

細菌における外膜蛋白質を形成させる分子装置の解明

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科
塚崎 智也

1. はじめに

すべての生物は、細胞膜で囲まれた細胞を生命の基本単位としている。細胞膜の成り立ちや働きについて理解を深めることは、細菌からヒトまで共通した基本的な生命現象を理解する上で、欠かせない。大腸菌には外膜と内膜に膜タンパク質を組込む為の膜タンパク質が存在している。タンパク質の膜への組込みは、必須因子である膜タンパク質 YidC などの insertase を介して起こる。YidC は呼吸鎖複合体の形成などに関わっており、ミトコンドリアでは Oxa1、葉緑体では Alb3 が同様の機能を果たしている。2000 年に Dalbey らのグループによって、YidC が膜タンパク質の組込みに重要な役割を果たしていることが示され、その後 YidC の重要性や機能が明らかとされてきた。しかしながら、YidC の詳細構造が不明であったため、具体的に膜タンパク質がどのような相互作用を介して YidC によって細胞膜へと組み込まれるのかの詳細については不明であった。本研究では膜タンパク質の機能発現システムを詳細に理解する為に、真正細菌の YidC の立体構造を X 線結晶構造解析によって決定し、その構造情報に基づく機能解析を進めた。結果を統合して、YidC による 1 回膜貫通型タンパク質の膜組み込みの分子メカニズムを提唱した。

2. 方法

はじめに、結晶化に適したサンプルを探索する為に YidC のホモログ数十種類をクローニングし、GFP タグを用いた蛍光ゲル濾過システムで解析した。これらのうち *Bacillus halodurans* 由来の YidC (BhYidC) が安定であることが判明し、BhYidC を用いて結晶構造解析を進めた。プラスミドを用いて BhYidC を過剰発現させた大腸菌膜画分から膜タンパク質をドデシルマルトシドで可溶化した。その後、Ni-NTA、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーなどを用いて、高純度に精製された BhYidC を得た。収量は培地 1 リットルあたり、約 0.2 mg であった。次に、この精製タンパク質を濃縮して結晶化へと進めた。YidC の結晶化は、近年膜タンパク質の結晶化法として一般化してきた脂質との共結晶化である LCP (Lipidic cubic phase) 法を適用した。得られた結晶は、大型放射光施設 SPring-8 (兵庫県佐用郡) のビームライン BL32XU にてデータの収集を行った。Native の結晶からは 2.4 Å 分解能のデータセット、位相決定の為に作成した Hg 誘導体の結晶からは 3.0 Å 分解能のデータセットを得た (Kumazaki, Tsukazaki et al., 2014)。これらのデータから、最終的に 2.4 Å 分解能で YidC の構造を決定した。構造決定後は、枯草菌を用いた YidC の機能解析や、部位特異的 UV クロスリンク法を用いた YidC と基質との相互作用解析などを進めた (Kumazaki, Chiba et al., 2014)。

3. 結果

YidC は図 1 に示したように、保存された主要な 5 本の膜貫通 α ヘリックスから構成されており、そのほとんどが膜に埋もれた構造だった。YidC の細胞側には膜と平行に配置した N 末端側の α ヘリックスが存在し、細胞質側には 2 本の α ヘリックスで構成されたヘアピン型の突出したループが存在していた。YidC 膜貫通領域には大きな溝が存在していた。その溝は、親水的なアミノ酸残基が多く存在し、正の電荷を帯びていた。YidC は疎水的な環境である細胞質膜に、「親水的な溝」を形成させるというユニークな構造体 (図 2) であった。この親水的な溝は、細胞質側・膜側のどちらからもアクセス可能であり、膜内において不安定に見えた。実際に生体膜において、このユニークな構造体が存在しうることを分子動力学計算から予測した。分子動力学計算では親水的な溝に常時約 20 個の水分子の存在が確認された。また、サイトプラズム側の突出したループが、非常にフレキシブルであることも同時に推測された。YidC の親水的な溝の中央部分には、生物間で保存されたアルギニン残基が存在していた。このアルギニン残基の重要性を、枯草菌を用いた MifM (膜 1 回貫通型膜タンパク質で YidC の基質) の膜組込み解析によって示した。さらに、基質タンパク質の負電荷も組込みに重要であることを示した。これらの結果から、膜タンパク質の組込みには YidC の凹みの正電荷と、基質タンパク質の負電荷の静電的相互作用の必要性が示唆された。続いて、部位特異的 UV クロスリンク実験を進め、YidC の凹みと基質タンパク質との間に直接的な相互作用が存在することを見いだした。これらの実験を統合して、YidC の親水的な溝と基質膜タンパク質とが静電的な相互作用で一時的に結合し、その後基質膜タンパク質が膜に組み込まれるという新規のモデルを提唱した (図 3)

