

大腸菌 SecA タンパク質の構造と機能

新海 曉 男

①

大腸菌 S e c A タンパク質の構造と機能

Structure and function of SecA protein of *E. coli*

農芸化学専攻
昭和63年度 博士課程入学
氏名 新海暁男
指導教官名 水島昭二

<目次>

序章	1
第一章 タンパク質の膜透過に関与する諸因子との相互作用による、 SecA の構造及び機能の変化	
第一節 プロテアーゼに対する感受性の変化を指標とした、 SecA の構造変化の解析	
1-1-§1 序	7
1-1-§2 材料・方法	9
1-1-§3 結果	17
第二節 物理化学的な手法を用いた、SecA の構造変化の解析	
1-2-§1 序	26
1-2-§2 材料・方法	27
1-2-§3 結果	28
第三節 フローダイアリス法による、SecA の機能解析	
1-3-§1 序	31
1-3-§2 材料・方法	32
1-3-§3 結果	34
第四節 考察	40
第二章 グアニジン塩酸水溶液中で変性した SecA の、 構造及び機能の再生	
2-§1 序	45
2-§2 材料・方法	47
2-§3 結果	55
2-§4 考察	61
図表	63
参考文献	84
論文目録	88
謝辞	89

<略語>

本論文では以下の略語を用いた。

ADP,	adenosine 5'-diphosphate
AMP,	adenosine 5'-monophosphate
ATP,	adenosine 5'-triphosphate
ATPase,	adenosine 5'-triphosphatase
ATP- γ S,	adenosine 5'-(γ -thio)triphosphate
BSA,	bovine serum albumin
CD,	circular dichroism
CL,	cardiolipin
CTP,	cytidine 5'-triphosphate
DNA,	deoxyribonucleic acid
DNase,	deoxyribonuclease
DTT,	dithiothreitol
EDAC,	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDTA,	ethylenediaminetetraacetic acid
FAD,	flavin adenine nucleotide
GTP,	guanosine 5'-triphosphate
IPTG,	isopropyl-1-thio- β -D-thiogalactoside
Lpp,	lipoprotein
NADP,	nicotinate adenine dinucleotide phosphate
NTCB,	2-nitro-5-thiocyanate benzoic acid
OD,	optical density
PC,	phosphatidylcholine
PE,	phosphatidylethanolamine
PG,	phosphatidylglycerol
PMSF,	phenylmethanesulfonylfuloride
RNA,	ribonucleic acid
RNase,	ribonuclease
SDS,	sodium dodecyl sulfate
tRNA,	transfer RNA
UTP,	uridine 5'-triphosphate
V8,	protease V8 of <i>Staphylococcus aureus</i>

序章

細胞は生命の基本単位である。細胞の内外には種々様々な物質が存在し、それぞれ生命活動にかかわっている。タンパク質は、それらの物質の中の主役として機能しており、細胞内外の様々な場所に存在している。分子生物学のセントラルドグマで説明されているように、タンパク質は、DNA の遺伝情報に基づいて合成される。しかしながら、ここで合成されるのは、ポリペプチド鎖にすぎず、このままでは、機能を遂行することはできない。ポリペプチド鎖は、決められた場所で、しかも決められた立体構造をとって、はじめて機能を遂行し得る。

細胞は、生体膜によって外界と区別されている。さらに、真核細胞では、細胞内に存在する小器官は、ほとんどすべて、生体膜によって仕切られている。一方、タンパク質（ポリペプチド鎖）のほとんどのものは、細胞質で合成される。したがって、細胞外あるいは細胞内の小器官で機能するタンパク質のほとんどのものは、合成された後、決められた場所へと移行しなければならない。そして、移行の過程で、生体膜の透過というステップが必要不可欠となる。

このように、タンパク質の膜透過は、合成されたタンパク質が、機能を発現するまでの、一つの重要なステップなのである。つまり、タンパク質の膜透過は、分子生物学のセントラルドグマの延長線上にあり、細胞生物学上、重要な現象の一つである。

一方、生体膜は一般に、リン脂質二重層とタンパク質とから構成されており、親水

性低分子や高分子物質の透過障壁となっている。では、このような生体膜を、タンパク質のような巨大分子が如何にして透過するのであろうか。

タンパク質の膜透過の研究は、まず、真核細胞における分泌型タンパク質を対象に行なわれた。真核細胞において、分泌型タンパク質は、まず小胞体膜を透過して、小胞体内腔に放出される。その後、ゴルジ体・分泌顆粒などを経て細胞質膜まで運ばれ、エキソサイトーシスによって、細胞の外へ分泌される。この初期過程である、分泌型タンパク質の小胞体膜透過機構を説明するモデルとして、1975年 Blobel と Dobberstein によりシグナル仮説が提唱され(1)、タンパク質の膜透過の研究の基盤が築かれた。この仮説によると、分泌型タンパク質は、N末端に、シグナルペプチドをもち、このペプチドに導かれて小胞体膜を透過する。シグナルペプチドは、膜透過の過程で切断され、膜透過したタンパク質は、成熟型となる。この仮説が提唱されて以来、原核細胞における分泌型タンパク質を対象としたタンパク質の膜透過の研究も急速に進展した。原核細胞において、分泌型タンパク質は、直接細胞質膜を透過して分泌される。この、原核細胞における分泌型タンパク質の細胞質膜透過機構と、真核細胞における分泌型タンパク質の小胞体膜透過機構とは、多くの共通性があることが示唆されている。例えば、分泌型タンパク質であるラットのインシュリンの遺伝子を大腸菌内で発現させるとシグナルペプチドは正しく認識・切断され、タンパク質は、細胞質膜の外へと分泌される(2)。さらに、大腸菌 β -ラクタマーゼは、イヌのミクロソームの小胞体膜を透過することができる(3)。

タンパク質の膜透過・分泌の機構を研究するには、原核細胞、特に大腸菌を対象と

した研究が有利であると思われる。大腸菌は、遺伝学的にも、生化学的にも、取り扱いが容易であるからである。

大腸菌の表層には、細胞質膜及び外膜の二層の生体膜があり、それらの間には、ペプチドグリカン層とペリプラズム空間が存在する。外膜やペリプラズム空間には、それぞれ特異的なタンパク質が多数存在している。これらのタンパク質は、細胞質で合成されるので、局在化の過程で、細胞質膜を透過する。ここでは、細胞質膜を透過して、細胞の外側へ移行することを、膜透過あるいは分泌と呼ぶ。したがって、ペリプラズムや、外膜に存在するタンパク質を、膜透過型タンパク質あるいは分泌型タンパク質と呼ぶことにする。

大腸菌におけるタンパク質の膜透過の研究は、*in vivo* の実験系を中心として、主として二つの側面から進められてきた。一つは、分泌型タンパク質の構造の研究、もう一つは、分泌型タンパク質の膜透過に関与するタンパク質因子の研究である。

まず、分泌型タンパク質の構造について述べる。分泌型タンパク質は、外膜を透過する一部のタンパク質を除いて、N末端に20-30アミノ酸残基から成るシグナルペプチドをもった前駆体として合成される。シグナルペプチドは、細胞質膜内に存在するシグナルペプチダーゼ(4,5)によって切断され、分泌型タンパク質は成熟体となる。シグナルペプチドには、いわゆる共通配列はないが、以下の特徴がある。①、N末端近くに塩基性アミノ酸残基が存在する。②、中央部領域に疎水性アミノ酸残基のクラスターが存在する。③、C末端は、側鎖の小さいアミノ酸残基からなっており、シグナルペプチダーゼの切断部位となっている。Inouye と Halegoua は、分泌型タンパ

ク質の膜透過におけるシグナルペプチドの役割りとして「ループモデル」を提唱した(6)。このモデルは、シグナルペプチドの構造上の共通点を考えあわせ、シグナルペプチドの膜への貫入様式をモデル化したという点で、現在広く受け入れられている。このモデルによると、分泌型タンパク質前駆体は、シグナルペプチドのN末端側を細胞質側に向け、つづく疎水性アミノ酸残基のクラスターに導かれて膜内に入って行く。そして、シグナルペプチダーゼによってシグナルペプチドが切断され、分泌型タンパク質の成熟体部分は分泌される。

分泌型タンパク質の膜透過には、シグナルペプチドは必須である。シグナルペプチドの特徴を失わせるような変異を起こした分泌型タンパク質は、膜透過が阻害される(7)。しかし、このような変異が、成熟体部分の変異によって相補される例がある(8)。さらに、シグナルペプチドを付加しても、分泌できないタンパク質もある(9)。すなわち、分泌型タンパク質が、細胞質膜を透過するには、シグナルペプチドをもつことと同時に、成熟体部分を含めた構造も重要であると考えられている。

次に、膜透過に関与するタンパク質因子について述べる。膜透過に関与するタンパク質因子は、変異株の取得により同定された。このような変異株は、比較的高い培養温度あるいは、比較的低い培養温度で分泌型タンパク質前駆体が細胞内に蓄積する結果致死になる、いわゆる、高温感受性変異株あるいは、低温感受性変異株として単離することができる。このような方法を用いて、分泌型タンパク質の膜透過に関する変異株が複数単離され、遺伝子も同定された。それらの遺伝子のうち、重要視されているものは、*secA*(10), *secB*(10), *secY*(11), *secE*(12), *secD/secF*(13,14)遺伝

