

SecM の研究について

我々の SecM の研究は、様々な新しい概念をもたらした。リボソームはどんなアミノ酸配列のタンパク質でも翻訳を完結できるわけではないとの事実は、ゲノムと遺伝情報を考える上の重要問題である。リボソームトンネルと相互作用することができるアミノ酸配列の存在は、翻訳の分野に大きなインパクトを与えるものになった。SecM のアレスト配列は *in vivo*, *in vitro* で特定の翻訳途上状態を作り出す手段として、世界的に利用されるようになり、既に膜タンパク質挿入反応を行いつつあるリボソーム・トランスロコン複合体の構造解析 (Mitra et al., *Nature*, 2006) などに利用されている。SecM アレスト配列を利用したリボソームディスプレイ実験系も開発されている。アレスト配列の「最後の残基」Pro166 は、実際にはポリペプチド鎖に入る前に、リボソームの A サイトで Prolyl-tRNA としてその生物機能 (SecM 翻訳のアレストの実現) を発揮する。このような特異な遺伝情報が存在すること自体が驚きであり、SecM は「誕生する前に働くタンパク質」という概念をもたらした。さらに、我々の研究はこのような特異な性質をもつアレスト配列が SecA の翻訳制御に使われているばかりか、SecM は mRNA を膜に局在化させることによって新生 SecA の機能構造へのフォールディングを助けるシスシャペロン機能を持っていることを明らかにした。シスシャペロンも新たな概念である。あえて一般化を試みると、SecM には、細胞に於ける部位特異的な翻訳というこれからの生物学の重要問題の一つに連なる素過程が含まれていると考えることも不可能ではないだろうし、さらに想像をたくましくすれば神経細胞における長期増強といった高次現象がこのような原理を使っている可能性はないだろうか？一方、SecM 翻訳アレストの分子機構の研究はリボソームの動的な研究の一端として重要な役割を果たしていくことは確実と思われる。また、膜透過反応によるアレスト解除の機構も知的好奇心に訴える研究テーマである。

膜タンパク質の品質管理の研究に関して

我々は、これまでに主として *in vivo* の解析から、FtsH が膜タンパク質の生合成時とは逆方向の動きを誘起することで分解をおこなうという「dislocation model」を提唱してきた。FtsH 細胞質ドメインの構造が最近報告されたが、FtsH が、具体的にどのようにして膜タンパク質を「認識」し、「動かす」のか、ATP やプロトン駆動力などのエネルギーが如何に使われるのかといった作用機構の解明はいまだ不明であり、これからの重要な課題である。FtsH の機能解析は、*in vivo* の解析や可溶化状態での実験により行われてきたが、それらによっては、膜構造を基盤とした反応の詳細な解析は極めて困難である。我々の構築した *in vitro* 再構成系は逆輸送を伴う膜タンパク質分解機構の解明に必要な基礎的手段を提供するものであり、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がどのように実現するのかという、基本的問題を解明するよい系であると考えられる。膜タンパク質の品質管理に FtsH が重要な役割を果たしていることは疑いないが、それ以外にも様々な因子がこれに関わることが推測されている。しかしながら、その実態の多くは不明である。HtpX や QmcA/HflKC は、FtsH とともにそのホモログが真核生物ミトコンドリア等で同様の働きをしていることが推測される。また、表層 (細胞質外) のストレスに応答する仕組みが、膜内在性タンパク質の異常をも関知するという我々の発見は、膜ストレスという、ユニークな生物現象を研究する実験系を確立したことになる。これら膜プロテアーゼやその制御因子、膜シャペロン、さらに膜ストレス応答の研究は、生物に保存された膜タンパク質品質管理システム全体像の理解に寄与するものと期待される。

膜内切断型 RIP プロテアーゼの研究に関して

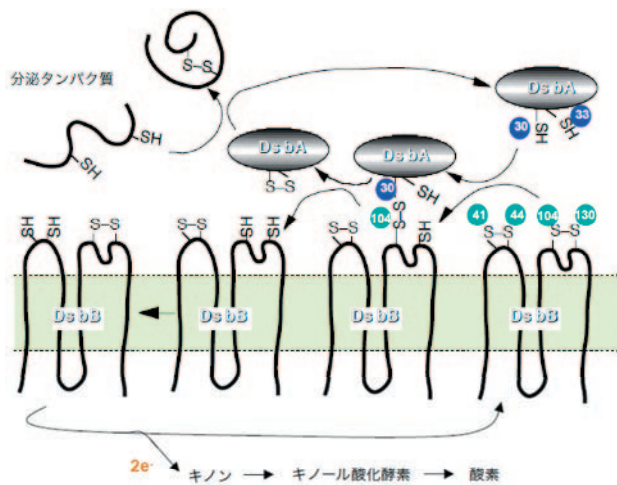
膜におけるタンパク質切断反応、Regulated Intramembrane Proteolysis (RIP) は、転写制御や神経病変など原核生物から高等真核生物まで多くの生体現象に関わっている。しかしながら、その基質切断や機能制御のメカニズムについては、「膜内切断が実際に脂質層で起こるのか」といった基本的な問題も含めて多くの点が不明である。我々の研究成果は、基質特異性や活性部位の環境などを、異なる RIP ファミリープロテアーゼについて比較しつつ分子レベルで明らかにするものであり、精密な研究において有利なモデル生物大腸菌

の利点を生かして様々なアプローチで研究を進めることで、上記の基本的問題点も解明に寄与することができるであろう。特に、RIP プロテアーゼとして初めて構造の明らかになった GlpG の研究は、RIP プロテアーゼの構造・機能相関の研究の先駆けであり RIP の分子機構理解の一つの基礎となるものである。RIP プロテアーゼについては、例えば、RseP ホモログが、コレラ菌や結核菌の病原性発現に必要であること、Rohomboid ホモログが、マラリア寄生虫の宿主細胞への進入や、細胞の抗アポトーシス機能に関わるなどの例が最近相次いで見出されており、基礎生物学的興味と共に医学的な関わりからも注目されている。今後、その作用機構の分子的理解は、医療など応用面における重要性も高まるものと考えられる。

3.2 ジスルフィド結合導入装置の研究(九州大学・京都大学 機能解析グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

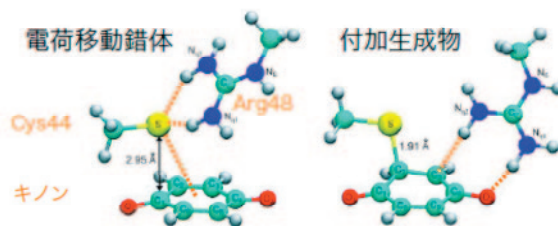
タンパク質にジスルフィド架橋を導入する仕組みについて、化学機構とその立体構造にもとづく作動原理を解明した。ジスルフィド結合形成が、細胞で効率よく起こるためには特異的な装置による助けが必要である。大腸菌の DsbA は、直接基質タンパク質のシステインペアを酸化する可溶性ペリプラズム酵素である。その活性部位 Cys30-Pro-His-Cys33 の酸化還元電位は、知られているシステイン酸化還元酵素のなかでもっとも高い(酸化力が強い)。本来還元されやすい DsbA は、細胞内で DsbB によって



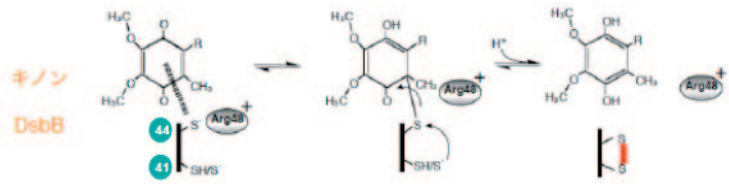
酸化型に保たれることで高い酸化能力を発揮できる。われわれは DsbB と DsbA の複合体の結晶構造を決定した。DsbB は4個の膜貫通 α ヘリックス(TM1-TM4)、TM1 と TM2 を結ぶ短いペリプラズムループ(P1)、TM2 と TM3 を結ぶペリプラズム領域(P2)などをもつ。機能に必須のシステインとして、P1 に Cys41 と Cys44、P2 に Cys104 と Cys130 をもち、P2 の末尾には膜に水平方向の短い α ヘリックスが存在する。

休止状態では、P1 と P2 のシステインペアはそれぞれジスルフィド結合を形成している。DsbB による還元型 DsbA の酸化反応は、DsbB の Cys104-Cys130 ジスルフィドが DsbA の Cys30 による求核攻撃を受けることにより開始される。その結果、(DsbB) Cys104 と(DsbA) Cys30 との間に分子間ジスルフィド結合が形成される。DsbB が酸化還元電位の差に逆らうかのように DsbA を酸化する機構が、問題の核心の一つである。もう一つの問題点として、DsbB 上でキノンの働きにより、ジスルフィド結合 Cys41-Cys44 が新たに創生される機構がある。

我々は以前に、呼吸鎖電子伝達系の機能が DsbB-DsbA システムが働くために必須であることを発見し、引き続いて Bardwell らは DsbB がユビキノンによって直接活性化されることを明らかにした。我々はキノンは DsbB の Cys41-Cys44 ペアを特異的に強く酸化すること、さらに、DsbB に結合したキノンが電子状態の遷移をおこし、ピンク色 ($\lambda_{\max}=500$ nm、ユビキノンの場合)あるいはすみれ色 ($\lambda_{\max}=550$ nm、メナキノンの場合)に発色することを発見した⁵⁾。この現象は、正常な DsbB による DsbA 酸化反応の進行中に一過的にみられるが、その原因は Cys44 が還元状態となりチオレートイオンに脱プロトン化されることにあることを突き止めた。理論化学シミュレーションの結果、



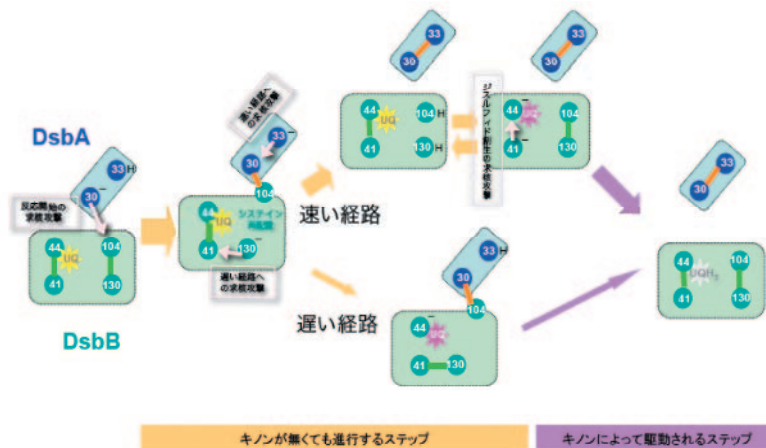
Cys44 チオレートとユビキノンが電荷移動錯体を形成し、それが DsbB の Arg48 の正電荷によって安定化されていることが示された。さらに Cys44 とユビキノンは共有結合による付加生成物を生じることも予測された。結晶構造解析の結果、実際に Cys41, Cys44, Arg48 の近傍にユビキノンのキノン環が位置していることがわかり、われわれ



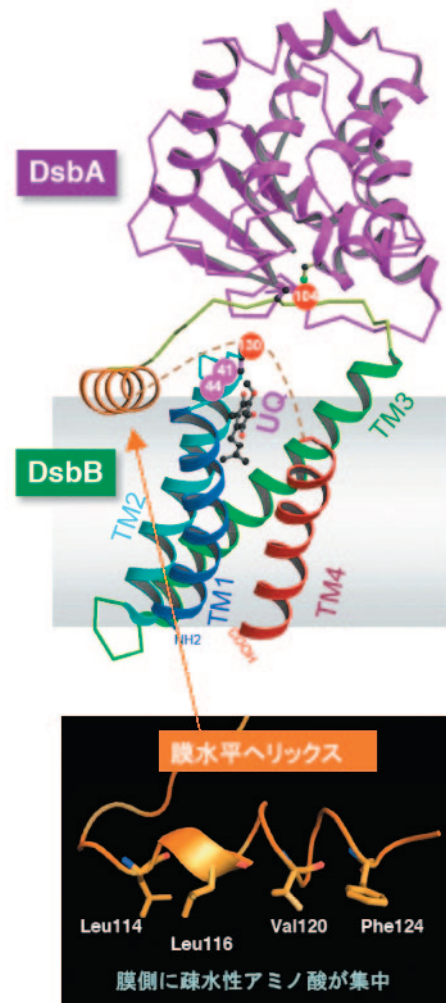
れはこのキノン結合領域がDsbBにおけるジスルフィド結合創生の反応中心であることを提唱した。Cys44-キノン電荷移動錯体・付加生成物が Cys41 による求核攻撃を誘起することによって、Cys41-Cys44 ジスルフィド結合が創生されるという化学メカニズムが強く示唆される。

