

博士論文

再構築型無細胞翻訳系による
SecYEG トランスロコンの合成と機能解析

(*In Vitro* Synthesis and Functional Analysis of
SecYEG Translocon)

2016 年 3 月

松林 英明

東京大学大学院 新領域創成科学研究科
メディカル情報生命専攻 分子医科学分野
指導教官：上田卓也

目次

1	序説.....	1
1.1	膜タンパク質研究における無細胞翻訳系の利用.....	1
1.2	Sec トランスロコン.....	3
1.3	SecYEG トランスロコンの構造.....	6
1.4	大腸菌での SecYEG の合成と分解.....	8
1.5	本研究の目的.....	8
2	方法.....	9
2.1	実験材料と試料調製.....	9
2.1.1	実験材料.....	9
2.1.2	プラスミドと大腸菌株.....	9
2.1.3	PURE system 反応液に用いる鋳型 DNA の調製.....	12
2.1.4	SecYEG の精製.....	12
2.1.5	SecA の精製.....	14
2.1.6	SecB の精製.....	14
2.1.7	SRP の精製.....	14
2.1.8	FtsY の精製.....	15
2.1.9	リポソームの調製.....	16
2.1.10	SecYEG プロテオリポソームの調製.....	16
2.2	無細胞翻訳系 (PURE system) と生化学実験の方法.....	18
2.2.1	無細胞翻訳系 (PURE system) によるタンパク質の合成.....	18
2.2.2	放射性同位体標識されたタンパク質の検出と定量.....	18
2.2.3	Flotation 法.....	18
2.2.4	TCA 沈殿.....	19
2.2.5	Enterokinase 処理.....	19
2.2.6	3C protease 処理.....	19
2.2.7	Blue Native PAGE.....	20

2.2.8	pOmpA、pOmpF-Lpp の co-translational 膜透過反応	20
2.2.9	Protease K (PK) 処理	21
2.2.10	SecB-pOmpA 複合体の調製	21
2.2.11	pOmpA の post-translational 膜透過反応	22
2.2.12	YidC と LepB の co-translational 膜挿入反応	22
2.2.13	SecA ATPase 反応	22
2.2.14	LepB によるシグナル配列の切断反応	23
2.2.15	脂質の分画と薄層クロマトグラフィー	23
2.2.16	AmpC、PhoA の合成と活性測定	24
2.3	タンパク質の蛍光標識と 1 分子観察の方法	25
2.3.1	アンバーサプレッション法を用いたタンパク質の蛍光標識	25
2.3.2	SecYE の蛍光標識と精製	25
2.3.3	pOmpA の蛍光標識と精製	25
2.3.4	1 分子観察に用いた脂質平面膜再構成デバイスの作製	26
2.3.5	脂質平面膜の作製	27
2.3.6	脂質平面上の SecYE の観察	27
2.3.7	マイクロチャンバーに封入した Fluorocillin™ Green の観察	28
2.3.8	脂質平面上の pOmpA の観察	28
2.3.9	1 分子観察と画像解析	28
3	結果	30
3.1	PURE system による SecYEG の合成	30
3.2	SecY、SecE、SecG の膜局在化	35
3.3	SecY、SecE の膜上でのトポロジーの評価	37
3.4	SecYEG の複合体形成の解析	39
3.5	pOmpA の膜透過反応による SecYEG の活性評価	42
3.6	再構成系における SecY の変異体解析	46
3.7	SecYEG による YidC の膜挿入	50

3.8	SecYEG による LepB の膜挿入.....	53
3.9	SecYEG の複合体形成、機能発現における脂質組成の影響.....	56
3.10	SecYEG トランスロコンの 1 分子観察の意義.....	59
3.11	アンバーサプレッション法を用いた SecYE の pOmpA の蛍光標識と精製.....	60
3.12	SecYE の平面膜上での 1 分子観察.....	62
3.13	大腸菌ペリプラズム酵素 AmpC、PhoA の活性評価と膜透過.....	64
3.14	マイクロチャンバーの脂質膜を介した Fluorocillin™ Green の漏れの問題.....	66
3.15	pOmpA の平面膜上での 1 分子観察.....	68
4	考察.....	70
4.1	本研究のまとめ.....	70
4.2	無細胞翻訳系で合成される膜タンパク質のトポロジーと課題.....	70
4.3	PURE system 内における SecYEG の合成過程.....	71
4.4	SecY 変異体の機能解析で新たに得られた知見.....	72
4.5	脂質組成と SecYEG の膜透過活性.....	73
4.6	無細胞翻訳系における SecYEG トランスロコンの利用.....	74
4.7	原始細胞における Sec トランスロコン獲得の仮説.....	75
5	参考文献.....	77
6	謝辞.....	83

略語

avg: average

CL: cardiolipin

CV: column volume

DDM: *n*-Dodecyl- β -D-maltoside

DLS: dynamic light scattering

DOPC: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

DOPE: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

DOPG: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol)

DOPS: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine

DTT: dithiothreitol

EK: enterokinase

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

PCR: polymerase chain reaction

PE: phosphatidylethanolamine

PG: phosphatidylglycerol

PK: protease K

PMF: protom motive force

POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

POPE: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

POPG: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol)

SD 配列: Shine-Dalgarno 配列

SRP: signal recognition particle

SR: SRP receptor

TM: trans-membrane helix

1 序説

1.1 膜タンパク質研究における無細胞翻訳系の利用

すべての細胞は、それ自身の反応系を内部に区画化するための細胞膜に覆われている。細胞は、その「生きている」状態を維持するために、外環境と物質や情報をやりとりすることが求められるが、その反応はすべて細胞膜を介して行われる。そのため、細胞膜では、物質輸送、情報伝達、エネルギー生産などの重要な反応が絶えず行われるが、それらの反応の多くでは、細胞膜に存在するタンパク質である膜タンパク質が重要な役割を担っている。また、膜タンパク質の多くは、外界と接する細胞の表面に存在し、細胞内部の反応を制御、調節する因子であることから、創薬ターゲットとしても重要である。

膜タンパク質は大きく分けて、細胞膜の表面に付着する形で存在する「膜表在性タンパク質」と脂質膜にタンパク質が埋め込まれた形で存在する「膜貫通型タンパク質」の2つに分けられるが、本論文では膜貫通型のタンパク質に着目して研究をおこなった。そこで、本論文においては、表記を簡略化するため、膜貫通型タンパク質を指して「膜タンパク質」と表記する。

膜タンパク質は上述のように重要な研究対象であるにもかかわらず、十分に解析が進んでいないのが現状である。構造解析を例にとると、2015年12月1日の時点で、Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) には、約113,971件のタンパク質の立体構造情報が登録されているが、Stephen White による Membrane Protein of Known 3D Structure (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>) によれば、PDBに登録されている構造情報のうち膜タンパク質についての情報は1,821件であり、全体の1.6%を下回る割合である。多くの生物で、ゲノムにコードされるタンパク質のうちの30%前後を膜タンパク質が占めることを考えると、この数字は極めて少ないと言える¹。

膜タンパク質の機能解析、構造解析の研究を遅らせている大きな要因のひとつは、膜タンパク質をリコンビナントタンパク質として発現、精製することが困難なことにあると考えられている。細胞の発現系を用いた場合は、タンパク質の発現自体が難しい場合や、発現した膜タンパク質が細胞毒性を示すなどの理由でタンパク質を調製することが難しい場合が多い。これは、特定の膜タンパク質が過剰に生産されると細胞の生存に欠かせない膜構造に悪影響を及ぼすためであると考えられている¹。また、膜タンパク質は脂質膜に埋め込まれているため、精製の過程で界面活性剤を用いた膜タンパク質の可溶化が必要になるが、膜タンパク質の本来のフォールディングを保ったまま可溶化するためには、適切な界面活性剤の種類や濃度の選択が不可欠になる。しかし、こうした可溶化の条件は個々の膜タンパク質で異なり、精製する膜タンパク質ごとに試行錯誤が必要となるため、極めてスループットの低い実験にならざるを得ない。

こうした課題に対して、近年、無細胞翻訳系を使って膜タンパク質を *in vitro* で調製する方法が盛んに研究されている²。無細胞翻訳系は細胞を使わないため、細胞毒性のあるタンパク質でも発現が可能である。また、合成する膜タンパク質を脂質膜に直接再構成させることもでき、界面活性剤の条件検討の煩雑さを回避できるという利点もある。直接再構成する際には、通常、擬似的な膜成分を系に添加し、合成される膜タンパク質の疎水的な領域と脂質膜との相互作用によって、自発的にタンパク質が脂質膜に挿入されることを利用する。膜成分としては、脂質のみで構成された膜小胞であるリポソームや、数 nm の半径の脂質膜をアポリタンパク質のベルトで束ねた nanodisc などが用いられる³。また、反応系に直接界面活性剤や界面活性剤と脂質の混合液を添加し、界面活性剤の存在下で翻訳反応を行い、そのまま膜タンパク質を可溶性画分に回収する方法も報告されている^{4,5}。

膜タンパク質の合成における無細胞翻訳系の応用例も近年増えてきている。合成した膜タンパク質の活性まで確認されている例もあり、代表的なものとして bacteriorhodopsin (bR)^{3,5,7}、FoF1 ATP 合成酵素^{7,8}、脂質合成酵素⁹、connexin-43¹⁰ などの例が挙げられる。膜タンパク質の結晶構造解析に応用される例もみられ、大腸菌の多剤排出トランスポーターである EmrE¹¹、藻類カサノリのロドプシン AR II¹² の構造が、無細胞翻訳系によって調製された膜タンパク質を元に解析されている。また、膜貫通タンパク質ではないが、*Enterococcus hirae* の V-ATPase¹³ の構造も、大腸菌抽出液系によって調整されたタンパク質の結晶を元に解析されている。さらに、無細胞翻訳系を μm サイズのリポソームである GUV (giant unilamellar vesicle) に封入した人工細胞系での膜タンパク質合成も行われており、 α -hemolysin の例¹⁴ などがある。また、GUV 内での膜タンパク質合成とフローサイトメトリーを組み合わせた、膜タンパク質の人工進化系であるリポソームディスプレイ系も開発されている¹⁵。

しかし、これまでの手法では合成された膜タンパク質の膜挿入は、脂質と膜タンパク質の自発的な相互作用を利用しているため、合成されたタンパク質の膜上でのトポロジーの制御が難しく、無細胞系で合成できる膜タンパク質には限りがあった。特に、受容体などの細胞外部に親水的なドメインを持つ膜タンパク質の場合、従来の合成系では、親水的なドメインが疎水的な脂質膜を越えることができず、正しい構造で膜タンパク質を合成することが難しかった。細胞内で膜タンパク質が合成される際には、膜タンパク質組み込み装置である Sec トランスロコン¹⁶ を介して、膜上でのトポロジーなどの構造形成が制御されている。車らは、反転内膜小胞と呼ばれる大腸菌由来の細胞膜を再構築型の無細胞翻訳系である PURE system¹⁷ に添加することで、細胞膜に存在する SecYEG トランスロコンを利用して膜タンパク質の合成や分泌タンパク質の膜透過反応を再構成することに成功している¹⁸。そこで、より純化された Sec トランスロコンの膜タンパク質合成系を構築することができれば、無細胞翻訳系の機能解析や構造解析での応用範囲をより大きく広げることが可能になると見込まれる。

1.2 Sec トランスロコン

Sec トランスロコンは、タンパク質の膜挿入と膜透過のゲートとして働く膜上の分子装置である。リボソームや他の因子と共役して、様々なタンパク質の局在を制御するタンパク質輸送のハブである。進化的にも広く保存されており、細菌では SecYEG 複合体、古細菌では SecYEB 複合体、真核生物の小胞体では Sec61 $\alpha\beta\gamma$ 複合体として存在し、また、葉緑体のチラコイド膜にも SecYE 複合体が同定されている¹⁶。大腸菌の SecYEG 複合体は、ペリプラズムや外膜に輸送される分泌タンパク質の膜透過反応 (図 1-1) と内膜に組み込まれる膜タンパク質の膜挿入 (図 1-2) を担い、細胞内のタンパク質輸送の中心的な輸送経路を構成している。

分泌タンパク質の膜透過の経路では、SecB の経路が最もよく研究されている¹⁹。SecB は、ホモ 4 量体として細胞質に存在し分泌タンパク質と結合するシャペロンであり、タンパク質が SecYEG に輸送されるまで構造形成を抑制する働きをもつ。分泌タンパク質が SecYEG まで輸送されると、膜透過反応を駆動する ATPase である SecA に ATP が結合することで膜透過の開始反応が駆動され、分泌タンパク質のシグナル配列が SecYEG に挿入される²⁰。SecA は、さらに ATP 加水分解を繰り返し、複数回のステップでタンパク質を膜透過する。

細胞内においては、SecA の ATP 加水分解によるエネルギーに加えて、proton motive force (PMF) による電気ポテンシャルも膜透過反応を駆動する要因である²¹。また、SecA が細胞質側からタンパク質を押し込む一方で、ペリプラズム側からは SecYEG と相互作用する膜タンパク質である SecDF 複合体のペリプラズム側のドメインがタンパク質を引き抜く形で反応に寄与する²²。

分泌タンパク質のシグナル配列の多くは Type I シグナルペプチダーゼである LepB によって切断される²³。LepB は 2 回膜貫通型の膜タンパク質であり、ペリプラズム領域にペプチダーゼドメインをもつ。このペプチダーゼドメインが、SecYEG を介してペリプラズム側に露出したシグナル配列の C 末端側を切断する。

膜タンパク質の膜挿入の経路では、タンパク質は signal recognition particle (SRP) による経路で SecYEG に輸送される²⁴。SRP は Ffh タンパク質と 4.5S RNA からなるタンパク質 RNA 複合体であり、リボソームの exit tunnel から露出した膜タンパク質の N 末端の疎水的なペプチドと相互作用する。さらに、SRP は膜上の SRP receptor (SR) である FtsY タンパク質と共役して、翻訳中のリボソームを SecYEG のチャンネル上に結合させる。

真核生物、古細菌と、細菌のうちグラム陽性菌の SRP には、リボソームの A-site に入って翻訳をストールさせるドメインがあるため、SRP の結合に伴って翻訳が一時停止し、その後の疎水的なペプチドが細胞質中に放出されることを回避している²⁵。大腸菌などのグラム陰性菌にはストールをおこすドメインはないため SRP による翻訳停止はないと考えられるが、mRNA 上にリボソームの翻訳速度を低下させる配列があり、同様の機

能を果たしているとする説が近年報告されている²⁶。上記のような機構により、膜タンパク質の翻訳はそのほとんどの部分をリボソームが SecYEG に結合した状態で行われ、翻訳反応と共役して膜タンパク質の膜貫通領域が SecYEG を介して膜へ挿入される。また、SecYEG を介して膜挿入するタンパク質に対して膜内在性のシャペロンである YidC が相互作用し、膜タンパク質の構造形成や膜タンパク質複合体のアセンブリに寄与する²⁷。

1. Secretory Protein Translocation
2. Membrane Protein Integration

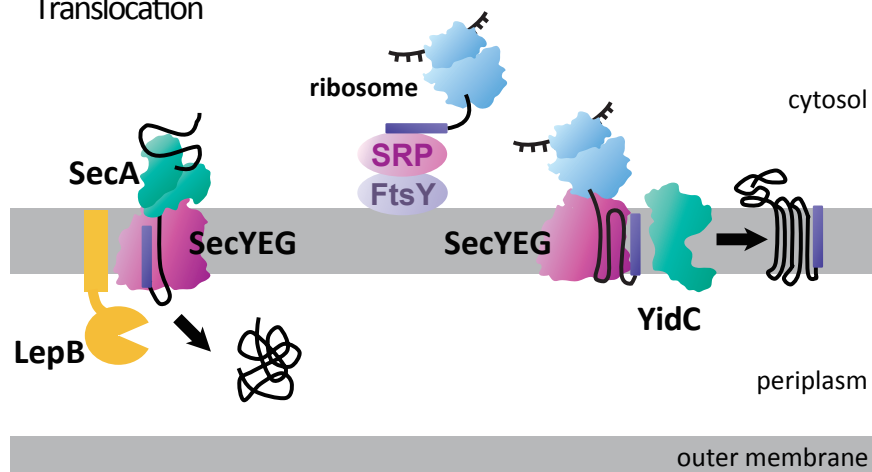


図 1. SecYEG トランスロコンによるタンパク質の輸送機構

大腸菌の SecYEG トランスロコンは、分泌タンパク質の膜透過反応と膜タンパク質の膜挿入反応の際のゲートとして働く。

1.3 SecYEG トランスロコンの構造

大腸菌の SecYEG は、SecY (48 kDa、10 回膜貫通)、SecE (14 kDa、3 回膜貫通)、SecG (11 kDa、2 回膜貫通) の各サブユニットが 1:1:1 で複合体を形成する膜タンパク質複合体である。Sec トランスロコンの高分解能の結晶構造は、古細菌の SecYE β 複合体や細菌の SecYEG 複合体 (図 2) など複数のグループから報告されている^{28, 29, 30, 31}。SecY はチャネル構造を形成するタンパク質であり、SecE が SecY の背側に結合してチャネル構造の形成や安定性に寄与する。SecY と SecE は、どちらも大腸菌において必須遺伝子である。SecG は SecE とは独立に SecY と結合し³² 膜透過反応を促進する因子である。SecG の欠損は致死ではないが、欠損株は低温感受性を示し³³、膜透過促進の効果も低温条件や PMF が存在しない条件において顕著に見られることが報告されている³⁴。また、SecG は SecA の ATP 加水分解反応と共役して膜上でのトポロジを反転させることが報告されている³⁵。

SecY の主要なドメインとして、ポアリング、プラグ (図 2C)、ラテラルゲート (図 2B) がある。ポアリングは、チャネル中央に円を描く形で配置されている 6 つの Ile 残基から構成され、このリングの中をペプチドが透過すると考えられている^{36, 39}。プラグは、ペリプラズム側のヘリックス 2a から構成され、SecY がクローズ状態にいるときにポアを後ろから塞ぐ形で不必要なイオンの透過を防ぐ働きをしている^{36, 37}。ラテラルゲートは SecY の膜貫通ヘリックス 2 と 7 (TM2, 7) の間で形成される。SecY がオープン状態のときには、このラテラルゲートが開き、分泌タンパク質のシグナル配列が膜透過の開始反応に伴ってこのスペースに入ると考えられている^{38, 39, 40}。また、ラテラルゲートは、膜タンパク質の膜貫通ヘリックスが SecY から脂質膜へと移行する際の出口になると考えられている⁴¹。

1980 年代からの SecYEG の遺伝学では、分泌タンパク質のシグナル配列の変異で膜透過効率が低下した株のサプレッサー変異として、prl (protein localization) 変異と呼ばれる一連の変異体が SecY、SecE、SecG の遺伝子の中に複数見つかった。SecY の prl 変異の多くは、ポアリングやプラグの領域に多く見つかり、これらの領域に変異が入ることによって SecY のオープン構造が安定化されると考えられている⁴²。

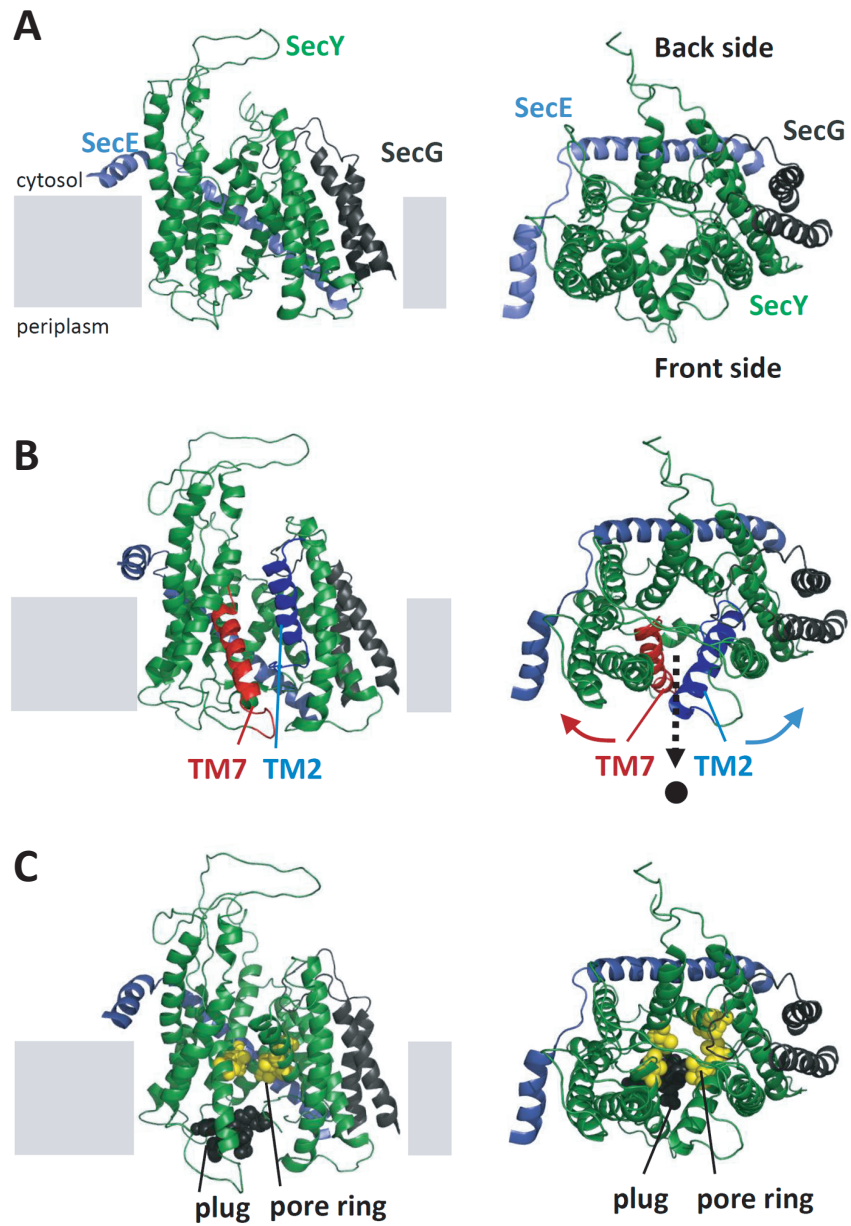


図 2. SecYEG トランスロコンの構造

Thermotoga maritima の SecYEG トランスロコンの構造 (PDB: 3DIN). ラテラルゲートは膜タンパク質が脂質膜へ移行する際のゲートとして、ポアリングは膜透過されるペプチドの通る穴として機能する。

1.4 大腸菌での SecYEG の合成と分解

SecY、SecE、SecG はそれぞれが膜タンパク質であり、細胞内では、すでに存在する SecYEG 複合体を介して膜挿入されると考えられている。パルスラベルを用いた実験から、形成された複合体間でのサブユニットの交換はみられないことが報告されているため、SecYEG 複合体は新規に合成されたサブユニットどうしで形成されると想定される⁴³。しかし、SecY のみを過剰発現させた場合に生じる余剰な SecY は膜上のプロテアーゼである FtsH によって半減期 2 分で速やかに分解される^{44,45}ことから、SecE と結合していない SecY は細胞膜上では非常に不安定であると考えられる。加えて、大腸菌において、SecY、SecE、SecG は別々のオペロンにコードされており、大腸菌の他の多くのタンパク複合体でみられるようなサブユニットが同一の mRNA から翻訳されるような機構⁴⁶はなく、タンパク質合成の場所と時間をそろえるような他の制御機構も見つかっていない。

1.5 本研究の目的

このような背景から、本研究では、大腸菌の SecYEG 複合体を無細胞翻訳系によって鋳型 DNA から合成し、膜タンパク質合成経路を無細胞翻訳系内に再構築することを目的とした。無細胞翻訳系として大腸菌翻訳系の再構成系である PURE system¹⁷を使用し、膜成分としてはリン脂質から構成される人工脂質膜であるリポソームを用いることによって、夾雑物を最小限に抑えた条件で、SecYEG のサブユニットが膜上で構造形成し機能発現に至るまでの過程を翻訳段階から構成論的に解析した。さらに、合成した SecYEG を基盤として膜タンパク質合成系を構築し、これまでの無細胞翻訳系では難しかった膜透過反応を伴う膜タンパク質合成反応を最小限の因子から再構成することを目指した。また、本研究内で SecYEG の無細胞合成系が確立されたことから、無細胞系によるタンパク質試料調製のスループット性を利用し、SecYEG による膜透過反応を 1 分子レベルでリアルタイムに観察することが可能な蛍光 1 分子観察系の構築を試みた。

2 方法

2.1 実験材料と試料調製

2.1.1 実験材料

リポソーム作製に用いた脂質は、L- α -Phosphatidylcholine from Soybean Type-IIS (P 5638) はシグマアルドリッチ社から、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (18:1 (Δ 9-Cis) PC (DOPC), 850375)、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (18:1 (Δ 9-Cis) PE (DOPE), 850725)、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (18:1 (Δ 9-Cis) PG (DOPG), 840475)、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (16:0-18:1 PC (POPC), 850457)、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (16:0-18:1 PG (POPG), 840457)、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE, 16:0-18:1 PE, 850757)、E. coli polar lipid extract (100600) は Avanti Polar Lipids 社から購入した。

再構築型無細胞翻訳系 PURE system は、ジーンフロンティア社から供給していただいた PUREflex[®]1.0 を用いた。また、合成するタンパク質の放射性同位体標識に用いた Methionine, L-[35S]- (NEG009A) や、ATP, [γ -³²P] (NEG002A) はパーキンエルマー社から、蛍光標識に用いた TAMRA-X-AF アンバーサプレッサー-tRNA (CLD02) はプロテイン・エクスプレス社からそれぞれ購入した。

プロテアーゼ処理で用いた Proteinase K Solution (20 mg/mL), RNA grade (25530-049) は Invitrogen (現サーモフィッシャーサイエンティフィック) 社から、Enterokinase (from bovine intestine, E4906) はシグマアルドリッチ社から、HRV 3C Protease (7360) はタカラバイオ社から購入した。

薄層クロマトグラフィーの標準サンプルに用いた MPlase は、岩手大学の西山賢一教授よりご提供いただいた。また、タンパク質精製などに用いた *n*-Dodecyl- β -D-maltoside (DDM, 和光コード: 347-06163) は同仁化学研究所から購入した。

酵素活性測定に用いた蛍光性基質 Fluorocillin[™] Green 495/525 (F33952) と AttoPhos[®] (S1000) は、それぞれ life technologies 社とプロメガ社から購入した。

2.1.2 プラスミドと大腸菌株

大腸菌からの SecYEG の発現精製には、図 3 に示した pBAD22 6 \times His SecEYG プラスミドを用いた。このプラスミドは、6 \times His SecE、SecY、SecG、LeuU の遺伝子 (大腸菌) が EcoR I サイト (1311-1316) と HindIII サイト (1361-1366) の間にコードされたものである。PURE system での pOmpA と YidC の合成には、それらの ORF を含んだ pET29 プラスミドを用いた。どちらも大腸菌の pOmpA、YidC の ORF が Nde I と EcoR I サイトの間にコードされて

おり、YidC のみ EcoR I の手前に終止コドンを含まないため、C 末端に 6xHis-tag を持つ。Ffh 発現株である JM109/pTac-Ffh、pOmpF-Lpp の配列を含む pK125 プラスミドは岩手大学の西山賢一教授よりご提供いただいた。

