

膜タンパク質の膜組み込みとトランスロコンの柔軟性

阪口 雅郎, 木田 祐一郎

内在性膜タンパク質は様々な因子の作用によってはじめて膜に組み込まれ構造を形成できる。それらの因子の中で、小胞体（および原核細胞の形質膜）のトランスロコンはポリペプチド鎖を膜透過させると同時に、膜タンパク質を膜に組み込む作用をもつ中心的な装置である。新しい実験系の導入によって、トランスロコンによる膜組み込み過程の詳細が明らかにされつつある。リボソームから伸長してくるポリペプチド鎖に対するダイナミックな配向決定作用、リボソームでの合成開始から膜組み込みまでの素過程、シグナル配列による膜透過の駆動作用や膜透過段階に応じた駆動力の変動、などである。さらに、トランスロコンはポリペプチド鎖透過のための単なる狭い通路ではなく、複数の透過途中のポリペプチド鎖を同時に許容できる驚くべき柔軟性をもっていることが分かってきた。

1. はじめに

内在性膜タンパク質の大部分が膜貫通 α ヘリックスをもつ。これらが構造を形成する過程には、膜との関連でいくつかの難関がある。すなわち、①膜貫通(TM)配列が膜表面の極性層をすり抜けねばならない、②TMセグメントの膜内配向が的確に規定されなければならない、③細胞外部分（または膜内腔部分）が膜を通り抜けなくてはならない、④TMセグメントが的確に膜内配置されなければならない、⑤TM部分が適切に会合しなくてはならない、などである。生体膜はリン脂質二重層を基本骨格とし、極性基がアルキル鎖の疎水層をはさんで水環境から隔離している。細胞外の親水性ドメインが膜の疎水層を通過するためには大きなエネルギー障壁が存在する。同様にTM部分が脂質環境に配置される際には、表面の極性層が障壁となる¹⁾。膜小胞と膜タンパク質のポリペプチド鎖をふれさせると、特殊な構成のポリペプチド鎖は別として、正しく膜

に組み込まれることはない（たとえば文献2)）。細胞にはこれらの難関を克服すべく巧妙な分子装置が存在している。

小胞体、ゴルジ体、リソソーム、細胞膜などのいわゆる「分泌経路」上に存在する膜系の膜タンパク質や膜内腔にある可溶性タンパク質は、小胞体で膜内に進入しまたは膜透過し、構造を形成した後、小胞輸送で下流のオルガネラ膜に配分される。これらは細胞外マトリックス、各種受容体やイオンチャネル、輸送体、膜酵素など多種多様である。これらの合成途上では、シグナル配列がリボソームから出ると、シグナル認識粒子(SRP)によって認識され、トランスロコンとよばれるタンパク質膜透過チャネル³⁾に受け渡され、同時に膜結合型リボソームが形成される(図1)。その後、ポリペプチド鎖は合成と同時に膜に組み込まれる。一部、C末端に膜結合部分を有する膜タンパク質は、TM部分がリボソームから出るときには合成が終結しているために、合成完了後に膜に組み込まれる。このカテゴリーの膜タンパク質の膜認識や膜組み込みについては、合成共役型のものに比べてかなり情報が乏しい(たとえば総説⁴⁾など)。一方、分泌系オルガネラとは対照的にミトコンドリアやペルオキシソームへは合成が完了してから標的化し、小胞体トランスロコンとは大きく異なるシステムによる膜組み込みが起きる。筆者らは、細胞内での膜タンパク質構造形成の総括的な理解をめざして研究を行ってきて

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 (〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1)

Flexibility of ER translocon and integration of membrane protein

Masao Sakaguchi and Yuichiro Kida (Graduate School of Life Science University of Hyogo, Kouto, Ako-gun, Hyogo 678-1297, Japan)

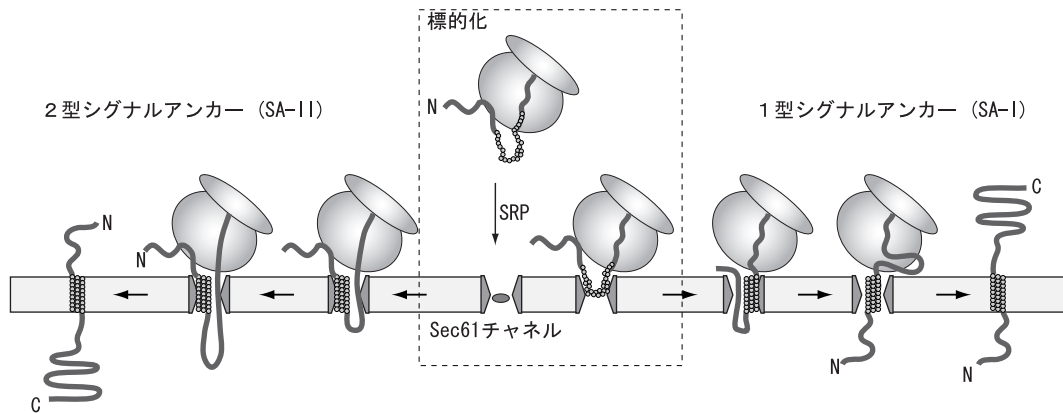


図1 新生鎖のトランスロコンへの標的化と膜配向の決定

リボソームから出てきたシグナル配列の疎水性セグメントがSRPに認識され、小胞体へ標的化される。その後疎水性配列はトランスロコン内に進入し、N末端側またはC末端側の膜透過を引き起こす。後ろが膜透過して切断されるとシグナルペプチド、切断を受けないと膜アンカー部分(2型シグナルアンカー)となる。N末端側が透過すると膜アンカー(1型シグナルアンカー)となる。作用のあとシグナルアンカーはトランスロコン孔から横方向に離脱し膜脂質環境に移行する。トランスロコンは親水性部分が膜の疎水性環境を横切るのを可能とするだけでなく、疎水性セグメントが膜表面の極性層を回避して膜内に分配する役割をもつ。トランスロコンは新生鎖のアミノ酸配列を解釈して、配向を決定する。絵には、結晶構造で認められた通路のくびれ構造とプラグヘリックスを描いた。

いるが、ここでは最近明らかにした小胞体トランスロコンの興味深い作用について紹介する。

2. 膜タンパク質のシグナル配列とトランスロコンによる構造形成

膜タンパク質の膜組み込みを議論するとき、先ずシグナル配列の作用を明確にしておかなければならない(図1)。リボソームから出てきた新生ポリペプチド鎖のシグナル配列がSRPにより認識されると、ポリペプチド鎖の合成は抑制され⁵⁾、同時にSRP受容体の存在する小胞体へ標的化する³⁾。リボソームは膜上のトランスロコンに密接に結合し、膜結合型となり、シグナル配列はトランスロコンへと移行する。リボソームとトランスロコンは後で述べるように緊密に連携している。このような膜標的化と組み込み開始の役割を担うのはシグナル配列の疎水性部分である。分泌経路以外のオルガネラに存在する膜タンパク質が、この仕組みを回避するにはうまくできた機構が存在する(詳細は文献6)など参照)。