DsbB はいかにして、酸化還元電位の非常に高い(還元型でいることを非常に好む)DsbA を酸化できるのだろうか？低分子酸化還元化合物との平衡状態を観察することによって DsbB の酸化還元電位を見積もると、Cys104-Cys130, Cys41-Cys44 のいずれも DsbA の酸化還元電位に比べてはるかに低い値を示した。DsbB が DsbA を酸化できることから考えると、逆説的な値である。一方、われわれは、試験管内反応における DsbB による DsbA の酸化が、「速い経路」、「遅い経路」の二つの経路で進行することを見いだした。両タンパク質間の反応をキノンが関与しない状態で解析するため、キノン合成酵素欠損変異株を用いて、キノンフリーの DsbB を調製して反応に供した場合でも、上記二つの反応経路がかなりの程度進行し、DsbA の酸化が起こった。二つの反応経路は、(DsbA) Cys30-(DsbB) Cys104 分子間ジスルフィド中間体が形成された後に枝分れし、以下のように進行する。「速い経路」では、分子間ジスルフィドが DsbA の Cys33 による求核攻撃を受けて開裂し、DsbA 分子内に Cys30-Cys33 ジスルフィド結合が作られる。その結果 DsbB の P2ドメインの Cys104と Cys130 が還元されるが、ただちに P1 ドメインの Cys41-Cys44 ジスルフィドと平衡状態となる。ここまではキノン非存在下でもおこる。キノンが存在すれば、還元状態の Cys41, Cys44 はただちにキノンによって酸化され、平衡現象のため酸化は Cys104, Cys130 におよぶ。一部は以下の遅い経路で処理される。「遅い経路」では、DsbA(Cys30)-DsbB(Cys104)ジスルフィド結合ができた結果還元された Cys130 が P1 のジスルフィド Cys41-Cy44 を求核攻撃し、Cys41-Cys130 分子内ジスルフィドを形成する。このジスルフィド再編成の結果、Cys44 が単独状態となりチオレート化してキノンとの電荷移動錯体を形成する。DsbB 分子内に再編成されたジスルフィドを含む DsbA-DsbB 複合体状態は、キノン非存在下では開裂されず安定に存続するが、キノンが存在すれば、この中間体は三つのシステインと Cys44-キノン電荷移動錯体が関与する協調的な反応を経てゆっくりと開裂し、すべてのジスルフィドが再生された状態に戻る。この経路は、「遅くても確実にキノンの働きで DsbA の酸化を駆動する安全装置」としての役割をもっているのかもしれない。

DsbA の酸化還元電位が高いこと(還元型でいることを好む性質)を考えれば、最初の分子間複合体はたとえ一瞬形成されることがあろうとも、ただちに Cys130 による「逆アタック」を受けて還元型 DsbA と酸化型 DsbB に



戻ってしまうはずである。何らかの構造変化が DsbB に誘起され、DsbB の実効酸化還元ポテンシャルが DsbA に匹敵するほど上昇する可能性が浮上した。DsbB は疎水性が強い膜タンパク質であり、結晶構造解析は困難を極めたが、DsbB と DsbA の Cys33 変異体とのジスルフィド結合複合体(実際には DsbB の Cys130 も置換して複合体の安定性を増している)を用い、多くの工夫を積み重ねた結果、成し遂げることができた。この構造においては、DsbB の P2 部分のうち DsbA の Cys30 とジスルフィドを作っている Cys104 を含む領域が DsbA の疎水性溝に捕捉され、Cys30 の近くに引き込まれている。一方、Cys130 は単独 DsbB では Cys104 とジスルフィド結合を作っている Cys104 と 2 Å 程度ほどの距離にあるはずであるが、DsbA との複合体においては、ジスルフィド結合形成が不可能な距離にまで引き離され、Cys41-Cys44 に近づいていた。このように、DsbA との複合体形成にともない、P2 領域に構造変化が起こり、DsbA と直接相互作用する DsbB の二つのシステイン残基に大幅な再配置が誘起されることがわかった。この再配置によって、DsbB の Cys130 は分子間ジスルフィドから引き離され、それへの求核攻撃能力を奪われてしまうのである。このことにより逆反応が妨げられ、DsbA の Cys33 による求核攻撃が許されるのだろう(速い経路)。あるいは、その前に Cys130 が Cys41-Cys44 を攻撃して、Cys41-Cys130 分子内ジスルフィドを形成すれば遅い経路に入り、やはり逆反応はおこりえない。



DsbB は特異的な基質である DsbA と相互作用して結合したときにだけ、システイン再配置機構によって、基質特異的な強力酸化酵素に変身するのである。DsbB はキノンと共役してジスルフィド結合を創生することに加えて、巧みな構造変化によって新たなジスルフィドを DsbA に受け渡す。このような基本スキームによって細胞におけるタンパク質へのジスルフィド結合の導入が支えられていることを、構造生物学、生化学、分光学解析、理論化学を総動員して、明らかにすることができた。

上記のように、2006 年 11 月に、DsbA-DsbB-ユビキノ三者複合体の結晶構造を世界で初めて報告し、この分野の研究に大きなブレイクスルーをもたらした。その後、我々が解いた構造をもとに、機能的に重要と思われる領域の変異解析を遂行した。DsbB の P2 領域の中に存在する膜に水平に配向した短い α -ヘリックス部位の変異体解析により、この領域が膜と水平に相互作用することに働くと思われる両親媒性が DsbA 再酸化に重要な役割をもつことがわかりつつある。また DsbB の休止状態(DsbA と結合する前の状態)についても構造解析を行うため、DsbB と特異的に結合するモノクローナル抗体の作製にも取り組み、既に DsbB とモノクローナル抗体の共結晶化を開始している。DsbB の休止状態と中間複合体の両方の構造情報を得ることにより、DsbA 酸化過程における DsbB の構造ダイナミクスを明らかにし、一連の分子機構のシナリオを原子分子レベルで描くことを目指している。

(2)研究成果の今後期待される効果

近年、細胞内において、蛋白質の構造形成が分子シャペロンなどの補助を受けて初めて

効率的に起こる事が具体的に明らかにされ、細胞生物学における現代的なパラダイムとして確立した。蛋白質におけるジスルフィド結合形成は、非酵素的にも起こり得るにも関わらず、生体内では複数の因子の補助により初めて有効に起こるものである事が、大腸菌を用いた我々等の研究によって示された。化学反応としては単純なジスルフィド結合形成を的確に起こすため、細胞の統合されたシステムが働く必要があると言うことは、蛋白質のフォールディングを考える上重要な事実である。我々は、さらにこのシステムが、酸化力の供給という意味において呼吸鎖電子伝達系に連なるとの新事実を発見した。さらに特筆すべきは、我々は最近、大腸菌におけるタンパク質ジスルフィド結合形成に必須の三つの因子 DsbA, DsbB, ユビキノンの複合体のX線結晶構造解析に成功した。この成果とこれまで我々が遂行した多くの遺伝学、生化学、理論 化学的研究を統合することにより、細胞内でジスルフィド結合がどのような化学スキームにしたがい創りだされ、それがどのような分子機構によりフォールディング途上のタンパク質に受け渡されるのか、その全貌が原子分子レベルで 明らかとなった。以上の研究は、Bardwell, Beckwith (米国), Glockshuber (スイス)らの巨大グループとの激しい競合状態にあったが、結果的に少人数で行った我々の成果が本分野を大きく先導することになった。日本国内で遂行する比較的小規模な CREST・さきがけ研究によるサイエンスが世界と対等以上に戦えることを示す一例になったと考えている。大腸菌のジスルフィド結合形成システムに関して明らかになったことは、真核細胞の同システムを深く理解する上で役立つことはいまでもない。本研究成果は、生物種を問わず、呼吸鎖やエネルギー代謝研究分野、蛋白質フォールディングの研究分野に様々なインパクトを与え、細胞生物学・生化学の基礎問題としての意義と同時に、タンパク質の分泌生産などバイオテクノロジー分野にも寄与するものと期待される。

3.3 電子顕微鏡構造解析(大阪大学 構造解析グループ)

(1)研究実施内容及び成果

研究の構想

細胞の生存には、細胞膜自身の構築や細胞膜を隔てた構造体の保守・管理・分解が必須となる。分泌も含め細胞膜外に存在する分子や分子群の構造形成を調べるためには、膜蛋白質や膜近傍分子群の構造や集合様式を調べるために直接的な構造観察が欠かせない。生きているときの細胞に近い状態での構造観察と観察から導かれる結論やモデルの検証のためには、電子顕微鏡特に氷に閉じこめた状態で観察するクライオ電子顕微鏡による構造観察を必要とする。膜透過駆動機構に関連するタンパク質に関しては、透過初期状態および終了状態を捕捉するか、もしくは近似的状態の複合体を再構成してその複合体の一分子観察を行う。もちろん複合体として単離できれば結晶化による(電子線、X線)構造決定を高い分解能でできることも期待できる。しかし電子顕微鏡の低分解能像でも各反応状態での集合様式のトポロジーを解き明かすことを目的として個々の構成要素をラベルにより特定できれば、各構成要素間の配置の変化や道筋の機能解析への土台が提供できる。これらの目的のために、集合様式に適した試料の単離とその構造観察、さらにはより生体膜に近い状態での観察法の開発を進めながら観察し観察事実に基づく仮説・モデル化と検証を行う。

膜透過装置の構造観察は、世界的にX線結晶解析を中心とした進展を遂げている過程にあり、電子顕微鏡での構造観察や機能解析は一時中断している。いくつかの分子群の構造解析が一段落つけばまた電子顕微鏡による観察が求められるだろう。一方膜蛋白質の管理・分解装置は自己分解を含み、なかなか複合体の単離は難しい。それでも、大腸菌の膜に局在する唯一のATP利用プロテアーゼFtsHは可溶性状態での単離から2種類の観察象が得られているが、特にその1種については3次元再構成像が得られておりこの両者の生理的意義を追求している。またFtsHはHflK, HflCと複合体を作りそれに伴い膜タンパクの分解から可溶性タンパクへ対象をシフトすることが知られているが、これに対応すると思われる複合体の構造観察ができています。これから導き出される複合体の様式と意義についても新しい実験系を計画しているが、現状の観察事実をありのままにレポートすることも大切と考え発表

準備中である。

膜におけるタンパク質分解系タンパク質の構造解析

① 研究のねらい

FtsHは大腸菌では膜に局在するAAAファミリーに属する蛋白質分解酵素であるが、自然状態では HflK および HflC と巨大な複合体を作っていることが本研究プロジェクトにより証明できている。この複合体は、そのあり方によって FtsH が分解する対象が膜蛋白質からサイトプラズムに存在する非膜蛋白質にシフトすることを見いだしている。HflK および HflC は、それ自体、膜を貫通する部分を持つ膜蛋白質だが大部分はペリプラズム側にある。そのような蛋白質が、生体膜を挟んで反対側のサイトプラズム側にある FtsH のプロテアーゼドメインの分解する対象を膜蛋白質から可溶性蛋白質に変化させる機構を構造観察から説明しようとしている。