4. 考察

本研究から、図3の1回膜貫通タンパク質の膜組みモデルを提唱した。YidCの基質となるタンパク質の多くは細胞質外となる領域に負電荷を持っている。はじめに、基質タンパク質が何らかのかたちで、膜へとターゲットされる。その後、基質タンパク質の負電荷と、YidCの親水的な凹みの正電荷を持つアルギニン残基が相互作用して、一時的にYidCと基質が結合する。このときに、YidCの活性に必須のフレキシブルな細胞質領域が基質認識に関わっているのかもしれない。この後の過程である膜への組み込みについては、これまでの解析結果をふまえると基質膜タンパク質の膜貫通領域の疎水性領域と脂質の炭素鎖との疎水性相互作用や、膜電位による負電荷をもった領域の電気泳動的な効果が寄与すると考えている。YidCは親水的な溝を、疎水的な膜に形成させることで、膜組み込み過程におけるエネルギー障壁を下げ膜組み込みを達成していると思われる。

論文では1回膜貫通型の膜組みモデルを提唱したが、YidCはこのような単純な膜タンパク質の膜組み込みだけでなく、複数膜貫通領域をもつ複雑なタンパク質の膜組み込みにも関与する。この場合は、YidCが単独でタンパク質の膜組み込みに関与するのではなく、Secトランスロコンとよばれるタンパク質膜透過チャネルと共同して働く。このとき、YidCは膜組み込みのinsertaseとして機能するのではなく、膜タンパク質のフォールディングのためのシャペロンとして機能することが示されている。フォールディング機能においても、YidCの親水性の凹みが重要な働きをしていると考えられる。一般的に、可溶性タンパク質のシャペロンは親水的な環境下において疎水的領域を提供する。逆に、YidCがシャペロンとして機能する場合には、疎水的な環境で親水性の領域を提供しているのだろう。

最も研究が進んでいるYidCは大腸菌由来のものである。大腸菌由来YidCには、BhYidCには存在しないペリプラズム領域が存在する。この領域は、YidCの最低限の活性には必要ないとされているが、Secトランスロコンとの相互作用に関わる領域が存在する。そのため、大腸菌YidCの構造解析は、Secトランスロコンと共役して働くYidCの複雑なメカニズムの解明に向けた基盤となる。私たちは、大腸菌YidCの構造解析にも取り組み、最近その構造を決定した(Kumazaki, Kishimoto et al., 2014; PDB ID 3WVF)。BhYidCと同様に膜貫通領域が親水的な凹みを形成していることが判明した。また、グラム陰性菌特有のペリプラズム領域の配向が、はじめて明らかとなった。今後、この結晶構造をもとにSecトランスロコンとの詳細な相互作用の展開が期待される。

本研究は、細菌からヒトまで共通した生命現象のひとつである「YidCによる1膜貫通型タンパク質膜組み込み過程」の詳細を、YidCの結晶構造とその構造に基づく機能解析によって、初めて解明した。図3に示したモデルは、単純な基質タンパク質の膜組み込み過程の提唱であるが、今後は本研究で決定した2つのYidCの構造情報を基に、より複雑な膜タンパク質の組み込み過程について解析が進められるだろう。本成果は、生体内のタンパク質の成り立ちやタンパク質輸送の基礎研究の発展に大きく貢献するものである。また、YidCは細菌の生育に必須の膜タンパク質であるため、病原菌のYidCを標的とした新規の抗生物質の開発等の基盤情報として利用されることも期待される。

5. 発表論文

Kumazaki K, Chiba S, Takemoto M, Furukawa A, Nishiyama K, Sugano Y, Mori T, Dohmae N, Hirata K, Nakada-Nakura Y, Maturana AD, Tanaka Y, Mori H, Sugita Y, Arisaka F, Ito K, Ishitani R, *Tsukazaki T and *Nureki O. Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature* 509, 516-520 (2014).

Kumazaki K, Kishimoto T, Furukawa A, Mori Hiroyuki, Tanaka Y, Dohmae N, Ishitani R, *Tsukazaki T and *Nureki O. Crystal structure of Escherichia coli YidC, a membrane protein chaperone and insertase. *Sci. Rep.* 4, 7299

Kumazaki K, *Tsukazaki T, Nishizawa T, Tanaka Y, Kato HE, Nakada-Nakura Y, Hirata K, Mori Y, Suga H, Dohmae N, Ishitani R and *Nureki O. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of YidC, a membrane-protein chaperone and insertase from Bacillus halodurans. *Acta Crystallogr. F* 70, 1056-1060 (2014).

