

# Feature Article

特集論文

## 圧力で探る生体膜と膜タンパク質のダイナミクス研究

阿部 文快

深海では非常に高い圧力のため、普通の生物はとても生きていくことができない。ところが、好んで深海に棲む生物もいる。筆者らはその仕組みの解明のため、“圧力生理学”を提唱している。本稿では圧力が生物の機能に及ぼす影響の一例として、高圧で培養した出芽酵母で明らかになったトリプトファン輸送のダイナミクスについて解説する。

### はじめに

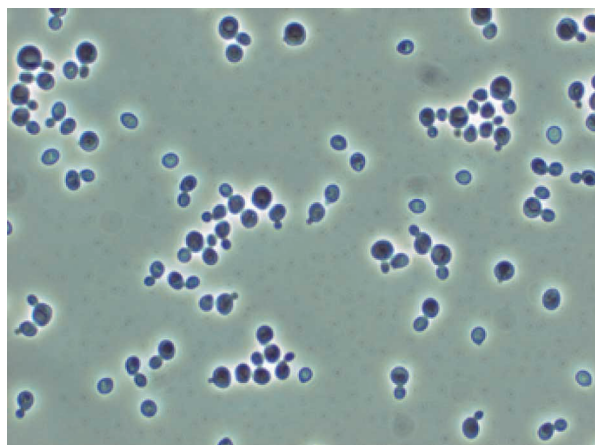
私たちの住む地球は約7割が海で覆われ、その平均深度は3800 mに達する。10 mにつき水圧は1気圧上がるので、3800 mだと380気圧、世界最深部10000 mのマリアナ海溝では1000気圧もの圧力がかかる。1000気圧とは、直径1 mのマンホールに成人男性10万人が乗る圧力だ。当然、大気圧下に住む生物の機能のほとんどは阻害される。ところが、深海には好圧性生物という不思議な生き物がいて、むしろ圧力を好んで生きている。一体なぜ彼らは高圧環境下で生きられるのだろうか？ その仕組みを追求しようと提唱したのが、“圧力生理学(Piezophysiology)”である。しかし、深海の生物を生きたまま捕獲するのはとても困難で、運良く捕獲できても実験室で飼育するのは容易ではない。また、遺伝子機能を解明しようにもゲノム配列が不明である。私たちは生物に対する圧力の効果をまず原理から明らかにしようと考え、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*を実験材料に選んだ。この酵母菌はパンやビールを造ることで私たちの生活に密着している有用微生物だが、同時に基礎研究においても不可欠な存在である。膨大な数の変異株コレクション、ゲノム全塩基配列の公開による優れた分子生物学的ツールも整備されており、そして何より真核生物なので得られた成果は医学に応用できる可能性が高い。

本稿では、酵母に対する圧力効果とトリプトファン輸送の重要性、そして膜や膜タンパク質研究への圧力利用に

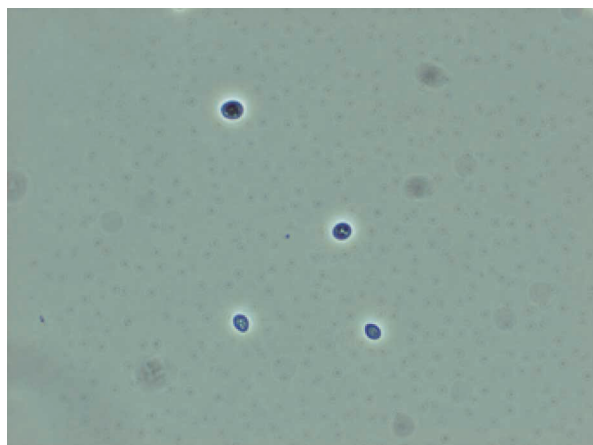
ついて解説したい。なお、学術論文同様、本文における圧力の単位はMPa(メガパスカル)を用いる。0.1 MPaが大気圧で、25 MPaなら250気圧である。