② 研究実施方法

FtsHは膜を貫通している部分を欠損させると自然状態では会合状態が変わることが示せることから膜貫通部分を含む全体像での構造を電子顕微鏡の単粒子解析で決定し、さらに HflK, HflC 存在下で全体構造がどのように変化するかを観察する。

③ 主な成果

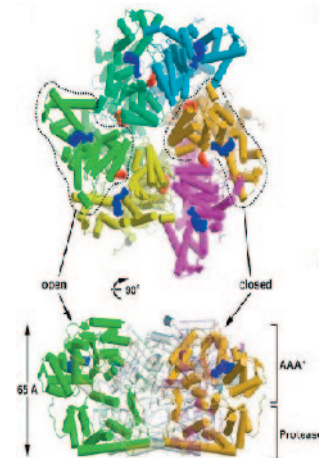
FtsH は ATP 加水分解依存的に、可溶性蛋白質及び膜蛋白質を分解する細胞質膜プロテアーゼである。その細胞質領域は AAA ATPase ドメインと亜鉛結合型プロテアーゼドメインからなり、他の AAA ATPase ファミリー蛋白質と同様に、ホモ六量体を形成し、リング構造をとられている。細胞内においては、多くの FtsH は HflK/HflC とともに非常に大きな複合体(FtsH ホロ酵素)を形成している。HflK/HflC はペリプラズム領域に配列の大部分を露出する膜蛋白質であり、FtsH による分解を基質の局在に応じて調節することが示唆されている。

FtsH の可溶性ドメインは結晶構造解析がなされたが、膜蛋白質基質を dislocation させつつ分解するためには膜貫通ドメインが必須であり、全長の FtsH の構造を決定することは重要である。我々は、全長 FtsH, HflK/HflC 及び、FtsH ホロ酵素の電子顕微鏡構造解析を行った。

FtsH の三次元再構成はネガティブ染色法と非染色のクライオ法の両方の利点を持つ方法で観察した。この方法は、クライオネガティブ法とも呼ぶべきもので、重原子を含む染色液を蛋白質の溶液などに混ぜ観察用試料台に載せ乾燥させることなく急速凍結して非晶質氷包埋の状態を試料の像を観測する。通常の染色法では、乾燥操作によって様々な人為変化を引き起こす可能性がある。特に膜蛋白質のように界面活性剤を使用する場合には、乾燥が界面活性剤の状態を変化させるため人為産物の影響が大きい。一方純粋な非染色のクライオ法では試料のコントラストが低いため観測される像の均一性を頼りに積算する。試料の均一性が充分でないときに(十分に精製されていないか、精製されていても構造的に多形とな



全長FtsHの電子顕微鏡像



FtsH可溶性ドメインの結晶構造

(Suno, Yoshida, Morikawa, 2006)

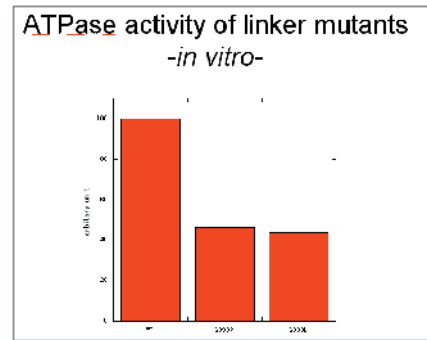
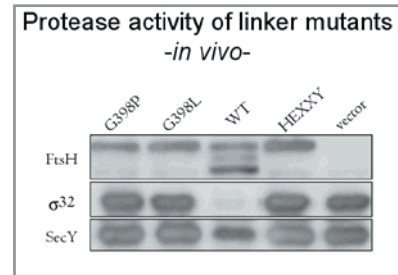
る性質があるとき)には、構造として似て非なるものを積算してしまう可能性がある。クライオネガティブ法では単一粒子の画像コントラストが高くなり粒子間の構造の差が見分けやすくなるのと、乾燥の人為的变化を防げるので原理的に優位と思われる。実際次に述べるようにこの研究でその特色がよく発揮された。

試料は、完全長 FtsH を界面活性剤で可溶化精製し、色々な方向を向いた FtsH の画像から三次元像を解析したところ、対称性の高い構造と非対称な構造とが混在することが証明できた。対称性のある画像からは3次元再構成が比較的容易にでき、その構造は直径 100Å 前後のリング三層から成っていた。最も直径の大きい二層目のリングは、X線結晶解析から得られた大腸菌 FtsH (PDB 1LV7) の六量体モデルにほぼ一致した。このリングは方向性を持っており、やや小さめのリングは膜貫通部分に相当すると思われ、その反対には少し大きめのリング様の像はプロテアーゼドメインと結論できた。このプロテアーゼドメインの構造は、可溶性部分だけのX線結晶構造解析の結果と有意に差があること、また観察された非対称な構造を反映する像はこの部分であることが見いだされた。X線結晶構造解析の場合には2層目のリングと3層目のリングをつなぐリンカ一部分に変異を入れることによって3次元結晶化に成功している。われわれもこの部分に変異を導入したところ図に見られるようにプロテアーゼ活性・ATPase 活性ともに大きく影響を受けたが、とりわけ FtsH の可溶性タンパクの分解がほぼ失われていることを見いだした。このことから、可溶性の2層のリングの間の非対称な構造変化が活性にとって重要なのではないかという仮説が知見として得られた。

このように、対称構造と非対称構造が混じり合った試料状態は生理的な機能・構造相関にとって有意義な結果であるが、これはクライオ電子顕微鏡ならではの結果といえる。

一方、HflK/HflC では、様々な形状のリング様の像が見られた。また、FtsH ホロ酵素では、「直径約 100 Å の円形とそれを囲むリング様の物体」や「リングが円形を完全には囲まらず、尾のように延びた像」が見られた。我々はこれらの像から、HflK/HflC はおおむね、FtsH 6量体の周りを取り囲むようにして膜・膜近傍と FtsH との間で物理的障壁として働くという仮説をたて、その検証を行っている。この物理的な障壁がどのようにでき調整されているかがプロテアーゼドメインなどのある反対側にある HflK,C のペリプラズムドメインで決まるのではないかと想像される。このような物理的障壁の具合によりFtsHの分解対象が膜蛋白質と可溶蛋白質との間で変化するのではない。ペリプラズムの条件に応じてサイトプラズム内への生体膜を超えた制御(トランス制御)という点や、さらには制御ドメインがプロテアーゼと同じ側にある QmcA などの制御(シス制御)を統一的に考えることができそうだ。

HflK, HflC による FtsH の制御は、膜を超えた制御でありまた FtsH の分解対象を膜タンパク質と可溶タンパク質との間で変化させるという一見複雑そうな制御が、二種のタンパク質間の柔軟で多様な構造で決まるといふモデルは、これまで知られていた機械的な剛体モデルとは質的に異なっている。もちろんこれは、構造解析としては決定的なものではなく検証を必要とする。しかし、このような質的に異なる制御モデルが得られたのは一分子構造観察が生み出した特色である。



さらなる検証には、時間的柔軟性を評価する1分子観察と電子顕微鏡の単粒子観察とを有機的に組み立てる必要があるだろう。

膜透過駆動機構に関連するタンパク質の構造解析

① 研究のねらい

平面膜再構成および均質リポソーム再構成を行い単粒子解析による構成蛋白質の構造やそれらの部分のトポロジー変化を解明することを目指した。

② 研究実施方法

NMR で行われるバイセル法を応用して単層の平面膜に *Thermus thermophilus* 由来の SecYE 再構成を再構成し平面膜状での構造解析を試みた。

③ 主な成果

界面活性剤で可溶化した SecYEG は8割方モノマーとして存在することが確かめられたがおよそ2割ほどダイマー(2量体)として存在する可能性があることが分かった。これが平面膜に再構成したときにはダイマーとなることが期待されたが、平面膜内での蛋白質の無染色像はコントラストが乏しく、金粒子によるラベル化は完全な修飾ができていないかどうかの検定の途中でSecYEのプロジェクトを中断した。また、平面膜再構成ができた時点で、脂質・蛋白質の比率を変えて2次元結晶化を試みたが、このプロジェクトが始まる前から先行していた Rapoport や Kuehlbrant らの2次元結晶による電子顕微鏡の構造解析、およびX線結晶解析の結果が発表され、単独での構造解析やトポロジー解析が無意味となり複合蛋白質でのトポロジー解析ができるまで一時中断することとした。しかしこのときのラベル化の試みから派生して金-HaloTag ラベル法を考案した。

(2)研究成果の今後期待される効果

FtsH の非対称構造変化や HflK,C による FtsH の制御仮説は膜蛋白質の管理と制御のありかたに新しい視点をもたらすもので是非検証する価値があると思われる。さらにプロジェクトで計画し充分には果たせていないが、反転膜小胞でのこれら複合体の直接観察は、これらの仮説の検証のみならず、新しいモデル・仮説を生み出した観察技術として認知され応用されてゆくものと思われる。

4 研究参加者

①機能解析グループ(蛋白質膜透過装置および膜プロテアーゼの研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
伊藤維昭	京都大学・ウイルス研究所	教授	研究全般の先導と統括	平成14年11月～平成19年3月
秋山芳展	京都大学・ウイルス研究所	助教授・教授	膜におけるタンパク質分解系の研究	平成14年11月～平成19年10月
森 博幸	京都大学・ウイルス研究所	助手・准教授	膜透過装置の研究	平成14年11月～平成19年10月
稲葉謙次	京都大学・ウイルス研究所	CREST 研究員	ジスルフィド結合形成装置の研究	平成17年4月～平成18年10月
武藤洋樹	京都大学・ウイルス研究所	大学院生	SecMの研究	平成16年4月～平成19年10月
小出佳代	京都大学・ウイルス研究所	大学院生	RsePの調節機構	平成16年4月～平成19年10月
前河早希	京都大学・ウイルス研究所	大学院生	GlpGの機能解析	平成16年4月～平成19年10月
中戸川仁	京都大学・ウイルス研究所	大学院生	翻訳初期過程の研究	平成14年11月～平成16年3月
千葉志信	京都大学・ウイルス研究所	大学院生	FtsHの制御機構の研究	平成14年11月～平成16年3月
金原和江	京都大学・ウイルス研究所	大学院生・CREST 研究員	RsePの機能解析	平成14年11月～平成16年8月
佐藤康成	京都大学・ウイルス研究所	大学院生	SecYEGの分子解剖	平成14年11月～平成16年8月
千葉和彦	京都大学・ウイルス研究所	大学院生	SecY/Sec61の機能解析	平成14年11月～平成16年3月
酒向万智子	京都大学・ウイルス研究所	大学院生	HtpXの生化学解析	平成14年11月～平成17年3月
下畑宣行	京都大学・ウイルス研究所	大学院生	SecYの機能解析	平成14年11月～平成17年3月
下川直美	京都大学・ウイルス研究所	大学院生	SecYの構造機能相関	平成14年11月～平成17年3月
塚崎智也	京都大学・ウイルス研究所	大学院生	高度好熱菌 SecYEの解析	平成14年11月～平成18年3月
村上亜希子	京都大学・ウイルス研究所	大学院生	SecMの機能解析	平成15年4月～平成18年3月
片岩裕貴	京都大学・ウイルス研究所	大学院生	FtsHの機能解析	平成15年4月～平成15年8月
山本直哉	京都大学・ウイルス研究所	大学院生	高度好熱菌 SecAの解析	平成16年4月～平成17年3月

高橋洋平	京都大学・ウイルス研究所	大学院生	DsbB の機能解析	平成 16 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
望月清子	京都大学・ウイルス研究所	技 官 ・ CREST 事 務員	事務担当	平成 14 年 11 月～ 平成 19 年 3 月
佐野美千代	京都大学・ウイルス研究所	研究補助 員・事務補 佐員	実験補助・事務補助	平成 14 年 12 月～ 平成 19 年 10 月
吉海江国仁	京都大学・ウイルス研究所	CREST 技 術員	タンパク質の精製	平成 14 年 12 月～ 平成 19 年 8 月
雑賀登喜子	京都大学・ウイルス研究所	CREST 研 究補助員	タンパク質の精製	平成 15 年 12 月～ 平成 16 年 3 月
阪本友美	京都大学・ウイルス研究所	CREST 技 術員	タンパク質の精製	平成 16 年 4 月～ 平成 19 年 1 月
足立卓彦	京都大学・ウイルス研究所	CREST 研 究補助員	実験補助	平成 16 年 5 月～ 平成 17 年 3 月

