

大腸菌リポ蛋白質の選別輸送を担う ABC トランスポーターの反応機構

応用生命工学専攻

平成14年度 博士課程入学

氏名 伊東 靖子

指導教員名 徳田 元

略語表

| | |
|---------|--|
| ABC | ATP binding cassette |
| ATP | Adenosine 5'-triphosphate |
| ADP | Adenosine 5'-diphosphate |
| AMP | Adenosine 5'-monophosphate |
| AMP-PNP | Adenylyl-imidodiphosphate |
| AP | Alkaline phosphatase |
| Ap | Ampicillin |
| BCIP | 5-Bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate |
| BSA | Bovine serum albumin |
| CBB | Coomassie brilliant blue R-250 |
| Cm | Chloramphenicol |
| DDM | n-Dodecyl- β -D-maltoside |
| EDTA | Ethylenediamine tetraacetic acid |
| IPTG | Isopropyl- β -D[-]-thiogalactopyranoside |
| Lol | Localization of lipoprotein |
| MSD | Membrane-spanning domain |
| NBD | Nucleotide-binding domain |
| NBT | Nitro blue tetrazolium chloride |
| OD | Optical density |
| ORF | Open reading frame |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PE | Phosphatidylethanolamine |
| Pi | Phosphate |
| PL | Phospholipid |
| PVDF | Polyvinylidene Fluoride |
| SAB | Sample application buffer |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| SM | Sucrose monocrate |
| TBS | Tris buffered saline |
| TCA | Trichloroacetic acid |
| Tris | 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol |
| Vi | Vanadate |

目次

| | ページ |
|-------------------------------|-----|
| 1. 序論 | 1 |
| 2. 材料と実験方法 | 16 |
| 3. 結果 | |
| 3-1. 基質結合型 LolCDE 複合体の単離および解析 | 32 |
| 3-2. LolD モチーフの解析 | 49 |
| 4. 考察 | 64 |
| 参考文献 | 72 |
| 謝辞 | |

1. 序論

細胞膜は、生物界の三大ドメイン（古細菌、真正細菌および真核生物）が共通にもつ普遍的なオルガネラである。細胞膜がなければ細胞は存在し得ないし、生命体としてのアイデンティティーが保てない。細胞膜の大部分を構成するリン脂質分子は、疎水性部分と親水性部分からなる両親媒性分子であり、こうした物理化学特性をもつことから、水中で自然に凝集して脂質二重層を形成し、閉じた小胞となる。地球上の生物は、無限にありうる化学物質の中から DNA、RNA、タンパク質を基礎に選び、めざましい成功を収めたが、自然に閉じる性質をもつ脂質二重層を細胞の基本骨格として選択したこともまた、そうした成功をもたらす重要な要因だったのではないだろうか。

しかしながら、脂質二重層のみからなる閉鎖系では、変化に富む環境に適応できないため、細胞はさまざまな工夫を凝らすようになった。リン脂質でつくられた二重の層に蛋白質が埋めこまれたのも、そうした工夫の一例であろう。これらの蛋白質は、細胞外の情報を細胞内へ伝えたり、栄養素の取り込みや老廃物の排出（選択的透過性）を行ったりして、細胞内の調和を維持している。また、真核細胞の細胞膜には、リン脂質分子1個に対して1個というほどの高い濃度でコレステロール分子が含まれており、温度低下による炭化水素鎖の凝集や結晶化（相転移）を回避するとともに、細胞膜の構造的および機能的な安定性を高めている。一方で、コレステロールを含まない細菌などでは、膜の相転移に関しては、環境温度に応じて脂質の脂肪酸組成を調節することで膜の流動性を保っており、細胞表層の物理的安定性に関しても、独自の巧妙なシステムを開発してこれを補っている。

細菌細胞表層の構造

細菌（古細菌および真正細菌）の細胞表層には、ペプチドグリカンと呼ばれる糖の置換体や数種類のアミノ酸からなるヘテロポリマーが存在し、細胞を浸透圧から守っている。大腸菌を始めとするグラム陰性細菌のペプチドグリカン層は、主に単層からなり、細胞壁重量の5-10%を占めるが、枯草菌などのグラム陽性細菌のペプチドグリカン層は、多層構造をとっているためかなり厚く、細胞壁重量の40-90%を占めている。古細菌でもペプチドグリカ

ン層が見出されているが、構成アミノ糖やアミノ酸の種類が真正細菌とは異なる。一方、グラム陰性細菌は、細胞膜（内膜）の外側にさらに別の膜構造（外膜）をもっている。外膜は内膜と同様にリン脂質とタンパク質からなる脂質二重層であるが、それに加えて独特の脂質であるリポ多糖（LPS）を大量に含んでいる。リポ多糖は、外膜の外葉において、完全にリン脂質に取って代わる（図1）。グラム陰性細菌は、外膜構造によりさまざまな毒物に対する抵抗性を増すとともに、膜の外側にあるリポ多糖がヒトのLPSレセプターを介してさまざまな障害を引き起こすことが知られている。さらに、外膜を貫通する蛋白質は、一般の生体膜を貫通する蛋白質とは性質が異なる。一般的に、生体膜蛋白質は、疎水性残基が連続した膜貫通セグメントが α ヘリックスを形成して膜を貫通するのに対して、外膜蛋白質は、疎水性残基が片側に配列する両親媒性の β 構造で膜を貫通する。こうした構造の違いにより、内膜蛋白質は内膜にとどまり、外膜蛋白質は内膜を越えて外膜に運ばれる (Tokuda, 2004)。

N末端のシステインが脂質で修飾されたりポ蛋白質も、あらゆる細菌細胞表層に広く存在する。脂質部分で膜にアンカーして蛋白質部分を親水性の領域に露出しているものが多い(図1)。細菌全ゲノム解析に基づいたリポ蛋白質に関する情報を表1に示す。大腸菌では、約100種類のリポ蛋白質が存在する (Juncker et al., 2003)。その多くは生育に必須でないものの、薬剤排出や形態維持に重要であることが知られている (Bernadac et al., 1998; Drummelsmith and Whitfield, 2000; Lommatzsch et al., 1997; Tikhonova and Zgurskaya, 2004; Yakushi et al., 1997)。ライム病の病原細菌 *Borrelia burgdorferi* は、極めて豊富にリポ蛋白質をもつ (Fraser et al., 1997)。これらリポ蛋白質の中には宿主細胞に免疫応答を引き起こす原因物質となっているものもあり、医学的に重要な蛋白質群となっている。枯草菌 *Bacillus subtilis* には100種類以上のリポ蛋白質が存在している。そのうちの約3割は栄養素の取り込みに重要な機能をもつと考えられている (Tjalsma et al., 1999)。古細菌リポ蛋白質の研究は緒に就いたばかりであるが、古細菌全ゲノムデータベースから分泌蛋白質のシグナルペプチドを解析したところ、リポ蛋白質に特異的なシグナルを有するものが見出された (Albers and Driessen, 2002; Bardy et al., 2003)。*Nantronobacterium pharaonis* では、電子伝達鎖に関係する蛋白質 N末端側の脂質修飾が示唆された (Mattar et al., 1994)。また *Halobacterium salinarum* では、膜局在性の基質結合蛋白質が栄養素の取り込みに関与するリポ蛋白質であることが示された (Kokoeva et al., 2002)。

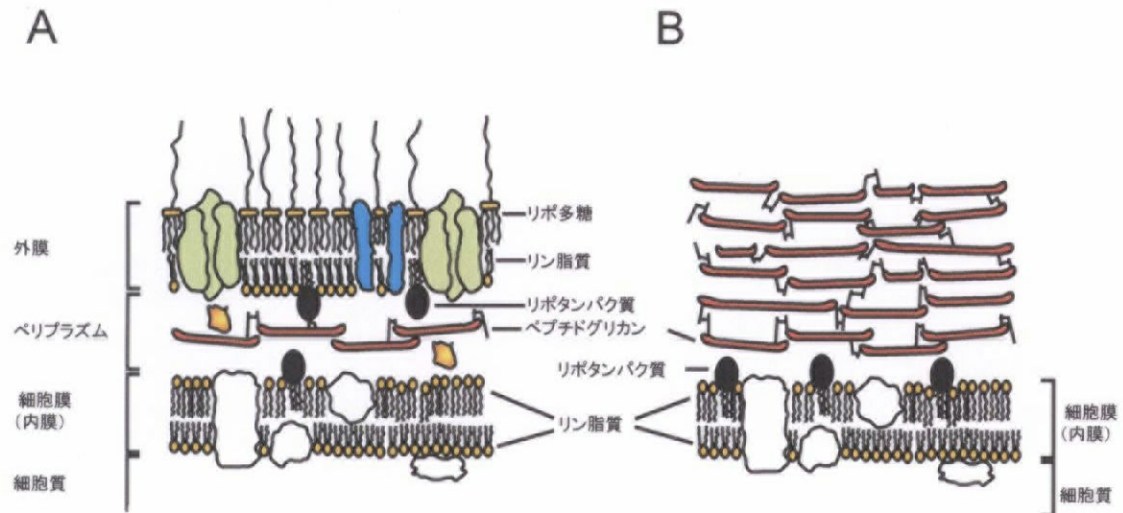


図1 細菌の細胞表層構造

(A) グラム陰性細菌の細胞表層は、細胞膜(内膜)、ペリプラズム空間および外膜からなる。外膜と内膜のペリプラズム側にリポ蛋白質があり、その大部分が外膜に局在する。外膜の外側にはリポ多糖があり、ペリプラズム空間には単層からなるペプチドグリカンが存在する。(B) グラム陽性細菌の細胞表層は、細胞膜(内膜)とペプチドグリカンの多層構造からなり、リポ蛋白質が細胞膜上にある。

