

- Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 16489–16494.
- 10) Kanatsu-Shinohara, M., Ikawa, M., Takehashi, M., Ogonuki, N., Miki, H., Inoue, K., Kazuki, Y., Lee, J., Toyokuni, S., Oshimura, M., Ogura, A., & Shinohara, T. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 8018–8023.
 - 11) Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S., Toyoshima, M., Niwa, O., Oshimura, M., Heike, T., Nakahata, T., Ishino, F., Ogura, A., & Shinohara, T. (2004) *Cell*, 119, 1001–1012.
 - 12) Guan, K., Nayernia, K., Maier, L.S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J.H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M., Engel, W., & Hasenfuss, G. (2006) *Nature*, 440, 1199–1203.
 - 13) Yoshida, S., Takakura, A., Ohbo, K., Abe, K., Wakabayashi, J., Yamamoto, M., Suda, T., & Nabeshima, Y. (2004) *Dev. Biol.*, 269, 447–458.
 - 14) Nakagawa, T., Nabeshima, Y., & Yoshida, S. (2007) *Developmental Cell*, 12, 195–206.
 - 15) Yoshida, S. (2007) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1120, 47–58.
 - 16) Yoshida, S., Sukeno, M., & Nabeshima, Y. (2007) *Science*, 317, 1722–1726.
 - 17) Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., & Kai, T. (2001) *Nature*, 414, 98–104.
 - 18) 毛利秀雄, 星 元紀 監修, 森沢正昭, 星 和彦, 岡部 勝 編 (2006) 新編精子学, 東京大学出版会, 東京.

吉田 松生

(京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座)

Progress in mammalian spermatogenic stem cell research
 Shosei Yoshida (Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida-Konoe, Sakyo, Kyoto 606-8501, Japan)

大腸菌におけるタンパク質の細胞内局在とそのメカニズム

1. はじめに

生命現象の主要な役割を担うタンパク質は細胞内での個々の役割を適切に果たすためにその存在すべき場所が時間的、空間的に、厳密に制御されていなければならない。これは大きさがわずかに数ミクロンという細菌細胞においても例外ではない。Bi と Lutkenhaus によって大腸菌の細胞分裂に関与するチューブリンホモログ FtsZ が分裂面でリング状の構造を作ることが1991年に見いだされて以来¹⁾, 細菌が FtsZ 以外にも真核細胞の細胞骨格のホモログ (アクチンや中間径フィラメントのホモログ) を持つことや、それらが細菌の形の形成・維持に重要であることが示されてき

た²⁾。また細胞骨格以外のタンパク質もある特定の場所(極や分裂面)に局在していることが明らかになってきている。その例として, Maddock と Shapiro によって, 大腸菌走化性複合体が極に局在することが1993年に示された³⁾。この極局在が走化性シグナル伝達やシグナルの増幅, 刺激に対する適応に重要であると考えられている (図 1A)。では, これらのタンパク質の局在はどのように決められているのだろうか。

2. 走化性受容体 Tar の極局在のメカニズム

タンパク質の極局在のメカニズムには2通りあることがすでに報告されている^{4,5)}。極 (付近) で合成されて膜に挿入される場合 (*direct* モデル) と, 細胞膜にランダムに挿入された後, 極に局在する (*indirect* モデル) という二つのモデルである (図 1B)。細菌あるいはタンパク質の種類によってこれらのメカニズムが使い分けられているようである。

では, 走化性受容体の極局在はどのように決められているのだろうか。我々は膜貫通型走化性受容体の一つであるアスパラギン酸受容体 (Tar) に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合し (Tar-GFP), これを用いてその極局在のメカニズムを探ることとした。Tar-GFP の発現を時間 0 で誘導開始し, その後の Tar-GFP の局在の様子を観察した。Tar-GFP はまず極ではなく, 菌体側面の細胞膜で蛍光が観察された (図 1C) (*indirect* モデル)。しかし, 細胞膜に挿入された Tar の極への移動 (別のタンパク質に運ばれるか, あるいは拡散していくか) は, 残念ながら現在までのところ, 直接観察することはできていない⁶⁾。

3. Tar のらせん状配置

図 1C の写真をよく見てみると, とくに 40 分, 60 分の写真では, Tar-GFP が両方の側面部で等間隔に並んでいるように見える (図中の矢尻)。そこで, 我々はその局在を三次元的に解析した。Z 軸に沿った Tar-GFP の蛍光像をデコンボリューション法によって三次元再構成した結果, Tar-GFP がらせん状に配置されることが明らかになった (図 1D, E)。このらせんは何を反映しているのだろうか?

