

膜タンパク質複合体 SecDF によるタンパク質分泌促進機構

森 博幸

(京都大学 ウイルス研究所)

研究の目的

細菌のタンパク質分泌は、SecYEG トランスロコンと SecA ATPase が協調的に働くことにより駆動される。これら必須の因子に加え、膜タンパク質複合体 SecDF も、*in vivo* における効果的なタンパク質分泌に必要である。我々は、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の SecDF の結晶構造を 3.3 Å の分解能により明らかにし、立体構造情報に基づいた生化学的、生物物理学的な解析から、SecDF によるタンパク質分泌促進のメカニズムに関する作業仮説 (図 1) を提案した^{1, 2)}。このモデルに従えば、SecDF は、SecYEG トランスロコンと相互作用しており、SecD の P1 (第 1 ペリプラズム) ドメイン領域で、分泌途上の基質タンパク質を一時的に捕捉する。その後、プロトンの流入と共役した、P1 ドメインの構造変化により、基質タンパク質分子を膜から引き出すと同時に、基質タンパク質を手放し、元の状態に戻る。こうした構造変化を繰り返すことにより、タンパク質の分泌を促進すると考えられる。

しかしながら、1) SecYEG トランスロコンや分泌基質タンパク質を含めた Sec 関連因子と SecDF との相互作用の様式や、2) プロトン駆動力 (PMF) のエネルギーを用いた SecDF の構造変化の実態については、不明な点が多く残されている。本研究では、これらに関して更なる情報を得るために、大腸菌 SecD タンパク質を対象とした系統的な部位特異的 *in vitro* 光架橋実験を行った。

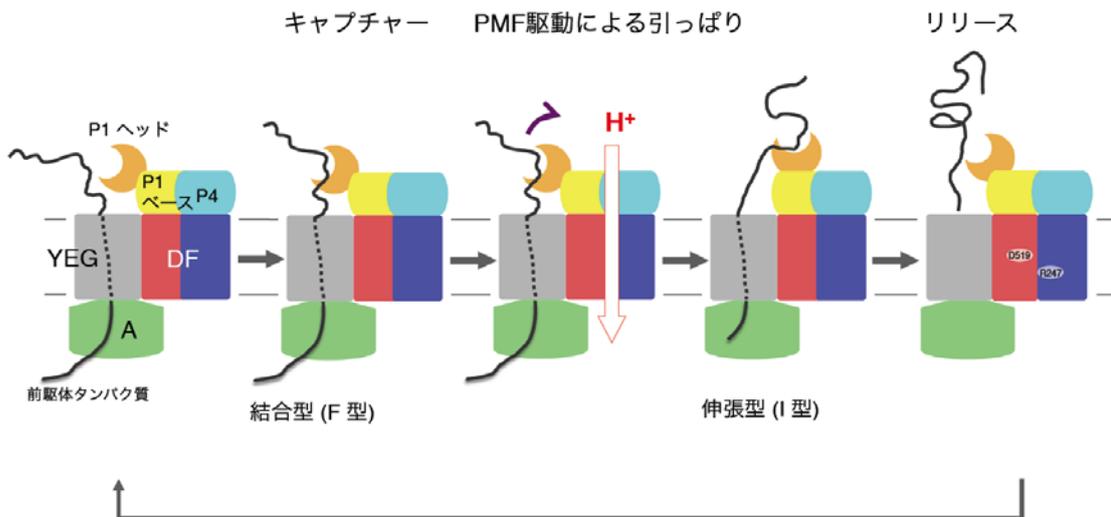


図 1 SecDF によるタンパク質分泌促進モデル

方法

米国の P. Schultz 博士らによって開発された部位特異的 *in vitro* 光架橋実験法は、以下の点で画期的なものである。彼らは、光反応性のアミノ酸アナログ *p*-ベンゾイルフェニルアラニン (pBPA) を amber コドンの位置に効率良く導入出来る変異型 tRNA 合成酵素と変異型 tRNA を分離した³⁾。これらを同時に発現する大腸菌を利用することにより、*in vivo* で、研究対象タンパク質の任意の位置に pBPA を持つ変異型タンパク質の合成が可能となる。紫外線照射に依存した近接因子との架橋複合体の形成を指標として、生きた細胞内で生じている一過的かつ動的なタンパク質間相互作用を解析することができる。本手法を用いて、我々は、SecY 分子内の SecA ATPase 近接部位の同定とその作用様式に関する知見を既に得ている⁴⁾。

本研究では、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の SecDF (TtSecDF) の立体構造に基づき、大腸菌 SecD の分子表面に露出していると考えられるアミノ酸残基を対象に、55 種類の SecD 変異体を作製し、これらを用いて *in vivo* 光架橋実験を行った。架橋産物の同定並びに帰属は、SDS-PAGE 上の移動度の変化と、相互作用候補因子に対する特異的抗体を用いた immunoblotting により評価した。

