

## 大腸菌における膜内在性タンパク質の膜挿入機構

西山 賢一

大腸菌におけるタンパク質膜挿入機構は、膜挿入に関与する因子の変異株解析や、膜挿入反応の *in vitro* 実験系・再構成系の発展により多くの知見が明らかになってきているが、個々の膜タンパク質により因子の要求性が大きく異なるため、統一的な膜挿入機構の理解には至っていなかった。また、リポソームでは *in vivo* では観察されない自発的な膜挿入が起こるため、再構成系の確立が困難であった。筆者らは、ジアシルグリセロールにより自発的膜挿入が抑制されることを見出し、さらに膜挿入に関与する因子を発見・精製した。その結果、精製因子のみによる *in vivo* での依存性を正しく反映した膜挿入反応の再構成系の構築に成功した。本総説では、膜挿入機構の分子機構について概説し、機能的膜タンパク質の *in vitro* 大量合成への応用の可能性についても議論する。

## はじめに

膜内在性タンパク質は、大腸菌においては1,000種ほどの存在が予測されており、大腸菌ゲノムにコードされていると考えられる全タンパク質の約1/4近くにも及ぶ<sup>1)</sup>。これらの中には、その機能がまったく不明なものも多くある。ポストゲノムにおけるプロテオミクス解析においても、膜タンパク質の機能解析は重要な課題である。膜タンパク質は、当然のことながら、膜に正しく挿入されてからその機能が発現する。したがって、膜タンパク質が膜挿入する分子機構の解明は、細胞生物学的に最も重要な課題のひとつであるだけでなく、機能未知の膜タンパク質の機能解析といった見地からも解明が望まれている課題である。

分泌タンパク質の膜透過機構が詳細に明らかになってきているのに対し、膜タンパク質の膜挿入機構については不明な点が多く、統一的な理解には至っていない。個々の膜タンパク質で膜挿入に必要な因子が異なる場合があるため

である。現在考えられる大腸菌における膜タンパク質の膜挿入機構について、最近の筆者らの成果を交えて概説する。

## 1. M13 プロコートタンパク質 (M13 procoat) と自発的膜挿入

M13 ファージの主要コートタンパク質は、50 アミノ酸からなる膜内在性タンパク質であり、シグナルペプチドを付加した前駆体として合成されたのち内膜に挿入される。M13 procoat の膜挿入機構の解析の歴史は古く、1970年代からはじまっている。M13 procoat は膜貫通領域を1箇所もち、シグナルペプチドが切断された後、N末端がペリプラズム側、C末端が細胞質側に露出する膜内配向性をとる<sup>2,3)</sup> (図1)。M13 procoat はプロセスされるシグナルペプチドを保持しているという点では分泌タンパク質に似ているが、分泌タンパク質の膜透過に必要な因子 (Sec 因子、後述) の変異株 (*sec* 変異株) においてもその膜挿入はまったく影響を受けない<sup>4)</sup>。そればかりか、リン脂質のみで形成されたりポソーム存在下で M13 procoat を合成しても、リポソームへの膜挿入が観察される<sup>5-7)</sup>。さらに、リポソームにプロテアーゼをあらかじめ封入しておくと、膜挿入した M13 procoat がリポソーム内部のプロテアーゼで分解される<sup>7)</sup>ことから、M13 procoat がリポソームに膜挿入していることが確認される。大腸菌が形成している膜電位を破壊すると M13 procoat の膜挿入は強く阻害を受ける<sup>8)</sup>

東京大学分子細胞生物学研究所 (〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1)

Molecular mechanisms underlying membrane protein integrations in *E. coli*

Ken-ichi Nishiyama (Institute of Molecular and Cellular Biosciences, the University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan)

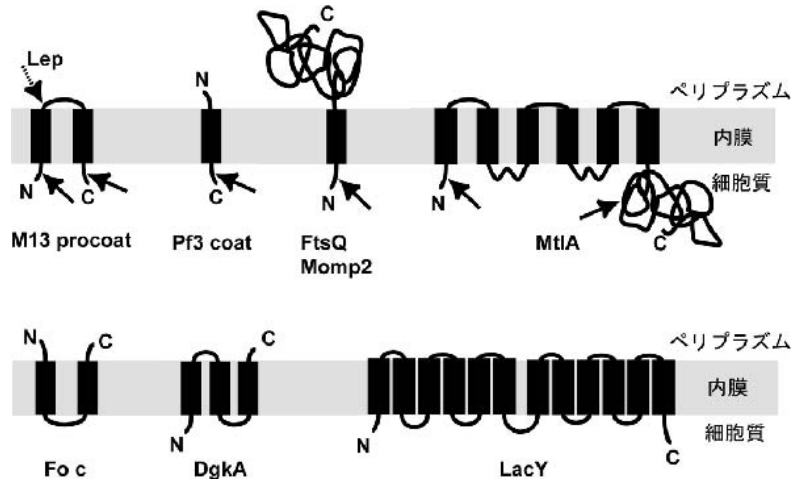


図1 代表的な膜内在性タンパク質の膜内配向性

図に示す大腸菌内膜タンパク質の内膜での配向性モデルを示した。内膜の下が細胞質，上がペリプラズムを示している。上段下側の矢印は，*in vitro*で膜挿入反応を行った後プロテアーゼ消化を行ったとき，分解を受ける部位を示す。点線矢印は，リーダーペプチダーゼ(Lep)により切断される部位を示す。

が，膜電位非存在下でも膜挿入が完全に阻害されるわけではなく<sup>9)</sup>，膜電位を形成していないリボソームにも膜挿入が起こる<sup>7)</sup>。このため，M13 procoatの膜挿入は自発的に進行し，これは膜電位により促進されると考えられてきた。しかし，変異型M13 procoatの中には，膜電位非存在下でも膜挿入できるものもある<sup>10,11)</sup>ため，膜電位は膜挿入のエネルギー源として作用するわけではない。膜挿入の駆動力になっているのは，むしろ，疎水の相互作用である<sup>11,12)</sup>。膜電位は，膜タンパク質が一定のトポロジーで膜挿入するのに必要であるという報告もある<sup>11,13)</sup>。M13 procoatはタンパク質性の「膜挿入装置」を介さずに，膜貫通領域の疎水的相互作用のみによって自発的に膜挿入すると考えられたのである。言うまでもなくM13 procoatはバクテリオファージ由来の膜タンパク質であるため，この自発的膜挿入はファージがもつ巧妙なトリックによるとも考えられるが，F<sub>0</sub>cサブユニットやDgkA，KdpDなど(図1参照)，大腸菌自身も持っている膜タンパク質でもこうした機構で膜挿入するものが知られている<sup>14-16)</sup>。しかし，後述するように，Sec非依存的に膜挿入することは必ずしも自発的に膜挿入することを意味しない。

