タンパク質膜輸送の鍵を握る糖脂質

有機化学からのアプローチ

公益財団法人 サントリー生命科学財団

島本 啓子

1. はじめに

すべての生命は生体膜により「内」と「外」が隔てられている。膜上には多くの 膜タンパク質が存在し、細胞内外の物質や情報のやりとりを担っている。膜タンパ ク質が正常な機能を発揮するためには、細胞内のリボソームにおいて生合成された タンパク質が、正しい三次元構造と配向性をもって細胞膜へ挿入されることが必須 であり、その分子機構解明は生命科学における重要な課題の一つである。最近、我々 は大腸菌内膜における膜タンパク質挿入に必須の新たな因子として、MPIase (Membrane Protein Integrase)を発見した¹⁾。このMPIaseについて構造解析を試み たところ、驚くべきことにMPIaseはタンパク質性の酵素ではなく、糖脂質であると いう結論に至った。MPIaseは膜挿入だけでなく、分泌タンパク質の膜透過も促進し ていることが明らかになってきた。本講演では、糖脂質が関与する膜輸送機構の解

2. 新たな膜タンパク質膜挿入因子の発見

明に向けた我々の取り組みについて紹介する。

膜タンパク質を膜に挿入したり、分泌タンパク質を膜透過させたりするための分 子装置として、トランスロコンと呼ばれる複合体チャネルが知られている。トラン スロコン依存性の膜タンパク質は、生合成が始まりリボソームから出てきたところ で、疎水性の膜貫通部分がシグナル認識粒子(SRP)に認識されて膜上に輸送され、ト ランスロコンに受け渡された後、生合成が進行するのに合わせて膜挿入する(図1)。





トランスロコンを構成するSec因子の一部やSRPとその受容体は全ての生物で保存さ れており、大腸菌SecYEGは、哺乳類小胞体Sec61αβγと相同体である。トランスロコ ン依存性挿入の基本的な機構は進化を通じて維持されていると考えられている。

分泌タンパク質の膜透過の場合にも同様にトランスロコンが活躍する。すなわち、 シグナルペプチド部分が膜に挿入された1回膜貫通型構造をいったん形成し、膜外 の親水性部分がペプチダーゼで切り出されて分泌されるのである。大腸菌の場合に は親水性部分を押し込むための別のタンパク質(SecA)が必要となるが、トランス ロコン(SecYEG)が使われるところは同じである。

一方、大腸菌にはトランスロコン(SecYEG)が無くても内膜に挿入されるタンパク 質もあり、このようなトランスロコン非依存性のタンパク質は、膜の疎水性による 「自発的挿入」を起こしていると考えられていた。しかし、共同研究者の岩手大学 西 山賢一教授は先行研究で、膜中の微量成分であるジアシルグリセロール (DAG) が存 在すると、「自発的挿入」が起こらないことを明らかにしていた²⁾。生理的濃度のDAG が「自発的挿入」も「トランスロコン依存的挿入」も抑えるが、それでは実際の大 腸菌の膜で膜挿入を引き起こしている要因は何なのだろうか? 彼らはDAGで自発 的挿入を抑制したリポソームに、大腸菌内膜の抽出物を加えると、膜挿入が復活す ることを見出した³⁾。これは、大腸菌の内膜には、タンパク質膜挿入に関わる未知の 因子が存在するという可能性を示している。そこで、我々は西山らとの共同研究で、 膜成分からこの因子の精製を行った¹⁾。

3. 膜タンパク質膜挿入因子 MPIaseの同定

大腸菌内膜抽出物を分画したものをリポソームに組み込み、放射性標識したタンパク質(アッセイにはトランスロコン非依存性の Pf3 ファージコートタンパク質の変異体 3L-Pf3 を用いた)の膜挿入能を指標に精製を進めた。因子は疎水性と親水性の両方を併せ持つ複雑な物性を示すため、精製にはかなり苦労したが、HPLC や液-液分配等の各種クロマトグラフィーを駆使して、ようやく純粋な因子を単離することに成功した。単離した因子を用いて膜タンパク質挿入試験を行ったところ、DAGで抑制された膜挿入が、因子の濃度依存的に回復する現象が見られた⁴⁾。SDS-PAGEから因子の分子量を約7kDaと推定して化学量論的な解析をすると、膜中の因子の分子数よりも挿入されたタンパク質分子数が多く、触媒様の活性をもつことがわかった。