また、SecY などの変異導入には、PrimeSTAR® MAX DNA Polymerase (タカラバイオ社、R045A) を用いた。

```

EcoR I   secE
GAATTCctA TGcaccatca ccatcaccat GGCggGCCAA GTGCGAATAC CGAAGCTCAA GGAAGCGGGC GCGGCCGTGA AGCGATGAAG TGGTCGTTG 100
        6 x His
TGGTGGCATT GCTCCTGGT GCGATTGTC GCAACTATCT TTATCGCGAC ATTATGCTGC CGCTGCGTGC GCTGGCCGTA GTAATTCTGA TTGCTGCAGC 200
GGTGGTGTG GCGCTGTAA CGACAAAAGG TAAAGCTACC GTTGCTTTTG CCCGTGAAGC GCGTACCGAA GTCGCTAAGG TCATTTGGCC GACTCGCCAG 300
GAAACATTGC ACACCACGCT GATTGTGGCT GCGGTTACCG CAGTAATGTC ACTGATCCTG TGGGACTGG ATGGTATTCT GGTTCGCTG GTATCCTTTA 400
TCACTGGCCT GAGGTTCTGA sal I          secY
gtcgacagga ataagtagca gATGGCTAAA CAACCGGAT TAGATTTTCA AAGTGCCAAA GGTGGCTTAG GCGAGCTGAA 500
ACGCAGACTG CTGTTTGTTA TCGGTGCGCT GATTGTGTC CGTATTGGCT CTTTTATTCC GATCCCTGGT ATTGATGCCG CTGACTTGC CAAACTGCTT 600
GAGCAACAGC GAGGCACCAT CATTGAGATG TTTAACATGT TCTCTGGTGG TGCTCTCAGC CGTGCTTCTA TCTTTGCTCT GGGGATCATG CCGTATATTT 700
CGGCGTCGAT CATTATCCAG CTGCTGACGG TGGTTCACCC AACGTTGGCA GAAATTAAGA AAGAAGGGGA GTCTGGTCGT CGTAAGATCA GCCAGTACAC 800
CCGCTACGGT ACTCTGGTGC TGCCAATATT CCAGTCGATC GGTATTGCTA CCGGCTGCC GAATATGCTT GGTATGCAAG GCCTGGTAT TAACCCGGGC 900
TTTGACTCT ACTTCACCGC TGTGTAAGT CTGGTCACAG GAACCATGTT CCTGATGTGG TTGGGCGAAC AGATTACTGA ACGAGGTATC GGCAACGGTA 1000
TTTCAATCAT TATCTTCGCC GGTATTGTCG CGGGACTCCC GCCAGCCATT GCCCATACTA TCGAGCAAGC GCGTCAAGGC GACCTGCAC TCTCGTGT 1100
GCTGTTGGT GCAATATTAG TATTTGAGT GACGTTCTTT GTTGATTGTT TTGAGCGTGG TCAACGCCGG ATTGTGGTAA ACTACGGAA ACGTCAGCAA 1200
GGTGTGCTG TCTATGCTGC ACAGAGCACA CATTACCGC TGAAGTGAA TATGGCGGGG GTAATCCCGG CAATCTTCGC TTCCAGTATT ATTCTGTCC 1300
CGGCGACCAT CCGCTCATGG TTCGGGGGCG GTACTGGTGG GAACTGGCTG ACAACAATTT CGCTGTATTT GCAGCCTGGG CAACCGCTTT ATGTGTTACT 1400
CTATGCTGCT GCAATCATCT TCTTCTGTTT CTTCTACAGC GCGTTGGTTC TCAACCCGCG TGAACAGCA GATAACCTGA AGAAGTCCGG TGCATTTGTA 1500
CCAGGAATTC GTCCGGGAGA GCAAACGGCG AAGTATATCG ATAAAGTAAT GACCCGCTG ACCCTGGTTG GTGCGCTGTA TATTACCTTT ATCTGCTGTA 1600
TCCCGGAGTT CATGCGTGAT GCAATGAAAG TACCGTTCTA CTCGCTGGG ACCTCACTGC TTATCGTTGT TGTGCTGATT ATGGACTTTA TGGTCAAGT 1700
GCAAACCTG ATGATGTCCA GTCAGTATGA GTCTGCATTG AAGAAGGCGA ACCTGAAAGG CTACGGCCGA TAAaagcttc tagagtattc acacccgctt 1800
cagtgggaaa gattaanaac tcccgottta ttggttgaag cattgttacg cggcaactcc gcaaggaaca ggttgattAT GTATGAAGCT CTTTGTAGT 1900
TTTTCTTAT TGTGGCAATT GGCCTTGTG GTCTGATCAT GCTGCAGCAA GGTAAGGCG CTGATATGGG AGCCTCCTTC GGAGCAGGGC CTTCCGCTAC 2000
GCTGTTGGT TCAAGTGGT CTGGTAACTT CATGACCGC ATGACGGCGC TGCTGGCAAC GTTATTCTTC ATCATCAGTC TGGTGTGGG TAACATCAAT 2100
AGCAACAAAA CCAATAAAGG TAGCGAATGG GAAAATCTGA GTGCACCGC GAAAACCGAA CAAACTCAGC CAGCTGCTCC GGCTAAGCCG ACCAGCGATA 2200
TCCCGAACTA Aaaagtagta leuU
tccgtGCCGA GGTGGTGGAA TTGGTAGACA CGCTACCTTG AGGTGGTAGT GCCCAATAGG GCTTACGGGT TCAAGTCCCG 2300
TCCTCGGTAC CAaattccag aaaagagacg ctgaaaagcg tcttttttcg ttttggtoct ggtctgagga atggttgtaa GCTT
Hind III

```

図 3. pBAD22 6xHis SecEYG プラスミドの配列情報
pBAD22 プラスミドに , 6xHis SecE, SecY, SecG, LeuU の遺伝子がコードされている .

2.1.3 PURE system 反応液に用いる鋳型 DNA の調製

PURE system でのタンパク質合成に PCR 産物を用いる場合は、2 ステップ PCR⁴⁷ によって鋳型 DNA を調製し、開始コドンの 5'側に GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA (一重線: T7 promoter, 二重線: SD 配列) を、終始コドンの 3'側に TGAATAACTAATCC (ジーンフロンティア社で推奨されている 10 塩基以上の任意の配列) を付加した。PCR には、KOD-plus (東洋紡社、KOD-201) を用いた。

1 段階目の PCR では、開始コドンから始まるアニーリング配列の 5'側に CTTTAAGAAGGAGATATACCA を付加した forward プライマーと、終始コドンを含むアニーリング配列に GGATTAGTTATTCA を付加した reverse プライマーを用いた。PCR の鋳型配列は、各遺伝子をコードしたプラスミドや大腸菌 A19 ゲノムを KOD-plus のプロトコルに準拠した濃度で使用した。2 段階目の PCR では、forward プライマーに universal プライマー (GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA) を、reverse プライマーに 1 段階目と同じ reverse プライマーを用いた。鋳型配列は、1 段階目の PCR 産物を Milli-Q で直接 100 倍希釈したものをを用いた。

目的配列は、2 段階目の PCR で完成するが、実験で用いる十分量を確保するために増幅するための PCR を行った。Forward プライマーは amplify プライマー (GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTT) を、reverse プライマーは 1 段階目、2 段階目と同じものをを用いた。鋳型配列は、2 段階目の PCR 産物を Milli-Q で直接 10 倍希釈したものをを用いた。調製した PCR 産物は、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社, 28104) によって精製した。精製の際、基本的には溶出に Milli-Q を用いたが、長期保存する場合は TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA) で溶出した。TE buffer で溶出した DNA は Milli-Q で 3-5 倍希釈したものを PURE system に添加して用いた。SecY、SecE、SecG、LepB、OmpA (Δ signal)、pOmpF-Lpp の鋳型 DNA はこの方法によって調製した。

2.1.4 SecYEG の精製

pBAD22 6×His SecEYG プラスミドを形質転換した BL21 (DE3) を 100 μ g/mL アンピシリンを添加した LB 液体培地中、37°C で一晩前培養した。本培養は、100 μ g/mL アンピシリンを添加した 2×YT 培地 1 L につき、前培養液 1 mL を植えつぎ、30°C で培養した。対数増殖期 ($OD_{660} = 0.5-0.6$) に、各 1 L の本培養溶液に対して 25%アラビノースをそれぞれ 50 mL ずつ加えて発現誘導を行った。発現誘導から 4 時間 30°C で培養後、集菌し、液体窒素で凍結後-80°C で保存した。

菌体を buffer A (50 mM Triethanolamine-OAc (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 250 mM sucrose) で再懸濁し、フレンチプレス (10,000 psi, 3 回) によって破碎した。未破

碎菌体を遠心 (9,000 \times g, 30 min, 4°C) によって除去し、上清を Type 45 Ti rotor (Beckman 社) を用いて超遠心 (44,000 rpm \approx 150,000 \times g (avg), 2 hour, 4°C) することで、大腸菌の膜画分のペレットを得た。得られたペレットは、Loose タイプのホモジナイザー (7 mL または 15 mL サイズ) を用いて buffer A で再懸濁した。

膜画分をsucroseで作製した密度勾配の層 (上から、0.77 M sucrose 10 mL、1.44 M sucrose 12 mL、 2.02 M sucrose 12 mLで、それぞれ50 mM Triethanolamine-OAc (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTTを含む) の上に重層し、SW28 rotor (Beckman社) で超遠心 (25,000 rpm \approx 80,000 \times g (avg), 16 hour, 4°C) した。0.77 M sucrose 層と1.44 M sucrose 層の間に得られる内膜画分を 5 mL程度ずつ回収した。50 mM Triethanolamine-OAc (pH 7.5) で5倍以上希釈し、再度Type 45 Ti rotor (Beckman) にて遠心 (44,000 rpm \approx 150,000 \times g (avg), 2 hour, 4°C) し、沈殿した内膜をLooseタイプのホモジナイザー (7 mLまたは15 mLサイズ) を用いてbuffer (50 mM Triethanolamine-OAc (pH 7.5), 1 mM DTT, 250 mM sucrose) で再懸濁した。得られた溶液を反転内膜小胞として回収し、液体窒素で凍結後-80°Cで保存した。

反転内膜小胞のタンパク質濃度をブラッドフォード法によって定量し、タンパク質濃度が2 mg/mLになるように、buffer (Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 20% (v/v) glycerol, 1% (w/v) DDM) で希釈し、50 mLチューブ中、4°Cで回転させながら膜タンパク質を可溶化した。不溶性画分をType 70 Ti rotor (Beckman社) で超遠心 (48,000 rpm \approx 170,000 \times g (avg), 30 min, 4°C) することで除去し、上清をSecEのN末端に付加した6 \times His-tagによるHis-tag精製に用いた。タンパク質総量20 mgに対して1 mLのTALON® Metal Affinity Resin (Clontech社、635501) を用い、樹脂は使用前にbuffer B (Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 20% (v/v) glycerol, 0.02% (w/v) DDM) で平衡化した。平衡化した樹脂にサンプルを加え、50 mLチューブ中で、4°Cで30分回転させながら攪拌することで樹脂への結合を行った。溶液をオープンカラムに移し、10 column volume (CV) のbuffer Bで洗浄したのち、buffer B中のimidazole濃度を段階的に上げて溶出した (10 mM 1 \times 5 mL, 25 mM 5 \times 1 mL, 50 mM 5 \times 1 mL, 250 mM 5 \times 1 mL, 500 mM 1 \times 5 mL)。SecYEGを含む画分をSDS-PAGEとCBB染色によって確認し、回収したサンプルを液体窒素で凍結後-80°Cで保存した。Amicon Ultra (Milipore社) などによる濃縮は、SecYEGを損失する一方、不必要にDDMを濃縮させるため行わなかった。

2.1.5 SecA の精製

SecA の大腸菌からの発現は、車らの報告¹⁸に基づいて行った。SecA を過剰発現させた 1 L 分の菌体を 30 mL の buffer C (50 mM Triethanolamine-OAc (pH 7.8), 10% (w/v) sucrose, 0.1 mM PMSF) で懸濁し、フレンチプレス (10,000 psi, 3 回) で破碎した。遠心 (9,000 ×g, 30 min, 4°C) によって未破碎菌体を除去し、上清をさらに Type 45 Ti rotor (Beckman 社) で超遠心 (36,000 rpm ≈ 100,000 ×g (avg), 2.5 hour, 4°C) することで膜画分を沈殿させて除去した。超遠心の上清を硫酸アンモニウム分画によって SecA を含む画分を得た。具体的には、まず 30%硫酸アンモニウム中 4°C で 45 分攪拌したのち遠心 (9,000 ×g, 20 min, 4°C) することによって、不要なタンパク質を沈殿として除去した。残った上清にさらに硫酸アンモニウムを 60%になるまで加え、4°C で 45 分攪拌したのち、遠心 (9,000 ×g, 20 min, 4°C) によって SecA が含まれる画分を沈殿させ回収した。沈殿画分を 4–5 mL の buffer D (50 mM KPO₄ (pH 7.5), 0.1 mM PMSF) で再懸濁したものを buffer D に対して透析した。

SecA を含むサンプルは ÄKTAexplorer (GE Healthcare 社) を用いて hydroxylapatite カラム (8 mL column、研究室にて作製) で精製した。buffer E (10 mM KPO₄ (pH 7.5), 10 mM KCl, 10% (v/v) glycerol) で平衡化したカラムにサンプルを導入し、buffer E で 280 nm の吸光度の値が十分低くなるまで洗浄したのち、10 mM から 400 mM までの KPO₄ (pH 7.5) 濃度勾配を 80 mL (10 CV) かけて溶出した。SecA が含まれる画分を SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを Amicon Ultra (Milipore 社) によって濃縮した。

次に、Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare 社) カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーによる精製を行った。カラムは、事前に buffer F (50 mM KPO₄ (pH 7.5), 10% (v/v) glycerol) で平衡化し、サンプル導入、溶出は buffer F で 0.5 mL/min の一定流速で行った。SecA が含まれる画分を SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを Amicon Ultra (Milipore) によって濃縮したのち、液体窒素で凍結後 -80°C で保存した。

2.1.6 SecB の精製

SecB の大腸菌からの発現精製は、車らの報告¹⁸に準拠した方法で行った。簡潔には、N 末端に 6xHis-tag を付加した SecB を BL21(DE3) 株から IPTG 誘導によって過剰発現し、タンパク質を、ÄKTAexplorer (GE Healthcare 社) を用いて His Trap カラムと Hi-Trap Q カラムで精製した。

2.1.7 SRP の精製

JM109/pTac-Ffh を対数増殖期に 0.1 mM IPTG によって発現誘導し、37°C でさらに 2.5 時間培養したのち、集菌した。buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂,

20% (v/v) glycerol, 0.1 mM PMSF) で再懸濁した菌体をフレンチプレス (10,000 psi 3回) によって破碎した。超遠心 (30,000 \times g, 30 min, 4°C) に未破碎菌体などを沈殿させて除去し、上清を Milli-Q で洗浄した TALON® Metal Affinity Resin (Clontech 社、635501) 2 mL に導入した。一度目のフロースルーをもう一度カラムに導入したのち、buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 20% (v/v) glycerol) 中の imidazole 濃度を段階的に上げる (10, 25, 50, 100, 150, 250, 300, 400 mM) ことによって溶出した。Ffh が含まれる画分を SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 150 mM KOAc, 10mM Mg(OAc)₂, 50% (v/v) glycerol) に対して透析したのち、液体窒素で凍結し-80°C で保存した。Ffh は凍結融解によってタンパク質の凝集を生じやすいため、保存は少量に分注して行い、実験で使用するチューブは-20°C で保存した。SRP の構成要素である 4.5S RNA は、共発現などを行わなくても複合体形成することが知られている¹⁸ ために、共発現は行わなかった。

2.1.8 FtsY の精製

FtsY の大腸菌からの発現は、車らの報告¹⁸ に基づいて行った。pET30-FtsY を形質転換した BL21 (DE3) 株を 50 μ g/mL カナマイシンを添加した LB 液体培地中、37°C で一晩前培養した。本培養は、50 μ g/mL カナマイシンを添加した LB 培地 1 L につき、前培養液 10 mL を植えつぎ、37°C で 2 時間半培養したのち、対数増殖期 (OD₆₆₀ = 0.4–0.5) に、0.1 mM IPTG を加えて発現誘導を行った。発現誘導から 3 時間 37°C で培養後、集菌し、液体窒素で凍結後 -80°C で保存した。

2 L 分の菌体を 200 mL の buffer G (50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 300 mM KCl) で懸濁し、フレンチプレス (10,000 psi, 3回) で破碎した。破碎液を Type 45 Ti rotor (Beckman 社) で超遠心 (36,000 rpm \approx 100,000 \times g (avg), 1 hour, 4°C) することで未破碎菌体などを除去した。FtsY を含むサンプルは ÄKTAexplorer (GE Healthcare 社) を用いて His Trap HP カラム (5 mL, GE Healthcare 社) で精製した。buffer G で平衡化したカラムにサンプルを導入し、25 mM imidazole を含む buffer G で 280 nm の吸光度が十分低くなるまで洗浄したのち、25 mM から 200 mM までの imidazole 濃度勾配を 50 mL (10 CV) かけて溶出した。FtsY が含まれる画分を SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを buffer G に対して透析した。

次に、Hi-Trap Q カラム (5 mL, GE Healthcare 社) を用いたイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 60 mM NaCl) で平衡化したカラムにサンプルを導入し、60 mM から 500 mM までの NaCl 濃度勾配を 75 mL (15 CV) かけて溶出した。FtsY が含まれる画分を SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 60 mM NaCl, 20% (v/v) glycerol) に対して透析したのち、液体窒素で凍結後-80°C で保存した。

2.1.9 リポソームの調製

Soybean 脂質抽出物 (シグマアルドリッチ社) からのリポソーム作製は、下記の手順で行った。まず、Soybean 脂質の粉にアセトンを加えて攪拌し沈殿物を回収する操作を 3 回繰り返し脂質の洗浄を行ったのち、残存するアセトンを真空乾燥によって除去した。1.5 mL チューブ中で脂質の粉に対して buffer H (50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 1 mM DTT) を脂質の濃度が 44 mg/mL になるように加え、チューブを固定した状態で 30 分ボルテックスした。次に、液体窒素と 37°C 恒温槽を使って凍結融解を 3 回繰り返したのち、小型デジタル超音波ホモジナイザー (20kHz, BRANSON 社) で溶液に透明度が出るまで超音波処理した。得られたリポソームの半径を動的光散乱測定機 (Viscotek 802 DLS) で測定し、液体窒素で凍結後-80°C で保存した。

POPC などの合成脂質からなるリポソームや複数種類の組成からなるリポソームを作製する場合は、フィルムハイドレーション法によるリポソーム作製を行った。まず、クロロホルムに溶解している脂質か、あるいは、脂質の粉末を 25 mg/mL 前後の濃度でクロロホルムに溶解させた脂質を用意し、ナス型フラスコの中で混合した。複数種類の脂質からリポソームを作製する場合は、脂質の混合後にバスソニケーター (Elmasonic 社、S 30H) で超音波処理した。ナス型フラスコをロータリーエバポレーター (EYELA 社、N-1110) に接続しナス型フラスコを水浴で 45°C に温めた状態で、クロロホルムの波がたたない範囲でなるべく速いスピートで回転させながら、真空ポンプで少しずつ内部を減圧してクロロホルムを蒸発させ、そのまま 5-10 分放置し、脂質フィルムを作製した。ナス型フラスコを、一晩真空乾燥させて完全に溶媒を蒸発、除去した。次に、脂質のフィルムに buffer H を脂質濃度が 20-45 mg/mL になるように加え、超音波処理とボルテックスを使って脂質フィルムを buffer H に溶解した。次に、脂質溶液を 1.5 mL チューブに移し、液体窒素と 37°C 恒温槽を使って凍結融解を 3 回繰り返してから、小型デジタル超音波ホモジナイザー (20kHz, BRANSON 社) で溶液に透明度が出るまで超音波処理した。得られたリポソームの半径を動的光散乱測定機 (Viscotek 802 DLS) で測定し、液体窒素で凍結後-80°C で保存した。

使用するリポソームは、毎回室温で融解し、バスソニケーターで 10-20 秒超音波処理してから使用した。使用後は、液体窒素で凍結後-80°C で保存した。

2.1.10 SecYEG プロテオリポソームの調製

大腸菌の SecYEG を用いた SecYEG プロテオリポソームの作製は下記の手順で行った。まず、soybean リポソーム (2.25 mg lipids) と SecYEG (7.5 µg) を buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 1 mM DTT, 1.5% (w/v) n-Octyl-β-D-glucoside (OG)) 200 µL 中、4°C で 30 分、1.5 mL チュ

ープ中で回転して混合した。buffer H (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 1 mM DTT) 500 mL に対して 14 kDa cut-off 透析膜を用いて 6 時間以上 2 回透析し、OG を除去することでプロテオリポソーム を形成させた。TLA-100.2 rotor (Beckman 社) を用いて超遠心 (67,000 rpm \approx 160,000 \times g (avg), 2 hour, 4°C) してプロテオリポソームを沈殿させ、100 μ L の buffer H で再懸濁し、得られたプロテオリポソームは液体窒素で凍結後-80°C で保存した。この条件で作製した SecYEG プロテオリポソーム は、ストック濃度として、SecYEG 75 μ g/mL (\approx 1 μ M)、脂質 22 mg/mL を含む。プロテオリポソームは使用前に 4°C で融解し、バスソニケーターで数秒超音波処理してから使用した。

2.2 無細胞翻訳系 (PURE system) と生化学実験の方法

2.2.1 無細胞翻訳系 (PURE system) によるタンパク質の合成

無細胞タンパク質合成反応は PUREfrex®1.0 (ジーンフロンティア社) を用いて行った。合成されるタンパク質を放射性同位体によって標識する際は、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン 10 μM を 50 μL の PUREfrex®反応液に 1 μL 加えた (final 200 nM $[^{35}\text{S}]$ メチオニン)。SecYEG の合成は、特に明記しない場合は、4.4 mg/mL soybean liposome 存在下で、30°C、3 時間の条件で行った。

2.2.2 放射性同位体標識されたタンパク質の検出と定量

$[^{35}\text{S}]$ メチオニンによるタンパク質の定量は下記の手順で行った。泳動後の SDS-PAGE のゲルをろ紙とラップではさみ、RapiDry ゲルドライヤー (ATTO 社) で乾燥させた。乾燥させたゲルと、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンの希釈系列を 10 μL ずつスポットした検量線用紙をカセットにはさんで IP プレートを一晩露光した。IP プレートを BAS-5000 (富士フィルム社) によって検出し、Multi Gauge (富士フィルム社) を用いて定量した。

2.2.3 Flotation 法

合成した SecY、SecE、SecG の膜局在化を評価するために行った、Flotation 法による PUREfrex®反応液からのリポソーム画分の分離は下記の手順で行った。15 μL の PUREfrex®反応液に対し、220 ng/ μL RNase A を 1.5 μL (final 20 ng/ μL) 加え、30°C で 10 分処理した。サンプルから 4.4 μL 分 (4 μL PUREfrex®反応液相当量) を取り出し、直接 SDS-Loading Dye と混ぜて total 画分として回収した。残りのサンプルから 11 μL (10 μL PUREfrex®反応液相当) を 19 μL の 2.4 M Sucrose buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM KCl, and 10 mM MgCl_2 , 2.4 M sucrose) と混ぜ、TLA-100 rotor (Beckman 社) 用の遠心チューブの底に充填し、その上に 30 μL の 0 M Sucrose buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM KCl, and 10 mM MgCl_2) を重層した。超遠心 (100,000 rpm \approx 386,000 $\times g$ (avg), 3 hour, 4°C) によってリポソームを上清画分 (sup) に、リポソームに膜挿入しなかったタンパク質を沈殿画分 (ppt) に分離した。沈殿画分は 60 μL の 0 M Sucrose buffer を加え、バスソニケーターを用いて再懸濁した。両画分をさらに TCA 沈殿したのち、SDS-Loading Dye で沈殿を溶解し、SDS-PAGE を行い、sup/total の値から膜局在化率を算出した。

2.2.4 TCA 沈殿

SDS-PAGE 前にサンプルを濃縮する必要がある場合や、プロテアーゼ処理などの後にプロテアーゼを失活させる必要がある場合は、TCA 沈殿を行った。まず、反応液の半分の容量の 30% TCA (final 10% TCA) を加え、氷上で 30 分静置した。遠心 (20,000 ×g, >40 min, 4°C) によってタンパク質を沈殿させたのち、上清を除去した。沈殿に対して、アセトン 150 μL を加えバスソニケーターで沈殿を壊し、再度遠心 (20,000 ×g, >30 min, 4°C) でタンパク質を沈殿させた。その後、上清を除去し、アセトンを蒸発させ、残ったタンパク質の沈殿に SDS-Lading dye を加え超音波処理とボルテックスで溶解した。

2.2.5 Enterokinase 処理

SecY と SecE の膜上での配向を決定するための Enterokinase によるペプチド切断反応は先行研究⁴⁸に準拠し、下記の手順で行った。Enterokinase はペプチド配列 DDDDK の C 末端側を切断するため、タンパク質の N 末端の配向を決定する際には、SecY や SecE の N 末端に MHHHHHDDDDKA 配列を付加したコンストラクトを用いた。また、C 末端の配向を決定する際には、SecY や SecE の C 末端に DDDDKHHHHH 配列を付加したコンストラクトを用いた。切断配列が付加された SecY または SecE は野生型の他のサブユニットと共発現させた。12 μL の PUREfrex[®] 反応液に 1.2 μL の 330 ng/μL chloramphenicol (final 30 ng/μL) を加えて翻訳反応を停止させたのち、さらに、EK buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 4 mM CaCl₂) で 2 倍希釈した。つづいて、サンプルを 8 μL ずつ 3 つの画分に分けた。1 つめの画分 (EK-/DDM-) は 8 μL のサンプルに 8 μL の EK buffer と 4 μL の EK stock buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 2 mM CaCl₂, 20% (v/v) glycerol) を加えた。2 つめの画分 (EK+/DDM-) は、8 μL のサンプルに 8 μL の EK buffer と 4 μL の Enterokinase (購入した ≥ 0.1 mg/mL, ≥ 20 units/mg 溶液を EK stock buffer で 20 倍希釈したもの) を加えた。3 つめの画分 (EK+/DDM+) は、8 μL のサンプルに 8 μL の 1% DDM EK buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 4 mM CaCl₂, 1% (w/v) DDM) と 4 μL の Enterokinase (同上) を加えた。切断反応は、37°C で 2 時間行い、その後 SDS-PAGE によって切断効率を評価した。

2.2.6 3C protease 処理

3C protease はペプチド配列 LEVLFQGP を認識し、Q と G の間のペプチド結合を切断するため、SecY の細胞質側の 3 番目のループ (C3 Loop) 内の 243 残基目のアミノ酸から 250 残基目のアミノ酸までの配列 RIVVNYAK を LEVLFQGP に置換したコンストラクトを作製した。コンストラクト作製の際には、8 アミノ酸単位のハイドロパシースコアの合計値について、ペプチド配列の置換前後での変化が最小になる領域を C3 Loop 内から選択した。切

断配列が置換された SecY は野生型の SecE、SecG と共発現させた。32 μL の PUREfreflex[®] 反応液に 3.2 μL の 220 ng/ μL RNase A (final 20 ng/ μL) を加えて翻訳反応を停止させたのち、サンプルを 6.6 μL (PUREfreflex[®] 反応液 6 μL 相当) ずつ 3 つの画分に分けた。1 つめの画分 (3C-/DDM-) は 6.6 μL のサンプルに 3.3 μL の 4x 3C buffer (200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 600 mM NaCl) と 3.3 μL の 3C buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl) を加えた。2 つめの画分 (3C+/DDM-) は、6.6 μL のサンプルに 3.3 μL の 4x 3C buffer と 3.3 μL の 3C protease (購入した 1 units/ μL 溶液を 3C buffer で 10 倍希釈したもの) を加えた。3 つめの画分 (3C+/DDM+) は、6.6 μL のサンプルに 3.3 μL の 4% DDM 4 x 3C buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% (w/v) DDM) と 3.3 μL の 3C protease (同上) を加えた。切断反応は、4 $^{\circ}\text{C}$ で 17 時間行い、その後 SDS-PAGE によって切断効率を評価した。

