

海洋性ビブリオ菌の食塩濃度変化に対する適応の仕組みを解明 —タンパク質の分泌能力の監視機構を利用したタンパク質膜透過装置の再編成—

森 博幸 ウイルス研究所准教授、石井英治 同博士研究員、橋本成祐 同大学院生、秋山芳展 同教授、千葉志信 京都産業大学准教授、伊藤維昭 同シニアリサーチフェロー、小嶋誠司 名古屋大学理学研究科准教授、本間道夫 同教授らの研究グループは、「海洋性ビブリオ菌は、環境中の食塩濃度変化に応じて、性質の異なる2種類の SecDF タンパク質複合体（タンパク質の膜透過装置の構成因子の1つ）を使い分けることで、タンパク質の膜透過活性を維持する巧みな機構を持つ。」ことを明らかにしました。この調節に関わる因子は、腸炎ビブリオや人食いビブリオ等の病原性ビブリオ属細菌においても広く保存されていることから、これら病原性菌の宿主への感染・増殖の際にも働いている可能性が考えられます。

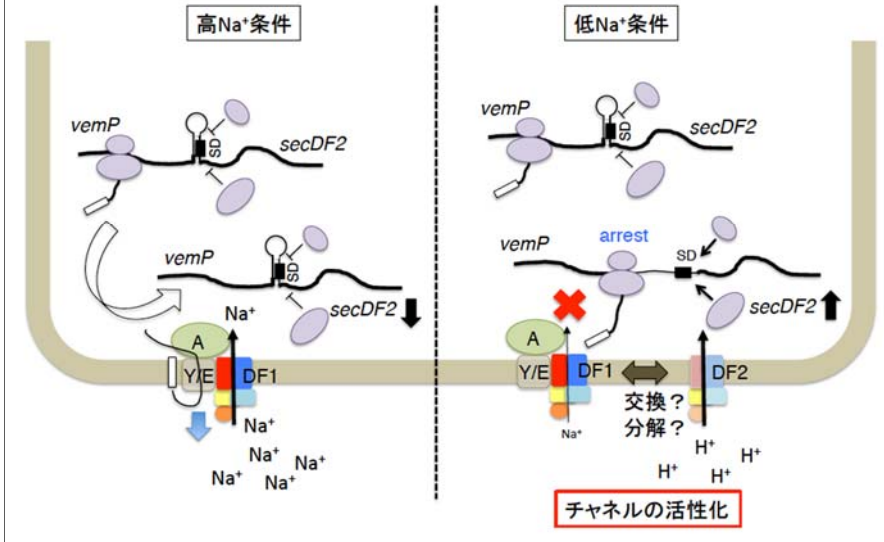
本研究成果は、2015年9月21日の週に米国科学アカデミー紀要の電子版に掲載されました。

研究者からのコメント：増殖速度の早い細菌にとっては、新しく合成されたタンパク質を細胞の表面や細胞外に正確に素早く運ぶことは非常に大切です。ビブリオ属細菌は、様々な塩環境（海水、汽水、宿主体内）中で生育しており、こうした環境変化に迅速に適応する必要があります。本研究で、ビブリオ属細菌が持つ食塩濃度変化に対する適応機構を明らかにすることが出来ました。それと同時に、分泌監視タンパク質が持つ翻訳停止の性質を利用した発現調節機構の新たな例を示すことができました。