### 出芽酵母への圧力効果

通常環境で生育した細胞にとって、100 MPaを超える圧力は致命的である。しかし、あらかじめ細胞をマイルドに熱処理(42 °C, 30分など)しておくと、この圧力下での生存率は1000倍くらい高まる。圧力耐性には熱耐性の獲得で知られているストレスタンパク質の一種Hsp104が重要な役割を演じており、圧力で変性した細胞内タンパク質の再生を促す<sup>[4]</sup>。50 MPa以下の圧力なら、20時間くらいかけても酵母の生存率はほとんど低下しない。しかし、増殖は完全に停止する。圧力と細胞増殖の関係については次節で解説する。酵母を非致命的な圧力にさらすと細胞内で何が起こるのだろうか？ pH感受性の細胞内蛍光プローブを用いた高圧蛍光測光を行ったところ、50 MPa程度で細胞質や液胞内が顕著に酸性化する現象を見いだした<sup>[6]</sup>。これはアルコール発酵に伴い生成する炭酸ガスの水和( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$ )及びイオン化( $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ )が圧力により大きく促進されるためで、その効果はグルコース濃度が高いほど大きい。解糖系の鍵酵素ホスホフルクトキナーゼの活性は細胞内pHの低下に鋭敏に反応するので、圧力は酵母の発酵能に影響を及ぼすと言える。圧力はまた、細胞内の非特異的エステラーゼの活性を著しく高める。従って、香気成分であるエス



(A) 大気圧下で培養した細胞。細胞から芽が出ているのがわかる。



(B) 25MPaで10時間培養した細胞。増殖が止まり、細胞は丸くなっている。

図1 高压培養した酵母細胞の顕微鏡像

テル化合物の合成や分解にも影響を与えるであろう。例えば、醸造に用いる巨大な発酵槽の底部では、ある程度の圧力が発生するので、こうした圧力誘起の現象が起こっていてもおかしくはない。

## トリプトファンの取り込みは細胞のアキレス腱か？

ある日、酵母を高压培養し顕微鏡で観察していた時、ふと不思議な変化が目にとまった。25 MPaで増殖は止まったが、そのまま数時間培養したら、細胞が丸くなってきたのである(図1；その後の調べで、細胞周期がDNA合成直前のG<sub>1</sub>期で停止していることがわかった)。その様子が何となく飢餓条件においた細胞に似て見えた。培地の栄養はもともと豊富なのだが、試しに20種類の各アミノ酸を1 g/Lという過剰量添加して高压培養してみた。すると驚いたことに、トリプトファンを加えた培地でだけ、細胞は元気に増えたのである。用いたYPH499株の遺伝子型を見ると、*ade2 ura3 leu2 lys2 his3 trp1*とあった。この菌株はプラスミド選択マーカとしてアデニン、ウラシル、ロイシン、リジン、ヒスチジン、トリプトファン要求性だった。つまり、これら6種類の栄養源を細胞の外から取り込まなくては生きられないタイプの株だったのである。常温常圧では、アミノ酸類を1 g/Lも追加しなくても十分増殖する。従って、高压下では外からのトリプトファンの取り込みが“細胞のアキレス腱”のごとく損なわれてしまい、大量に与えることでそれが補われたのである。実際、トリプトファンを自ら合成できる株は、ゆっくりとではあ

るが25 MPaで増殖する。

出芽酵母ゲノムにはアミノ酸輸送体の遺伝子がホモログ<sup>\*1</sup>と合わせ24個コードとされているが、そのほとんどは12回膜貫通型<sup>\*2</sup>と予測されている<sup>[7]</sup>。そこで、高親和性のトリプトファン輸送体Tat2を高発現させ、高压培養を行った。すると、細胞周期のG<sub>1</sub>期停止は回避され、細胞は25 MPaの圧力下で増殖するようになった<sup>[8]</sup>。また、Tat2高発現株は10~15℃における低温増殖能も獲得した<sup>[8]</sup>。高压と低温はいずれも生体膜の流動性の低下を招くが、その際、直ちに悪影響を被るのがトリプトファンの取り込みだったのである。実は、酵母におけるトリプトファンの取り込みを“細胞のアキレス腱”と呼んだのには他にも理由がある。免疫抑制剤のFK506やラパマイシン、吸入麻酔剤イソフルラン、副腎白質ジストロフィー治療薬4-フェニル酪酸、有機弱酸、フィトスフィンゴシンなどを酵母に投与すると、トリプトファン要求株だけ増殖が阻害される<sup>[9]</sup>。そして多くの場合、Tat2高発現によって耐性を得る。ラパマイシンが作用するタンパク質はTor(Target of rapamycin)と呼ばれ、酵母から動物まで広く保存されている<sup>[10]</sup>。Torの不活性化はタンパク質合成の抑制、アクチン骨格形成の阻害、自食作用の誘導、特異的遺伝子の発現など多様な変化をもたらし、Tat2の分解誘導もその一つである<sup>[11]</sup>。こうしてトリプトファン輸送体をめぐり、高压や低温の効果とさまざまな薬剤作用に共通点があることがわかった。それらをつなぐ鍵が、次に示す“ユビキチン機構”である。