## 2. YidCの発見

YidCは，ミトコンドリアやクロロプラストにおいて膜挿入に関与する因子(それぞれOxa1pとAlb3)と相同的な因子であり<sup>17)</sup>，タンパク質膜透過装置SecYEGと相互作用する<sup>18)</sup>ことが知られている膜タンパク質である。yidC遺伝子は生育に必須であり，YidCを枯渇させた株では，様々な膜タンパク質の膜挿入が阻害される<sup>19)</sup>。このとき，M13 procoatのシグナル配列のプロセッシングも影響を受

け，従来，自発的に膜挿入すると考えられてきたM13 procoatもYidCにより膜挿入する可能性が考えられた。YidC枯渇により，CyoA<sup>20)</sup>などの呼吸系を構成する膜タンパク質の膜挿入が強く影響を受けるため，この株ではプロトン駆動力(膜電位)の形成能が著しく低下していることが明らかになった。そのため，YidC枯渇によるM13 procoatの膜挿入阻害はプロトン駆動力形成能の低下による二次的なものである可能性も指摘されたが，プロトン駆動力に依存しない変異型M13 procoat(上述)の膜挿入も影響を受けたため，YidCがM13 procoatの膜挿入に関与する可能性が強くなった<sup>21)</sup>。しかし，YidC枯渇株でM13 procoatのプロセッシングは影響を受けるが，このときM13 procoatはアルカリ抽出されないため，YidC非存在下でもM13 procoatは，不完全ながらも膜挿入が最終過程まで進行している可能性が高い<sup>21)</sup>。したがって，自発的膜挿入機構は完全に否定されたわけではない。また，膜タンパク質の種類によっては，YidC枯渇によってもあまり影響を受けないものもあり<sup>9,22-24)</sup>，YidCがすべての膜挿入反応に直接的に関与するかどうかは完全に証明されたわけではない。

yidC遺伝子は生育に必須である<sup>19)</sup>ため，YidC枯渇による二次的な影響を排除することが非常に困難になる。そのため，*in vitro*実験系や再構成系でもYidCの機能が調べられている。FtsQ<sup>25,26)</sup>やMtlA<sup>27)</sup>(図1参照)のリボソーム-膜タンパク質新生鎖複合体を膜小胞と反応させると，膜挿入中間体が形成できる。このとき，膜タンパク質新生鎖はYidCと効率よく化学架橋を形成でき，膜挿入中に膜タンパク質がYidCと相互作用することを強く示唆している。これらの結果より，膜タンパク質が膜挿入直後に脂質二重

層に放出される過程に YidC が関与する可能性や、YidC 上で膜挿入直後の膜タンパク質が高次構造を形成していくという可能性が提唱された<sup>27)</sup>。さらには、M13 procoat と同様に Sec 非依存的に膜挿入する Pf3 コートタンパク質 (図1参照) については、ある条件で YidC をプロテオリポソームに再構成しておけば、その膜挿入が促進される<sup>28)</sup>。このことから、YidC は「membrane insertase」であると提唱されている。以上のように、*in vitro* の化学架橋実験でも、YidC の膜挿入反応への関与は強く支持されているが、実際に YidC を枯渇させた膜小胞を用いて膜挿入活性が阻害されたことを示す結果はほとんど報告されていない。F<sub>0</sub>c サブユニットの YidC 枯渇膜への膜挿入が阻害されるという報告があるが、FtsQ の膜挿入はほとんど影響を受けない<sup>29)</sup>。YidC の膜挿入への関与については、むしろ否定的な報告もある。FtsQ は SecYEG を再構成したプロテオリポソームに膜挿入するが、このとき YidC を共存させると阻害的に作用する<sup>22)</sup>。さらに、LacY<sup>23)</sup> (図1参照) や MtlA<sup>9)</sup> の膜挿入は YidC 枯渇膜でも野生株から調製した膜と同様の活性で膜挿入する。しかし、YidC 枯渇膜に膜挿入した LacY は機能的な高次構造を形成していないと考えられている<sup>23)</sup>。したがって、YidC は膜挿入過程ではなく、膜挿入直後における高次構造形成等に関与する可能性が高い。すなわち、膜内におけるシャペロン様の機能をもつ可能性があると考えられる。

### 3. SRP (シグナル認識粒子) と Sec 因子の関与

シグナル認識粒子 (SRP) は、分泌タンパク質のシグナル配列を認識し、小胞体膜へのターゲティングに関与する因子として真核細胞で同定された。合成途中のシグナルペプチドがリボソーム上に出現すると SRP が結合し、合成が一時停止する。この新生鎖複合体は小胞体膜上の SRP 受容体 (SR) にターゲットされた後、合成が再開され、膜透過が進行する。すなわち、SRP はタンパク質合成に共役した分泌タンパク質の小胞体膜透過に重要な役割を果たす<sup>30)</sup>。SRP は 6 種のタンパク質と 1 種の RNA 分子から構成される<sup>30)</sup>。中でも、54 kDa サブユニットは、シグナル配列に直接結合し、GTPase 活性ももっていて、特に重要な因子である。大腸菌では、RNA と 54 kDa サブユニットに相同的な因子、4.5S RNA と Ffh (fifty four homolog) が存在する<sup>31~33)</sup>。さらに、SR は SR $\alpha$  と SR $\beta$  からなる複合体であるが、大腸菌の FtsY は SR $\alpha$  と相同的な因子である<sup>34)</sup>。また、すべての細菌や古細菌にも Ffh、FtsY と 4.5S RNA のホモログが存在し、SRP の重要性を裏付けている。Ffh 遺伝子は生育に必須であるが、Ffh を枯渇させても分泌タンパク質の膜透過はあまり影響を受けない<sup>35)</sup>ため、大腸菌では Ffh は「SRP」として機能していないと考えられる。大腸菌では、通常、分泌タンパク質の膜透過は