概要

細菌は、細胞質で作られたタンパク質が効率良く生体膜を横切る為の装置（タンパク質膜透過装置）を有しています。この輸送装置の構成因子の1つである膜タンパク質複合体 SecDF は、細胞質膜を挟んで形成される一価陽イオン濃度勾配を利用してタンパク質膜透過を促進しています。本研究では、海洋性ビブリオ菌が、2種類の SecDF パラログ（SecDF1, SecDF2）を持ち、前者が Na⁺を、後者が H⁺を利用している事を明らかにしました。また、ビブリオ菌は、Na⁺が豊富な環境では Na⁺駆動型の SecDF1 のみを利用していますが、環境中の Na⁺濃度が低下するなど細胞のタンパク質膜透過能が低下した際には、SecDF 2 を新しく合成し、膜透過装置を再編成することにより H⁺濃度勾配を利用してタンパク質膜透過能を維持する巧妙な仕組みを持つ事を見いだしました。更には、この発現上昇には、*secDF2* 遺伝子の同一オペロン上流に存在する遺伝子によってコードされる分泌タンパク質 VemP (*V*ibrio protein *e*xport *m*onitoring *p*olypeptide)が必須の役割を持つ事も明らかにしました。VemP は、細胞のタンパク質膜透過能を自身の膜透過能として監視し、膜透過能が低下した時にはリボソームによる自身の翻訳を停止することで、周辺の mRNA の二次構造がほどけた状態を維持し下流の *secDF2* 遺伝子の発現を促すと考えられます。

VemPの翻訳停止を利用した SecDF2の発現上昇機構



(左) 高食塩環境では、 Na^+ 濃度勾配エネルギーを利用して SecDF1 が十分に機能できるため、VemP タンパク質の翻訳停止は一過的であり、SecDF2 の合成は抑制される。

(右) 低食塩環境下では、 Na^+ 濃度勾配の減少により SecDF1 の機能が低下し、VemP の分泌能も低下する。その結果 VemP の翻訳停止状態が安定化し、mRNA の特徴的な二次構造がほどけた

状態が持続する。SecDF2 に対する SD 配列 (リボソーム結合部位) が露出し、SecDF2 の合成量が増加する。SecDF2 は SecDF1 と置き換わり、 H^+ 濃度勾配を利用できる新しいタンパク質の膜透過装置が再構築される。

1. 「背景」

細胞質中で合成されたタンパク質の約 1/3 は、生体膜を通過し細胞内外の適切な場所に運ばれて初めて生理的機能を獲得します。タンパク質のような巨大な分子を効率良く膜透過するために、細胞はタンパク質の膜透過装置を有しています。細菌においては、SecYEG と呼ばれる膜タンパク質複合体が、輸送されるタンパク質が通過するための「通り道」を形成しています。タンパク質の膜透過反応にはモーター因子 SecA ATPase の働きは必須ですが、膜タンパク質 SecDF もタンパク質膜透過の促進に関与することが知られています。我々は、SecDF の立体構造を決定し、構造情報に基づいた生化学的解析から、「SecDF は H^+ 輸送体であり、細胞質膜を挟んで形成された H^+ 濃度勾配エネルギーを利用して膜透過途上の基質タンパク質を引っ張り出す。」との作業仮説を提案しています (図 1)。

海洋性ビブリオ菌や食中毒の主要な原因菌である腸炎ビブリオは、海水中のみならず河口等の汽水域にも生育しています。また、これらの細菌は、貝や魚などの宿主に感染しその体内で生育しています。このように、ビブリオ属細菌は食塩濃度の異なる様々な環境に適応し生存できる仕組みを持つと考えられますが、その機構は解っていませんでした。

「研究の内容」

モデル生物として最も良く研究されている大腸菌は、上記 *sec* 遺伝子を各 1 コピー有し

ています。我々は種々の細菌のゲノム配列を精査した結果、同じグラム陰性細菌に属するビブリオ属細菌では、*secDF* 遺伝子のみを2コピー持つ事に気づきました。(以下、配列上大腸菌の SecDF に類似している方を SecDF1、他方を SecDF2 と呼びます。) これらの SecDF パラログの酵素学的性質を調べた所、SecDF1 は Na⁺濃度勾配を利用してタンパク質膜透過能を促進するのに対して、SecDF2 は H⁺濃度勾配を利用して膜透過を促進している事を示唆する結果を得ました (図2)。

