

《日本農芸化学会賞》

## 細菌における蛋白質局在化機構の研究



東京大学分子細胞生物学研究所 教授 徳田 元

単細胞生物である細菌が生存し繁殖するためには、細胞質膜を含む細胞表層構造（エンベロープ）が決定的に重要である。ここでは、さまざまな環境変化の中でも生存し繁殖するための重要な仕組みがある。特に外膜をもつグラム陰性細菌のエンベロープには、各種の蛋白質分泌・局在化機構が存在し、細菌の生存と繁殖に重要な役割を果たしている。

細菌のエンベロープ形成の根幹をなす機構が、Sec 蛋白質輸送装置である。ペリプラズムと外膜に存在する蛋白質の大部分が、シグナルペプチドをもった前駆体として細胞質で合成され、この装置によって細胞質膜の外側に運搬される。シグナルペプチドは細胞質膜を超えて蛋白質を輸送するために必須であるが、その後の局在場所を決定する機能はない。グラム陰性細菌では、細胞質膜を超えた後の蛋白質はペリプラズムに存在する各種のシャペロンや、局在化機構によってそれぞれ所定の場所に運ばれる。Sec 蛋白質輸送装置は、細胞質膜を超える蛋白質だけでなく細胞質膜を構成する蛋白質の膜挿入にも必要である。

## 1. Sec 蛋白質輸送装置の構造と機能

筆者が故 水島昭二教授のグループに加わり、大腸菌の蛋白質輸送機構の研究を始めた当時、輸送に関与すると思われる遺伝子が変異株の分離からすでに示唆されていた。しかし、変異株は輸送機能が部分的に低下したか変化したものであった。これら先駆的な遺伝学的研究によっても明確な結論が得られていなかったため、輸送機構を生化学的に解析することが緊急の課題であった。William Wickner や P. C. Tai らのグループが生化学的研究を開始し、Jon Beckwith や Tom Silhavy らが遺伝学的解析を精力的に展開する競争の厳しい研究分野であった。

## 1.1 蛋白質輸送のエネルギーと装置の再構成

筆者は細菌細胞質膜に存在する物質輸送機構のバイオエネルギーを、再構成系などを用いて研究していた。この研究経験を活かし、蛋白質輸送機構の研究に新たな展開を試みた。その結果、蛋白質輸送反応に ATP は必須であり、プロトン駆動力は促進的に働くことを示し、蛋白質輸送は 2 種類のエネルギーによって駆動されるユニークな反応であることを明らかにした。

遺伝学的解析から示唆されていた膜内在性 Sec 因子が、蛋白質輸送反応に関与するかどうかを明らかにするため、因子を精製しプロテオリポゾームに再構成して蛋白質輸送反応を調べた。その結果、反応に必要な因子は、ATPase である SecA と、膜内在性 SecY, SecE であることを初めて明らかにした。一方、Wickner らは SecY, SecE が主成分である複合体と SecA から再構成に成功した。この複合体には、他の蛋白質が多数混在していたが、両グループの結論は、蛋白質輸送反応の最少単位が SecA, SecY, SecE の 3 因子であることで一致していた。

## 1.2 新因子 SecG の発見とその役割の解明

SecA, SecY, SecE から再構成したプロテオリポゾームの蛋

白質輸送活性を著しく上昇させる新因子が細胞質膜にあることを発見し、この因子 (SecG) を同定した。SecG は、SecY, SecE とともに、蛋白質輸送装置の中核となる構造を形成する因子であり、SecYEG 複合体という名称が広く定着している。

Wickner らは ATP の結合と加水分解によって SecA が前駆体蛋白質とともに膜に挿入し、前駆体から解離して膜から抜け出すサイクルを繰り返すことが蛋白質輸送の駆動力であることを見いだした。筆者らは新因子 SecG の機能を詳細に解析する過程で、SecA サイクルに共役して SecG が膜内配向性を大きく変化させることを見だし、蛋白質輸送反応の促進は SecA サイクルの促進によることを明らかにした。

SecG は、プロトン駆動力が存在しないときに特に強く蛋白質輸送反応を促進することを明らかにした。すなわち、SecG とプロトン駆動力の役割がある程度相互に補完的であることに着目し、SecA の構造変化にプロトン駆動力が与える影響を調べた。その結果、プロトン駆動力は SecA が膜から抜け出す過程を促進することを見いだした。これらの結果から、蛋白質輸送反応のエネルギー要求機構を統一的に理解できるモデルを提唱した。