2.2.7 Blue Native PAGE

Blue Native PAGE は NativePAGE[™] Novex[®] Bis-Tris Gel System (Invitrogen 社, 現サーモフィッシュャーサイエンティフィック社) を用いて行った。タンパク質合成は 2.2.1 の通りに行い、ウエスタンブロットティングを行う場合には、^[35S]メチオニンを反応系から除いた。5 μL の PUREfreflex[®] 反応液に 0.5 μL の RNase A (220 ng/ μL) を加えて合成反応を停止したのち、50 mM HEPES-KOH (pH 7.5) を 4.5 μL 、0.8 % DDM を含む 2x sample buffer を 10 μL 加え、氷上で 20 分静置した。さらに、サンプルには、泳動する直前に 1% coomassie G-250 溶液を 2 μL 加え、合計で 22 μL あるうちの 20 μL をゲルにロードし泳動した。泳動は、4-16%のグラジエントゲルを使用し、4 $^{\circ}\text{C}$ で電圧が 120 V を超えない条件で行った。

ウエスタンブロットティングを行う場合は、泳動が 1/3 程度進んだ段階で cathode buffer の cathode additive 濃度を 10 倍希釈して残りの泳動を行った。泳動後のゲルは、denature buffer (20 mM Tris-HCl (pH 6.8), 1 % (w/v) SDS, and 100 mM 2-mercaptoethanol) に浸し、60 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分振盪したのち、PVDF 膜に対してブロットティングした。1 次抗体には、岩手大学の西山教授からいただいた SecY、SecE、SecG に対するウサギ抗体を用い、2 次抗体には HRP を標識した anti-rabbit IgG 抗体を用い、ECL[™] Western Blotting Detection Reagents (GE healthcare 社) と Las-1000 (富士フィルム社) で検出した。

2.2.8 pOmpA、pOmpF-Lpp の co-translational 膜透過反応

SecYEG の活性評価で行った pOmpA の co-translational 膜透過反応は下記の手順で行った。まず、5 μL の PUREfreflex[®] 反応液で SecYEG を 2.2.1 の手順で合成した。このとき、SecYEG の標識は行わないため、^[35S]メチオニンは反応系から除いた。次に、SecYEG の反応液を新しく調製した pOmpA を合成するための PUREfreflex[®] 反応液 5 μL と混合した。pOmpA の PUREfreflex[®] 反応液には、SecA、SecB、pET29b pOmpA プラスミド、^[35S]メチオニンを添加し

た。SecYEG の PUREfrex®反応液との混合後のそれぞれの濃度は、SecA: 1 μ M、SecB: 4 μ M (4量体として)、pET29 pOmpA: 14 nM、[³⁵S]メチオニン: 200 nM となるようにした。混合した反応液を 30°C で、pOmpA の合成と膜透過反応を行った。反応後、RNase A を終濃度 20 ng/ μ L で加え、PK 処理したのち、TCA 沈殿を行った。

pOmpF-Lpp を基質とした膜透過反応は、PCR で調製した pOmpF-Lpp の鋳型を用いて、pOmpA の膜透過反応と同様に行った。

2.2.9 Protease K (PK) 処理

膜透過活性を評価するための PK 処理は下記の手順で行った。まず、膜透過反応後の反応液を等量ずつ 2 つの画分に分けた。一方の画分には、反応液と等量の 50 mM HEPES-KOH (pH 7.6) を加えコントロールとした。もう一方の画分には、反応液と等量の 1 mg/mL の Protinase K (PK) 溶液を加え、終濃度 0.5 mg/mL の PK 溶液とした。25°C で 20 分 PK による分解反応を行い、リポソーム外部のタンパク質を分解したのち、反応液の半量の 30% TCA を加え (final 10% TCA)、56°C で 5 分間処理して PK を失活させた。以下、TCA 沈殿と同じ手順で SDS-PAGE のサンプルを調製した。

2.2.10 SecB-pOmpA 複合体の調製

Post-translational な膜透過反応の基質として用いる pOmpA は、西山らの報告⁴⁹に基づき、PUREfrex®1.0 を用いて *in vitro* で調製し、SecB の His-tag を用いて精製した。まず、反応液に SecB (4 量体として 5 μ M)、[³⁵S]メチオニン (216 nM)、pET29 pOmpA plasmid (20 ng/ μ L \approx 4.7 nM) を添加した 1 mL の PUREfrex®反応液を調製した。反応液を 50 μ L ずつ 8 連 PCR チューブ 20 本に分注し、30°C、1 時間タンパク質合成反応を行った。反応液を回収し、5 mL の buffer J (50 mM KPi (pH 7.5), 300 mM NaCl) を加え、さらに buffer J で平衡化した TALON® Metal Affinity Resin (Clontech 社、635501) 500 μ L を加えたのち、氷上で 30 分穏やかに混合した。混合液をカラムにロードし、5 mL の buffer W1 (50 mM KPi (pH 7.5), 300 mM NaCl, 10 mM imidazole) で 4 回、5 mL の buffer W2 (50 mM KPi (pH 7.5), 10 mM imidazole) で 2 回洗浄したのち、500 μ L の Elution buffer (50 mM KPi (pH 7.5), 250 mM imidazole) で 5 回に分けて溶出し、シンチレーションカウンター (ALOKA 社、LSC-6100) で測定した [³⁵S]メチオニンの放射量のピークの画分を回収した。回収したサンプルは、Amicon-Ultra (Milipore 社、4 mL size、30 kDa cut off) を使って、約 150 μ L まで濃縮した。濃縮したサンプルを 2 つのチューブに分け、Micro Bio-Spin 6 (BIO-RAD 社) を用い buffer (50 mM KPi (pH 7.5), 10% (v/v) glycerol) に buffer 交換して、残存する imidazole を除去した。調製したサンプルは液体窒素で凍結したのち、-80°C で保存した。

2.2.11 pOmpA の post-translational 膜透過反応

SecYEG による pOmpA の膜透過反応のタイムコースを測定する際には、SecYEG の存在量を固定するため、タンパク質合成反応を停止させたのちに膜透過反応を行った。SecYEG の合成は、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンを除いた PUREfrex[®]反応液 10 μL で行い、合成後に 1 μL の RNase A (final 20 ng/ μL) を加え、30°C で 15 分静置して翻訳反応を停止した。その後、反応液に 2 μL の 10 μM SecA (final 1 μM) と 7 μL の 1.2 μM SecB-pOmpA (final > 400 nM) を加え、30°C で膜透過反応を行った。各時点で protease K (final 0.5 mg/mL) を加え、4°C で静置して膜透過反応を停止したのち、PK 処理と TCA 沈殿を行い、膜透過した pOmpA の量を SDS-PAGE 上で pOmpA に含まれる $[^{35}\text{S}]$ メチオニンから定量した。

2.2.12 YidC と LepB の co-translational 膜挿入反応

YidC と LepB の膜挿入反応は、2.2.8 の pOmpA の co-translational な膜透過反応と同様の手順で行った。2 段階目の PUREfrex[®]反応液に、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンと YidC または LepB の鋳型 DNA を加え、また、SecA、SRP、FtsY をそれぞれ終濃度 1 μM 、56 nM、270 nM となるように加えた。YidC、LepB どちらの場合も合成と膜挿入反応は 30°C で 30 分行った。

2.2.13 SecA ATPase 反応

SecYEG に依存した SecA の ATP 加水分解活性の測定では、PUREfrex[®]に内在する ATPase の影響を抑えるため、まず、PUREfrex[®]反応液からの SecYEG リポソームの分離を行った。SecYEG 合成後の反応液 38 μL に 3.8 μL の RNase A (220 ng/ μL) を加え、30°C で 15 分静置し翻訳反応を停止したのち、162 μL の buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2) を加え 5 倍希釈したサンプルを TLA-100 rotor (Beckman 社) を用いて超遠心した (170,000 $\times g$, 3 hour, 4°C)。沈殿した SecYEG リポソームを 19 μL の buffer H (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 1 mM DTT) で再懸濁し、それを ATPase 反応の反応液に加えた。大腸菌由来の精製 SecYEG から再構成した SecYEG リポソームを用いた場合は、失活をさけるため、7.6 μL の SecYEG リポソーム (1 μM SecYEG, 22 mg/mL lipid) を RNase A 処理が終わったあとの PUREfrex[®]反応液 (反応系から SecYEG の鋳型 DNA とリポソームを除いたもの)と RNase A の混合液 35.2 μL に加えた。

50 μL の 7.5 mM ATP (cold) に 2 μL の γ - ^{32}P ATP を混合したものを、ATPase 反应用的 ATP-mix として使用した。ATPase 反応液は、2.5 μL の 1.25 μM SecA、2.5 μL の 400 nM SecB-pOmpA、6 μL の SecYEG リポソーム、12.5 μL の 2 \times buffer (100 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2)、0.5 μL ATP-mix と Milli-Q で合計 25.5 μL となるように調製した

(それぞれの因子の終濃度は、125 nM SecA、40 nM SecB-pOmpA、50 nM SecYEG、2.2 mg/mL lipid)。反応液の調製は氷上で行い、30°C で 10 分 ATPase 反応を行った。反応後の反応液に 5% sodium molybdate と acidic solution (200 mM H₂SO₄, 1.5 mM NaH₂SO₄) の 1:4 の混合液 125 μL を加えて反応を停止し、遊離されたリン酸をモリブデンとのキレート錯体として回収した。さらに、250 μL のイソプロパノールを加え 1 分間ボルテックスしたのち、遠心 (10,000 rpm, 1 min, 4°C) によって水層とイソプロパノール層を分離し、上層のイソプロパノール層から 200 μL 回収して 5 mL の ULTIMA Gold (PerkinElmer 社) に混合した。液体シンチレーションカウンター (ALOKA 社、LSC-6100) で ³²P の放射量を測定し、測定値を 1 μL の ATP-mix の放射量と比較し加水分解された ATP の量を算出した。

2.2.14 LepB によるシグナル配列の切断反応

LepB によるシグナル切断活性の評価は下記の手順で行った。まず、SecYEG の合成を 5 μL の PUREfrex[®] 反応液 ([³⁵S]メチオニンを除いたもの) で 30°C、3 時間行ったのち、反応液を新しく作製した PUREfrex[®] 反応液 5 μL と混合した。2 段階目の反応液には、SecA (final 1 μM)、SecB (4 量体として final 4 μM)、pET29b pOmpA (final 14.4 nM)、[³⁵S]メチオニン (216 nM) を加えて調整し、1 段階目の反応液と混合してから 30°C で 30 分、pOmpA の合成と膜透過を行った。その後、合計 10 μL の反応液に 0.5 μL の 200 nM LepB DNA (PCR にて調製) または Milli-Q を加え、さらに 30°C で 1 時間 LepB の合成、膜挿入、シグナル切断反応を行った。反応後のサンプルは PK 処理、TCA 沈殿、SDS-PAGE を行い pOmpA のシグナル切断を解析した。

2.2.15 脂質の分画と薄層クロマトグラフィー

Soybean の溶媒による分画は次の手順で行った。Soybean 脂質を 10 μg/μL の濃度でエタノールなどの溶媒に懸濁し、1.5 mL チューブ内でよくボルテックスしたのち、氷上で 30 分静置し、遠心 (20,000 xg, 4°C, 30 min) によって分離した。上清画分を別のチューブに移し、沈殿に対しては、solvent B (CHCl₃/ethanol/H₂O: 3/7/4) で再懸濁した。

薄層クロマトグラフィーは、西山らの報告⁵⁰に基づいて行った。上記で得られた脂質分画や liposome を脂質濃度 4 μg/μL に調整したものを 1 μL ずつ計 5 μL、TLC Silica gel 60G F₂₅₄ Glass plates (メルクミリポア社、100390) にスポットした。ガラス製の展開溶媒に深さ数 mm 程度になるように solvent B を浸し、そこにプレートを入れて蓋をしたのち、室温で 30-40 分放置して展開を行った。ここで、solvent B の溶液は混合比の多少のずれや室温によって溶解度合いが異なるため、溶解度が低く solvent ににごりを生じる場合は、H₂O の量を少なくした solvent を用いた (にごりのある solvent B では薄層クロマトグラフィーで良好な展開パターンが得られない)。展開後のプレートは、337.6 mL のエタノールに

p-methoxybenzaldehyde 9.23 mL、酢酸 3.76 mL、濃硫酸 12.5 mL を加えた (エタノール、酢酸、アニスアルデヒドの混合液をよく冷やしたのに対して、濃硫酸を低温室内で少しずつ滴下して調製した) アニスアルデヒド溶液に浸したのち、200°C に加熱して呈色した。

2.2.16 AmpC、PhoA の合成と活性測定

AmpC、PhoA の合成は、PUREfrex®1.0 を用いて行った。鋳型 DNA はそれぞれ、大腸菌のゲノムから PCR によって PUREfrex®用の鋳型を調製し、反応液に 5 nM の濃度で添加した。37°C で 90 分タンパク質合成反応を行い、PUREfrex®反応液をそのまま活性測定に用いた。

AmpC、PhoA の活性測定は、蛍光基質である Fluorocillin™ Green と AttoPhos®をそれぞれ用いて行い、日本分光社の蛍光分光器 FP-6500 によって酵素反応で生じる蛍光物質の量の時間変化を測定した。Fluorocillin™ Green による AmpC の活性測定の際には、PhoA の PUREfrex®反応液を対照サンプルとしてバックグラウンドの測定に用いた。逆に、AttoPhos®による PhoA の活性測定の際には、AmpC の PUREfrex®反応液を対照サンプルとしてバックグラウンドの測定に用いた。それぞれ酵素反応の測定は、室温で、1.5 mL の反応液中で行い、マグネチックスターラーで攪拌しながら測定した。

AmpC の活性測定は、buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 40 mM KCl, 2 mM MgCl₂) 1.5 mL に対して Fluorocillin™ Green 溶液 (Fluorocillin™ Green の粉末を 870 μM になるように DMSO で懸濁したもの) 1.5 μL を加えた反応液中で行い、測定開始の 50 秒後に PUREfrex®反応液 2 μL を添加した。蛍光測定は、励起光 495 nm の条件で、525 nm の蛍光の経時変化を測定した。

PhoA の活性測定は、buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5)) 1.4 mL に対して、AttoPhos 溶液 (AttoPhos®の粉末 (36 mg: 60 μmol) を付属の AttoPhos® buffer (2.4 M DEA, 57 μM MgCl₂, 0.005% NaN₃; (pH 10)) 60 mL で懸濁したもの) 100 μL を加えた反応液中で行い、測定開始の 50 秒後に PUREfrex®反応液 2 μL を添加した。蛍光測定は、励起光 435 nm の条件で、555 nm の蛍光の経時変化を測定した。

AmpC、PhoA の post-translational な膜透過反応は下記の手順で行った。まず、[³⁵S]メチオニン、SecA、SecB、SRP、FtsY をそれぞれ終濃度 200 nM、1 μM、4 μM、56 nM、270 nM で加えた PUREfrex®で AmpC または PhoA を 30°C、90 分合成した。この AmpC または PhoA の PUREfrex®反応液 5 μL に RNase A (220 ng/μL) を 0.5 μL 加えたのち、SecYEG を合成後の PUREfrex®反応液 5 μL を混合し、30°C で 90 分間、膜透過反応を行った。SecYEG リポソームを加えないサンプルの場合は、SecYEG の DNA やリポソームを含まない PUREfrex®を用いた。膜透過反応後は、PK 処理後、SDS-PAGE で解析した。

2.3 タンパク質の蛍光標識と 1 分子観察の方法

2.3.1 アンバーサプレッション法を用いたタンパク質の蛍光標識

アンバーサプレッション法によるタンパク質の蛍光標識は、下記の手順で行った。プロテイン・エクスプレス社から購入した TAMRA-X-AF アンバーサプレッサー-tRNA は、50 μL PUREflex[®]反応液中に 2.5 μL 加えた。また、PUREflex[®]はアンバーコドン (UAG) を認識し翻訳終結する因子である RF1 の濃度を通常の 1/10 量にしたものを特注した。翻訳反応は、30 $^{\circ}\text{C}$ で行った。また、アンバーサプレッサー-tRNA は対応するアミノアシル tRNA 合成酵素がなく、長時間タンパク質合成反応を行うとアンバーコドンに対して別のアミノ酸が取り込まれる可能性が高まるため、反応時間は 2 時間までとした。TAMRA-X-AF の取り込みは、SDS-PAGE 後に LAS-4000 を用いて、TAMRA の蛍光から検出した。

2.3.2 SecYE の蛍光標識と精製

アンバーサプレッション法による TAMRA 標識は、2.3.1 の条件で行った。25 μL の PUREflex[®] 反応液で 30 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間合成を行い、反応後 2.5 μL の RNase A (220 ng/ μL) を加え 30 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分処理し翻訳反応を停止した。

タンパク質合成後の PUREflex[®]反応液には、蛍光標識した SecY または SecE と、タンパク質に取り込まれなかった遊離の TAMRA が存在するが、遊離の TAMRA は蛍光 1 分子観察時に邪魔になるため、下記の手順で、SecYE リポソームを精製した。27.5 μL のサンプルに 100 μL の 0 M Sucrose buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM KCl, and 10 mM MgCl₂) を加え約 5 倍希釈し、TLA-100 rotor (Beckman 社) を用いて超遠心した (54,000 rpm \approx 112,000 $\times g$ (avg), 1 hour, 4 $^{\circ}\text{C}$)。上清を除去したのち、沈殿を壊さずに 100 μL の 0 M Sucrose buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM KCl, and 10 mM MgCl₂) を加え、再度超遠心した (54,000 rpm \approx 112,000 $\times g$ (avg), 1 hour, 4 $^{\circ}\text{C}$)。沈殿した SecYE リポソームを buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 1 mM DTT) 50 μL で再懸濁し、これを 1 分子観察に用いた。観察まで日をまたぐ場合は、液体窒素で凍結し -80 $^{\circ}\text{C}$ または -20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

2.3.3 pOmpA の蛍光標識と精製

アンバーサプレッション法による TAMRA 標識は、2.3.1 の条件で行った。4 量体として 4 μM の SecB (N-His) 存在下、50 μL の PUREflex[®]反応液で 30 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間合成を行い、反応後 5 μL の RNase A (220 ng/ μL) を加え 30 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分処理し翻訳反応を停止した。

遊離の TAMRA からの pOmpA の精製は、SecB の His-tag を用いて、SecB-pOmpA 複合体として下記の手順で精製した。まず、RNase A 反応後の 50 μL の反応液に 150 μL の buffer

K (20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 300 mM NaCl, 5 mM imidazole) を加え 4 倍希釈し、さらに buffer K で平衡化した TALON® Metal Affinity Resin (Clontech 社、635501) 200 μ L を加えたのち、4°C で 30 分穏やかに混合した。混合液をカラムにロードし、400 μ L の wash buffer (20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 300 mM NaCl, 50 mM imidazole) で 2 回洗浄したのち、200 μ L の elution buffer (20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 500 mM imidazole) で 2 回に分けて溶出した。さらに、imidazole を除去する目的で、Zeba™ Spin Desalting Columns (7K MWCO、0.5 mL、サーモフィッシャーサイエンティフィック、#89882) に通し、溶出したサンプルに終濃度 20% (v/v) となるように glycerol を加え、これを 1 分子観察に用いた。観察まで日をまたぐ場合は、液体窒素で凍結し -80°C または -20°C で保存した。

2.3.4 1 分子観察に用いた脂質平面膜再構成デバイスの作製

脂質平面膜上の 1 分子観察は、63 ページの図 20A に示すデバイスを用いて行った。このデバイスでは、上部のチャンバーの底に直径約 100 μ m ほどの穴をあけ、そこに脂質膜を作製する。作製した脂質膜は下部チャンバーのカバーガラスに接触させ、エバネッセン照明によって脂質膜上の分子を観察する。

上部チャンバーは下記の手順で作製した。まず、0.2 mm 厚の塩化ビニールのシートに対して、ハンドプレス (ぺんてる社、PP110) にボールペン (ぺんてる社、Hybrid TECHNICA 0.4 mm、KN104-A) を取り付けただけのものを用いて、ボールペンの先端で 3.5–4.0 kg の負荷をかけて、シートに半球形の突起を作った。次に、顕微鏡 (オリンパス社、SZX7) で確認しながら、半球状の先端に直径約 100 μ m の穴ができるようにメス (フェザー社、#11) で切断した。メスで一度切断しただけでは、穴の部分が窪んでしまい表面に出ないため、さらに、作製した穴の外側をメスでななめに削ぎ落とした。次に、穴を開けたシートを、穴の部分を中心に直径約 1 cm の円になるように、クラフトパンチで切り出した。このシートを、0.5 mL の容量ずつに切断した 10 mL のディスポピペットの底部に、瞬間接着剤 (セメダイン社、SuperX クリア) を用いて接着し、半日以上放置した。作製したチャンバーに柄を取り付けるため、まず、芯入ガラス管 (NARISHIGE 社、GD-1.5、1.5 x 90 mm) の中央をヤスリで削って傷をつけ半分に折った。次に、ガラス管の先端約 1 cm の部分をガスバーナーで 70°前後まげて、熱せられた先端をそのままチャンバーに接して容器のプラスチックを溶かしながら仮止めした。最後に、エポキシ系接着剤アラルダイト® (ニチバン社、AR-R30) で仮止めした柄の接着を行った。

下部チャンバーは下記の手順で作製した。まず、直径 30 mm の円形のマイクロカバーガラス (松波硝子工業社) をピラニア溶液 (濃硫酸 : 30%過酸化水素 = 4 : 1) に一晩以上浸けて、表面に付着し蛍光観察の邪魔となる有機残渣を処理した。ピラニア処理したガラスを Milli-Q で洗浄したのち、片方の面にアガロースをスピンコートした。このとき、アガロースは、スパチュラで半掻き程度のアガロース粉末 (理科研社、STAR Agarose Powder、RSV-AGRP-100G) に 5 mL 程度の Milli-Q を加え、電子レンジで熱して溶解させた

アガロース溶液を使用した。スピコートは、スピナー (ミカサ社、1H-D2) を用いて、まず rotation 2000 程度で表面の Milli-Q を飛ばしたのち、アガロース溶液を 500 μL 程度乗せ、同じく 2000 程度で 10 秒回転して行った。作製したガラスは、アガロースコートした面が内側になるように、細胞培養用のディッシュに取り付け、マニキュアで固定した。マニキュアが乾燥するまで半日から 1 日放置したのち、観察に用いた。

脂質平面膜へのサンプル添加に用いるガラスピペットは下記の手順で作製した。まず、calibrated pipet 75 μL (DRUMMOND 社、2-000-075) に、プーラー (NARISHIGE 社、PC-10) を用いてキャピラリーを作った。キャピラリーを作る際の Heater Level はおよそ 66 の設定にし、ガラス管が熱せられて動き出すのと同時にヒーターのスイッチを切り、ガラス管が 2 つに分断されるようにした。次に、研磨器 (NARISHIGE 社、EG-400) を用いてキャピラリーの先端を研磨し、研磨器の拡大鏡のメモリで 2 メモリ弱になるまで、キャピラリーの先端の穴を広げた。このとき、研磨器の Rotation は、60 で設定した。また、研磨の段階で先端にヒビが入っているものや、先端が平らな断面にならないものは除外した。さらに、マイクロフォージ (NARISHIGE 社、MF-900) でキャピラリーの先端を熱し、表面をなめらかにした。このとき、Heater Level は 37 程度に設定した。最後に、ガスバーナーで先端 2 cm 程度の部分を折り曲げて、これをガラスピペットとして使用した。

2.3.5 脂質平面膜の作製

平面膜再構成デバイスの上部チャンバーの底に開けた穴への脂質膜の形成は、顕微鏡の上で、下記の手順で行った。まず、脂質溶液の調製のため、高さ 2 cm、直径 8 mm 程度の透明のガラス瓶を一晩以上、ピラニア処理した。処理したガラス瓶を Milli-Q で洗浄したのち、窒素ガスによって残存する Milli-Q を飛ばして乾燥させた。そこに、7 mg/mL の soybean 脂質のクロロホルム溶液を 50 μL 加えたのち、窒素ガスによって穏やかにクロロホルムを蒸発させ、ガラス瓶の内部に脂質のフィルムを作製した。脂質フィルムに対して 50 μL のデカン (和光社、040-21602) を加えタッピングして溶解させたものを脂質溶液とした。脂質平面膜を作製する際には、まず、上部チャンバーの底に 2-3 μL の脂質溶液を P-20 のピペットマン (ギルソン社) で塗りつけた。次に、下部チャンバーは 1-2 mL の buffer L (10 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 10 mM KCl, 1 mM MgCl_2) を加え、上部チャンバーは 500 μL の buffer L で満たした。その後、10 倍の対物レンズで確認しながら、上部チャンバーの底を下部チャンバー内の buffer に浸して、脂質膜を形成させた。

2.3.6 脂質平面上の SecYE の観察

SecYE の観察の際には、2.3.2 で調製した SecYE プロテオリポソームを融解後、バスソニケーターで 5 秒程度超音波処理したものを buffer L で 10 倍希釈し、約 5 μL をガラスピペッ

トで静かに平面膜上加えた。プロテオリポソームの添加は、平面膜が下部チャンバーの buffer 中に浮いた状態で行った。プロテオリポソーム添加後約 10 分静置し、プロテオリポソームと平面膜の融合を待ったのち、平面膜を下部チャンバーのガラスに接触させて、エバネッセント照明にて観察した。

2.3.7 マイクロチャンバーに封入した Fluorocillin™ Green の観察

まず、Fluorocillin™ Green が蛍光を発する状態にするため、AmpC による基質の分解を行った。AmpC は PUREfrex® 50 μ L で調製し、AmpC 合成後の反応液をそのまま 10 μ M の Fluorocillin™ Green を含む buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 40 mM KCl, 2 mM MgCl₂) 1.5 mL に加えた。チューブをアルミホイルで覆い、37°C の恒温槽で 12 時間静置して反応させた。

上記の Fluorocillin™ Green を顕微鏡上で観察するため、上部チャンバー、下部チャンバーに加える buffer L に対して、Fluorocillin™ Green を 10 nM の濃度で加えた。また、下部チャンバーには共同研究先である東京大学工学系研究科の野地研究室で作製していただいたマイクロチャンバーアレイをガラスの表面に取り付けたものを用いた。マイクロチャンバーアレイは CYTOP (旭硝子社) の微細加工によって作製されており、67 ページの図 22A に示すように直径約 2.5 μ m、深さ約 1 μ m の空洞が開けられている。このマイクロチャンバーに対して、脂質平面膜再構成デバイスで作製した soybean 脂質の膜で蓋をする条件と、平面膜をマイクロチャンバーから離して蓋をしない条件でそれぞれ観察した。

2.3.8 脂質平面上の pOmpA の観察

pOmpA の観察の際には、まず、SecYE の観察と同じ条件で、蛍光標識していない SecYEG プロテオリポソームを平面膜へ添加し、10 分静置して再構成させたのち、平面膜を下部チャンバーのガラスに接触した。続いて、2.3.3 で調製した SecB-pOmpA 複合体を融解後、バスソニケーターで 5 秒程度超音波処理した。SecB-pOmpA 複合体 9 μ L に対して、100 mM ATP を 0.5 μ L、8.4 mg/mL SecA を 0.5 μ L 加え、計 10 μ L としたサンプルの溶液のうち約 5 μ L をガラスピペットで静かに平面膜上加えた。

2.3.9 1 分子観察と画像解析

蛍光 1 分子観察は、倒立型リサーチ顕微鏡 (オリンパス社、IX71) と油浸対物レンズ (オリンパス社、PlanApo、X60、1.45 NA) を用いた、対物レンズ型の全反射顕微鏡によって行った。蛍光色素 TAMRA の観察には、波長 532 nm のレーザー (Coherent 社、COMPASS

