

論文の内容の要旨

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)

分子医科学分野 上田卓也研究室

47-137343 松林英明

1 背景・目的

1.1 無細胞翻訳系での膜タンパク質合成

膜タンパク質は物質輸送やシグナル伝達などの細胞の機能を担い、その多くが創薬ターゲットとしても重要である。しかし、リコンビナントタンパク質としての発現や精製が困難なことから、その重要性にもかかわらず解析が進んでいない。

近年、細胞での発現や精製が難しい膜タンパク質を無細胞翻訳系で調整する方法が盛んに研究されている (Katzen, F. *et al.*, 2009, *Trends in biotechnology*)。これらの多くは、人工脂質膜小胞 (liposome) などを膜成分として用い、合成された膜タンパク質の疎水的なヘリックスが自発的に脂質膜に挿入されることを利用している。しかし、liposome は脂質のみから構成され、細胞がもつ膜タンパク質組み込み装置である Sec トランスロコンを欠く。そのため、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いという制約があった (図 1 B)。

1.2 SecYEG トランスロコン

Sec トランスロコンは、タンパク質の膜透過と膜挿入を担う膜上の分子装置であり、細菌、古細菌、真核生物 (小胞体、葉緑体) に普遍的に存在する。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。

大腸菌の分泌タンパク質の膜透過反応は、膜透過駆動 ATPase である SecA が分泌タンパク質を SecYEG の穴に通すことで進行し、膜透過した分泌タンパク質はシグナルペプチダーゼである LepB によってシグナル配列が切断され、ペリプラズムや外膜へ輸送される。膜タンパク質の膜挿入は、リボソームの翻訳反応と共役して、膜タン

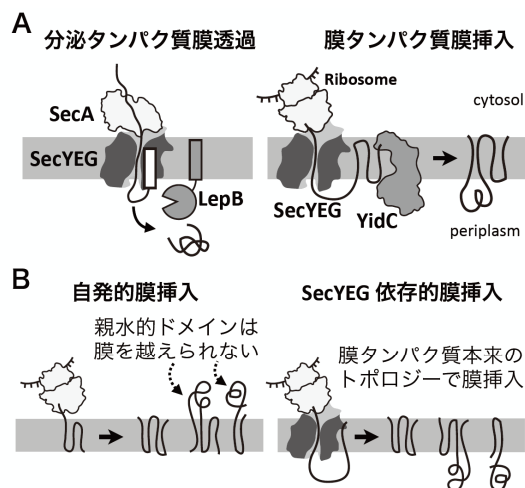


図 1 SecYEG トランスロコンとタンパク質膜挿入機構

(A)大腸菌の SecYEG は分泌タンパク質の膜透過と膜タンパク質の膜挿入反応を担う。(B)自発的膜挿入では、親水的ドメインが膜を越えることができないのに対し、SecYEG 依存的な膜挿入では、正しくトポロジーを制御した膜挿入が可能になる。

パク質の膜貫通ヘリックスが SecYEG を介して脂質膜上へ挿入される。このとき、膜タンパク質のシャペロンである YidC が SecYEG から出てくるヘリックスと相互作用し、合成される膜タンパク質のフォールディングなどに関与するとされている (図 1A)。

1.3 本研究の目的

本研究では、無細胞翻訳系を用いて複数サブユニットからなる膜タンパク質複合体である SecYEG をはじめとした膜タンパク質合成システムの無細胞合成を試みた。無細胞翻訳系として再構築型の PURE system 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 の複合体形成、機能発現に必要な要素を解析した。さらに、無細胞系のスループット性を利用し、SecYEG 変異体の *in vitro* 解析や 1 分子蛍光観察系の構築を試みた。