次に、これら2種の SecDF パラログの発現・蓄積状態を種々の生育条件やタンパク質膜透過阻害剤を用いて検討した結果、高 Na⁺濃度環境下では SecDF1 のみが検出されるのに対して、低 Na⁺濃度環境下やタンパク質の膜透過能が低下した状況下では、SecDF2 の発現が強く誘導され、代わりに SecDF1 の細胞内量が減少する事が明らかになりました。即ち、食塩濃度の低下に伴い Na⁺駆動型の SecDF1 を含む膜透過装置から、H⁺駆動型の SecDF2 型膜透過装置への再編成が起こり、H⁺濃度勾配がタンパク質膜透過の促進に用いられるようになることを示しています。

SecDF2 の発現上昇の分子機構を明らかにするために、ビブリオ属細菌の遺伝子を調べた所、*secDF2* 遺伝子上流に非常に良く保存された ORF が存在していることを見いだしました。この遺伝子は分泌タンパク質をコードしており、菌の分泌状態を監視し膜透過能の低下時に SecDF2 の発現を上昇する働きを持つことから、新たに VemP (*Vibrio* protein export monitoring polypeptide) と名付けました。

VemP タンパク質の機能解析の結果から、N末端に存在する疎水領域はシグナル配列として機能し、C末端領域の保存配列は、下流の SecDF2 の発現に必須の役割を持つ事が明らかになりました。更なる解析から、VemP タンパク質の合成は、C末端近くで一旦停止し、VemP の膜透過が低下した際には、その合成が安定に停止する事が解りました。またこの翻訳停止には、C末端の保存領域内の多数のアミノ酸残基が関与している事も明らかになりました。

VemP の翻訳停止に伴う SecDF2 の発現上昇には、*vemP-secDF2* が同一 mRNA として転写されることが必須であり、*vemP-secDF2* mRNA は、翻訳停止点の近くで特徴的なステム・ループ構造を形成すると予想されます。翻訳停止点とステムの開始点までの距離を伸ばすと SecDF2 の発現上昇能は大きく低下しました。これらの結果から、VemP タンパク質の合成停止により停滞したリボソームが mRNA の二次構造を持続的に破壊し、SecDF2 の翻訳開始に必要なリボソーム結合部位が露出した結果 SecDF2 の翻訳が上昇すると考えられます (図3)。

2. 「成果の意義」

1) ビブリオ属細菌は様々な食塩濃度の環境に適応し生育する為に、イオン特異性の異なる2種類の SecDF パラログを巧みに使い分ける機構を持つことを世界で初めて明らかにしました。外界の Na⁺濃度変化を直接感知するのではなく、細胞内のタンパク質の膜透過能をモニターすることで、鋭敏かつ迅速で可逆的な膜透過装置の再編成が可能になると考えられます。VemP を用いた発現制御システムは、病原性細菌である同族の腸炎ビブリオや人食いビブリオ、コレラ菌においても高度に保存されていることから、宿主内での菌の

増殖ひいては病原性の発現に関与している可能性も考えられます。secDF2は必須遺伝子ではなく、機能ドメインの多くが、非細胞質側に向いていることから、上記病原性ビブリオ菌に対する創薬のターゲットとしても大いに期待されます。

2) SecDF2の発現上昇には分泌監視タンパク質 VemP の翻訳停止が必須であることも明らかになりました。監視タンパク質の翻訳停止を介した類似の発現上昇の機構は、これまで大腸菌の secM-secA システムや枯草菌の mifM-yidC2 (膜タンパク質の組み込み促進因子) システムにおいてのみ知られていました。(i) 監視タンパク質と発現上昇される遺伝子が同一オペロンとして転写されること、(ii) 翻訳停止により特異的な mRNA の 2 次構造が壊れることで発現誘導が起こること、(iii) 翻訳停止には、リボソームの内壁と監視タンパク質内の翻訳停止配列 (アレストモチーフ) との間の特異的な相互作用が関与すること等は共通していますが、生物種、発現誘導されるタンパク質、アレストモチーフとリボソームとの相互作用様式、翻訳停止の様式は全て異なっており、進化の後期過程で各生物が独立に獲得してきたと考えられます。VemP の翻訳停止機構の更なる研究により、新生鎖バイオロジーという新しい分野の進展への寄与が期待されます。