SRPからトランスロコンに受け渡された疎水性セグメントは、TM α ヘリックスを形成する。その際、N末端側またはC末端側のいずれかが膜の反対側へと移行する(図1)。N末端が膜透過するものは1型シグナルアンカー配列(SA-I)とよばれる。これが本稿の主役となる。1型の命名は、N末端を膜内腔側に、C末端を細胞質側に配置した1回膜貫通型膜タンパク質が1型とよばれたことに由来する⁷⁾。逆に、C末端側が膜透過し切断を受けるとシグナルペプチド、切断を受けずにTM部分になるとき2型シグナルアンカー配列(SA-II)とよばれる。後で詳しく述べる

が、膜組み込みの配向決定において疎水性セグメント周辺の正電荷アミノ酸が決定的な作用を及ぼす。正電荷はそれを含むポリペプチド鎖が膜内へ進入するのを抑制し、疎水性セグメントをはさんで反対側のポリペプチド鎖を膜透過させる作用をもつ。このように、トランスロコンは疎水性配列の進入を受け入れながら、付随してくるポリペプチド鎖を膜透過させ、最終的に疎水性配列を膜脂質環境へと放出する。

一度膜結合型となったりリボソームからトランスロコンに進入してゆくポリペプチド鎖に疎水性配列があると、膜透過はそこで停止しTMセグメントとなる。この作用(膜透過停止作用)でも、疎水性セグメントが主要決定要因であり、正電荷アミノ酸残基の透過抑制作用も寄与する。これらの作用については、筆者らが1991年にすでに本質的なところを報告したが^{8,9)}、最近になってアミノ酸残基ごとに停止作用を定量化した成果が出された^{10,11)}。このように疎水性配列によりトランスロコンでの膜透過が誘起され、疎水性配列で膜透過が停止する。

また、多数のTMセグメントをもったいわゆるマルチスパン型膜タンパク質の分子内でSA-Iが作用し、自発的には膜に進入できない「疎水性の低いセグメント」が膜内に強制的に配置されるという興味深い膜組み込み様式も分かっている^{3,12,13)}。この仕組みによって、マルチスパン膜タンパク質ではすべてのTMセグメントが高い疎水性度をもっている必要がないことも明らかになった^{14,15)}。このようにして、小胞体ではリボソーム、シグナル配列およびトランスロコンが協調し、互いに適切なタイミングで作用することによってポリペプチド鎖が膜に織り込まれてゆく^{14,15)}。

3. トランスロコンを構成する Sec61 (SecY) 複合体

真核細胞の小胞体や原核細胞の形質膜には類似性のあるタンパク質膜透過装置が存在し、トランスロコンとよばれている³⁾。動物の Sec61 複合体 (α , β , γ)、出芽酵母の Sec61 複合体 (Sec61p, Sbh1p, Sss1p)、大腸菌の SecY 複合体 (SecY, SecE, SecE) で、互いに対応する3種のヘテロサブユニットからなる複合体である。これらのなかで、SecY が最初に伊藤維昭博士により発見された (発見の経緯は文献16) を参照)。

古細菌 (*Methanococcus jannaschii*) の SecY 複合体の結晶構造¹⁷⁾によると、SecY の10本の TM ヘリックスが親水性の孔を形成している。細胞質側の開口部の直径が17Åで反対側が14Åであるのに比べ、中央部分には3Åしかないくびれ構造があり、全体には砂時計型をしている。くびれ部分には、疎水性アミノ酸がリング状に整列し、それらの側鎖は内側に突き出して透過途中のポリペプチド鎖と膜透過孔との間のすき間を埋め、水やイオンなど低分子物質の漏れを防ぐ作用をしていると考えられる³⁾。細胞質側には突き出た部分があり、リボソームとの相互作用が考えられる¹⁸⁾。前半後半の各5本ずつの TM (TM1~TM5 と TM6~TM10) が擬似対象性を示し、TM5 と TM6 間のループがちょうつがい部分となり、それぞれが合わさった二枚貝型構造をしている。ちょうつがいの反対側には、TM7 と TM2 で形成されたシグナルポケットがあり、ここが横方向 (膜平面方向) へ向かって開口できる構造になっている。シグナルアンカーが始めにここで認識された後、横方向に離脱し TM セグメントとなるのが容易に想像できる。また、短い α ヘリックスがくびれ部分の近くにあり、休止状態時に孔をふさぐと考えられる。くびれ部分は狭く1本のポリペプチド鎖が通れる程度しかないが、くびれ部分を形成する残基が膜透過途中のポリペプチド鎖と S-S 結合形成可能なほど近接していることなどから、この孔が透過孔であると考えられている¹⁹⁾。SecY 複合体の二量体の機能を丹念に解析した報告によると、一方の SecY のみがシグナルポケットと膜透過孔を形成している²⁰⁾。多量体を形成していてもシグナル受容と透過孔形成は一つの SecY 分子によって担われていると考えられる。

このように、トランスロコン孔は一つの SecY (Sec61) 複合体で形成されている可能性が高いと考えられるが、いくつかの観察からもっと大きな (または柔軟な) 構造をしているとの考えもあり論争となっている。たとえば、小胞体膜ではトランスロコンに40Åをこえる大きな親水性環境が形成され、かなり大きな分子が内腔側から機能途中のトランスロコン孔内部へ進入できる²¹⁾、トランスロコンの親水性の環境に少なくとも5本の膜タンパク質の TM セグメントが許容される²⁴⁾、などの実験事実は狭いチャンネルで

は考えにくい現象である。また、小胞体内腔の hsp70 (BiP) が内腔側でトランスロコン孔のふたとして作用している^{22,23)}との報告はくびれ部分に栓があるとの説とも相容れない。Sec61 複合体や SecY 複合体はほとんどの場合二量体または四量体で観察されてきており、リボソームを結合した Sec61 複合体は開口部を近接させた二量体を形成するという報告もある²⁵⁾。このように、Sec61 チャンネルはオリゴマー構造を介して機能している可能性が考えられてきた。

4. 正電荷の透過抑制作用

正電荷アミノ酸による膜配向決定作用は、統計的にも『Positive Inside Rule』として広く認知され、実験的にも多くの例が報告されている。たとえば、シナプトタグミン2のN末端近くにあるシグナル配列 (SA-I) は、すぐ後ろにある複数の正電荷によってN末端が膜内腔側でC末端が細胞質側にある配向を維持している。この正電荷数を変化させると数に応じて配向が逆転する²⁶⁾。