② 機能解析グループ2(ジスルフィド結合導入装置の研究)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
稲葉謙次	九州大学・生体 防御医学研究 所	特任准教 授	ジスルフィド結合導入装 置の研究	平成 18 年 11 月～ 平成 19 年 10 月
金城麻衣	九州大学・生体 防御医学研究 所	研究補助 員	タンパク質の精製、結晶 化	平成19年4月～平成1 9年8月

③ 構造解析グループ(電子顕微鏡構造解析の研究)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
伊藤維昭	大阪大学・蛋白 質研究所(バイオ 関連多目的研究 施設)	招聘教授	研究全般の先導と統括	平成 19 年 4 月～ 平成 19 年 10 月
木村能章	大阪大学・蛋白 質研究所(バイオ 関連多目的研究 施設)	招聘教授・ 藍野大学 特任教授	電子顕微鏡解析	平成 14 年 11 月～ 平成 19 年 10 月
才川直哉	大阪大学・蛋白 質研究所(バイオ 関連多目的研究 施設)	CREST 研 究員・大塚 製薬 Qs' 研究所	FtsH 複合体の電子顕 微鏡観察	平成 15 年 4 月～ 平成 19 年 10 月

林 満寿美	大阪大学・蛋白質研究所(バイオ関連多目的研究施設)	研究補助員	研究補助	平成 18 年 9 月～平成 19 年 7 月
才川希代子	生物分子工学研究所	CREST 研究補助員	研究補助	平成 16 年 7 月～平成 16 年 12 月
西条武俊	生物分子工学研究所	研究企画部長	研究調整	平成 16 年 4 月～平成 17 年 5 月
松島日出夫	生物分子工学研究所	研究企画部長	研究調整	平成 14 年 11 月～平成 15 年 6 月

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Chris Kaiser (マサチューセッツ工科大学・教授・学部長)	ジスルフィド結合形成システムの生物学的機能に関する研究連絡	京都大学	2006.5.25-5.31
Hiroshi Kadokura (ハーバード大学・研究員)	ジスルフィド結合導入酵素の分子機構と応用に関する研究連絡	京都大学等	2007. 3.6-3.19

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国際誌 44 件)

1. Wang, Y., Maegawa, S., Akiyama, Y., and Ha, Y. The role of L1 loop in the mechanism of rhomboid intramembrane protease GlpG. **J. Mol. Biol.** 374, 1104-1113 (2007)
2. Akiyama, Y. and Maegawa, S. Sequence features of substrates required for cleavage by GlpG, an *Escherichia coli* rhomboid protease. **Mol. Microbiol.** 64, 1028-1037 (2007)
3. Shimohata, N., Nagamori, S., Akiyama, Y., Kaback, H. R. and Ito, K. SecY alterations that impair membrane protein folding and generate a membrane stress. **J. Cell Biol.** 176, 307-317 (2007)
4. Koide, K., Maegawa, S., Ito, K. and Akiyama, Y. Environments of the active site region of RseP, an *E. coli* RIP protease, assessed by site-directed cysteine alkylation. **J. Biol. Chem.**, 282 4553-4560 (2007)
5. Maegawa, S., Koide, K., Ito, K. and Akiyama, Y. The intramembrane active site of GlpG, an *E. coli* rhomboid protease, is accessible to water and hydrolyzes an extramembrane peptide-bond of substrates. **Mol. Microbiol.**, 64, 435-447 (2007)
6. Tsukazaki, T., Mori, H., Fukai, S., Numata, T., Perederin, A., Adachi, H., Matsumura, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Mori, Y., Sasaki, T., Vassylyev, D., Nureki, O. and Ito, K. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of SecDF, a translocon-associated membrane protein, from *Thermus thermophilus*. **Acta Cryst.** F62, 376-380 (2006).
7. Vassylyeva, M. N., Mori, H., Tsukazaki, T., Yokoyama, S., Tahirov, T. H., Ito, K. and Vassylyev, D. G. Cloning, expression, purification, crystallization and initial crystallographic analysis of the preprotein translocation ATPase SecA from *Thermus thermophilus*. **Acta Cryst.** F62, 909-912 (2006)
8. Vassylyev, D. G., Mori, H., Vassylyeva, M. N., Tsukazaki, T., Kimura, Y., and Ito, K.

- Crystal structure of the translocation ATPase SecA from *Thermus thermophilus* reveals a parallel, head-to-head dimer. **J. Mol. Biol.** 364, 248–258 (2006)
9. Mori, H. and Ito, K. Different modes of SecY-SecA interactions revealed by site-directed *in vivo* photo-crosslinking. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 103, 16159-16164 (2006)
 10. Mori, H. and Ito, K. The long α -helix of SecA is important for the ATPase coupling of translocation. **J. Biol. Chem.** 281, 36249-36256 (2006)
 11. Muto, H., Nakatogawa, H. and Ito, K. Genetically encoded but non-polypeptide prolyl-tRNA functions in the A-site for SecM-mediated ribosomal stall. **Mol. Cell** 22, 545-552 (2006)
 12. Chiba, S., Ito, K. and Akiyama, Y. The *Escherichia coli* plasma membrane contains two PHB (prohibitin homology) domain protein complexes of opposite orientations. **Mol. Microbiol.** 60, 448-457 (2006)
 13. Inaba, K., Takahashi, Y.-h., Ito, K. and Hayashi, S. Critical role of a thiolate-quinone charge transfer complex and its adduct form in *de novo* disulfide bond generation by DsbB. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 103, 287-292 (2006)
 14. Takahashi, Y.-h., Inaba, K. and Ito, K. Role of the cytosolic loop of DsbB in catalytic turnover of the ubiquinone-DsbB complex. **Antioxid. Redox Signal.**, 8, 743-752 (2006)
 15. Inaba, K., Murakami, S., Suzuki, M., Nakagawa, A., Yamashita, E., Okada, K. and Ito, K. Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a mechanism of disulfide bond generation. **Cell** 127, 789–801 (2006)
 16. Nakatogawa, H., Murakami, A., Mori, H. and Ito, K. SecM facilitates translocase function of SecA by localizing its biosynthesis. **Genes Dev.** 19, 436-444 (2005)
 17. Shimohata, N., Akiyama, Y. and Ito, K. Peculiar properties of DsbA in its export across the *E. coli* cytoplasmic membrane. **J. Bacteriol.** 187, 3997-4004 (2005)
 18. Inaba, K., Takahashi, Y.-h. and Ito, K. Reactivities of quinone-free DsbB from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 280, 33035-33044 (2005)
 19. Sakoh, M., Ito, K. and Akiyama, Y. Proteolytic activity of HtpX, a membrane-bound and stress-controlled protease of *E. coli*. **J. Biol. Chem.** 280, 33305-33310 (2005)
 20. Maegawa, S., Ito, K. and Akiyama, Y. Proteolytic action of GlpG, a rhomboid protease in the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. **Biochemistry** 41, 13543-13552 (2005)
 21. Mori, H., Shimokawa, N., Satoh, Y. and Ito, K. Mutation analysis of transmembrane regions 3 and 4 of SecY, a central component of protein translocase. **J. Bacteriol.** 186, 3960-3969 (2004)
 22. Murakami, A., Nakatogawa, H. and Ito, K. Translation arrest of SecM is essential for the basal and regulated expression of SecA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 101, 12330-12335 (2004)
 23. Saikawa, N., Akiyama, Y. and Ito, K. FtsH exists as an exceptionally large complex containing HflKC in the plasma membrane of *Escherichia coli*. **J. Struct. Biol.** 146, 123-129 (2004)
 24. Akiyama, Y., Kanehara, K. and Ito, K. RseP (YaeL), an *E. coli* RIP protease, cleaves transmembrane sequences. **EMBO J.** 23, 4434-4442 (2004)
 25. Inaba, K., Takahashi, Y.-H., Fujieda, N., Kano, K., Miyoshi, H. and Ito, K. DsbB elicits a red-shift of bound ubiquinone during the catalysis of DsbA oxidation. **J. Biol. Chem.** 279, 6761-6768 (2004)
 26. Takahashi, Y., Inaba, K. and Ito, K. Characterization of menaquinone-dependent disulfide bond formation pathway of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 279, 47057-4706 (2004)
 27. Mori, H. and Ito, K.: Biochemical characterization of a mutationally altered protein translocase: proton-motive force stimulation of the initiation phase of translocation. **J. Bacteriol.** 185, 405-412 (2003)
 28. Mori, H., Akiyama, Y. and Ito, K.: A SecE mutation that modulates SecY-SecE translocase assembly, identified as a specific suppressor against SecY defects. **J. Bacteriol.** 185, 948-956
 29. Shimokawa, N., Mori, H. and Ito, K.: Importance of transmembrane segments in SecY. **Mol. Gen. Genomics** 269, 180–187 (2003)
 30. Matsuo, E., Mori, H. and Ito, K.: Interfering mutations provide *in vivo* evidence that *Escherichia coli* SecE functions in multimeric states. **Mol. Gen. Genomics** 268, 808–815 (2003)

31. Mori, H., Tsukazaki, T., Masui, R., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Johnson, A. E., Kimura, Y., Akiyama, Y. and Ito, K.: Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein translocase: SecYE from *Thermus thermophilus* HB8 forms a constitutive oligomer in membranes. **J. Biol. Chem.** 278, 14257-14264 (2003)
32. Akiyama, Y. and Ito, K.: Reconstitution of membrane proteolysis by FtsH. **J. Biol. Chem.** 278, 18146-18153 (2003)
33. Satoh, Y., Matsumoto, G., Mori, H. and Ito, K.: Nearest neighbor analysis of the SecYEG complex. I. Identification of a SecY-SecG interface. **Biochemistry** 42, 7434-7441 (2003)
34. Satoh, Y., Mori, H. and Ito, K.: Nearest neighbor analysis of the SecYEG complex. II. Identification of a SecY-SecE cytosolic interface. **Biochemistry** 42, 7442-7447 (2003)
35. Kanehara, K., Ito, K. and Akiyama, Y.: YaeL proteolysis of RseA is controlled by the PDZ domain of YaeL and a Gln-rich region of RseA. **EMBO J.** 22, 6389-6398 (2003)
36. Nakatogawa, H. and Ito, K.: The ribosomal exit tunnel functions as a discriminating gate. **Cell** 108, 629-636. (2002)
37. Chiba, K., Mori, H. and Ito, K.: Roles of the C-terminal end of SecY in protein translocation and viability of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 184, 2243-2250. (2002)
38. Inaba, K. and Ito, K.: Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction cascade. **EMBO J.** 21, 2646-2654. (2002)
39. Akiyama, Y.: Proton-motive force stimulates the proteolytic activity of FtsH, a membrane-bound ATP-dependent protease in *E. coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99, 8066-8071. (2002)
40. Saikawa, N., Ito, K. and Akiyama, Y.: Identification of glutamic acid 479 as the gluzincin coordinator of zinc in FtsH (HflB). **Biochemistry** 41, 1861-1868. (2002)
41. Chiba, S., Akiyama, Y. and Ito, K.: Processive membrane protein degradation by FtsH can be initiated from either end. **J. Bacteriol.** 184, 4775-4782. (2002)
42. Shimohata, N., Chiba, S., Saikawa, N., Ito, K. and Akiyama, Y.: The Cpx stress response system of *Escherichia coli* senses plasma membrane proteins and controls HtpX, a membrane protease with cytosolic active site. **Genes Cells** 7, 653-662. (2002)
43. Kanahara, K., Ito, K. and Akiyama, Y.: YaeL (EcfE) activates the σ^E pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti- σ^E , RseA. **Genes Dev.** 16, 2147-2155. (2002)
44. Mori, H., Shimizu, Y. and Ito, K.: Super active SecY variants that fulfill the essential translocation function with a reduced cellular quantity. **J. Biol. Chem.** 277, 48550-48557 (2002)