4. Sec 複合体のらせん状配置

走化性受容体は, 普遍的なタンパク質膜輸送・挿入装置 (Sec) によって細胞膜に挿入される⁷⁾。筆者らは, Tar のらせん構造が Sec の細胞内局在を反映しているのではない

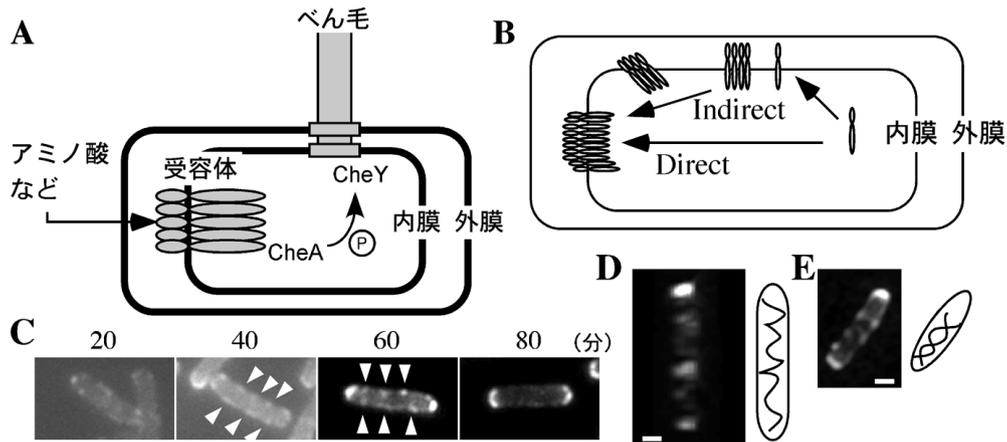


図1 走化性受容体複合体の極局在とらせん状配置

(A) 走化性シグナル伝達. 外界の刺激 (アミノ酸など) が極局在する受容体に感知され, 細胞質内へその情報が伝えられる. その情報は二成分制御系 (His-Asp リン酸リレー系) によってべん毛モーターに伝達され, 菌はべん毛の回転方向を制御することにより, より好ましい方向へと泳いでいく. 単純化するために, 受容体, 二成分制御系 (CheA と CheY) とべん毛のみを示した. (B) 受容体極局在の二つのモデル. 受容体が極 (付近) で合成される (*direct*) か, 合成された受容体がランダムに膜に挿入された後, 極へ移動する (*indirect*). (C) 時間 0 で Tar-GFP の発現を誘導し, 20, 40, 60, 80 分後に菌を観察した. 矢尻は Tar-GFP の側面での局在を示している. (D, E) Tar-GFP の三次元再構成像. D, E は同じ条件で見た異なる細胞を示した. スケールは 1 μ m.