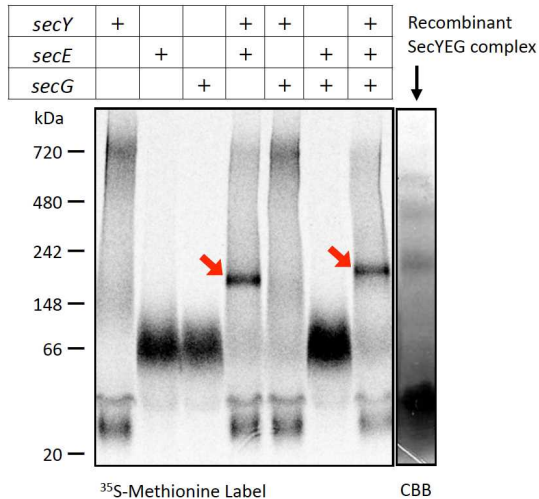


図2 SecYEG 複合体形成の評価

Blue-Native PAGE による複合体形成の評価。
SecYE、SecYEG合成時に、大腸菌から精製した
SecYEG複合体と同様のバンドが検出された。

2 実験結果

2.1 SecYEG の合成

まず、liposome 存在下の PURE system で SecY、
SecE、SecG の発現を行った。Liposome は大豆の
脂質抽出物から作成し、終濃度 4.4 mg/mL (lipid)
で翻訳系に加えた。SecY、E、G の鋳型 DNA は、
PCR によって個別に調整し、濃度比を最適化す
ることによって、タンパク質の発現量を 1:1:1 に
そろえた。30°C、3 時間の合成で、それぞれ約 200
nM のタンパク質が合成された。

また、シヨ糖密度勾配中での超遠心によって
liposome 画分を回収したところ、合成されたタン
パク質の約 7~8 割が膜挿入していることが示
された。さらに、SecY、E あるいは SecY、E、G
を共発現させた場合に、Blue-Native PAGE 上で複
合体のバンドが検出されたことから、合成された
個々のタンパク質が liposome の膜上で複合体を
形成していることが示唆された (図2)。以上か
ら、PURE system で合成された SecYEG は
liposome 膜上で自発的に複合体を形成するこ
とが明らかとなった。

2.2 pOmpA 膜透過

次に、合成された SecYEG 複体の膜透過活性を
確認するため、大腸菌の分泌タンパク質である
pOmpA をモデルとした膜透過実験を行った。図

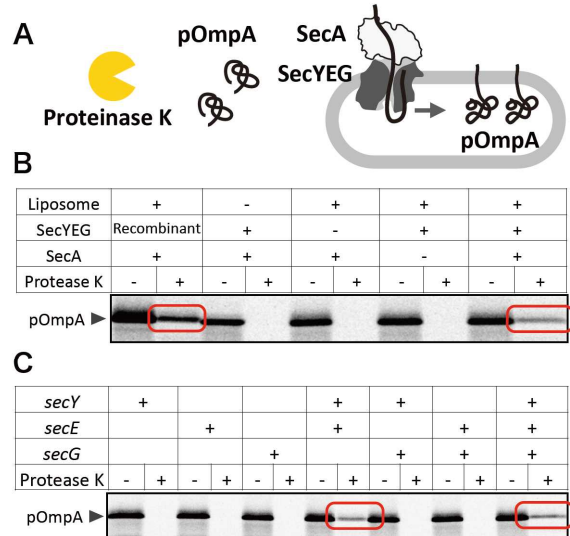


図3 pOmpA 膜透過

pOmpA をモデルとして合成したSecYEG の膜透
過活性を評価した。SecYE、SecYEG 合成時に
Protease K 耐性のバンドが見られ、膜透過活性を
持つことが示された。

3 A に示すように、膜透過後に反応液を Protease
K (PK) 処理することで膜透過しなかったタンパ
ク質を分解し、膜透過したタンパク質のみを PK+
の画分に検出した。SecYE または SecYEG 合成時
において、pOmpA の膜透過が確認された (図 3
B、C)。また、大腸菌から精製した SecYEG と比
較したところ、pOmpA の膜透過量や膜透過反応
時の SecA の ATPase 活性は、実験誤差の範囲で
同等であった。以上から、PURE system で合成し
た SecYEG には分泌タンパク質を膜透過する活
性があることが示された。

2.3 YidC、LepB 膜挿入

続いて、合成した SecYEG によって、膜タンパク
質合成システムの構成要素である YidC と LepB
の膜挿入を行った。実験では、pOmpA の膜透過
と同様に PK の切断パターンによって膜挿入され
たタンパク質の膜上でのトポロジーを解析した。
結果から、YidC は約 10%、LepB は約 2% のタン
パク質が SecYEG によって正しいトポロジーで
膜挿入されることが確認された (図4)。

LepB の膜挿入効率は非常に低かったが、
SecYEG → pOmpA → LepB の順に合成し、LepB
のシグナル配列切断活性を評価したところ、
liposome 内部を示す PK+の画分でシグナルが切