\*1：ホモ(同じ)ログ(遺伝子)の意味。配列と機能が良く似ている遺伝子

のこと。

\*2: 貫通型タンパク質とは、膜タンパク質のうち膜の両側を貫通しているもの。回数は、何回貫通しているかを表している。

## ユビキチン機構によるトリプトファン輸送体の圧力制御

トリプトファン要求株を親株として、25 MPaで増殖する変異株を多数単離することができた。その一つ、*HPG1*株ではRsp5というユビキチンリガーゼにアミノ酸置換が見つかった<sup>[9]</sup>。ユビキチンは76アミノ酸からなる小さな細胞内分子である。それが共有結合したタンパク質は不要とみなされ、細胞内で分解される。この仕組みは真核生物のみに見られ、バクテリアなど原核生物にはない選択的なタンパク質分解システムである。Rsp5ユビキチンリガーゼは不要になったタンパク質を認識し、ユビキチンを付加する重要な役割を担う。細胞を高圧にさらすと膜構造に歪みが生じ、膜タンパク質であるTat2は変性する(図2)。野生株の場合、変性Tat2はRsp5によってユビキ

チン化され、やがて液胞という細胞内小器官内で処分される。一方、*HPG1*株ではTat2の分解が起こらず、変性状態のままTat2が細胞膜に蓄積する(図2)。この状態でも活性はある程度維持されているため、結果としてトリプトファンの取り込みが盛んになり、細胞は高圧条件下で増殖する。一方、*HPG2*変異はTat2そのものに生じており、3つの変異アレル<sup>3</sup>はTat2のN末端とC末端に見つかった<sup>[12]</sup>。この場合も、やはり変異型Tat2はユビキチン化を受けにくくなり高圧下で安定化する(図2)。前述した薬剤のうち、少なくともイソフルラン、4-フェニル酪酸、有機弱酸及びフィトスフィンゴシンは、膜の構造や機能に影響を及ぼす。“適正な膜の状態”がトリプトファン輸送に重要であり、高圧・低温と薬剤の不思議な相関関係を解く重要な因子であった。

酵母には、もう一つTat1という低親和性のトリプトファン輸送体があり、Tat2とは39%の相同性がある(類似性では60%)。おもしろいことに、細胞膜上でTat2が流動性に富むグリセロリン脂質に存在するのに対し、Tat1はスフィンゴ脂質やエルゴステロールに富むタイトなドメイン“脂