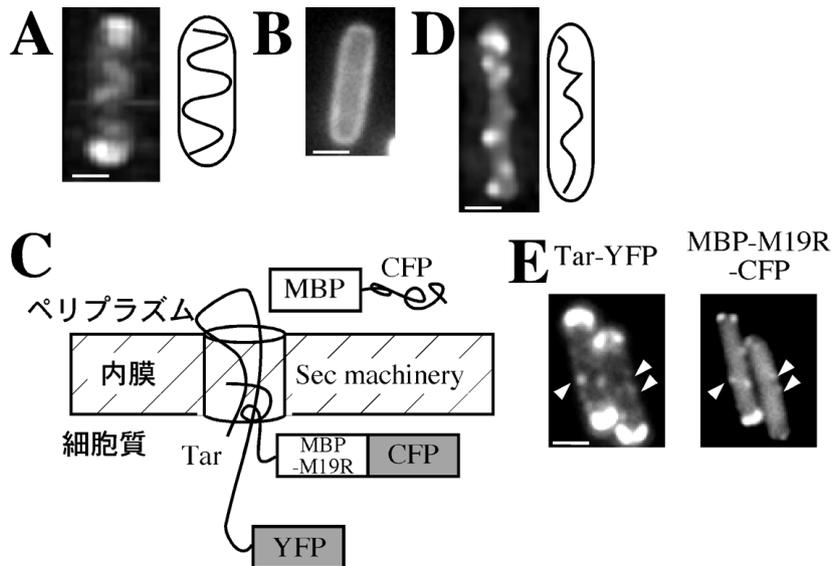


図2 Sec 複合体のらせん状配置

(A) GFP-SecE の三次元再構成像. (B) 大量発現した GFP-SecE の局在. (C) Tar-YFP と MBP-CFP の二重染色. MBP-CFP はペリプラズムで蛍光を發しないが, MBP-M19R-CFP は蛍光を發する. (D) MBP-M19R-GFP の三次元再構成像. (E) Tar-YFP と MBP-M19R-CFP の共局在. 矢尻が共局在を示している. スケールは 1 μ m.

かと考えた。Sec 複合体は、膜内在型タンパク質で、タンパク質透過チャンネルを形成する SecY, SecE, SecG と膜表面型 ATPase である SecA から構成される。GFP-SecE の局在を観察したところ、Tar-GFP と同様に極とらせん状に配置していた (図 2A)。しかし、GFP-SecE の発現量を多くすると、一様な分布が見られた (図 2B)。以前、Sec 複合体は膜上に一様に分布すると報告された⁸⁾が、これは、GFP 融合タンパク質の過剰発現により、本来のらせん状配置が覆われてしまったためではないかと思われる⁹⁾。

また GFP を Sec 複合体に融合することで複合体形成が阻害されたりすることなどを防ぐために、Sec 複合体構成因子である SecG を、抗 SecG 抗体を用いた間接蛍光抗体法により観察したところ、やはりらせん状配置と矛盾しない像が得られた。また別の方法として、輸送基質に GFP を融合させることで Sec 複合体を可視化することを試みた。Sec の輸送基質であるマルトース結合タンパク質 (MBP) には、ペリプラズム領域へ輸送されずに Sec 複合体にトラップされていると考えられている変異体 (MBP-M19R) が知られている⁹⁾。Sec を介してペリプラズムへ輸送された MBP-GFP は GFP が正しくフォールドしない (本来細胞内では起こらないジスルフィド結合が、ペリプラズム領域では形成されるためだと考えられている) ので蛍光を発しない¹⁰⁾が、Sec 複合体にトラップされた MBP-M19R-GFP または CFP (青緑色蛍光タンパク質) は細胞質側でフォールドし、Sec 複合体および細胞質内で蛍光を発するはずである (図 2C)。図 2D に示すように、Sec 複合体にトラップされているであろうと考えられる細胞膜付近の蛍光のスポットに着目すると、予想通り MBP-M19R-GFP もらせん状配置を示した。さらに、MBP-M19R-CFP と Tar-YFP (黄色蛍光タンパク質) が少なくとも筆者らの顕微鏡の解像度では共局在していた (図 2E 矢尻)。このことはこれらのタンパク質が細胞内で相互作用することを直接示すものではないが、私たちは、大腸菌では Sec 複合体はらせん状に配置されていると結論した⁹⁾。また、グラム陽性菌の枯草菌においても Sec 複合体はらせん状に配置することが報告されている¹¹⁾。以上のことを総合すると、細菌内において、タンパク質輸送装置は細胞膜中でランダムに存在するのではなく、特定の場所に局在するようである。このように輸送装置がらせん状に配置する方が、タンパク質を効率よく目的の場所に局在させるのに有利なのかもしれない。

5. 大腸菌内でらせん状に配置されるタンパク質

ではタンパク質のらせん状配置は Sec 複合体に特有の性質だろうか。あるいは他のタンパク質にも共通に見られる現象なのだろうか。例えば、細胞骨格タンパク質 MreB (アクチンホモログ) もらせんを形成する (図 3A)。チューブリンホモログ FtsZ も分裂面に局在しているもの以外はらせんを形成しながら細胞内を往復運動していること¹²⁾が明らかになっている。また FtsZ と相互作用する FtsA (アクチンホモログ) を大量発現させて細胞分裂を阻害すると