315M-100) によるエバネッセント照明を、Fluorocillin™ Green の観察には、波長 488 nm のレーザー (Coherent 社、SAPPHIRE 488-20) によるエバネッセント照明を用いた。蛍光画像は、EM ゲインを 255 に設定して EM-CCD カメラ (Andor 社、iXon, DV887 DSC-DV,) と Andor iQ を用いて記録した。各フレームは、x 軸方向 0.112360 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 、y 軸方向 0.113636 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ の画像として、露光時間は 30 ミリ秒、平均フレームレイト 31.46 ミリ秒で記録した。それぞれの画像や動画は ImageJ または Fiji によって編集した。

SecYE を観察した動画は、下記の手順で編集した。まず、[Process > Subtract Background] から、50.0 pixels の半径の "Rolling ball" による Subtract Background を行いノイズの除去を行った。次に、[Image > Stacks > Z projection] から "Average Intensity" を計算し、[Process > Image Calculator] によって、動画の各フレームの画像から "Average Intensity" を減算し、動きのない輝点を除去した。

Fluorocillin™ Green を観察した画像は、[Process > Subtract Background] から、200 pixels の半径の "Rolling ball" による Subtract Background を行いノイズの除去を行った。次に、[Image > Adjust > Brightness/Contrast] から、すべての画像の "Minimum" を 0 に、"Maximum" を 6500 に調節した。

3 結果

3.1 PURE system による SecYEG の合成

まず、PURE system における SecY、SecE、SecG の発現確認を行った。SecY、SecE、SecG の DNA は PCR によって、それぞれ ORF の上流に T7 promoter と SD 配列を付加したものを個別に調製した。PCR の鋳型としては、pBAD22 6×His SecEYG プラスミドを用いた。SecE については、本来の開始コドンの領域をアニーリング配列として His-tag を持たない野生型の DNA を調製した。リポソームは無細胞翻訳系の膜タンパク質合成でしばしば用いられる soybean 脂質抽出物由来のリポソームを反応系に脂質濃度 4.4 mg/mL で添加した。

まず、それぞれの DNA を 1 nM に設定した条件で、30°C でタンパク質合成反応を行ったところ、各タンパク質は目立った中間産物もなく良好なパターンで合成され、3つのタンパク質を同時に合成する場合も、それぞれの遺伝子の発現産物が確認された (図 4)。反応温度を、37°C と 30°C で条件検討したところ、37°C で合成した場合は 30°C で合成する場合に比べてタンパク質間の発現量の差が大きくなる結果となった。また、タンパク質合成反応のタイムコースから、反応時間は 3 時間で十分量のタンパク質が合成されることが示された (図 5)。以上の結果を踏まえて、これ以降の SecYEG の合成は 30°C、3 時間の条件で行った。

SecYEG は、SecY、SecE、SecG が 1:1:1 で複合体を形成する。そこで、PURE system でのタンパク質合成量を 1:1:1 にそろえるため、DNA 濃度の条件検討を行った。30°C、3 時間の合成結果から、SecY = 4 nM、SecE = 1 nM、SecG = 1 nM の条件で、それぞれの合成量をおよそ 1:1:1 にそろえることができ、各サブユニットは約 200 nM 合成されることが示された (図 6)。この結果を踏まえて、以降の実験では、この DNA 濃度の条件で SecYEG の合成を行った。また、SecY = 4 nM、SecE = 1 nM、SecG = 1 nM の DNA 濃度条件で、再度、各サブユニットとすべての組み合わせで合成した結果を図 7 に示す。

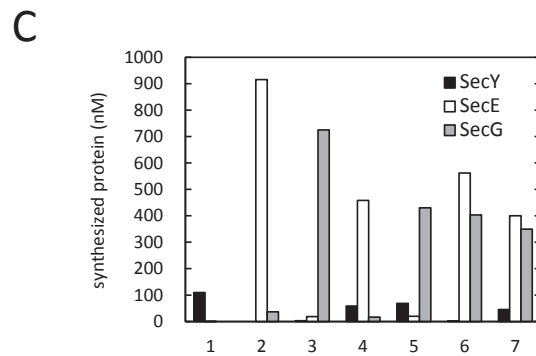
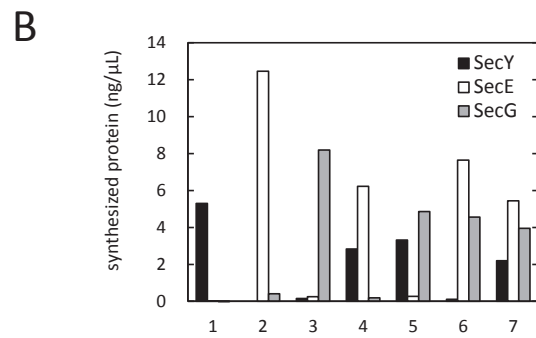
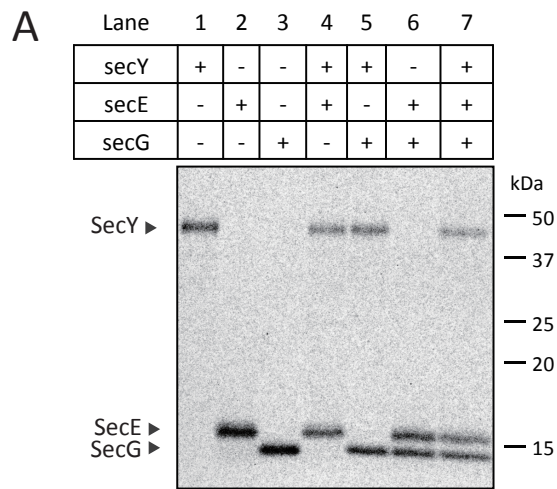


図 4. SecY:SecE:SecG = 1:1:1 nM (DNA) のときの発現パターン
 A: SDS-PAGE. B: タンパク質発現量 (ng/μL). C: タンパク質発現量 (nM).
 発現温度は 30°C.

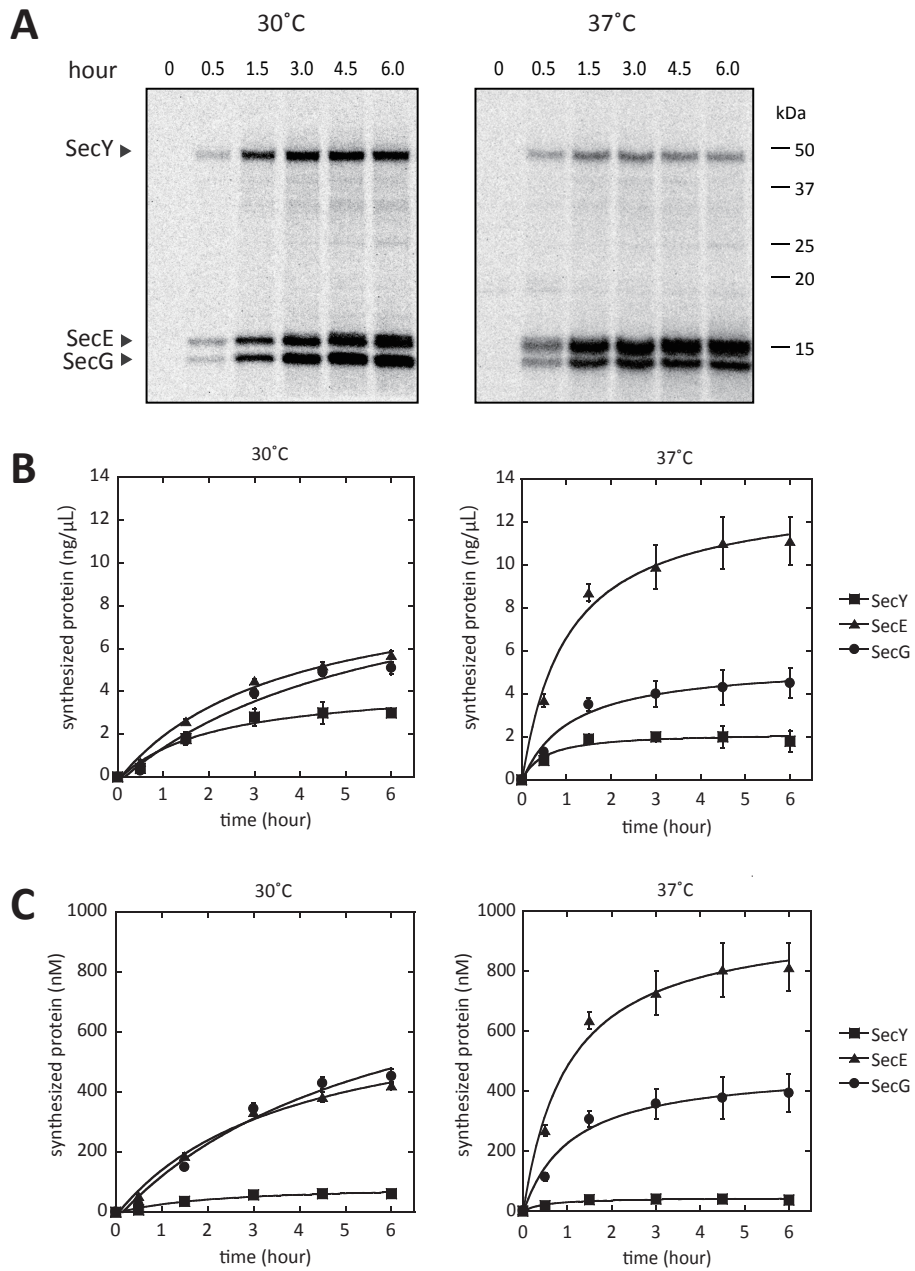


図 5. SecY, SecE, SecG 合成における時間変化と反応温度の影響
 A: SDS-PAGE. B: タンパク質発現量 (ng/μL), エラーバーは標準偏差 (n=3) を示す. C: タンパク質発現量 (nM), エラーバーは標準偏差 (n=3) を示す.

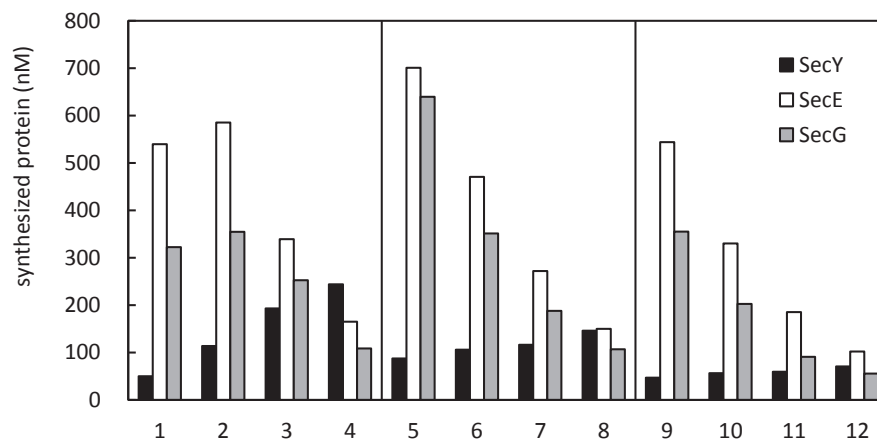
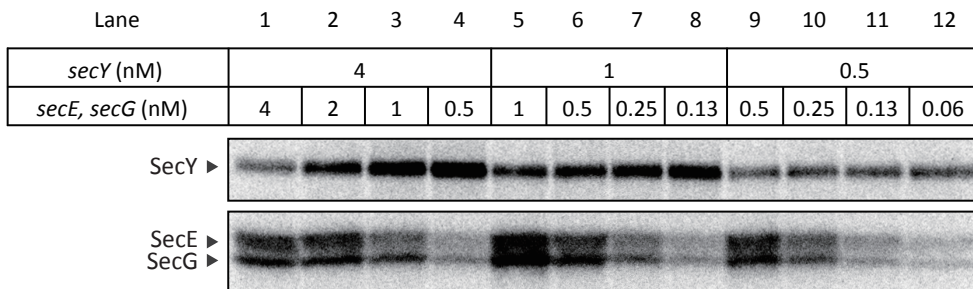


図 6. DNA 濃度比に対するタンパク質発現量の変化
発現温度は 30°C

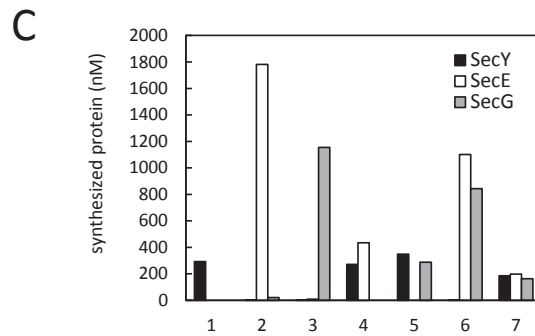
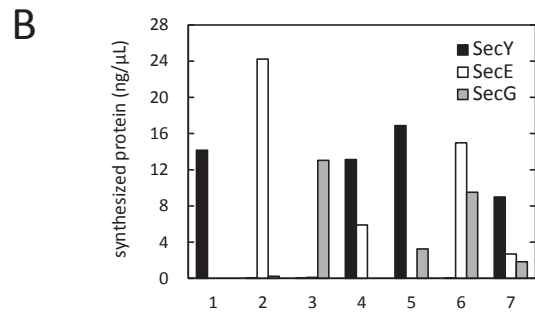
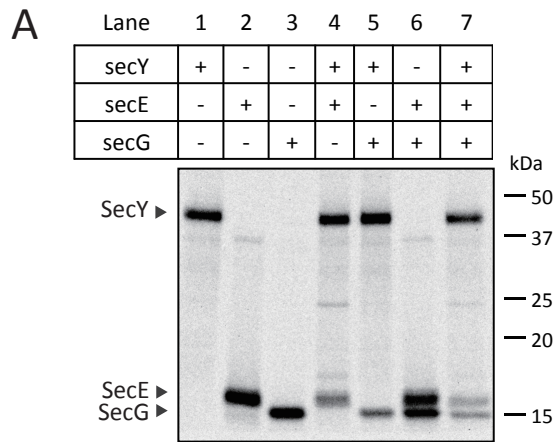


図 7. SecY:SecE:SecG = 4:1:1 nM (DNA) のときの発現パターン
 A: SDS-PAGE. B: タンパク質発現量 (ng/μL). C: タンパク質発現量 (nM)
 発現温度は 30°C

3.2 SecY、SecE、SecG の膜局在化

無細胞翻訳系にリポソームなどの脂質膜を添加した条件で、疎水性の高い膜タンパク質を合成する場合、膜タンパク質が自発的に脂質膜と相互作用する自発的膜挿入と呼ばれる機構によって膜挿入されることが知られている。SecY、SecE、SecG についてこの自発的膜挿入を評価するため、Flotation 法によってリポソーム画分と凝集タンパク質画分を分離して、それぞれの存在量を定量した。反応系にリポソームが存在しない条件では、合成されるタンパク質は超遠心の沈殿画分に回収され、疎水性の高いタンパク質が反応液中で凝集していることが示唆された。一方、反応系にリポソームが存在する条件では、タンパク質がリポソームを含む上清画分から回収されたことから、合成されたタンパク質は自発的に脂質膜に膜挿入することが示唆された (図 8)。以上から、PURE system で合成された SecY、SecE、SecG の各タンパク質は、自発的膜挿入によってリポソームの膜上に局在化していることが示された。

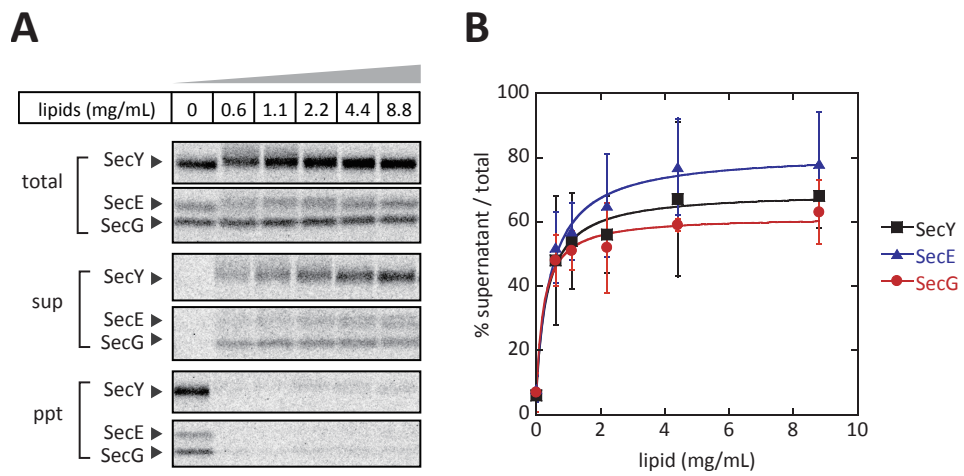


図 8. Flotation 法による膜局在化の評価

A: SDS-PAGE のパターン, sup: 上清, ppt: 沈殿. B: A のデータをグラフ化したもの. エラーバーは標準偏差 (n=3) を示す.

3.3 SecY、SecE の膜上でのトポロジーの評価

膜上でタンパク質の配向をプロテアーゼによる部位特異的な切断反応で評価した。まず、Enterokinase を用いて、SecY、SecE の N 末端と C 末端の配向を評価した。Enterokinase はアミノ酸配列 DDDDK の C 末端側を切断する酵素であるため、N 末端の配向の評価の際には、タンパク質の N 末端に MHHHHHDDDDKA 配列を付加したコンストラクトを、C 末端の配向の評価の際には、タンパク質の C 末端に DDDDKHHHHHHH 配列を付加したコンストラクトを使用した。タンパク質合成反応をリポソームの外部で行っているため、膜の内外に対する配向は、大腸菌でのタンパク質の配向とは逆の向きが正しい向きになる。図 9B に示す結果から、SecY の N 末端、C 末端はほとんど 100%に近い割合で切断されており、正しい配向をとってリポソームの外部に位置していることが示された。SecE の場合は、N 末端は SecY と同様、100%に近い割合で正しい配向をとっているが、C 末端はおよそ 50%が切断されており、リポソームの内側に挿入されず正しくない配向をとっていることが示された。

次に、SecY の細胞質側の Loop 部分の配向の評価を 3C protease を用いて行った。3C protease はアミノ酸配列 LEVLFQGP を認識し、Q と G の間のペプチド結合を切断する酵素であるため、配向の評価の際には、SecY の細胞質側にある 3 番目の Loop 領域 (C3 Loop) の配列の一部を LEVLFQGP に置換したコンストラクトを使用した。細胞質側の Loop も N 末端、C 末端と同様に、正しい配向のときにリポソーム外部に位置し、切断されることが期待される。図 9C に示す結果から、70%程度の割合で切断されており、C3 Loop の領域は約 7 割が正しい配向をとっていることが示された。

ここで、用いたプロテアーゼの切断による評価系は、プロテアーゼの認識配列として、膜タンパク質本来の配列にないアミノ酸配列を挿入しなければならない。そのため、挿入配列によって膜上でのタンパク質の配向に影響がある可能性は否定できない。例えば、Enterokinase の認識配列は DDDDK であるが、電荷を持ったアミノ酸が連続することによって膜への挿入を抑制している可能性があり、SecE の C 末端の配向については過小評価している可能性がある。また、3C protease はいくつかある配列特異的 protease の中から、その認識配列における電荷もったアミノ酸の数が少ないことから選択したが、3C proteases による配向の評価においても、挿入配列による配向への影響は必ずしも否定できない。加えて、プロテアーゼのペプチド切断反応がリポソームの膜近傍でも溶液中での切断反応と同じ効率で行われるかについては議論の余地を残している。そのため、これらの実験から SecY や SecE の膜上での配向を厳密に決定することには限界があった。膜タンパク質本来の配向になるべく影響を与えずに、膜タンパク質の配向を簡便に解析できる実験系の構築は、無細胞翻訳系での膜タンパク質合成における今後の課題になると考えられる。

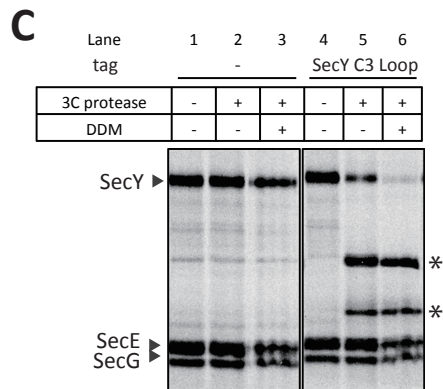
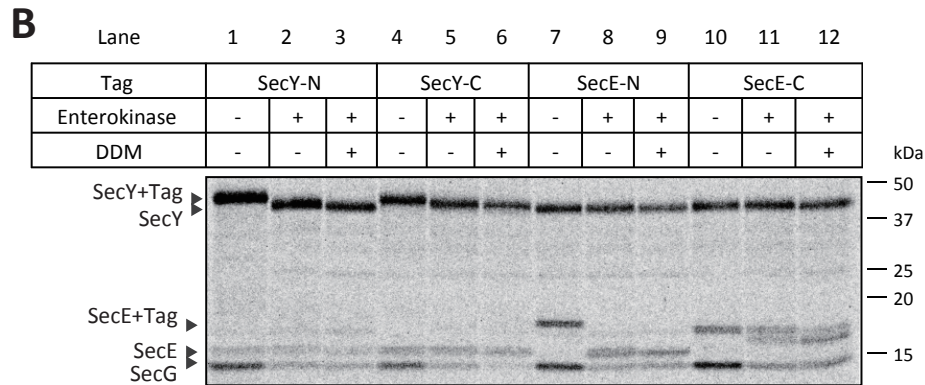
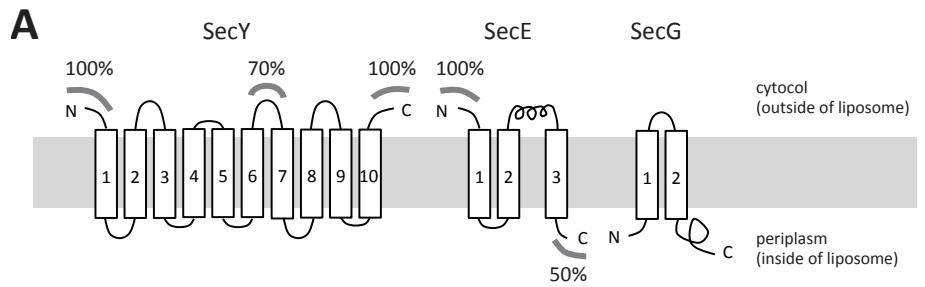


図9. 膜上でのトポロジーの評価

A: SecYEG のトポロジーと解析結果のまとめ . B: Enterokinase による SecY、SecE の N 末端、C 末端の配向の評価 . C: 3C protease による SecY の細胞質側のループ (C3 Loop) の配向の評価 . * は切断断片を表す .

3.4 SecYEG の複合体形成の解析

合成されたタンパク質の半分以上は、正しい配向で膜挿入している可能性が示唆されたため、次に、サブユニット間の相互作用による複合体形成について、Blue Native PAGE によって評価した。この方法では、適切な濃度の界面活性剤を用いて膜タンパク質を複合体のまま可溶化した状態で電気泳動することができ、さらに、coomassie G250 色素を添加することで、界面活性剤とタンパク質の複合体に負電荷を持たせ、等電点の高いタンパク質の泳動も可能にしたものである。

Blue Native PAGE の結果、SecY と SecE あるいは、SecY、SecE、SecG の 3 タンパク質を同時に発現させた場合に、200 kDa 付近にシャープなバンドが得られた。また、それらのバンドは大腸菌から精製した SecYEG のバンドの泳動度と一致した (図 10A)。SecYE のバンド位置は SecYEG のバンド位置より少し分子量が小さい位置に表れていたが、これは、SecG のサブユニットが含まれていないことから説明されると考えられた。これらの結果から、PURE system で合成した SecYE あるいは SecYEG が複合体を形成していることが示唆された。

Blue Native PAGE のゲルをウエスタンブロッティングすることによって、複合体に各サブユニットが含まれているかを検証したところ、SecYE 複合体には、SecY、SecE が含まれ、SecYEG 複合体には 3 タンパク質がそれぞれ含まれていることが確認された (図 10B)。ここで、SecG は複合体に見られるバンドよりも遊離の SecG と思われる低分子量側のバンドのほうが強かったことから、SecY、SecE に比べて複合体の形成効率が低いことも示唆された。

Blue Native PAGE は低温で長時間泳動するため、ゲル上でみられた複合体のバンドはリポソーム膜上で形成されたものではなく、DDM で可溶化後の溶液中で形成された可能性も考えられた。そこで、SecY と SecE を個別に合成し、DDM での可溶化後に混合したものを Blue Native PAGE で同様に泳動した。しかし、この条件では、複合体のバンドが検出されなかったことから、Blue Native PAGE 上の複合体のバンドは、リポソーム膜上で形成された複合体であることを支持した (図 10C)。

以上の結果から、PURE system で合成した SecYEG はリポソーム膜上で複合体を形成することが示された。また、PURE system は翻訳に関わる因子のみで再構成されており、リポソームはリン脂質のみから構成されていることから、SecYEG の複合体形成には他のタンパク質の働きを必要とせず、自己集合的な機構で行われることが示唆された。

過去の、Blue Native PAGE、cross-link などの実験結果から、SecYEG は 2 量体を形成することが報告されている^{51, 52, 53, 54}。特に、Blue Native PAGE の過去の研究結果では、分子量約 100 kDa の位置に単量体が、約 200 kDa の位置に 2 量体が、それぞれ検出されることが報告されている。そのため、今回 Blue Native PAGE で得られた複合体は 2 量体であることも考えられた。そこで、SecYEG 複合体のオリゴマー状態を評価するための実験を行った。

過去の Blue Native PAGE の例では、界面活性剤の濃度を上げると 2 量体の量が減少し、次第に単量体が増えることが見られていた⁵² ため、まず、界面活性剤の濃度の検討を行った。しかし、DDM を 0.1% から 1.6% までの範囲で検討した結果、DDM 濃度が 0.8% 以上になると 200 kDa の複合体のバンドが次第に失われるものの、100 kDa のバンドの出現は確認されなかった。

さらに、SecYEG の 2 量体化を阻害することが報告されている変異を導入し、同様に Blue Native PAGE による評価を行った。SecY の細胞質側のループに変異を導入した SecY (R357E) や SecY (RPG357EDP)⁵³ では低分子量側にわずかにシフトすることがみられたが、その変化は先行研究で見られていたものに比べて小さく、変異によって SecYEG の単量体化の可否を決定づけることは難しかった。また、SecYEG が back-to-back で 2 量体化をするときの相互作用部位とされるアミノ酸に変異を入れた SecE (L106R)⁵⁴ ではバンドシフトはほとんど見られなかった (図 10D)。

これらの結果に加えて、ポジティブコントロールとして用いた大腸菌から精製した SecYEG には複数のバンドが確認されるが、最も低分子量側のバンドが 200 kDa 付近に位置していることから、今回の Blue Native PAGE の条件で 200 kDa に検出されたバンドは SecYEG の単量体のバンドである可能性が高いと考えられた。また、リポソーム濃度と SecYEG 複合体の濃度から算出した 1 つのリポソーム (動的光散乱法の結果より半径約 76 nm) あたりの SecYEG 複合体の数は、およそ 3-4 個であり、この条件でほとんどの複合体が 2 量体を形成することは考えにくく、検出されたバンドが単量体であるという仮説を支持した。

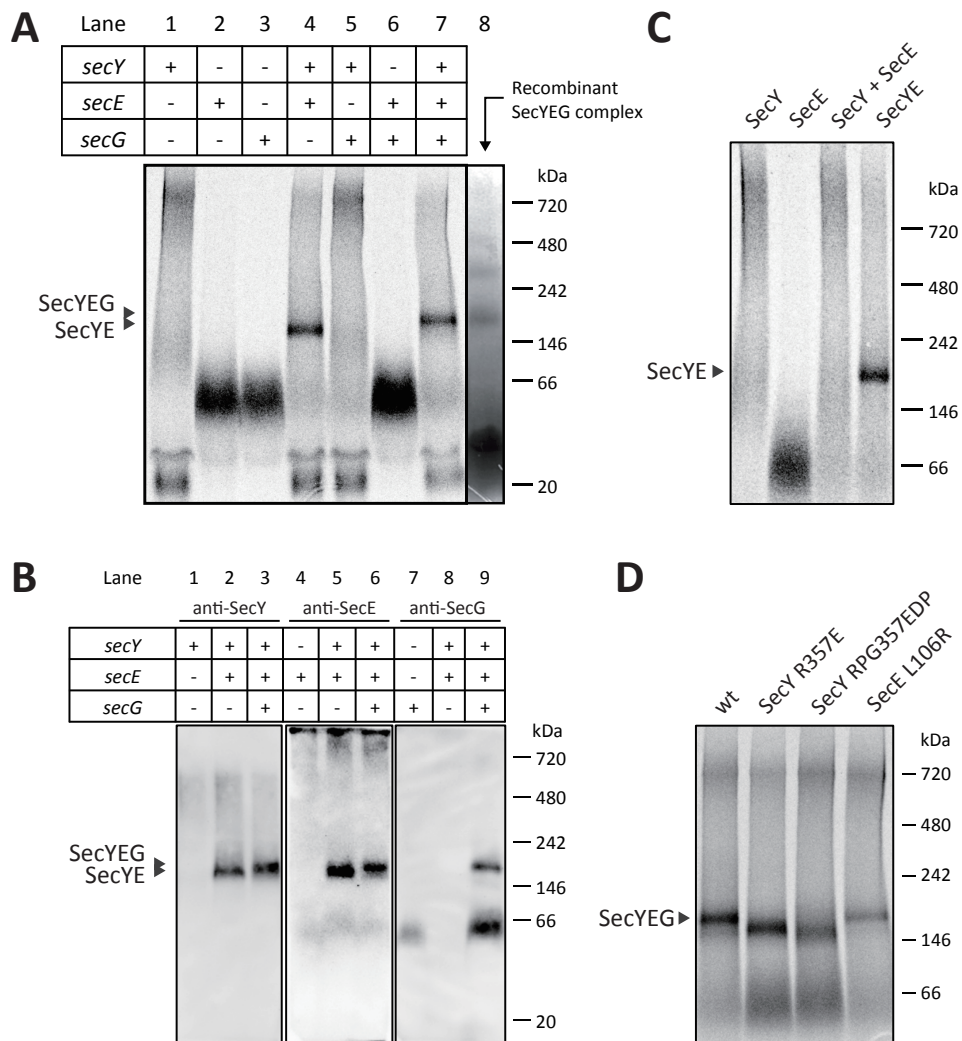


図 10. Blue Native PAGE による複合体形成の評価

A: 各サブユニットの組み合わせにおける複合体形成の解析 B: ウェスタンブロットによる各サブユニットの確認 . C: 単独発現したもの (SecY, SecE) と, 単独発現した SecY, SecE を可溶化後に混合したもの (SecY+SecE) と, 共発現した SecYE との比較 . D: SecYEG の 2 量体化を阻害する変異体を用いた SecYEG のオリゴマー状態の解析 .