これらの正電荷アミノ酸と疎水性配列の間の距離効果についての実験結果は興味深い構造形成ダイナミクスを示唆した (図2)。疎水性配列から正電荷アミノ酸を後ろへ離していくと、距離に応じて効果が低下するのであるが、驚いたことに20残基以上離れた位置にある正電荷が TM 配向に影響した (図2)²⁷⁾。すぐ後ろに正電荷がある場合には、疎水性配列がリボソームから出るとすぐにN末端ドメインの透過が見られる (図2a)²⁶⁾。正電荷クラスターを25残基後ろに移動させても、作用はやや低下するが有意なN末端側透過作用が認められた (図2b)²⁷⁾。40残基離すとN末端ドメインの膜透過を誘導せず、C末端側の膜透過が見られるようになった (図2c)。さらに、ポリペプチド鎖の伸張段階との関連を調べると、正電荷を20残基後ろに配置した場合には、5残基のみ離れた場合に比べてN末端ドメインの透過タイミングが遅くなっていた。20残基以上後ろにある荷電残基がトランスロコンに達するときには、疎水性配列はC末端側が膜透過した配向を十分形成できるはずであるが、現実にはこのような状況下でもN末端側の透過を誘導できるわけである。トランスロコンは予想以上に広い範囲の残基分布を識別して、ダイナミックな配向決定を引き起こしている。またこれらの結果は、正電荷と疎水性配列が物理的に近接していなくても、正電荷は配向決定の指令を出すことができることを意味する。電荷は疎水性配列とは独立したトポロジー決定要因であるかもしれない。データは示さないが、最近疎水性セグメントと正電荷アミノ酸残基が相互の関連なしに、独立したポリペプチド鎖の膜透過制御要因であることが筆者らの研究で分かってきた。

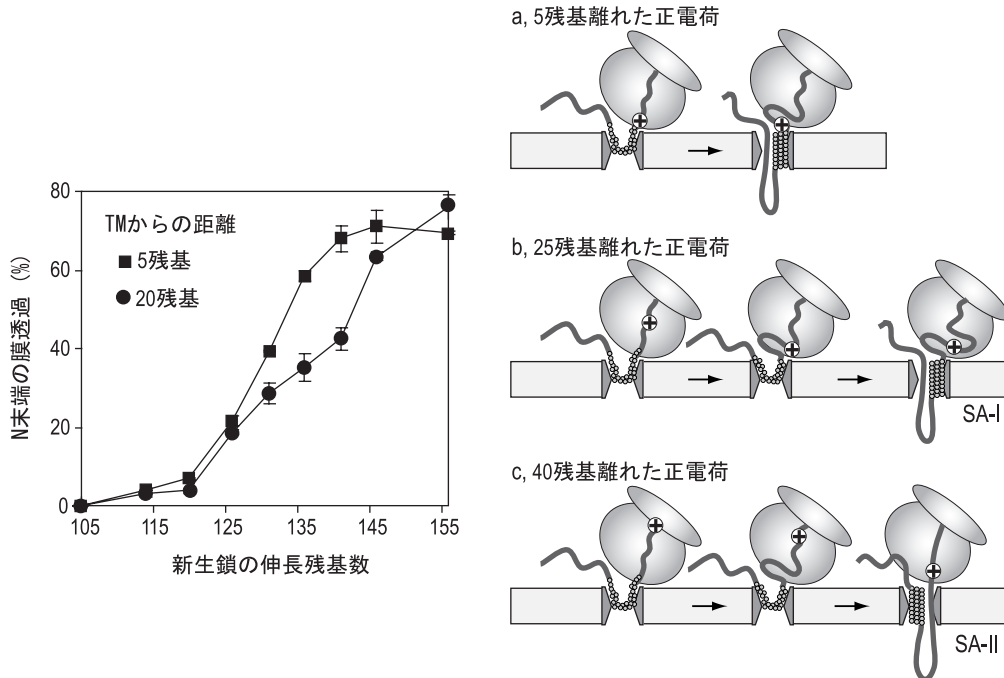


図2 トランスロコンによる正電荷アミノ酸残基の認識とN末端ドメインの膜透過

タンパク質合成中間状態を作ることができる無細胞系で、ポリペプチド鎖の伸長度合いと、N末端ドメインの膜透過との関係を調べた²⁷⁾。シナプトタグミン2のSA-Iの場合、疎水性配列から5残基後ろの正電荷クラスターがトランスロコンに識別されてN末端の膜透過が始まる(a)。正電荷を疎水性配列から25残基後方へと離してもN末端ドメインの膜透過誘導作用が見られる(b)。40残基離すと後ろ側が透過する(c)。トランスロコンは、疎水性セグメント直近のみならず、かなり広範囲の荷電アミノ酸残基を識別している。左は正電荷クラスターが20残基離れたとき、より長く伸長しないとN末端の膜透過が進まないことを示す。

5. DHFR ドメインを使った膜透過の制御系

トランスロコンでのポリペプチド鎖輸送の分子機構や関わっている因子の詳細を調べるには、リボソームによる伸長とトランスロコンによる透過とを分離して解析することが必要である。SA-Iは、一度でき上がったN末端部分を透過させるので、適当な工夫をすれば合成を止めた後で膜透過を観察できると考えられた。N末端ドメインの透過を一時停止させておく工夫として、ミトコンドリアへのタンパク質輸入実験で用いられてきたジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を利用した^{28,29)}。シナプトタグミン2(SytII)のN末端にマウスのDHFRを融合し、合計250残基を越える大きなドメインとしても、後ろのSA-Iにより膜透過し小胞体内腔で糖鎖付加を受けた(図3A)。糖鎖付加は内腔のオリゴ糖転移酵素による高マンノース型コア糖鎖の付加で、膜透過の決定的な指標になる。タンパク質合成の際にDHFRの基質アナログであるメトトレキセート(MTX)を添加しておく、膜透過が完全に抑制された(図3A)。さらに都合なことには、低温での超遠心分離により溶液中のMTXを除いた後、温度を上げることによって膜透過を再開させることができた(図3B)。図の向下的矢印が糖鎖

付加された産物であるが、最初ほとんど観察できないものが、経時的に増加している²⁸⁾。このようにして、大きなN末端ドメインの膜透過を制御して調べることが可能になった。またこの実験事実は、DHFRドメインが膜透過以前にMTXが結合できる状態にまでフォールドしていることを示した。

この実験系でMTXを添加してタンパク質を合成した後、エネルギー分子を除くなどによって、それらの要求性を調べることができるようになった。膜に標的化する過程にはGTPが必須であるが、その後のDHFRドメインの膜透過にはATPなどの高エネルギーリン酸化合物は、意外にも不要であることが明らかになった。また、粗面小胞体膜を弱いアルカリ条件で処理することによって、内腔のHsp70ホモログ(BiP)を除いても有意な膜透過が観察され、BiPシャペロンは関わっていないことが分かった。