表1 細菌全ゲノム解析から得られたリポ蛋白質に関する情報

| 生物種 | ゲノム サイズ (kb) | 蛋白質 遺伝子数 | リポ蛋白質 遺伝子数 | リポ蛋白質 遺伝子の 割合(%) | 文献 |
|---|--------------------|-------------|---------------|------------------------|--|
| 真正細菌 | | | | | |
| グラム陰性細菌 | | | | | |
| 緑膿菌 (<i>P. aeruginosa</i> PAO1) | 6264 | 5567 | 185 | 3.3 | <i>Juncker et al., 2003;</i> <i>Stover et al., 2000</i> |
| 大腸菌 (<i>E. coli</i> K-12) | 4639 | 4288 | 100 | 2.3 | <i>Blattner et al., 1997;</i> <i>Juncker et al., 2003</i> |
| ピロリ菌 (<i>H. pylori</i> 26695) | 1667 | 1590 | 35 | 2.2 | <i>Juncker et al., 2003;</i> <i>Tomb et al., 1997</i> |
| ライム病ボレリア (<i>B. burgdorferi</i> B31) ^b | 1229 | 1283 | 110 | 8.6 | <i>Fraser et al., 1997;</i> <i>Juncker et al., 2003</i> |
| 梅毒トレポネマ (<i>T. pallidum</i>) | 1138 | 1041 | 30 | 2.9 | <i>Fraser et al., 1998;</i> <i>Juncker et al., 2003</i> |
| グラム陽性細菌 | | | | | |
| 枯草菌 (<i>B. subtilis</i>) | 4214 | 4099 | 114 | 2.8 | <i>Kunst et al., 1997</i> <i>Tjalsma et al., 1999;</i> |
| 結核菌 (<i>M. tuberculosis</i>) | 4447 | 3927 | 50 | 1.3 ^a | <i>Fleischmann et al., 2002</i> |
| 黄色ブドウ球菌 (<i>S. aureus</i> N315) | 2813 | 2595 | 53 | 2.0 ^a | <i>Kuroda et al., 2001</i> |
| マイコプラズマ (<i>M. hyopneumoniae</i>) | 892 | 692 | 53 | 7.7 | <i>Minion et al., 2004</i> |
| (<i>M. genitalium</i>) | 580 | 468 | 11 | 2.4 ^a | <i>Fraser et al., 1995</i> |
| 古細菌 | | | | | |
| <i>Archaeoglobus fulgidus</i> | 2178 | 2493 | 1 | 0.04 | <i>Bardy et al., 2003;</i> <i>Klenk et al., 1997</i> |
| <i>Sulfolobus solfataricus</i> | 2992 | 2977 | 2 | 0.07 | <i>Albers and Driessen, 2002;</i> <i>She et al., 2001</i> |
| <i>Pyrococcus horikoshii</i> | 1738 | 2061 | 3-4 | 0.15-0.19 | <i>Bardy et al., 2003;</i> <i>Kawarabayasi et al., 1998</i> |
| <i>Aeropyrum pernix</i> | 1669 | 2,694 | 8 | 0.3 | <i>Kawarabayasi et al., 1999</i> |
| <i>Methanococcus jannaschii</i> | 1664 | 1750 | — | — | <i>Bult et al., 1996</i> |

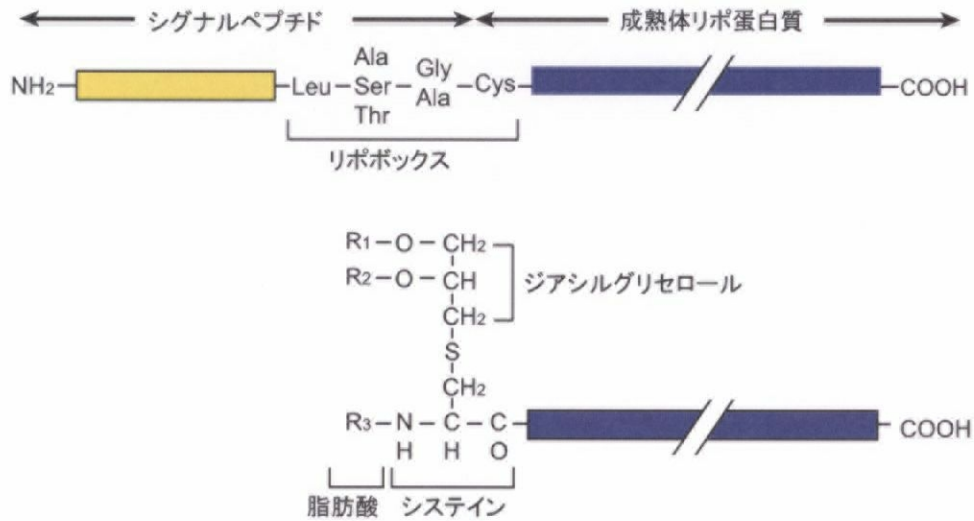
^a結核菌、黄色ブドウ球菌、マイコプラズマ (*M. genitalium*) の蛋白質遺伝子数およびリポ蛋白質遺伝子数は、DOLOP (A Database of Bacterial Lipoproteins) (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/dolop/>)のサイトから引用した; ^bライム病ボレリアのゲノム解析は、プラスミドDNAも含めて行った。

細菌細胞表層の生合成

細菌細胞表層に存在する蛋白質は全て細胞質で合成され、細胞質膜或いは細胞質膜と外膜の両方を越えてそれぞれの場所に運ばれる。ペプチドグリカンの場合、細胞膜の内側で5個のアミノ酸が結合したN-アセチルムラミン酸 (MurNAc- penta AA) がウンデカプレノール (Und) と結合し、続いてN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が付加されて Lipid II 前駆体 (Und-ペプチドグリカン単量体) となる。Lipid II 前駆体は細胞膜の外側に輸送され (輸送機構は不明)、架橋により重合してペプチドグリカン鎖を形成する (Ha et al., 2000; Holtje, 1998; van den Brink-van der Laan et al., 2003)。一方、細胞膜の内側で合成された LPS やリン脂質を細胞膜の外側へ輸送する機構については、LPS の場合、特定の輸送体として MsbA (ABC トランスポーター) を要求するのに対して、リン脂質においては、MsbA のような特定の輸送体ではなく一般的な細胞膜蛋白質の α ヘリックス構造を要求すると考えられている (Doerfler et al., 2004; Kol et al., 2003; Zhou et al., 1998)。両方とも、ペリプラズム空間を横断する機構については不明であるが、外膜の内側に挿入された LPS を外膜の外側に運ぶフリッパーゼの報告がなされた (Bos et al., 2004; Bos and Tommassen, 2004)。外膜蛋白質は、シグナルペプチドをもつ前駆体として細胞質で合成され、Sec 膜透過装置によって内膜を透過する (de Keyser et al., 2003)。内膜を透過した外膜蛋白質は、水溶性のペリプラズム空間にあるシャペロン蛋白質を介して外膜に局在化する経路が支持されている (Eppens et al., 1997; Harms et al., 2001; Kadokura et al., 2003; Rouviere and Gross, 1996; Voulhoux et al., 2003)。

外膜蛋白質と同様に、リポ蛋白質はシグナルペプチドをもつ前駆体として細胞質で合成され、Sec 膜透過装置によって内膜を透過する (Hayashi and Wu, 1990; Pugsley, 1993)。その後、内膜上での連続的な触媒反応により成熟体リポ蛋白質となる (図 2) (Sankaran and Wu, 1994)。成熟体リポ蛋白質のうち、+2 位がアスパラギン酸以外のリポ蛋白質は、ABC トランスポーター (LolCDE) の ATP 加水分解エネルギーを利用して内膜から遊離する (Yakushi et al., 2000; Yakushi et al., 1998)。一方で、+2 位がアスパラギン酸であるリポ蛋白質は LolCDE による認識を回避して内膜に留まる (+2 位ルール) (Masuda et al., 2002; Seydel et al., 1999; Terada et al., 2001; Yamaguchi et al., 1988)。リポ蛋白質は内膜に留まるか外膜に運搬されるかにかかわらず、共通の経路を介して成熟体となり、そのうちの大部分が外膜のペリプラズム側に、一部が内

A



B

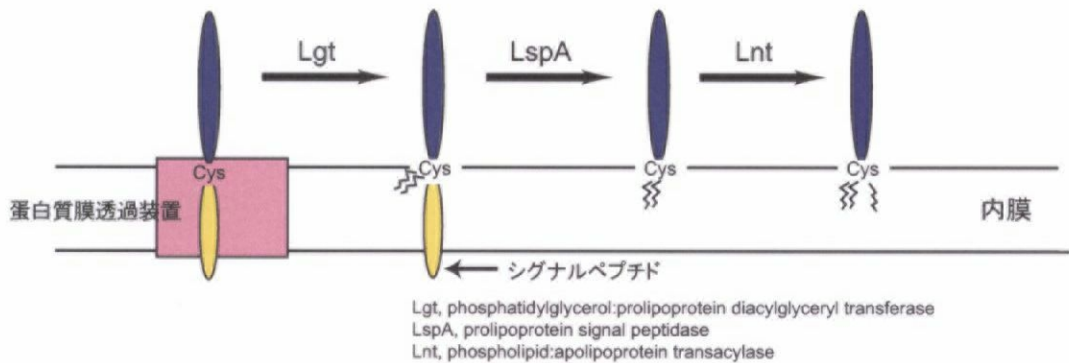


図2 リポ蛋白質の生合成

(A) 前駆体リポ蛋白質 (上) および成熟体リポ蛋白質 (下) の構造。シグナルペプチドの切断領域には、リポボックスと呼ばれる共通配列(L・A/S・G/A・C)が存在する。(B) 大腸菌リポ蛋白質はシグナルペプチドをもつ前駆体として細胞質で合成され、Sec 膜透過装置によって内膜を透過する。リポボックス配列を酵素 Lgt が認識してジアシルグリセロールを付加する。続いてリポ蛋白質特異的シグナルペプチダーゼ LspA が、ジアシルグリセロールで修飾されたリポ蛋白質前駆体を認識してシグナルペプチドを切断する。切断により新たにN末端となったシステイン残基に酵素 Lnt によって脂肪酸が付加されて成熟体リポ蛋白質となる

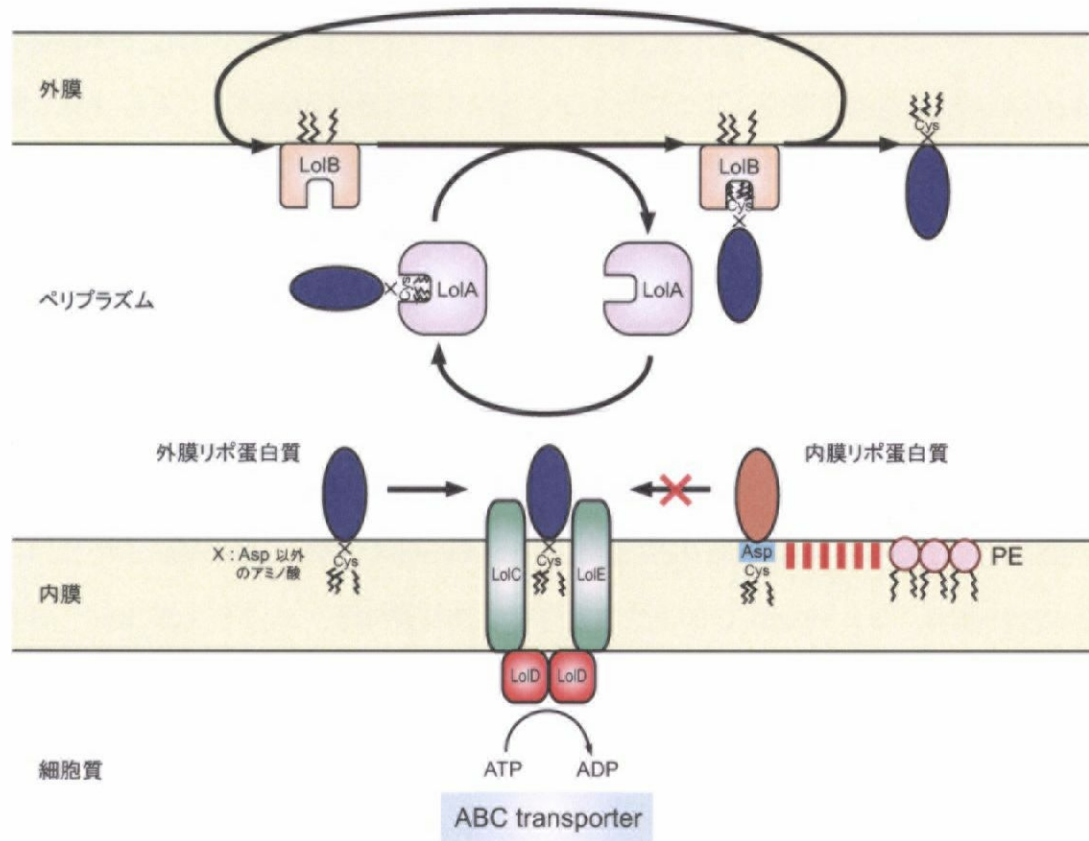


図3 Lol システムによるリポ蛋白質の選別輸送

内膜上で成熟体となった外膜リポ蛋白質は、ABC トランスポーター LolCDE の ATP 加水分解エネルギーを利用して内膜から遊離する。遊離した外膜リポ蛋白質はペリプラズムに局在するシャペロン蛋白質 LolA と複合体を形成した後、外膜に局在する受容体蛋白質 LolB に受け渡され、外膜に挿入される。+2位がアスパラギン酸である内膜リポ蛋白質は PE との相互作用を介して内膜に留まると考えられている。

