

特集：膜輸送ナノマシンの構造・作動機構と制御

序論：膜輸送ナノマシンの構造・作動機構と制御

金 澤 浩, 山 口 明 人

細胞内の物質環境は閉じたものではない。常に外界から必要なものを取り入れており、不要なものを排出し、内部環境は恒常的に保たれていることは良く知られている。この際、外部からの物質の細胞内への流入に特別なタンパク質が存在し、それが細胞膜へ組み込まれたタンパク質であることが初めて認識されたのは、1940年代の大腸菌のラクトース利用の研究に遡る¹⁾。現在ラクトース輸送担体タンパク質とよばれるものがそれであり、以来50年以上に亘りこのタンパク質の実態が追求され、生化学の大きな課題の一つでありつづけている。生体膜輸送の仕組みは、古くから新しい課題である。

当初ラクトース輸送担体は遺伝子が突き止められ、引き続き大腸菌細胞全体を用いた細胞内への物質取り込みに関する酵素学的解析から遺伝子産物のタンパク質の性質が詳細に記載された。しかし、タンパク質の単離と性質解明という生化学の王道には永らく近づけなかった。それは、大半の酵素のもつ可溶性という性質が輸送担体にならなからであり、他の酵素のように性質が解析できない時代が永く続いた。細胞膜から界面活性剤でラクトース輸送タンパク質を可溶化し単品にできたのは、タンパク質としてラクトース輸送タンパク質が予見されてから30年以上たった1983年であった²⁾。

細胞内の物質濃度は高く、濃度の低い外界からさらに輸送されることは、明らかにエネルギー論的に矛盾している。ラクトース輸送もその例外ではない。この矛盾を解決したのが、1960年に提出されたP. Mitchellの化学浸透圧説である³⁾。ATPや酸化還元力を使って、細胞膜の外へ H^+ が排出され結果として細胞外に高く内部に低い H^+ の勾配が形成され、この勾配がエネルギー源となって他の輸送基質が低濃度から高濃度環境へ輸送されることが可能となる。こうした背景のもとに、生体膜輸送の研究課題は、膜の輸送タンパク質の中をどのように物質やイオンが一方方向的に移動するのか、またその際にATPや H^+ 勾配などのエネルギー源と基質の輸送の関係がどのように成り立ってい

るかという点となった。ここで、歴史的にATPや酸化還元力を直接利用する輸送系はポンプと呼ばれ、ポンプが形成する膜内外の H^+ 勾配もしくは Na^+ 勾配を利用する輸送系をトランスポーターと呼び区別してきている。生体膜内の輸送系は、ポンプとトランスポーター以外にチャンネルが知られている。チャンネルはエネルギーを利用しない受動輸送を担うことから、ポンプとトランスポーターとは離れて、独自の研究課題を形成してきた。

ポンプとトランスポーターの作動機構は、1970年代後半には、P. Mitchell自身により分子内部に及んで予見された。しかし、基質やイオンの結合部位やエネルギー供与による輸送タンパク質の構造変化が語られても、当の輸送タンパク質の内部構造が分からなければ、絵に描いた餅の状態といわざるを得なかった。1970年後半にP. Mitchellの作動仮説提出と時を同じくして、遺伝子工学が普及し始めると、ポンプやトランスポーターの遺伝子のクローン化が始まり⁴⁾、一次構造は急速に解明されていった。遺伝子工学の導入の恩恵は、生化学や分子生物学の中で生体膜輸送タンパク質の作動機構研究が、もっとも顕著に恩恵を受けた分野の一つであった。この理由は、大部分が膜貫通部にある膜輸送タンパク質では、遺伝子工学的にいわゆる膜貫通トポロジーという形での構造推定が可能なためである。膜輸送機能は、生体膜を介する物質やイオンの一定方向への移動であり、可溶性酵素ではそれほど問題とされない基質の分子内でのベクトリアルな移動が問題となる。すなわち、精製した輸送タンパク質の機能解析には、それらをまず脂質膜に再構成し、膜を介して二つの異なる空間の間を物質が移動する速度を解析することが必要である。酵素活性を溶液中で測定する多くの酵素群とは、この点で大きく異なり研究上の難しさを抱えている。遺伝子工学的手法を用いると、人為的にアミノ酸残基を改変した輸送タンパク質を細胞内に発現させることで、改変しないタンパク質を発現した場合との比較という形で、タンパク質を精製せずとも、細胞膜に存在する状態で当該膜輸送体の機能を調べ

ることができる。これにより、機能と構造の相関は生化学的解析の難しさを超えて、1980年代から現在に至る世界的な研究の進捗により飛躍的に解明された。本特集では、この手法を用いた輸送タンパク質の構造と機能相関について最新の成果が述べられている。笠原らは、この方法でガラクトースとグルコースの識別がたった一つのアミノ酸残基に帰着できることを酵母のグルコース輸送担体において示している。また、金澤らは、 Na^+/H^+ 交換輸送体において基質イオンの結合部位についての正確な情報が遺伝子工学的手法で得られることを述べている。結晶構造データが得られるようになった今日でも、こうした遺伝子工学的手法による知見は、機能の理解には不可欠な情報である。