3.5 pOmpA の膜透過反応による SecYEG の活性評価

合成した SecYEG が膜上で複合体を形成することが示されたため、続いて、SecYEG 複合体の活性を評価する実験を行った。まず、分泌タンパク質の膜透過活性を評価するため、大腸菌の分泌タンパク質で外膜に局在するタンパク質である pOmpA を基質とした膜透過実験を行った。この実験では、これまでと同様に PURE system で SecYEG を合成したのち、pOmpA を合成するための未反応の PURE system 反応液と等量ずつ混合し、さらに、30°C で 1 時間 pOmpA の合成と膜透過反応を行った。pOmpA の PURE system には SecA、SecB を添加しており、SecYEG が活性型の複合体を形成していれば、pOmpA がリポソーム内に膜透過される。膜透過した pOmpA は、後から加える protease K (PK) の分解に耐性をもつことから、PK 耐性の pOmpA のバンドを SecYEG の活性として評価した。

まず、大腸菌から精製した SecYEG から調製したプロテオリポソームで膜透過反応を行ったところ、約 19% の pOmpA が膜透過された (図 11B Lane 1, 2)。これに対し、PURE system で合成した SecYEG の場合にも、約 15% の pOmpA が膜透過され、合成した SecYEG が分泌タンパク質を膜透過する活性を保持していることが示された (図 11B Lane 9, 10)。また、それぞれのネガティブコントロールから、ここでみられた膜透過反応が、SecA や SecB、SecYEG の合成、リポソームの存在に依存したものであることも裏付けられた (図 11B Lane 3–8)。

次に、膜透過活性への SecY、SecE、SecG それぞれのサブユニットの寄与を検証するため、様々なサブユニットの組み合わせで、同様に pOmpA の膜透過を行った。結果として、Blue Native PAGE で複合体のバンドが見られる、SecYE と SecYEG の条件で膜透過活性が観察された (図 11C)。この結果から、SecY 単独ではタンパク質膜透過チャンネルとしては機能できず、チャンネルを形成するためには SecE の結合が重要な役割を持つことが確かめられた。

一方で、pOmpA の膜透過反応では、SecG を除いた SecYE 複合体のときにも膜透過活性を持つことから、SecG の機能については解析が十分にできなかった。SecG は Blue Native PAGE のウエスタンブロットティングの結果からも、SecYEG 複合体へ組み込まれる効率が低いことが示唆されている (図 10B)。そこで、無細胞系で合成した SecG の機能を検証するため、SecG 依存的な基質である pOmpF-Lpp⁶² を用いた膜透過反応の解析を行った。pOmpF-Lpp は、大腸菌の分泌タンパク質で外膜リポタンパク質である Lpp の成熟タンパク質の部分に、同じく外膜タンパク質である OmpF のシグナル配列が付加された人工的な膜透過基質である。SecYE と SecYEG について、pOmpA の膜透過反応と同様に pOmpF-Lpp の膜透過を評価したところ、SecG を含まない SecYE では膜透過が見られなかったのに対して、SecYEG の場合に pOmpF-Lpp の膜透過が観察された (図 11D)。この結果から、PURE system で合成した SecG も活性を持つことが確かめられた。

さらに、SecYEG 複合体の膜透過活性を詳細に調べるため、膜透過反応初期の反応速度の測定を行った。膜透過反応速度の解析は、投入する SecYEG 量をそろえるため、post-translational な膜透過反応を解析した。SecYEG の存在量の見積もりとして、大腸菌由

来の精製 SecYEG を用いた場合は、リポソーム膜上での配向が表裏 50:50 であることを仮定した⁴⁸。PURE system で SecYEG を合成する場合は、Blue Native PAGE の複合体のバンドの定量値を、活性型の複合体の量とした。膜透過反応は、SecYEG を含む反応液に SecB-pOmpA と SecA を加え、30°C で反応を行い、0-20 分のタイムコースを解析した。その結果、PURE system で合成した SecYEG の膜透過反応の比活性は、大腸菌から精製した SecYEG 複合体と実験誤差の範囲で一致する値であった (図 12A)。以上の結果から、PURE system で合成された SecYEG は大腸菌の細胞内から精製した SecYEG と同程度の活性を持つことが示唆された。

また、膜透過反応開始後 10 分間で SecA によって加水分解された ATP 量の測定を行い、PURE system で合成した SecYEG と大腸菌から精製した SecYEG を比較した。PURE system で合成した SecYEG を用いた場合の SecA の ATP 加水分解活性は、大腸菌から精製した SecYEG 複合体を用いた場合よりもやや高く、SecA のエネルギー効率の面では精製 SecYEG に比べてわずかに低いことが示唆されたが、同程度のオーダーでの SecA の ATP 加水分解活性が確認された (図 12B)。

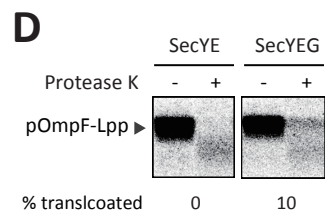
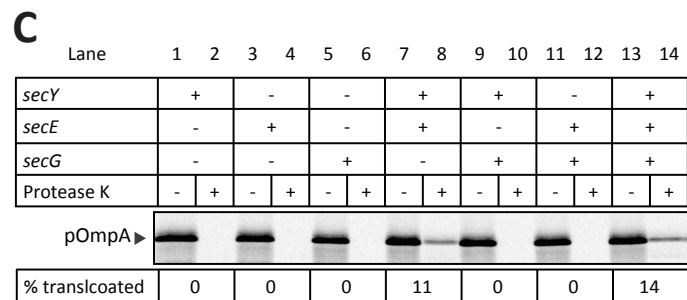
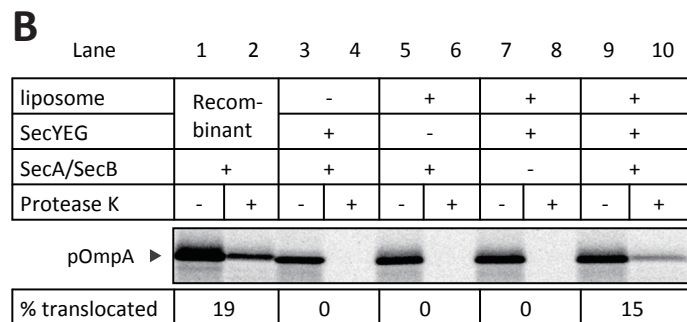


図 11. 膜透過反応による SecYEG の活性評価

A: pOmpA 膜透過反応のスキーム . リポソーム内に膜透過した pOmpA は protease K 耐性になる . B: 膜透過反応の因子依存性 . Recombinant は大腸菌から精製した SecYEG を用いて作成したプロテオリポソームを使用 . C: 膜透過反応の SecYEG の各サブユニットの依存性 . pOmpF-Lpp の膜透過反応の SecG 依存性 .

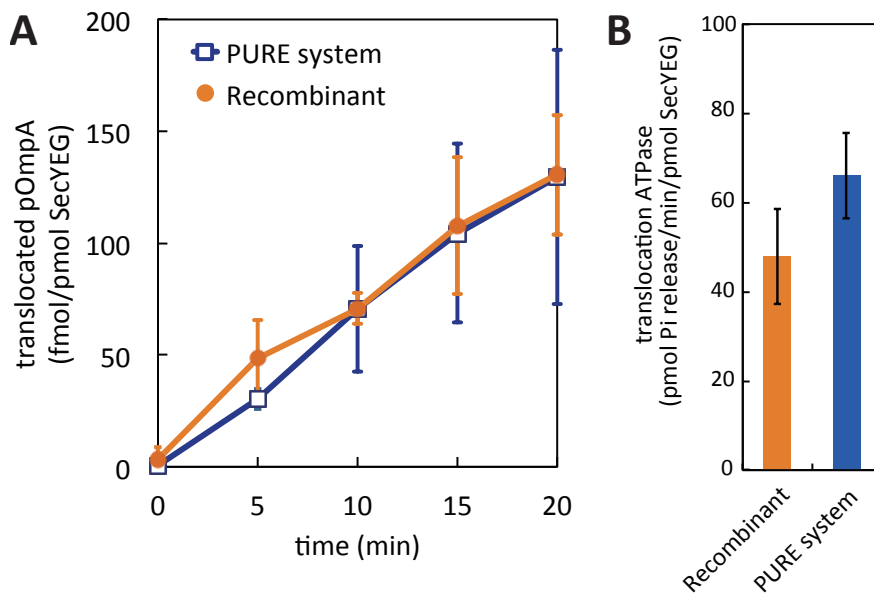


図 12. PURE system で合成した SecYEG と大腸菌から精製した SecYEG の活性比較

A: pOmpA 膜透過反応速度. エラーバーは標準偏差 (n=3) を示す.

B: SecA による ATP 加水分解反応の測定. エラーバーは標準偏差 (n=3) を示す.

3.6 再構成系における SecY の変異体解析

無細胞翻訳系のひとつの利点として、精製されたタンパク質試料の調製の簡便さが挙げられる。ここまでの結果から、PURE system で合成した SecYEG について pOmpA の膜透過活性を再構成系で評価できること確認されたため、これまで *in vivo* の実験で同定されてきている SecY の変異体について、再構成系での pOmpA 膜透過反応を指標に機能評価を行った。

SecY の変異体は下畑らの報告⁵⁵を参考に、2 グループの変異体を選択した。1 つ目のグループは、*secY39* (R357H) と *secY205* (Y429D) で、膜タンパク質の膜挿入活性には大きな支障がないが、分泌タンパク質の膜透過活性が低下する変異体である。下畑らの報告ではパルスラベルの実験で pOmpA の膜透過に伴うシグナル切断の効率が、それぞれ野生型の 62% (*secY39* (R357H))、76% (*secY205* (Y429D)) にまで減少していることから活性低下を確認している。これらの変異体は SecA と相互作用する部位に変異が入ることなどにより膜透過活性が低下するものと考えられている。2 つ目のグループは、*secY129* (C385Y) と *secY238* (E238K) で、分泌タンパク質の膜透過活性には弱い阻害効果しかないが、膜タンパク質の膜挿入に支障をきたす変異体である。下畑らの報告では、膜挿入活性の支障は、大腸菌のラクトース輸送体である LacY を構造特異的に認識する抗体を用いた評価系や、膜タンパク質の異常を検知する Cpx/o^E ストレス応答系の活性化によって確認している。また、このグループの変異体の膜透過活性への影響が小さいことは、上記のパルスラベルの実験で膜透過活性が野生型の 90%程度に保たれていることから確認している。

これらの変異体について、PURE system を用いた再構成系での解析を行った。実験ではまず、変異体も野生型のとおり同じように PURE system で合成されることを確認し (図 13A)、Blue Native PAGE の複合体形成を評価した。それぞれの変異体について野生型のとおり同じ移動度の SecYEG 複合体のバンドは確認されたものの、バンドパターンはそれぞれ異なる特徴を示した。C385Y や E238K の変異体では、野生型のとおりバンドに比べてぼやけて上下に広がっており、複合体の構造が不安定であることが示唆された。一方、R375H や Y429D の変異体では、野生型に比べて複合体のバンド強度が増したことから、構造ゆらぎの少ない強固な複合体を形成する可能性が示唆された (図 13B)。

pOmpA の膜透過活性について評価したところ、R375H や Y429D の変異体では、*in vivo* での報告⁵⁵と同様に膜透過活性の著しい低下がみられた。しかしながら、*in vivo* での報告⁵⁵では膜透過活性は野生型には影響がないとされていた C385Y や E238K の変異体について、再構成系での膜透過活性は、E238K については膜透過活性が 4 割以下に低下し、C385Y については野生型の約 5 倍の高い活性を示した (図 13C)。

野生型よりも高い活性を示した C385Y について、より詳細に解析するために、膜透過反応の速度と、膜透過反応時の SecA の ATP 加水分解速度を測定した。それらの結果から、C385Y では膜透過反応の速度は上昇しているにもかかわらず、そのときに消費される ATP の量は野生型と大きな差がないことが示された (図 14)。以上の結果から、C385Y の

変異体では、野生型と比べてより少ないエネルギーでタンパク質を膜透過している可能性が示唆された。

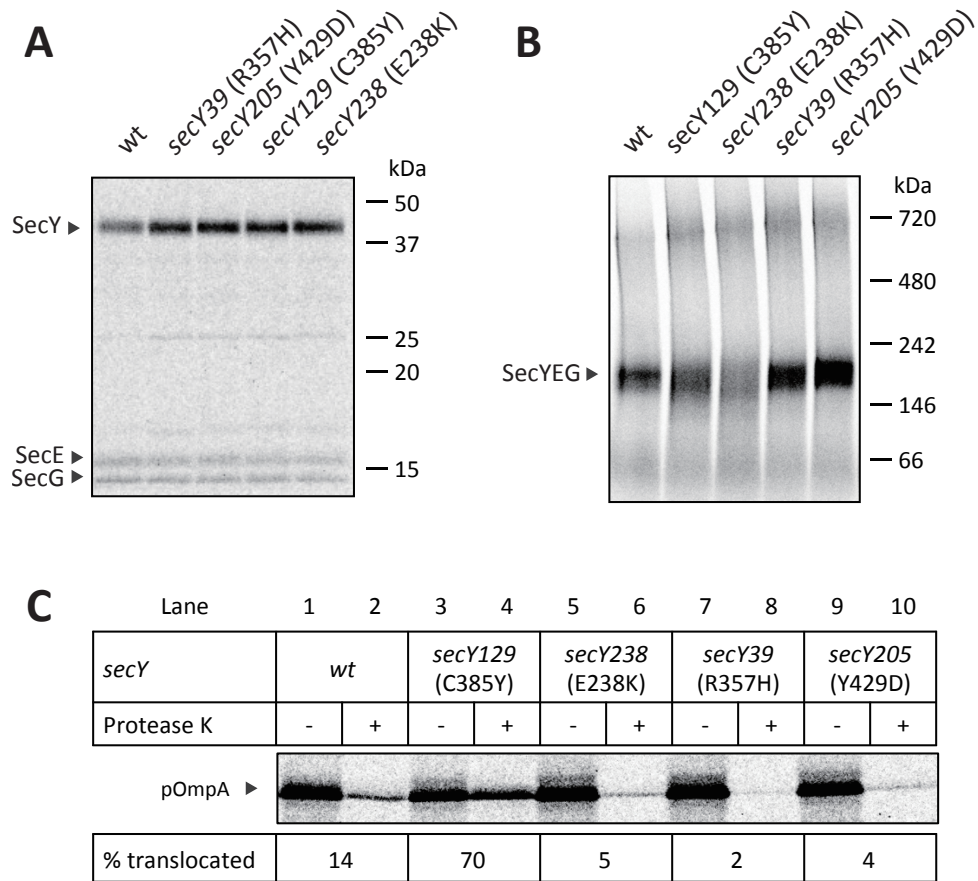


図 13. PURE system を用いた再構成系での SecY 変異体の解析

A: SDS-PAGE. B: Blue Native PAGE. C: pOmpA 膜透過反応.

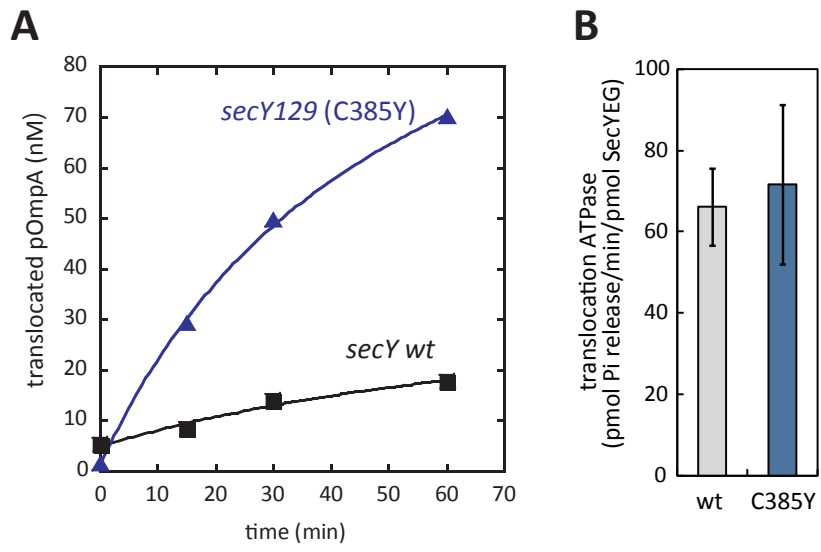


図 14. 野生型 SecY と SecY C385Y の活性比較

A: pOmpA 膜透過反応速度 .

B: SecA による ATP 加水分解反応の測定 . エラーバーは標準偏差 (n=3) を示す .

3.7 SecYEG による YidC の膜挿入

従来の無細胞翻訳系による膜タンパク質合成のひとつの問題点として、合成する膜タンパク質の膜上でのトポロジ制御が難しいことが挙げられる。これまでのリポソームを使った方法では、膜挿入はタンパク質と脂質膜の疎水的な相互作用に基づく自発的な膜挿入を用いており、Sec トランスロコンのような生体の膜挿入機構を欠くことが課題であった。これまでの結果から、PURE system によって活性型の SecYEG 複合体を合成できることが明らかになったため、この実験系の拡張性を検証するべく、SecYEG を基盤として他の膜タンパク質についてトポロジを制御した膜タンパク質の無細胞合成を検証した。

まず、大腸菌の6回膜貫通タンパク質であるYidCについて膜挿入実験を行った。YidCは膜貫通ヘリックス1と2 (TM1, 2)の間に親水的なドメインをもつ (図15 A) が、このドメインは大腸菌ではペリプラズムに位置し、SecYEGとSecAによる膜透過反応を必要とする。無細胞翻訳系にリポソームを添加して、リポソームの外から膜タンパク質を合成する場合、大腸菌内とは膜の内外が逆転し、YidCが正しい向きで膜挿入されると親水的なドメインがリポソームの内部に膜透過する。この形で膜挿入されたYidCに対して外からprotease Kを加えた場合、TM2の下流で切断されて 41 kDa の断片が得られる⁵⁶。一方、自発的膜挿入では、親水的なドメインが膜を越えることができず、TM1の直下で切断され 58 kDa の産物が得られる⁵⁷。

実験は、図11のpOmpAのco-translatinalな膜透過反応と同じスキームで、合成に用いる鋳型DNAをpOmpAからYidCに置き換えて行った。実験の結果から、SecYEGの合成やSecAに依存して正しい配向で膜挿入したYidCの断片が得られることが示された (図15B)。

同様に、SecYの変異体を用いて実験を行った。その結果、SecYEG依存の膜挿入断片の割合はC385Yでは増加し、それ以外の3つの変異体では減少しており、YidCが正しいトポロジで膜挿入される割合は、pOmpAの膜透過の効率と相関していると考えられた (図15C)。

以上の結果から、PURE systemで合成されたSecYEGは分泌タンパク質の膜透過に加えて、YidCのような膜タンパク質を基質とした反応も行えることが示された。同時に、これまでの無細胞系では難しかった膜タンパク質のトポロジの制御、特に親水的ドメインの膜透過反応を伴う膜タンパク質の膜挿入がSecYEGを基盤とした合成系によって可能になることも示唆された。

しかしながら、現状の合成系における問題点も明らかになった。まず、膜挿入反応について、リポソームをSecYEGにリクルートする因子であるSRP/FtsYの依存性はみられなかった (図15B Lane 3, 4)。また、SecYEGが存在する条件においても、SecYEGのリポソームを用いた場合と同じだけの自発的膜挿入の断片が確認された。この断片は、YidCの翻訳を終結させた後でリポソームを加えた場合 (すなわち、post-translationalにリポソームへの膜挿入を試みた場合) は検出されなかった (図15C Lane 1, 2)。これらのことから、YidCの翻訳中に反応液にリポソームが存在する場合には、SecYEGやSRP/FtsYが存在する条件であっても自発的膜挿入が起きることが示された。そのため、より正確な膜タンパク質のト

ポロジ-の制御を実現するためには、この自発的な膜挿入を抑制する必要があることが明らかとなった。

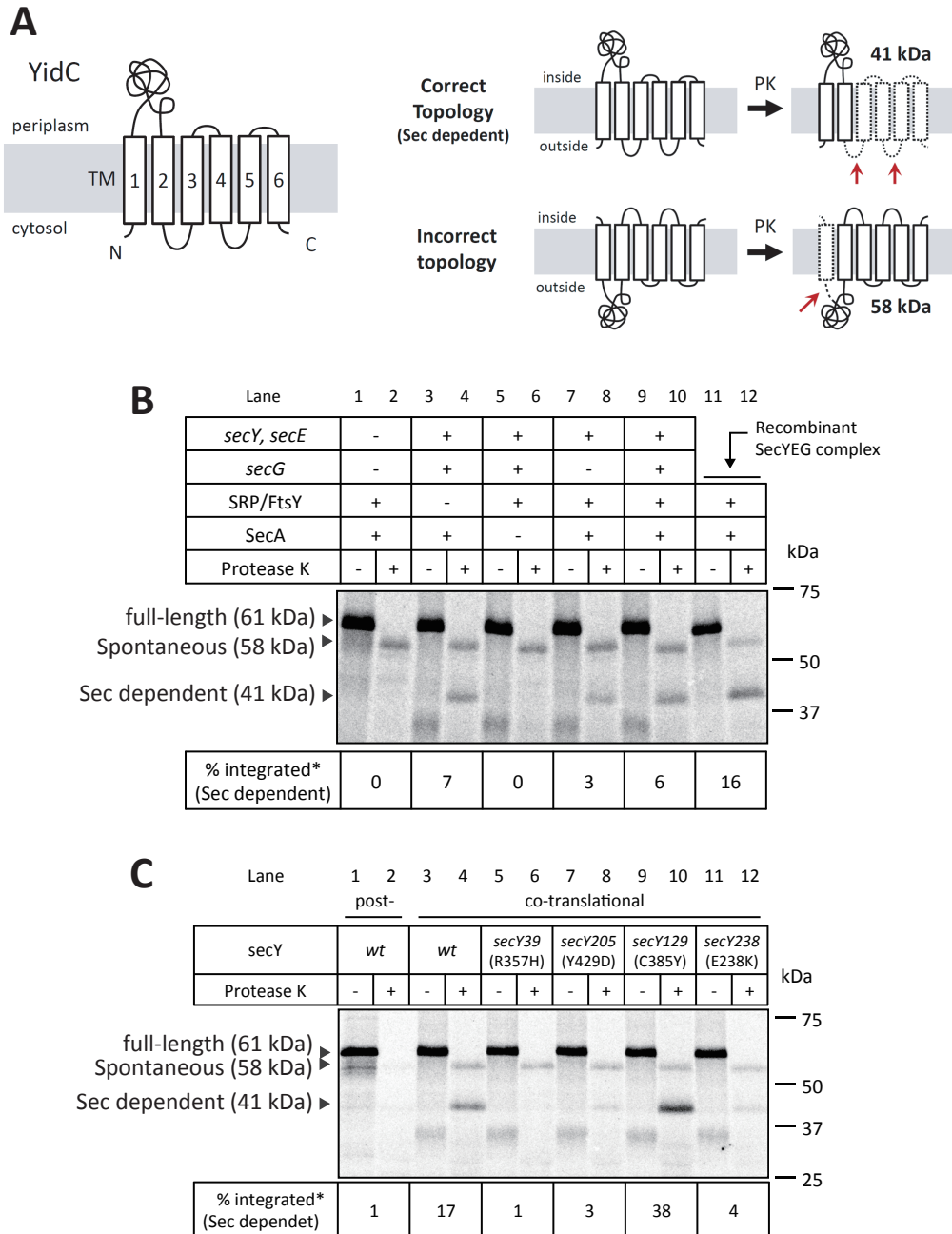


図 15. SecYEG 依存的な YidC の膜挿入

A: YidC のトポロジーと PK 切断パターン . B: YidC 膜挿入の因子依存性 . Recombinant は大腸菌から精製した SecYEG 複合体を用いて作成したプロテオリポソームを使用 . C: SecY 変異体を用いた YidC 膜挿入 . post- は YidC の翻訳終結後に SecYEG プロテオリポソームを混合 . co-translational は YidC の翻訳段階から SecYEG プロテオリポソームを混合 . B, C ともに PK+ は PK- の 4 倍量を泳動 . %integrated* は 41 kDa の断片が 7 つのメチオニンを持つと仮定して算出 .