(2) その他の著作物(総説、書籍など。国際 11 件、国内 26 件)

1. Ito, K.: The role of molecular chaperones and Sec machinery in protein secretion. Henry Stewart Talks "Molecular Chaperones: Principles and Diseases", to be released from Henry Stewart, U.K..
2. Ito, K. and Mori, H.: The Sec protein secretion system. Ed: Karl Wooldridge, Horizon Scientific Press, *in press*
3. Inaba, K. and Ito, K.: Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide generation machine. Special Issue "Redox Regulation of Protein Folding", **Biochim. Biophys. Acta.**, *in press*
4. Inaba, K.: Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a mechanism of protein disulfide bond generation in *E. coli*. **J. Synchr. Rad.** *in press*
5. Ito, K.: Redox Control of Protein Processing: From Electrons to Cells. **Antioxid. Redox Signal.** 8, 729-730 (2006)
6. Kimura, Y.: Molecular Electron Microscopy for Biology and Medicine - Overview. **Aino Journal** 5, 7-15 (2006)
7. Ito, K. and Akiyama, Y.: Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. **Annu. Rev. Microbiol.** 59, 211-231 (2005)
8. Ito, K.: Ribosome-based protein folding systems are structurally divergent but functionally universal across biological kingdoms. **Mol. Microbiol.** 57, 313-317 (2005)

9. Nakatogawa, H. and Ito, K. Intra-ribosomal regulation of expression and fates of proteins. **ChemBiochem** 5, 48-51 (2004)
10. Nakatogawa, H., Murakami, A. and Ito, K. Control of SecA and SecM translation by protein secretion. **Curr. Opin. Microbiol.** 7, 145-150 (2004)
11. Akiyama, Y., Ito, K. and Ogura, T. FtsH protease. pp. 794-798, **Handbook of Proteolytic Enzymes 2nd Edn.**, Elsevier (2004)
12. 稲葉謙次、伊藤維昭 (2007) 細胞品質管理に関与するタンパク質ジスルフィドネットワーク pp 77-85, バイオ研究マスターシリーズ タンパク質の一生集中マスター (遠藤斗志也、森和俊、田口英樹編) 羊土社
13. 稲葉謙次、伊藤維昭 (2007) まだまだ見つかる Protein Disulfide Isomerase (PDI) の新しい機能 pp 132-133, バイオ研究マスターシリーズ タンパク質の一生集中マスター (遠藤斗志也、森和俊、田口英樹編) 羊土社
14. 秋山芳展 (2007) 水と油のコラボ:膜タンパク質の加水分解 p 139, バイオ研究マスターシリーズ タンパク質の一生集中マスター (遠藤斗志也、森和俊、田口英樹編) 羊土社
15. 伊藤維昭 (2007) アトモスフィア「さじ加減」生化学 79, 197
16. 伊藤維昭、稲葉謙次 (2007) ジスルフィド結合の形成メカニズム *メディカルバイオ* 4-4, 58-65
17. 稲葉謙次、伊藤維昭 (2007) 構造が明らかにしたジスルフィド結合の形成機構 *蛋白質核酸酵素* 7, 853-861
18. 伊藤維昭 (2007) 最終講義「トランスロコンとめぐりあえて」 *蛋白質核酸酵素* 52, 1480-1485
19. 稲葉謙次 (2007) タンパク質ジスルフィド結合の形成に関わる酵素群—構造が明らかにしたそのメカニズム—. *酵素工学ニュース* 57, 17-23
20. 森博幸 (2006) せなかあわせより、向かい合わせの方が好都合? トランスロコンのアセンブリー様式 *蛋白質 核酸 酵素* 51, 169-170 稲葉謙次(2006) 細胞における蛋白質ジスルフィド結合創生の基本化学原理 *生物物理* 46, 257-262
21. 武藤洋樹、伊藤維昭 (2006) 分泌モニターSecMが明らかにした新しい概念 *蛋白質核酸酵素* (増刊「RNAと生命」) 51, 2583-2589
22. 稲葉謙次、伊藤維昭 (2005) タンパク質ジスルフィド結合導入のための細胞支援システム。 *実験医学* 23 増刊「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏、遠藤斗志也 編) 2260-2265
23. 酒向真智子、秋山芳展 (2005) 大腸菌の膜タンパク質分解。 *実験医学* 23 増刊「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏、遠藤斗志也 編) 2358-2362
24. 稲葉謙次、伊藤維昭 (2005) Oxidative protein folding にかかわる細胞因子。別冊・医学のあゆみ「レドックス—ストレス防御の医学」(淀井淳司、松尾禎之 編) pp. 67-71
25. 稲葉謙次(2005) Redox status の検出/SH 基修飾剤。別冊・医学のあゆみ「レドックス—ストレス防御の医学」(淀井淳司、松尾禎之 編) p. 164
26. 木村能章、才川直哉: 電子顕微鏡構造解析 (高分解能までの道)。 *遺伝子医学MOOK別冊/分子生物学実験シリーズ「図・写真で見る蛋白構造・機能解析実験実践ガイド」* 編集 月原富武、新延道夫 (ディカル ドウ). (2005)
27. 千葉志信、秋山芳展 (2004) 大腸菌膜プロテアーゼによる膜の品質管理とストレス応答調節。 *化学と生物* 42, 86-92.
28. 中戸川 仁、伊藤維昭 (2004) 蛋白質の誕生におけるリボソームのトンネルの役割。 *蛋白質核酸酵素* (増刊「細胞における蛋白質の一生」) 生成・成熟・輸送・管理・分解・病態) 49, 829-833
29. 森博幸 (2004) 蛋白質膜透過装置研究の新しい流れ。 *構造生物学の時代へ。蛋白質核酸酵素* (増刊「細胞における蛋白質の一生」) 生成・成熟・輸送・管理・分解・病態) 49, 950-958
30. 秋山芳展 (2004) 大腸菌の表層蛋白質の品質管理。 *蛋白質核酸酵素* (増刊「細胞における蛋白質の一生」) 生成・成熟・輸送・管理・分解・病態) 49, 1054-1058
31. 下畑宣行、伊藤維昭 (2004) 膜への挿入とフォールディング。特集「階層別に見るタンパク質のフォールディングと品質管理: in vitro から細胞・個体レベルまで。 *細胞工学* 23, 1380-1383

32. 中戸川仁、伊藤維昭 (2003) 蛋白質の膜透過と翻訳アレスト。「RNA の細胞生物学」蛋白質核酸酵素増刊 48, 338-345. 共立出版
33. 中戸川仁、村上亜希子、伊藤維昭 (2003) タンパク質分泌モニターSecMによるSecAの発現制御機構。難産なタンパク質が誕生するとき。実験医学 21, 869-873. 羊土社
34. 才川直哉、秋山芳展 (2003) AAA プロテアーゼによる大腸菌タンパク質の品質管理。バイオサイエンスとインダストリー 61, 306-311.
35. 金原和江、秋山芳展 (2003) 膜内部での蛋白質切断 (RIP) によるシグナル分子の生成。細菌から高等生物まで。蛋白質核酸酵素 48, 836-841.
36. 森博幸 (2003) ピストン・モーターSecAの構造。蛋白質核酸酵素 48, 159-160.
37. 中戸川仁、伊藤維昭 (2002) 大腸菌におけるタンパク質膜透過ならびに輸送。わかる実験医学シリーズ「細胞内輸送がわかる」(米田悦啓 編) PP. 78-86. 羊土社

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 37 件、国際会議 41 件)

1. Ito, K. SecM-mediated ribosomal stalling: mechanism and physiological functions. ASM 107th General Meeting, Toronto, Canada (2007.5.23), 2007
2. Akiyama, Y. Function and regulation of E. coli membrane metalloproteases. Gordon Research Conference on Matrix Metalloproteinases. (June 3-8, Lucca, Italy), 2007
3. Ito, K. Biological, chemical and structural principles of protein-disulfide bond generation. Boden Conference on Disulfide Bonds and Their Role in Protein Folding and Function. Queensland, Australia, July 29-August 2, 2007
4. Inaba, K. Structural basis of the DsbA-DsbB-UQ oxidative system in E. coli. Boden Conference on Disulfide Bonds and Their Role in Protein Folding and Function. Queensland, Australia, July 29-August 2, 2007
5. 稲葉謙次、伊藤維昭 蛋白質ジスルフィド結合形成に関わる細胞システムの構造と機能 第7回日本蛋白質科学会(仙台, 2007.5.24-26), 2007
6. 稲葉謙次、伊藤維昭 Structural basis for protein disulfide bond formation in the cell. 第40回日本発生物学会第59回日本細胞生物学会合同大会(福岡, 2007.5.28-30), 2007
7. 森博幸、伊藤維昭 How does SecA ATPase drive protein translocation? 第40回日本発生物学会・第59回日本細胞生物学会 合同大会, 2007
8. Inaba, K. and Ito, K. Structure and molecular mechanisms of a disulfide bond generation machinery. Revisiting Life Science from Half Century of Virus Research. Abstract p. 17, May, Kyoto, 2006
9. Ito, K., Nagamori, S., Shimohata, N., Mori, H., Akiyama, Y. and Kaback, H.R. SecY alterations that impair membrane protein folding and generate a membrane stress. ASM-FEMS Conference Protein Traffic in Prokaryotes. Abstract p. 14, Greece, May 6-10, 2006
10. 秋山芳展. 大腸菌 RIP プロテアーゼの機能とその制御, 蛋白質研究所セミナー Membrane-proximal proteolysis:膜近傍におけるプロテオリシス研究の最先端. 吹田, 2006
11. Ito, K., Shimohata, N., Nagamori, S., Kaback, H.R., Sakoh, M., Chiba, S., Mori, H. and Akiyama, Y. Protein quality control devices in the Escherichia coli plasma membrane. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Symposium Quality Control of Proteins and Proteolysis, Abstract p. 75, Jun 18-23, 2006
12. Inaba, K. and Ito, K. Crystal structure of DsbB-DsbA complex revealing a cysteine relocation mechanism. FASEB Summer Research Conferences Protein Folding in the Cell, July 29-August 3, Vermont Academy, Vermont, USA, 2006
13. Inaba, K., Murakami, S., Suzuki, M., Nakagawa, A., Yamashita, E., Okada, K. and Ito, K. Crystal structure of the DsbB-DsbA complex revealing a cysteine relocation process for disulfide bond generation. Switzerland-Japan Symposium on Structural Biology 2006. Abstract p. 30, September, Brunnen, Switzerland, 2006
14. Inaba, K., Murakami, S., Suzuki, M., Nakagawa, A., Yamashita, E., Okada, K. and Ito, K. Crystal structure of DsbB-DsbA complex revealing a cysteine relocation mechanism. Joint