この実験系では、新生ポリペプチド鎖がリボソームに結合したままの状態でも膜透過を起こさせている。終止コドンを含まないmRNAをタンパク質合成に用いると3'末端まで翻訳が進んでも、翻訳終結因子が作用しないために新生鎖はpeptidyl-tRNAとしてリボソーム内に保持されるのである。この工夫によってはじめて、長いN末端ドメイン

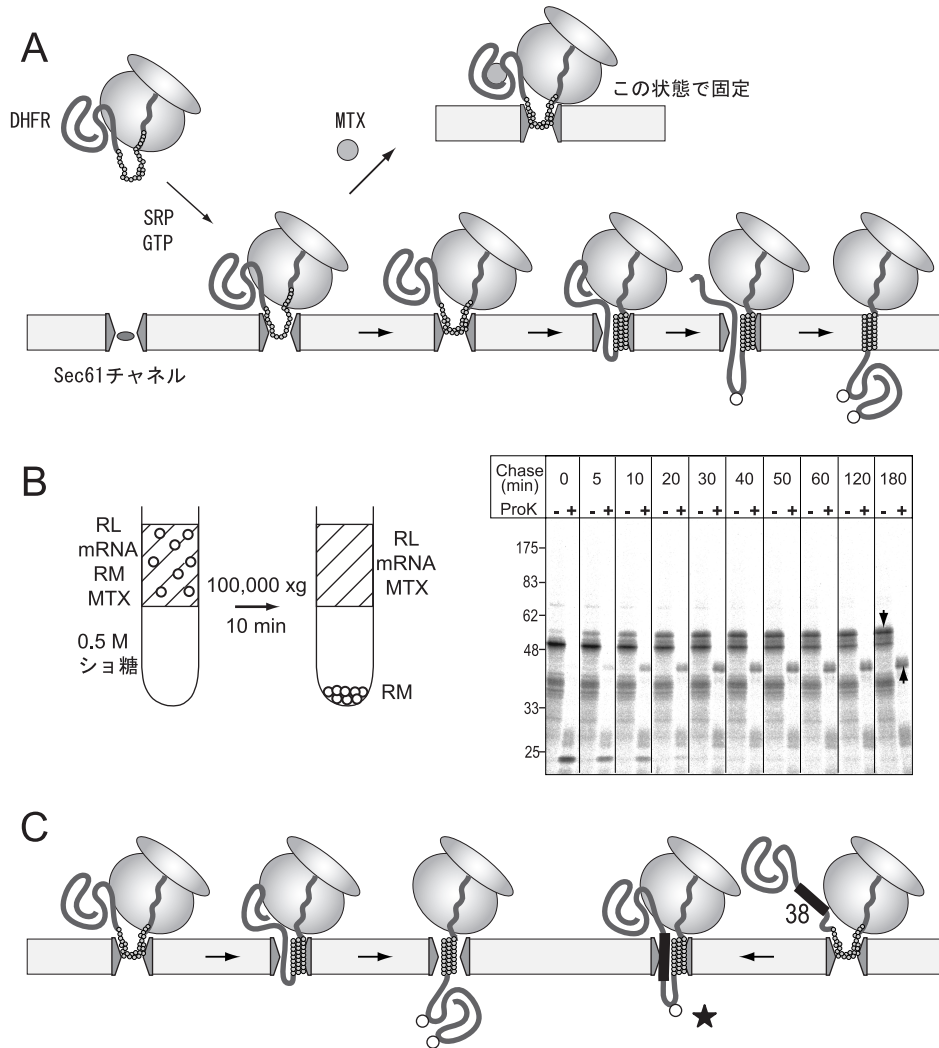


図3 SA-Iによる大きなN末端ドメインの膜透過

(A) DHFRを含む250残基以上のN末端ドメインが後ろのSA-Iの作用により膜透過できる。GTPがないと膜標的化が起きないが、その後の長いN末端ドメインの膜透過はエネルギー分子なしに進む。小胞体内腔のBiPシャペロンも必須ではない。効率よい透過にはリボソームが新生鎖に結合していることが必要である。DHFRドメインの膜透過はリガンド(MTX, メトトレキサート)の結合で完全に抑制される。白丸は内腔での糖鎖付加を示す。

(B) MTXで抑制されたDHFRドメインの膜透過は、MTXを遠心で除去すると再開できる。ショ糖クッションを通して膜を沈殿させ、溶液内のMTXを除去し、再懸濁して温度を上げることで同調的に膜透過を再開させることができる。アイソトープラベルされた新生鎖の時間経過ごとの糖鎖付加状況をSDS-PAGEにより調べた結果を示す。糖鎖付加を受けた分子(下向き矢印)が時間とともに増加するのが分かる。また各時点でプロテアーゼ(ProK)処理を行うと、膜透過を示すProK抵抗性の分子(上向き矢印)が増加しており、膜透過が確認される。

(C) SA-Iの膜への進入ストロークとDHFRドメインの膜透過。SA-Iに近い場合にはDHFRドメインのアンフォールディングが誘起され膜透過できる(左)。38残基のスペーサーを導入すると、MTXのない条件でも膜透過できない(右)。このときスペーサーの後ろは糖鎖付加を受ける(★印)。シグナル配列がトランスロコンを介して膜に進入する際に大きな駆動作用が働くが、そこから離れた位置のDHFRドメインのアンフォールディングは引き起こさない。

の高効率膜透過が可能になった。逆に、ピューロマイシン処理や終止コドンによって積極的にポリペプチド鎖をリボソームから解離させると、N末端のDHFRドメインの膜透過効率が低下した。リボソームの活動状態がトランスロコンの機能に積極的な役割を果たしていると結論された。これに関しては、リボソームがSec61複合体の会合を誘導するという報告や³⁰⁾、リボソーム内で感知された合成途上のポリペプチド鎖の情報がトランスロコンに伝わり機能が制御されるなどの興味深い報告^{31,32)}と対応する。リボソームとトランスロコン間の情報伝達と互いの機能制御も今後の興味深い課題である。

この膜透過制御系でDHFRドメインのアンフォールディングと膜透過駆動力について興味深い知見が得られた。DHFRドメインとSA-Iとの間に38残基の親水性配列からなるスペーサーを導入すると、MTXのない条件でもDHFR部分の膜透過が起きなかった。このとき、スペーサーの後ろの部分は内腔にまで到達し糖鎖付加を受けていた(図3C, ★印)。SA-Iの疎水性セグメントはTMトポロジーを形成し、前方の膜透過を始めたものの、DHFRのアンフォールディングが制限となって膜透過が停止したのである。すなわち、DHFRドメインがSA-Iに近接している場合にはDHFRドメインのアンフォールディングを誘起して透過させることが可能である(図3C)が、38残基のスペーサー導入によって、SA-Iのトランスロコン孔への進入による駆動作用がDHFRドメインにまで作用しなくなったと解釈された。後で触れるように原理的に異なる制御実験によっても、この駆動作用の変動が定量的に観察されている。これらの事実から、初期段階ではシグナル配列の膜への進入ストロークによって大きな駆動力が作用するが、その後続く膜透過段階ではDHFRドメインを解きほぐすほどの駆動作用はないと考えられた。

