

《農芸化学奨励賞》

圧力生理学から見た高水圧による酵母生理機能の活性化



独立行政法人海洋研究開発機構 極限環境生物圏研究センター グループリーダー 阿部 文 快

熱を加えるとゆで卵ができるように、圧力をかけると“圧卵”ができる。温度と圧力が不可逆的なタンパク質変性をもたらした結果が、それぞれゆで卵と圧卵である。“圧力”という言葉から連想するイメージは人それぞれだと思うが、総じてネガティブで抑制的ではなからうか。実際、大気圧下にすむ生物の働きは、多くの場合高圧で損なわれる。ところが深海の好圧性細菌は、逆に数百気圧もの高圧環境を好んで生きている。この違いは何なのだろうか？ 生物は圧力をどのようにして認識しているのか？ 研究に際してまずはじめに圧力作用の本質とは何かを考えることにした。その過程で提唱したのが、“圧力生理学 (Piezophysiology)”である。実験材料に選んだ出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、こうした新しい研究領域を開拓するのに最適なモデル生物である。

1. トリプトファン輸送と酵母の高圧増殖

ある日、圧力培養した酵母菌を見ながら、ふと不思議な変化に目が止まった。酵母を高圧培養しながら顕微鏡観察していた。すると培養後6時間を経過したところから、20~30 MPa (200~300 気圧、水深 2,000~3,000 m 相当) の細胞で出芽率が減り細胞が丸くなってきた。FACS 解析から、このとき細胞周期が G₁ 期停止していることがわかった。思いつきで、培養液に 20 種類のアミノ酸やその誘導体、糖類などを一つ一つ別々に過剰に入れて高圧培養してみた。するとトリプトファンを加えたバッチでのみ細胞は増殖したのだ。白濁する培養チューブを見たときの驚きは今でも忘れられない。菌株の遺伝子型を見たら、*trp1 leu2 lys2 his3 ura3 ade2* で、トリプトファン要求株だった。手持ちのトリプトファン要求性と非要求性の株をすべて調べたところ、加圧すると前者 (Trp⁻ 株) は例外なく G₁ 期停止し、後者 (Trp⁺ 株) は増殖速度は落ちるにせよ皆 25 MPa で増えた。残りの 5 種の要求性に関しては影響がないのに、トリプトファンだけ劇的な効果を生むのがとても不思議に思えた。

次に高親和性トリプトファン輸送体 Tat2 を高発現させてみ

た。すると、やはり細胞は 25 MPa で良好に増殖し、しかも 15°C 以下の低温下でもよく増殖するようになった。高圧と低温、あたかも深海環境のような条件だが、トリプトファンの取り込みさえ十分に行えればいずれの条件下でも増殖するようになる。高圧と低温は生体膜の秩序を増し流動性を低下させるが、その際、直ちに悪影響を被るのがトリプトファン輸送だったのである。

酵母のトリプトファン輸送は外乱に弱く、“細胞のアキレス腱”と呼ばれている。吸入麻酔剤のイソフルラン、副腎白質ジストロフィー治療薬の 4-フェニル酪酸、有機弱酸、フィトスフィンゴシン、そして高圧と低温という一見関連性のない要因でトリプトファン要求株の増殖は止まる。そして多くの場合、Tat2 高発現により耐性となる。こうした薬剤はいずれも生体膜に分配されるので、膜構造に影響を及ぼす。つまり、膜構造変化の影響を一番に被るのがトリプトファン輸送体なのだ。高圧下に生きる深海の生物ではトリプトファン輸送系に何か違いがあるのかもしれない。ではなぜトリプトファンだけなのか？ 明確な答えはないのだが、20 種類のアミノ酸の中では分子量が最大であり、天然の存在割合が最も少ないなどの理由で、輸送系は進化の過程で特殊化したのかもしれない。

2. 高圧増殖変異とユビキチンシステム

次に高圧下で増殖する変異株の単離を試みた。その結果、細胞のユビキチンシステムが高圧増殖や Tat2 の制御に重要なことがわかってきた。得られた多数の変異株は、準優性な 4 相補群に分類され、それらを *HPG* (high-pressure growth) 1, *HPG* 2, *HPG* 3 および *HPG* 4 とした。*HPG* 1 の 4 変異アレルは、いずれも HECT 型ユビキチンリガーゼ Rsp5 の触媒ドメインのアミノ酸の置換だった。Rsp5 はバラエティーに富んだ役割を演じている。Tat2 はそのユビキチン分解の標的の一つだった (表 1)。実際、野性株を 25 MPa で培養すると Tat2 は速やかに分解された。ところが *HPG* 1 株では、Tat2 が細胞膜に多量に蓄積し、かつ高圧培養後も Tat2 は分解されなかった。Rsp5 の結