3.8 SecYEG による LepB の膜挿入

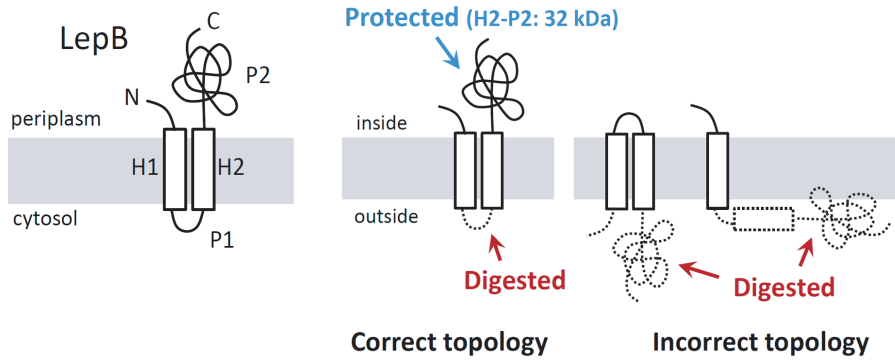
YidCに加えて、大腸菌のシグナルペプチダーゼである LepB についても膜挿入を評価した。LepB は 2 回膜貫通型の膜タンパク質であり、YidC と同様にペリプラズム側に配向する親水的なペプチダーゼのドメインが存在する。実験としても、図 16A に示すように、YidC のときと同様のスキームで、正しい配向で膜挿入された場合に protease K (PK) の分解を免れたペプチダーゼドメインの断片が確認できる⁵⁸。

実験の結果から、SecYEG の合成や SecA に依存して正しい配向でのペプチダーゼドメインの膜挿入が認められた(図 16B)。しかしながら、YidC の結果と比較すると膜挿入効率は低い値であった。また、YidC のときと同様に SRP/FtsY の依存性は見られなかった (図 16B Lane 3, 4)。

膜等挿入効率は比較的低かったが、SecYEG を介して膜透過した親水的なドメインがシグナルペプチダーゼとしての活性を保持しているか検証するため、pOmpA の膜透過反応と組み合わせた実験を行った。この実験では、まず、SecYEG 合成済みの PURE system 反応液を、等量の新しい PURE system 反応液と混合した。次に、30°C で 30 分間 pOmpA の合成と膜透過反応を行ったのち、LepB の鋳型 DNA を反応系に加え pOmpA 合成と並行して LepB の合成と膜挿入をさらに 30°C で 1 時間行った。結果から、SecYEG と LepB が共に存在する条件において、リポソームの内部の画分を示す PK+のレーンから、シグナル配列に対応する約 2 kDa 分低分子量側にシフトした OmpA が確認されたことから、リポソーム内部で pOmpA が LepB によって切断されたことが示唆された (図 17A Lane 11, 12)。また、この OmpA のバンドは、高活性な SecY C385Y を用いた場合により顕著に確認された (図 17A Lane 13, 14)。

しかしながら、上記の実験だけでは、pOmpA の膜透過とシグナル切断の順序を一意に決定できない。すなわち、リポソームの外部で先にシグナルが切断された OmpA が膜透過して PK+のレーンで検出された可能性も考えられた。そこで、pOmpA の鋳型 DNA のシグナル配列領域を除いた OmpA をネガティブコントロールとして用いた対照実験を行った。その結果、シグナル配列を除いた OmpA では PK 耐性のバンドが確認できず、膜透過能を持たないことが確かめられた。このことから、上記の実験結果は、先に pOmpA の形で膜透過したタンパク質がリポソーム内部でシグナル切断されたことを示しており、SecYEG によって正しい配向で膜挿入された LepB がシグナルペプチダーゼとしての活性を保持していることを支持した。

A



B

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>secY, secE</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>secG</i>	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
SRP/FtsY	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SecA	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Protease K	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

full-length	▶											
H2-P2	▶											

% integrated	0	3	0	1	2	6						
--------------	---	---	---	---	---	---	--	--	--	--	--	--

Recombinant SecYEG complex

図 16. SecYEG 依存的な LepB の膜挿入

A: LepB のトポロジーと PK 切断パターン . B: LepB 膜挿入の因子依存性 . Recombinant は大腸菌から精製した SecYEG 複合体を用いて作成したプロテオリボソームを使用 . PK+ は PK- の 4 倍量を泳動 .

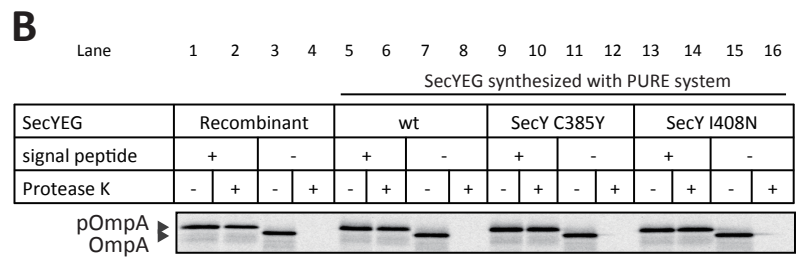
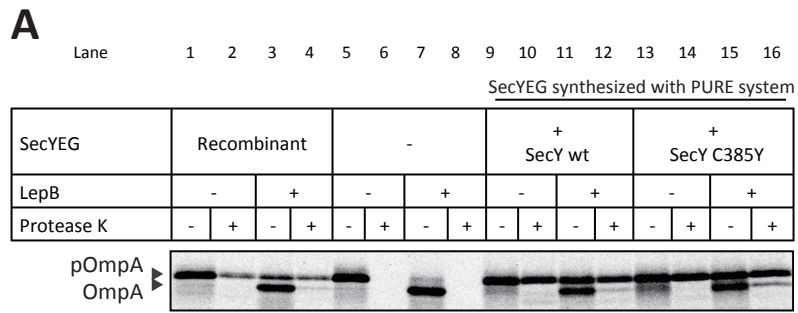


図 17. LepB による pOmpA のシグナル切断

A: pOmpA のシグナル切断活性の評価 . B: シグナル配列を除いた OmpA の膜透過評価 .
 Recombinant は大腸菌から精製した SecYEG 複合体を用いて作成したプロテオリソームを使用 .

3.9 SecYEG の複合体形成、機能発現における脂質組成の影響

これまでの結果から、PURE system によって活性型の SecYEG 複合体を再構成することができることが示された。また、SecYEG が活性型の複合体を形成する過程では他のタンパク質を必要としないことが示唆された。これまでの実験で使用したリポソームは、soybean の脂質抽出物から調製したものであったが、SecYEG の構造形成に必要な脂質膜の条件についてもさらに詳細に解析するため、合成脂質から再構成したリポソームを用いて、脂質組成が複合体形成や膜透過反応に与える影響を解析した。

まず、様々な脂質の組み合わせでリポソームを作製し、Blue Native PAGE によって各脂質条件での SecYEG 複合体の形成について解析した。POPC 80%/POPG 20%と DOPC の条件では、soybean 脂質の場合よりも複合体のバンド強度が強くみられ、POPC 40%/POPE 30%/POPG 20%/CL 10%や POPC 40%/E. coli polar lipid extract 60%の条件ではバンド強度が比較的弱くみられたものの、どの条件でも SecYEG 複合体のバンドを Blue Native PAGE 上で認めることができ、脂質組成は SecYEG の複合体形成に顕著な影響を与えないことが示唆された (図 18A)。

次に、pOmpA の膜透過効率を指標として脂質組成が SecYEG の活性に与える影響を解析した。まず、soybean 脂質に対して POPC を段階的に加えたリポソームを調製し、pOmpA の膜透過活性を評価した。その結果、POPC を加えたリポソームではその割合に従って pOmpA を膜透過する活性が減少することが示された (図 18B)。また、POPC 100%や POPC 80%/POPG 20%のリポソームでは pOmpA の膜透過がほとんど見られず、この条件では SecYEG が活性を持たないことが示された。これらの結果は、脂質頭部の小さいホスファチジルエタノールアミン (PE) と負電荷を帯びた脂質 (大腸菌の場合は、ホスファチジルグリセロール (PG)) の存在が SecYEG や SecA の活性に重要であるという報告^{48, 59, 60}と一致する結果であった (図 18C)。そこで、PE と PG のどちらも含有する POPC 40%/POPE 30%/POPG 20%/CL 10%や POPC 40%/E. coli polar lipid extract 60%の条件で検証したところ、わずかながら pOmpA の膜透過が見られたものの、その効率は soybean リポソームの条件に比べて著しく低い値であった (図 18C)。(大腸菌の細胞膜に近い E. coli polar lipid extract 100%のリポソームも検討したが、Mg²⁺濃度の高い溶液ではリポソームの凝集がみられ、PUREfrex[®]反応液中では使うことができなかった。)

大腸菌の脂質膜の主成分は、PE、PG とカルジオリピン (CL) であるため、POPC 40%/POPE 30%/POPG 20%/CL 10%の条件や、POPC 40%/E. coli polar lipid extract 60%の条件では、大腸菌の主要な脂質はすべて存在する条件であると考えられる。そこで、大腸菌の主要な脂質には含まれない因子が soybean 脂質抽出物中に存在し、その因子が SecYEG を活性化に必要な因子であるという仮説が考えられた。

近年、西山らのグループは、大腸菌の SecYEG の研究で、SecYEG の活性を促進する MPLase と呼ばれる糖脂質を発見しており^{50, 61}、この MPLase の存在によって SecYEG の膜透過反応の比活性が 5-10 倍上昇することを報告している⁶²。また、soybean 脂質抽出物を調製する際の脂質の洗浄条件では、糖脂質は除去されない可能性が高く、soybean 脂

質抽出物中に MPIase 様の分子が含まれている可能性も十分に考えられた。そこで、soybean 脂質の薄層クロマトグラフィーによる展開を行った。Soybean 脂質の主要な成分である PC 以外にも、多数のスポットが確認され、その中の最も移動距離の短いスポットは MPIase と同様の移動度を示していた (図 18D)。この結果から、Sec トランスロコンの活性に影響を与える糖脂質が、真核生物である soybean の脂質中に存在している可能性が示唆された。

一方で、DOPC 40%/DOPE 30%/DOPG 30%のリポソームを用いた場合は、合成脂質から再構成した条件でも soybean の脂質の場合と同様な膜透過活性が見られた (図 18E)。活性の低かった合成脂質の条件に比べて、脂肪酸の不飽和度が高くなり脂質の流動性が上がったことで、リポソームの安定性やタンパク質の活性に影響が出たと考えられるが、SecYEG が機能するために必要な脂質条件を合成脂質から再構成することが可能であることが示された。

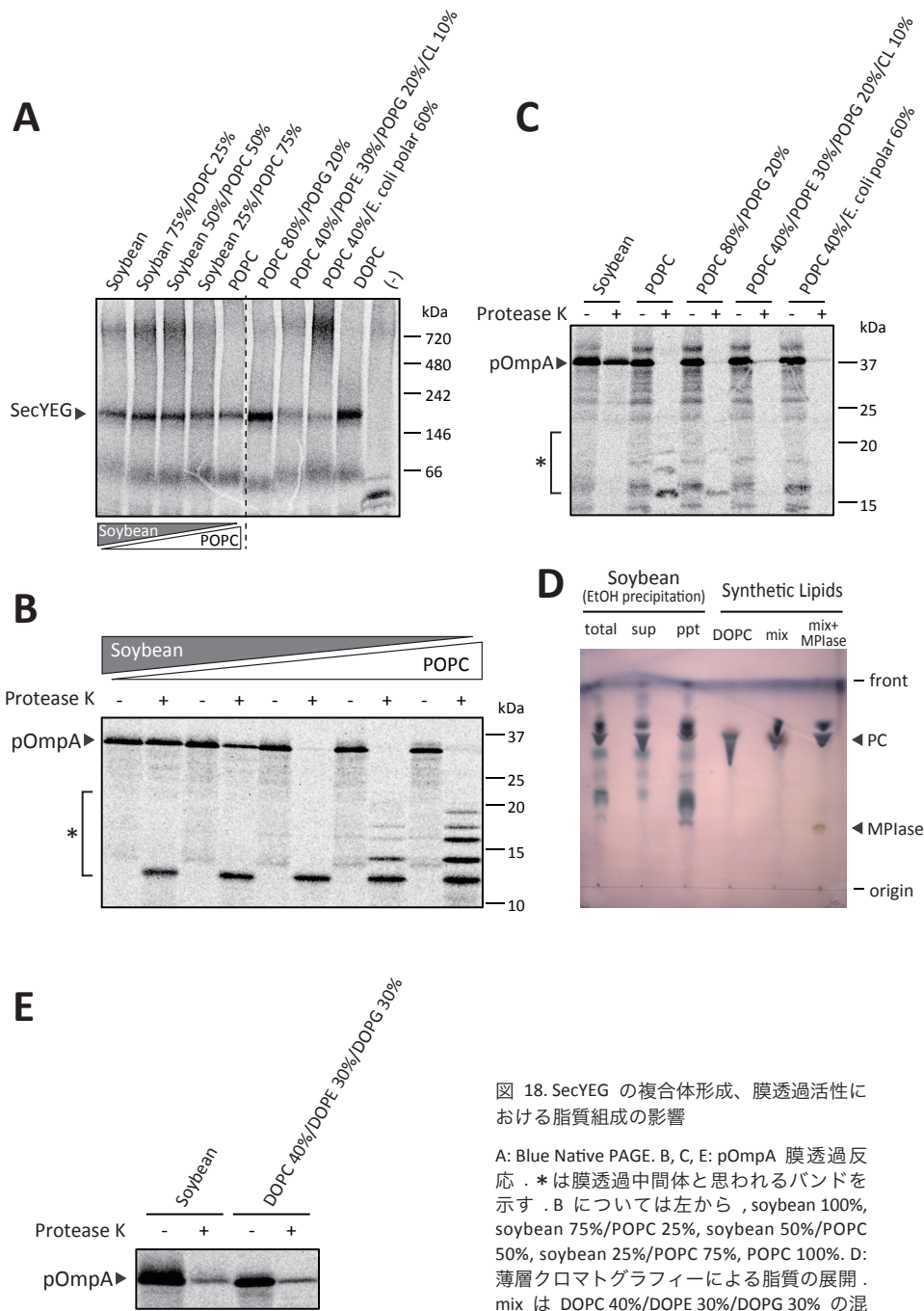


図 18. SecYEG の複合体形成、膜透過活性における脂質組成の影響

A: Blue Native PAGE. B, C, E: pOmpA 膜透過反応. * は膜透過中間体と思われるバンドを示す. B については左から, soybean 100%, soybean 75%/POPC 25%, soybean 50%/POPC 50%, soybean 25%/POPC 75%, POPC 100%. D: 薄層クロマトグラフィーによる脂質の展開. mix は DOPC 40%/DOPE 30%/DOPG 30% の混合物. 脂質の % については全て mol %.

3.10 SecYEG トランスロコンの 1 分子観察の意義

SecYEG トランスロコンによるタンパク質膜透過機構の未解明な課題として、SecYEG のオリゴマー状態の解析が挙げられる。SecYEG 複合体の電子顕微鏡による構造解析⁶³や Native PAGE^{52, 53}などの研究から、SecYEG 複合体は 2 量体を形成することが示唆されてきた。この 2 量体が細胞内でも存在していることが、クロスリンクなどの実験から示唆されている⁵⁴が、2 量体形成が SecYEG の機能にどのような意義をもつのかは未だ明らかになっていない。実際に、SecYEG の単量体でも pOmpA-DHFR (分泌タンパク質の pOmpA の C 末端にフォールディングしやすい DHFR を融合し、膜透過が途中で停止するようにしたもの)との間で膜透過中間状態が形成されることが *in vitro* の FRET の実験^{48, 64}から示されている。一方で、nanodisc に SecYEG の単量体または 2 量体の状態で再構成した場合、2 量体の SecYEG の場合でのみ SecA による膜透過反応依存的な ATPase 反応が活性化されることも報告されている⁶⁵。しかしながら、これまでの解析方法は、生化学による多分子の平均による解析か、構造解析やクロスリンク、DHFR などによる膜透過の停止操作といった瞬間的な静止画の観察に限られており、「単量体と 2 量体で反応効率がどれほど違うのか」や「SecYEG の 2 量体化が反応のどのステップで重要になるのか」を明確に議論することが難しかった。

もうひとつの課題として、膜透過反応の速度論の解析が挙げられる。これまでに、膜透過反応のエネルギー論の見積もりとして、1 つの pOmpA を輸送するために必要な平均の ATP の個数は、大腸菌の反転内膜小胞を用いた生化学の解析から、proton motive force (PMF) が存在する場合は ATP 約 1000 個、PMF が存在しない場合には ATP 約 5000 個と見積もられている⁶⁶。しかしながら、SecA によるタンパク質輸送反応のステップ長の詳細、すなわち「1 回の ATP 加水分解によって、何アミノ酸分が輸送されるのか」は明らかになっていない。ATP 濃度を低くした場合に見られる、pOmpA の膜透過中間体 (PK 耐性のバンド) から、1 回の反応ステップで約 5 kDa 分輸送が進行すると考えられている⁶⁷が、この仮説が正しいとすればおよそ 7 個の ATP で pOmpA を膜透過できることとなり、上記の生化学実験の計算結果と大きく乖離していた。

こうした背景から、SecYEG による膜透過反応のダイナミクスや速度論を動画として 1 分子レベルで解析することが求められている。これを実現する実験として、蛍光 1 分子観察が有力であると考えられる。しかし、蛍光 1 分子観察の場合、タンパク質の蛍光修飾などにおいて様々な試料を検討する必要が生じるが、膜タンパク質は細胞からの精製が煩雑であり、どうしても可溶性タンパク質に比べ条件検討に時間を要するため、1 分子解析の例は多くなかった。ここまでの結果から、再構築型の無細胞翻訳系である PURE system によって活性型の SecYEG 複合体や、pOmpA を合成可能であることが明らかになった。無細胞翻訳系の特徴として、タンパク質の収量は少ないものの、純度の高いタンパク質試料が非常に簡便に得られる点が挙げられるため、蛍光 1 分子観察に必要な条件検討のスループット性を大きく向上できると考えられる。そこで、PURE system による SecYEG の合成を基盤とした蛍光 1 分子観察を試みることにした。

3.11 アンバーサプレッション法を用いた SecYE の pOmpA の蛍光標識と精製

まず、蛍光 1 分子観察のために、SecY、SecE、または pOmpA の蛍光標識を行った。蛍光標識には、アンバーサプレッション法を用いた。アンバーサプレッション法は、通常は終止コドンであるアンバーコドン (UAG) に対応するサプレッサー-tRNA によって、非天然アミノ酸などを翻訳と同時に取り込ませる方法である。この方法を用いて、PUREflex® でのタンパク質合成反応時に、蛍光色素 TAMRA が修飾されたアミノフェニルアラニン (図 19A、TAMRA-X-AF) をそれぞれのタンパク質の N 末端領域に導入することを試みた。

SecY については 2 番目から 9 番目の残基 (AKQPGLDF) を、SecE についても 2 番目から 9 番目の残基 (SANTEAQG) をそれぞれ 1 残基ずつ UAG コドンに置換した鋳型 DNA を作製し、アンバーサプレッションの条件検討を行った。その結果、SecY は 2 番目の Ala だった位置を、SecE は 5 番目の Thr だった位置を、UAG コドンに置換した場合に、効率よく TAMRA-X-A が導入された (図 19B)。また、pOmpA の場合は、N 末端のシグナル配列を避け、29 番目から 36 番目の残基 (YTGAKLGW) をそれぞれ 1 残基ずつ UAG コドンに置換した鋳型 DNA で条件検討したところ、32 番目の Ala だった位置を UAG コドンに置換した場合に、サブバンドが少なく、効率よく TAMRA-X-AF が導入されたタンパク質が合成された (図 19C)。一方、pOmpA の条件検討の際には、タンパク質の中間領域や、C 末端領域への TAMRA の導入も試みたが、これまでに知られているように、TAMRA のように大きな分子をタンパク質の N 末端領域以外に導入することはできなかった。

蛍光 1 分子観察を行う場合、タンパク質の標識後は、余剰な色素を除去する必要があるが、SecYE の場合は超遠心でプロテオリソームを沈殿させることで、余剰な色素と分離した (図 19B)。pOmpA の場合は、SecB との複合体として SecB の His-tag で精製した。また、His-tag 精製の溶出で用いる imidazole は膜透過反応を阻害するため、His-tag 精製したのち、脱塩カラムによって imidazole も除去した (図 19C)。

さらに、図 11 と同様の膜透過反応から、TAMRA で標識した pOmpA が野生型と同様の効率で膜透過されることも確かめられた (図 19D)。

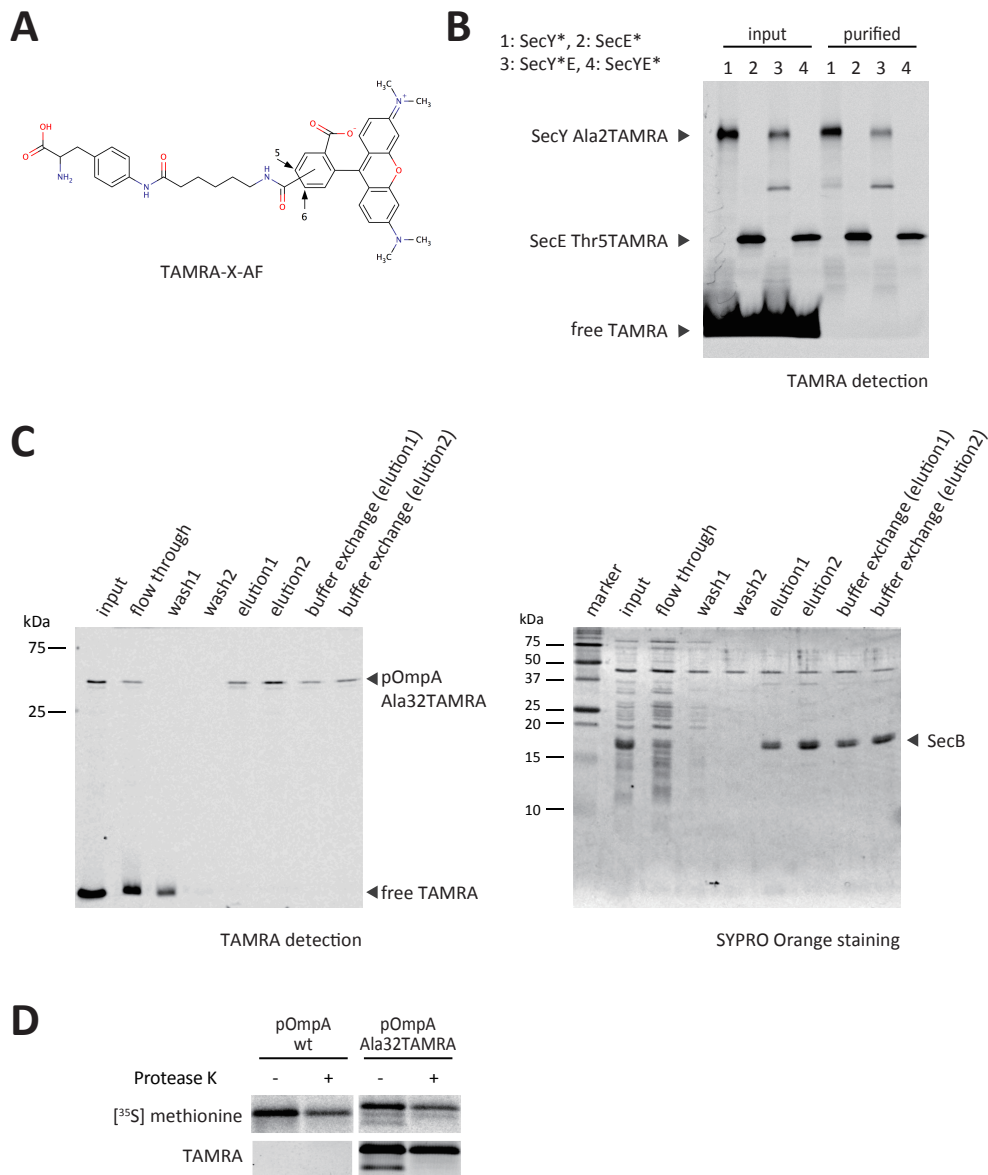


図 19. アンバーサプレッション法による SecYE, pOmpA の蛍光標識

A: TAMRA-X-AF の分子構造 . B: アンバーサプレッション法による SecY, SecE の標識とプロテオリボソームの精製 . * は標識したものを示し, SecY の場合は 2 残基目の Ala を, SecE の場合は 5 残基目の Thr を UAG コドンに置換した . input はタンパク質合成直後の PUREflex 反応液, purified は精製後のプロテオリボソームを示す . C: アンバーサプレッション法による pOmpA の標識と SecB の His-tag による精製 . pOmpA は 32 残基目の Ala を UAG コドンに置換した . D: TAMRA 標識した pOmpA の膜透過反応 .

3.12 SecYE の平面膜上での 1 分子観察

蛍光標識した SecYE の脂質膜上での挙動を確認するため、SecYE の脂質平面膜への再構成と蛍光 1 分子観察を行った。

再構成系の膜タンパク質の 1 分子観察の例は少ないものの、野地研究室では、図 20A に示すデバイスを用いて脂質の平面膜を作製し、全反射顕微鏡によって膜上での膜タンパク質の反応を 1 分子観察する方法論を報告している^{68, 69}。そこで、野地研究室との共同研究で、脂質膜上の Sec トランスロコンの観察を行った。

まず、脂質平面膜が作製可能な脂質の条件検討を行った。先行研究で使われていた Major-Miner mix (DOPC を中心とした 9 種の合成脂質の混合物)⁶⁸の他に、DOPC や DOPC 50%/DOPS 50% などの単純な合成脂質や、soybean 脂質でも平面膜が作製可能であることが明らかとなった。そこで、SecYEG の pOmpA 膜透過活性は、soybean 脂質を使った場合が最も高いこと (図 18) から、これ以降の実験では soybean 脂質からなる平面膜を用いた。

この平面膜に対して、SecY または SecE を蛍光標識した SecYE 複合体を再構成したところ、膜上で分散して 2 次元的にブラウン運動する様子が観察され、平面膜への再構成と 1 分子観察が問題なく行えることが確かめられた (図 20E, F)。

次に、SecY と SecE のそれぞれの単量体の観察を行った。大腸菌の細胞膜上において、SecE に対して過剰な SecY は安定に存在できず膜上のプロテアーゼ FtsH の分解の対象となる^{44, 45}ことから、単量体の SecY は膜上で凝集することも予想された。しかし、1 分子観察の結果としては、予想に反して、単量体の SecY も SecYE 複合体のときと同様に、膜上で分散して 2 次元的にブラウン運動する様子が観察された (図 20C)。同様に、SecE の単量体も分散してブラウン運動する様子が観察された (図 20D)。これらのことから、純粋な脂質膜上では、単量体の SecY や SecE も安定的に存在できることが示唆された。この観察結果から、PURE system で合成した場合の SecYEG の複合体形成のメカニズムとして、リポソーム上に分散してブラウン運動する単量体同士がランダムに相互作用する可能性が考えられた。大腸菌の細胞膜上で SecY 単量体の挙動や、それに伴う FtsH による SecY の認識と分解のメカニズムについては、さらなる解析が求められる。

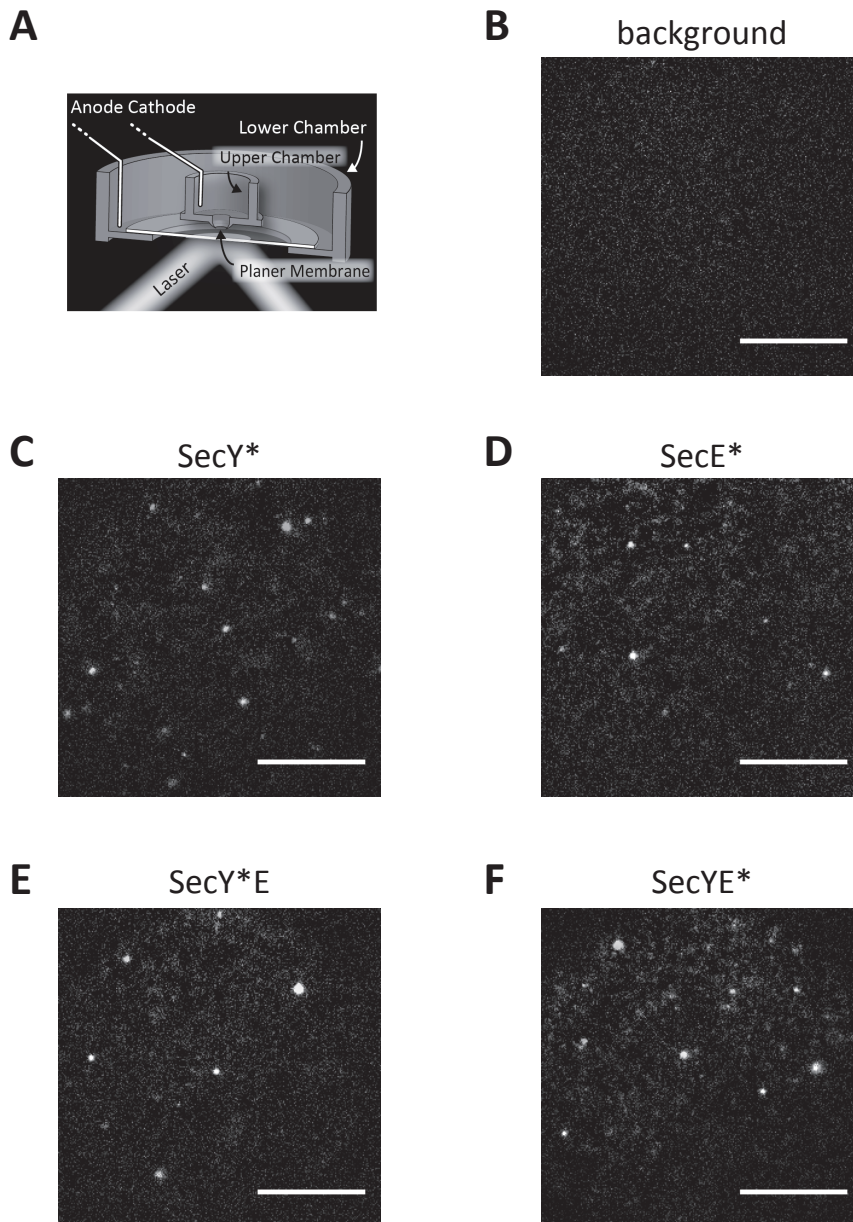


図 20. 脂質平面膜上での SecYE の観察

A: 脂質平面膜再構成デバイスの模式図 . B-F: 観察結果 . B: soybean 脂質平面膜 . C: SecY 単量体 . D: SecE 単量体 . E: SecYE 複合体 (SecY 標識) . F: SecYE 複合体 (SecE 標識) . * は標識した分子を示す . スケールバーは 10 μm .