タンパク質合成とは共役しないで進行する。したがって、タンパク質合成に共役した反応に関与する SRP は、合成に共役しない反応には関与しないと考えられる。一方で、膜内在性タンパク質は疎水性が非常に強いいため、その膜挿入は合成に共役する必要があるのではないかと考えられ、まず LacY の膜挿入が Ffh の枯渇や 4.5S RNA の変異により影響を受けることが明らかにされた<sup>36)</sup>。その後、大腸菌の SRP/SR 因子の枯渇や変異により多くの膜タンパク質の膜挿入が影響を受けることが明らかとなった<sup>37~40)</sup>。このことは、MtlA を用いた *in vitro* 実験系の確立により明確に示された。MtlA は膜を 6 回貫通し、N 末端と C 末端領域は細胞質側に露出している<sup>41)</sup> (図1参照)。MtlA は膜挿入すると、その N 末端領域 (膜内在領域) は外部から作用させたプロテイナーゼ K (PK) 消化から保護される<sup>42~45)</sup>。膜小胞およびタンパク質合成反応液から SRP/SR の構成因子を除去すると膜挿入した保護断片はほとんど検出されなくなるが、除去した因子を添加すると膜挿入が回復する<sup>44)</sup>。さらには、MtlA 新生鎖-リボソーム複合体は、Ffh と効率よく化学架橋することができる<sup>27)</sup>。この相互作用は、MtlA の膜貫通領域と Ffh の間で観察される<sup>27)</sup>。すなわち、Ffh は膜タンパク質の膜貫通領域を認識し、膜タンパク質の膜へのターゲティングに関与する。大腸菌 SRP は分泌タンパク質のシグナル配列は認識しない (この意味では SRP の名前は適当ではない) が、膜タンパク質の疎水的な領域を認識し、膜への輸送に関わっている。シグナルペプチドにも疎水的な領域は存在するが、Ffh と相互作用するには疎水性の強さが十分ではない。実際、シグナルペプチドの疎水性を強くすると膜透過も SRP 依存となる。

SRP/SR の作用で膜にターゲットされた後、膜挿入がタンパク質合成に共役して進行する。Sec (secretion) 因子は分泌タンパク質の膜透過に必須な因子であり、中でも膜透過チャンネルを形成する SecYEG と ATPase 活性をもつ SecA が中心的な役割を果たす<sup>46)</sup>。SecA は合成が完了した分泌タンパク質前駆体に結合し、ATP を利用して膜透過反応を駆動する。真核生物の SRP は、分泌タンパク質の膜透過にも膜タンパク質の膜挿入にも関与することが示されていた<sup>30)</sup>ため、大腸菌においても Sec 因子は膜タンパク質の膜挿入に関与する可能性が考えられたが、Sec 因子の関与については不明な点が多かった。たとえば、*secY* 遺伝子の変異により膜タンパク質の膜挿入が影響を受ける<sup>47)</sup>という報告がある一方、膜挿入はほとんど影響を受けない<sup>48)</sup>という報告もあった。また、LacY や MtlA の膜挿入は *secA* 遺伝子の変異株でも効率よく起こる<sup>43)</sup>ことが示される一方、FtsQ や Lep (リーダーペプチダーゼ) の膜挿入は SecA に強く依存する<sup>49,50)</sup>ことも判明した。

これらの Sec 依存性の有無についても、*in vitro* 実験系の進展により明らかになった。*secY* 遺伝子や *secE* 遺伝子

の変異株から反転膜小胞を調製して膜挿入反応を行うと、MtlA や FtsQ の膜挿入は阻害を受け<sup>22,45)</sup>、膜透過チャンネル SecYEG は膜挿入にも重要であることが判明した。変異株の解析で SecY の関与があいまいであった理由のひとつは、*secY* 変異の中には分泌タンパク質の膜透過のみ、あるいは膜挿入のみに欠陥が生じる場合があることである。SecA については、変異株の解析と同様、MtlA の膜挿入には必要なく<sup>45)</sup>、FtsQ には必須であった<sup>22)</sup>。この依存性の相違は膜タンパク質がペリプラズム側に大きな親水的な領域をもつかどうかによると考えられている。膜貫通領域の膜挿入は合成に共役して進行するが、その膜挿入後に親水的な領域が存在すれば、その領域の膜透過は分泌タンパク質同様に SecA に依存する。このとき、SecYEG はリボソームとも SecA とも相互作用する<sup>51)</sup>が、両者が SecYEG 上で共存できるのか、ある程度合成が完了しリボソームが遊離した後に SecA が相互作用するのかが不明である。また、MtlA の膜挿入には SecA は必要ないが、このとき SecG も不要となる<sup>45)</sup>一方、SecA を必要とする FtsQ の膜挿入には SecG が重要となる<sup>22)</sup>。SecG は SecA の構造変化に応じて構造変化し、SecA 機能を促進する<sup>52,53)</sup>ため、SecA 依存性と SecG 依存性には強い相関関係が観察されている。以上のように、Sec 因子依存で膜挿入する膜タンパク質は SecA を必要とするものとしめないものに区別でき、それはペリプラズムに親水的な領域が存在するかどうかによる。SecA 依存的になるのに必要なペリプラズム領域の長さは 30 アミノ酸程度と考えられているが、膜タンパク質によってはもっと短くても SecA 依存的になる<sup>50,54)</sup>。

#### 4. タンパク質膜挿入反応の再構成

膜挿入機構をさらに詳細に調べるためには、反応に関わる因子のみを用いた再構成系が必要になってくる。筆者らの報告を含めて膜挿入反応の再構成系がいくつか報告されている。Driessen らは、FtsQ<sup>22)</sup>や CyoA<sup>24)</sup>の膜挿入が SecYEG に依存することを示したが、FtsQ は YidC の添加により膜挿入活性が低下し、CyoA の場合は促進されている。これらの膜タンパク質は SecYEG だけでなく SecA にも依存するため、膜貫通領域の膜挿入が正しく再構成されていなくても、ペリプラズム領域が SecA 依存的に膜透過すれば膜挿入活性として検出される可能性もある。Sec 非依存的な膜挿入についても、Pf3 コートタンパク質<sup>28)</sup>や Fic サブユニット<sup>29)</sup>を基質とした再構成系が報告されている。これらは、YidC により膜挿入が促進されるものの、YidC が存在しないときにも膜挿入活性が検出されている。それに対して、MtlA や LacY など、SecYEG に依存するが SecA に依存しないタイプの再構成系は報告されていなかった。その大きな理由は、これらの膜タンパク質は SecYEG に依存する反面、リン脂質からなるリボソームにも自発的膜挿入