## 2. リポ蛋白質の選別と外膜局在化機構

生体膜は、その内葉と外葉のどちらもリン脂質で構成された対称的な脂質二重層が基本構造である。生体膜を貫通する蛋白質には疎水性残基が連続した膜貫通セグメントがあり、これが  $\alpha$  ヘリックスを形成して膜を貫通している。一方、グラム陰性細菌の外膜は外葉をリポ多糖、内葉をリン脂質が構成する非対称的な構造である。また、外膜を貫通している蛋白質は、疎水性残基が片側に配列する両親媒性の  $\beta$  構造からなるバレル構造が一般的である。この理由は、典型的膜貫通セグメントをもった蛋白質を、細胞質膜を超えて外膜にまで運ぶ機構がないためである。一方、両親媒性の  $\beta$  構造は細胞質膜を超える支障にはならない。細菌に広く存在するリポ蛋白質は、アミノ末端のシステインが脂質で修飾されていることにより、膜と強く相互作用する蛋白質である。リポ蛋白質の脂質修飾は、細胞質膜のペリプラズム側で起きるため、細胞質膜の通過に影響しない。すなわち、両親媒性の  $\beta$  構造と同様、リポ蛋白質の脂質修飾は細胞質膜を超えて外膜に局在する蛋白質を作るために重要であると考えられる。大腸菌には 90 種以上のリポ蛋白質が存在し、大部分は外膜にアンカーしている。

大腸菌のリポ蛋白質は、井上正順らの先駆的な研究によりシステインの次がアスパラギン酸の場合のみ細胞質膜にとどまることが示唆されていたが、その機構は不明であった。Sec 蛋白質輸送装置の研究に引き続き、この課題に取り組んだ。

## 2.1 リポ蛋白質の選別輸送系

リポ蛋白質はシグナルペプチドをもつ前駆体として細胞質で合成され、Sec 蛋白質輸送装置によって細胞質膜を通過する。

その後細胞質膜のペリプラズム側で、脂質修飾とシグナルペプチドの切断が段階的に進行し成熟体となる。スフェロプラストでリポ蛋白質を生成すると成熟体となっても細胞質膜にとどまったままであるが、ペリプラズム画分存在下で生成すると細胞質膜から遊離することに着目し、ペリプラズムのリポ蛋白質遊離因子 LolA を同定した。LolA による遊離は外膜リポ蛋白質に特異的であり、LolA と水溶性の複合体を形成して細胞質膜から遊離するかどうかを外膜移行を決定していることを明らかにした。つづいて、LolA と水溶性の複合体を形成したリポ蛋白質は、外膜に組み込まれることを見だし、リポ蛋白質組み込み活性をもつ外膜因子 LolB を同定した。

LolA に依存したリポ蛋白質の遊離には ATP が必須であることを見だし、リポ蛋白質遊離活性をプロテオリポゾームに再構成することに成功した。精製の結果、3種の蛋白質からなる複合体が遊離活性をもつことを明らかにした。複合体は、2種の膜サブユニット LolC, LolE それぞれ1分子と、2分子の ATPase サブユニット LolD からなる ABC (ATP-binding cassette) トランスポーターであることを明らかにした。LolCDE 複合体は脂質二重層の片側にアンカーしたりポ蛋白質を遊離する、これまでに知られていないタイプの ABC トランスポーターである。こうしてリポ蛋白質を選別し、膜局在化を司る Lol システムの全容を明らかにした (図1)。

## 2.2 Lol システムの分子機構

LolA に依存したスフェロプラストからのリポ蛋白質遊離実験系で、リポ蛋白質の選別シグナルを系統的に解析し、システインの次の残基がアスパラギン酸の場合リポ蛋白質は細胞質膜特異的となることを明らかにした。この理由は、アスパラギン酸をもつリポ蛋白質が、LolCDE の認識を受けないためであること、すなわちアスパラギン酸は、Lol 回避シグナルとして働くことを明らかにした。さらに、アスパラギン酸をもつリポ蛋白質が LolCDE の認識を回避する機構を解析し、細胞質膜のリン脂質が重要であることを明らかにした。ホスファチジルエタ