膜のペリプラズム側に局在する (Fukuda et al., 2002)。内膜リポ蛋白質は大腸菌の主要なリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE) と強く相互作用して内膜に留まると考えられている (Hara et al., 2003)。また、内膜リポ蛋白質を外膜に輸送する変異 LolC(A40P)DE の解析から、基質の選別には LolCDE 複合体の安定な構造が重要であることが示唆された (Narita et al., 2003)。LolCDE を介して内膜から遊離した外膜リポ蛋白質は、ペリプラズム蛋白質 LolA と 1 : 1 の水溶性複合体を形成してペリプラズム空間を通過し (Matsuyama et al., 1995)、外膜に存在する受容体蛋白質 LolB により外膜に組み込まれる (図 3) (Matsuyama et al., 1997; Yokota et al., 1999)。大腸菌におけるリポ蛋白質の局在は Lol システムにより厳密に制御されており、リポ蛋白質が誤った場所に局在すると、菌は致死的な影響を受ける。したがって、当研究室において同定された 5 種類の Lol 因子 (A、B、C、D、E) は全て大腸菌において必須である (Narita et al., 2002; Tajima et al., 1998; Tanaka et al., 2001)。LolA および LolB については、既に結晶構造が解明されており (Takeda et al., 2003)、変異体による機能解析が行われた (Miyamoto et al., 2001; Miyamoto et al., 2002; Wada et al., 2004)。一方で、LolCDE については、LolC および LolE の膜内配向性が解析されたものの (Iguchi et al., unpublished results)、分子機構についてはほとんど不明である。

細菌型 ABC トランスポーター

細菌細胞膜上の主要な膜輸送蛋白質は、チャネルとトランスポーターの 2 つに分類される。チャネルは膜を貫通する親水性の小孔を形成して、電荷をもった無機イオンの受動輸送 (濃度勾配にしたがった物質輸送) を行う。一方、トランスポーターは、膜に挿入された蛋白質の構造変化を伴って、エネルギー源と共役した物質の能動輸送 (濃度勾配に逆らった物質輸送) を行う。トランスポーターはさらに、エネルギー源として ATP 加水分解エネルギーを利用するもの (ABC トランスポーターおよび P-type ATPase) と、膜内外に形成されたプロトン駆動力を利用するものとに分類される。膜輸送蛋白質は、あらゆる細胞において膜蛋白質の 15-30% を占める重要な蛋白質群であり、基本的な分子構造が広く保存されている (Abramson et al., 2003)。

ヒトでは 48 個、大腸菌では 80 個もの ABC 輸送体が存在する (表 2)。ABC 輸送体スーパ

表2 全ゲノム解析から得られた ABC 蛋白質に関する情報

| 生物種 | ゲノムサイズ (kb) (1-倍体ゲノム) | 蛋白質 遺伝子数 | ABC 蛋白質 遺伝子数 | ABC 蛋白質 遺伝子 の割合 (%) | 文献 |
|--|--------------------------|-------------|-----------------|---------------------------|---|
| マイコプラズマ (<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>) | 820 | 677 | 34 | 5 | <i>Minion et al., 2004</i> |
| 大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) | 4,639 | 4,288 | 80 | 1.8 | <i>Blattner et al., 1997</i> |
| 酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) | 12,069 | 約6,300 | 28 ^a | 0.4 | <i>Bruce Alberts et al., Molecular Biology of THE CELL, Fourth Edition.</i> |
| 線虫 (<i>Caenorhabditis elegans</i>) | 約97,000 | 約19,000 | 58 | 0.3 | <i>Shitan and Yazaki, 2004</i> |
| ハエ (<i>Drosophila melanogaster</i>) | 約137,000 | 約14,000 | 56 | 0.4 | <i>Shitan and Yazaki, 2004</i> |
| シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) | 約142,000 | 約25,500 | 131 | 0.5 | <i>Shitan and Yazaki, 2004</i> |
| ヒト (<i>Homo sapiens</i>) | 約3,200,000 | 約30,000 | 49 | 0.2 | <i>Ueda, 2004; Bruce Alberts et al., Molecular Biology of THE CELL, Fourth Edition.</i> |

^a ABC Systems : functional and phylogenic studies
(<http://www.pasteur.fr/recherche/unites/pmtg/abc/index.html>) より引用した。

一ファミリーは生物最大の蛋白質ファミリーであり、細胞膜やオルガネラ膜を介したさまざまな構造の物質輸送を触媒する。細菌型 ABC 輸送体の研究は、栄養分を細胞内に輸送するマルトース輸送体 (MalFGK₂) やヒスチジンパーミアーゼ (HisQMP₂) の研究を中心として発展した (Ames, 1990; Dean et al., 1990; Gilson et al., 1982)。これらの輸送体は、基質との高い親和性をもつ基質結合蛋白質を介した物質輸送を行う。基質結合蛋白質は、グラム陰性細菌ではペリプラズムの可溶性蛋白質であり (Sharff et al., 1992; Spurlino et al., 1991)、グラム陽性細菌では細胞膜上のリポ蛋白質或いは輸送体との融合蛋白質がこれに代わる (Tjalsma et al., 1999; van der Heide and Poolman, 2002)。一方で、真核型 ABC 輸送体の研究は、ヒト癌細胞の多剤耐性にかかわる蛋白質 (P 糖蛋白質) が、細菌の MalFGK₂ 等とホモロジーを有していたことに端を発する (Chen et al., 1986; Gros et al., 1986)。P 糖蛋白質は、細胞に投与された化学療法剤を細胞外へ排出してしまうため、癌治療の問題となっている (Horio et al., 1988)。癌細胞の多剤耐性以外にも、ヒト ABC 輸送体に関係するさまざまな疾病 (タンジール病、高脂血症、糖尿病、嚢胞性繊維症等) が報告されており、ABC システムの解明は、臨床医学との関連からも極めて重要である (Allikmets et al., 1997; Holland and Blight, 1999; Rich et al., 1990; Thomas et al., 1995)。尚、ABC ファミリーの分類データベース (<http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/>) によれば、細菌型は、取り込み系として22個、排出系として24個のサブファミリーに分類され、真核型は、10個のサブファミリーすべてが排出系に分類されている。

ABC 輸送体の基本的な構造は、膜を貫通する2つのドメイン (MSD) と ATP を結合・加水分解する2つのドメイン (NBD) から成る。真核生物では1本のポリペプチドにすべてのドメインが含まれているものが一般的であるのに対して、細菌では、4つのドメインがそれぞれのサブユニットに分かれていることが多い (Saurin et al., 1999)。異なるサブファミリーを比較すると、MSD の保存は見出せないが、あらゆる NBD において、Walker モチーフ (A、B) と Signature モチーフが保存されている。Walker モチーフは広く ATPase で重要な領域であり、一方、Signature モチーフは ABC 蛋白質に特徴的な配列である。NBD が ATP と結合すると、Walker A モチーフと Signature モチーフが対になって ATP を挟み込み、NBD のサンドイッチダイマー構造を形成する (図4) (Davidson and Chen, 2004)。NBD がダイマーになると、ATPase 活性が相乗的に高まることが知られている (Janas et al., 2003; Nikaido et al., 1997)。

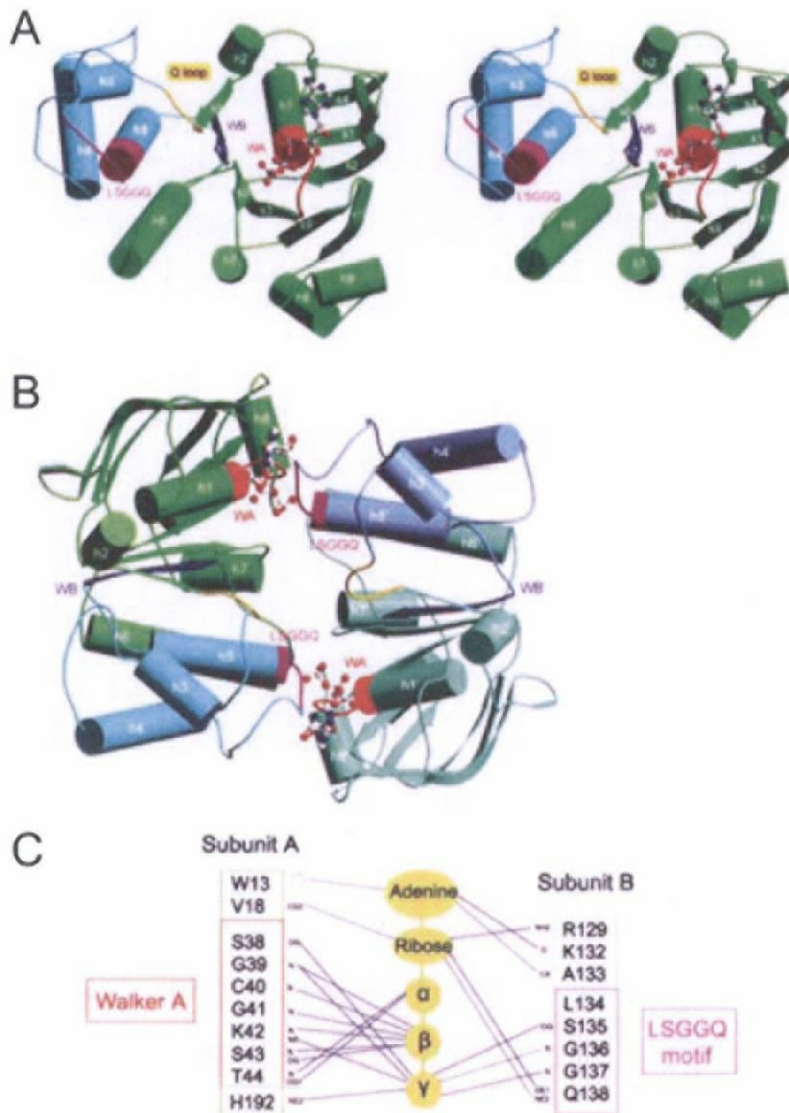


図4 ATP結合型 MalK(大腸菌)のNBD(1-235aa)構造 (Davidson and Chen, 2004)
 (A) NBDモノマーの構造。RecA-likeドメインを緑、ヘリカルサブドメインを水色で示した。重要なモチーフについても色分けした; Walker A(赤)、LSGGQ(Signature)(紫)、Walker B(青)、Qループ(黄)。ATPはボール&スティックモデルで表した(酸素原子(赤)、窒素原子(青))。(B) NBDホモダイマーの構造。識別のため、ホモダイマーの一方の分子を淡色で示した。ホモダイマーあたり2分子のATPを結合してサンドイッチダイマー構造を形成する。(C) ATPを介したNBDどうしの相互作用。ホモダイマーの各々をサブユニットA、Bとする。サブユニットAのWalker AモチーフとサブユニットBのLSGGQ(Signature)モチーフとが対になってATPと結合する。