- Conference of the Asian Crystallographic Association and the Crystallographic Society of Japan. Abstract p. 77, November, Tsukuba, Japan, 2006
15. Akiyama, Y., Maegawa, S., Koide, K., and Ito, K. Regulatory and reaction mechanisms of *E. coli* RIP proteases. The Ringberg Symposium on Regulated Intramembrane Proteolysis. November, Rottach-Egern, Germany, 2006
 16. Muto, H., Nakatogawa, H. and Ito, K. Mechanisms of the SecM-mediated ribosomal stall. RNA 2006 Izu. Functional RNAs and Regulatory Machinery. Abstract p. 10, December, Izu, 2006
 17. Mori, H. and Ito, K. Structure, function and regulation of the protein translocation machine of *E. coli*. Discussion on Theory and Simulation of Biomolecular Nano-machines, December 12-16, Kobe, Japan, 2006
 18. 稲葉謙次、村上聡、鈴木守、中川敦史、山下栄樹、岡田健吾、伊藤維昭. 大腸菌におけるジスルフィド結合導入システムの構造的基盤. 第33回生体分子科学討論会. 名古屋, 2006
 19. 稲葉謙次、村上聡、鈴木守、中川敦史、山下栄樹、岡田健吾、伊藤維昭. 大腸菌における蛋白質ジスルフィド結合創生マシーナリーの構造とメカニズム. 日本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」. 要旨集 p.199, 名古屋, 2006
 20. 森博幸、伊藤維昭. 部位特異的 in vivo 光架橋実験により明らかになった、タンパク質膜透過モータ SecA と膜透過チャンネル SecY 間の異なる相互作用様式. 日本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」. 要旨集 p.199, 名古屋, 2006
 21. 秋山芳展、小出佳代、前河早希、伊藤維昭. 大腸菌 RIP (regulated intramembrane proteolysis) プロテアーゼ RseP の機能と制御. 第6回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「水と蛋白質が織り成す機能発現のメカニズム」. 要旨集 p. 23, 京都, 2006
 22. 稲葉謙次、高橋洋平、林重彦、伊藤維昭. 細胞における蛋白質ジスルフィド結合創生の基本化学原理. 第6回日本蛋白質科学会年会. 要旨集 p. 108, 京都, 2006
 23. 才川直哉、鈴木博文、秋山芳展、伊藤維昭、木村能章. 大腸菌 FtsH 及びその超分子複合体の電子顕微鏡構造解析から予測される分解調節機構. 第6回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「AAA+ タンパク質の高次構造と作用のダイナミクス」. 要旨集 p. 18, 京都, 2006
 24. Akiyama, Y., Kanehara, K., Maegawa, S., Koide, K. and Ito, K.: Regulatory and reaction mechanisms of *E. coli* RIP (regulated intramembrane proteolysis) proteases. Proteolysis in Prokaryotes: Protein Quality Control and Regulatory Principles. April 20-23, Berlin, Germany, 2005
 25. Akiyama, Y.: Regulatory and reaction mechanisms of *E. coli* RIP (regulated intramembrane proteolysis) proteases. The 12th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research - From Molecules to Cells. Abstract p. 64-65. 11. 20-23, Shao Xing, China, 2005
 26. Ito, K., Shimohata, N., Mori, H., Kanehara, K. and Akiyama, Y.: Stress response devices in the *E. coli* plasma membrane and their ability to sense abnormality of integral membrane proteins. IUMS 2005. XI International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Symposium "Envelope Stress". Abstracts p. 214-215. July 23-28, San Francisco, California, USA, 2005
 27. Ito, K., Mori, H., Nakatogawa, H., Akiyama, Y. and Shimohata, N.: Regulation and route-selection in SecA-SecYEG protein translocase. The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology Symposium "Protein Threading through Tunnels and Pores". Cell Struct. Funct. 30, Suppl. P. 9. June 15-17, Saitama, Japan, 2005
 28. Ito, K.: Regulation of the SecA-SecYEG protein translocation system at different levels. International Symposium "Membrane Dynamics and Cell Regulation". 6.29, Fukuoka, Japan, 2005
 29. Ito, K., Shimohata, N., Nakatogawa, H., Murakami, A., Muto, H., Akiyama, Y. Tsukazaki, T. and Mori, H.: Coordinated functions of SecA-SecYEG protein translocation system. International Symposium on Life of Proteins. Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell. 10.30-11.3, Awajisima, Hyogo, Japan, 2005
 30. Akiyama, Y., Kanehara, K., Maegawa, S., Koide, K. and Ito, K.: Regulatory and reaction mechanisms of *E. coli* RIP (regulated intramembrane proteolysis) proteases. International

- Symposium on Life of Proteins. Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell. 10.30-11.3, Awajisima, Hyogo, Japan, 2005
31. Inaba, K., Takahashi, Y.-h. and Ito, K.: Biochemical, biophysical and structural understanding of the DsbB-quinone oxidative system that creates disulfide bond to be relayed by DsbA to *E. coli* proteins. International Symposium on Life of Proteins. Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell. 10.30-11.3, Awajisima, Hyogo, Japan, 2005
 32. Saikawa, N., Suzuki, H., Akiyama, Y., Ito, K. and Kimura, Y. The three-dimensional structure of FtsH oligomer from *E. coli* by cryo-staining electron microscopy. 6th International Conference on AAA Proteins. September 14-18, Graz, Austria
 33. 中戸川仁、村上亜希子、武藤洋樹、森博幸、伊藤維昭: SecMによるSecAの翻訳と機能の調節. 第5回日本蛋白質科学会年会 シンポジウム「タンパク質の一生:タンパク質の合成とその調節」予稿集 p. 4. 6.30, 福岡, 2005
 34. 秋山芳展、金原和江、小出佳代、伊藤維昭: 表層ストレス応答に関わる大腸菌膜プロテアーゼ RseP (YaeL) の活性制御機構. 第28回日本分子生物学会年会 シンポジウム「小胞体ストレスとタンパク質の品質管理」要旨集 p. 24. 12.7-10, 福岡, 2005
 35. 稲葉謙次、高橋洋平、林重彦、伊藤維昭: 蛋白質ジスルフィド結合導入メカニズムにおける共通原理. 第28回日本分子生物学会年会 シンポジウム「小胞体ストレスとタンパク質の品質管理」要旨集 p. 24. 12.7-10, 福岡, 2005
 36. 伊藤維昭、森博幸、下畑宣行、秋山芳展: 膜蛋白質の形成におけるトランスロコンの機能と機能不全感知システム. 第28回日本分子生物学会年会 ワークショップ「タンパク質と脂質のオーケストレーションによる膜の形成」要旨集 p. 112. 12.7-10, 福岡, 2005
 37. 稲葉謙次: 細胞内ジスルフィド結合導入システムの分子科学. 第32回生体分子科学討論会特別講演. 6.24, 神戸, 2005
 38. 稲葉謙次: 酸化的な蛋白質フォールディングとそれを補助する細胞システム. 蛋白研セミナー「蛋白質の昼と夜-フォールディングとミスフォールディング」5.26-27, 大阪, 2005
 39. 才川直哉、鈴木博文、秋山芳展、伊藤維昭、木村能章: 電子顕微鏡による大腸菌膜プロテアーゼ FtsH の構造解析. 第28回日本分子生物学会年会 ワークショップ「細胞機能のキープレイヤーAAA+タンパク質の世界」要旨集 p. 45. 12.7-10, 福岡, 2005
 40. 木村能章 高分解能2次元結晶解析の精密化 日本顕微鏡学会第61回学術講演会 シンポジウム BS03 「電子顕微鏡による蛋白質のイメージング」プログラム p35 (2006)
 41. Akiyama, Y. and Kanehara, K.: Roles and regulation of YaeL, a RIP protease involved in the extracytoplasmic stress response in *E. coli*. The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science. Workshop "In vivo Folding, Transport and Quality Control" Abstract p. 97. April 14-18, Yokohama, 2004
 42. Inaba, K., Takahashi, Y.-H., and Ito, K.: DsbB elicits a red-shift of bound ubiquinone during the catalysis of DsbA oxidation. Cold Spring Harbor Meeting "Molecular Chaperones & the Heat Shock Response. Abstract p. 15. May 5-9, Cold Spring Harbor, N. Y., USA, 2004
 43. Ito, K.: SecM and intra-ribosomal regulation of gene expression at different levels. The 104th ASM General Meeting. May 23-27, New Orleans, Louisiana, USA, 2004
 44. Akiyama, Y.: Control of envelope stress by regulated proteolysis of RseA. Gordon Research Conference on Microbial Stress Response. July 11-16, Mount Holyoke College, South Hadley, Massachusetts, USA, 2004
 45. Kanehara, K. and Akiyama, Y.: Proteolytic activities of YaeL, an *E. coli* intramembrane protease, in vitro. Gordon Research Conference on Microbial Stress Response. July 11-16, Mount Holyoke College, South Hadley, Massachusetts, USA, 2004
 46. Nakatogawa, H., Murakami, A. and Ito, K.: SecM controls quantity and quality of SecA. FASEB Summer Research Conference "Protein Folding in the Cell" July 31-August 5. Saxtons River, Vermont, USA, 2004
 47. 伊藤維昭: 膜におけるタンパク質の動き、構造形成、分解を制御する細胞装置. 日本生化学会北陸支部第22回大会 特別講演. 要旨集 p. 7. 5. 29, 金沢, 2004
 48. 秋山芳展: 大腸菌の膜タンパク質分解メカニズムと機能. 第二回γセクレターゼ研究会「膜内蛋白分解はどのようにして起こり、何を引き起こすのか?」6. 27, 大阪大学コンベンション

- センター, 2004
49. 稲葉謙次、高橋洋平、伊藤維昭: 大腸菌の蛋白質ジスルフィド結合導入メカニズム: パラドックスとソリューション. 第27回日本分子生物学会年会 ワークショップ「タンパク質機能化の細胞内インフラストラクチャー」 要旨集 p. 321. 12. 8-11、神戸, 2004
 50. 中戸川仁、村上亜希子、武藤洋樹、森博幸、伊藤維昭: リボソームトンネルと相互作用する SecM による SecA の制御. 第27回日本分子生物学会年会 ワークショップ「RNA-protein complex: 超分子システムの機能発現に迫る」 要旨集 p. 341. 12. 8-11、神戸, 2004
 51. 森博幸、中戸川仁、Dmitry Vassylyev, 伊藤維昭: タンパク質膜透過装置 SecA-SecYEG: 構造と機能の動的な理解に向けて. 日本生物物理学会第42回年会 シンポジウム「蛋白質の一生: ゆりかごから墓場まで」 生物物理 44, Supplement 1, S2. 12. 13-15、京都, 2004
 52. 秋山芳展、金原和江、伊藤維昭: 表層ストレス応答に関わる大腸菌膜プロテアーゼ YaeL の機能. 日本生物物理学会第42回年会 シンポジウム「蛋白質の一生: ゆりかごから墓場まで」 生物物理 44, Supplement 1, S2. 12. 13-15、京都, 2004
 53. Saikawa, N., Akiyama, Y. and Ito, K.: FtsH exists as an unusually large complex in the cytoplasmic membrane. Fifth International Conference on AAA Proteins. Abstract page A-9. Virginia, U. S. A., 2003
 54. Akiyama, Y., Chiba, S., Saikawa, N., Shimohata, N., Kataiwa, H. and Ito, K.: Proteolytic actions of FtsH against membrane-embedded substrates. Fifth International Conference on AAA Proteins. Abstract page A-7. Virginia, U. S. A., 2003
 55. Kanehara, K., Ito, K. and Akiyama, Y.: Roles and regulation of YaeL, a membrane-bound procase involved in the sE pathway of extracytoplasmic stress response in *E. coli*. International Workshop for *Escherichia coli* "Towards New Biology in the 21st Century". Abstract p. 47. Awaji, Hyogo, Japan, 2003
 56. Ito, K., Nakatogawa, H., Murakami, A. and Muto, H. SecM and intra-ribosomal regulation of gene expression at different levels. International Workshop for *Escherichia coli* "Towards New Biology in the 21st Century". Abstract p. 30. Awaji, Hyogo, Japan, 2003
 57. Akiyama, Y., Kanehara, K., Chiba, S., Saikawa, N., Shimohata, N., Kataiwa, H., and Ito, K.: Membrane-bound proteases of *E. coli*: roles in quality control and stress responses. Keystone Symposia "Conformational Diseases of the Secretory Pathway". Abstract p. 37. New Mexico, U. S. A., 2003
 58. Nakatogawa, H. and Ito, K. Intra-ribosomal regulation of expression and fates of proteins. The 10th East Asian Joint Symposium on Biomedical Research. Abstract p. 54. Kyoto, Japan, 2003
 59. Nakatogawa, H., Murakami, A., Muto, H. and Ito, K. SecM and intra-ribosomal regulation of gene expression at different levels. The Frontier of RNA Science, RNA 2003. Abstract p. 24. Kyoto, Japan, 2003
 60. Akiyama, Y.: Signal transduction through bacterial cell envelope: Transcription regulation mediated by membrane-bound proteases. Workshop "Functional Genomics of *E. coli* Development and Perspectives of Useful Resources". Abstract Oral Session 4-2. Awaji, Hyogo, Japan, 2003
 61. 金原和江、伊藤維昭、秋山芳展: 膜プロテアーゼを介した遺伝子発現制御: 大腸菌 YaeL による表層ストレス応答調節. 第 26 回日本分子生物学会年会シンポジウム「大腸菌におけるタンパク質の細胞内局在と相互作用」. 要旨集 p. 419. 神戸, 2003
 62. 稲葉謙次、高橋洋平、伊藤維昭: 大腸菌における蛋白質ジスルフィド結合導入システムの分子機構. 第3回日本蛋白質科学会年会 シンポジウム 要旨集 p. 14. 札幌, 2003
 63. Shimohata, N., Akiyama, Y. and Ito, K.: Export of DsbA, the disulfide bond formation factor in *E. coli*. 第 76 回日本生化学会大会. 生化学 75, 954. 横浜, 2003
 64. Ito, K.: Protein translocation and quality control machinery in the *E. coli* membrane. 第 76 回日本生化学会大会 マスターズレクチャー. 生化学 75, 665. 横浜, 2003
 65. 森博幸、伊藤維昭: タンパク質膜透過装置 SecA-SecYEG の分子解剖. 日本生体エネルギー研究会第29回討論会「膜輸送とエネルギーと」. 要旨集 p. 54. 横浜, 2003
 66. Akiyama, Y., Kanehara, K., Chiba, S., Saikawa, N., Shimohata, N., Kataiwa, H. and Ito, K.