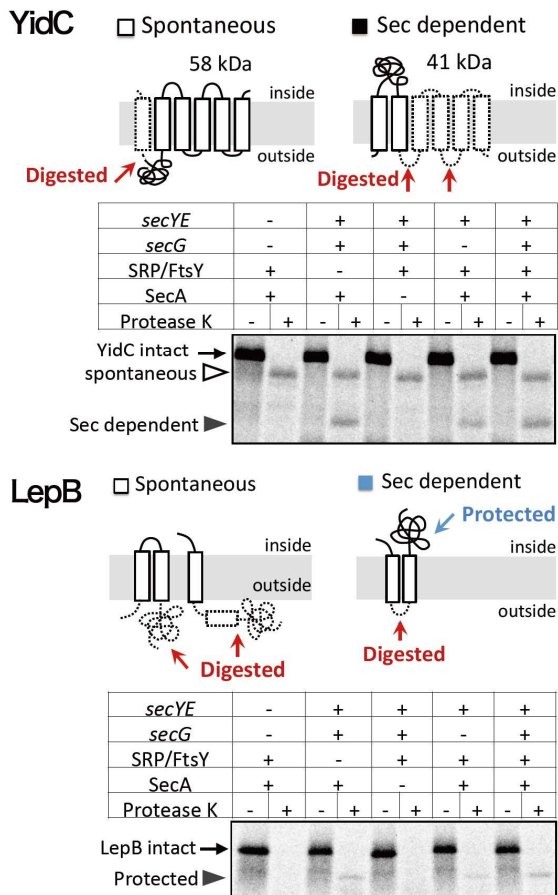


図4 YidC, LepB の膜挿入

YidC, LepB ともに、SecYEGに依存して膜挿入したときの特徴的なPK切断パターンから、膜挿入率を評価した。

断された OmpA のバンドが検出された。このことから、SecYEG を介して正しいトポロジーで膜挿入した LepB は、pOmpA のシグナル配列を切断する活性を保持していることが確認された。

以上の結果から、合成した SecYEG は膜タンパク質の膜挿入過程においても機能することが示された。特に、大きな親水的なドメインをもつ YidC などの膜タンパク質についても、SecYEG を合成することによって、自発的膜挿入では達成できない本来のトポロジーでの膜挿入が可能となることが示され、SecYEG を基盤として liposome 膜上に膜タンパク質合成システムを拡張できることが示唆された。

2.4 SecY 変異体の機能解析

無細胞翻訳系で SecYEG を調製できれば、再構成系における機能解析をハイスループットに行うことができる。そこで、まず、*in vivo* の先行研究

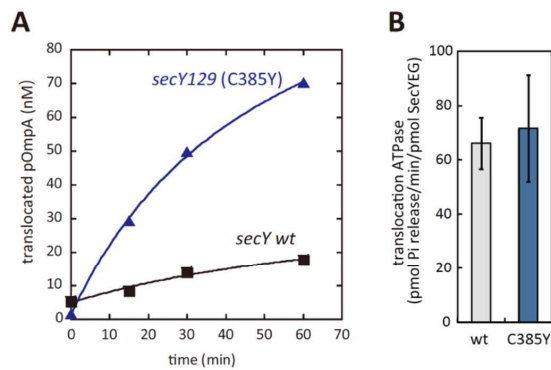


図5 変異体 SecY C385Y の in vitro 解析

SecY C385Y は野生型の5倍のタンパク質膜透過活性を示すが (A)、SecAのATP消費量は野生型と変わらない (B)。

で見つかっている SecY の変異体 (Shimohata, N. *et al.*, 2007, *J. Cell Biol.*) について PURE system で合成し、再構成系における pOmpA の膜透過反応の解析を行った。In vivo 系で膜透過効率に大きな影響がないとされていた E238K, C385Y の変異体について、再構成系の実験では、前者は著しい活性の低下、後者は wt の約5倍の高活性という予想外を得た。さらに、膜透過反応中の SecA の ATP 加水分解速度を測定したところ、C385Y と wt で差がなかったことから、C385Y の変異体では、同じ ATP 消費量でもより多くのタンパク質の輸送を行える可能性が示唆された。