「用語説明」

Sec 因子：タンパク質の分泌 (英語では secretion) に関わるタンパク質。モーター因子 SecA、分泌特異的シャペロン SecB 以外は全て膜タンパク質である。

パラログ：同一生物の中に存在する複数のホモログ。

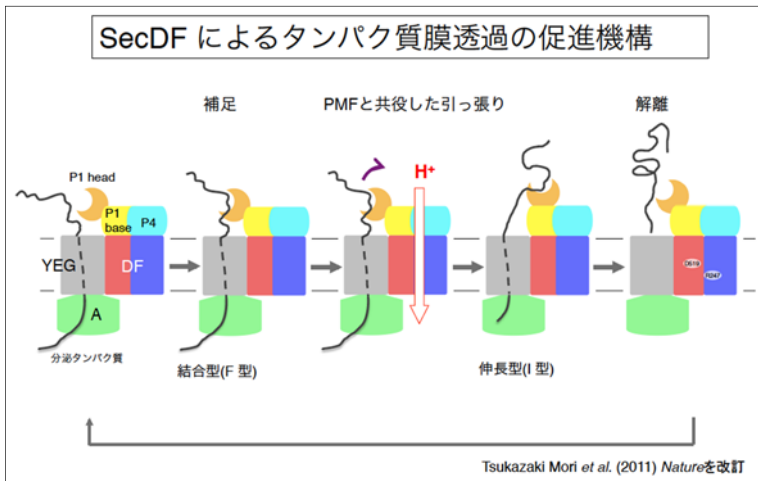
ORF:オープンリーディングフレームの略。タンパク質に翻訳される可能性がある塩基配列。

シグナル配列：分泌タンパク質のアミノ末端に存在する荷札配列。Sec タンパク質膜透過装置に運ばれる分泌タンパク質の場合には、アミノ酸配列に相同性は見られないが、アミノ末端から、数個の正電荷残基、疎水性アミノ酸残基のクラスター、側鎖の小さいアミノ酸残基が続くという共通の特徴が見られる。

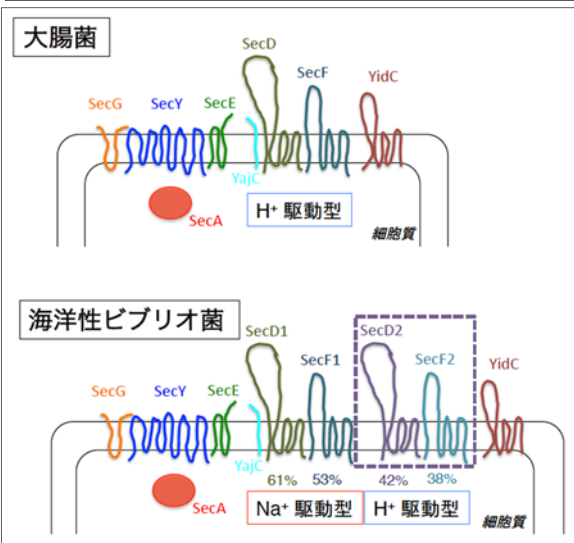
オペロン：一つの mRNA として複数の遺伝子が転写される際の遺伝子の組のこと

SD 配列：Shine-Dalgarno 配列の略。原核生物の mRNA の開始コドンの 5' 上流 3~15 塩基の間に存在するプリン塩基 (G と A) に富んだ配列。タンパク質の合成が開始される際のリボソームの認識部位として働く。