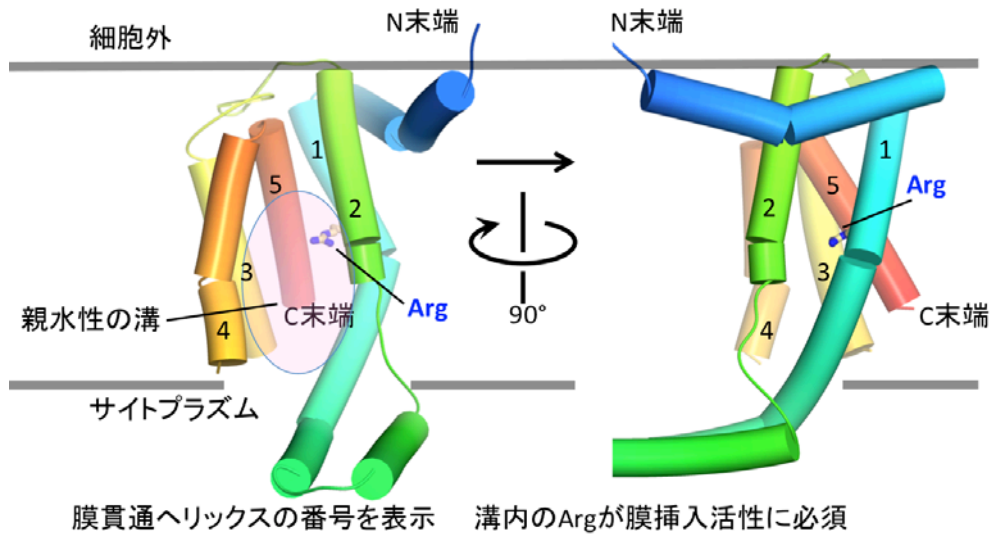


図1: *Bacillus halodurans* YidC の結晶構造

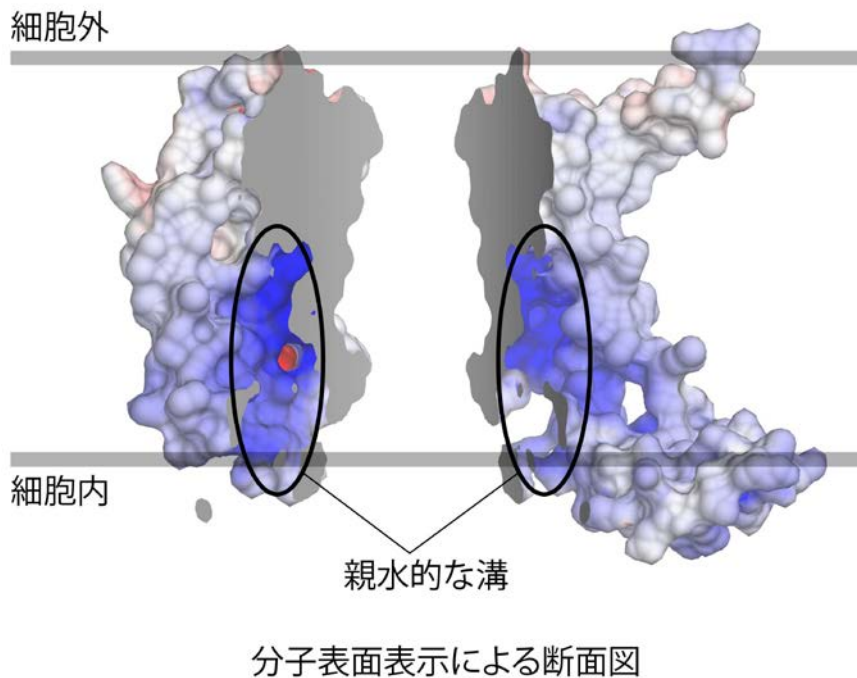


図2: YidC の親水的な溝

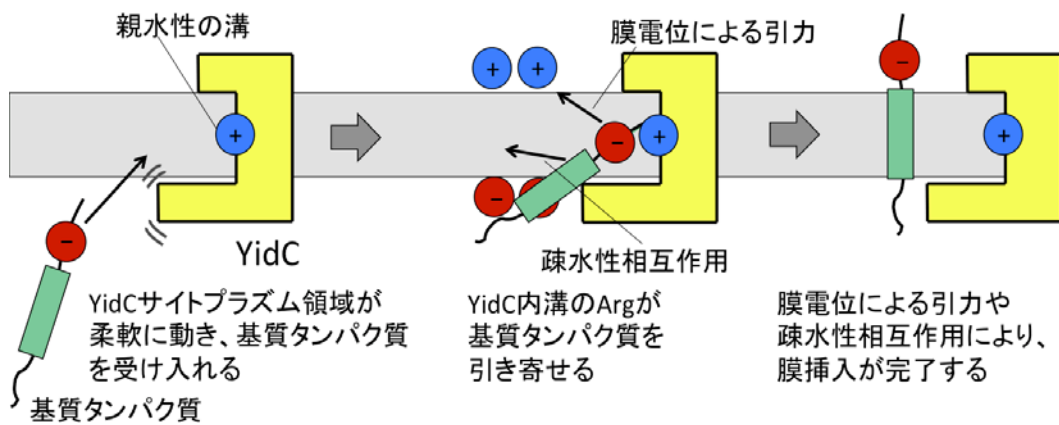


図3: YidC によるタンパク質膜組み込み