子である。

secA 遺伝子に由来する SecA タンパク質(SecA)(分子量 およそ102kDa)は、可溶性タンパク質であるが、細胞質膜と相互作用する(15)。SecB タンパク質(SecB)(分子量 およそ12kDa)も可溶性タンパク質(16)である。SecY タンパク質(SecY)(分子量 およそ49kDa)、SecE タンパク質(SecE)(分子量 およそ14kDa)、SecDタンパク質(SecD)(分子量 およそ68kDa)、SecF タンパク質(SecF)(分子量 およそ36kDa)は、細胞質膜タンパク質である。SecY は、アミノ酸配列のハイドロパシーの解析の結果により、細胞質膜を10回貫通していることが推定されている(17)。同様の解析により、SecE は、細胞質膜を3回貫通していることが推定されている(18)。SecD 及び SecF は、細胞質膜と相互作用しているものの、大部分の領域がペリプラズム空間に露出していることが推定されている(14)。

以上に示したものの他にも、*in vivo* の実験系からは、タンパク質の膜透過に関する情報が、多数得られている。しかし、分泌型タンパク質の膜透過の分子機構を解明するためには、*in vivo* の実験系に加えて、*in vitro* の実験系を用いた解析が必要である。

筆者が所属する研究室では、詳細な生化学的解析に耐え得る *in vitro* の膜透過実験系を確立した(19,20)。そして、まず、分泌型タンパク質の膜透過には、ATP と、プロトン駆動力(膜電位と pH 勾配)が必要であることを明らかにした(19)。筆者が所属する研究室では、さらに、SecA、SecY、SecE、を大量に得ることに成功しており(21,22)、これらのタンパク質の機能解析も可能となってきた。SecA に関して

は、筆者の研究と並行して、次に示す研究成果が得られている。①、SecA は、分泌型タンパク質の膜透過に直接関与する(21)。②、分泌型タンパク質の膜透過に必要なプロトン駆動力と SecA の機能とは、密接に関係している(23)。③、SecA は、分泌型タンパク質と直接相互作用する(24)。④、SecA は、分泌型タンパク質の膜透過に必要なATP と相互作用する(25)。さらに、米国の Wickner の研究グループでは、SecA が、ATPase 活性をもつこと(26)、SecA と SecB とが相互作用すること(27)を見出した。これらのことから、SecA は、大腸菌におけるタンパク質の膜透過において中心的な役割りを果たしていると考えられる。したがって、SecA の性質をより詳細に解析することは、大腸菌におけるタンパク質の膜透過機構の解明に結びつくと考えられる。

本研究は、SecA の性質を、主として構造変化に焦点を当てて解析したものである。第一章では、タンパク質の膜透過に関与する諸因子(ATP、分泌型タンパク質前駆体、細胞質膜、リン脂質)との相互作用による、SecA の構造及び機能の変化について述べる。第二章では、グアニジン塩酸水溶液中で変性した SecA の、構造及び機能の再生について述べる。

第一章 タンパク質の膜透過に関与する 諸因子との相互作用による、SecAの 構造及び機能の変化

第一節 プロテアーゼに対する感受性の変化を指標とした、SecAの構造変化の解析

1-1-§1 序

生体内で、タンパク質は、基質やリガンドなどの諸因子と相互作用して機能している。諸因子と相互作用したときに構造変化することが、プロテアーゼに対する感受性を指標にして明らかにされているタンパク質もある。例えば、ウサギの Ca^{2+} -ATPase (28) や、大腸菌の RepA(29)がそうである。 Ca^{2+} -ATPase は、筋小胞体に存在し、カルシウム、マグネシウム、カリウムの共存下で活性化されて、ATP を加水分解し、そのエネルギーを利用して、カルシウムの能動輸送を行なう。 *S. aureus* V8 プロテアーゼに対する感受性を指標にして解析した結果、 Ca^{2+} -ATPase は、カルシウムの存在下で、構造変化することが明らかとなった(30)。 RepA は、大腸菌に感染した一本鎖 DNA フェージの複製に関与しており、一本鎖 DNA の存在下で、ATPase活性及び二本

鎖DNA を巻き戻す活性を示す。RepA はATP と相互作用したときに、構造変化すること、さらに、RepA は、一本鎖 DNA と相互作用したときにも構造変化し、その変化は、ATP と相互作用したときの変化とは異なることが、トリプシンに対する感受性の変化を指標にして明らかにされた(31)。

序章でも述べたように、SecA は、タンパク質の膜透過に直接関与し、ATP、分泌型タンパク質前駆体、細胞質膜と相互作用する(32)。筆者は、これらの諸因子と相互作用したときに、SecA が構造変化することを、SecA の、*S. aureus* V8 プロテアーゼに対する感受性を指標にして明らかにすることができた。本節では、その結果について述べる。

1-1-§2 材料・方法

試薬

S. aureus V8 プロテアーゼ(V8)は、ICN より購入した。ATP, ADP, AMP, GTP, CTP, UTP, ATP-γS は、Boehringer Mannheim より購入した。カルジオリピン (CL) (大腸菌由来)、ホスファチジルグリセロール(PG) (卵黄由来)、ホスファチジルコリン (PC) (大豆由来) は Sigma より購入した。ホスファチジリエタノールアミン (PE) (大腸菌由来) は Avanti より購入した。

SecA の精製

秋田らの方法(24)で以下のように行なった。SecA は、SecA 過剰生産株(RR1/pMAN400)(21)から精製した。pMAN400 は、*secA* 遺伝子を運ぶ多コピー型プラスミドである。このプラスミド上では、*secA* 遺伝子は、いわゆる共通配列をもつ SD 配列、高発現プロモーターである *tac* プロモーター (*trp* プロモーターと *lac* プロモーターの融合プロモーター)(33)及び *lac* オペレーターの支配下にあるので、このプラスミドを保持する菌株 (RR1/pMAN400 株) は、IPTG によって、SecA を大量に合成することができる。

RR1/pMAN400 株を、6 l の LB培地で培養した。OD₆₆₀=0.8 で、2mM になるように IPTG を添加し、SecA を誘導合成させた。IPTG を添加して2.5 時間後に集菌し、菌体を 40ml の 50mM トリス-酢酸 (pH7.5) / 10% ショ糖 で洗浄した。菌体を再び 40ml の

50mM トリス-酢酸(pH7.5)/10% ショ糖に懸濁した後、フレンチプレッシャーセル(#4-3398A)(Amicon)を用い、10,000psi で破碎した。8,000xg、10分間の遠心で破碎されなかった菌体を除去した後、150,000xg、2.5時間遠心し、上清画分(S-150 画分)を硫酸塩析により分画した。SecA に富んだ画分(40%上清-50%沈澱画分)を6mlの 50mM リン酸カリウム(pH7.5)に懸濁した後、同緩衝液で透析した。この標品を、同緩衝液で平衡化したハイドロキシルアパタイトカラムにかけ、50mM リン酸カリウム(pH7.5)で洗浄した後、同緩衝液 50mM-250mM の直線グラジエントにより溶出させた。SecA に富んだ画分を集め、セントリコン10(Amicon)により濃縮し、50mM リン酸カリウム(pH7.5)で透析した。精製標品は、-80℃に保存した。

N95-SecA の精製

SecA のC末端側の70アミノ酸が欠失した、SecA の変異体である N95-SecAは、N95-SecA 過剰生産株(RR1/pMAN789)(25)から精製した。精製は、上述の、SecAの精製方法と同様に行なった。

proOmpA の精製

Crooke らの方法(34)に基づき、以下のようにして、proOmpA 過剰生産株(JM103 Lp p⁻/pTacOmpA)から精製した。JM103 Lpp⁻/pTacOmpA株を、1.5 l の LB培地で 37℃で培養した。OD₆₆₀=0.9で、2mM になるように IPTGを添加し proOmpA を誘導合成させた。IPTG を添加して 2.5時間後(OD₆₆₀=1.8)に集菌した。菌体を 20mlの 50mM トリ

スー塩酸(pH8.0)/10% ショ糖 に懸濁し、-80℃で凍結させた。30℃で融解後、1mg/mlになるようにリゾチームを添加し、25℃で5分間保温した。塩化マグネシウム、DNaseIをそれぞれ5mM、4μg/mlになるように添加し、さらに5分間保温した。リン酸ナトリウムによってpH=6.0に調製した50mMクエン酸溶液に、N-ラウロイルザルコシン酸ナトリウムを1.5%(W/V)になるように溶かした溶液を70ml添加してホモゲナイズし、25℃で30分間保温した。27,000xg,30分間遠心し、沈澱を20mlの50mM トリスー塩酸(pH8.0)/10% ショ糖に懸濁した後、上記のN-ラウロイルザルコシン酸ナトリウム溶液を70ml添加し、25℃で30分間保温した。27,000xg,30分間遠心し、沈澱を2.5mlの50mM トリスー塩酸(pH8.0)/2mM DTT/8M 尿素に溶かした。27,000xg,10分間遠心し、上清をproOmpA 標品として用いた。標品は-80℃で保存した。