入するためである<sup>9)</sup>。

#### 4-1. ジアシルグリセロール (DAG) による自発的膜挿入の抑制

上述のように M13 procoat はリボソームに自発的膜挿入する。同様の条件で MtlA を合成すると MtlA の膜挿入断片が検出された (図 2A)。この膜挿入断片は合成に共役してのみ観察され、尿素や高濃度の塩で洗浄しても安定に存在するが、界面活性剤でリボソームを可溶化すると消失する<sup>9)</sup>。さらに、Ffh や FtsY の添加により膜挿入効率が上昇した<sup>9)</sup>。これらの結果は、MtlA はタンパク質性の因子をまったく含まないリボソームに自発的に膜挿入することを示している。しかし、これは MtlA が SecYEG に依存して膜挿入するという知見<sup>45)</sup> (上述) とは矛盾してしまう結果である。SecE を枯渇させた膜小胞を可溶化し、界面活性剤を除去してプロテオリボソームを再構成すると MtlA の膜挿入はまったく観察されないが、SecYEG を大量生産した株から反転膜小胞を可溶化・再構成すると MtlA の膜挿入は著しく促進された<sup>9)</sup>。この結果により、膜小胞には本来自発的膜挿入を抑制する仕組みが存在し、リン脂質のみから形成されたりリボソームではこの仕組みが破壊されている可能性が考えられた。すなわち、膜小胞には自発的膜挿入を抑制する働きがある膜構成成分が存在するが、リボソームにはこの成分が含まれていないという可能性である。膜成分を検索した結果、ジアシルグリセロール (DAG) に自発的膜挿入を抑制する作用があることが明らかとなった<sup>9)</sup> (図 2A)。リン脂質に DAG を混合してリボソームを形成すると、DAG の濃度が上昇するにつれて MtlA の自発的膜挿入は低下し、DAG が 3% 以上存在するときは、SRP/SR を加えても MtlA の膜挿入は全く観察されなくなった。DAG による自発的膜挿入の抑制は、M13 procoat を基質に用いても観察された<sup>9)</sup> (図 2B)。これらの結果は、膜タンパク質の疎水的な領域は、本来、DAG が存在しないリボソームに自発的膜挿入する性質があることを強く示唆している。したがって、これまで報告されている再構成系<sup>22,24,28,29)</sup>では、DAG を含まないリボソームを用いて再構成しているため、膜挿入反応が正しく再構成されていない可能性が高い。大腸菌では DAG は全クロロホルム/メタノール抽出物に対して 1% 前後発現していることが知られている<sup>55)</sup>。したがって、全リン脂質に対しては、DAG は 2% 前後存在することになる。これは、自発的膜挿入の抑制に必要な DAG 量とほぼ同じであるため、大腸菌における DAG の主要な機能は自発的膜挿入の抑制であると考えている。リン脂質のみで形成されたりリボソームでは、リン脂質の親水的な頭部が比較的大きいため、二重層内部の疎水的な領域で空間が生じていてこの空間を疎水的な物質で充填することにより安定な構造を取る可能性があ

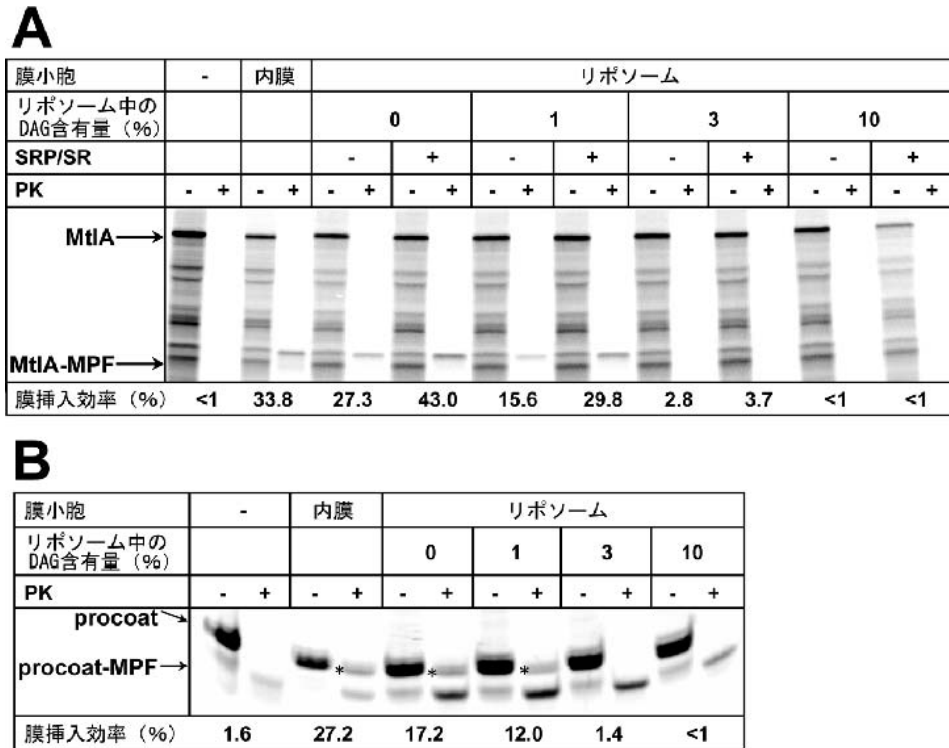


図2 ジアシルグリセロール (DAG) による自発的膜挿入の抑制

図に示す膜小胞存在下で MtlA (A) あるいは M13 procoat の H5 変異体 (B) をラベル・合成した。MtlA の場合は、図に示す通り SRP/SR を加えた。合成終了後、プロテイナーゼ K (PK) 消化を行い、膜挿入断片 (membrane protected fragment; MPF) を解析し、膜挿入効率を求めた。M13 procoat の H5 変異体は、シグナルペプチド切断部位付近に変異が導入されていて、シグナルが切断されなくなっている<sup>3)</sup>。H5 変異体は野生型と同じ効率で膜挿入する<sup>6)</sup>。\* は M13 procoat の膜挿入断片を示す。