一方、DHFRドメインアンフォールディングが誘起され透過が一旦スタートすると、200残基を超える大きなドメインでも、透過にはATPなどの高エネルギー化合物は不要であり、内腔のBIPもない状況で膜透過が進むと結論された。

6. 培養細胞内での透過制御

このようなMTXによるN末端DHFRドメインの透過抑制は生きている細胞内でも見られた³³⁾。上記の無細胞膜透過実験で用いたモデルタンパク質(DHFR-SytII)を培養細胞で一過的に発現させウエスタンブロッティングで調べると、DHFRドメインが膜透過した糖鎖付加型が主産物として検出された。一方、培地にMTXを添加しておくとも膜透過が抑制された、非糖鎖付加型が主産物となった。小胞体品質管理による分解や安定性の変化などを考慮しなければならないが、細胞内に定常的に存在する膜タンパク質の

膜トポロジーを培地成分によって制御し逆転させることができると考えられる。この結果は、生きている細胞でもN末端のDHFRドメインが合成された後、膜透過以前にMTXが結合可能な状態にまでフォールドしていることを示す。低分子薬剤を培地へ添加するだけで、生きている細胞内での膜タンパク質の膜トポロジーを変化させることができるわけで、応用方面への意義があるかも知れない。

7. SBP-タグで膜透過を制御する

より定量的に膜透過駆動作用を解析したり、より精密に膜組み込み中間状態を規定したりするためには、より小さなドメインを用いた透過制御系が必要であった。この目的のためには、長いN末端ドメインの膜透過を調べるのとは逆に、短いドメインで明瞭なON-OFFができること、産物の分子量ができるだけ小さいこと、できれば中間体を単離して構造解析への道が開けることなどの要請があった。いくつかの試行の後、ストレプトアビジン結合ペプチドタグ(SBP-タグ)で理想的な制御が可能であることが分かった(図4)³⁴⁾。SBP-タグはいわゆるディスプレイ手法で見出された38残基のペプチドタグで、ストレプトアビジン(SAv)に高い親和性をもつ³⁵⁾。SBP-タグをN末端に融合したモデルタンパク質を無細胞系で合成し膜組み込み実験を行うと、SAvでN末端ドメインの透過が抑制された(図4)。このときシグナル配列の前方にある2箇所の糖鎖付加サイトはいずれも修飾を受けなかった。すなわち、疎水性部分はTMトポロジーを形成していない組み込みの初期段階(earlier stage)にあると考えられた。SAvとの結合はビオチンを添加することによって解除でき、それと同時に膜透過を高効率で再開できた。また、SBP-タグとSA-Iの間に38残基のスペーサーを導入すると、N末端部分は細胞質側に留め置かれているものの、後方は小胞体内腔にまで到達して糖鎖付加を受けている、より進んだ中間状態(advanced state)が形成できた(図4B, ★印)。いずれの中間体も主要産物であり、ビオチンを加えることで2箇所の付加サイトへの糖鎖付加が定量的に見られた(図4C)。こうして、N末端の透過が38アミノ酸のタグ配列で制御でき、DHFRの長いドメインを使ったときと同様に、トランスロコンへの進入度合いの異なる2種の膜透過中間状態を形成できた。

この系では、SAvの濃度やSBP-タグのSAvとの親和性を改変することで、膜透過駆動作用を定量的に調べることができる。予備的な結果によると、SBP-タグはSAvと $K_d = 1 \times 10^{-9}$ 程度のかなり強い親和性でないと効率的な膜透過抑制を発揮できない。透過の駆動力を見積もると、SBP-タグがSA-Iシグナル配列に近いときに比べ、38残基離れた場合には10分の1以下の濃度のSAvで膜透過が抑制された。このように膜透過の段階に応じて駆動力が変動する

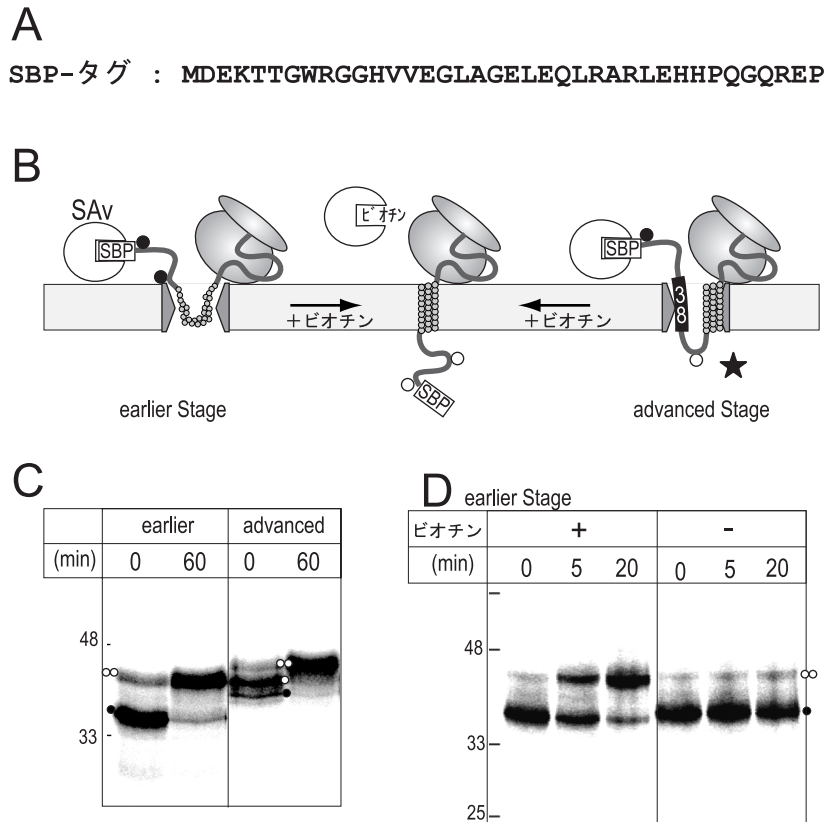


図4 SBP-タグとストレプトアビジン (SAv) を使った膜透過制御系

- (A) SAv 結合ペプチドタグ (SBP-タグ).
 (B) N 末端に SBP-タグを付加すると, N 末端ドメインの膜透過が SAv によって抑制される. N 末端部分の 2 箇所サイトの糖鎖付加を受けていない (黒丸, earlier stage). ビオチンを添加することで SAv からタグが解離して膜透過が再開し, 2 箇所とも糖鎖付加される (白丸). SBP-タグと SA-I の間に 38 残基スペーサーを導入すると, シグナル配列の膜内への進入が進んで, 後ろのみが糖鎖付加を受ける (advanced stage, ★印). 親水性セグメントが膜を貫いた中間状態である.
 (C) 膜透過中間体の糖鎖付加状況. earlier stage の中間状態では糖鎖付加が見られないものが, ビオチン添加後 60 分で, 定量的に 2 箇所糖鎖付加型に変換した. advanced stage の場合は, 1 箇所糖鎖付加型 (白丸○印) が主要産物として観察され, ビオチン添加後には全て 2 箇所糖鎖付加型に変換している.
 (D) 膜透過再開後の膜透過時間経過. 20 分後には大半が糖鎖付加型に変換している. ビオチンの存在しないときにはほとんど糖鎖付加が見られない.