OmpA の精製

MH1160 *recA*株(*recA*, *ompR101*)(35)を、1 l の LB培地で、37℃で培養し、 $OD_{660}=1.0$ で集菌した。菌体を、60mlの50mM トリスー酢酸(pH7.5)/10% ショ糖で洗浄した後、同溶液60mlに懸濁し、フレンチプレッシャーセル(#4-3398A)(Amicon)を用いて、10,000psiで破碎した。8,000xg,10分間の遠心で破碎されなかった菌体を除去した後、50,000xg,2時間遠心し、沈澱(膜)画分を10mlの10mM リン酸ナトリウム(pH7.2)に懸濁した。10mlの1.5%(W/V) N-ラウロイルザルコシン酸ナトリウム/10mM リン酸ナトリウム(pH7.2)を添加し、25℃で30分間保温した後、50,000xg,2時間遠心した。沈澱(外膜)画分を5mlの60mM トリスー塩酸(pH6.8)/2% SDS/10% グリセリン/5%

2-メルカプトエタノール/0.01%プロモフェノールブルー に溶かした。 SDS-ポリアクリルアミド(10% アクリルアミド、0.27% N-N'-メチレンビスアクリルアミド)ゲル電気泳動を行い、クマシーブリリアントブルー(R250)により染色した。 0mpA に相当するバンドをゲルから切り出し、電気泳動により 0mpA を回収した。1mM リン酸ナトリウム(pH7.2)/1% SDS 溶液で透析した後、90% になるようにアセトンを添加し、10,000xg, 15分間遠心した。沈澱を 1mlの 50mM トリシュー塩酸(pH8.0)/2mM DTT/8M 尿素に溶かし、0mpA 標品として用いた。標品は-80℃で保存した。

反転膜小胞の調製

山田らの方法(36)で以下のように行なった。K003株(F^- , Δlpp , $\Delta uncB-C$ -Tn10)を次に示す培地 1 l 中で 37℃で $OD_{660}=0.17$ まで培養し、集菌した。

・培地 (1 l 当たり) :

リン酸二水素カリウム 14.45g, リン酸水素二カリウム 2.8g,

グルコース 5g, 酵母エキス 5g, トリプトン 5g,

以下の操作はすべて 4℃で行なった。菌体を蒸留水で洗浄した後、35.5mlの蒸留水に懸濁した。20mlの 2M トリシュー酢酸(pH7.8), 18mlの 2M ショ糖, 3.4mlの 1% EDTA(pH 7.0), 3.4mlの 5mg/mlリゾチームを順にゆっくりと添加し、スフェロプラスト化した。30分間放置した後、50 μ g/mlになるように DNaseI を添加し、フレンチプレッシャーセル(#4-3398A)(Amicon)を用い、4,000psi で菌体を破碎した。テフロン製ホモゲナイザーでホモゲナイズし、破碎されなかった菌体を8,000xg, 10分間の遠心で除去した後、

150,000xg, 2時間の遠心により膜画分(沈澱画分)を回収した。膜画分は、6ml の50mM トリス-酢酸(pH7.8)/250mM ショ糖/1mM EDTA(pH7.0)/1mM DTTに懸濁し、30-40%(W/W) ショ糖密度勾配遠心(60,000xg 15時間)にかけることにより、細胞質膜画分と外膜画分とに分画した。細胞質膜画分を回収し、50mM リン酸カリウム(pH7.5) /250mM ショ糖/10% グリセリン/1mM DTT で 約10倍に希釈し、50,000xg, 2時間遠心した。沈澱画分を 500 μ l の 50mM リン酸カリウム(pH7.5)/250mM ショ糖/10%グリセリン /1mM DTT に懸濁し、細胞質膜画分として使用した。標品は -80℃で保存した。

反転膜小胞の 4M尿素処理

タンパク質濃度が 2mg/ml の反転膜小胞 1ml に対し、1mlの 8M尿素/50mM リン酸カリウム(pH7.5)/250mM ショ糖/10% グリセリン を添加し(終濃度 4M 尿素)、氷中に 1時間放置した。150,000xg, 30分間遠心して反転膜小胞を回収し、100 μ l の50mM リン酸カリウム(pH7.5)/250mM ショ糖/1mM DTT に懸濁した。

大腸菌の全リン脂質の調製

Viitanen らの方法(37)で以下のように行なった。MC4100株を 60 l の LB 培地で、37℃で培養した。OD₆₀₀=1.8 で集菌した。菌体を 3 l の溶媒(ヘキサン:イソプロパノール=3:2(V/V))に懸濁し、室温で 1.5時間攪拌して脂質を抽出した。10,000xg, 5分間遠心し、上清を 37℃で 蒸発乾固させた。試料中の水分を除去するために、試料を20mlのベンゼンに溶かし、再び蒸発乾固させた。試料を、10ml の溶媒(クロロホ

ルム：メタノール=9:1(V/V)) に溶かした後、400mlの アセトン/2mM 2-メルカプトエタノール中に移した。窒素ガスを容器に充滿させ、室温で、一晚攪拌して中性脂質を溶かした。5,000xg, 15分間遠心し沈澱を乾燥させた後、400mlのジエチルエーテル/2mM 2-メルカプトエタノールに溶かした。5,000xg, 10分間遠心し、上清を蒸発乾固させた。試料をデシケーター中で乾燥させた後、乾燥重量を測定し、100mg/ml になるように 2mM 2-メルカプトエタノールを加え、超音波洗浄器(Branson)中で超音波処理を行なうことにより溶かした。

リボソームの調製

大腸菌の全リン脂質、及び購入した、CL、PG、PCの場合は、10mgのリン脂質に対し1mlの 2mM 2-メルカプトエタノールを加え、超音波洗浄器中で超音波処理を行なうことにより調製した。PEの場合は、Stollery と Vailの方法(38)で行なった。すなわち、10mgのリン脂質に対し1ml の 10mM ホウ酸ナトリウム/1mM EDTA(pH9.2) を添加し、超音波洗浄器(Branson)中で超音波処理を行ない、10mM トリス-塩酸(pH7.5)/2mM 2-メルカプトエタノールで 3時間透析した後、78,000xg, 1時間遠心し、上清をリボソームとして用いた。

V8 による SecA の分解

10 μ g の SecA、50mM リン酸カリウム(pH7.5)、0.4M 尿素、及びタンパク質の膜透過に関与する諸因子(ATP、proOmpA、反転膜小胞あるいは、リン脂質リボソーム)を含

む 25 μ lの溶液を、37 $^{\circ}$ Cで 20分間保温した後、V8 を添加して SecAを分解した。V8 を添加してから 0分後、5分後、15分後、30分後に 5 μ l づつサンプリングし、氷上で、5 μ lの 10mM PMSF/125mM トリシュー塩酸(pH6.8)/4% SDS/20% グリセリン/10% 2-メルカプトエタノール/0.02% プロモフェノールブルーを添加して反応を止めた。試料を 5分間煮沸した後、SDS-ポリアクリルアミド(10% アクリルアミド、0.27% N-N'-メチレンビスアクリルアミド)ゲル電気泳動を行なった。クマシーブリリアントブルー(R250)によってゲルを染色し、バンドを検出した。尚、図1 に実験方法を模式的に示した。

NTCB による SecA 及び 95kDaフラグメントの切断

Jacobsonらの方法(39)に基づいて、以下のように行なった。10 μ g の SecA 及び95 kDaフラグメントを 10 μ lの 6Mグアニジン塩酸/200mM トリシュー塩酸(pH8.0)/10mMDT T に溶かし、37 $^{\circ}$ Cで 2時間保温した。1 μ lの 100mM NTCB を添加し、25 $^{\circ}$ Cで 20分間保温した。150 μ lの水と 1mlのアセトンを添加して遠心し、沈澱を 10 μ lの 6M グアニジン塩酸/100mM ホウ酸(pH9.0) に溶かし、37 $^{\circ}$ Cで 12時間保温した。150 μ lの水と1mlのアセトンを添加して遠心し、沈澱を 50 μ l の 62mM トリシュー塩酸(pH6.8)/ 2% SDS /10% グリセリン/5% 2-メルカプトエタノール/0.01% プロモフェノールブルー に溶かした後、SDS-ポリアクリルアミド(10% アクリルアミド、0.27% N-N'-メチレンビスアクリルアミド)ゲル電気泳動を行なった。クマシーブリリアントブルー(R250)によってゲルを染色し、バンドを検出した。

タンパク質の定量

Lowryらの方法(40)で行なった。標準曲線は、BSAにより作成した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmliの方法(41)で行なった。

反転膜小胞からのリン脂質の抽出

タンパク質 800 μ g の反転膜小胞に、5mlの溶媒(エタノール:エーテル=3:1(V/V))を添加し、80℃で10分間保温し、リン脂質を抽出した。8,000xg,10分間遠心し、上清を蒸発乾固させた。

リン脂質の定量

リン脂質の定量は、リン脂質を加水分解した後、Bartlettの方法(42)により無機リンを定量することによって行なった。すなわち、リン脂質溶液から溶媒を除去した後、0.5mlの70%過塩素酸に溶解し、240℃で15分間保温することにより加水分解反応を行なった。試料を200 μ lサンプリングし、2.1mlの水、100 μ lのアミドール試薬(2% 2,4-ジアミノフェノール/40% 亜硫酸水素ナトリウム)、100 μ lの5% モリブデン酸アンモニウムを添加し、沸騰水浴中で7分間保温した後、820nmの吸光度を測定し、無機リンを定量した。リン酸二水素カリウムにより標準曲線を作成した。