NBDの結晶構造解析から、ATPを介したNBDどうしの相互作用が明らかとなったが、ABC輸送システムの全容を解明するためには、NBDとMSDとの相互作用、並びにMSDどうしの相互作用を明らかとする必要がある。そこで、MSDを含めたABC蛋白質全体の構造として、ビタミンB₁₂を輸送するBtuCD、LPSを輸送するMsbAの構造が報告された(図5)。ところが、BtuCD(大腸菌)(Locher et al., 2002)、MsbA(大腸菌)(Chang and Roth, 2001)、およびMsbA(コレラ菌)(Chang, 2003)の3つ構造は全て異なり、現在はBtuCDのみが生理的な機能を反映した構造であると考えられている。MsbA(大腸菌)では、NBDのSignatureモチーフが外側に向いており、ダイマーのインターフェイス側を向いていない。MsbA(コレラ菌)では、Signatureモチーフは内側に向いているものの、通常きちんとパッキングされるRecA-likeドメイン(図5-Dの緑色部分)の一部を欠き、さらにRecA-likeドメインとHelicalサブドメイン(図5-Dの青色部分)とが著しく離れた位置にあるために、通常のNBDダイマー構造をとっていない。MsbA(大腸菌)およびMsbA(コレラ菌)の構造を、異なる輸送反応の中間体とする説もあるが、外側に向いたSignatureモチーフを内側に向かせるためには、ICD(図5-C, Dの赤色部分)領域を中心として最大120度もの回転を要するため、2つのMsbA構造をもとにした輸送反応モデルの構築には無理があると言える。

BtuCDのATPaseサブユニット(BtuD)と膜サブユニット(BtuC)との境界面では、ATPaseサブユニットから突き出たQループと膜サブユニットから突き出たLループが近接している(図5-B)。Qループは、ループ中央のグルタミン残基が保存されていることからQループと呼ばれる。一方、Lループは、ループ中央にグリシン残基が保存されているが、ループの形がL字型に見えることからLループと呼ばれる(Locher et al., 2002)。QループはMSDと接触するだけでなく、中央のグルタミン残基はATP加水分解に必須のマグネシウム(ATPのP(γ)に近接)にも結合することから(Davidson and Chen, 2004)、NBDのATP結合・加水分解で生じるQループの構造変化はすぐにMSDに伝わる。ゆえに、QループはATPの結合・加水分解に共役したMSD領域の構造変化を引き起こす重要な領域であると考えられる。すべてのNBD(BtuDを除く)立体構造において、柔軟性に富むQループは失われているが、本欠損部分はいずれもNBD分子表面上にあり、Qループを介した物質輸送の機構が広くABC輸送体で保存されていることを示唆している。一方で、Qループ周辺のアミノ酸配列は保存が極めて低いが、このことは、他の細菌型ABC輸送体のMSDとの誤った複合体形成を防ぐ

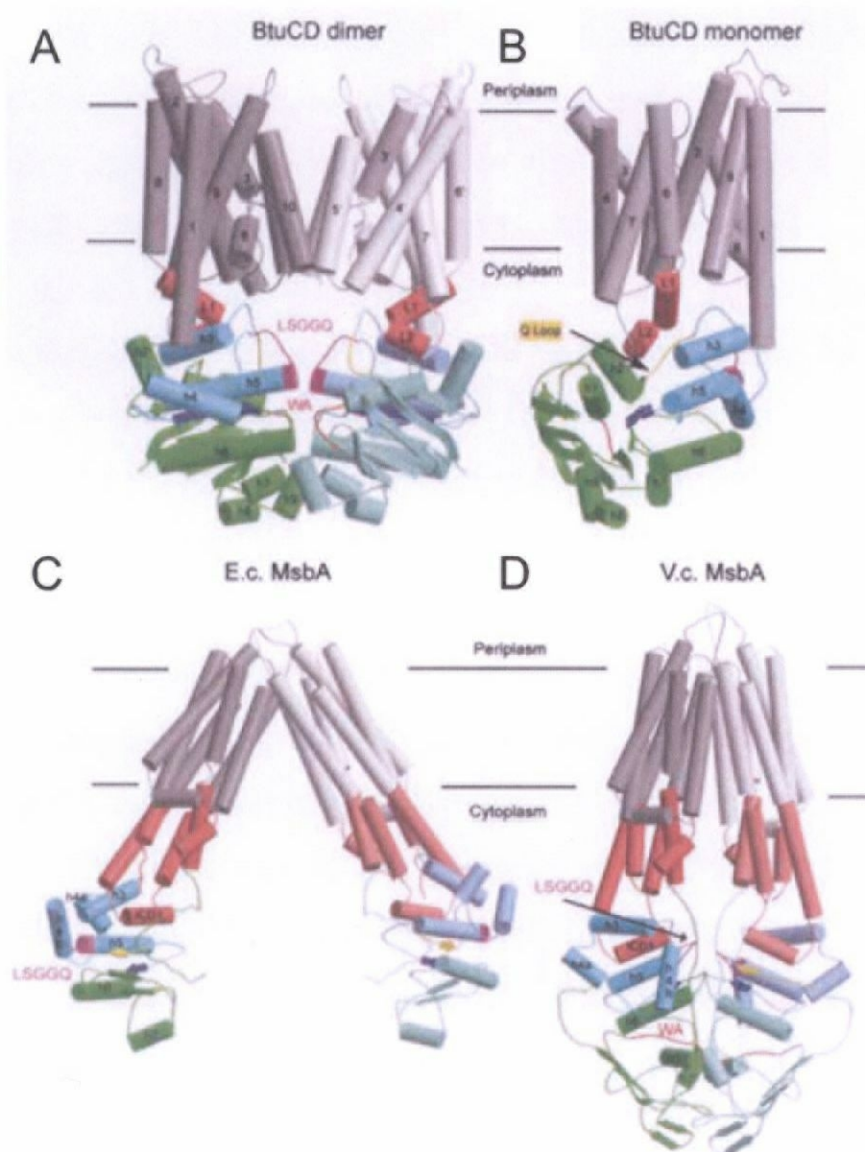


図5 ABCトランスポーター全体の構造 (Davidson and Chen, 2004)

(A) ビタミンB₁₂ 輸送体 (BtuCD) のダイマー構造。BtuC を灰色、BtuC からサイトゾルに突き出したループ (L ループ) を橙色、BtuD については図4と同様に示した。(B) BtuCD モノマーの構造。色分けは (A) と同様に示した。BtuC の L ループと BtuD の Q ループが近接している。(C) 大腸菌 MsbA のダイマー構造。MSDsを灰色、ICD (Intracellular domain)を橙色で示した。NBDsについては蛋白質二次構造に基づいて図4と同様に示したが、立体構造は図4と著しく異なる。(D) コレラ菌 MsbA のダイマー構造。色分けは (C) と同様に示した。

効果があると考えられている。

LolCDE は、膜サブユニット (LolC、LolE) および ATPase サブユニット (LolD) が、C : D : E = 1 : 2 : 1 から成る典型的な細菌型 ABC トランスポーターである。これまでに明らかとされた NBD 結晶構造 (細菌型取り込み系から 5 個 (Chen et al., 2003; Diederichs et al., 2000; Hung et al., 1998; Karpowich et al., 2001; Verdon et al., 2003)、細菌型排出系から 2 個 (2 つの MsbA を除く) (Schmitt et al., 2003; Smith et al., 2002; Yuan et al., 2001)、真核型から 1 個 (Gaudet and Wiley, 2001)) をみると、異なるサブファミリーであっても非常によく似た構造をとっている。LolD のホモログ蛋白質 MJ0796 (相同性 43.7%) の結晶構造 (Smith et al., 2002; Yuan et al., 2001) も、広く知られた NBD 構造とほぼ同じであることから、LolD の構造的特徴はこれまでに報告された ABC 蛋白質と共通と考えられる。さらに LolCDE には、ATPase 活性に重要な Walker モチーフや Signature モチーフ、および Q ループのグルタミン残基が保存されているので、ATP の結合・加水分解、並びに加水分解と物質輸送の共役機構も、これまでに報告された ABC 蛋白質と共通であると考えている。一方で、これまでに明らかとされた MSD のトポロジー構造をみると、他の ABC 蛋白質の膜貫通領域が平均して 10 - 16 本であるのに対して、LolCDE の膜貫通領域は合計 8 本と非常に少ない。また LolCDE と同じ排出系に分類される ABC 輸送体では、親水性の基質を膜横断的に輸送するものや、疎水性の基質を細胞膜内葉から認識して細胞膜外葉或いは細胞の外へ運ぶものなどは知られているが (Bolhuis et al., 1996; Shapiro and Ling, 1997)、LolCDE のように細胞膜外葉にアンカーした基質を膜から遊離させる報告はない。LolCDE は、ABC システムに共通した ATP 加水分解機構を利用するが、基質輸送に関しては ABC システムの多様な性質を特に反映していると考えられる。

本研究では、Lol システムの解明を目指して、LolCDE の触媒機構を分子レベルで解析した。本論文の結果前半では、本実験過程において、基質を特異的に結合した LolCDE 複合体 (基質結合型 LolCDE) を機能的な中間体として単離したこと (数多くの ABC 蛋白質の中で、基質との複合体として単離された初めての例である。)、および単離した基質結合型 LolCDE と ATPase 活性を損なった LolCDE 変異体を用いて行った解析を中心に述べる。本論文の結果後半では、LolD の機能ドメインの一つである「LolD モチーフ (Q ループ領域を含む)」につい