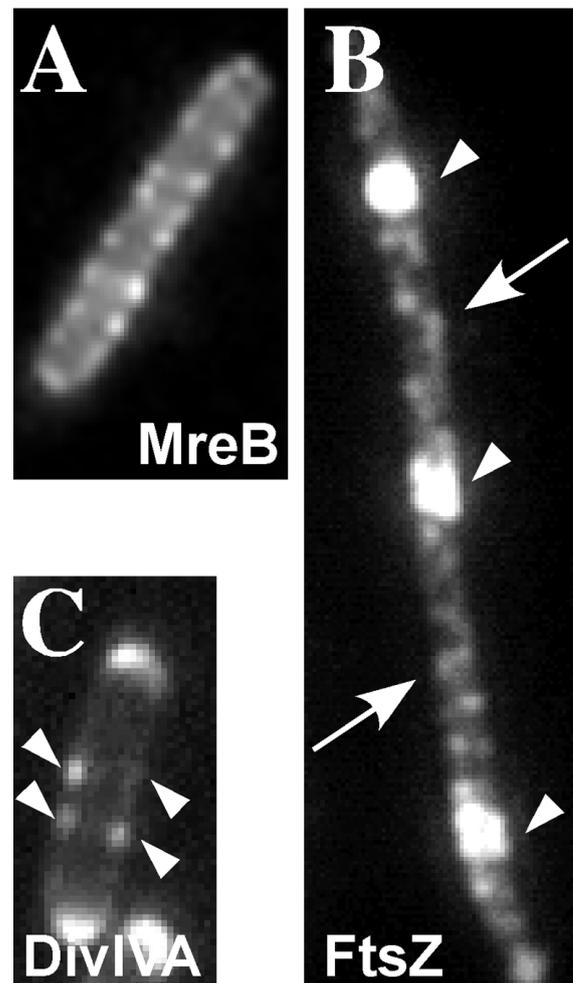


図 3 らせん状に配置されるタンパク質

(A) GFP-MreB の局在。(B) FtsZ は抗 FtsZ 抗体を用いた間接蛍光抗体法により可視化した。この菌ではアクチンホモログ FtsA が大量発現されており、細胞分裂が阻害されるために菌が長くなっている。矢尻は分裂面に局在する FtsZ を示す。矢印は分裂面以外での FtsZ のらせんを示す。(C) DivIVA-GFP の大腸菌での局在。矢尻は DivIVA-GFP の側面での局在を示している。

FtsZ のらせんが容易に観察される (図 3B). 興味深いことに枯草菌の極に局在する分裂関連タンパク質 DivIVA を大腸菌で発現させると, 極局在を示すとともに Tar と同様, 側面において規則正しい配置が観察される (図 3C) のでやはりらせんを形成していることが推測される. ここで例を挙げた以外にも多くのタンパク質が細菌の中でらせんを形成することが続々と報告されている. 一体何がタンパク質のらせん状配置を決定しているのだろうか. らせんを形成するメカニズムは共通なのだろうか.

6. らせんを決める因子は?

タンパク質が細胞内においてらせんを形成するメカニズムとしては二つの可能性が考えられる. タンパク質自身がらせんを形成する能力を持つか, そのようにらせん状に配置したタンパク質が他のタンパク質をらせん状にアンカーする, ということである. そこで, 筆者らは, Tar (Sec) らせんが細胞骨格 MreB にアンカーされている可能性を調べるために Tar-YFP と CFP-MreB の共局在を調べたが, それぞれのらせんは完全には一致しなかったので, Tar が MreB にアンカーされている可能性は低いと思われる. Tar (Sec) 自身にらせん形成能があるか, あるいは他のらせん状に配置したタンパク質にアンカーされているかは今後明らかにしなければならない.

また, 大腸菌の内膜と外膜の間にはペプチドグリカンといわれる層がある. ペプチドグリカン結合タンパク質もらせん状に配置されており, 枯草菌においては, 新規に合成されるペプチドグリカンが, らせん状に合成されること¹³⁾も報告されているのでペプチドグリカンがある種のタンパク質のらせんを決めているかもしれない.