1-1-33 結果

1) SecA の精製

精製の各ステップの標品を図2 に示した。最終精製標品の純度は、約 85% であった。この標品を以下の実験に用いた。

2) SecA の構造変化に及ぼすヌクレオチドの影響

SecA は、N末端側で ATP と相互作用し(25)、分泌型タンパク質の膜透過に共役した ATPase 活性をもつ(26)。そこで、まず、SecA の V8 に対する感受性に及ぼす ATP の影響を調べた(図3)。

ここでは、4 μ M の SecA に対して、2mM の ATP の存在下で実験を行なった。V8 による分解反応を ATP の存在下で行なうと、分子量およそ 95kDa のフラグメント(以下 95kDaフラグメントと呼ぶ)の蓄積が認められた(図3A)。これを定量化して表した結果、SecA は、ほぼ定量的に95kDaフラグメントに変化していることがわかった(図3B)。すなわち、SecA の 95kDaフラグメント領域は、V8 に対する感受性が顕著に低下することが明らかとなった。BSA の V8 に対する感受性は、ATP によって影響されなかった(データ省略)。つまり、ATP が V8 の活性を阻害している可能性はない。したがって、SecA の V8 に対する感受性の変化は、SecA が ATP と相互作用し、SecA の構造が変化したことに起因することが強く示唆された。尚、この実験系には、0.4M の尿素が含まれている。精製した pro0mpA は凝集体を形成し易いので、膜透過

が可能な構造を保つためには、proOmpA を 8M の尿素に溶解しなくてはならない。したがって、精製した proOmpA を用いる実験では、実験系に尿素が混入してくる。後出しの、proOmpA を用いた実験系には、0.4M の尿素が含まれている(図8)。proOmpA を用いた実験と条件を合わせるために、ここでも、0.4M の尿素の存在下で実験を行なった。0.4M の尿素は *in vitro* におけるタンパク質の膜透過反応に影響を及ぼさない(43)。さらに、尿素の非存在下で、SecA の V8 に対する感受性を調べた結果、尿素の存在下の場合に比べて、SecA の V8 に対する感受性は、やや低下したが、ATP の影響は、尿素の存在下の場合と同様に認められた。特に、V8 の濃度を上げたときに顕著に認められた(図3C)。これらのことから、0.4M の尿素がこの実験の本質に影響を及ぼすことはないと判断した。

次に、他のアデニンヌクレオチドの存在下での、SecA の V8 に対する感受性を調べた。ATP 及び ADP には、SecA と分泌型タンパク質前駆体との相互作用を促進する効果が認められるが、AMP にはその効果が認められない(44)。そこで、ADP あるいは AMP の存在下における SecA の V8 に対する感受性の変化を同様の方法で解析した(図4)。ヌクレオチドの濃度が 2mM の場合(図4A)と 5 μ M の場合(図4B)のどちらにおいても、ADP の存在下では、ATP の存在下の場合と同様、95kDaフラグメント領域の、V8 に対する感受性が顕著に低下したが、AMP の存在下では、SecA の V8 に対する感受性の変化は認められなかった。つまり、ADP にも ATP と同様に SecA の構造を変化させる効果が認められたが、AMP にはそれが認められなかった。以上の結果、これらのアデニンヌクレオチドの、SecA と分泌型タンパク質前駆体との相互作用

用に及ぼす影響と、SecA の構造変化に及ぼす影響とが一致していることが明らかとなった。

前述したが、SecA は ATPase 活性をもつ(26)。薄層クロマトグラフィー上で定量した結果、2mM の ATP の存在下での実験では、およそ 50% の ATP が ADP に分解されていた(データ省略)。上述したように、ADP も SecA の構造を変化させる。したがって、ATP と相互作用したときの、SecA の構造変化には、ATP の加水分解が必要か否かは明らかではない。そこで、ATP のアナログである ATP- γ S の効果を調べたところ、ATP あるいは ADP と同様の効果が認められた(図4)。このことから、SecA は、ATP と相互作用すること、SecA の構造変化には、ATP の加水分解は必要ないことが明らかとなった。

前述したが、ATP はタンパク質の膜透過に必須のエネルギー源である(19, 45, 46)。CTP 及び UTP は ATP に代わるエネルギー源になり得るが、GTP はエネルギー源になり得ない(46)。そこで、これらのヌクレオチドの存在下における、SecA の V8 に対する感受性の変化を調べた。95kDaフラグメントの蓄積をその変化の指標とした(図5)。尚、この実験では、ヌクレオチドの濃度は 0.3mM である。その結果、SecA の V8に対する感受性に及ぼす影響が大きいもの、すなわち、構造変化に及ぼす影響が大きいものから順に、ATP>CTP>UTP>GTP であり、GTP はほとんど効果を示さなかった。タンパク質の膜透過反応に対して、これらのヌクレオチドが示す活性は、高い方から順に ATP>CTP>UTP>GTPであり、この場合も、GTP はほとんど不活性であった(46)。このことから、ヌクレオチドの存在下における SecA の構造変化は、タンパク質の膜透

過反応と関連しており、生理学的に意味のあることであることが示唆された。

3) 95kDa フラグメントの解析

ATP の存在下で、SecA の 95kDa フラグメント領域の、V8 に対する感受性が低下した (図3)。この領域を決定するために、まず、N95-SecA の、V8 に対する感受性を調べた。N95-SecA は、SecA の C 末端側の 70 アミノ酸が欠失した、SecA の変異体である (図6A)。さらに、N95-SecA は、分泌型タンパク質の膜透過に対して、SecA と同様の活性をもっている (25)。したがって、ATP との相互作用において、N95-SecA は、SecA と同様であると考えられる。ATP の存在下で、N95-SecA の、V8 に対する感受性は著しく低下した。ところが、この場合には、SecA の場合に認められた 95kDa フラグメントに相当するフラグメントは検出されなかった (図6B)。このことは、ATP の存在下で、V8 に対する感受性が著しく低下した 95kDa フラグメント領域は、SecA の N 末端側であることを示唆している。

95kDa の領域が、SecA の N 末端側であることをさらに確かめるために、SecA 及び 95kDa フラグメントを、NTCB で切断した (図7)。NTCB は、システイン残基の N 末端側のペプチド結合を切断する。SecA (901 アミノ酸残基) は、4 つのシステイン残基をもっている (98, 885, 887 及び 896 残基) (47) (図7A)。

SecA を NTCB で切断した結果、分子量がおよそ 10,000 減少した位置に、新たにバンドが検出された (図7B)。このバンドは、分子量から判断して、SecA の 98 番目のシステイン残基よりも N 末端側が欠失したフラグメントである。885 番目、887 番

目、及び 896 番目のシステイン残基で、SecA が切断されているか否かは、明確ではない。仮に、これらのシステイン残基で切断されているとしても、分子量の変化が小さい(1,000-2,000)ので、このゲル電気泳動の条件では、バンドの移動度の差に違いが認められないからである。

95kDa フラグメントを NTCB で切断した場合も、SecA を NTCB で切断した場合と同様に、分子量が およそ 10,000 減少した位置に、新たにバンドが検出された(図 7B)。このバンドも分子量から判断して、98番目のシステイン残基よりも N 末端側が欠失したフラグメントである。したがって、この実験からも、ATP の存在下で V8 に対する感受性が著しく低下する、95kDaフラグメント領域は、SecA の N 末端側であることが強く示唆された。

4) SecA の構造変化に及ぼす、分泌型タンパク質前駆体の影響

SecA は、分泌型タンパク質前駆体と直接相互作用する(24)。そこで次に、SecA の V8 に対する感受性に及ぼす、分泌型タンパク質前駆体の影響を調べた(図 8)。

分泌型タンパク質前駆体としては、proOmpA を用いた。4 μ M の SecA に対して、20 μ M の proOmpA の存在下で実験を行なった。proOmpA は、SecA の V8 に対する感受性に対して、ATP と逆の効果を示した。すなわち、proOmpA の存在下では、SecA の V8 に対する感受性は高まり、95kDaフラグメントの蓄積は認められなかった(図 8A)。このことから、SecA は、proOmpA と相互作用したときにも構造変化すること、そして、その変化は、ATP と相互作用したときの変化とは異なることが強く示唆された。

一方、成熟体 OmpAには、そのような効果は認められなかった(図8A)。このことから、この構造変化には、シグナルペプチドが必須であることが強く示唆された。

次に、proOmpA の、SecA の V8 に対する感受性に及ぼす影響を ATP の共存下で調べた(図8B)。

ATP と proOmpA を同時に加えたときも、proOmpA だけを加えたときと同様に、SecA の V8 に対する感受性は高まった。すなわち、V8 に対する感受性に及ぼす ATP の影響は認められなかった。ATP を加えた後に、proOmpA を加えたときも、結果は同様であった。尚、これらの実験(図8)では、前述の実験(図3-6)に比べて V8 の濃度が低いので、proOmpA 及び ATP の非存在下(None)における SecA の分解速度は、前述の実験に比べて遅くなっている。

ADP 及び ATP- γ S も、proOmpA との共存下では、SecA の V8 に対する感受性に影響を及ぼさなかった(データ省略)。これらのことは、proOmpA と SecA とが相互作用することにより、SecA に結合していたヌクレオチドが SecA から遊離するという可能性を示唆している。この可能性について検討した結果は、第三節で述べる。

5) SecA の構造変化に及ぼす、反転膜小胞及びリン脂質の影響

SecA は膜表在性タンパク質であり、大腸菌の細胞質膜より成る反転膜小胞と相互作用する。さらに、4M の尿素で処理を施すことによって SecA を除去した反転膜小胞を用いれば、SecA との相互作用は促進される(48)。そこで、4M の尿素で処理を施した反転膜小胞の、SecA の V8 に対する感受性に及ぼす影響を調べた(図9)。尚、