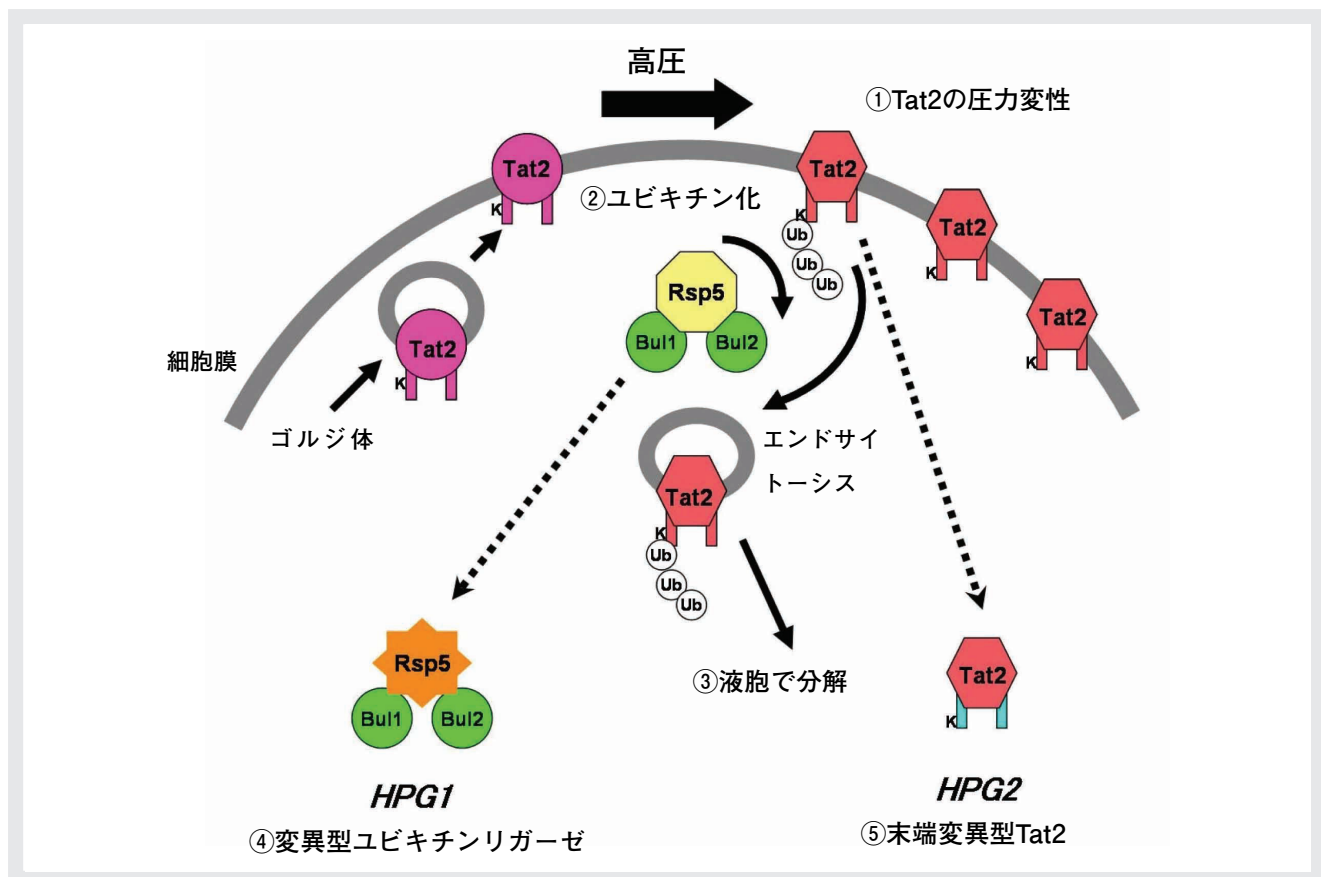


図2 Tat2の圧力変性とユビキチン機構による分解  
細胞が高圧にさらされると、トリプトファン輸送体Tat2が変性する(①)。変性Tat2はRsp5によりユビキチン化され(②)、エンドサイトーシスの後、液胞で分解される(③)。Rsp5が変異した*HPG1*株では、ユビキチン化活性が低下しており(④)、*HPG2*株ではTat2の細胞質末端が変異している(⑤)。結果としてTat2は分解されず細胞膜上に蓄積する(Ub, ユビキチン; Bul1/Bul2, Rsp5の結合タンパク質)。