大腸菌の膜挿入については、トランスロコン以外にも YidC というタンパク質が Membrane Protein Insertase (膜タンパク質膜挿入酵素)として働き、トランスロコ ン非依存的挿入を手助けするという報告がある (図1)⁵⁾。しかし、これまでの報告 ではリポソームに DAG が添加されておらず (あるいは添加法に問題があり) 自発的 挿入を排除しきれていない恐れが強い。西山らは DAG により完全に自発的挿入を排 除した実験系を組んでおり、この系では YidC をリポソームに組み込んでも全く膜挿 入活性は検出されない事から、我々の発見した因子こそ" Membrane Protein Integrase"と呼ぶにふさわしいと考え、MPIaseと命名することにした^{1,4)}。我々は、 YidC は MPIase と協働して膜タンパク質の膜挿入を仕上げる膜シャペロンではない かと考えている。MPIase は、トランスロコン依存的・非依存的の両方の経路の膜挿 入に必須であるだけでなく、分泌タンパク質の膜透過も著しく促進する³⁾。

4. MPIase の構造解析

当初、MPIaseはその機能からタンパク質性の因子であると考えられた。ところが、 MPIaseを加水分解しても、グルコサミンと大量のアンモニアが検出されるのみで、 通常のアミノ酸は全く検出されなかった。¹H-NMRや¹³C-NMRからは*N*-アセチル基や脂 質のピークが検出され、アミノ糖を含む糖脂質であることが予測された。ここで「非 タンパク質性の糖脂質にMPIaseという名前を付けてもよいのか?」という問題に突 き当たった。因子の発見者である西山教授と議論の末、"Membrane Protein Integrase"の活性本体を追い求めて得られたものなのだから、このままの名前で行 こう!ということになった。

構造決定は MS と NMR 等の機器分析と推定部分構造の合成を組み合わせて行った (図2)¹⁾。糖鎖部は、3種の N-アセチルアミノ糖からなる3糖ユニットが10回程 度繰り返すもので、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)の6位ヒドロキシ基は1/3程 度が O-アセチル化されていた。脂質部はジアシルグリセロール構造で、大腸菌膜に よく見られる脂肪酸で構成されていた。糖鎖部と脂質部の間はピロリン酸リンカー で繋がっていた。



5. mini-MPIase の合成

続いて、MPIaseの分子・官能基レベルでの膜挿入機構や最小活性構造を明らかに するため、MPIase類縁体の合成を行った⁶⁾。まず MPIaseの最小単位である3糖ピロ リン脂質(3糖の小さな MPIase という事で mini-MPIase-3と命名した)の合成から 着手した。逆合成経路を Scheme 1 に示す。不安定なピロリン酸部は、最後にリン酸 化3糖と DAG アミダイトを縮合して得ることとした。アンカー部の脂肪酸には一般 的な膜脂質と相転移温度が近く、合成上都合がよい飽和脂肪酸のミリスチン酸 (C14:0)を採用した。構築が難しい β -マンノサミニド部分は、隣接基関与を利用し た選択的βグルコシド化の後に、2位の立体反転を伴ってアジド基を導入すること にした。ウロン酸部位は糖縮合の反応性を下げるので、3糖構築後に酸化すること とした。アジド基の還元やピロリン酸の精製に手こずったが、mini-MPIase-3および いくつかの類縁体を得ることに成功した。



Scheme 1 mini-MPIase-3の逆合成

6. MPIase の構造活性相関

合成した mini-MPIase-3 は糖鎖が短いにもかかわらず、弱いながら濃度依存的に 有意な活性を示した⁶。これにより、MPIase が活性本体であることが証明され、膜 挿入の最小活性構造は合成した mini-MPIase-3 構造中に含まれることが明らかにな った。グルコサミンの6位 *O*-アセチル基を無くすと活性が著しく低下し、ピロリン 酸を欠くと活性が無くなった。アセチル基やピロリン酸は活性発現に重要らしい。 活性に関与していそうな置換基について、順次類縁体を合成し、その活性を調べて いる。

次に、膜に固定されている意義を探るため、天然 MPIase をピロホスファターゼで 処理して脂質部を除去した類縁体 (Polysac-P)について調べたところ、膜挿入活性を 全く示さず、糖脂質が膜に固定されていることが活性発現に不可欠であることが明 らかになった。しかし興味深いことに、脂質部を持たない Polysac-P と膜固定した mini-MPIase-3 とを共存させると、mini-MPIase-3 の膜挿入活性が著しく向上するこ とがわかった。これは、MPIase の糖鎖部 (Polysac-P)にシャペロン様の相乗効果があ り、タンパク質と長い糖鎖が複合体を作って凝集を抑制していることを示唆する。

7. MPIase と膜の相互作用

一方、膜に埋め込まれた脂質部分はどのような役目を果たしているのだろうか? そもそも DAG はなぜ膜挿入を阻害するのか? DAG と MPIase の各々が膜に及ぼす影 響を検証した⁷⁾。まず初めに、膜の構造を壊している可能性を考えたが、固体²H-NMR や TEM 観測の結果からは、少なくとも活性試験の濃度では、二重膜構造は維持され ていることが確認された。次に膜の運動性について、固体 NMR や蛍光観察を組み合 わせて調べたところ、DAG は膜内部のアシル鎖部の配向を高めるのに対して、ここに MPIase を加えると膜内部の配向が緩み、膜脂質頭部の動きも大きくなっていること が分かった。すなわち、DAG の添加で膜の流動性が低下するが、MPIase 周辺では膜 が動いて内部が露出しやすくなっており、タンパク質との疎水性相互作用をしやす くなると考えられる。