膜輸送の分子機構についての理解を大きく飛躍させたのは、結晶構造解析が可能になったことによる。まず、ポンプの結晶構造に関しては、1994年にJ. Walkerらにより、 H^+ ポンプであるF型ATPaseの膜表面部分の結晶構造が示され、その後膜内在性部分の一部の結晶構造も明らかにされた⁵⁾。この構造の特徴は、このポンプに内在する回転機構を予想させるに十分なものであり、1997年に野地、安田らによって回転は実証された⁶⁾。膜輸送機構に輸送体内部における回転という大きな構造変化を伴うことが示されたことは、この分野の活性化に大きく寄与した。さらに、2000年には、豊島らによって Ca^{2+} 輸送性ATPaseの分子構造が決定され⁷⁾、次々と反応中間体の構造決定も行われて、詳細な作動機構が明らかになりつつある。トランスポーターの構造決定はポンプよりも遅れたが、2002年に、村上・山口らによって、異物排出トランスポーターAcrBの結晶構造が解かれたことによって口火が切れ⁸⁾、翌年にはラクトーストランスポーターの構造が決定され⁹⁾、さらに続々とトランスポーターの構造決定が続いている。

生体膜輸送は、細胞の外界との接点であることを考えれば、その多様性は自ずと理解できる。2001年のヒトゲノム構造解明は、トランスポーターやポンプにも多くの類似体があることを示した。とりわけ、トランスポーターの多様性は目を見張るものがある。しかし多様な類似体がいかなる作動機構にもとづき、どのような生理的意味をもつものか、研究は緒に就いたばかりである。一群の薬剤排出タンパク質について作動機構を中心に研究が進んでいることが、本特集で中江、山口、和田らにより述べられている。しかし、これらの生理的役割が本来どのようなものであったか謎は多く残されている。中西、二井らは H^+ ポンプであるV型ATPaseの構成サブユニットの多様性と生理的役割の多様性について多くの知見を紹介している。大橋、前田らは、免疫系に関わるペプチド輸送体の多様な生理的役割を論じている。また、前島は従来知られているイオン輸送性のポンプのいずれとも構造の類似性のない無機ピロリン酸を基質とし H^+ を輸送するポンプを植物液胞に見いだ

し、詳細を解析した結果を論じている。多様性は、輸送の作動機構にも存在する。嘉屋らは、 Ca^{2+} ポンプの仲間である H^+ 、 K^+ ポンプは細胞膜内では二量体や四量体として機能していることを明らかにしている。二量体が作動機構の実態であることは、 Na^+/H^+ 交換輸送体でも重要な意味をもつことが、若林、金澤らにより述べられている。2006年にAcrBの三量体構造の非対称性が明らかにされ、三量体が交互に輸送に関わっていくという、画期的なモデルが示された¹⁰⁾。トランスポーターの輸送作動機構にも H^+ ポンプを想起させる動的機構が組み込まれていると考えられるようになったことは注目すべき点である。

急展開する膜輸送タンパク質の作動機構の解明に伴い、その制御機構についても目が向けられている。また、それぞれの輸送体の解明が深まる中で疾病との関係についても研究は大きな進歩を遂げており、和田らは、薬剤輸送タンパク質と発がんについて、また若林も Na^+/H^+ 交換輸送体と疾病との相関について述べている。浅野らは胃酸分泌に関わる H^+ 、 K^+ ポンプ抑制剤の作用部位について詳細を論じている。作動機構の多様性を論ずる場合、ポンプやトランスポーターのみの分子機構を解明すれば良いわけではない。輸送体の研究は、ゲノム情報に基づき、構造類似体の機能解明が先行しているが、生化学的解析は残されている。膜内での作動機構には、機能発現に必至な輸送本体以外の因子が必要であることが見逃されている傾向にある。 Na^+/H^+ 交換輸送体では、輸送本体とは異なる機能発現の必須因子が存在することが、金澤、若林により報告されている。多くの輸送体の解析の中で今後進むべき方向を示唆している。

世紀の変わり目に当たって相次いで成されたポンプとトランスポーターの構造決定は、この分野の研究に革命的な展開をもたらした。もはや、ポンプ、トランスポーターの作動機構はブラックボックスではなく、確かな分子構造の基礎の上に議論できる謂わばナノマシンとも呼ばれる理解の段階に入った。次に問題になるのは、これらの膜輸送体が、細胞膜という場の中でどのように相互に、また他のタンパク質と連携しつつ機能を発現しているのかを解明することである。その中には発現制御のメカニズムも当然含まれる。それが、究極的には、細胞生理における膜輸送体の役割を包括的に理解することにつながる。膜輸送研究はまさに、最もエキサイティングな急展開の時代を迎えていると言える。

本特集は、2000年前後を境として急展開するポンプとトランスポーター研究の現状と未来へ向けた問題の所在を明らかにすることを目的とした。2001年から5年間文部科学省特定領域“膜輸送ナノマシンの構造・作動機構とその制御”に参画された方々を中心に執筆をお願いした。

文 献

- 1) Fox, C.F. & Kennedy, E.P. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **54**, 891-899.
 - 2) Foster, D.L., Boublik, M., & Kaback, H.R. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 31-34.
 - 3) Mitchell, P. (1963) *Biochem. Soc. Symp.*, **22**, 141.
 - 4) Kanazawa, H., Miki, T., Tamura, F., Yura, T., & Futai, M. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **76**, 1126.
 - 5) Abrams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., & Walker, J. (1994) *Nature*, **370**, 621-628.
 - 6) Noji, H., Yasuda, R., Kinoshita, M., & Yoshida, M. (1997) *Nature*, **386**, 299-302.
 - 7) Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., & Ogawa, H. (2000) *Nature*, **405**, 647-655.
 - 8) Murakami, S., Nakashima, E., Yamashita, A., & Yamaguchi, A. (2002) *Nature*, **419**, 587-593.
 - 9) Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., & Iwata, S. (2003) *Science*, 610-615.
 - 10) Murakami, S., Nakanishi, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., & Yamaguchi, A. (2006) *Nature*, **443**, 173-179.
-