での解析を中心に述べる。考察では、本実験にもとづいて LolCDE の触媒機構モデルを構築し、これまでに報告された ABC 蛋白質との共通性および本モデルの意義について議論する。さらに「LolD モチーフ」の解析を通して、膜サブユニットと ATPase サブユニットとの相互作用および情報伝達における役割について考察する。本論文は、膜サブユニットにおける基質の結合・解離の各反応と、ATPase サブユニットにおける ATP の結合・加水分解の各反応とが、いかなる順序で、またどのように連携しあっているのかに関する重要な情報を提出するものである。

2. 材料と実験方法

菌株・培地

本研究に使用した大腸菌と遺伝子型は表3に示した。

大腸菌の培養には、栄養培地 (L-broth) [0.5% (w/v) 酵母エキス、1.0% (w/v) トリプトン、0.5% (w/v) NaCl] を用いた。培養は菌株に応じて 30°C もしくは 37°C で行った。寒天培地には 1.5% (w/v) 寒天を加えたものを使用した。液体培地は、特に記載がない限り 5 mL のものを使用した。クロラムフェニコールおよびアンピシリンはそれぞれ 25 µg/mL、50 µg/mL で使用した。

プラスミド

pTTQ18 (Amersham) は *Ptac* プロモーター、*lacI* 遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子などを持つ。pMAN885EH (Yakushi et al., 1997) は *PBAD* プロモーター、*araC* 遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子などを持つ。pKM203 (Masuda et al., 2002) は、pTTQ18 の *Ptac* プロモーター下流に *lolD-His* (*lolD_H*) 遺伝子がおかれている。pKM402 (Masuda et al., 2002) は、pMAN885EH の *PBAD* プロモーター下流に *lolCD_H* 遺伝子がおかれている。pKM301 (Masuda et al., 2002) は、*Ptac* プロモーター下流に *lolE* 遺伝子がおかれている。pTAN21 は *Ptac* プロモーター下流に *pal* 遺伝子が置かれている。大腸菌プラスミドの抽出は、QIAprep (QIAGEN) を使用した。

コンピテントセルの調製

大腸菌を L-broth 液体培地に植菌して 37°C で一晩培養した。新しい L-broth 液体培地に 100 倍希釈となるように植菌して、37°C で $OD_{660} = 0.4$ となるまで培養後、9,000×g、5 分間、4°C で遠心し、ペレットを 2 mL の 0.1 M $MgCl_2$ で穏やかに懸濁した。9,000×g、5 分間、4°C で遠心後、ペレットを 2 mL の 0.1 M $CaCl_2$ で穏やかに懸濁し、氷上で 30 分以上静置した。9,000×g、5 分間、4°C で遠心後、ペレットを 0.3 mL の 0.1 M $CaCl_2$ で穏やかに懸濁し、50 µL ずつ

表3 使用した大腸菌

| 菌株 | 遺伝子型 | 文献 |
|--------------|---|---|
| DH5 α | <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> [Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15] <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> | <i>Sambrook et al., Molecular Cloning 2nd edition</i> |
| DLP79-36 | <i>HfrC pps man lpp</i> | <i>Terada et al., 2001</i> |
| DLP79-22 | <i>HfrC pps man</i> | <i>Terada et al., 2001</i> |
| JC7752 | <i>supE</i> <i>hsdS</i> <i>met</i> <i>gal</i> <i>lacY</i> <i>fhuA</i> Δ <i>tolB-pal</i> | <i>Bouveret et al., 1995</i> |
| JE5505 | F ⁻ <i>lpp</i> <i>pps</i> <i>his</i> <i>proA</i> <i>argE</i> <i>thi</i> <i>gal</i> <i>lac</i> <i>xyl</i> <i>mtl</i> <i>tsx</i> | <i>Suzuki et al., 1978;</i> <i>Hirota et al., 1977</i> |
| JE5506 | F ⁻ <i>pps</i> <i>his</i> <i>proA</i> <i>argE</i> <i>thi</i> <i>gal</i> <i>lac</i> <i>xyl</i> <i>mtl</i> <i>tsx</i> | <i>Suzuki et al., 1978;</i> <i>Hirota et al., 1977</i> |
| JM83 | F ⁻ <i>ara</i> Δ [<i>lac-proAB</i>] <i>rpsL</i> [Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15] | <i>Yanisch-Perron et al., 1985</i> |
| JM109 | <i>recA1</i> <i>supE44</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>thi</i> Δ [<i>lac-proAB</i>] F' [<i>traD36</i> <i>proAB</i> ⁺ <i>lac</i> ⁺ <i>lacZ</i> Δ M15] | <i>Sambrook et al., Molecular Cloning 2nd edition</i> |
| MC4100 | F ⁻ Δ <i>lacU169</i> <i>araD</i> <i>relA</i> <i>rpsL</i> <i>thi</i> <i>fibB</i> | <i>Casadaban, 1976</i> |
| XL1-Blue | <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA46</i> <i>thi</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> ⁻ F' [<i>proAB</i> ⁺ <i>lac</i> ⁺ <i>lacZ</i> Δ M15::Tn10(<i>tef</i> ^r)] | <i>Sambrook et al., Molecular Cloning 2nd edition</i> |

分注した。

形質転換

プラスミド DNA 溶液をコンピテントセル溶液 (50 μ L) の 1/10 量注入し氷上で 30 分間静置した。42 $^{\circ}$ C、40 秒間の熱処理を行い、すぐに氷上に戻して 2 分後に、保温した L-broth 液体培地を 0.5 mL 加えた。30 $^{\circ}$ C 或いは 37 $^{\circ}$ C で 1 時間培養後、適当量をプレートに塗布した。

DNA アガロースゲル電気泳動

0.7%アガロースゲル / 1 \times TAE (0.04 M Tris-HCl, 0.02 M 酢酸, 1 mM EDTA, pH 8.0) を、1 \times TAE の入った泳動槽にいれ、10 \times ローディングバッファー (TAKARA 社) を加えた DNA サンプル液をアプライして 100 V で泳動した。ゲルをエチジウムブロマイドで染色して、UV トランスイルミネーターで検出した。

lolD_H 遺伝子への部位特異的ランダム変異の導入

lolD_H 遺伝子への部位特異的ランダム変異の導入は QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE) を用いて以下の方法で行った。

変異を導入するプラスミド pKM203 (Ptac-*lolD_H*) とランダム変異プライマー (表 4) を含む 50 μ L の PCR 反応液 [pKM203 (5-50 ng)、forward primer (125 ng)、reverse primer (125 ng)、10 \times reaction buffer、dNTP mix (2.5 nmol each)、*Pfu Turbo* DNA polymerase (2.5 U)] を調製した。PCR 反応は、95 $^{\circ}$ C、30 秒間の変性後、変性 95 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、アニーリング 55 $^{\circ}$ C \cdot 1 分、伸張 68 $^{\circ}$ C \cdot 10 分 (1 kb あたり 2 分) を 16 回繰り返して増幅を行った。反応液 10 μ L に対して DNA アガロース電気泳動を行い、増幅フラグメントが一本であることを確認した後、残りの反応液 40 μ L に、0.5 μ L の *DpnI* (20 U/ μ L) を用いて 37 $^{\circ}$ C \cdot 1 h のインキュベーションを行って、メチル化された鋳型 DNA を切断し、変異の入った 2 本鎖 DNA のみを取得した。この 2 本鎖 DNA 溶液 4 μ L を用いて 50 μ L XL1-Blue コンピテントセルを形質転換した後、LB (50 μ g/mL Ap, 12.5

表4 使用したプライマー

| 名称 | 配列 | 用途 |
|----------|---|--|
| pTTQ18-2 | 5'-gtataatgtgtggaattgtgagcgg-3' | Ptac- <i>lolD_H</i> シークエンス (Ptac 側) |
| pMAN885N | 5'-cgtctgtgccataagccaggcaagg-3' | PBAD- <i>lolCD_H</i> シークエンス (PBAD 側) |
| pMAN885C | 5'-cgacgttgtaaacgacggccagt-3' | <i>lolD_H</i> シークエンス (His-tag 側) |
| Sp1-f | 5'-tgaatattgaggatgcctcgcgtct-3' | <i>lolCD_H</i> シークエンス (608-632, forward) |
| Sp1-r | 5'-cttaatgagtcgactttcagcggct-3' | <i>lolCD_H</i> シークエンス (683-707, reverse) |
| Sp2-f | 5'-caggaagcagctgtgcaaaccgatg-3' | <i>lolCD_H</i> シークエンス (1238-1260, forward) |
| Sp2-r | 5'-ttttaccggaaccagactaccgac-3' | <i>lolCD_H</i> シークエンス (1313-1337, reverse) |
| Sp3-f | 5'-ctcgatgcgcgtaacgccgacagca-3' | <i>lolCD_H</i> シークエンス (1718-1742, forward) |
| Sp3-r | 5'-tgaccagcgccatcaccgagggt-3' | <i>lolCD_H</i> シークエンス (103-127, reverse) |
| Sp4-f | 5'-taatcgcggtgatcaaatccgcgtg-3' | <i>lolCD_H</i> シークエンス (468-492, forward) |
| Sp5-f | 5'-acgctttacccttcatggcgcgtg-3' | <i>lolCD_H</i> シークエンス (1138-1162, forward) |
| K48M-f | 5'-tcggtagctctggttccggatgagctaccttgcacacctgct-3' | Ptac- <i>lolD_H</i> (K48M) |
| K48M-r | 5'-agcaggtgcagcaaggtactcataccggaaccagactaccga-3' | |
| E171Q-f | 5'-cgcgcctggactgaggatcagcctaccggtaacctcgatgc-3' | Ptac- <i>lolD_H</i> (E171Q) |
| E171Q-r | 5'-gcatcgaggttaccggtaggtgatccgccagtaccaggcgcg-3' | |
| L84-f | 5'-cgtcggcagcgaagctgaaNNNcgcaaccagaagctgggctt-3' | Ptac- <i>lolD_H</i> (L84X) |
| L84-r | 5'-aagcccagcttctggttgcgNNNttcagctttcgctgccgacg-3' | |
| R85-f | 5'-cggcagcgaagctgaactgNNNaaccagaagctgggctttat-3' | Ptac- <i>lolD_H</i> (R85X) |
| R85-r | 5'-ataaagcccagcttctggttNNNcagttcagctttcgctgccg-3' | |
| N86-f | 5'-cagcgaagctgaactgcgcnNNNcagaagctgggctttattta-3' | Ptac- <i>lolD_H</i> (N86X) |
| N86-r | 5'-taataaagcccagcttctgNNNgcgcagttcagctttcgctg-3' | |
| Q87-f | 5'-cgaaagctgaactgcaacNNNaagctgggctttatttatca-3' | Ptac- <i>lolD_H</i> (Q87X) |
| Q87-r | 5'-tgataaataaagcccagcttNNNggttgcgagttcagctttcg-3' | |
| K88-f | 5'-aagctgaactgcaaccagNNNctgggctttatttatcagtt-3' | Ptac- <i>lolD_H</i> (K88X) |
| K88-r | 5'-aactgataaataaagcccagNNNctgggtgcaagttcagctt-3' | |
| L89-f | 5'-ctgaactgcaaccagaagNNNggctttatttatcagtttca-3' | Ptac- <i>lolD_H</i> (L89X) |
| L89-r | 5'-tgaaactgataaataaagccNNNcttctggttgcaagttcag-3' | |