ことが明らかになりつつある. これは DHFR ドメインを用いて得られた前出の定性的な結果と同じ結論で, シグナル配列がトランスロコンに進入するときに, より強い透過駆動作用が発揮されることを示す. さらにこの系を使って, シグナル配列の点変異で駆動作用が変動することが証明されつつある. シグナル配列自体がタンパク質膜透過の駆動力を供給することを初めて証明するものと期待される. 今後これらの透過制御系を使って, ポリペプチド鎖の膜をこえた輸送の一分子観察や, 速度論的解析などを行う予定である.

8. 2本のポリペプチド鎖が膜透過中間状態を形成する

結晶構造から, トランスロコン内では, SecY の 10 本の

TM セグメントによって狭い透過孔が形成されると考えられた. 確かに単純な膜透過は説明可能であるし, 透過途上のポリペプチド鎖は SecY 孔のくびれ部分とジスルフィド結合可能であるとの報告¹⁹⁾もこれを支持する. しかし, 生理機能上重要なマルチスパン膜タンパク質の構造形成がいかに説明されるのかが課題として残された. 大きな親水環境が形成されるとか²⁴⁾, アクアポリンの 4 本の TM セグメントが同時に Sec61 α サブユニットと架橋反応する³⁶⁾などの報告はトランスロコンが単純ではないことを示唆した.

SBP-タグによる実験系を適用して, マルチスパン膜タンパク質の膜組み込みを解析したところ, 以下のように, SecY 複合体の結晶構造から想定される狭い孔のみでは説明できない結果が次々と得られた. N 末端に SBP-タグを

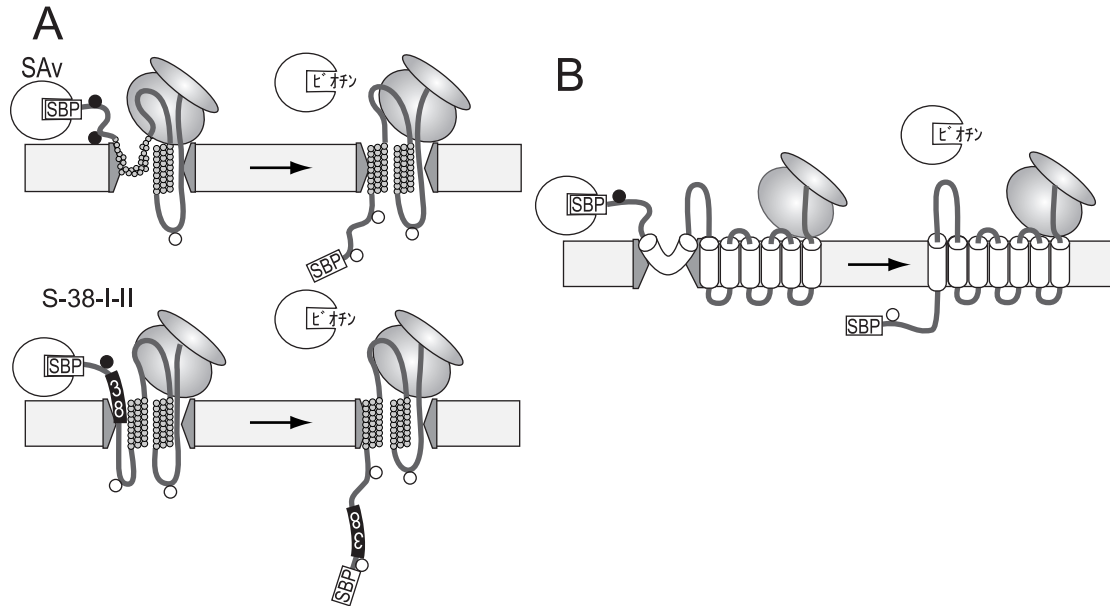


図5 2本の透過中間状態のポリペプチド鎖がトランスロコンに許容される

(A) SBP-タグで中間状態を形成させ、後方に2番目の膜組み込みシグナルを配置した。C末端は終止コドンなしのmRNAを翻訳することでリボソーム内に固定した。前方の膜組み込み中間状態にかかわらず2番目のシグナルが膜透過を開始しその後方の親水性ポリペプチド鎖が透過中間状態を作った。いずれの中間状態ともに、ビオチンによるN末端の透過再開が可能であった。さらにC末端側もピューロマイシンでリボソームから解離することで透過再開できた。

(B) 透過中間状態を形成する条件で、後方にロドプシンのTM2からTM7の6本の膜貫通セグメントを配置した。N末端の中間状態にもかかわらず後方のTMの組み込みは阻害されなかった。後方の組み込みは、内腔側ループの糖鎖付加により定量的に確認された。逆に後方に6本のTMが組み込まれても、N末端の膜透過中間状態は維持されており、ビオチンによる透過再開が可能であった。

配置して、SA-Iの後方に2番目の膜組み込み配列を配置した図5Aのようなモデルポリペプチド鎖の挙動を調べた。C末端は終止コドンのないmRNAを翻訳することでリボソーム内に固定した。このデザインは、筆者らが蓄積してきたトポロジー形成シグナルの知見を活用して可能となった。無細胞系で膜組み込みを行うと、驚いたことにN末端の膜透過を抑制したearlier stageおよびadvanced stageのいずれにあっても、その後方の膜組み込みが効率よく観察された(図5A)。さらにビオチン添加後は、N末端部分の透過が定量的に再開できた。いずれの中間状態でも、後方の膜透過中間状態の形成のためにはトランスロコンが2本の親水性ポリペプチド鎖を同時に受け入れる必要がある。実験をする前には、トランスロコンが一つの小さな透過孔で構成されているならば、SBP-タグによる透過抑制の影響で後方の膜組み込みは起こらないと予想したので、これらの結果は驚きであった。現実には、N末端側のSA-Iが組み込み中間状態となりシグナルポケットを占有しているときに、後方のシグナルが機能することを妨げない。また、逆に後方のシグナルと親水性ポリペプチド鎖がトランスロコン孔に入った状態でも前のシグナル配列がN末端ドメインを透過させることができる。さらにこれらの中間状態でも、N末端部分のみならずC末端部分の膜透過も