結果・考察

上記 *in vivo* 光架橋実験の結果を、図 2 にまとめると共に、以下に要約した。

1) SecF との架橋 (図 2 中紫色で表示) : TtSecDF の立体構造から予想されたように、膜貫通領域内の SecF との相互作用面に位置する部位に pBPA を持つ SecD 変異体の幾つかにおいて、SecF との架橋が観察された。この結果は、大腸菌 SecDF は、生体膜内においても TtSecDF と同じような立体構造を保持している事を示している。

2) 分子シャペロン DegP, Skp との架橋 (赤色) : P1 ドメインの外表面に存在する α ヘリックス上に pBPA を持つ変異体において、移動度の異なる幾つかの架橋産物が観察された。架橋相手は、分泌タンパク質の凝集を抑え、外膜への輸送の促進に関与する分子シャペロン DegP, Skp であることを明らかにした。P1 ドメインは、基質タンパク質の結合部位としてだけでなく (後述)、基質タンパク質の folding や輸送を助ける分子シャペロンの結合部位としても機能する可能性が示唆された。

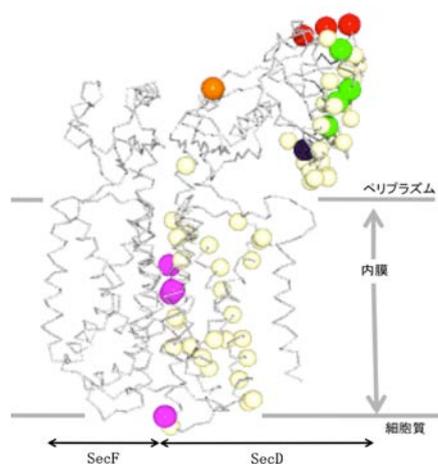


図 2 大腸菌 SecD をターゲットにした *in vivo* 光架橋実験結果のまとめ

Tt.SecDF の立体構造 (F 型) に大腸菌 SecD を対象にした *in vivo* 光架橋実験の結果をマップした。架橋相手の違いにより色分けした。
マゼンタ : SecF との架橋が確認された部位
赤 : 分子シャペロン DegP, Skp との架橋を形成した部位
緑 : MBP との架橋が形成された部位
オレンジ : 分子内架橋が形成された部位
白 : 架橋が形成されなかった部位

3) 分泌基質マルトース結合タンパク質 (MBP) との架橋 (緑色) : P1 ドメイン中に存在する細い溝の内側に pBPA を持つ変異体において、分泌タンパク質 MBP との架橋が確認された。これらが、膜透過途上の新生 MBP との架橋産物である証拠は未だに得られていないが、上記の結果は、P1 ドメイン内のこの溝が、分泌基質タンパク質の結合部位として機能している可能性を示している。

4) 分子内架橋産物 (オレンジ色) : P1 ドメインはヘッド、ベースと呼ばれる2つのサブドメインよりなる。生化学的解析から、P1 ヘッド領域がドメイン単位で動くことにより、SecD は F 型、I 型と呼ばれる2つの構造状態を行き来していることを我々は見いだしている。R268 部位に pBPA を持つ SecD 変異体を用いた際に、UV 照射に依存して、SDS-PAGE 上、SecD 分子より僅かに移動度の小さい架橋バンドの形成が確認できた。これは、SecD が I 型の構造状態を取った際に生じる分子内架橋産物と考えられた。興味深い事に、UV 照射前に細胞をプロトンイオノフォア CCCP で処理し PMF を消失させた場合には、この架橋形成は著しく低下した。また、SecDF のプロトン透過活性、並びに分泌促進活性に必須のアミノ酸残基を置換した SecD あるいは SecF 変異と Arg268pBPA 変異を組み合わせた場合には、分子内架橋産物はほぼ完全に消失した。これらの結果は、この分子内架橋が、SecD の P1 ドメインの構造変化をモニターする高感度のプローブとして利用可能な事を示すと共に、「SecDF のプロトン透過能と P1 ドメインの構造変化が共役している。」との我々の作業仮説を支持する。

結論

SecD の分子表面アミノ酸残基を対象とした部位特異的 *in vivo* 光架橋実験を通して、SecD に近接する幾つかの因子の同定に成功した。これらの結果は、我々の作業仮説の妥当性を強く支持する。この強力な実験手法を用いた更なる詳細な研究により、PMF で駆動される SecDF 機能の分子機構の理解に向けて重要な情報が得られるものと期待される。

文献

- 1) Tsukazaki, T. *et al.* (2011) *Nature* **474**, 235-238.
- 2) 森 博幸、塚崎智也 (2013) 化学と生物 **51**, 28-35
- 3) Chin, J. W. and Schultz, P. G. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 11020-11024
- 4) Mori, H. and Ito, K. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 16159-16164