この実験では、前述の実験に比べて V8 の濃度が低いので、反転膜小胞の非存在下 (None)において、95kDaフラグメントの蓄積が顕著に認められる。

250 μ g (タンパク質の量) の反転膜小胞の存在下では、SecA の V8 に対する感受性が著しく高まり、95kDa フラグメントの蓄積は認められなかった。すなわち、反転膜小胞と相互作用したときにも、SecA の構造が変化することが強く示唆された。

SecA の V8 に対する感受性の変化を、proOmpA と相互作用した場合と、反転膜小胞と相互作用した場合とで比較すると、95kDa フラグメントの蓄積が認められないという点では一致しているが、proOmpA と相互作用した場合の方が、V8 に対してより感受性になっている (図8,9)。このことは、反転膜小胞と相互作用したときの SecA の構造変化は、proOmpA と相互作用したときの変化とは異なることを示唆している。

SecA の機能と、膜を介したプロトン駆動力とは、密接に関係していることが、強く示唆されている(23)。そこで、次に、SecA の V8 に対する感受性に及ぼす、膜を介したプロトン駆動力の影響を調べた。5mM の NADH によって、4M の尿素で処理を施した膜にプロトン駆動力をかけた(23)。ところが、SecA の V8 に対する感受性に及ぼすプロトン駆動力の影響は認められなかった(データ省略)。

次に、反転膜小胞(細胞質膜)の主要構成成分の一つであるリン脂質の影響を調べた(図10A)。

大腸菌から調製した全リン脂質より成るリボソームの存在下でも、SecA の V8 に対する感受性は著しく高まった。尚、加えたリン脂質の量(125 μ g)は、前述した反転膜小胞 250 μ g (タンパク質の量)に含まれるリン脂質の量とほぼ同じ量である。こ

のことから、SecA はリン脂質と相互作用したときにも、構造変化することが強く示唆された。

SecA の V8 に対する感受性の変化を、リン脂質と相互作用したときと、反転膜小胞と相互作用したときとの間で比較すると、リン脂質と相互作用したときの方が V8 に対してより感受性になっている (図9,10A)。このことは、リン脂質と相互作用したときの SecA の構造変化は、反転膜小胞と相互作用したときの変化とは異なることを示唆している。さらに、proOmpA と相互作用したときの方が、リン脂質と相互作用したときよりも、SecA の V8 に対する感受性は高まっている (図8,10A)。このことは、リン脂質と相互作用したときの SecA の構造変化は、proOmpA と相互作用したときの変化とも異なることを示唆している。

次に、大腸菌の主要リン脂質三種類 (ホスファチジルグリセロール (PG)、カルジオリピン (CL)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)) の存在下における、SecA の V8 に対する感受性の変化を調べた (図10A)。この実験で用いたリン脂質は、CL と PE は大腸菌由来であるが、PG は卵黄由来である。そこで、三種類のリン脂質を、大腸菌の細胞質膜中の含量比率 (49) とほぼ同じ比率 (PE:PG:CL=8:1:1 重量比) で混合してリボソームを作成し (混合リボソーム)、SecA の V8 に対する感受性に及ぼす影響を調べたところ、大腸菌の全リン脂質と同様の効果が認められた。さらに、SecA の V8 に対する感受性に及ぼす影響を、個々のリン脂質について調べた。この実験で用いたリン脂質の量は、それぞれ、上記の混合リボソーム中に含まれる量に等しい。PG あるいは CL は、SecA の V8 に対する感受性を高めたが、PE はそのような効果

を示さなかった。

PE 単独では、リボソームを形成するのは難しい(38,50)ので、PE に SecA の V8 に対する感受性に及ぼす影響が認められなかったのは、リボソームの形成が不完全であったためである可能性がある。PE は、ホスファチジルコリン(PC)の共存下では、リボソームを形成する(50,51)。そこで、PC との混合リボソームを用い同様に解析した(図10B)。

PC 単独では、SecA の V8 に対する感受性に影響を及ぼさなかったが、PCと PG あるいは PC と CL より成る混合リボソームは、SecA の V8 に対する感受性を高めた。ところが、PC と PE より成る混合リボソームは、SecA の V8 に対する感受性に影響を及ぼさなかった。尚、ここで用いた混合リボソームは、PC:PG=PC:CL=PC:PE=8:1 (重量比)である。大腸菌の細胞質膜では、PE の含量は、PG 及び CL の 7-8 倍である。そこで、PE の含量を 8倍に増した混合リボソーム(PC:PE=8:8)を用い同様に解析したが、このリボソームも SecA の V8 に対する感受性に影響を及ぼさなかった。すなわち、PG 及び CL には、SecA の V8 に対する感受性を高める効果があるが、PE には、その効果がないことが明らかとなった。

以上の結果、酸性リン脂質である PG 及び CL と相互作用したときに、SecA の構造が変化することが強く示唆された。

第二節 物理化学的手法を用いた、SecA の構造変化の解析

1-2-§1 序

これまでの研究で、筆者は、タンパク質の膜透過に関与する諸因子と相互作用したときに、SecA の構造が変化することを、V8 に対する感受性の変化を指標にして明らかにしてきた。これらの構造変化のうち、測定が可能なものについては、CDスペクトル及び蛍光スペクトルの変化を解析したので、次に述べておく。

1-2-§2 材料・方法

CDスペクトルの測定

CDスペクトルは、分光施光計 J-20A(Jasco) を用いて測定した。SecA の濃度は、100 μ g/ml で測定した。その他の測定条件を以下に示す。speed control, 1cm/min ; cell length, 2mm ; λ expand, 5nm/cm ; temperature, 37 $^{\circ}$ C

蛍光スペクトルの測定

蛍光スペクトルは、分光蛍光光度計 RF-5000(Shimadzu) を用いて測定した。SecA の濃度は、15 μ g/ml で測定した。その他の測定条件を以下に示す。excitation wavelength, 290nm(5nm bandpass) ; emission wavelength, 300nm-420nm(5nm bandpass) ; scan speed, 50nm/min ; sensitivity, high ; temperature, 37 $^{\circ}$ C

その他の材料及び方法は、第一節、1-1-§2 材料・方法に同じ。

1-2-33 結果

まず、CDスペクトルを測定することにより、二次構造の変化を解析した(図11)。SecAのCDスペクトル曲線は、202nm付近から250nm付近にかけて負の吸収帯を示し、222nm付近で極小を示す、 α -ヘリックスの含量の多いタンパク質に特有の曲線(52)を示した。そこで、222nmにおけるモル分子楕円率から、GreenfieldとFasmanの方法(52)に基づいて α -ヘリックスの含量を計算した。計算式を以下に示す。

$$\alpha\text{-ヘリックスの含量 (\%)} = \{[\theta]_{222} - (3,900) / -35,700 - (3,900)\} \times 100$$

① ただし、 $-35,700(\text{deg cm}^2/\text{dmol})$ は、ポリ-L-リジンによって作られた α -ヘリックスの、222nmにおける平均残基当たりのモル分子楕円率で、 $3,900(\text{deg cm}^2/\text{dmol})$ は、同じくポリ-L-リジンによって作られた、ランダムコイルの、222nmにおける平均残基当たりのモル分子楕円率である。 $[\theta]_{222}$ は、222nmにおけるSecAの平均残基当たりのモル分子楕円率である。SecAのモル分子楕円率($[\theta]_{222}$)は、およそ $-7.5 \times 10^6(\text{deg cm}^2/\text{dmol})$ であった(図11A)。この値を、SecAの残基数901で割った値が、SecAの平均残基当たりのモル分子楕円率である。すなわち、 $[\theta]_{222}$ は $-8,300(\text{deg cm}^2/\text{dmol})$ である。この値を①式に代入し、 α -ヘリックスの含量を計算した結果、およそ30%であった。

ATPの存在下でも、ATPの非存在下と同様の曲線を示した(図11B)。大腸菌の全リン脂質より成るリポソームの存在下でも、同様の曲線を示した(図11C)。すなわち、これらの因子と相互作用したときのSecAの構造変化は、CDスペクトルに影響

を及ぼすような変化ではないことが示された。高、分泌型タンパク質前駆体 (proOmpA) の存在下及び細胞質膜 (反転膜小胞) の存在下では、測定していない。CDスペクトルの補正が不可能だからである。

SecA は7つのトリプトファン残基をもっている (349, 519, 541, 622, 701, 及び 755 残基)(47)。そこで、次に、トリプトファン残基の蛍光スペクトルを測定することにより、三次構造の変化を解析した (図12)。

SecA の蛍光スペクトルの極大波長は、340nm 付近であった。この試料に ATP を 2 mM になるように添加した後、スペクトルを測定すると、極大波長の移動は認められなかったが、蛍光強度の低下が認められた。ATP の存在下で、蛍光強度が低下するのは、励起波長である、290nm の光を ATP が吸収するためである。そこで、Helene らの方法(53)によって、蛍光強度を補正した。補正式を以下に示す。

$$\text{蛍光強度の補正值} = \{A(1-10^{-A_0}) / A_0(1-10^{-A})\} \times \text{蛍光強度} \quad \text{--- ②}$$