3.13 大腸菌ペリプラズム酵素 AmpC、PhoA の活性評価と膜透過

平面膜上に Sec トランスロコンが再構成できることが確認されたため、次に、平面膜上に再構成された Sec トランスロコンが膜透過活性を保持しているか否かについての評価を試みた。

顕微鏡上で膜透過反応を観察する方法として、まず、酵素の触媒反応を利用した観察を試みた。野地研究室では、 β -galactosidase や alkaline phosphatase などの酵素を fL スケールの空間に封入し、酵素反応によって蛍光性基質の蛍光が生じる速度を顕微鏡で観察することで、1 分子レベルで酵素反応を解析できることを報告している^{70, 71, 72}。また、CYTOP 樹脂の微細加工で作製したマイクロチャンバーアレイの上を脂質膜で蓋をした状態にすると、上記と同様の fL スケールの空間を作製でき、膜タンパク質の物質輸送活性を 1 分子計測できることが、同じく野地研究室から報告されている⁷³。この実験系において、脂質膜上に SecYEG を再構築しておけば、膜透過した酵素のみが脂質膜下の空間に入り、膜透過した酵素量に伴う酵素反応が蛍光性基質を介して観察できると期待される。

そこで、蛍光性の基質が知られている酵素の中から、大腸菌のペリプラズムに局在する分泌タンパク質である AmpC (β -lactamase、図 21A) と PhoA (alkaline phosphatase、図 21B) について検討を行った。 β -lactamase については Fluorocillin™ Green (図 21C)が、alkaline phosphatase については AttoPhos® (図 21D)が、蛍光性基質として市販されており、これらを用いて PURE system で合成した酵素の活性評価を行った。AmpC、PhoA ともに合成量は比較的高く、37°C、3 時間の合成条件で 1 μ M 程度合成された。また、蛍光分光器を用いた解析から合成した酵素の活性も確認された (図 21C, D)。

これらの酵素が膜透過反応の基質として利用できるか確かめるため、生化学のバルク系での post-translational な膜透過を検証した。AmpC の場合に SecYEG に依存した膜透過が確認されたが、PhoA は SecYEG に依存した膜透過断片は確認されなかった (図 21E, SecYEG liposome +, PK +)。AmpC の場合も、PhoA の場合も、全長タンパク質の 1–2 kDa 下の位置に PK 耐性の断片が確認されたが、これらは SecYEG プロテオリポソームを加えていない条件でも確認された (図 21E, SecYEG liposome -, PK +) ことから、酵素ドメインなどが自発的にフォールディングして PK 耐性を持ち、シグナル配列等が部分的に切断されたものと考えられる。膜透過反応の結果から、次のマイクロチャンバーの観察実験では Fluorocillin™ Green を使って検証した。

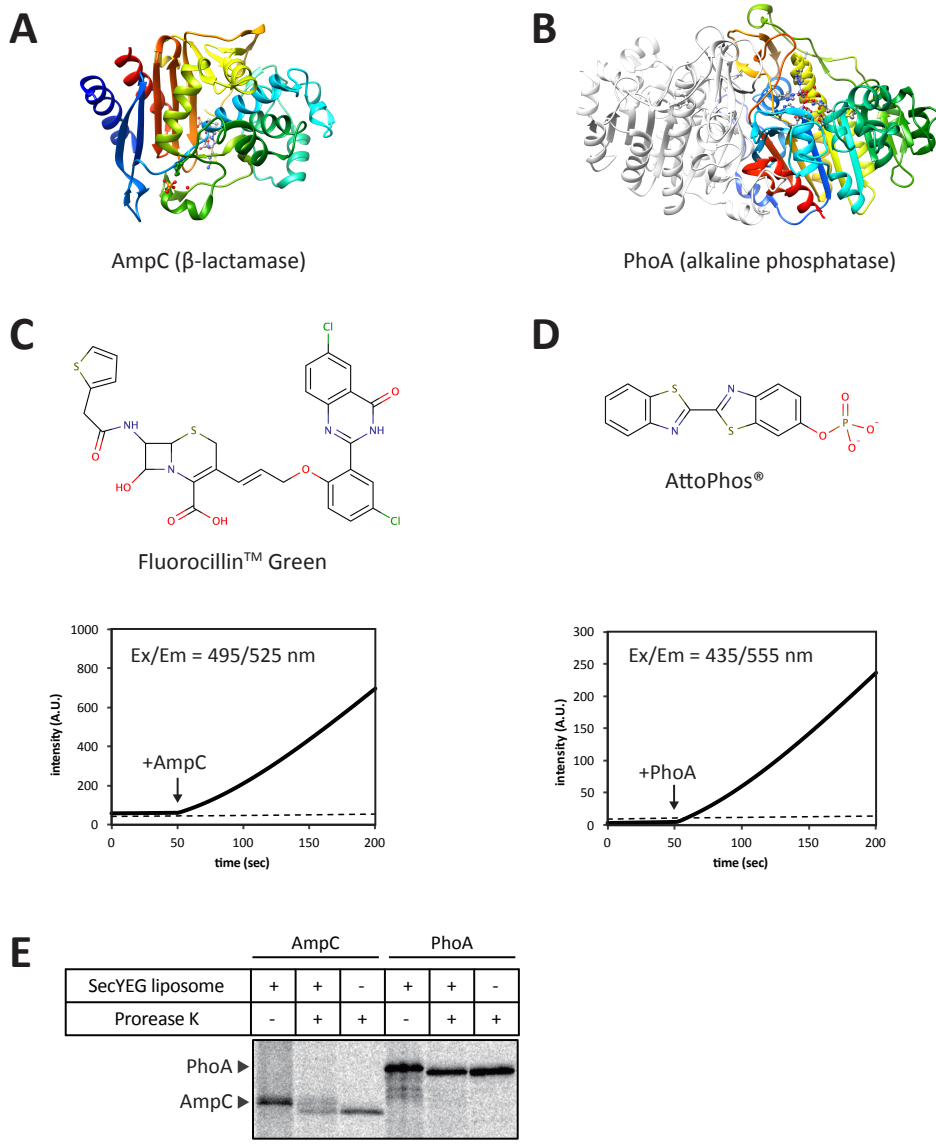


図 21. AmpC, PhoA の活性評価

A: AmpC の構造 (PDB: 1IEL). B: PhoA の構造 (PDB: 3TG0). C: beta-lactamase の蛍光性基質 Fluorocillin™ Green の分子構造と AmpC の酵素活性測定. D: alkaline phosphatase の蛍光性基質 AttoPhos® の分子構造と PhoA の酵素活性測定. 測定開始から 50 秒後に PUREflex 反応液を添加. 点線はバックグラウンド. E: post-translational な膜透過反応.

3.14 マイクロチャンバーの脂質膜を介した Fluorocillin™ Green の漏れの問題

図 22A に示す CYTOP 樹脂のマイクロチャンバーを用いて、fL スケールのチャンバー内の Fluorocillin™ Green を観察した。Fluorocillin™ Green は、先に PURE system で合成した AmpC による酵素反応で蛍光を発生する状態にしたものを用い、平面膜デバイスの上両方のチャンバーに 10 nM の濃度で加えた。まず、脂質平面膜でマイクロチャンバーを覆う場合は、エバネッセント照明による Fluorocillin™ Green の励起によってマイクロチャンバー内の蛍光が退色する様子が観察された。この退色は、平面膜でマイクロチャンバーを覆わない場合には見られず、脂質膜の蓋がない状態では常に上部の buffer 内の Fluorocillin™ Green 分子とマイクロチャンバー内の Fluorocillin™ Green 分子との交換が起きていると考えられた。これらの結果から、脂質平面膜によってマイクロチャンバーに蓋をして区画化できることが確かめられた。

しかしながら、マイクロチャンバーに脂質膜で蓋をしてマイクロチャンバー内の Fluorocillin™ Green を強い照明によって全て退色させた後であっても、脂質膜の上側領域の buffer 内にある Fluorocillin™ Green が脂質膜を介してマイクロチャンバー内に漏れ、マイクロチャンバー内の蛍光が回復する様子が観察された。また、この蛍光回復の経時変化の観察から Fluorocillin™ Green の漏れは、分単位のオーダーで起こることが明らかとなり(図 22B, C)、この条件では、酵素反応を介してタンパク質の膜透過反応を十分に解析できることは期待できなかった。以上の結果から、Fluorocillin™ Green のような蛍光小分子の場合は、このような漏れが問題になると考えられたため、分泌タンパク質を直接蛍光標識して観察する実験に移行した。

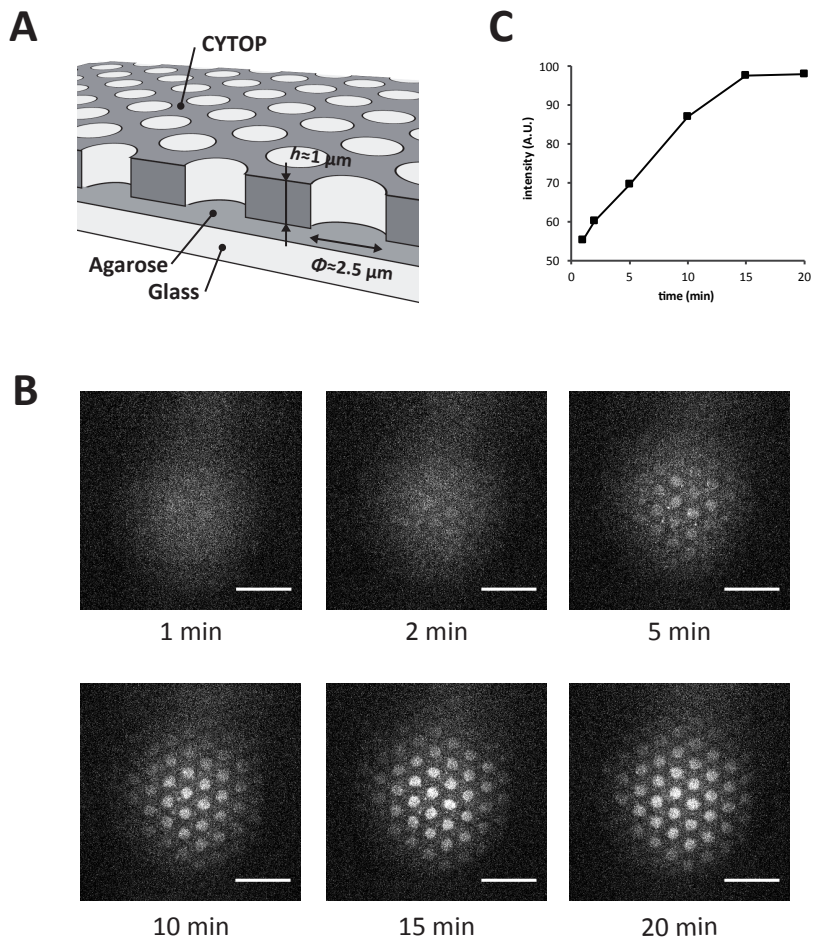


図 22. マイクロチャンバーを使った Fluorocillin™ Green の観察

A: マイクロチャンバーの模式図. B: 脂質膜を介してマイクロチャンバー内に Fluorocillin™ Green が漏れて入る様子. スケールバーは $10 \mu\text{m}$. C: B の観察における 1 つのチャンバー内の蛍光強度の時間変化.

3.15 pOmpA の平面膜上での 1 分子観察

Fluorocillin™ Green とマイクロチャンバーを使った観察では、Fluorocillin™ Green の漏れが問題になったことから、分泌タンパク質である pOmpA を TAMRA で蛍光標識して直接観察することを試みた。観察には図 19C, D に示した SecB-pOmpA 複合体を用い、SecYEG は蛍光標識していない SecYEG プロテオリポソームを図 20 の実験と同様に平面膜に再構成した。pOmpA を加えてからの時間に伴って徐々に平面膜上の輝点が増加することが確認されたが、脂質膜上に SecYEG を加えていない条件でも同様な輝点が認められ、脂質膜上に pOmpA が非特異的に結合することが示唆された。そのため、蛍光標識した分泌タンパク質を用いて SecYEG による膜透過反応の観察を行う場合、このような非特異的な結合を抑制する必要があることが明らかとなった。

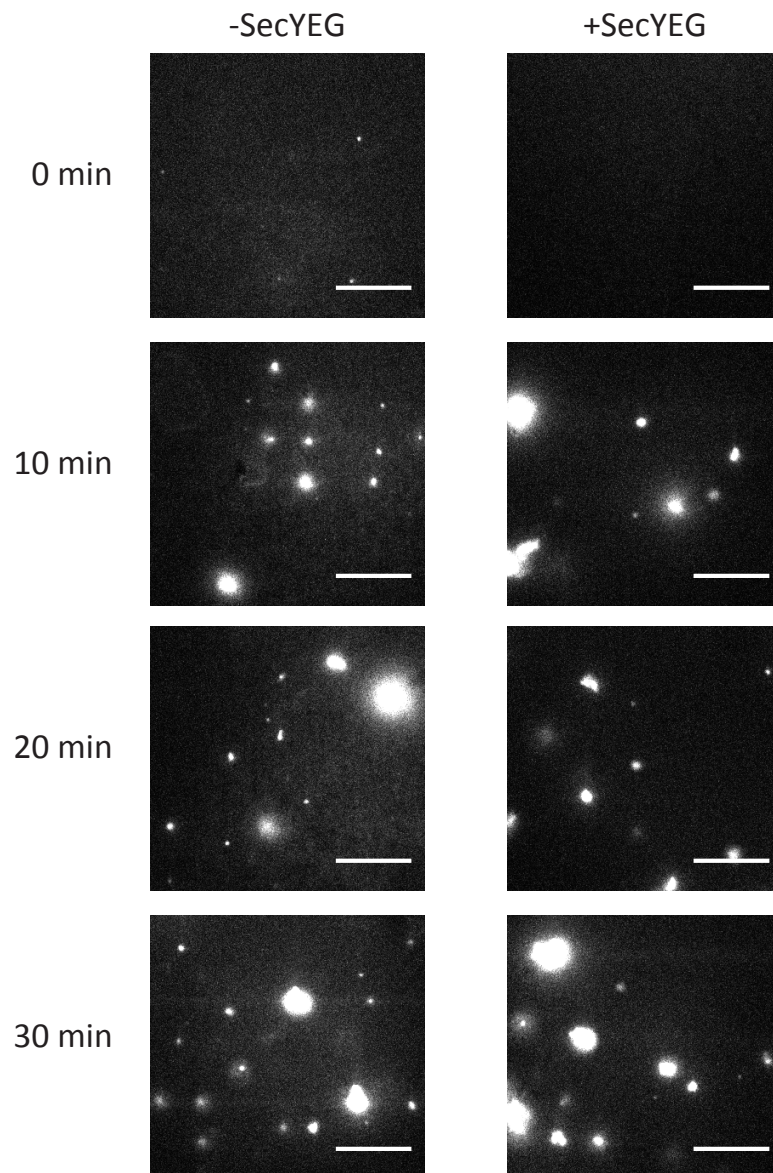


図 23. 脂質平面膜上での pOmpA の観察

平面膜に SecYEG を加えた条件と加えていない条件で観察 . 時間は SecB-pOmpA (Ala32TAMRA) を加えてからの時間 . スケールバーは 10 μ m.

4 考察

4.1 本研究のまとめ

本研究を通して、再構築型の無細胞翻訳系である PURE system を用いて SecYEG トランスロコンを合成することに成功した。PURE system は翻訳に関わる因子のみから構成され、リポソームはリン脂質のみから構成されていることから、SecYEG の複合体形成には他のタンパク質を必要とせず、自己集合的に行われることが示された。

さらに、合成した SecYEG を基盤として他の膜タンパク質合成系の要素である YidC や LepB についても、リポソームだけの膜条件では難しかった親水的なドメインの膜透過を伴う膜タンパク質の合成が可能になった。以上の結果から、無細胞翻訳系が膜タンパク質を調製する方法論として有用であり、SecYEG によってさらにその応用範囲を広げられることが示された。

また、PURE system によってアンバーサプレッション法を用いて蛍光標識した SecYEG を簡便に調製することも可能であり、実際に SecYE についての平面膜上での挙動を観察することに成功した。しかしながら、タンパク質の膜透過反応の観察については、SecYEG 特異的な反応を観察するには至らず、さらなる実験系の改良が必要であることが示された。

4.2 無細胞翻訳系で合成される膜タンパク質のトポロジーと課題

SecY と SecE について、配列特異的なプロテアーゼを用いて膜上でのトポロジーを評価した実験では、合成された SecY、SecE は正しいトポロジーで膜挿入される割合のほうが高いことが示された。界面活性剤を用いて大腸菌から精製した SecYEG をリポソームに再構成する場合には、膜上での配向がおよそ 50:50 になる⁴⁸ことを考えると、無細胞系で合成した場合には、自発的な膜挿入であっても、正しいトポロジーのほうにバイアスがかかって膜挿入されていることが示唆された。正しいトポロジーのほうにバイアスがかかる理由としては、翻訳反応がリポソームの外側でのみ行われることが大きく寄与していると考えられる。また、膜貫通ヘリックスをつなぐループの部分の長さやアミノ酸の性質も要因になると考えられる。たとえば、SecY や SecE をリポソームの外側で合成する場合、細胞質側のループがリポソームの外側に位置する場合に正しいトポロジーとなるが、これらのループはペリプラズム側のループと比較して長く、正の電荷を持ったアミノ酸が多く含まれている。そのため、電荷を持った長いループが疎水的な脂質膜を越えてリポソームの内側に配向することが難しく、正しいトポロジーの割合が増えると考えられる。

上記のような理由によって、無細胞翻訳系で自発的に膜挿入した膜タンパク質のトポロジーにバイアスがかかることは、他の膜タンパク質の場合にも見られると考えられる。例えば、connexin-43 を PURE system で合成した際にリポソーム上での配向が揃うことが報告されている¹⁰。

一方で、合成される膜タンパク質が膜挿入される際に、親水的なループやドメインが膜を越えなければならない場合、すなわち、膜透過反応を伴う膜挿入が必要になる場合は、正しいトポロジーでの膜挿入に Sec トランスロコンが必要になる。実際に、ペリプラズム側に親水的なドメインを持つ YidC や LepB について、SecYEG がいない条件での自発的膜挿入では正しいトポロジーで合成することができなかった。これに対して、本研究によって、合成した SecYEG を基盤として、膜透過反応を伴った膜挿入を行うことで YidC や LepB を正しいトポロジーで膜挿入できることが示された。

しかしながら、YidC の場合も LepB の場合も、正しいトポロジーでの膜挿入効率は低く、大部分は自発的膜挿入による誤ったトポロジーで膜挿入することが示唆された。また、今回の研究で評価できたのは、YidC の膜貫通ヘリックス 1 と 2 (TM1, 2) の間のドメインや、LepB の TM2 の下流のドメインの膜透過であり、批判的な見方をすれば、pOmpA の膜透過反応と大きな差はなく、複数回膜貫通のタンパク質における C 末端側の膜貫通ヘリックスやドメインについてもトポロジーが正しく膜挿入反応が行われるか否かについては検証の余地を残している。

正しいトポロジーでの膜挿入効率を向上させるためには、自発的膜挿入の経路を抑制する必要があると考えられる。Diacylglycerol をリポソームの脂質組成に加えることで、自発的膜挿入を抑制できることが報告されており⁷⁷、脂質組成の最適化により、より実用性の高い、膜タンパク質合成系が構築されることが期待される。

4.3 PURE system 内における SecYEG の合成過程

PURE system 内で合成された SecY、SecE、SecG はどのような過程を経て脂質膜上に挿入され複合体を形成しているのか。これについて、「反応の初めに合成された SecYEG が確率的に活性型の複合体を形成し、その活性型複合体が後から合成される SecY、SecE、SecG のサブユニットの膜挿入や複合体形成を助けている」という仮説も考えられた。

この仮説について、まず定量的な側面から考察した。動的光散乱法から算出されたリポソームサイズは半径約 76 nm であり、脂質 1 分子の頭部の面積を 0.72 nm² (phosphatidylcholine の値) として換算すると、4.4 mg/mL の脂質濃度では、約 30 nM のリポソームが反応液中に存在することになる。一方、合成された SecY は SDS-PAGE での [³⁵S]メチオニンの定量から、200 nM と算出され、膜局在の割合を 6 割としてもリポソームの 4 倍以上の SecY が膜上に存在することになる。ポアソン分布を仮定すると「1 つのリポソームに 3 または 4 つの SecY」となる状態が最頻値の分布になり、2 つ以上の SecY をも

つりポソームは全体の 90%以上になる。そこで、先に合成された SecYEG が後から合成される SecY、SecE、SecG と相互作用することは定量的には可能であると考えられた。

一方で、SecY 変異体の機能評価の結果は、この SecYEG の合成経路の解釈に示唆を与える。*secY129* (C385Y) と *secY238* (E238K) の変異体は、膜挿入したタンパク質のフォールディングに支障があり細胞のストレス応答を誘発するものである。先に合成した SecYEG によって後から合成する SecY、SecE、SecG が膜挿入されるとした場合、これらの変異体では、後から膜挿入される SecY、SecE、SecG のフォールディングなどに支障が出て、複合体形成やタンパク質膜透過活性が見られなくなると考えられた。しかしながら、実験結果は、*secY129* (C385Y) と *secY238* (E238K) の場合も、Blue Native PAGE によって複合体の存在が確認され、*secY129* (C385Y) では膜透過活性も確認されたことから、「先に合成した SecYEG によって後から合成する SecY、SecE、SecG が膜挿入される」経路は優位ではないことを示唆していると考えられる。

また、脂質平面膜での 1 分子観察から、純粋な脂質膜の上では、単量体の SecY や SecE も凝集することなく、安定的に分散してブラウン運動する様子が観察されたことから、リポソームの膜上でも同様に各サブユニットがランダム運動する過程から複合体形成する可能性が示唆された。

4.4 SecY 変異体の機能解析で新たに得られた知見

SecY の変異体解析において、*secY129* (C385Y) と *secY238* (E238K) の結果は、*in vivo* での実験の結果と異なる新規の知見を得た。

まず、*secY238* (E238K) では、膜透過活性の低下が見られた。また、Blue Native PAGE でのバンドのスメアリングも見られた。変異の位置が SecE との相互作用部位に近いために、SecE との相互作用が弱まり SecY のチャンネルとしての構造安定性が低下したと考えられる。

secY129 (C385Y) では、野生型の約 5 倍の高い活性が見られた。今回の変異は 385 残基目の Cys に変異が入ったものであるが、おなじ 385 残基目の Cys が Arg に変異したものが *prl* 変異として知られている⁷⁴。*prl* 変異の多くは SecY のオープン状態を安定化すると考えられており、C385Y の変異体もそれらと同様に SecY のオープン状態が安定化されることによって膜透過反応が上昇したものと考えられる。

secY129 (C385Y) については、SecA の ATP 加水分解速度は野生型の SecY のときと同程度であったことから、より効率的に膜透過反応を行っていることが示唆された。この点についても他の *prl* 変異で同様な現象が過去に報告されている。*Prl* 変異の一種である、*prlA4* は野生型に比べて高い膜透過活性を示すが、ポアリングを形成する Ile の一つが Asn に変異する (SecY I408N) ことで、チャンネルがオープン状態で安定化するものと考えられている。この変異体では、膜透過反応時の SecA の加水分解活性は野生型の SecY のときと比べて低く、より少ないエネルギーで膜透過していることが示唆されている⁷⁵。その

メカニズムとしては、膜透過反応の開始時における基質タンパク質の脱離が少なくなっているとするモデルが提唱されている。膜透過反応時の SecA が ATP を加水分解すると、SecA が SecY から解離しやすくなるが、そのときにうまく開始複合体を形成できなかった基質のタンパク質も同時に脱離する現象がおきる。prlA4 の変異体では、この ATP 加水分解に伴う基質の脱離が野生型の Sec Y に比べて低い（開始反応時の空振りが少ない）ことが報告されており⁷⁵、これにより少ないエネルギーで膜透過反応が行われているものと考えられている。そこで、SecY C385Y についても、基質タンパク質の脱離が少なくなる構造になっていることで、膜透過反応が効率的になっていることが考えられる。

しかしながら、なぜ secY129 (C385Y) の高活性化は *in vivo* の実験では検出されなかったのか。ひとつの仮説として、SecA の翻訳量の制御が考えられる。細胞内においては、SecA の翻訳は上流の SecM によって制御されている⁷⁶。SecM は細胞の膜透過活性を検知するセンサーとしての役割を持ち、膜透過活性が高い場合には SecM の mRNA 配列の一部が SecA の SD 配列と結合して SecA の発現量を抑える。このような SecM による負のフィードバックが働き、細胞内の SecA の発現量が少なく調節されたために、secY129 (C385Y) の高い膜透過活性が *in vivo* の実験では見られなかった可能性がある。

今回の SecY の変異体の結果は、これまで *in vivo* の実験で見つかった変異体についても、*in vitro* で再検証して新たな知見を得ることで、より詳細な分子機構の理解につながることの例を示している。膜タンパク質は一般に精製が煩雑になるために、再構成系での実験に時間を要するが、無細胞翻訳系による膜タンパク質調製の方法は、試料調製の過程を非常にハイスループットにし、研究を加速する有効な手段になるものと期待される。