可能だった。

また、膜透過途中の2本のポリペプチド鎖の特定の部位にシステインを導入し、部位特異的な架橋反応を行うと、両方ともSec61 α サブユニットと架橋され、2本ともトランスロコン孔の近傍に存在することが示された。このようにして、トランスロコンは2本の親水性ポリペプチド鎖を同時に収容できることが確かなこととなった。

さらに、N末端ドメインの膜透過中間状態で、SA-Iの後方にロドプシンの6本の膜貫通配列を配置してトランスロコンに対する影響を調べた(図5B)。N末端の透過をSAvで抑制しておいても6本の組み込みは高効率で進んだ。TM2-TM3およびTM4-TM5の組み込みはそれらの間のループ部分に糖鎖付加が起きることを利用して確認した。逆に、後方に6本ものTMセグメントが進入した後でも、N末端側の中間状態は維持されており、ビオチンを添加すると膜透過が効率よく再開した。これは、二枚貝型チャンネルの開口部にあるシグナルポケットにSA-Iが配置された中間状態のチャンネルに6本の疎水性セグメントが進入できることを意味する。トランスロコンはマルチスパン膜タンパク質の多数のTMセグメントを順番に受け入れ、順番に脂質環境へと送り込んでゆくと考えられている³⁶⁾。しかし、結晶構造によるとシグナルポケットはこの出口部

分に存在し、もしここを組み込み中間状態のシグナル配列が占有しているなら、透過孔に入ってきた後方の TM セグメントは膜環境へと出て行けずに結果的に組み込みは進まないと予想された。逆に、もし、複数の TM セグメントがトランスロコンに進んできたとしても、N 末端部分の膜組み込み中間状態は維持されないだろうと予想した。しかし、事実はいずれの状態も可能であった。トランスロコンは驚くべき柔軟性を有していたのである。これらはトランスロコンで一つの SecY の狭い孔だけが作用しているとする単純な仮説では考えにくい結果であった。

9. トランスロコン孔協調機能モデル

狭い Sec61 (SecY) チャネルの孔の中で、どのようにして 2 本の親水性ポリペプチド鎖が受容されるのか? Sec61 チャネル単独では、よほど大きな構造変化がない限りこのようなことは不可能に思われる。また、他のアクセサリ因子の作用によってチャネル孔が大きくなるのだろうか、あるいは補助的な受容部位が形成されるのだろうか (図 6A)? あるいは、複数の Sec61 複合体が集合して、大きな孔を形成するのだろうか (図 6D)? SecY 複合体結晶構造の外周は疎水性が高く脂質と触れる状況であり、単純にこれらが四つ会合したとしても会合体の中央部分に親水性の大きな環境が出現するとは考えにくい。また膜透過途中のポリペプチドは SecY モノマーの中央のくびれ部分を通るという確かな報告がある¹⁹⁾。このように、結晶構造でみられた「くびれ部分」以外に予想外の大きな透過チャネルが新たに形成されるという可能性は完全には否定できないが、低いように思われる。

一方、機能性 Sec61 (SecY) チャネルは高頻度で二量体以上の会合体として観察されることから考えると、近接した Sec61 複合体チャネルが 2 個一緒に働けばよいと考えられた (図 6B, C)。2 個の Sec61 チャネルが協調して、それぞれがシグナルと透過ポリペプチド鎖の組を受け入れると考えるのである (図 6B)。動物トランスロコンで観察される Sec61 複合体の四量体のうち 2 個が協調関係にあると考えると、マルチスパン膜タンパク質の疎水性度の不十分なセグメントがトランスロコン内に配置されたときにも、2 番目の Sec61 孔が続く膜組み込みを担当することができる。この仮説によると、これまで多くの場面で観察されてきた Sec61 (SecY) 複合体の四量体構造の意義が明らかであるし、私たちの見出した予想外の間中状態も矛盾なく説明できる。また、疎水性度の低い配列を一時的に保管する場としてアセンブリの環境も中央部分に提供でき、より複雑な低疎水性 TM 部分を含むマルチスパン膜タンパク質^{13,37)}の膜組み込みも説明できる。また正電荷を多数有する膜電位依存性イオンチャネルの TM4 (S4) の電荷相互作用による組み込み^{38,39)}も説明できる。このように、複数

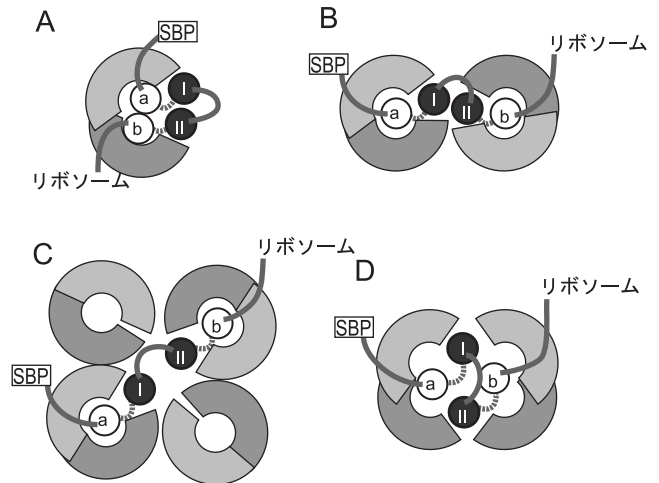


図 6 Sec61 ポア協調機能モデル

トランスロコンに複数の親水性ポリペプチド鎖が収容された状況を説明するモデル。シグナル配列を I および II で、透過ポリペプチド鎖を a および b で示す。Sec61 チャネルを細胞質側から見た模式図で示す。

(A) 一つの Sec61 チャネルが構造変化を起こし、場合によっては他の補助因子と協調して、大きな孔を形成する。(B) 二つの Sec61 チャネルが協調し、それぞれ一つのシグナル配列と透過ポリペプチド鎖を収容する。(C) Sec61 チャネルが形成する四量体構造のうち二つがそれぞれ 1 組のシグナル配列と透過ポリペプチド鎖を受け入れる。B の二つのポア協調モデルの拡張。(D) 二つの Sec61 チャネルが予想外の構造を形成し、大きな親水性環境を形成する可能性。

の膜透過チャネルが協調して機能するこのモデルは理想的な膜組み込み装置としての構成ではないかと考えられた^{34,40)}。

いずれにせよ、ここで見出した予想外の膜タンパク質組み込み中間体はトランスロコンのより複雑で組織的な機能を提起した。複数の膜透過途上のポリペプチド鎖を許容する柔軟な作用によって、複雑な膜タンパク質の組み込みも説明可能となることが期待される^{34,40)}。