| 名称 | 配列 | 用途 |
|------------------|--|---------------------------------------|
| G90-f G90-r | 5'-aactgcgcaaccagaagctgNNNtttatttaccagtttcacca-3' 5'-tggtgaaactgataaataaaaNNNcagcttctggttgcgagtt-3' | Ptac- <i>loID_H</i> (G90X) |
| F91-f F91-r | 5'-tgcgcaaccagaagctgggcNNNatttaccagtttcaccacct-3' 5'-agggtggtgaaactgataaataaaaNNNcccagcttctggttgcgca-3' | Ptac- <i>loID_H</i> (F91X) |
| I92-f I92-r | 5'-gcaaccagaagctgggctttNNNtatcagtttcaccacctgct-3' 5'-agcaggtggtgaaactgataNNNaaagcccagcttctggttgc-3' | Ptac- <i>loID_H</i> (I92X) |
| Y93-f Y93-r | 5'-accagaagctgggctttattNNNcagtttcaccacctgctgcc-3' 5'-ggcagcaggtggtgaaactgNNNaataaagcccagcttctgggt-3' | Ptac- <i>loID_H</i> (Y93X) |
| Q94-f Q94-r | 5'-agaagctgggctttatttNNNtttaccacctgctgccgga-3' 5'-tccggcagcaggtggtgaaaNNNataaataaagcccagcttct-3' | Ptac- <i>loID_H</i> (Q94X) |
| F95-f F95-r | 5'-agctgggctttatttaccagNNNcaccacctgctgccggattt-3' 5'-aaatccggcagcaggtggtgNNNctgataaataaagcccagct-3' | Ptac- <i>loID_H</i> (F95X) |
| H96-f H96-r | 5'-tgggctttatttaccagtttNNNcactgctgccggattttac-3' 5'-gtaaaatccggcagcaggtgNNNaactgataaataaagccca-3' | Ptac- <i>loID_H</i> (H96X) |
| H97-f H97-r | 5'-gctttatttaccagtttcacNNNctgctgccggattttaccgc-3' 5'-gcggtaaaaatccggcagcagNNNgtgaaactgataaataaagc-3' | Ptac- <i>loID_H</i> (H97X) |
| L98-f L98-r | 5'-ttatttaccagtttcaccacNNNctgcccggattttaccgccct-3' 5'-agggcggtaaaaatccggcagNNNgtggtgaaactgataaataa-3' | Ptac- <i>loID_H</i> (L98X) |
| L99-f L99-r | 5'-tttaccagtttcaccacctgNNNcccggattttaccgccctgga-3' 5'-tccagggcggtaaaaatccggNNNcaggtggtgaaactgataa-3' | Ptac- <i>loID_H</i> (L99X) |
| P100-f P100-r | 5'-atcagtttcaccacctgctgNNNgattttaccgccctggaaaa-3' 5'-ttttccagggcggtaaaaatcNNNcagcaggtggtgaaactgat-3' | Ptac- <i>loID_H</i> (P100X) |
| D101-f D101-r | 5'-agtttcaccacctgctgccgNNNtttaccgccctggaaaact-3' 5'-acgttttccagggcggtaaaaNNNcggcagcaggtggtgaaact-3' | Ptac- <i>loID_H</i> (D101X) |
| F102-f F102-r | 5'-ttcaccacctgctgccgatNNNaccgccctggaaaactggc-3' 5'-gccacgttttccagggcggtNNNatccggcagcaggtggtgaa-3' | Ptac- <i>loID_H</i> (F102X) |
| T103-f T103-r | 5'-accacctgctgccggattttNNNgcctggaaaactggctat-3' 5'-atagccacgttttccagggcNNNaaaaatccggcagcaggtggt-3' | Ptac- <i>loID_H</i> (T103X) |
| A104-f A104-r | 5'-acctgctgccggattttaccNNNctggaaaactggctatgcc-3' 5'-ggcatagccacgttttccagNNNggtaaaaatccggcagcaggt-3' | Ptac- <i>loID_H</i> (A104X) |

| 名称 | 配列 | 用途 |
|------------------|---|--|
| L105-f L105-r | 5' -tgctgccggatTTTaccgccNNNgaaaacgtggctatgccgct-3' 5' -agcggcatagccacgtTTTcNNNgcggtaaaaTccggcagca-3' | Ptac- <i>lclD_H</i> (L105X) |
| E106-f E106-r | 5' -tgccggatTTTaccgcctgNNNaacgtggctatgccgctgct-3' 5' -agcagcggcatagccacgtTTNNNcagggcggtaaaaTccggca-3' | Ptac- <i>lclD_H</i> (E106X) |
| N107-f N107-r | 5' -cggatTTTaccgccctggaaNNNgtggctatgccgctgctgat-3' 5' -atcagcagcggcatagccacNNNtTccagggcggtaaaaTccg-3' | Ptac- <i>lclD_H</i> (N107X) |
| V108-f V108-r | 5' -atTTTaccgccctggaaaacNNNgctatgccgctgctgattgg-3' 5' -ccaatcagcagcggcatagcNNNgtTTTccagggcggtaaaaT-3' | Ptac- <i>lclD_H</i> (V108X) |
| A109-f A109-r | 5' -ttaccgccctggaaaacgtgNNNatgccgctgctgattggcaa-3' 5' -ttgccaatcagcagcggcatNNNcacgtTTTccagggcggtaa-3' | Ptac- <i>lclD_H</i> (A109X) |
| M110-f M110-r | 5' -ccgccctggaaaacgtggctNNNccgctgctgattggcaagaa-3' 5' -ttcttgccaatcagcagcggNNNagccacgtTTTccagggcgg-3' | Ptac- <i>lclD_H</i> (M110X) |
| P111-f P111-r | 5' -ccctggaaaacgtggctatgNNNctgctgattggcaagaaaa-3' 5' -TTTTcttgccaatcagcagNNNcatagccacgtTTTccaggg-3' | Ptac- <i>lclD_H</i> (P111X) |
| L112-f L112-r | 5' -tggaaaaacgtggctatgccgNNNctgattggcaagaaaaagcc-3' 5' -ggctTTTTcttgccaatcagNNNcggcatagccacgtTTTcca-3' | Ptac- <i>lclD_H</i> (L112X) |
| L113-f L113-r | 5' -aaaacgtggctatgccgctgNNNatggcaagaaaaagccgc-3' 5' -gcgggctTTTTcttgccaatNNNcagcggcatagccacgtTTT-3' | Ptac- <i>lclD_H</i> (L113X) |
| I114-f I114-r | 5' -acgtggctatgccgctgctgNNNggcaagaaaaagcccgtga-3' 5' -tcagcgggctTTTTcttgccNNNcagcagcggcatagccacgt-3' | Ptac- <i>lclD_H</i> (L114X) |
| G115-f G115-r | 5' -tggtatgccgctgctgattNNNaagaaaaagcccgtgaaat-3' 5' -atTtcagcgggctTTTTcttNNNaatcagcagcggcatagcca-3' | Ptac- <i>lclD_H</i> (L115X) |
| R85Y-f R85Y-r | 5' -cggcagcgaagctgaactgtataaccagaagctgggctttat-3' 5' -ataaagcccagcttctgggtatacagttcagctttcgtgccg-3' | P _{BAD} - <i>lclCD_H</i> (R85Y) |
| L89P-f L89P-r | 5' -ctgaactgcgcaaccagaagccgggctttatttatcagtttca-3' 5' -tgaaactgataaaataaagcccggcttctgggtgcgcagttcag-3' | P _{BAD} - <i>lclCD_H</i> (L89P) |
| F91W-f F91W-r | 5' -tgcgcaaccagaagctgggctggatttatcagtttcaccacct-3' 5' -aggTggtgaaactgataaaTccagcccagcttctgggtgcgca-3' | P _{BAD} - <i>lclCD_H</i> (F91W) |
| I92F-f I92F-r | 5' -gcaaccagaagctgggctTTTTtatcagtttcaccacctgct-3' 5' -agcaggtggtgaaactgataaaaaagcccagcttctggttgc-3' | P _{BAD} - <i>lclCD_H</i> (I92F) |

| 名称 | 配列 | 用途 |
|--------------------|--|--|
| Y93H-f Y93H-r | 5'-accagaagctgggctttatcatcagtttcaccacctgctgcc-3' 5'-ggcagcaggtggtgaaactgatgaataaagcccagcttctggt-3' | P _{BAD} - <i>IoICDH</i> (Y93H) |
| Q94L-f Q94L-r | 5'-agaagctgggctttatctctgtttcaccacctgctgccgga-3' 5'-tccggcagcaggtggtgaaacagataaataaagcccagcttct-3' | P _{BAD} - <i>IoICDH</i> (Q94L) |
| H96P-f H96P-r | 5'-tgggctttatctatcagtttcgcacacctgctgccggatTTTAC-3' 5'-gtaaaatccggcagcaggtgcggaactgataaataaagccca-3' | P _{BAD} - <i>IoICDH</i> (H96P) |
| H97N-f H97N-r | 5'-gctttatctatcagtttcacaacctgctgccggatTTTACCgc-3' 5'-gcggtaaaatccggcagcaggtggtgaaactgataaataaagc-3' | P _{BAD} - <i>IoICDH</i> (H97N) |
| H97T-f H97T-r | 5'-gctttatctatcagtttcacacctgctgccggatTTTACCgc-3' 5'-gcggtaaaatccggcagcaggtggtgaaactgataaataaagc-3' | P _{BAD} - <i>IoICDH</i> (H97T) |
| L98T-f L98T-r | 5'-ttatctatcagtttcaccacacctgctgccggatTTTACCgcct-3' 5'-aggcggtaaaatccggcaggtggtgaaactgataaataa-3' | P _{BAD} - <i>IoICDH</i> (L98T) |
| D101N-f D101N-r | 5'-agtttcaccacctgctgccgaactTTTACCgcctggaaaacgt-3' 5'-acgttttccaggcggtaagttcggcagcaggtggtgaaact-3' | P _{BAD} - <i>IoICDH</i> (D101N) |
| D101R-f D101R-r | 5'-agtttcaccacctgctgccgcgctTTTACCgcctggaaaacgt-3' 5'-acgttttccaggcggtaagcgcggcagcaggtggtgaaact-3' | P _{BAD} - <i>IoICDH</i> (D101R) |
| A104M-f A104M-r | 5'-acctgctgccggatTTTACCATgctggaaaacgtggctatgcc-3' 5'-ggcatagccacgttttccagcatggtaaaatccggcagcaggt-3' | P _{BAD} - <i>IoICDH</i> (A104M) |
| P111K-f P111K-r | 5'-ccctggaaaacgtggctatgaaactgctgattggcaagaaaa-3' 5'-ttttcttgccaatcagcagtttcatagccacgttttccaggg-3' | P _{BAD} - <i>IoICDH</i> (P111K) |

mM MgSO₄, 0.4% Glucose) 寒天培地上で 37°C 培養して、コロニーを生育させた。ここで生育した XL1-Blue は、変異 pKM203*プラスミドを持つが、アミノ酸変異個所がヘテロ重合したプラスミドを持つ可能性があったので、生育した全てのコロニーを L-broth (50 µg/mL Ap, 12.5 mM MgSO₄, 0.4% Glucose) 液体培地に移して 37°C で培養後、変異 pKM203*プラスミドを回収して、MC4100 株を形質転換した。L-broth (50 µg/mL Ap, 0.4% Glucose) 寒天培地上で 30°C 培養によりコロニーを生育させた。