最近, タンパク質だけでなく, リン脂質も特異的な局在を示すことが報告されている. 大腸菌の膜を構成する脂質のひとつカルジオリピン (CL) が極と分裂面に多く局在している¹⁴⁾. このことからある種の脂質の局在がタンパク質の局在に関与している可能性がある. 実際, 大腸菌の浸透圧センサーの一種である ProP は CL と極または分裂面で共局在する. ProP の局在には CL との相互作用が必要かもしれない¹⁵⁾. Sec 複合体のタンパク質輸送活性という観点から見ると, 大腸菌において, ホスファチジルグリセロール (PG) が Sec 複合体のタンパク質輸送活性に関与することが分かっている¹⁶⁾. そして, 枯草菌の Sec 複合体のらせんは PG ならびに CL 合成の変異株では形成されないことが報告されている¹¹⁾. このことは, 大腸菌においても, Sec 複合体の局在と機能が, ある種のリン脂質の局在

と関連があることを示唆している. 今後はリン脂質合成経路の変異株中での Tar の極局在, Sec 複合体の局在を解析することが必要であろう.

7. おわりに

以上のように, 大腸菌の極に局在する走化性受容体が, 極付近の膜に直接挿入されるのではなく, 細胞膜上でらせんを形成する Sec 複合体によって, 側面の細胞膜から挿入されることが分かった. しかし, なぜ走化性受容体が膜挿入後速やかに拡散していかずに Sec と共局在しているのだろうか. 現在までのところ, 膜に挿入されたひとつの受容体の側面から極へ動きは観察されていない. そのような動きが拡散によるのか, あるいはモータータンパク質が介在しているのかも不明である. より詳細に Tar-GFP の動きを解析することによって, これらが明らかになるだろう. たった数ミクロンという小さな大腸菌の中に入ったいくつの独立したらせんが存在するのだろうか. 複数のらせんが絡まり合うことはないのだろうか. らせんを形成する仕組みも謎である. 今後はこれらの問いに答えるような研究の展開が待たれる.

謝辞

本研究は, 名古屋大学理学研究科川岸郁朗助教授 (現法政大学工学部教授) とテキサス大学ヒューストン校, William Margolin 教授の研究室で行われました. ここに感謝の意を表します.

- 1) Bi, E. & Lutkenhaus, J. (1991) *Nature*, 354, 161-164.
- 2) Shih, Y.L. & Rothfield, L. (2006) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70, 729-754.
- 3) Maddock, J.R. & Shapiro, L. (1993) *Science*, 259, 1717-1723.
- 4) Charles, M., Perez, M., Kobil, J.H., & Goldberg, M.B. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98, 9871-9876.
- 5) Rudner, D.Z., Pan, Q., & Losick, R.M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 99, 8701-8706.
- 6) Shiomi, D., Yoshimoto, M., Homma, M., & Kawagishi, I. (2006) *Mol. Microbiol.*, 60, 894-906.
- 7) Gebert, J.F., Overhoff, B., Manson, M.D., & Boos, W. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 16652-16660.
- 8) Brandon, L.D., Goehring, N., Janakiraman, A., Yan, A.W., Wu, T., Beckwith, J., & Goldberg, M.B. (2003) *Mol. Microbiol.*, 50, 45-60.
- 9) Bassford, P. & Beckwith, J. (1979) *Nature*, 277, 538-541.
- 10) Feilmeier, B.J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H., & Phillips, G.J. (2000) *J. Bacteriol.*, 182, 4068-4076.
- 11) Campo, N., Tjalsma, H., Buist, G., Stepniak, D., Meijer, M., Veenhuis, M., Westermann, M., Muller, J.P., Bron, S., Kok, J., Kuipers, O.P., & Jongbloed, J.D. (2004) *Mol. Microbiol.*, 53,

- 1583-1599.
- 12) Thanedar, S. & Margolin, W. (2004) *Curr. Biol.*, 14, 1167-1173.
- 13) Daniel, R.A. & Errington, J. (2003) *Cell*, 113, 767-776.
- 14) Mileykovskaya, E. & Dowhan, W. (2000) *J. Bacteriol.*, 182, 1172-1175.
- 15) Romantsov, T., Helbig, S., Culham, D.E., Gill, C., Stalker, L., & Wood, J.M. (2007) *Mol. Microbiol.*, 64, 1455-1465.
- 16) de Vrije, T., de Swart, R.L., Dowhan, W., Tommassen, J., & de Kruijff, B. (1988) *Nature*, 334, 173-175.