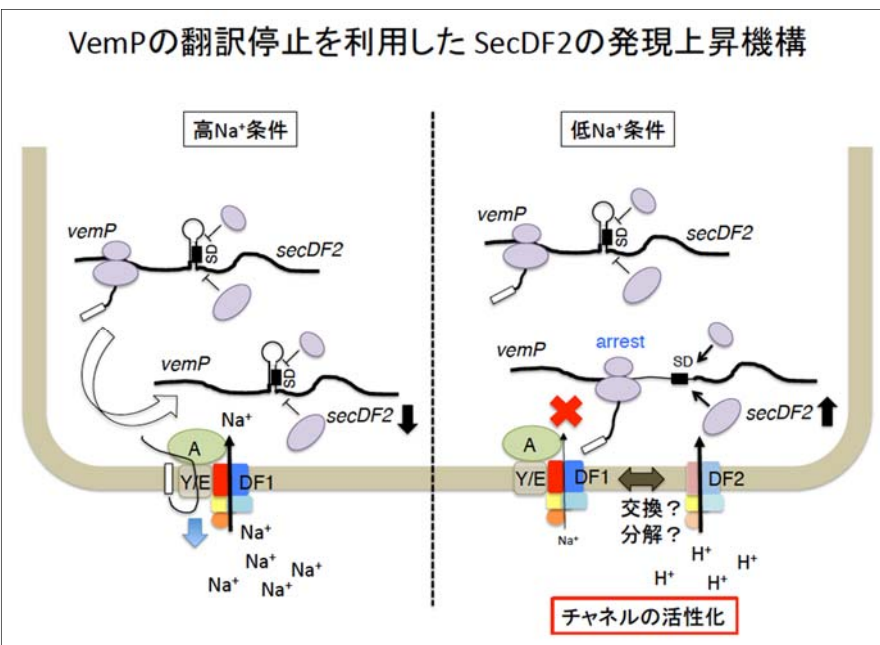
新生鎖バイオロジー：翻訳途上の中間体と考えられてきた新生鎖を主役とした生命現象に着目した生物学。合成途上の新生途上鎖が、自らのフォールディングや品質管理を巧妙に制御していることや、新生鎖の状態でのみ生物学的な独自の機能を発揮する場合もあることなどが最近明らかになってきており、生物学の新しいパラダイムとして注目されている。



(図1) SecDFは、SecYEG チャンネルから出て来た基質タンパク質を非細胞質側の大きなドメイン (P1ヘッドドメイン) で補足し、プロトンの細胞内流入と共役した P1ヘッドドメインの構造変化により、引っ張り出す。その後、基質タンパク質を手放して元の状態に戻る。この一連の運動を繰り返すことで、タンパク質の膜透過を促進する。



(図2) 大腸菌と海洋性ビブリオ菌が持つタンパク質膜透過装置関連因子を模式的に示した。SecD/F1, SecD/F2 下の数字は、大腸菌 SecD/F に対するアミノ酸相同性を示す。生化学的解析結果から、SecDF1 は Na⁺駆動型、SecDF2 は H⁺駆動型と考えられる。



(図3)

(左) 高食塩環境では、Na⁺濃度勾配エネルギーを利用して SecDF1 が十分に機能できるため、VemP タンパク質の翻訳停止は一過的であり、SecDF2 の合成は抑制される。

(右) 低食塩環境下では、Na⁺濃度勾配の減少により SecDF1 の機能が低下し、VemP の分泌能も低下する。その結果 VemP の翻訳停止状態が安定化し、mRNA の特

徴的な二次構造がほどけた状態が持続する。SecD2 に対する SD 配列 (リボソーム結合部位) が露出し、SecDF2 の合成量が増加する。SecDF2 は SecDF1 と置き換わり、H⁺濃度勾配を利用できる新しいタンパク質の膜透過装置が再構築される。