変異 pKM203*プラスミドを保持した MC4100 のコロニー 180 個を楊枝でつついて、アンピシリンと IPTG を含むもしくは含まない L-broth 寒天培地に植菌して 30°C で培養した。IPTG を含む L-broth 寒天培地上で生育阻害がみられたコロニーの一部を 50 µL のダイレクト PCR 反応液 [forward primer (20 pmol), reverse primer (20 pmol), 10×Ex Taq™ buffer, dNTP mix (2.5 nmol each), Ex Taq™ DNA polymerase (2.5 U)] に懸濁した。PCR 反応は、95°C、5 分間の変性後、変性 95°C・30 秒、アニーリング 55°C・30 秒、伸張 72°C・30 秒を 35 回繰り返し増幅を行った。ダイレクト PCR により変異 P_{tac}-*lolD_H**遺伝子フラグメントの増幅が確認されたものについては、これをシーケンス反作用 template とした。DNA 塩基配列は、CEQ2000XL マルチキャピラリー塩基配列解析装置 (Beckman Coulter) および GENETYX プログラムを用いて解析した。

***LolCD_H* 遺伝子への部位特異的変異の導入**

LolD_H 遺伝子への部位特異的変異導入の場合とほぼ同様の方法で行った。但し、変異を導入するプラスミドとして pKM402 (P_{BAD}-*lolCD_H*) を使用した。また、変異体によっては形質転換効率が低かったため、その場合は、形質転換に使用する DNA 溶液をエタノール沈殿により濃縮し、宿主大腸菌を XL1-Blue よりも高効率の DH5 α とし、培養温度を全て 30°C に変更した。

アライメントの作成

データベース (DDBJ/EMBL/Gen Bank) 解析には、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) サイト

上の BLAST を通じて、blastp プログラムを使用した。アライメントの作成には、GENETYX プログラムを使用した。

LolCD_HE の精製

①膜画分の調製

pKM402 と pKM301 を保持した大腸菌 JM83 株を 50 µg / mL アンピシリン、25 µg / mL クロラムフェニコールを含む 2 L の L-broth 培地にて 30°C で浸透培養した。培養液が OD₆₆₀ = 0.8 になった段階で、アラビノースを終濃度 0.2% になるように加えて LolCD_H 蛋白質の発現を誘導した。アラビノース添加 2 時間後、IPTG を終濃度 1 mM となるように加えて LolE 蛋白質の発現を誘導し、IPTG を添加して 1 時間後に菌体を集菌した (10,000×g, 15 min, 4°C)。菌体 2 g に対して 10 mL の 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)–300 mM ショ糖を加え、テフロンホモジナイザーによって均一に懸濁した。菌体懸濁溶液を氷上で攪拌しながら、終濃度 0.05 mg/mL DNase I、2.5 mM EDTA (pH 8.0)、0.5 mg/mL Lysozyme となるように各試薬を順次滴下して、そのまま氷上で 15 分間攪拌した。その後、菌体懸濁溶液をフレンチプレス (10,000 psi) に 1 回通して菌体を破碎後、この菌体破碎溶液に対して 1.5 倍量の 50 mM K-Pi (pH 7.5) を加えて、テフロンホモジナイザーにより均一に懸濁した。遠心 (10,000×g, 10 min, 4°C) にて菌体未破碎画分を除き、上清をさらに遠心 (100,000×g, 60 min, 4°C) して回収された沈殿を膜画分とした。2 g の菌体より得られた膜画分を 0.5 mL の 50 mM K-Pi (pH 7.5) に懸濁し、テフロンホモジナイザーを用いて均一に懸濁した。膜画分は、-80°C で保存した。

②膜の可溶化および TALON カラム–FPLC システム (Amersham Biosciences) による精製

大量精製のための条件を以下に示す。なお、() には解析用の少量精製条件を示す。

300 mg (20 mg) の膜画分を 2.5 mg / mL となるように可溶化溶液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM MgCl₂、1% DDM、±2 mM ATP、10% Glycerol] に懸濁して、時折攪拌しながら氷上で 30 分間インキュベーションした。遠心 (100,000×g, 30 min, 4°C) して得られた上清を、バッファー A [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、300 mM NaCl、0.01% DDM、±2 mM ATP、10% Glycerol] で平衡化した 6 mL (0.4 mL) の TALON superflow resin (BD Biosciences Clontech) に

流速 1 mL/min (0.5 mL/min) で吸着させた。続いて、60 mL (4 mL) の終濃度 10 mM イミダゾール / バッファーA を流速 2 mL/min (0.5 mL/min) で送液して、非特異的に吸着した蛋白質を洗浄除去した。LolCD_HE 蛋白質の溶出は、10 - 250 mM のイミダゾール濃度勾配 / バッファーA、流速 2 mL/min (0.5 mL/min) で 80 mL (12 mL) を送液することにより行った。約 60 mM イミダゾール濃度の画分に確認される LolCD_HE 蛋白質を回収して、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.01% DDM、10% Glycerol、±2 mM ATP で一晩透析した。透析により析出した不溶性蛋白質は遠心 (100,000×g、30 min、4°C) により除去した。上清を回収して、蛋白質定量を行い、少量ずつ分注して-80°Cで保存した。すべての精製過程から ATP を除くことにより、基質結合型の LolCD_HE を取得した。一方で、フリーの LolCD_HE は、全ての精製過程に ATP を加えることにより得た。

LolD_H の精製

pKM203 を保持した大腸菌 DLP79-36 株 (Δpp) を 50 μ g / mL アンピシリンを含む 2 L の L-broth 培地にて 30°C で振とう培養した。OD₆₆₀ = 0.8 となった時点で、終濃度 1 mM となるように IPTG を加えて 30°C で 2 時間培養して菌体を集菌した (10,000×g、15 min、4°C)。菌体を 400 mL の 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で洗浄し、回収した菌体 2 g に対して 15 mL のバッファーB [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl、10% Glycerol] を加えて、テフロンホモジナイザーにより懸濁した。菌体懸濁溶液をフレンチプレス (10,000 psi) に 2 回通して菌体を破碎後、テフロンホモジナイザーにより均一に懸濁した。遠心 (10,000×g、15 min、4°C) により菌体未破碎画分を除き、さらに遠心 (100,000×g、60 min、4°C) して、上清を回収した。上清画分 40 mL に対して、バッファーB で平衡化した 3 mL の TALON resin を加え、4°C で 45 分間振とうした。遠心 (8,000×g、5 min、4°C) により上清を除き、終濃度 10 mM のイミダゾールを含む 40 mL のバッファーB を添加して、4°C で 30 分間振とうした後、遠心 (8,000×g、5 min、4°C) により上清を除き、非特異的に吸着した蛋白質を除去した。洗浄を 3 回繰り返した後、TALON resin をセパコール・ミニカラム (生化学工業株式会社) に充填して、終濃度 250 mM のイミダゾールを含む 5 mL のバッファーB で溶出した。0.5 mL×10 フラクションを回収して、LolD_H を含む画分をまとめ、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10%グリセロール

で一晩透析して、-80℃で保存した。さらなる精製を必要とする場合には、Smart System (Amersham Biosciences)にて、あらかじめ 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10%グリセロールで平衡化した MonoQ カラム(1.6/5 Amersham Biosciences)を用いてサンプルを 0.1 mL/min の流速で通した。素通り画分を回収して、-80℃で保存した。

Pal の精製

Pal の精製は Mizuno ら(1979)の精製方法を参考にした。pTAN21 を保持した大腸菌 JC7752 を 50 µg/mL アンピシリンを含む 2 L の L-broth を用いて、37℃で培養した。OD₆₆₀ = 0.6 になった段階で終濃度 1 mM となるように IPTG を添加して、2 時間、37℃で培養して集菌した (10,000×g, 15 min, 4℃)。菌体に 100 mL のバッファーC [10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl]を加えよく懸濁し、遠心 (10,000×g, 15 min, 4℃) して菌体を回収した。菌体 10g に対して、100 mL のバッファーC を加えて、テフロンホモジナイザーにて均一に懸濁した。その後、10,000 psi でフレンチプレスに 1 回通して、テフロンホモジナイザーにて懸濁し、これを 2 回行った。遠心 (10,000×g, 15 min, 4℃) により菌体未破碎画分を除去した後、上清から、遠心 (100,000×g, 30min, 4℃) により沈殿を回収した。2 L の培養液から回収された膜画分を、5 mL のバッファーC に懸濁し、さらにテフロンホモジナイザーにより均一に懸濁した。得られたサンプルを膜画分として-80℃で凍結保存した。

膜画分 5 mL に 45 mL のバッファーD [2%SDS、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl] を添加して、25℃・10 分間のインキュベーションを行い、遠心にて (100,000×g, 30 min, 25℃) 回収した沈殿画分に、25 mL のバッファーD を加えた。これをテフロンホモジナイザーで懸濁し、50℃・1 h のインキュベーションを行った後、遠心 (100,000×g, 30min, 4℃) により回収した上清に 5 倍量のアセトンを添加して、-20℃で一晩静置した。溶液を 50 mL のファルコンチューブに移して、析出した沈殿を超音波処理により均一に懸濁し、遠心 (8,000 rpm, 30 min, 4℃) により析出物を沈殿として回収した。ここに 5 mL のアセトンを添加して、超音波処理を行い、遠心 (8000 rpm, 10 min, 4℃) にて沈殿を回収した。ペレットを乾燥して、3 mL のバッファーE [2% SC, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)]を加えて超音波処理により均一に懸濁した。サンプルをフィルターを通して、不溶物を除去し、2 L のバッファーE に対し

て一晚透析した。遠心 (100,000×g、30min、4℃) にて上清画分を回収して、VS0601 (VIVASCIENCE) を用いて約 2 mL にまで限外濾過濃縮したサンプルを、バッファーE で平衡化した MonoQ カラム (5/5、Amresham Biosciences) を用いて、サンプルを 1 mL/min の流速で通した。蛋白質はカラム容量 (1 mL) の 20 倍の NaCl 濃度勾配 (0M-0.5M) で分離した。NaCl 0.15 M 前後の画分に Pal が回収され、蛋白質量を Lowry ら (1951) の方法に従って定量して-80℃で保存した。

大腸菌リン脂質の調製

大腸菌リン脂質は Viitanen ら (1986) の方法に従い抽出した。大腸菌全脂質抽出物 (Avanti Polar Lipids, Inc.) をクロロホルム / メタノール (9 : 1) に溶解し、アセトン・エーテルを用いて抽出したものを 2 mM β-メルカプトエタノール溶液に 100 mg/mL の濃度で溶解して、-80℃で保存した。