4.5 脂質組成と SecYEG の膜透過活性

pOmpA の膜透過反応において、脂質の脂肪酸部位の不飽和度を上げた DOPC 40%/DOPE 30%/DOPG 30%の脂質を用いた場合には、合成脂質の組み合わせ条件でも soybean 脂質の条件に相当する膜透過活性が見られた。脂肪酸の不飽和度を上げたことによって、活性に違いが見られた理由としては、PE の相転移が関係していると考えられる。今回の解析で用いた合成脂質のゲル-液晶相転移温度は、Avanti Polar Lipids 社が web サイト上で提供している表 (http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1700&Itemid=419) によると、それぞれ、POPC: -2°C、POPE: 25°C、POPG: -2°C、DOPC: -17°C、DOPE: -16°C、DOPG: -18°C である。そのうち、POPE の相転移温度は 25°C と、際立って高く、タンパク質合成と膜透過反応の反応温度である 30°C に近い値であった。そのため、POPC 40%/POPE 30%/POPG 20%/CL 10%のリポソームを用いた場合に、反応液の条件によっては、POPE の流動性や均一性が十分でなくなる可能性が考えられる。

また、Avanti Polar Lipids 社の商品情報によれば、E. coli polar lipid の 67%が PE であるが、E. coli PE の脂肪酸の主成分はパルミトイル基 (炭素数 16、不飽和度 0:) が 33.6%、オ

レオイル基 (炭素数 18、不飽和度 1:) が 34.1%であり、POPE に近い組成であることが考えられる。そのため、POPC 40%/E. coli polar lipid 60%の脂質を用いた場合も同様に、PE の流動性や均一性が十分でなかったために膜透過活性が低かった可能性が考えられる。

POPC 40%/POPE 30%/POPG 20%/CL 10%や POPC 40%/E. coli polar lipid 60%を用いた場合に、Blue Native PAGE 上の複合体のバンドの強度が比較的弱かったことは、上記のような理由で流動性が低下したことによるものかもしれない。

Soybean 脂質の薄層クロマトグラフィーでの展開によって、soybean 脂質の中に MPLase 様の分子が含まれる可能性が示唆された。MPLase は大腸菌の内膜に存在する糖脂質で、大腸菌の脂質を用いた SecYEG プロテオリポソームの系において、SecYEG の膜透過活性をおよそ 10 倍上昇させる因子である⁶²。Soybean 中の MPLase 様分子は、アニスアルデヒドで染色した場合の色が MPLase と異なることから、分子構造の詳細は MPLase と異なることが予想されるが、特定の脂質が Sec トランスロコンを活性化する機構が種を越えて保存されている可能性が期待された。植物である soybean には、ER と葉緑体にそれぞれ Sec トランスロコンが存在するが、どちらの膜に由来する分子かを同定することも興味深い課題である。

しかしながら、PURE system で SecYEG を合成する条件では、MPLase 様分子による活性化の効果を検出することが難しかった。実際に、soybean 脂質の場合と、合成脂質の DOPC 40%/DOPE 30%/DOPG 30%を用いた場合とでは、先行研究で見られているような MPLase 依存的な膜透過活性の差は見られなかった。先行研究では、SecG が膜上で反転することや SecYEG の 2 量体構造が side-by-side 型なることに MPLase が必要であると報告されている⁶²。しかし、PURE system で合成した条件では、SecG が複合体に組み込まれる効率が低いことや、合成した SecYEG のほとんどが単量体であると考えられることから、MPLase による膜透過活性の促進効果を検出することが難しかったものと考えられる。

4.6 無細胞翻訳系における SecYEG トランスロコンの利用

無細胞タンパク質合成系は、細胞毒性のあるタンパク質でも発現が可能であることや、合成する膜タンパク質を直接脂質膜に再構成できる簡便性などから、膜タンパク質を調製する方法として研究が広がっている。しかし、これまでの手法で用いられている自発的膜挿入では、合成できる膜タンパク質に限りがあった。本研究では、細胞の膜タンパク質合成装置である SecYEG トランスロコンを無細胞翻訳系内に再構成することによって、これまでの無細胞翻訳系では難しかった、親水的なドメインの膜透過反応を伴う膜挿入が可能になることが示された。これにより、無細胞翻訳系の膜タンパク質合成への応用範囲が大きく広がることが期待される。特に、細胞の外部から内部にシグナルを伝達する、受容体型チロシンキナーゼ、細胞外ドメインを持つタイプの GPCR、インテグリンなどのタンパク質は、シグナルカスケードの起点になり創薬ターゲットとしても重要であ

るが、Sec トランスロコンを利用した無細胞翻訳系によって適切なトポロジーで合成できるようにすれば、今後研究が大きく進展することが期待される。

上記のように、SecYEG トランスロコンを用いた無細胞翻訳系を真核生物の膜タンパク質の合成に利用するうえで、原核生物の SecYEG のシステムを、真核生物の膜タンパク質の膜挿入に適用できるかという点は、検討すべき課題である。真核生物の膜タンパク質も、小胞体に存在する Sec61 トランスロコンによって翻訳に共役した形で膜挿入されることは原核生物のシステムと共通している。さらに、Sec61 の基本的な構造は SecYEG の構造と同じであると考えられることから、SecYEG のシステムで真核生物の膜タンパク質の合成を制御することは十分に可能であると考えられる。一方で、Sec61 のシステムと SecYEG のシステムで異なる点も幾つか存在する。例えば、SecYEG のシステムにおいて膜透過反応は細胞質（膜の手前側）に存在する SecA によって駆動されるが、Sec61 のシステムにおいては、小胞体内（膜の反対側）に存在する Hsp70 ファミリーに属する Bip タンパク質によって駆動される。また、哺乳類 ER の膜挿入系を再構成した研究では、Sec61 チャンルに加えて、TRAM (translocating chain-associated membrane protein) がいくつかの膜タンパク質の膜挿入に必要であることが報告されている⁷⁸。そのため、SecYEG トランスロコンを大腸菌以外の膜タンパク質の合成に応用する場合は、それぞれの膜タンパク質に合わせて必要な因子を追加した合成系を確立していく必要があるかもしれない。

4.7 原始細胞における Sec トランスロコン獲得の仮説

バクテリアのゲノム比較などを中心としたミニマルゲノムの研究から、膜タンパク質の合成に必須な Sec トランスロコンや LepB のシステムは、原始の細胞も同じシステムを持っていたと考えられている^{79, 80}。しかし、現代の細胞では、SecYEG や LepB 自体も膜上の Sec トランスロコンにより膜に組み込まれるため、「原始細胞の最初の Sec トランスロコンはどのように獲得されたのか？」という点が膜タンパク質の起源における謎であった。本研究の成果は、膜タンパク質がない脂質膜上で SecYEG や LepB のシステムが獲得されうるという可能性を実験的に明らかにしたものであり、原始の細胞も、なんらかのきっかけで Sec トランスロコンや LepB の遺伝子を獲得した細胞が、脂質膜上でタンパク質の自発的な構造形成を経て最初の膜タンパク質合成系を構築した可能性を示唆している。

SecYEG トランスロコンの3つのサブユニットである、SecY、SecE、SecGのうち、ミニマルゲノムに数えられているのは、SecY だけである。配列比較から推測した先祖型の SecY の配列を無細胞系で合成し、単独でタンパク質膜透過チャンネルとして機能するか解析することは、「あり得た」原始膜タンパク質合成系の起源を探る上で興味深い知見を与えるのではないだろうか。

5 参考文献

1. 岩田想 編. 2013. 膜タンパク質構造研究 化学同人
2. Katzen F, Peterson T, and Kudlicki W. 2009. Membrane protein expression: no cells required. *Trends in biotechnology*. 27(8):455–60.
3. Katzen F, Fletcher J, Yang J-P, Kang D, Peterson T, Cappuccio J, Blanchette C, *et al.* 2008. Insertion of membrane proteins into discoidal membranes using a cell-free protein expression approach. *J. Proteome Res.* 7(8):3535–42.
4. Ishihara G, Goto M, Saeki M, Ito K, Hori T, Kigawa T, Shirouzu M, and Yokoyama S. 2005. Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors. *Protein Expr. Purif.* 41:27–37.
5. Shimono K, Goto M, Kikukawa T, Miyauchi S, Shirouzu M, Kamo N, and Yokoyama S. 2009. Production of functional bacteriorhodopsin by an *Escherichia coli* cell-free protein synthesis system supplemented with steroid detergent and lipid. *Protein Sci.* 18(10):2160–71.
6. Kalmbach R, Chizhov I, Schumacher MC, Friedrich T, Bamberg E, and Engelhard M. 2007. Functional cell-free synthesis of a seven helix membrane protein: *in situ* insertion of bacteriorhodopsin into liposomes. *J. Mol. Biol.* 371(3):639–48.
7. Matthies D, Haberstock S, Joos F, Dötsch V, Vonck J, Bernhard F, and Meier T. 2011. Cell-free expression and assembly of ATP synthase. *J. Mol. Biol.* 413(3):593–603.
8. Kuruma Y, Suzuki T, Ono S, Yoshida M, and Ueda T. 2012. Functional analysis of membranous Fo-a subunit of F1Fo-ATP synthase by *in vitro* protein synthesis. *Biochem. J.* 442(3):631–8.
9. Kuruma Y, Stano P, Ueda T, and Luisi PL. 2009. A synthetic biology approach to the construction of membrane proteins in semi-synthetic minimal cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788(2):567–74.
10. Moritani Y, Nomura SM, Morita I, and Akiyoshi K. 2010. Direct integration of cell-free-synthesized connexin-43 into liposomes and hemichannel formation. *FEBS J.* 277(16):3343–52.
11. Chen Y-JJ, Pornillos O, Lieu S, Ma C, Chen AP, and Chang G. 2007. X-ray structure of EmrE supports dual topology model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(48):18999–9004.
12. Wada T, Shimono K, Kikukawa T, Hato M, Shinya N, *et al.* 2011. Crystal structure of the eukaryotic light-driven proton-pumping rhodopsin, *Acetabularia* rhodopsin II, from marine alga. *J. Mol. Biol.* 411(5):986–98.
13. Arai S, Saijo S, Suzuki K, Mizutani K, Kakinuma Y, Ishizuka-Katsura Y, Ohsawa N, *et al.* 2013. Rotation mechanism of *Enterococcus hirae* V1-ATPase based on asymmetric crystal structures. *Nature* 493(7434):703–7.
14. Noireaux V and Libchaber A. 2004. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(51):17669–74.
15. Fujii S, Matsuura T, Sunami T, Kazuta Y, and Yomo T. 2013. *In vitro* evolution of α -hemolysin using a liposome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110(42):16796–801.

16. du Plessis DJ, Nouwen N, and Driessen AJ. 2011. The sec translocase. *Biochim. Biophys. Acta* 1808(3):851-65.
17. Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, Nishikawa K, and Ueda T. 2001. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.*19(8):751–5.
18. Kuruma Y, Nishiyama K, Shimizu Y, Muller M, and Ueda T. 2005. Development of a minimal cell-free translation system for the synthesis of presecretory and integral membrane proteins. *Biotechnol. Prog.* 21(4): 1243-51.
19. Bechtluft P, Nouwen N, Tans SJ, and Driessen AJ. 2010. SecB--a chaperone dedicated to protein translocation. *Mol Biosyst* 6(4): 620-7.
20. Kusters I and Driessen AJ. 2011. SecA, a remarkable nanomachine. *Cell Mol Life Sci* 68(12):2053-66.
21. Schiebel E, Driessen AJ, Hartl FU, and Wickner W. 1991. Delta mu H⁺ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* 64(5):927–39.
22. Tsukazaki T, Mori H, Echizen Y, Ishitani R, Fukai S, Tanaka T, Perederina A, et al. 2011. Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature* 474(7350):235-8.
23. Auclair SM, Bhanu MK, and Kendall DA. 2012. Signal peptidase I: Cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci* 21(1):13-25.
24. Luirink J and Sinning I. 2004. SRP-mediated protein targeting: Structure and function revisited. *Biochim. Biophys. Acta* 1694(1-3):17-35.
25. Beckert B, Kedrov A, Sohmen D, Kempf G, Wild K, Sinning I, Stahlberg H, Wilson DN, and Beckmann R. 2015. Translational arrest by a prokaryotic signal recognition particle is mediated by RNA interactions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22(10):767-73
26. Fluman N, Navon S, Bibi E, and Pilpel Y. 2014. mRNA-programmed translation pauses in the targeting of *E. coli* membrane proteins. *Elife* 18;3. doi: 10.7554/eLife.03440.
27. Luirink J, von Heijne G, Houben E, and de Gier J-WW. 2005. Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:329–55.
28. Van den Berg B, Clemons WM, Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, and Rapoport TA. 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427(6969):36–44.
29. Zimmer J, Nam Y, and Rapoport TA. 2008. Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature* 455(7215):936-43.
30. Tsukazaki T, Mori H, Fukai S, Ishitani R, Mori T, Dohmae N, Perederina A, et al. 2008. Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures. *Nature* 455(7215):988–91.
31. Tanaka Y, Sugano Y, Takemoto M, Mori T, Furukawa A, et al. 2015. Crystal Structures of SecYEG in Lipidic Cubic Phase Elucidate a Precise Resting and a Peptide-Bound State. *Cell reports.* 13(8):1561-8

32. Homma T, Yoshihisa T, and Ito K. 1997. Subunit interactions in the *Escherichia coli* protein translocase: SecE and SecG associate independently with SecY. *FEBS Lett* 408(1):11-5.
33. Nishiyama K, Hanada M, and Tokuda H. 1994. Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.* 13(14):3272-7.
34. Hanada M, Nishiyama K, and Tokuda H. 1996. SecG plays a critical role in protein translocation in the absence of the proton motive force as well as at low temperature. *FEBS Lett* 381(1-2):25-28.
35. Nishiyama K, Suzuki T, and Tokuda H. 1996. Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell* 85(1):71-81.
36. Park E and Rapoport TA. 2011. Preserving the membrane barrier for small molecules during bacterial protein translocation. *Nature* 473(7346):239-42.
37. Li W, Schulman S, Boyd D, Erlandson K, Beckwith J, and Rapoport TA. 2007. The plug domain of the SecY protein stabilizes the closed state of the translocation channel and maintains a membrane seal. *Mol. Cell* 26(4):511-21.
38. Hizlan D, Robson A, Whitehouse S, Gold VA, Vonck J, Mills D, Kühlbrandt W, and Collinson I. 2012. Structure of the SecY complex unlocked by a preprotein mimic. *Cell Rep* 1(1):21-8.
39. Park E, Ménétret J-FF, Gumbart JC, Ludtke SJ, Li W, Whynot A, Rapoport TA, and Akey CW. 2013. Structure of the SecY channel during initiation of protein translocation. *Nature* 506(7486):102-6.
40. Ge Y, Draycheva A, Bornemann T, Rodnina MV, and Wintermeyer W. 2014. Lateral opening of the bacterial translocon on ribosome binding and signal peptide insertion. *Nat Commun* 5:5263.
41. Martoglio B, Hofmann MW, Brunner J, and Dobberstein B. 1995. The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell* 81(2):207-14.
42. Smith MA, Clemons WM, Jr, DeMars CJ, and Flower AM. 2005. Modeling the effects of prl mutations on the *Escherichia coli* SecY complex. *J Bacteriol* 187(18):6454-6465.
43. Joly JC, Leonard MR, and Wickner WT. 1994. Subunit dynamics in *Escherichia coli* preprotein translocase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(11):4703-7.
44. Taura T, Baba T, Akiyama Y, and Ito K. 1993. Determinants of the quantity of the stable SecY complex in the *Escherichia coli* cell. *J Bacteriol* 175(24):7771-5.
45. Kihara A, Akiyama Y, and Ito K. 1995. FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(10):4532-6.
46. Li G-WW, Burkhardt D, Gross C, and Weissman JS. 2014. Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. *Cell* 157(3):624-35.
47. Osada E, Shimizu Y, Akbar BK, Kanamori T, and Ueda T. 2009. Epitope mapping using ribosome display in a reconstituted cell-free protein synthesis system. *J Biochem* 145(5):693-700.
48. Kedrov A, Kusters I, Krasnikov VV, and Driessen AJ. 2011. A single copy of SecYEG is sufficient for preprotein translocation. *EMBO J.* 30(21):4387-97.

49. Nishiyama K, and Tokuda H. 2010. Preparation of a highly translocation-competent proOmpA/SecB complex. *Protein Sci* 19(12):2402-8.
50. Nishiyama K, Maeda M, Abe M, Kanamori T, Shimamoto K, Kusumoto S, Ueda T, and Tokuda H. 2010. A novel complete reconstitution system for membrane integration of the simplest membrane protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394(3):733–6.
51. Osborne AR and Rapoport TA. 2007. Protein translocation is mediated by oligomers of the SecY complex with one SecY copy forming the channel. *Cell* 129(1):97–110.
52. Bessonneau P, Besson V, Collinson I, and Duong F. 2002. The SecYEG preprotein translocation channel is a conformationally dynamic and dimeric structure. *EMBO J.* 21(5):995–1003.
53. Tam P, Maillard AP, and Chan K. 2005. Investigating the SecY plug movement at the SecYEG translocation channel. *EMBO J.* 24(19):3380–8
54. Park E, and Rapoport TA. 2012. Bacterial protein translocation requires only one copy of the SecY complex *in vivo*. *J Cell Biol* 198(5):881-93.
55. Shimohata N, Nagamori S, Akiyama Y, Kaback HR, and Ito K. 2007. SecY alterations that impair membrane protein folding and generate a membrane stress. *J Cell Biol* 176(3):307-17.
56. Koch HG, Moser M, Schimz KL, and Muller M. 2002. The integration of YidC into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* requires the signal recognition particle, SecA and SecYEG. *J Biol Chem* 277(8):5715-8.
57. Urbanus ML, Fröderberg L, Drew D, Björk P, de Gier J-WLW, Brunner J, Oudega B, and Luirink J. 2002. Targeting, insertion, and localization of *Escherichia coli* YidC. *J. Biol. Chem.* 277(15):12718–23.
58. van Klompenburg W, *et al.* 1997. *In vitro* membrane integration of leader peptidase depends on the sec machinery and anionic phospholipids and can occur post-translationally. *FEBS Lett* 413(1): 109-14.
59. van der Does C, Swaving J, van Klompenburg W, and Driessen AJ. 2000. Non-bilayer lipids stimulate the activity of the reconstituted bacterial protein translocase. *J Biol Chem* 275(4):2472-8.
60. Lill R, Dowhan W & Wickner W. 1990. The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* 60(2):271-80.
61. Nishiyama K, Maeda M, Yanagisawa K, Nagase R, Komura H, Iwashita T, Yamagaki T, Kusumoto S, Tokuda H, and Shimamoto K. 2012. MPLase is a glycolipozyme essential for membrane protein integration. *Nat Commun* 3:1260.
62. Moser M, Nagamori S, Huber M, Tokuda H, and Nishiyama K. 2013. Glycolipozyme MPLase is essential for topology inversion of SecG during preprotein translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110(24):9734–9.
63. Manting EH, van Der Does C, Remigy H, Engel A, and Driessen AJ. 2000. SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J.* 19(5):852–61.
64. Taufik I, Kedrov A, Exterkate M, and Driessen AJ. 2013. Monitoring the activity of single translocons. *J. Mol. Biol.* 425(22):4145–53.

65. Dalal K, Chan CS, Sligar SG, and Duong F. 2012. Two copies of the SecY channel and acidic lipids are necessary to activate the SecA translocation ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(11):4104–9.
66. Driessen AJ. 1993. Precursor protein translocation by the *Escherichia coli* translocase is directed by the protonmotive force. *EMBO J.* 11(3): 847-53.
67. Van der Wolk J and de Wit JG. 1997. The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *The EMBO J.* 16(24): 7297–304.
68. Tabata KV, Sato K, Ide T, Nishizaka T, Nakano A, and Noji H. 2009. Visualization of cargo concentration by COPII minimal machinery in a planar lipid membrane. *EMBO J.* 28(21):3279–89.
69. Ide T, Takeuchi Y, Noji H, and Tabata KV. 2010. Simultaneous optical and electrical single channel recordings on a PEG glass. *Langmuir* 26(11):8540–3.
70. Rondelez Y, Tresset G, Tabata K, Arata H, Fujita H, Takeuchi S, and Noji H. 2005. Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology. *Nat. Biotechnol.* 23(3):361–5.
71. Kim S, Iwai S, Araki S, Sakakihara S, Iino R, and Noji H. 2012. Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules. *Lab Chip* 12(23):4986–91.
72. Obayashi Y, Iino R, and Noji H. 2015. A single-molecule digital enzyme assay using alkaline phosphatase with a coumarin-based fluorogenic substrate. *Analyst* 140(15): rsc.
73. Watanabe R, Soga N, Fujita D, Tabata KV, Yamauchi L, *et al.* 2014. Arrayed lipid bilayer chambers allow single-molecule analysis of membrane transporter activity. *Nat Commun* 5:4519.
74. Olsen MK, Rosey EL, and Tomich CS. 1993. Isolation and analysis of novel mutants of *Escherichia coli* prlA (*secY*). *J Bacteriol* 175(21):7092-6.
75. Van der Wolk JP, Fekkes P, Boorsma A, Huie JL, Silhavy TJ, and Driessen AJ. 1998. PrlA4 prevents the rejection of signal sequence defective preproteins by stabilizing the SecA-SecY interaction during the initiation of translocation. *EMBO J.* 17(13):3631–9.
76. Nakatogawa H and Ito K. 2001. Secretion monitor, SecM, undergoes self-translation arrest in the cytosol. *Mol. Cell.* 7:185–92.
77. Kawashima Y, Miyazaki E, Müller M, Tokuda H, and Nishiyama K. 2008. Diacylglycerol specifically blocks spontaneous integration of membrane proteins and allows detection of a factor-assisted integration. *J. Biol. Chem.* 283(36):24489–96.
78. Görlich D and Rapoport TA. 1993. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75(4):615–30.
79. Mushegian and Koonin. 1996. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:10268-73.
80. Jékely G. 2006. Did the last common ancestor have a biological membrane? *Biol. Direct* 1:35.

6 謝辞

本研究を支えてくださった先生方に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

岩手大学教授の西山先生には貴重な実験材料である、Ffh 発現株、FtsY 発現プラスミド、pOmpF-Lpp プラスミド、精製 MPlase、SecY、SecE、SecG に対する抗体を提供していただきました。また、SecB-pOmpA の精製方法や、脂質の分画、脂質の TLC での展開方法など数々の実験方法をご教授いただきました。それだけでなく、soybean 脂質の分析を快く引き受けていただきました。研究結果や進捗に対する数々の貴重なアドバイスとご指摘もしていただき、必要に応じて参照すべき論文も紹介していただきました。

京都産業大学教授の伊藤先生と、京都大学准教授の森先生には SecY の変異体解析についてご相談させていただき、実験に関する貴重なアドバイスもいただきました。

東京大学教授の野地先生と、おなじく東京大学講師の田端先生には、SecYEG の 1 分子観察の実験で大変お世話になりました。田端先生には平面膜再構成デバイスの作製法や、エバネッセント照明系の作製法について、その基礎から教えていただきました。また、野地先生、田端先生とも幾度となく観察系のデザインなどについてご相談にのっていただきました。

東京大学教授の津本先生には、動的光散乱の測定装置をご提供いただきました。この測定系を通してリポソームのサイズの測定と定量的な議論が可能になりました。

金森博士をはじめ、ジーンフロンティアのみなさんにも心より感謝申し上げます。ジーンフロンティアからご提供いただいた PUREflex®なくしては、この研究は成り立たず、研究の基盤となる研究材料を常に高い品質でご提供いただいたことに感謝いたします。また、金森さんとは折に触れて研究の方向性について議論させていただき、また無細胞翻訳系のテクノロジーについても多くのことを教えていただきました。

副査をしてくださった、泊幸秀先生、深井周也先生、本田真也先生、山本一夫先生にも、この場をお借りして感謝申し上げます。客観的かつ俯瞰的な立場から研究についてのアドバイスをいただき、自分の研究を見つめ直す機会と長期的な視野で研究を考える機会を数多くいただきました。

上田研究室の方々にも、この場を借りて感謝申し上げます。

私が修士 1 年のときの学部 4 年だった加藤くんは、同じ Sec トランスロコンを扱う研究テーマだったこともあり、頻繁に研究の議論をしました。本研究において、Enterokinase による SecYEG の配向評価の方法や、SecY の変異体に関する先行研究は加藤くんから教えてもらったものです。

研究室の先輩にあたる小谷博士には、彼が博士課程の学生のと時から公私ともに非常にお世話になり、実験装置の使い方、トラブルシューティングはほとんど小谷先輩から教えていただきました。また、SecA の ATPase 測定や、Blue Native PAGE のウエスタン

プロットングなどについて、実験条件を大幅に改善する貴重なアドバイスの数々をいただきました。

1年後輩の増淵くんはと、日夜研究についての議論させてもらいました。僕が苦手としている定量的、物理的な視点から、いつもするどい指摘を投げかけてくれました。

テクニシヤンの村上さんには、PURE system の反応に用いる因子の精製や、PURE system の反応系の調製について多大なサポートをしていただきました。また、実験を速く正確に再現性よく行うための数々のテクニックを教えてくださいました。

助教の多田隈先生からは、一分子イメージングの実験について、数多くのご助言をしていただきました。さらに、意識の低かった私に、プロの研究者になるうえで必要になるマインドを鍛えていただきました。

准教授の富田先生からは、Blue Native PAGE の条件を改善するためのアドバイスをはじめ、研究を成熟させるための数々の貴重なご助言をいただきました。また、生化学の実験方法などについて、私の質問がどんなに簡単なものでも、いつも丁寧に答えてくださいました。

車博士には、研究開始当初から実験の指導をしていただきました。リポソームの作製法や SecYEG の精製をはじめとしたほとんどすべての実験手法や、研究に対する向き合い方は車さんから教えていただきました。また、研究を進めるうえでの基礎となる、実験データを客観的に評価し論理的に考察することも車さんにトレーニングしていただきました。

指導教官である上田先生には、直接具体的にご指導いただいたことは多くありませんが、そこには、真の意味で「課題を見つける能力」「解決策を立案する能力」「解決策を実行する能力」「結果を検証する能力」を個々の大学院生に培ってもらいたいという先生の考えがあることを、恥ずかしながら研究をスタートさせて数年が経った後に知りました。そのような研究環境で、日々の実験に限らず本当に様々なことに挑戦させていただき、多くの成長の機会を与えていただきました。また、上田研究室の研究設備においても、研究室の枠を超えた共同研究の機会においても、研究を進めるうえで不自由を感じたことは何一つありません。このようなすばらしい研究環境を整えてくださったことに心より感謝申し上げます。

富満歩美さんにも陰ながら本当に支えてもらいました。彼女は、私の博士課程在学中に名字が松林へと変わりましたが、「足の裏の米粒 (取らないと気持ち悪いが、取っても食えない)」と揶揄される博士号を取ろうとする私と人生を共にするという大きなリスクを選択しただけでなく、博士課程在学中に2度長期入院した自分を、健康面においても精神面においても本当に献身的に支えてくれました。本研究の達成における彼女の貢献は計り知れません。

また、27歳になってもまだ学生をしている私の進路選択を受け入れ、自分が好きな道に進むことを後押しして、常に陰ながら励ましてくれた両親にも感謝します。

また、修士課程在学中は日本学生支援機構から、博士課程在学中は日本学術振興会から、それぞれ融資と投資をしていただきました。いくら両親からの同意が得られ、好きな道に進んだとはいえ、これらの経済的支援なくして研究生活を営むことはできませんでした。

これだけ多くのみなさんに支えてもらい、博士課程の研究を行えたことを忘れることなく、今後も 100 年後の世界に貢献する分子生物学の研究者を目指して精進したいと思います。