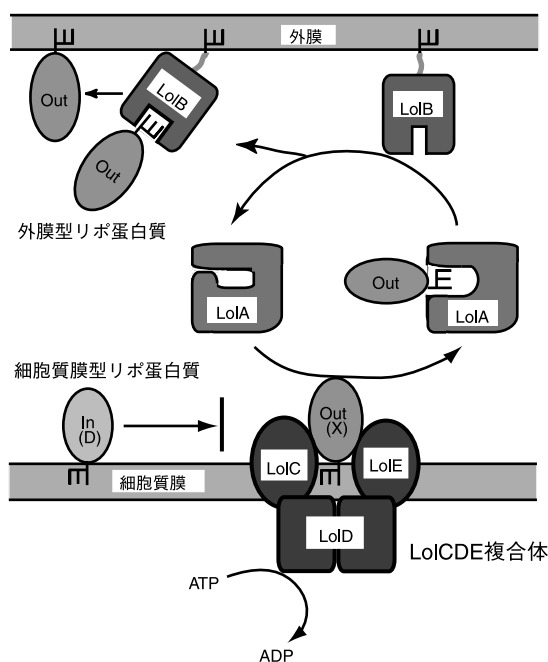


図1 リポ蛋白質の選別と膜局在化を担う Lol システムの全体像

ノールアミンの正電荷や、リポ蛋白質アスパラギン酸の負電荷を消失させると、リポ蛋白質は細胞質膜にとどまらなくなる。リン脂質とリポ蛋白質間の静電的な相互作用が、回避機構には重要と考えられる。

LolCDE によるリポ蛋白質遊離反応は ATP 依存であるが、LolA-リポ蛋白質複合体が形成された後は、エネルギーの供給なしにリポ蛋白質は外膜にまで運ばれる。リポ蛋白質との親和性の違いが LolA から LolB にリポ蛋白質を受け渡す反応に極めて重要であることを明らかにした。

LolA と LolB のアミノ酸配列に類似性はないが、結晶構造は驚くほどよく似ており、リポ蛋白質の脂質部分と結合すると推測される、疎水性キャビティーをもった  $\beta$  バレル構造であることを明らかにした (図2)。

Lol 因子はグラム陰性細菌に広く保存されている。また、細菌には多数のリポ蛋白質が存在することが明らかになっている。筆者らが見いだした Lol システムは、グラム陰性細菌のリポ蛋白質の選別輸送に普遍的な機構であると考えられている。

以上の研究成果は、多数の方々との共同研究で得られたものである。リポ蛋白質局在化機構の開拓者であり共同研究者である立教大学教授・松山伸一博士、SecG を巡る一連の研究の共同研究者である筆者の研究室の助教授・西山賢一博士に厚く感謝します。また、これまで筆者の研究室に所属した大学院生、研究員、研究補助員の方々の努力に心から敬意を表します。構造解析の共同研究者である京都大学教授・三木邦夫博士と、Spring8 の竹田一旗博士に感謝します。最後に、初期の研究をご指導いただいた故 水島昭二先生に深く感謝いたします。

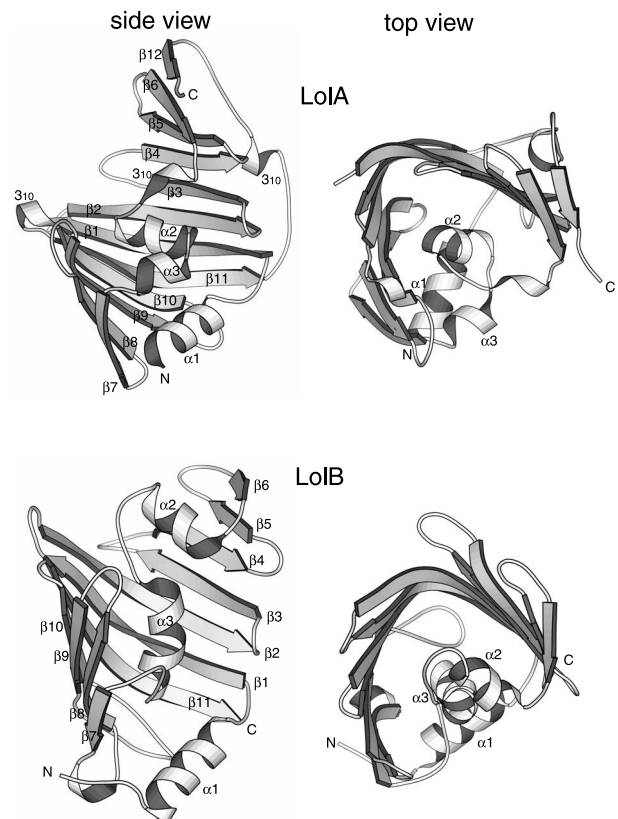


図2 LolA と LolB の結晶構造