表 1 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のトリプトファン要求株が高圧下で増殖する条件

培養条件や変異、遺伝子破壊	説明
トリプトファンの過剰投与	完全培地に 1 g/L 添加
Tat1 または Tat2 の高発現	多コピープラスミド導入
<i>HPG</i> 1 変異	Rsp5 ユビキチンリガーゼ HECT ドメインのアミノ酸置換: <i>HPG1-1</i> (Rsp5 ^{Pro514>Thr}), <i>HPG1-2</i> (Rsp5 ^{Cys517>Tyr}), <i>HPG1-3</i> (Rsp5 ^{Cys517>Phe}), <i>HPG1-4</i> (Rsp5 ^{Ala799>Thr})
<i>HPG</i> 2 変異	Tat2 の細胞質ドメインのアミノ酸置換: <i>HPG2-1</i> (Tat2 ^{Glu27>Phe}), <i>HPG2-2</i> (Tat2 ^{Asp563>Asn}), <i>HPG2-3</i> (Tat2 ^{Glu570>Lys})
<i>HPG</i> 3, <i>HPG</i> 4 変異	未同定
Bul1 欠損	Rsp5 結合タンパク質
Doa4 欠損	脱ユビキチン化酵素
Ubp6 欠損	26S プロテアソーム構成因子
Ubp14 欠損	ポリユビキチン鎖の分解に関与
Vps27 欠損	MVB 上のユビキチン受容体

合タンパク質 Bul1 の欠損株も高圧増殖能を示し、やはり Tat2 は安定化していた。HPG2 の 3 変異アレルは、面白いことに Tat2 タンパク質そのものの細胞質ドメインのアミノ酸置換で、やはり Tat2 (Hpg2 と呼んでもいい) が高圧下で安定化していた (表 1)。HPG3 と HPG4 変異は未同定である。その他にも、脱ユビキチン化酵素 Doa4, 26S プロテアソーム構成因子 Ubp6, ポリユビキチン鎖の分解を担う Ubp14, あるいは MVB (multivesicular body) 上のユビキチン受容体 Vps27 など欠く変異株では、いずれも Tat2 が分解されず高圧増殖能を示した。このように、トリプトファン要求株を使って高圧増殖変異株を単離・解析するということが、高圧による Tat2 の分解経路を明らかにすることにほかならない。一連の現象を集約する鍵となったのが、次に示す脂質ラフト (lipid raft) である。

3. 脂質ラフトにおけるトリプトファン輸送体の制御

脂質ラフトは、スフィンゴ脂質やコレステロール (酵母ではエルゴステロール) を含む秩序の高い細胞膜ドメインで、それ以外のグリセリン脂質部分 (以下、ノンラフト) と区別される。野生株で Tat2 はノンラフトに存在することがわかった。ところが、HPG1 や HPG2 変異により Tat2 はラフトに取り込まれ、細胞膜に効率よく運ばれるようになった。一方、Tat2 のホモログで低親和性のトリプトファン輸送体 Tat1 や H⁺-ATPase Pma1 は、野生株でラフトに存在し、HPG1 変異による局在の変化はなかった。こうした膜貫通領域 (TMD; transmembrane domain) の多いタンパク質では、何がラフト/ノンラフト局在を決めているのか? また、なぜ Tat2 ではユビキチン変異—それがリガーゼの変異であっても Tat2 自体に起きて一局在が変わるのか? 私たちは、TMD の極性アミノ酸残基数に着目した。すなわち、その数が多いと膜中で不安定なため、エルゴステロールの水酸基や共鳴 π 電子が電荷を遮蔽しているという仮説である。TMD 内に極性アミノ酸残基の多い Tat1 や Pma1 は、エルゴステロールと相互作用した結果ラフト局在する。一方、Tat2 は著しく疎水的であるがゆえノンラフトでも安定なのだろう。ただし、ノンラフトは秩序が

低い。温度や圧力変化による膜の摂動が Tat2 タンパク質を変性の危機にさらす。これをきっかけに、変性した Tat2 はエルゴステロールと相互作用しラフトに取り込まれる。野生株では Rsp5 による品質管理機構が働いて、変性 Tat2 はユビキチン化によって処理される。一方、HPG1 株や HPG2 株ではこれを行わず、結果として Tat2 はラフトに蓄積する。このように、Rsp5 はラフトで待ちかまえていて、常に Tat2 など膜タンパク質の構造を監視しているのではなかろうか? この仮説はノンラフトにしかないはずの野生型 Tat2 が、ユビキチン化能の低下をきっかけにラフトに出現する、という不思議な現象をうまく説明する。私たちは、細胞を圧力培養したときに Tat2 が分解される理由が、膜タンパク質の“品質管理”にあるのではないかと考えている。