り、これが自発的膜挿入の駆動力になっていると考えられる。

#### 4-2. 膜挿入に関与する新因子

DAG を含むリボソームを用いて SecYEG や YidC を再構成したプロテオリボソームを調製し、MtlA が膜挿入するかどうか調べた。しかし、SRP/SR 存在下でも SecYEG/YidC を再構成したプロテオリボソームへの MtlA の膜挿入はまったく検出できなかった<sup>9)</sup>。このことは膜挿入反応に関わる未知の因子が存在することを強く示唆している。そのため、大腸菌内膜を分画し、膜挿入に関わる因子を検索した。尿素洗浄した内膜画分をコール酸で抽出したところ、Sec 因子や YidC を含まない画分を得た。コール酸抽出画分に SecYEG を加えてプロテオリボソームを再構成したところ、MtlA の膜挿入活性が検出された<sup>9)</sup>。YidC をさらに加えて再構成しても MtlA の膜挿入活性には変化はなかった<sup>9)</sup>。さらに、コール酸抽出画分のみを再構成したプロテオリボソームには MtlA は膜挿入しなかったが、M13 procoat の膜挿入が観察された。これらのことから、コール酸抽出画分には膜挿入反応に関与する新因子が存在する

ことが判明した。さらに、YidC は MtlA や M13 procoat の膜挿入には必要ないことも明らかになった。この因子を、膜挿入活性を指標として精製したところ、SDS-PAGE 上で約 8kDa の膜成分が得られた (図5 参照)。DAG により自発的膜挿入を抑制した条件で、この因子のみに依存して M13 procoat の膜挿入が観察された (図5 参照)。MtlA の膜挿入は、この因子と SecYEG が存在するとき観察され、SRP/SR により促進された (図3)。さらに、モデル膜タンパク質 Momp2 (図1 参照) の膜挿入もこの因子に依存して観察された (図4)。Momp2 は MtlA の最初の膜貫通領域に外膜タンパク質 (分泌タンパク質) OmpA の成熟体領域を融合したタンパク質であり、膜挿入には SRP/SR と SecYEG, SecA が必要である<sup>56)</sup>。再構成に DAG を含まないリボソームを用いたとき、Momp2 の膜挿入は SecYEG, SecA, 新因子に依存したが、SRP/SR には依存しなかった<sup>9)</sup> (図4)。これは、Momp2 の膜貫通領域が自発的膜挿入したことを示している。一方、DAG を含むプロテオリボソームでは、Momp2 は SecYEG, SecA, 新因子, SRP/SR のすべてに依存して膜挿入した<sup>9)</sup> (図4)。これらの結果は、プロテオリボソームに DAG と膜挿入に関与する新

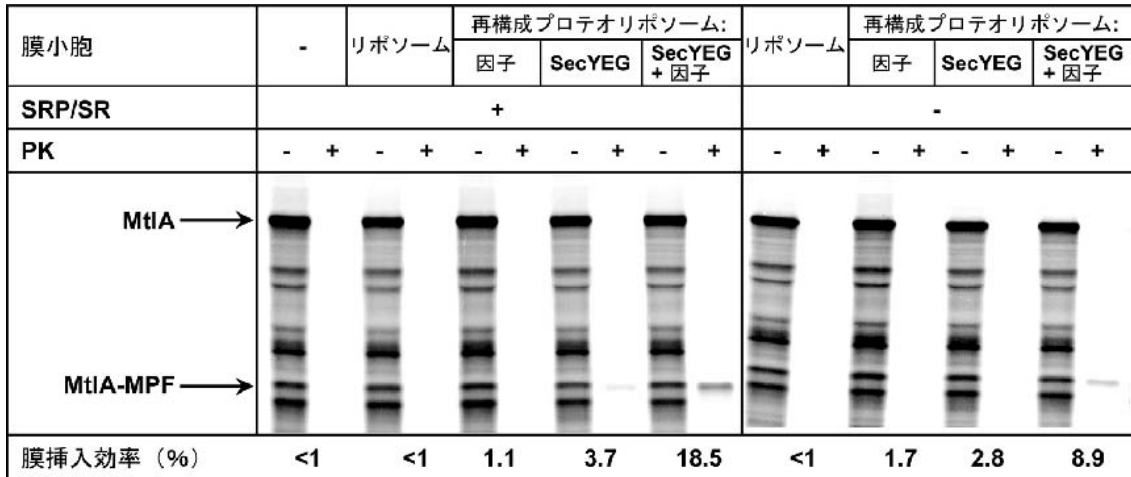


図3 MtlA 膜挿入の再構成

図に示すように因子や SecYEG を含むプロテオリポソームを再構成し、図に示す膜小胞存在下で MtlA をラベル・合成した。また、図に示すように SRP/SR を MtlA 合成時に加えた。図2 同様に膜挿入活性を解析した。

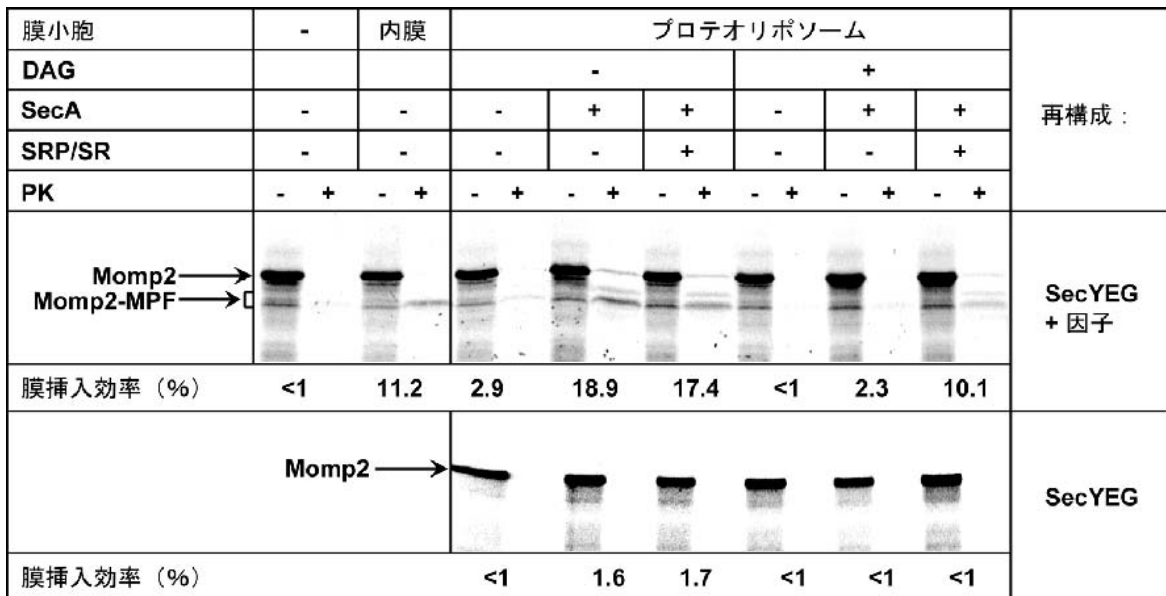


図4 Momp2 の膜挿入の再構成

図に示すように因子や SecYEG を含むプロテオリポソームを再構成し、図に示す膜小胞存在下で Momp2 をラベル・合成した。また、図に示すように SRP/SR や SecA を Momp2 合成時に加えた。図2 同様に膜挿入活性を解析した。