10. おわりに

膜タンパク質の構造形成はオルガネラ膜への標的化、膜透過の開始、膜への組み込み、膜内でのアセンブリなどまさに一過的、一方向的な膜インタフェイスでのソフトな相互作用の連続である。また、膜タンパク質のフォールディング研究の中心課題であるだけではなく、個別の膜タンパク質分子の機能発現基盤でもある。これらの膜内構造形成の連続過程が解明できる可能性が出てきた。SBP-タグで厳密に規定された膜組み込み中間状態形成の技法を応用すれば、異なる機能状態にあるにリボソーム・トランスロコン・新生ポリペプチド鎖複合体を単離できる可能性がある。近年、発展著しい単粒子解析技法で各段階のスナップショットを解明していくことも夢ではないだろう。さらには、リボソームとトランスロコン間の情報伝達や、トラン

スロコン内の Sec61 複合体の会合状態、機能分担の機構解明につながるであろう。また、ミトコンドリアやペルオキシソームなどの小胞体以外の系では小胞体 Sec61 系とはまったく異なる膜タンパク質組み込み因子による、独自のメカニズムが見出されるかもしれない。このような構造形成装置に依存した膜組み込みや配向決定機構の存在は、ある意味アンフィンゼンドグマの破綻を意味し、それに依存して構造を形成する膜タンパク質の進化に大きな影響を与えてきた可能性がある。このように、膜タンパク質の構造構築の研究はますますチャレンジングで面白い。多くの意欲的な若者の参画を期待している。

文 献

- 1) Heinrich, S.U., Mothes, W., Brunner, J., & Rapoport, T.A. (2000) *Cell*, **102**, 233–244.
- 2) Sakaguchi, M., Mihara, K., & Sato, R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3361–3364.
- 3) Endo, T., ほか編 (2008) 蛋白質核酸酵素 6 月号増刊「キーワード：蛋白質の一生」, 共立出版.
- 4) Borgese, N., Brambillasca, S., & Colombo, S. (2007) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **19**, 368–375.
- 5) Lakkaraju, A.K., Mary, C., Scherrer, A., Johnson, A.E., & Strub, K. (2008) *Cell*, **133**, 440–451.
- 6) 阪口雅郎 (2003) 生化学, **75**, 520–528.
- 7) Sakaguchi, M., Tomiyoshi, R., Kuroiwa, T., Mihara, K., & Omura, T. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 16–19.
- 8) Kuroiwa, T., Sakaguchi, M., Mihara, K., & Omura, T. (1990) *J. Biochem.*, **108**, 829–834.
- 9) Kuroiwa, T., Sakaguchi, M., Mihara, K., & Omura, T. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 9251–9255.
- 10) Hessa, T., Meindl-Beinker, N.M., Bernsel, A., Kim, H., Sato, Y., Lerch-Bader, M., Nilsson, I., White, S.H., & von Heijne, G. (2007) *Nature*, **450**, 1026–1030.
- 11) Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S.H., & von Heijne, G. (2005) *Nature*, **433**, 377–381.
- 12) Sakaguchi, M. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **296**, 1–4.
- 13) Ota, K., Sakaguchi, M., von Heijne, G., Hamasaki, N., & Mihara, K. (1998) *Mol. Cell*, **2**, 495–503.
- 14) 阪口雅郎 (1999) 細胞工学, **18**, 102–112.
- 15) 阪口雅郎 (2003) 実験医学, **21**, 1924–1931.
- 16) 伊藤維昭 (2007) 蛋白質核酸酵素, **52**, 1480–1485.
- 17) Van den Berg, B., Clemons, W.M.J., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., & Rapoport, T.A. (2004) *Nature*, **427**, 36–44.
- 18) Ménétret, J.F., Schaletzky, J., Clemons, J.W.M., Osborne, A.R., Skänland, S.S., Denison, C., Gygi, S.P., Kirkpatrick, D.S., Park, E., Ludtke, S.J., Rapoport, T.A., & Akey, C.W. (2007) *Mol. Cell*, **28**, 1083–1092.
- 19) Cannon, K.S., Or, E., Clemons, W.M.J., Shibata, Y., & Rapoport, T.A. (2005) *J. Cell Biol.*, **169**, 219–225.
- 20) Osborne, A.R. & Rapoport, T.A. (2007) *Cell*, **129**, 97–110.
- 21) Hamman, B.D., Chen, J.C., Johnson, E.E., & Johnson, A.E. (1997) *Cell*, **89**, 535–544.
- 22) Hamman, B.D., Hendershot, L.M., & Johnson, A.E. (1998) *Cell*, **92**, 747–758.
- 23) Alder, N.N., Shen, Y., Brodsky, J.L., Hendershot, L.M., & Johnson, A.E. (2005) *J. Cell Biol.*, **168**, 389–399.
- 24) Borel, A.C. & Simon, S.M. (1996) *Cell*, **85**, 379–389.
- 25) Mitra, K., Schaffitzel, C., Shaikh, T., Tama, F., Jenni, S., Brooks, C.L.r., Ban, N., & Frank, J. (2005) *Nature*, **438**, 318–324.
- 26) Kida, Y., Sakaguchi, M., Fukuda, M., Mikoshiba, K., & Mihara, K. (2000) *J. Cell Biol.*, **150**, 719–730.
- 27) Kida, Y., Morimoto, F., Mihara, K., & Sakaguchi, M. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 1152–1158.
- 28) Kida, Y., Mihara, K., & Sakaguchi, M. (2005) *EMBO J.*, **24**, 3202–3213.
- 29) Eilers, M. & Schatz, G. (1986) *Nature*, **322**, 228–232.
- 30) Matlack, K.E.S., Mothes, W., & Rapoport, T.A. (1998) *Cell*, **92**, 381–390.
- 31) Daniel, C.J., Conti, B., Johnson, A.E., & Skach, W.R. (2008) *J. Biol. Chem.*, in press.
- 32) Liao, S., Lin, J., Do, H., & Johnson, A.E. (1997) *Cell*, **90**, 31–41.
- 33) Ikeda, M., Kida, Y., Ikushiro, S., & Sakaguchi, M. (2005) *J. Biochem.*, **138**, 631–637.
- 34) Kida, Y., Morimoto, F., & Sakaguchi, M. (2007) *J. Cell Biol.*, **179**, 1441–1452.
- 35) Wilson, D.S., Keefe, A.D., & Szostak, J.W. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3750–3755.
- 36) Sadlish, H., Pitonzo, D., Johnson, A.E., & Skach, W.R. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 870–878.
- 37) Ota, K., Sakaguchi, M., Hamasaki, N., & Mihara, K. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 28286–28291.
- 38) Sato, Y., Sakaguchi, M., Goshima, S., Nakamura, T., & Uozumi, N. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 60–65.
- 39) Zhang, L., Sato, Y., Hessa, T., von Heijne, G., Lee, J.K., Kodama, I., Sakaguchi, M., & Uozumi, N. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 8263–8268.
- 40) Skach, W.R. (2007) *J. Cell Biol.*, **179**, 1333–1335.