4. 圧力を利用したトリプトファン輸送のダイナミクス解析

トリプトファンの輸送に伴う輸送体の構造変化を、活性化体積 (ΔV^\ddagger) の測定から検討した。その結果、以下に示すように、Tat1 と Tat2 はトリプトファン輸送時に非常に大きな構造 (体積) 変化を示すことが明らかとなった。活性化体積は、次の式で与えられる。

$$(\partial \ln k_{\text{cat}} / \partial p)_T = -\Delta V^\ddagger / RT$$

ここで k_{cat} は高圧条件下で測定されたトリプトファンの取り込み速度、 p は圧力、 T は絶対温度、 R は気体定数である。Tat1 と Tat2 を介するトリプトファン輸送の ΔV^\ddagger は、それぞれ 89.3 および 50.8 mL/mol という非常に大きな値を示した (図 1)。このことは、トリプトファン輸送の遷移状態では、輸送体タンパク質が大きく膨張することを意味している。こうした大きな構造変化がトリプトファン輸送の特徴であり、高圧・低温あるいは薬剤感受性の原因となっているのであろう。トリプトファン輸送に関して興味深いのは、Tat1 は Tat2 の約 2 倍の体積変化を示した点である。Tat1 は秩序の高いラフトに存在しているにもかかわらず、秩序の低いノンラフトに存在する Tat2 より体積変化が大きいの意外だった。おそらくこれは、基底状態の体積は Tat1 の方が小さいが ($V_{\text{Tat1}} < V_{\text{Tat2}}$)、遷移状態ではほぼ同等になるため ($V_{\text{Tat1}}^\ddagger = V_{\text{Tat2}}^\ddagger$)、体積差としては

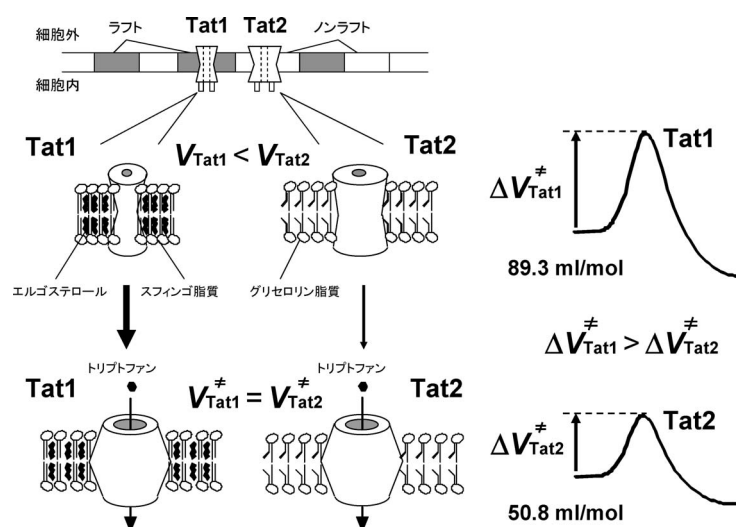


図 1 トリプトファン輸送に伴うダイナミックな構造変化

トリプトファン輸送体 Tat1 と Tat2 では輸送に伴う活性化体積が非常に大きく、ダイナミックに構造変化していることがわかる。 $\Delta V^\ddagger_{\text{Tat1}} (=V_{\text{Tat1}}^\ddagger - V_{\text{Tat1}}) > \Delta V^\ddagger_{\text{Tat2}} (=V_{\text{Tat2}}^\ddagger - V_{\text{Tat2}})$ であり、その差は両者の膜内局在、すなわちラフトにあるかノンラフトにあるかを反映している。

Tat1 依存性の方が大きくなる ($\Delta V_{\text{Tat1}} > \Delta V_{\text{Tat2}}$) からではないかと考えている。このように、圧力は膜タンパク質のダイナミズムを体積変化の視点から解析するユニークな研究手法といえる。

5. おわりに

圧力と薬剤の決定的な違いは、圧力作用は可逆的で系に何ら因子を加えず、除圧すれば元に戻せる点にある。温度と組み合わせれば、膜の状態をかなり幅広くコントロールできるので、うまく条件さえ整えてやれば、生命現象、特に生体膜にかかわる機能を探るユニークなアプローチが実現可能だ。圧力という未知因子が細胞という複雑なシステムにいかなる影響を及ぼすのか、圧力生理学の課題は無数に残されている。こうした取り組みを「化学と生物」誌の 2004 年 9 月号にて解説する機会をいただいたので、ご笑覧いただけたら幸いである。

本研究は独立行政法人海洋研究開発機構において行われたものです。このたび本奨励賞へのご推薦を賜り、また個人の思想を尊重する方針でご指導くださった掘越弘毅先生（独立行政法人海洋研究開発機構、センター長）、大学院時代の恩師であり研究者としての礎を築いてくださった前田靖男先生（東北大学大学院生命科学研究科教授）、酵母研究を始めて以来、多大なご指導と激励くださった飯田秀利先生（東京学芸大学教育学部教授）、我が国の高圧研究を先導なさっている林 力丸先生（日本大学生物資源科学部教授）、好圧性・深海微生物研究の先駆けで、良き研究仲間である加藤千明先生（海洋研究開発機構、グループリーダー）、井上 明先生（東洋大学生命科学部教授）、海洋研究開発機構の同僚の皆様、そして日本農芸化学会の奨励賞選考委員の諸先生方に心から感謝申し上げます。