因子が存在すると、MtlA や Momp2 の膜挿入について、これまで明らかになっているすべての因子依存性が正しく再構成されたことを示している。また、新因子が存在すれば M13 procoat の膜挿入も観察されることから、新因子は膜タンパク質の「integrase 活性」をもっていると考えられる。OmpA などの分泌タンパク質は SecA と SecYEG により膜透過する<sup>46)</sup>が、SecYEG にこの新因子を加えて再構成すると膜透過活性は著しく促進されることも判明した<sup>9)</sup>。新因子が「integrase」であるとする、シグナルペプチドの膜挿入過程に新因子が作用して膜透過活性を促進していると考えられる。さらに、新因子が SecYEG と直接相互作用

用する可能性も強く示唆される。

新因子をプロテイナーゼ K 消化すると、SDS-PAGE 上で約 8kDa から約 7kDa に変化し、膜挿入活性も消失した<sup>9)</sup>。このことから、新因子はタンパク質性の因子であると考えられるが、分子の大部分が糖質・脂質であることも明らかとなった。新因子を酸処理やアルカリ処理すると、それぞれ糖質部分や脂質部分が分解され、それと同時に膜挿入活性も消失した<sup>9)</sup>。これらのことから、新因子を構成するペプチド、糖質、脂質部分はすべてタンパク質膜挿入活性に必須であることが明らかになった。大腸菌外膜主要成分であるリポ多糖 (LPS) にはペプチド部分は存在しな

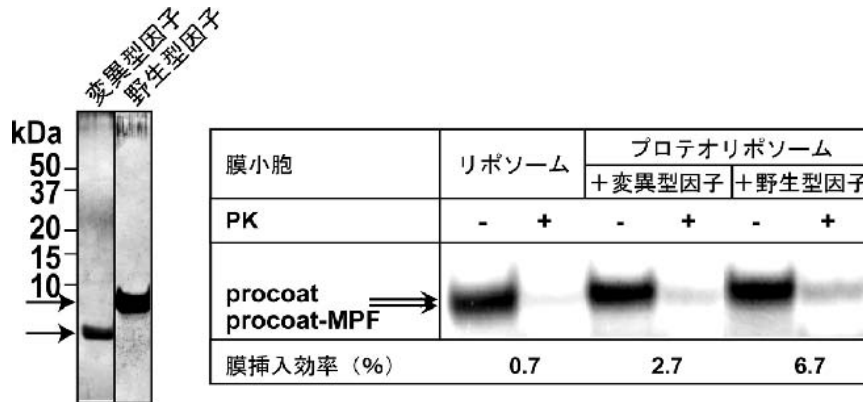


図5 変異型因子の活性と M13 procoat の膜挿入の再構成

野生株 (MC4100) あるいは LPS の変異株 (D31m4) から因子を精製し、SDS-PAGE で解析した (左)。これらの因子をプロテオリボソームに再構成し、M13 procoat の膜挿入活性を図2と同様に解析した。

いが、新因子との構造的な類似点がいくつか挙げられる。そのため、LPS 変異体である deep rough 変異体から新因子を精製した。deep rough 変異体では糖鎖部分が短くなった LPS を発現している<sup>57)</sup>。この変異株から精製した因子は SDS-PAGE 上で約 4kDa であり、野生株由来の因子 (約 8 kDa) より大幅に小さくなっていて<sup>9)</sup> (図5)。この変異型因子は、野生株由来の因子に比べて半分以下の活性しかもっていなかった<sup>9)</sup> (図5)。さらに、この変異株では、外膜主要リポタンパク質 Lpp の前駆体が蓄積していることが明らかになった<sup>9)</sup>。すなわち、この変異株では新因子の生合成が影響を受け、その結果、分泌・膜挿入阻害が引き起こされたと考えられる。これらのことから、新因子は LPS の脂質部分である Lipid A の誘導体であることが明らかとなった。LPS 生合成と新因子の生合成は一部重複していることが考えられる。

##### 5. タンパク質膜挿入機構と今後の展望

大腸菌における膜タンパク質の膜挿入機構についてはいくつかの異なる経路が考えられるが、以上のことをまとめると、図6に示すような3種の機構が考えられる。1番目の経路では、膜タンパク質の合成が進行し、膜貫通領域がリボソームから露出してくると SRP により認識され、SR を介して膜にターゲットされる。その後、SecYEG と新因子の作用で膜挿入する。このとき、新因子は膜挿入に直接関与するのか、膜貫通領域が SecYEG の膜透過チャネルを経て脂質二重層に放出する過程に関与するのかは不明であるが、SecYEG のみでは膜挿入活性が検出されなかったことや新因子が「integrase」活性をもつ可能性を考えると、前者の可能性が高いと考えている。膜挿入途中の膜タンパク質は YidC と相互作用し、最終的な高次構造を形成すると考えられる。2番目の経路は、膜タンパク質が

親水的なペリプラズム領域をもつ場合である。1番目と同様に SRP/SR により膜にターゲットされ、SecYEG と新因子の作用で膜挿入した後は、SecA の作用でペリプラズム領域が膜透過する。この場合も膜挿入中に YidC と相互作用する。SecYEG 上でリボソームと SecA が同時に機能しうるのか、リボソームが遊離した後 SecA が機能するのかが不明である。3番目の経路は SR/SR や Sec 因子に依存しない経路である。この経路で膜挿入するタンパク質は、従来、自発的に膜挿入すると考えられてきたが、DAG により自発的膜挿入が抑制された条件 (すなわち、*in vivo* により近い条件) では、これらの膜タンパク質も新因子に依存して膜挿入することが明らかとなった。この場合も YidC は膜タンパク質と相互作用するが、膜挿入には必須ではなく、膜挿入の完了や膜挿入後の高次構造形成に関与すると考えられる。いずれの膜挿入機構においても分泌タンパク質のシグナルペプチドの膜挿入においても新因子の機能が非常に重要であった。この因子は単なるタンパク質ではなく、ペプチド、糖質、脂質からなる物質であり、脂質二重層内部への入り口として機能していると考えられる。今後はこの因子の構造を決定して、構造と機能との相関関係をより詳細に調べていく必要があると考えている。