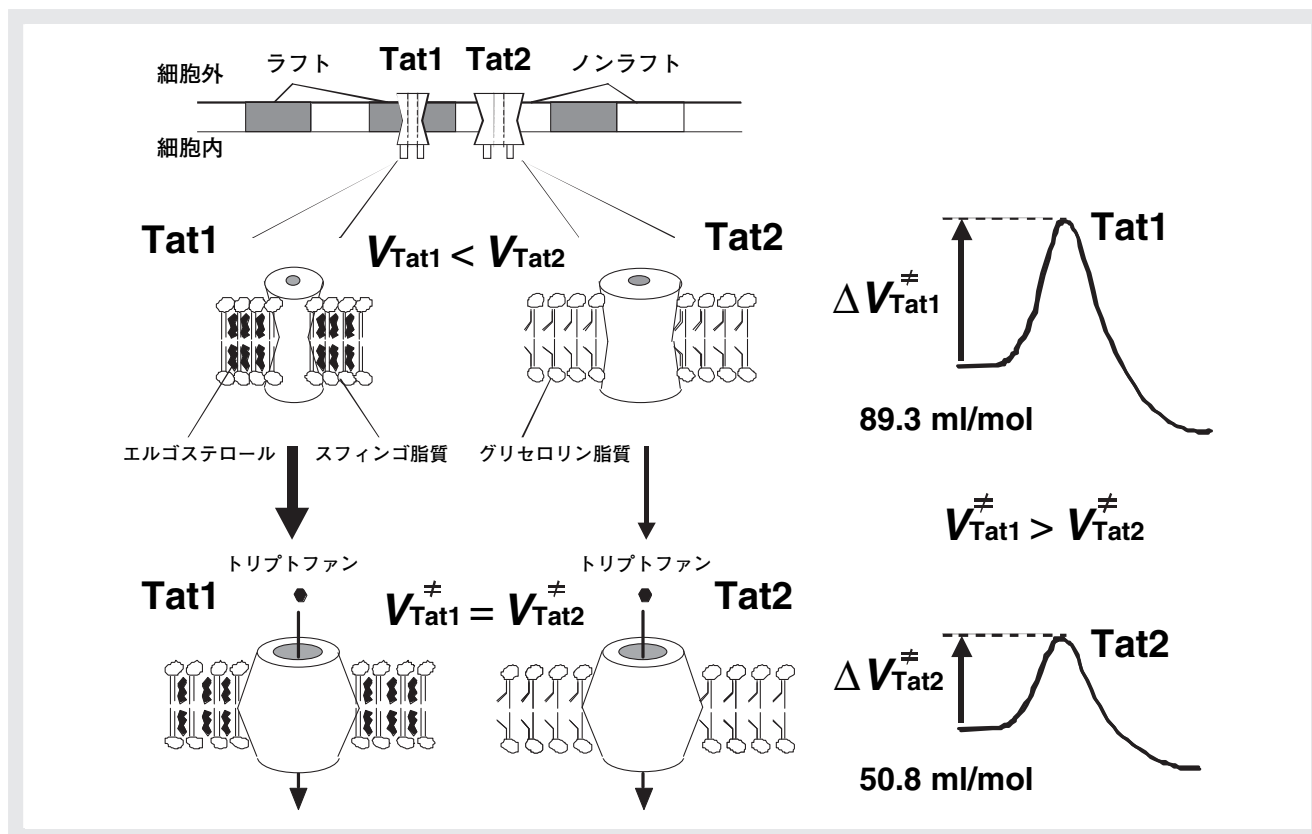


図3 トリプトファン輸送体Tat1とTat2のダイナミックな体積変化モデル  
Tat1とTat2は脂質局在に違いがあり、それが活性化体積に反映する。Tat1の方がより大きな体積変化を示す。

質ラフト<sup>\*4</sup>に局在する<sup>[9]</sup>。この脂質局在の違いが、次節で示すトリプトファン輸送のダイナミクスに大きな影響を及ぼすことがわかった。類似する2つの膜タンパク質の脂質局在がなぜ違うのだろうか？ 今後、生化学のみならず、脂質の物性を測る物理化学的なアプローチが必要となる。

\*3：アレルとは対立遺伝子のこと。同一遺伝子座に起こったDNA塩基配列の差異のこと。

\*4：ラフトとはいかなの意味。生体膜上の脂質(スフィンゴ脂質やコレステロール)が多い部分をいかなに見立てて脂質ラフトと呼んでいる。

## 圧力を用いたトリプトファン輸送のダイナミクス解析

圧力は化学反応を体積面から探るユニークな物理因子である。次式から得られる活性化体積( $\Delta V^\ddagger$ )が遷移状態における活性錯合体の立体構造を知る重要な手がかりとなる。

$$(\partial \ln k_{\text{cat}} / \partial p)_T = -\Delta V^\ddagger / RT \quad \dots\dots\dots (1)$$