ただし、 A_0 は ATP 非存在下における 290nm の吸光度、 A は ATP 存在下における、290nm の吸光度である。 $A_0=0.005$, $A=0.117$ であり、ATP の存在下では、340nm における蛍光強度の相対値は、およそ 80 であったので、これらの値を②式に代入して、蛍光強度の補正值を求めたところ、およそ 90 であった。ATP の非存在下における、蛍光強度の相対値は、およそ 95 であった。すなわち、ATP の存在下では、およそ 5% の消光が認められた。対照として、BSA について同様の解析を行なった。BSA は ATP と相互作用しない。ところが、この場合にも、ATP の存在下では、SecA の場合と同程度の消光が認められた (データ省略)。この原因はわからないが、このことか

ら、SecA と ATP を相互作用させたときに認められた蛍光強度の低下は、SecA の構造変化とは無関係である可能性が高いと考えられる。すなわち、ATP と相互作用したときの SecA の構造変化は、トリプトファン残基の蛍光スペクトルに影響を及ぼすような変化ではないことが示された。SecA と proOmpA、SecA と反転膜小胞、あるいは、SecA とリポソームとを相互作用させたときの蛍光スペクトルは測定していない。これらの場合には、蛍光スペクトルの補正が不可能であるからである。

第三節 フローダイアリス法による、SecA の機能解析

1-3-§1 序

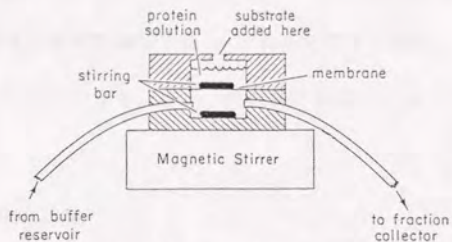
第一節で述べたように、ヌクレオチド (ATP, ADP, ATP- γ S) と相互作用したときに SecA の V8 に対する感受性は著しく低下し、分泌型タンパク質前駆体 (proOmpA) と相互作用したときには、SecA の V8 に対する感受性は著しく高まった。さらに、SecA とヌクレオチドとを相互作用させた後に、proOmpA を相互作用させたときには、SecA の V8 に対する感受性に及ぼすヌクレオチドの効果は認められなかった。このことから、proOmpA と SecA とが相互作用することにより、SecA に結合したヌクレオチドが遊離するという可能性が示唆された。本節では、この可能性を、フローダイアリス法を用いて検討した結果を述べる。さらに、proOmpA の、SecA の ATPase 活性に及ぼす影響も解析したので述べる。

試薬

[^3H]ADP(26.4Ci/mmol) 及び [^{35}S]ATP- γS (65Ci/mmol) は、Dupont から購入した。

フローダイアリス法

1) 原理



フローダイアリスの装置(54)

フローダイアリスの装置を上図に示した。テフロン製の器材(図中 ////)に上・下二つの槽を設ける。二つの槽の間には、透析膜を張っておく(図中 membrane)。上槽に、タンパク質、リガンドなどを添加する。上槽と同じ組成の緩衝液を、下槽を通して一定の速さで流し、一定量づつ分画する(図中 from buffer reservoir to fraction collector)。上・下各槽の中は、攪拌子により攪拌する。上槽に添加したりガンドのうち、タンパク質に結合していないものは、下槽へ透析される。リガンドは、放射性同位体を用いるので、放射能を測定することによって、下槽へ透析されたりガンドの量を測定することができる。この方法により、上槽における、タンパク質とリガンドとの結合・遊離を調べることが可能である。

2) 実験方法

上槽と下槽は、Seamless Cellulose Tubing (分画分子量 12,000-14,000) (Viskase)を広げた透析膜によって仕切った。上槽には、400 μ l の 50mM リン酸カリウム(pH 7.5)/ 5mM MgSO₄ を添加し、[³H]ADP あるいは [³⁵S]ATP- γ S、SecA、proOmpA あるいは OmpA、及び非放射性的の ADP あるいは 非放射性的の ATP- γ S を順次添加した。37 $^{\circ}$ C に保温した緩衝液を、下槽を通して毎分 500 μ l の流速で流し、650 μ l づつ分画した。分画後、200 μ l づつサンプリングし、放射能を測定した。

SecA の ATPase 活性の測定

50mM リン酸カリウム(pH7.5)/1mM DTT/2mM 硫酸マグネシウム/10 μ g/ml(10 units) ビルビン酸キナーゼ/46 μ g/ml(15 units) 乳酸デヒドロゲナーゼ/30mM ホスホエノールビルビン酸/0.25mM NADH/0.2mM ATP より成る反応液 2ml に、5mg/ml の SecA を 7 μ l(35 μ g の SecA)を添加し、340nm の吸光度の減少を経時的に調べた。SecAを添加してから、およそ 2分後に、30mg/ml の proOmpA を 20 μ l(600 μ g の proOmpA)あるいは、26mg/ml の OmpA を 20 μ l(520 μ g) 添加し、測定を続けた。吸光度は、分光光度計 S-3000(Shimadzu)を用いて測定した。測定条件を以下に示す。

λ scale, 1nm/cm ; scan speed, 5nm/cm ; response, fast ; temperature, 37 $^{\circ}$ C

その他の材料及び方法は、第一節、1-1-§2 材料・方法に同じ。

1-3-§3 結果

まず、ヌクレオチドとして、ADP を用いた場合について述べる (図13)。

フローダイアリスの装置の上槽に、 $[^3\text{H}]\text{ADP}$ を添加すると、下槽に検出される放射能の量は、およそ、5フラクシオンまで (およそ6分間) は、直線的に増加し、その後は、一定の割合で徐々に減少した。このことは、上槽に添加した $[^3\text{H}]\text{ADP}$ が、下槽へ透析され、およそ6分後に平衡に達したことを示している。上槽に SecA を添加すると、下槽に検出される放射能の量は、著しく減少した (図13 ●, ○)。このことは、上槽で、 $[^3\text{H}]\text{ADP}$ が SecA に結合したために、下槽に透析されてくる $[^3\text{H}]\text{ADP}$ の量が減少したことを示している。放射能の減少量から計算すると、SecA 1mol 当たり、およそ 0.18mol の $[^3\text{H}]\text{ADP}$ が結合したことになる。次に、上槽に、proOmpA を添加すると、下槽に検出される放射能の量は増加し、対照実験 (SecA 無添加(▽)) とほぼ同じ量に達した (図13 ●)。このことは、proOmpA と SecA とが相互作用したことにより、SecA に結合していた $[^3\text{H}]\text{ADP}$ が、SecA から遊離して下槽に透析されてきたことを示している。一方、成熟体 OmpA を添加した場合は、下槽に検出される放射能の量は増加しなかった (図13 ○)。すなわち、この場合は、SecA に結合していた $[^3\text{H}]\text{ADP}$ の SecA からの遊離は認められなかった。このことから、proOmpA が SecA に結合していた $[^3\text{H}]\text{ADP}$ を遊離させるためには、シグナルペプチドが必須であることが示された。上槽に、成熟体 OmpA を添加した後に、 $[^3\text{H}]\text{ADP}$ に対して過剰量の非放射性 ADP を添加することにより、下槽に検出される放射能の量の増加が

認められた (図13 ○)。これは、SecA に結合していた [^3H]ADP と、非放射性 ADP との交換反応が起こったために、下槽に透析されてきた [^3H]ADP の量が増加したことを示している。

次に、ヌクレオチドとして、[^{35}S]ATP- γS を用いた場合について述べる (図14, 15)。上槽に [^{35}S]ATP- γS を添加すると、[^3H]ADP を添加した場合と同様に、下槽に検出される放射能の量は、およそ 6分間は直線的に増加し、その後は一定の割合で徐々に減少した。このことも、上槽に添加した [^{35}S]ATP- γS が、下槽へ透析され、およそ 6分間で平衡に達したことを示している。次に、SecA を添加することによって、下槽に検出される放射能の量は著しく減少した。これは、[^{35}S]ATP- γS が SecA に結合したために、下槽に透析されてくる [^{35}S]ATP- γS の量が減少したことを示している。放射能の減少量から計算すると、SecA 1mol 当たり、およそ 0.05 mol の [^{35}S]ATP- γS が結合したことになる。この値は、[^3H]ADP の場合のおよそ 3分の1 の量である。第一節で示したように、SecA の V8 に対する感受性の変化は、ADP と相互作用した場合と、ATP- γS と相互作用した場合との間で、相違はほとんど認められなかった (図4) ので、ADP と ATP- γS は、SecA に対して同様に結合していると考えられた。その実験条件と比較すると、ここでは、ヌクレオチドの濃度が低い (0.25 μM)。したがって、[^{35}S]ATP- γS は、[^3H]ADP に比べて、SecA に対する解離定数 (Kd) 値が大きいと考えられる。SecA の次に、proOmpA を添加すると、下槽に検出される放射能の量は、全体量として、およそ 3.4×10^5 dpm 増加した (図14A)。一方、SecA を添加しない場合では、proOmpA を添加することによって、下槽に検出される放射能の量

は、およそ 0.7×10^5 dpm 増加した (図14B)。すなわち、両者の差 (およそ 2.7×10^5 dpm) は、SecA に結合していた [35 S]ATP- γ S が、SecA から遊離して、下槽に透析された放射能の量であると考えられる。さらに、[35 S]ATP- γ S に対して過剰量の非放射性 ATP- γ S を添加したときは、SecA の添加、無添加によらず下槽に検出される放射能の量の増加は、ほとんど認められなかった (図14A, B)。したがって、proOmpA と SecA とが相互作用することにより、SecA に結合していた [35 S]ATP- γ S の、ほとんど全てのものが、SecAから遊離することが示された。