リボソームをはじめとしてタンパク質合成に関わる因子は細胞質に局在する。タンパク質合成に必要な因子は PURE System<sup>58)</sup>として精製・再構成できるが、SRP や SR、SecA を必要に応じて添加すれば尿素洗浄した膜小胞へのタンパク質膜挿入反応が再現できることが明らかになっている<sup>59)</sup>。このことは、細胞質画分中でこれらの因子以外膜挿入反応には必要がないことを示している。したがって、膜挿入に関わる因子を再構成したプロテオリボソームに PURE System を組み合わせることにより、大腸菌の抽出物を全く含まない、精製因子のみを用いた、膜挿入反応の

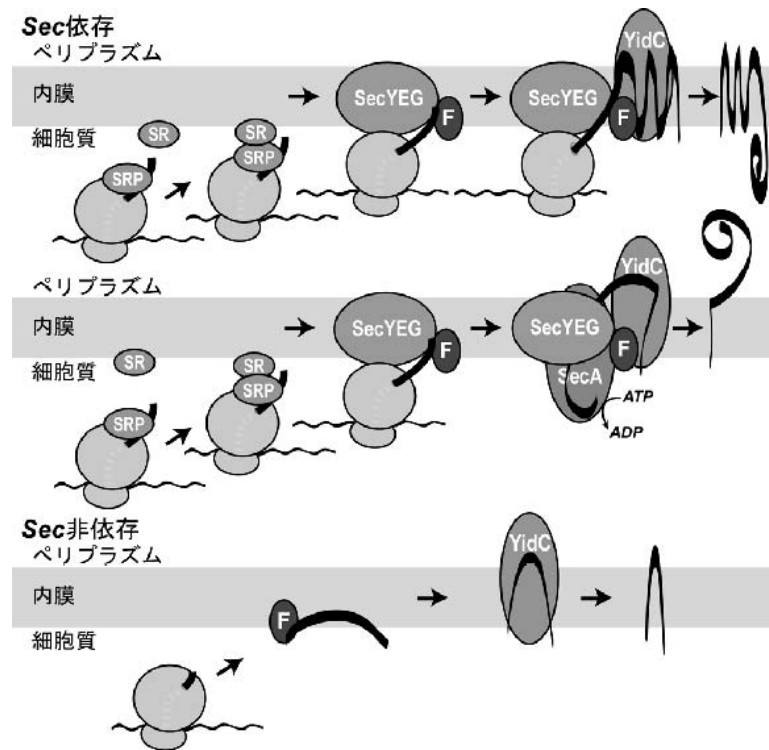


図6 大腸菌における膜タンパク質の膜挿入の分子機構

現在筆者らが考えている、3種の膜タンパク質の膜挿入機構を示す。Sec依存の膜挿入経路(上, 中)では, SRP/SRの働きで膜にターゲットされた後はSecYEG/因子(F)上で膜挿入が進行する。膜挿入後はYidC上で高次構造を形成すると考えている。膜タンパク質がペリプラズム側に親水的な領域をもつ場合, 膜透過反応に必須のATPaseであるSecAが必要となる(中)。Sec非依存の膜挿入経路(下)では, SRP/SR, SecYEG, SecAは必要ないが, 因子(F)は必須である。この場合も膜挿入後期段階でYidCが関与する可能性がある。

完全再構成系が構築できると考えている。

界面活性剤存在下で膜タンパク質を *in vitro* 合成することも可能であり, その成功例も報告されている<sup>60)</sup>。しかし, 界面活性剤によりタンパク質合成が阻害されたり, それぞれの膜タンパク質に応じて界面活性剤の種類や濃度を検討する必要もある。さらには, 機能解析のためには合成した膜タンパク質をプロテオリポソームに再構成する必要がある。そのため, 膜挿入機構が完全に明らかとなれば, SecYEG, YidCや新因子等, 膜タンパク質が膜挿入し機能発現するのに必要な因子をあらかじめ再構成したプロテオリポソームを用いることで, 膜タンパク質の発現と同時に膜挿入・高次構造の形成までも可能になる。近い将来, こうした手法が機能未知の膜タンパク質の解析法として一般的な手法となることを期待している。

## 文 献

- 1) Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E.L. (2001) *J. Mol. Biol.*, 305, 567–580.
- 2) Wickner, W. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 1159–1163.
- 3) Kuhn, A. & Wickner, W. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 15914–15918.
- 4) Kuhn, A. (1995) *FEMS Microbiol. Rev.*, 17, 185–190.
- 5) Watts, C., Silver, P., & Wickner, W. (1981) *Cell*, 25, 347–353.
- 6) Ohno-Iwashita, Y. & Wickner, W. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 1895–1900.
- 7) Geller, B. & Wickner, W. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 13281–13285.
- 8) Date, T., Zwizinski, C., Ludmerer, S., & Wickner, W. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 827–831.
- 9) Nishiyama, K., Ikegami, A., Moser, M., Schiltz, E., Tokuda, H., & Muller, M. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 35667–35676.
- 10) Zimmermann, R., Watts, C., & Wickner, W. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 6529–6536.
- 11) Cao, G., Kuhn, A., & Dalbey, R.E. (1995) *EMBO J.*, 14, 866–875.
- 12) Kiefer, D. & Kuhn, A. (1999) *EMBO J.*, 18, 6299–6306.
- 13) Kiefer, D., Hu, X., Dalbey, R., & Kuhn, A. (1997) *EMBO J.*, 16, 2197–2204.
- 14) Yi, L., Celebi, N., Chen, M., & Dalbey, R.E. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 39260–39267.
- 15) Sanders, C.R. II, Czerski, L., Vinogradova, O., Badola, P.,