- Membrane-bound proteases of *E. coli* and their roles in membrane quality control and stress responses. 1st International Symposium of the DFG Priority Program "Proteolysis in Prokaryotes: Protein Quality Control and Regulatory Principles" Abstract p. 19. Schwetzingen, Germany. 2002
67. Ito, K. Elongation control in SecM: arrest from within and release from without. FASEB Summer Research Conferences "Protein Folding in the Cell" Vermont, USA, 2002
 68. Nakatogawa, H. and Ito, K. SecM undergoes translational elongation arrest by interacting with the ribosomal exit tunnel. Gordon Research Conference on Bacterial Cell Surfaces. New Hampshire, U. S. A., 2002
 69. Nakatogawa, H., Murakami, A. and Ito, K. SecM monitors cellular activities of protein export and integration to control the SecA expression. JBS Symposium "Membrane Transporter: Structure and Function Relationship--Insights into ABC Transporter" Ohita, Japan, 2002
 70. Chiba, S. Membrane protein degradation by FtsH, a membrane-bound ATPase/protease; directionality of its action. The 9th East Asian Joint Symposium on Biomedical Research. Abstract p. 64. Suwon, Korea, 2002
 71. 森 博幸, 伊藤維昭. タンパク質膜透過駆動モーターSecA ATPase の機能とその制御. 第2回蛋白質科学会 ワークショップ「エネルギー変換マシンの 作動原理」要旨集 p26. 名古屋, 2002
 72. Akiyama, Y., Chiba, S., Saikawa, N., Shimohota, N., Kanehara, K., Kataiwa, H. and Ito, K. Membrane factors involved in proteolytic quality control and stress responses. 第25回日本分子生物学会年会ワークショップ「こんなところにもシャペロン」要旨集 p. 23. 横浜, 2002
 73. 中戸川仁, 村上亜希子, 伊藤維昭. リボソームトンネルによる翻訳産物の識別と遺伝子発現の制御. 第25回日本分子生物学会年会ワークショップ「バクテリアの分子生物学:新たな挑戦」要旨集 p. 29. 横浜, 2002
 74. 金原和江, 伊藤維昭, 秋山芳展. 大腸菌における膜蛋白質の2段階分解反応を通じた遺伝子調節. 第25回日本分子生物学会年会ワークショップ「バクテリアの分子生物学:新たな挑戦」要旨集 p. 30. 横浜, 2002
 75. Mori, H., Satoh, Y., Chiba, K., Shimokawa, N., Tsukazaki, T., Kimura, Y. and Ito, K. Molecular dissection of SecYEG protein translocase channel. 第75回日本生化学会大会. シンポジウム「タンパク質のトポジェネシス:細胞内タンパク質配置の生化学」生化学 74, 617. 京都, 2002
 76. Nakatogawa, H., Murakami, A. and Ito, K. Biological significance of the SecM translational arrest within the ribosome. 第75回日本生化学会大会. シンポジウム「タンパク質の一生:誕生から成熟、移動、品質管理まで」生化学 74, 631. 京都, 2002
 77. 金原和江, 伊藤維昭, 秋山芳展. 大腸菌の細胞表層ストレス応答における Regulated Intramembrane Proteolysis の役割. 第75回日本生化学会大会. シンポジウム「構造異常タンパク質の細胞内関知機構と細胞応答」生化学 74, 642. 京都, 2002
 78. 稲葉謙次, 伊藤維昭. 大腸菌における蛋白質ジスルフィド結合導入システムの生物物理化学. 第75回日本生化学会大会. シンポジウム「蛋白質分子のレベルでみるレドックス反応の生体内カスケード」生化学 74, 632. 京都, 2002

② 口頭発表 (国際会議 1 件)

1. Mori, H., Symersky, J., Vassilyev, M.N., Tsukazaki, T., Kimura, Y., Tahirov, T.H., Ito, K. and Vassilyev, D. Crystal structure of the translocation ATPase SecA from *Thermus thermophilus* reveals a parallel, head-to-head dimer. ASM-FEMS Conference Protein Traffic in Prokaryotes. Greece, Abstract p. 14, May 6-10, 2006

③ ポスター発表 (国内会議 24 件、国際会議 24 件)

2. Maegawa, S., Koide, K., Ito, K., Akiyama, Y. The intramembrane active site of GlpG, an *E.*

- coli rhomboid protease, is accessible to water and hydrolyzes an extramembrane peptide bond of substrates. FEBS-EMBO Advanced Summer Course "Cellular and Molecular Biology of Membranes", Corsica, France, 2007
3. Mori, H., Shimokawa, N. and Ito, K. Site-specific crosslinking studies of in vivo SecY-SecA interactions. ASM-FEMS Conference Protein Traffic in Prokaryotes. Abstract p. 53, Greece, May 6-10, 2006
 4. Muto, H., Nakatogawa, H. and Ito, K. Mechanism of the SecM-mediated ribosomal stall. ASM-FEMS Conference Protein Traffic in Prokaryotes. Abstract p. 49-50, Greece, May 6-10, 2006
 5. Chiba, S., Ito, K. and Akiyama, Y. The Escherichia coli plasma membrane contains two PHB (prohibitin homology) domain protein complexes of opposite orientations. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Abstract p. 682, Jun 18-23, 2006
 6. Inagaki, K., Uemura, Y., Ito, K. and Tamura, T. Combinatorial mutagenesis of the active-site dipeptide of DsbA. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Abstract p. 159, Jun 18-23, 2006
 7. Koide, K., Ito, K. and Akiyama, Y. Environments of the protease active site of RseP as assessed by site-specific cysteine modification. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Abstract P. 695, Jun 18-23, 2006, 2006
 8. Mitomo, H., Ishizu, Y., Furusawa, H., Tsukazaki, T., Mori, H., Ito, K. and Okahata, Y. Preparation of supported lipid membrane for analyses of membrane proteins on a quartz-crystal microbalance (QCM). 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Abstract p. 337, Jun 18-23, 2006
 9. Muto, H., Nakatogawa, H. and Ito, K. Genetically encoded but non-polypeptide prolyl-tRNA functions in the A-Site for SecM-mediated ribosomal stall. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Abstract. p. 141, Jun 18-23, 2006
 10. Nagamori, S., Shimohata, N., Akiyama, Y., Kaback, H.R. and Ito, K. Mutations in secY alter insertion and folding of lactose permease in the membrane of E. coli. Gordon Research Conference on Bacteria Cell Surfaces. June 25-30 2006, Colby-Sawyer College, New London, NH USA, 2006
 11. Tsukazaki, T., Hiroyuki, M., Fukai, S., Ishitani, R., Perederina, A., Vassylyev, D.G., Ito, K. and Nureki, O. Crystallization and X-ray diffraction of SecYE translocon from Thermus thermophilus with a Fab fragment. 第44回日本生物物理学会年会. 生物物理 46, S235, 沖縄, 2006
 12. Muto, H., Nakatogawa, H. and Ito, K. Mechanism of the SecM-mediated ribosomal stall. Cold Spring Harbor Meeting Translational Control. Abstract p. 228, September 6-10, 2006. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., USA, 2006
 13. Inaba, K., Murakami, S., Suzuki, M., Nakagawa, A., Yamashita, E., Okada, K. and Ito, K. Crystal structure of DsbB-DsbA complex revealing a cysteine relocation mechanism. Switzerland-Japan Symposium on Structural Biology 2006. Abstract p. 45, September, Brunnen, Switzerland, 2006
 14. 塚崎智也、森博幸、深井周也、沼田倫征、A. Perederina、安達宏昭、松村浩由、高野和文、村上聡、井上豪、森勇介、佐々木孝友、D. Vassylyev、濡木理、伊藤維昭. 高度好熱菌由来トランスロコン関連膜タンパク質 SecDF の精製・結晶化ならびにX線回折. 第6回日本蛋白質科学会年会. 要旨集 p. 40, 京都, 2006
 15. 前河早希、小出佳代、伊藤維昭、秋山芳展. 大腸菌 Rhomboid ファミリー膜プロテアーゼ GlpGの活性部位の環境. 日本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」. 要旨集 p.290, 名古屋, 2006
 16. Mori, H. and Ito, K.: The long α -helix of SecA is important for the coupling of ATP hydrolysis with protein translocation Gordon Research Conferences "Protein transport across cell membranes". June 15-17, New Hampshire, USA, 2005
 17. Takahashi, Y.-h., Inaba, K., Hayashi, S. and Ito, K.: A ubiquinone-thiolate charge transfer complex formed on DsbB, a membrane protein that drives DsbA-dependent oxidative protein folding. FEBS/EMBO Advanced Lecture Course "Cellular and Molecular Biology of