次に、成熟体 OmpA の影響を調べた (図15)。SecA の次に、成熟体 OmpA を添加した場合、下槽に検出された放射能の量は、全体量として、およそ 2.2×10^5 dpm 増加した (図15A)。一方、SecA を添加しない場合では、成熟体 OmpA の添加により、下槽に検出された放射能の量は、およそ 0.7×10^5 dpm 増加した (図15B)。すなわち、両者の差 (およそ 1.5×10^5 dpm) は、SecA に結合していた [35 S]ATP- γ S が、SecA から遊離して、下槽に透析された放射能の量であると考えられる。第一節でも述べたが、proOmpA 及び成熟体 OmpA は、8M尿素溶液に溶解している。成熟体 OmpA の代わりに、同量の 8M尿素溶液 (終濃度 0.4M) を添加した場合も、結果は同様であった (データ省略)。成熟体 OmpA の次に、[35 S]ATP- γ S に対して過剰量の、非放射性ATP- γ S を添加した場合、下槽に検出された放射能の量は、およそ 1.5×10^5 dpm 増加した (図15A)。SecA を添加しない場合では、過剰量の非放射性 [35 S]ATP- γ S の添加による放射能の量の増加は、ほとんど認められなかった (図15B) ので、これは、SecA に結合していた [35 S]ATP- γ S と、非放射性 ATP- γ S との交換反応が起こったために、

下槽に透析された $[^{35}\text{S}]\text{ATP-}\gamma\text{S}$ の量が増加したことを示している。成熟体 OmpA の代わりに、同量の 8M 尿素溶液を添加した場合も結果は同様であった（データ省略）。すなわち、SecA に結合した $[^{35}\text{S}]\text{ATP-}\gamma\text{S}$ は、尿素（終濃度 0.4M）によって一部遊離するが、成熟体 OmpA によって遊離することはないことが示された。

以上の結果、SecA と proOmpA とが相互作用することによって、SecA に結合していた $[^{35}\text{S}]\text{ATP-}\gamma\text{S}$ が SecA から遊離すること、そして、その遊離には、シグナルペプチドが、必須であることが示された。尚、 $[^{35}\text{S}]\text{ATP-}\gamma\text{S}$ を用いた実験で、SecA を添加しない場合にも proOmpA あるいは成熟体 OmpA あるいは、同量の尿素を添加することによって、下槽に検出される放射能の量が増加した（図15A, B）が、理由はわからない。

ヌクレオチドとして ATP を用いた場合は実験していない。この実験条件では、ほとんど全ての ATP が加水分解されていた(55)からである。

2) 分泌型タンパク質前駆体の、SecA の ATPase 活性に及ぼす影響

分泌型タンパク質前駆体(proOmpA)と SecA とが相互作用すると、SecA に結合していたヌクレオチドが遊離することが、フローダイアリシス法により、明らかとなった。一方、SecA は、タンパク質の膜透過と共役した ATPase 活性をもつ(26)。Wickner の研究グループでは、ATP が分解されることによって生ずる無機リンを、経時的に定量することによって、SecA の ATPase 活性を測定した。それによると、proOmpA の存在下、非存在下によらず、SecA の ATPase 活性は変化していない(26)。そこで、筆者

は、その実験系よりも感度が高いと思われる実験系により、proOmpA の、SecA の ATPase 活性に及ぼす影響を調べた (図16)。

ATPase 活性の測定は、乳酸醗酵の一部の反応である、ホスホエノールピルビン酸から乳酸までの反応を利用して測定した。つまり、ホスホエノールピルビン酸の脱リン酸反応には、ADP が必要とされ、ピルビン酸の還元反応には、NADH の分解を伴うので、ホスホエノールピルビン酸、ピルビン酸キナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、NADH、及び ATP、SecA とを反応させ、NADH による 340nm における吸光度の減少を、分光光度計を用いて連続的に測定することにより、SecA の ATPase 活性を測定した。尚、SecA による ATP の加水分解が律速段階となるように条件を設定した。

ATP を含む反応液に、SecA を添加することにより、340nm における吸光度が減少した。これは、SecA によって ATP が加水分解されたことを示している。NADH のモル吸光係数 $\epsilon = 6,220(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ を用い、SecA の ATPase 活性の比活性を計算したところ、およそ、 $0.18(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg of SecA})$ であった。反応系に proOmpA を添加した直後は、340nm における吸光度の減少の促進が認められた (図16A)。proOmpA が、ピルビン酸キナーゼあるいは、乳酸デヒドロゲナーゼの活性を促進している可能性はない (データ省略)。すなわち、これは、proOmpA と SecA とが相互作用することによって、SecA の ATPase 活性が促進されたことを示している。このときの、SecA の比活性を計算したところ、およそ、 $0.25(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg of SecA})$ であった。すなわち、proOmpA と相互作用することによって SecA の ATPase 活性は、およそ1.4 倍促進された。proOmpA を添加してから時間が経過するにつれて、吸光度の減少が、徐

々に抑制された。この反応条件では、尿素の濃度が低い(0.08M)ので、proOmpA が、徐々に不活性化されるためであると考えられる。一方、成熟体 OmpA には、SecA の ATPase 活性を促進させる効果は、認められなかった(図16B)。このことは、proOmpA が SecA の ATPase 活性を促進する場合においても、シグナルペプチドが必須であることを示している。

第四節 考察

SecA は、大腸菌におけるタンパク質の膜透過に直接関与し、タンパク質の膜透過に関与する他の諸因子と相互作用する(32)。これらのことから、SecA は、大腸菌におけるタンパク質の膜透過において、中心的な役割を果たしていると考えられる。本研究により、これらの諸因子と相互作用すると、SecA の構造が変化することが明らかとなった。SecA の V8 に対する感受性の変化を指標にすると、SecA の構造変化は、大きく二つに分類できる。一つは、ATP あるいはその他のヌクレオチドと相互作用したときの構造変化である。これらのヌクレオチドは、SecA の N 末端側のおよそ 95kDa に相当する領域の、V8 に対する感受性を著しく低下させた。もう一つは、分泌型タンパク質前駆体 (proOmpA)、あるいは細胞質膜 (反転膜小胞)、あるいはリン脂質と相互作用したときの構造変化である。これらの諸因子は、SecA の V8 に対する感受性を著しく高めた。ただし、これら三者の感受性の変化の間にも若干の違いが認められた。このことは、分泌型タンパク質前駆体と相互作用した場合と、細胞質膜と相互作用した場合と、リン脂質と相互作用した場合とでは、それぞれ、SecA の構造変化が異なることを示唆している。

ATP, ADP, ATP- γ S は、SecA の N 末端側のおよそ 95kDa に相当する領域の、V8 に対する感受性を著しく低下させた。AMP には、そのような効果は認められなかった。ATP は、SecA の N 末端側のおよそ 25kDa の領域内に結合する(25)。そして、その

結合は、ADP によって阻害されるが AMP には阻害されない。すなわち、ATP, ADP (おそらく ATP- γ S も) が、SecA の N 末端側のおよそ 25kDa の領域内に結合することにより、SecA の構造が変化すると考えられる。SecA の V8 に対する感受性の変化は、ATP- γ S と相互作用した場合と、ADP と相互作用した場合との間で、違いはなかった。このことは、これらの場合、SecA は同様の構造変化を起こしていることを示唆している。言い換えれば、このことは、ATP の加水分解により、SecA が著しい構造変化を起こすことはないことを示唆している。おそらくは、これらのヌクレオチドが、SecA に結合することや、SecA から遊離することによって、SecA の構造が変化するのであろう。

では、この構造変化の生理学的な意味は何であろうか。ATP, ADP 及び ATP- γ S は、SecA と分泌型タンパク質前駆体との相互作用を促進する(44)。このことから、SecA は、これらのヌクレオチドと相互作用することによって、分泌型タンパク質前駆体と相互作用し易い構造へと変化しているのであろう。

SecA とヌクレオチド(ATP, ADP, ATP- γ S) とを相互作用させた後に、proOmpA を相互作用させた場合、SecA の V8 に対する感受性の変化は、proOmpA だけを相互作用させた場合と同様であった。すなわち、SecA の V8 に対する感受性に及ぼすヌクレオチドの効果は認められなかった。このことから、proOmpA と SecA とが相互作用することにより、SecA に結合していたヌクレオチド(ATP- γ S, ADP, おそらく ATP も) が遊離するということが考えられた。このことは、フローダイアリス法によって明らかとなった。