- Song, D., & Smith, S.O. (1996) *Biochemistry*, **35**, 8610–8618.
- 16) Facey, S.J. & Kuhn, A. (2003) *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1724–1734.
- 17) Kuhn, A., Stuart, R., Henry, R., & Dalbey, R.E. (2003) *Trends Cell Biol.*, **13**, 510–516.
- 18) Scotti, P.A., Urbanus, M.L., Brunner, J., de Gier, J.W., von Heijne, G., van der Does, C., Driessen, A.J., Oudega, B., & Luirink, J. (2000) *EMBO J.*, **19**, 542–549.
- 19) Samuelson, J.C., Chen, M., Jiang, F., Moller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G.J., & Dalbey, R.E. (2000) *Nature*, **406**, 637–641.
- 20) van der Laan, M., Urbanus, M.L., Ten Hagen-Jongman, C.M., Nouwen, N., Oudega, B., Harms, N., Driessen, A.J., & Luirink, J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5801–5806.
- 21) Samuelson, J.C., Jiang, F., Yi, L., Chen, M., de Gier, J.W., Kuhn, A., & Dalbey, R.E. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 34847–34852.
- 22) van der Laan, M., Nouwen, N., & Driessen, A.J. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 1659–1664.
- 23) Nagamori, S., Smirnova, I.N., & Kaback, H.R. (2004) *J. Cell Biol.*, **165**, 53–62.
- 24) du Plessis, D.J., Nouwen, N., & Driessen, A.J. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 12248–12252.
- 25) Urbanus, M.L., Scotti, P.A., Froderberg, L., Saaf, A., de Gier, J.W., Brunner, J., Samuelson, J.C., Dalbey, R.E., Oudega, B., & Luirink, J. (2001) *EMBO Rep.*, **2**, 524–529.
- 26) van der Laan, M., Houben, E.N., Nouwen, N., Luirink, J., & Driessen, A.J. (2001) *EMBO Rep.*, **2**, 519–523.
- 27) Beck, K., Eisner, G., Trescher, D., Dalbey, R.E., Brunner, J., & Muller, M. (2001) *EMBO Rep.*, **2**, 709–714.
- 28) Serek, J., Bauer-Manz, G., Struhalla, G., van den Berg, L., Kiefer, D., Dalbey, R., & Kuhn, A. (2004) *EMBO J.*, **23**, 294–301.
- 29) van der Laan, M., Bechtluft, P., Kol, S., Nouwen, N., & Driessen, A.J. (2004) *J. Cell Biol.*, **165**, 213–222.
- 30) Keenan, R.J., Freymann, D.M., Stroud, R.M., & Walter, P. (2001) *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 755–775.
- 31) Ribes, V., Romisch, K., Giner, A., Dobberstein, B., & Tollervy, D. (1990) *Cell*, **63**, 591–600.
- 32) Bernstein, H.D., Poritz, M.A., Strub, K., Hoben, P.J., Brenner, S., & Walter, P. (1989) *Nature*, **340**, 482–486.
- 33) Romisch, K., Webb, J., Herz, J., Prehn, S., Frank, R., Vingron, M., & Dobberstein, B. (1989) *Nature*, **340**, 478–482.
- 34) Luirink, J., ten Hagen-Jongman, C.M., van der Weijden, C.C., Oudega, B., High, S., Dobberstein, B., & Kusters, R. (1994) *EMBO J.*, **13**, 2289–2296.
- 35) Phillips, G.J. & Silhavy, T.J. (1992) *Nature*, **359**, 744–746.
- 36) Macfarlane, J. & Muller, M. (1995) *Eur. J. Biochem.*, **233**, 766–771.
- 37) de Gier, J.W., Mansournia, P., Valent, Q.A., Phillips, G.J., Luirink, J., & von Heijne, G. (1996) *FEBS Lett.*, **399**, 307–309.
- 38) Ulbrandt, N.D., Newitt, J.A., & Bernstein, H.D. (1997) *Cell*, **88**, 187–196.
- 39) Seluanov, A. & Bibi, E. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 2053–2055.
- 40) Valent, Q.A., Scotti, P.A., High, S., de Gier, J.W. L., von Heijne, G., Lentzen, G., Wintermeyer, G., Oudega, B., & Luirink, J. (1998) *EMBO J.*, **17**, 2504–2512.
- 41) Sugiyama, J.E., Mahmoodian, S., & Jacobson, G.R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9603–9607.
- 42) Stephan, M.M. & Jacobson, G.R. (1986) *Biochemistry*, **25**, 8230–8234.
- 43) Werner, P.K., Saier, M.H., Jr., & Muller, M. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 24523–24532.
- 44) Koch, H.G., Hengelage, T., Neumann-Haefelin, C., MacFarlane, J., Hoffschulte, H.K., Schimz, K.L., Mechler, B., & Muller, M. (1999) *Mol. Biol. Cell*, **10**, 2163–2173.
- 45) Koch, H.G. & Muller, M. (2000) *J. Cell Biol.*, **150**, 689–694.
- 46) Duong, F., Eichler, J., Price, A., Leonard, M.R., & Wickner, W. (1997) *Cell*, **91**, 567–573.
- 47) Ito, K. & Akiyama, Y. (1991) *Mol. Microbiol.*, **6**, 2243–2253.
- 48) Yamato, I. (1992) *J. Biochem.*, **111**, 444–450.
- 49) Scotti, P.A., Valent, Q.A., Manting, E.H., Urbanus, M.L., Driessen, A.J., Oudega, B., & Luirink, J.F. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 29883–29888.
- 50) Andersson, H. & von Heijne, G. (1993) *EMBO J.*, **12**, 683–691.
- 51) Prinz, A., Behrens, C., Rapoport, T.A., Hartmann, E., & Kalies, K.U. (2000) *EMBO J.*, **19**, 1900–1906.
- 52) Nishiyama, K., Suzuki, T., & Tokuda, H. (1996) *Cell*, **85**, 71–81.
- 53) Suzuki, H., Nishiyama, K., & Tokuda, H. (1998) *Mol. Microbiol.*, **29**, 331–341.
- 54) Deitermann, S., Sprie, G.S., & Koch, H.G. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 39077–39085.
- 55) Rotering, H. & Raetz, C.R. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 8068–8073.
- 56) Neumann-Haefelin, C., Schafer, U., Muller, M., & Koch, H.G. (2000) *EMBO J.*, **19**, 6419–6426.
- 57) Monner, D.A., Jonsson, S., & Boman, H.G. (1971) *J. Bacteriol.*, **107**, 420–432.
- 58) Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., & Ueda, T. (2001) *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751–755.
- 59) Kuruma, Y., Nishiyama, K., Shimizu, Y., Muller, M., & Ueda, T. (2005) *Biotechnol. Prog.*, **21**, 1243–1251.
- 60) Schwarz, D., Klammt, C., Koglin, A., Lohr, F., Schneider, B., Dotsch, V., & Bernhard, F. (2006) *Methods*, in press.
- 61) Soekarjo, M., Eisenhawer, M., Kuhn, A., & Vogel, H. (1996) *Biochemistry*, **35**, 1232–1241.