ここで、 $k_{\text{cat}}$ は反応速度定数、 $p$ は圧力、 $T$ は絶対温度、 $R$

は気体定数である。トリプトファンの取り込みに伴う輸送体のダイナミックは構造変化について、圧力の側面から検討した。トリプトファンの取り込み速度 $k_{\text{cat}}$ の圧力依存性と前述の式(1)から活性化体積( $\Delta V^\ddagger$ )を算出した。その結果、Tat1とTat2を介するトリプトファン輸送の $\Delta V^\ddagger$ は、それぞれ89.3及び50.8 ml/molという非常に大きな正の値を示した<sup>[9]</sup>。このことは、トリプトファン取り込みの遷移状態で、輸送体タンパク質が大きく膨張することを示唆している(図3)。こうした大きな構造変化がトリプトファン輸送の特徴であり、高圧や低温に対する感受性の要因なのである。また、Tat1とTat2の活性化体積には約2倍の差があったが、おそらくこれは、先述した脂質局在の違いを反映するものと考えられる。すなわち、タイトなドメインにあるTat1は、基底状態の体積が小さいため、トリプトファン取り込みの遷移状態ではより大きな体積の膨張を必要とするであろう。一方、Tat2は比較的柔軟なグリセロリン脂質部分に局在していて、元の体積が大きいため、遷移状態に至るには相対的に小さめの体積変化で済むという解釈である(図3)。近年、X線結晶回折や電子顕微鏡による手法で膜タンパク質の立体構造が次々と明らかになってきている。しかしそれらは静的構造の可視化であり、動態を示すものではない。圧力実験は、膜タ

ンパク質の動態をダイナミックな体積変化として定量できる唯一の手法である。

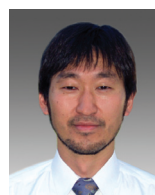
## おわりに

本稿では、出芽酵母に圧力を負荷した時の形態変化をきっかけとしてひも解かれた私たちの研究について解説した。圧力と薬剤の決定的な違いは、圧力作用は可逆的で系に何ら因子を加えず、除圧すれば元に戻せる点にある。温度と組み合わせれば膜の状態をかなり幅広くコントロールすることもできる。遺伝子の網羅的発現レベルで見ると、実に多様な遺伝子が圧力の影響を受けていることがわかってきた<sup>[13]</sup>。こうして考えると、圧力は全般的に確かに生物にとって抑制的だが、うまく条件さえ整えてやれば、生命現象、特に生体膜に関わる細胞機能を新たな角度から探る実に有効な手段となりうる。課題は無数に残されているが、酵母の分子生物学が基本的な概念を構築する上で威力を発揮することは間違いないであろう。

圧力研究は装置類の煩雑さから実験に制約を伴う分、チャレンジングな要素がまだ大いに残されている。本稿をご覧になった方々が、この分野に興味を抱いてくれることを願う次第である。

## 参考文献

- [1] F. Abe, C. Kato, and K. Horikoshi. *Trends Microbiol.* **7**, 447-452 (1999).
- [2] F. Abe and K. Horikoshi. *Trends Biotechnol.* **19**:102-108 (2001).
- [3] D. H. Bartlett. *Biochim. Biophys. Acta* **1595**, 367-381 (2002).
- [4] H. Iwahashi, K. Obuchi, S. Fujii, and Y. Komatsu. *FEBS Lett.* **416**, 1-5 (1997).
- [5] H. Iwahashi, H. Shimizu, M. Odani, and Y. Komatsu. *Extremophiles* **7**, 291-298 (2003).
- [6] F. Abe and K. Horikoshi. *Extremophiles* **2**, 223 (1998).
- [7] B. Nelissen, R. de Wachter, and A. Goffeau. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**, 113-134 (1997).
- [8] F. Abe and K. Horikoshi. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8093-8102 (2000).
- [9] F. Abe and H. Iida. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7566-7584 (2003).
- [10] J. L. Crespo and M. N. Hall. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 579-591 (2002).
- [11] T. Beck, A. Schmidt, and M. N. Hall. *J. Cell Biol.* **146**, 1227-1237 (1999).
- [12] A. Nagayama, C. Kato, and F. Abe. *Extremophiles* **8**, 143-149 (2004).
- [13] F. Abe. *FEBS Lett.* **581**, 4993-4998 (2007).



**阿部 文快**

**Fumiyoshi Abe**

独立行政法人海洋研究開発機構  
海洋・極限環境生物圏領域  
極限環境適応・分子進化研究チーム  
チームリーダー  
横浜市立大学大学院  
生命ナノシステム科学研究科  
客員教授