塩見 大輔

テキサス大学医学部ヒューストン
(現所属 国立遺伝学研究所)

Mechanism underlying subcellular localization of proteins in *Escherichia coli*

Daisuke Shiomi (University of Texas Medical School at Houston, 6431 Fannin Street, Houston, TX 77030 USA)
(Present address; National Institute of Genetics)

ウロテンシンⅡの動脈硬化促進機構

1. はじめに

ウロテンシンⅡ (urotensin II; UII) は、魚類 goby の脊椎尾部下垂体 (urophysis) から同定された収縮 (tension) に関わる物質として命名され、ソマトスタチン様ペプチドホルモンとして知られていた。魚類では心血管系、腸管、膀胱の平滑筋の収縮や水・Na⁺吸収の制御に関わる UI, UII, UIV 等が存在しているが、UI は哺乳類の corticotropin releasing factor に類似した構造を有していたことから哺乳類ではウロコルチンと呼ばれるようになった。その後 UII 類似ペプチドが哺乳類でも発見されるに至った。

1999年に Ames らによりヒト UII が最初にクローニングされ¹⁾、同年に複数の研究者により、ヒト UII が orphan receptor GPR14, 別名 sensory epithelium neuropeptide-like receptor の内因性リガンドであることが明らかになった^{1,2)}。この受容体を介して UII は、最強の心血管収縮物質として、また不安/ストレスの神経伝達物質として作用する。本受容体は UII と特異的に結合するため UT 受容体と改名され、UII/UT 受容体に関する研究は循環器学や創薬領域において大きな注目を浴びるに至った。本稿では、既知の心血管収縮作用に加え、我々が最近明らかにした動脈硬化

促進作用に焦点を絞り、UII/UT 受容体の現状を紹介する。

2. ヒト UII の生成と構造

Ames らは、ラット GPR14 のホモログとしてヒト GPR14 をクローニングした¹⁾。この受容体遺伝子を発現させた HEK293 細胞を用い、細胞内 Ca²⁺増加をきたす生理活性ペプチドをスクリーニングした結果、魚類の UII がこれに該当することを見出し、引き続きヒト UII のクローニングに成功した¹⁾。ヒト UII の前駆体である prepro UII の cDNA は 688bp からなり、アミノ酸配列中に酵素切断部位である polybasic proteolytic cleavage site が 3 箇所存在するため、prepro UII_A (139 残基) と prepro UII_B (124 残基) の二つの異なる前駆体が作られる (図 1)¹⁾。いずれの前駆体からも urotensin converting enzyme (UCE) によって同一のアミノ酸 11 個からなるヒト UII (MW: 1388) が生成する (図 1)¹⁾。ヒト UII はジスルフィド結合の分子内架橋による環状構造を有し (図 2)、魚類 goby, ラット, マウスの UII と高い相同性を持つ。特に受容体との結合に重要な環状構造部位 (Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys) は全く同じアミノ酸配列を持つ (図 2)³⁾。一方、UT 受容体は 389 アミノ酸からなる 7 回膜貫通型である。なお UII および UT 受容体の遺伝子座は 1p36-p32, 17q25.3 である⁴⁾。

3. UII/UT 受容体の組織分布と発現調節

ヒト UII および UT 受容体は心血管系、中枢神経系、腎臓をはじめ全身に発現している。ヒトの大動脈、頸動脈、冠動脈における粥状動脈硬化巣での UII/UT 受容体の発現は強く、UII は主に血管内皮細胞やリンパ球から分泌され、UT 受容体は心筋細胞、血管平滑筋細胞、単球/マクロファージ、NK 細胞に多く存在している⁵⁾。UII/UT 受容体の発現は、インターロイキン (IL) 6, IL1β, インターフェロン γ 等の炎症性サイトカインや低酸素によって促進される⁴⁾。また UT 受容体は、酸化 LDL, リポポリサッカリド, TNF-α によっても発現が促進される⁶⁾。しかし、圧負荷やずり応力 (シアストレス) によっては肺動脈内皮細胞の UII 発現は変わらなかったという報告がある。他には、ラット頸動脈にバルーン擦過傷を加えると、UII 発現は内膜増殖とともに増強する⁷⁾。動脈硬化モデル動物である ApoE ノックアウトマウスでは加齢 (28 週齢) とともに大動脈における UT 受容体の発現が増強する。ヒトにおいては、動脈硬化巣以外では糖尿病性腎や不全心において UII/UT 受容体は強発現している。

循環血液中の UII は、主に心血管系、肝臓、腎臓で産