大腸菌内膜と外膜の分画

大腸菌 JM83 株を 2 L の L-broth にて OD₆₆₀ = 0.8 まで 30℃培養して、遠心 (10,000×g、15 min、4℃) により菌体を回収した。800 mL のバッファーF [10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、750 mM ショ糖]で菌体を洗浄して遠心 (10,000×g、15 min、4℃) し、菌体質重量を計測した。500 mL のバッファーF を加えてテフロンホモジナイザーにて懸濁して、0.5 mL の 75 mg / mL の Lysozyme (終濃度 75 μg / mL) を滴下して、4℃で 10 分間攪拌した。1.5 mL の 0.5 M EDTA (pH 8.0) (終濃度 1.5 mM) を加えて 4℃で 5 分間攪拌して、遠心 (10,000×g、15 min、4℃) により沈殿 (スフェロプラスト) と上清に分け、スフェロプラスト画分に 50 μg / mL の DNase を含む 40 mL の 50 mM KPi (pH 7.5)を加えて、テフロンホモジナイザーにより懸濁した。フレンチプレス(8,000 psi)に 2 回通してスフェロプラストを破碎し、テフロンホモジナイザーにより懸濁した。遠心 (10,000×g、15 min、4℃) により菌体未破碎画分を除去して、さらに遠心 (100,000×g、40 min、4℃) して沈殿 (膜画分) と上清に分けた。2 g の菌体から得た膜画分に対して、0.5 mL の 50 mM KPi (pH 7.5)、1 mM EDTA を加え、テフロンホモジナイザー

にて均一に懸濁し、 -80°C で保存した。

50.2 Ti ローター (Beckman Coulter) に対応した 25 mL 超遠心チューブに各濃度のショ糖を下から順に重層した (55%/5 mL-50%/3 mL-45%/6 mL-40%/3 mL-35%/3 mL-30%/3 mL)。最上層に 0.5 mL の膜画分をのせて遠心 ($100,000\times g$, 2 h, 4°C) し、55-50%の境界面に白色の外膜、40-35%の境界面に赤色の内膜を得た。それぞれの膜画分を先を折り曲げたパスツールピペットで静かに吸い取って回収し、50 mM KPi (pH 7.5) を加えて 25 mL にした。遠心 ($100,000\times g$, 30 min, 4°C) により回収したペレットを 0.2 mL の 50 mM KPi (pH 7.5) に懸濁し、テフロンホモジナイザーにてさらに均一に懸濁した後、 -80°C で保存した。

SDS-PAGE

SDS-PAGE は、Hussain ら (1980) 或いは Laemmli (1970) の方法にしたがって、用途により使用するゲルの種類を使い分けた。以後、Hussain らのゲルを HI ゲルと呼び、Laemmli らのゲルを Laemmli ゲルと呼ぶ。本実験では、特に断りのない場合は Laemmli ゲルを使用し、Lpp 等の低分子量リポ蛋白質分離の際には、HI ゲルを使用した。

イムノブロットイング

PVDF 膜 (MILLIPORE) はメタノールに浸してから、ブロットイングバッファーで平衡化した。Laemmli ゲルから蛋白質を転写する場合には、ブロットイングバッファーA [50 mM Tris-HCl, 1.44%グリシン, 20%メタノール]を使用し、平衡化した PVDF 膜へ $3\text{ mA} / \text{cm}^2$ で 30 分間かけて転写した。一方で、HI ゲルから蛋白質を転写する場合には、ブロットイングバッファーB [100 mM Na-Pi, 20%メタノール]を使用し、平衡化した PVDF 膜へ 500 mA (一定) で 1 時間かけて転写した。

①アルカリフォスファターゼ (AP) 標識抗体法による検出

ブロットイングした膜を、10%(v/v)馬血清 (Invitrogen) / TBS [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl] に浸し 1 時間振とうした。膜を一次抗体 / TBS に移して 1 時間振とう後、

T-TBS [0.05% (v / v) Tween 20 / TBS] で洗淨 (10 分間×2) して、さらに TBS で 10 分間洗淨した。膜を anti-Rabbit IgG-AP conjugate (KPL) / TBS に浸し 1 時間振とう後、T-TBS [0.05% (v / v) Tween 20 / TBS] で洗淨 (10 分間×2) して、さらに TBS で 10 分間洗淨した。BCIP (0.0625 mg / mL)、NBT (0.125 mg / mL) を含む AP バッファー [100 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂ (pH 9.5)] に膜を浸し、発色検出を行った。

②ECL Plus ウェスタンブロットリング検出試薬 (Amersham Biosciences) による検出

ブロットリングした膜を、3% BSA / T-TBS に浸して 1 時間振とうした。膜を一次抗体 / 1% BSA / T-TBS に移して 1 時間振とう後、T-TBS [0.05% (v / v) Tween 20 / TBS] で洗淨 (10 分間×2) して、さらに TBS で 10 分間洗淨した。膜を anti-rabbit Ig, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey) (Amersham Biosciences) / 1% BSA / T-TBS に移して 1 時間振とう後、T-TBS [0.05% (v / v) Tween 20 / TBS] で洗淨 (10 分間×2) して、さらに TBS で 10 分間洗淨した。膜をラップ上に置き、検出試薬 (0.1 mL / 1 cm²) をかけて 5 分間静置した後に、イメージアナライザー LAS-1000 (富士フィルム) を用いて発光検出を行った。

①および②で検出されたバンドの定量は、ATTO Densitograph CS Analyzer を用いて解析した。

本研究で使用した一次抗体

ウサギ抗 LolC、LolD および LolE 抗体は、各々の合成ペプチド (LolC の K239-E255、LolD の P111-R125、LolE の P176-R186) を抗原として調製された (Narita et al., 2003)。ウサギ抗 Lpp (Hussain et al., 1980)、OmpA (Tani et al., 1990)、Pal (Tajima et al., 1998)、SecG (Nishiyama et al., 1993)、LolA (Matsuyama et al., 1995) および LolB (Matsuyama et al., 1997) 抗体は、各々の精製蛋白質を抗原として調製された。ウサギ抗 AcrA 抗体は、山口明人教授 (大阪大学産業科学研究所) に提供して頂いた。ウサギ抗 NlpC および抗 YcfM 抗体は、各々の SecA 融合蛋白質を抗原として調製された (Miyadai et al., unpublished results)。

LolCD_HE によるリポ蛋白質遊離活性

大腸菌リン脂質 800 μg 、LolCD_HE 8 μg を、終濃度で 1.2% SM を含むバッファーG [50 mM Tris-HCl (pH7.5)、5 mM MgSO₄、100 mM NaCl]に懸濁して、100 μL となるように調製した。氷上で 10 分間静置した後、0.9 mL の透析バッファーで 10 倍に希釈して、バッファーG に対して 4°C で一晩透析した。透析後、遠心 (100,000 \times g、2 h、4°C) により沈殿を回収した。沈殿を 100 μL の透析バッファーで懸濁して、凍結・融解・超音波処理を行いプロテオリポソームを調製した。45 μL のプロテオリポソーム、 \pm 4 μg LolA、 \pm 2 mM ヌクレオチドをバッファーG に加えて 300 μL に調製した。プロテオリポソーム添加前の反応液を 30°C で 10 分間ブレインキュベーションした後、プロテオリポソームを加えることで反応を開始した。30°C・20 分間の遊離反応後、終濃度で 1 mM の Vi を添加してすぐにチューブを氷上に移した。遠心 (100,000 \times g、2 h、4°C) により、プロテオリポソーム (沈殿) と可溶性画分 (上清) に分画し、TCA 沈殿を行った。沈殿を 1 \times SAB に懸濁して SDS 処理をした後、沈殿画分の 1/100 および上清画分の 1/3 を SDS-PAGE にて分離し、イムノブロットィングにより検出した。

LolD_H の ATPase 活性

ATPase 活性の測定は Chifflet ら (1988) の方法を参考にした。5 μg LolD_H を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl、10% Glycerol 溶液で 90 μL となるように調製した。50 mM の MgSO₄ を 10 μL および 0.2M ATP 1 μL を加えて 30°C で反応を開始した。一定時間 (0、5、10、20、40、80、120 分間) が経過したら順次反応液より 15 μL を回収し 15 μL の 12% SDS が入ったチューブに移して、反応を停止させた。このチューブに 30 μL の発色溶液 [3%アスコルビン酸、0.5 N 塩酸、0.5% モリブデン酸アンモニウム、6% SDS] を加え室温で反応させて 3 分が経過したら、45 μL の反応停止溶液 [2% クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物、2% 酢酸] を加え室温で 20 分以上放置した。これらの溶液の 850 nm の吸光度を DU 800 spectrophotometer (Beckman Coulter) にて測定して、反応溶液中の遊離リン酸の量を測定した。

LolCD_HE の ATPase 活性

大腸菌リン脂質 800 μg 、LolCD_HE 8 μg から、「LolCD_HE によるリポ蛋白質遊離活性」と同様の方法でプロテオリポソームを調製した。終濃度 2 mM ATP を含むバッファーG 20 μL を 30°C・10 分間プレインキュベーションして、ここに 90 μL のプロテオリポソームを加えて反応を開始した。反応後、一定時間が経過したら順次反応液より 15 μL を回収し 15 μL の 12% SDS が入ったチューブに移して反応を停止させた。反応溶液中の遊離リン酸量の量は、LoID の ATPase 活性測定と同様の方法で行った。

TALON 樹脂を用いた基質と LolCD_HE との相互作用解析

1 μg 基質結合型 LolCD_HE を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、 ± 2 mM ATP、5 mM MgSO₄、0.01~1% DDM、10% Glycerol に加えて 10 μL となるように調製し、30 分間氷上で静置した（詳細な反応条件については、結果および図の各部分で示した）。0.45 mL のバッファーH [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、300 mM NaCl、0.01% DDM、10% Glycerol]を加えて反応を停止し、バッファーH で平衡化した 50 μL の TALON resin を添加した。4°Cで 50 分間、回転板にて攪拌して、遠心 (10,000 \times g、10 min、4°C) により上清を回収して非吸着画分とした。沈殿に 0.4 mL のバッファーH を添加して、4°Cで 30 分間、回転板にて攪拌して、遠心 (10,000 \times g、10 min、4°C) により上清を回収して洗浄画分とした。沈殿に終濃度で 250 mM のイミダゾールを含むバッファーH を添加して、4°Cで 30 分間、回転板にて攪拌して、遠心 (10,000 \times g、10 min、4°C) により上清を回収して溶出画分とした。回収したそれぞれの画分について TCA 沈殿を行い、沈殿に 40 μL の 1 \times SAB を加えて、100°C・10 分間の SDS 処理を行った。2 μL のサンプルを SDS-PAGE により分離して、イムノブロットィングを行い、ECL Plus ウェスタンブロットィング検出試薬を用いて検出した。