- Membranes", June 20-July 1, Cargese, Corsica, France, 2005
18. Mori, H., Shimokawa, N. and Ito, K.: Site-specific crosslinking studies of in vivo SecY-SecA interactions. International Symposium on Life of Proteins. Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell. 10.30-11.3, Awajisima, Hyogo, Japan, 2005
 19. Tsukazaki, T., Mori, H., Peredrerina, A., Vassylyev, D. G., Fukai, S., Nureki, O. and Ito, K.: Structural analysis of *Thermus thermophilus* protein translocation complexes. International Symposium on Life of Proteins. Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell. 10.30-11.3, Awajisima, Hyogo, Japan, 2005
 20. Takahashi, Y.-h., Inaba, K. and Ito, K.: Role of the cytosolic loop of DsbB in catalytic turnover of the ubiquinone-DsbB complex. International Symposium on Life of Proteins. Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell. 10.30-11.3, Awajisima, Hyogo, Japan, 2005
 21. Maegawa, S., Ito, K. and Aikyama, Y.: Proteolytic action of GlpG, a rhomboid protease in the *E. coli* cytoplasmic membrane. International Symposium on Life of Proteins. Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell. 10.30-11.3, Awajisima, Hyogo, Japan, 2005
 22. 武藤洋樹、中戸川仁、伊藤維昭: SecMにおける翻訳アレストの作用点. 第28回日本分子生物学会年会. 要旨集 p. 458. 12.7-10, 福岡, 2005
 23. 才川直哉、鈴木博文、秋山芳展、伊藤維昭、木村能章: 電子顕微鏡による大腸菌 FtsH プロテアーゼの構造解析. 日本生物物理学会第43回年会. 生物物理 45, SUPPLEMENT 1, S236. 11.23-25, 札幌, 2005
 24. 才川直哉、鈴木博文、木村能章、秋山芳展、伊藤維昭: 大腸菌 FtsH の電子顕微鏡解析. 第5回日本蛋白質科学会年会. 予稿集 p. 104. 6.30-7.2, 福岡, 2005
 25. Takahashi, Y.-H., Inaba, K. and Ito, K.: Biochemical characterization of the menaquinone-driven disulfide bond formation pathway of *Escherichia coli*. The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science. Abstract p. 213. April 14-18, Yokohama, 2004
 26. Shimohata, N., Akiyama, Y. and Ito, K.: SecY alterations that lead to abnormal membrane protein assembly. Cold Spring Harbor Meeting "Molecular Chaperones & the Heat Shock Response" Abstract p. 202. May 5-9, Cold Spring Harbor, N. Y., USA, 2004
 27. Mori, H., Tsukazaki, T., Vassylyev, D. and Ito, K.: Protein translocase from *Thermus thermophilus* HB8. Gordon Research Conference on Bacterial Cell Surfaces. June 27-July 2, New London, New Hampshire, USA, 2004
 28. Takahashi, Y.-h., Inaba, K. and Ito, K.: Characterization of the menaquinone-driven disulfide bond formation pathway of *Escherichia coli*. Gordon Research Conference on Bacterial Cell Surfaces. June 27-July 2, New London, New Hampshire, USA, 2004
 29. Sakoh, M., Ito, K. and Akiyama, Y.: HtpX, a stress-controlled and membrane-bound protease in *E. coli*. FASEB Summer Research Conference "Protein Folding in the Cell" July 31-August 5. Saxtons River, Vermont, USA, 2004
 30. Yamamoto, N., Mori, H. and Ito, K.: Characterization of *Thermus thermophilus* HB8 SecA. 第77回日本生化学会大会. 生化学 76, 931. 10. 13-16, 横浜, 2004
 31. Sakoh, M., Ito, K. and Akiyama, Y.: HtpX, a putative metalloprotease of *E. coli* involved in quality control of plasma membrane proteins. 第77回日本生化学会大会. 生化学 76, 947. 10. 13-16, 横浜, 2004
 32. Maegawa, S., Ito, K. and Akiyama, Y.: Characterization of GlpG, a rhomboid protease in *E. coli*. 第77回日本生化学会大会. 生化学 76, 947. 10. 13-16, 横浜, 2004
 33. Nakatogawa, H., Niki, H., Murakami, A. and Ito, K.: SecM translation arrest: roles in up-regulation of both the quantity and the functionality of SecA. EMBO Lecture Course "Cellular and Molecular Biology of Membranes". Cargese, Corsica, France, 2003
 34. Kanehara, K., Ito, K. and Akiyama, Y.: Proteases involved in RIP (regulated intramembrane proteolysis)-activation of the sigma E stress response pathway. EMBO Lecture Course "Cellular and Molecular Biology of Membranes". Cargese, Corsica, France, 2003
 35. 下畑宣行、秋山芳展、伊藤維昭: 膜タンパク質組み込み不全を引き起こす secY 変異. 第26回日本分子生物学会年会. 要旨集 p. 726. 神戸, 2003

36. 下川直美、森博幸、佐藤康成、伊藤維昭: SecY の膜貫通領域 3、4 の Cys scanning 変異解析. 第 26 回日本分子生物学会年会. 要旨集 p. 726. 神戸, 2003
37. 酒向万智子、伊藤維昭、秋山芳展: 大腸菌膜内在性プロテアーゼ HtpX. 第 26 回日本分子生物学会年会. 要旨集 p. 726. 神戸, 2003
38. 才川直哉、秋山芳展、伊藤維昭: FtsH プロテアーゼは大腸菌細胞質膜に巨大な複合体として存在する. 第3回日本蛋白質科学会年会. 要旨集 p. 90. 札幌, 2003
39. 高橋洋平、高橋由貴、稲葉謙次、伊藤維昭: 酸化還元酵素 DsbB における Cys41-X-X-Cys44 モチーフの機能的役割. 第3回日本蛋白質科学会年会. 要旨集 p. 93. 札幌, 2003
40. Mori, H., Tzukazaki, T., Johnson, A.E., Kimura, Y., Akiyama, Y. and Ito, K.: FRET analysis of protein translocase from *Thermus thermophilus* HB8. 第 76 回日本生化学会大会. 生化学 75, 953. 横浜, 2003
41. Kanehara, K., Ito, K. and Akiyama, Y.: YaeL proteolysis of RseA, the membrane-bound anti-sE, is controlled by the PDZ domain of the enzyme and a glutamine-rich region of the substrate. 第 76 回日本生化学会大会. 生化学 75, 1149. 横浜, 2003
42. Inaba, K., Takahashi, Y. and Ito, K. Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction cascade. FASEB Summer Research Conferences "Protein Folding in the Cell" Vermont, USA, 2002
43. Shimohata, N., Chiba, S., Saikawa, N., Ito, K. and Akiyama, Y. The Cpx stress response system of *Escherichia coli* senses plasma membrane proteins and controls HtpX, a membrane protease with a cytosolic active site. Gordon Research Conference on Bacterial Cell Surfaces. New Hampshire, U. S. A., 2002
44. Kanehara, K., Akiyama, Y. and Ito, K. Characterization of the yaeL gene product and its S2P-protease motifs in *Escherichia coli*. Gordon Research Conference on Bacterial Cell Surfaces. New Hampshire, U. S. A., 2002
45. Inaba, K. and Ito, K. Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction cascade. Gordon Research Conference on Bacterial Cell Surfaces. New Hampshire, U. S. A., 2002
46. 村上亜希子、中戸川仁、伊藤維昭. SecM 翻訳停止機構の細胞における役割. 第 75 回日本生化学会大会. 生化学 74, 888. 京都, 2002
47. 秋山芳展. 大腸菌 ATP 依存性膜プロテアーゼ FtsH のタンパク質分解活性はプロトン駆動力によって促進される. 第 75 回日本生化学会大会. 生化学 74, 1041. 京都, 2002
48. 高橋由貴、稲葉謙次、伊藤維昭. 酸化還元酵素 DsbB CXXC モチーフの変異解析. 第 75 回日本生化学会大会. 生化学 74, 885. 京都, 2002.

(4)特許出願

- ①国内出願 (0 件)
- ②海外出願 (0 件)

(5)受賞等

- ①受賞
なし

②新聞報道

Cell 誌に掲載された DsbA-DsbB-ユビキノン複合体の結晶構造解析の論文が科学新聞(11月24日1面)、京都新聞(11月17日30面)及び日刊工業新聞(11月17日27面)で紹介された。

③その他

(6)その他特記事項

7 研究期間中の主な活動 ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 16 年 6 月 1 日～2 日	シンポジウム「蛋白質と遺伝子の細胞内動態の共役:モデル生物大腸菌を用いた統合の試み」	ウェルサンピア沼津	70 名	当チームの研究課題の推進にあたって、我々が研究材料として主に用いているモデル生物大腸菌の特徴と強みを生かした総合的な理解を目指すことは重要である。大腸菌はゲノム、代謝、蛋白質、などの情報が最も詳しく研究されている生物であり、ゲノムにコードされた蛋白質の動態を細胞全体の統合された反応として理解し、また、それがゲノムの構成や発現制御にフィードバックする様を理解することが可能である。そのため、異なる蛋白質や遺伝子に関する最近の情報を討論し、総合する機会が必要である。我が国において大腸菌を研究対象としている研究室・グループが集まり、院生やポストクの講演を通して研究成果の交流を行った。
平成 17 年 6 月 23 日～24 日	「モデル生物大腸菌の統合的理解にむけて」	メルパール伊勢志摩	90 名	我が国において大腸菌を研究対象としている研究室・グループが集まり、院生やポストクの講演を通して研究成果の交流を行うことにより、モデル生物としての大腸菌の統合的理解を深めた。
平成 18 年 10 月 3 日～4 日	大腸菌研究会	滋賀厚生年 休 暇 セ ン タ ー	76 名	蛋白質の細胞内動態を一つの生物(大腸菌)の視点から統一的に理解するための研究討論を行う

8 結び

CRESTには、生命活動のプログラムの課題「蛋白質の膜を越えたダイナミズムを支える細胞機能」に引き続いて採択していただきました。実質11年間のご援助により、当初の想定「本音」以上に研究が進みました。その中にはSecMのように、予測を遙かに超えたおもしろいものを捕まえることもできました。SecMの研究はペプチド抗体を注文したことからスタートしました。もちろん、我々の中で興味の対象にリストアップはされておりましたが、CRESTご援助による予算の余裕がなければ、とても実際に実行することはできなかったプロジェクトでした。以下の文章は、最近「蛋白質核酸酵素」に記した拙文の一部ですが、恥を顧みず引用させていただきます：『「大学院＝中学校」説。－ 略 － おそらく、どんな職業・分野でも共通かと思われるが、中学生でもわかる程度の理屈が最も大切だ。難しそうなことも、できる限りこのレベルの単純さに還元して理解しようとするのが最も本質的な理解につながるのではないか・・・と言う意味である。もちろん、それらが複数組み合わせられて「合成」されていくと、中学レベルよりは少し高度な意味合いも生じてくる。そして、新しい概念に到達することこそが、最大の喜びであり、研究する者の義務でもあると考える今日この頃である。』本研究でも、SecMをはじめとして、「新しい概念」と言えるものが、ささやかなものも含めて

数多く得られたことは大いなる喜びでした。もちろん、自己満足に終わっては意味がありません。幸い、例えばSecMのもたらした「新しい概念」はリボソームに対する人々の見方を変えさせるものになっていると思いますし、新たな実験ストラテジーの基にもなっています。・・・ここで、頭に乗っけてもう一つ、今年「生化学」に記した文章から抜粋させていただきます：『教育や研究については、「市場原理」に相当する自発性を鼓舞する仕組みがほとんど考慮すらされていないように思われる。不思議なことである・・・研究に関しては、政府や研究費提供機関が科学研究の枠組みや方向性を「計画する」ことの本質的な問題点を、「市場原理」と対比しつつ指摘することができる。科学技術基本計画やそれに基づく効率的な目的追求が一定程度重要であることは言を待たないとしても、そもそも計画が可能な課題とは重要性が既知である点で過去のものとも言える・・・科学の根源的な進歩に関わる部分は計画の対象にならないかも知れない・・・科学が持つ一見歯がゆい側面と計画経済的政策とが適正な割合で共存するよう、さじ加減を適度に設定する・・・「人類が新規知識を創造するためのコスト」と「既存の成果を役立たせるためのコスト」のさじ加減だ。・・・科学者が研究費獲得のため政策的目的に合わせた作文に追われているとすれば、計画経済に偏り過ぎではないだろうか・・・』 ささやかながら、予想外の発見に出くわしたものとして、改めてこのようなことを感じ、JST が我々のような基礎分野に寛大な援助を下されたことに感謝申し上げます。このグループは、もともと秋山さんと私で、in vivo 解析と遺伝学的アプローチから出発したのですが、CRESTの研究期間中に構造生物学に実際に携わることができるようになり、最後の年に向かって、構造決定の具体的成果が次々と出てきたことは、「予想外の結果」とはニュアンスが違いますが、対象が膜タンパク質であることもあり、構造生物学は素人の我々にとっては、期待以上の成果ともなりました。構造生物学に関しては、特に稲葉さんの忍耐強く自分の立てた目的にチャレンジする姿勢、森さんの高度好熱菌の実験系に着目して実験系を開発した慧眼を指摘したいと思います。そして、惜しみないご援助を下された外部の共同研究者と先生方に厚く御礼を申し上げます。最後に、この研究の終わりと、私の定年退職がほぼ重なったことから生じた、定年後の研究期間の延長に関しての勝手なお願いを認めてくださったことにお詫びと感謝を申し上げます。