8. MPIase の活性機構

以上のことから、図3のような活性機構を推定した。① リボソームで作られた膜 タンパク質は疎水性が高く、そのままでは凝集してしまう ② 膜上の MPIase の糖 鎖部がタンパク質を捕捉し、凝集を抑制する ③ タンパク質が挿入しやすい構造を とる ④ MPIase は周辺の膜を柔らかくする ⑤ MPIase から膜へとタンパク質が受 け渡され、膜挿入が進行する。現時点では、膜上の MPIase の存在状態やタンパク質 との複合体の構造は不明である。



9. おわりに

述べてきたように、我々は膜タンパク質が膜に挿入される際にはたらく新しい因 子として、ユニークなアミノ糖を含む糖鎖ユニットから成る糖脂質 MPIase の構造を 明らかにした。⁸⁾

最近の西山らの生化学的研究から、MPIase の生合成に関与する酵素も明らかになってきた⁹⁾。この酵素を枯渇させると、膜挿入反応は完全に阻害され、タンパク質 膜透過反応の効率も 1/10 程度まで低下する。菌は生育できなかったことから、*in vivo*でも MPIase が重要な役割をしていることが確認できた。 これまでタンパク質の膜輸送過程に非タンパク質性の有機分子が関与する知見はな く、有機化学からのアプローチにより、膜輸送機構解明に大きな手がかりを与える ことができたと考えている。また、非タンパク質性の糖脂質が酵素のような機能を 示すことは極めて興味深く、糖脂質の新たな生理学的役割として興味深い。糖鎖-タ ンパク質相互作用や糖鎖複合体から膜にタンパク質が受け渡される過程など、詳細 はまだ解明できておらず、今後は、合成類縁体と物理化学的な解析を組み合わせて、 これらを探っていきたい。

謝辞

この研究は、岩手大学農学部西山賢一先生との共同研究です。天然物の供与や活性 試験に心から感謝するとともに、こんな変てこな因子を見つけた先生に敬意を表し ます。MPIaseの構造決定は前田将秀博士、合成研究は藤川紘樹博士、永瀬良平博士、 膜物性試験は野村薫博士、森祥子氏、山口敏幸博士の尽力によるものです。深く感 謝致します。

参考文献

- 1 Nishiyama, K.; Maeda, M.; Yanagisawa, K.; Nagase, R.; Komura, H.; Iwashita, T.; Yamagaki, T.; Kusumoto, S.; Tokuda, H.; Shimamoto, K. *Nat Commun* **2012**, *3*, 1260.
- 2 Kawashima, Y.; Miyazaki, E.; Muller, M.; Tokuda, H.; Nishiyama, K. *J Biol Chem.* **2008**, *283*, 24489.
- 3 Nishiyama, K.; Ikegami, A.; Moser, M.; Schiltz, E.; Tokuda, H.; Muller, M. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 35667.
- 4 Nishiyama, K.; Maeda, M.; Abe, M.; Kanamori, T.; Shimamoto, K.; Kusumoto, S.; Ueda, T.; Tokuda, H. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *394*, 733.
- 5 Kuhn, A.; Kiefer, D. Mol Microbiol 2017, 103, 590.
- 6 Fujikawa, K.; Suzuki, S.; Nagase, R.; Ikeda, S.; Mori, S.; Nomura, K.; Nishiyama, K. I.; Shimamoto, K. *ACS Chem Biol.* **2018**, *13*, 2719.
- 7 Nomura, K.; Yamaguchi, T.; Mori, S.; Fujikawa, K.; Nishiyama, K.; Shimanouchi, T.; Tanimoto, Y.; Morigaki, K.; Shimamoto, K. *Biophys. J.* **2019**, *117*, 99.
- a) Fujikawa, K.; Nomura, K.; Nishiyama, K.I.; Shimamoto, K. J. Synth. Org. Chem. Jpn. 2019, 77, 1096. b) Fujikawa, K.; Nishiyama, K.I.; Shimamoto, K.Trends. Glycosci. Glyc. 2019, 31, E151.
- 9 Sawasato, K.; Sato, R.; Nishikawa, H.; Iimura, N.; Kamemoto, Y.; Fujikawa, K.; Yamaguchi, T.; Kuruma, Y.; Tamura, Y.; Endo, T.; Ueda, T.; Shimamoto, K.; Nishiyama, K.I. *Sci Rep.* **2019**, *9*, 1372.