2.5 SecYE の蛍光 1 分子観察

SecY C385Y での ATP 加水分解とペプチド輸送との関係を解明するためには、1分子レベルで反応の速度論を解析できる実験系が必要であると考え、東京大学工学系研究科、野地研究室との共同研究で、蛍光 1 分子観察の手法を構築するための実験を行った。野地研究室で開発されている平面膜観察系では、図 6 A に示す柄杓型の上部チャンバーの底に直径 100~200 μm の穴を開け、そこに構築した脂質二重膜を全反射顕微鏡によって観察することができる。

まず、この平面膜に対して、SecYE を再構成できることを確かめるため、PURE system を用いたアンバーサプレッション法によって蛍光色素 TAMRA を標識した SecY、SecE、または SecYE 複合体の観察を行った。それぞれの分子について、平面膜上でブラウン運動する様子が観察され、蛍光標識と平面膜への再構成が問題なく行えるこ

とが確認された (図 6 B)。

2.6 pOmpA 膜透過反応の蛍光 1 分子観察

さらに、蛍光標識した pOmpA の膜透過反応の観察を目指した。pOmpA は 32 番目の Ala を UAG コドンに変えて、SecYE と同様にアンバーサプレッション法で標識した。生化学の実験から、TAMRA 標識した pOmpA も wt と同様に膜透過されることが確かめられた。しかし、顕微鏡上の平面膜の上に注入したところ、SecYEG や SecA の非存在下においても、pOmpA が非特異的に脂質膜に結合する様子が観察され、観察のためには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。

3 まとめと考察

3.1 SecYEG の合成

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、liposome 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、機能発現は他のタンパク質を必要とせず、自己集行的に行われることが示された。

また、合成された SecYEG は大腸菌で精製した場合と同等の活性を持つことが確認され、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 についても合成することが可能になった。

3.2 SecY の安定性

大腸菌において SecY のみ過剰発現すると、SecE に対して余剰な SecY が膜上のプロテアーゼ FtsH によって速やかに (半減期 2 min) 分解されることが知られている (Kihara, A. *et al.*, 1995, *PNAS*)。しかし、今回の平面膜上での 1 分子観察では SecY 単独の場合も SecYE 複合体と同様に、分散した状態でブラウン運動していることが観察された。また、PURE system で SecY だけ先に合成し、後から SecE を合成した場合も pOmpA 膜透過活性を示した。これらのことから、脂質のみからなる liposome 膜上では、単独の SecY も安定に存在できることが示唆された。

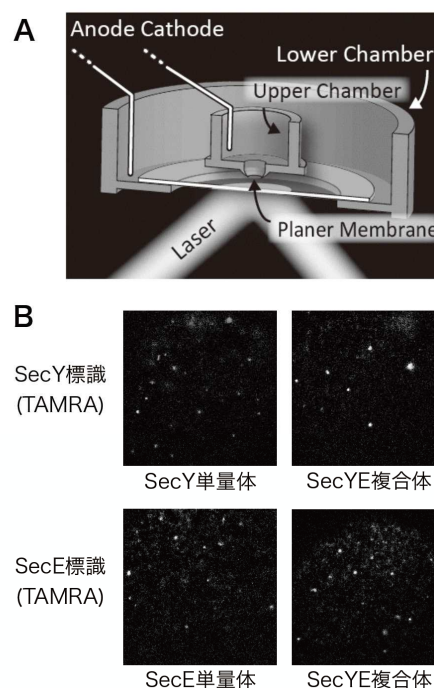


図 6 平面膜再構成系でのSecYEの 1 分子観察

(A) 平面膜再構成デバイス。上部チャンバーの底部に再構成した平面膜を膜全反射顕微鏡で観察。(B) 観察した SecY、SecE、SecYE の画像。どれも分散して膜上をブラウン運動する様子が観察された。

3.3 自発的膜挿入の存在

実験では、合成した SecYEG に依存して YidC や LepB を膜挿入できることが示された。しかし、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。正しいトポロジーでの膜挿入効率の向上には、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 liposome 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 (Kawashima, Y. *et al.*, 2008, *J. Biol. Chem.*)、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の構築されることが期待される。

発表論文

Matsubayashi, H., Kuruma, Y. & Ueda, T. In Vitro Synthesis of the E. coli Sec Translocon from DNA. *Angewandte Chemie International Edition*. (2014) **53**, 7535-7538, July 14, 2014.