では、この現象の生理学的な意味は何であろうか。ATP は、タンパク質の膜透過のために必須のエネルギー源であり(19, 45, 46)、SecAはタンパク質の膜透過と共役して ATP を加水分解する(26)。さらに、ATP は、SecAと分泌型タンパク質前駆体との相互作用を促進する(44)。分泌型タンパク質前駆体と SecA とが相互作用することにより、SecA に結合していた ATP が遊離するということは、これ以降の膜透過反応には ATP は不必要であることを示唆しているのであろうか。答えは否であろう。1 分子の SecA に対して、ごく少数の ATP しか結合できない(25, 26)のに対し、分泌型タンパク質 1 分子が膜透過するためには、SecAに対して大量の ATP が必要とされることが示唆されている(26, 46)し、さらに、SecA と分泌型タンパク質前駆体とが相互作用することにより、SecA の ATPase 活性の促進が認められたからである。これらのことから次に示すことが、タンパク質の膜透過反応の初期段階で起こっている可能性が考えられる。SecA は、ATP と相互作用することによって、分泌型タンパク質と相互作用し易い構造へと変化する。そして、分泌型タンパク質前駆体と SecA とが相互作用することにより、SecA は再び構造変化を起こし、ATP(あるいは ADP)の遊離を伴って、ATPase 活性の高い構造となる。そしてタンパク質の膜透過と共役して、大量の ATP が加水分解される。

反転膜小胞と相互作用したときにも、SecA の V8 に対する感受性が変化した。酸性リン脂質と相互作用したときにも同様の変化が認められた。このことは、細胞質膜の酸性リン脂質が、SecA と細胞質膜との相互作用に重要な役割を果たしているという可能性を示唆している。Wickner の研究グループでは、SecA の ATPase 活性は、

酸性リン脂質によって促進されることを見出した(56)。このことも、その可能性を支持していると考えられる。しかし、酸性リン脂質だけが、SecA の細胞質膜との相互作用に関与しているわけではないであろう。細胞質膜に存在するタンパク質で、タンパク質の膜透過に関与している因子の一つと考えられている SecY が、SecA と相互作用することが示唆されている(26, 57, 58)からである。SecA は、細胞質膜と相互作用する際には、まず最初に、酸性リン脂質と相互作用して構造変化した後に、細胞質膜に存在するその他の因子と相互作用するのかもしれない。

タンパク質の膜透過に関与する諸因子と相互作用したときの SecA の構造変化のうち、測定が可能なものについては、CDスペクトル及び蛍光スペクトルの変化を解析した。

SecA の CDスペクトル及び蛍光スペクトルは、ATP の存在下でも変化は認められなかった。さらに、大腸菌のリン脂質の存在下でも、SecA の CDスペクトルの変化は認められなかった。したがって、これらの因子と相互作用したときの SecA の構造変化は、SecA 分子内の一部分の変化である可能性が高い。

タンパク質の膜透過に関与する諸因子と相互作用したときに、SecA が構造変化を起こすことを、SecA のプロテアーゼに対する感受性の変化を指標にして、明らかにすることができた。このことから、SecA は、これらの因子と相互作用し、構造を変化させながら、タンパク質の膜透過反応に寄与していることが強く示唆された。しかし、これらの構造変化が、SecA のどの部分のどのような変化であるのか、さらに、これらの構造変化の生理学的な意味など、不明な点が多い。このような、構造変化を

詳しく解析することによって、タンパク質の膜透過における、SecA の役割をより具体的に示すことができると考えている。

第二章　グアニジン塩酸水溶液中で変性した SecA の、構造及び機能の再生

2-§1 序

これまでも述べてきたように、SecA は、タンパク質の膜透過に直接関与し、膜透過に関与するその他の諸因子と相互作用する(32)。このように、多くの機能をもった SecA の、機能ドメインを決定することを目的として、松山らは、まず、*secA* 遺伝子の一部を欠失させた、種々の変異体をプラスミド上で作成した(25)。これらの変異 *secA* 遺伝子は、種々の長さの SecA の N 末端フラグメント、あるいは C 末端フラグメントをコードしている。これらの遺伝子をそれぞれ、大腸菌内に導入して大量に発現させさせたところ、それらの産物のほとんどのものは、凝集体を形成した。凝集体を形成した SecA 変異体を再生させるために、6M のグアニジン塩酸により変性・可溶化させた後、希釈・透析を行なった。その結果、N 末端フラグメントと C 末端フラグメントが共存し、しかも、それらが一次構造上相補する組合せであるときに限って、ATP 及び分泌型タンパク質前駆体との結合能が再生した(25,44)。

SecA の構造と機能を解析するためのアプローチの一つとして、筆者は、intact SecA(SecA) の変性・再生について解析した。その結果、6M のグアニジン塩酸水溶液

中で変性した SecA は、希釈・透析により構造、機能共に、ほぼ完全に再生することが明らかとなった。本章では、その結果について述べる。

2-§2 材料・方法

SecA 及び N95-SecA の精製

第一章、第一節、1-1-§2 材料・方法 に同じ。

SecA 及び N95-SecA の変性と再生

Saxena と Wetlauferの方法(59)に基づいて行なった。すなわち、4mg/ml の SecA あるいは N95-SecA 25 μ l に対し、75 μ lの 8Mグアニジン塩酸/65mMトリス-酢酸(pH7.5)を加え(終濃度 10 μ M SecA、6Mグアニジン塩酸)氷上で、1時間放置した。このグアニジン塩酸溶液に、1.5mlの 50mM トリス-酢酸(pH7.5)/100mM 酢酸カリウム/3mM 還元型グルタチオン/0.3mM 酸化型グルタチオンを加え(16倍希釈)、50mM トリス-酢酸(pH7.5)/100mM 酢酸カリウム/1mM DTTで透析することにより、SecAを再生させた。再生SecA は、Bio-Gel-P300(Bio-Rad)により濃縮した。上記の方法を図表にしたものを図17 に示した。

CDスペクトルの測定

CDスペクトルは、分光旋光計 J-600(Jasco) を用いて測定した。ネイティブ SecA 及び再生SecA は、0.24mg/ml で測定し、変性SecA は、1mg/mlで測定した。その他の測定条件を以下に示す。 scan speed, 20nm/min ; sensitivity, 50mdeg ; time constant, 1s ; cell length, 1mm ; temperature, 4 $^{\circ}$ C.

蛍光スペクトルの測定

蛍光スペクトルは、分光蛍光光度計 RF-5000 (Shimadzu) を用いて測定した。タンパク質の濃度は、1mg/ml で測定した。その他の測定条件を以下に示す。excitation wavelength, 280nm(5nm bandpass) ; emission wavelength, 290nm-450nm ; scan speed, 50nm/min ; sensitivity, low ; temperature, 4℃

SecA 二量体の架橋反応

架橋試薬として、EDAC を用いた。105 μ g の SecA を含む 50mMリン酸カリウム(pH 7.5) 65 μ lに 5 μ lの 700mM EDAC を添加し、25℃で反応を行なった。反応液から、0分後、1分後、5分後、10分後、20分後、50分後、に 10 μ lづつサンプリングし、氷上で、10 μ lの 200mMトリス-塩酸(pH 6.8)/4% SDS/20% グリセリン/10% 2-メルカプトエタノール/0.02% ブロモフェノールブルーを添加することにより反応を停止した。反応を停止した後、SDS-ポリアクリルアミド(3%アクリルアミド、0.06% N-N'メチレンビスアクリルアミド)ゲル電気泳動を行い、クマシーブリリアントブルー (R250)により染色し、バンドを検出した。

[α - 32 P]ATP による SecA の光親和性標識

松山らの方法(25)で、以下のように行なった。20 μ lの反応液(50mM トリス-酢酸(pH 7.5)/100mM 酢酸カリウム/2mM 酢酸マグネシウム/1mM DTT/0.1 μ M [α - 32 P]AT

P/3 μ g SecA) を、0℃で15分間保温した後、紫外線照明器 TS15 (UVP) を用い、254nmの紫外線を40分間照射した。反応液に、5 μ l の 300mM トリス-塩酸(pH 6.8)/10% SDS/50% グリセリン/25% 2-メルカプトエタノール/0.05% プロモフェノールブルーを添加して反応を止めた後、Laemmli の方法(41)に基づいて、ポリアクリルアミド(10% アクリルアミド、0.27% N-N'-メチレンビスアクリルアミド)ゲル電気泳動を行い、フルオログラムによって、バンドを検出した。

in vitro 転写反応

SP6 のプロモーター支配下にある *uncleavable ompF-Lpp* 遺伝子を保持するプラスミド pK127(24)を、この遺伝子の下流にある *Hind*III 切断部位で切断して直鎖状とし、転写反応の鋳型とした。転写反応は、以下の組成で 40℃で 3時間行なった。

・転写反応液(終濃度)：

40mM トリス-塩酸(pH7.5),	2mM スペルミジン,
6mM 塩化マグネシウム,	10mM 塩化ナトリウム,
0.5mM ATP, GTP, CTP, UTP,	10mM DTT,
1unit/ μ l RNase阻害剤,	0.02-0.05 μ g 鋳型 DNA,
0.1-0.5units/ μ l SP6 RNA ポリメラーゼ	

細胞質画分の調製

山根らの方法(20)に若干の変更を加え、以下のように行なった。

MM66株(F^- , $\Delta lac169$, $secA^{*m}$)(15)を次に示す培地 3 l 中で、30℃ で $OD_{660}=0.02$ まで培養した後、培養温度を 41℃に上げ、1.5時間培養し($OD_{660}=0.18$)集菌した。

・培地 (1 l 当たり)

リン酸二水素カリウム 26g, リン酸水素二カリウム 5g,

酵母エキス 9g, グルコース 9g

以下の操作はすべて 4℃で行なった。菌体を 20mlの 50mM トリス-酢酸(pH 7.8)/10% ショ糖で洗浄し、菌体湿重量1g 当たり 1mlの 10mM トリス-酢酸(pH 7.8)/14mM 酢酸マグネシウム/60mM 酢酸カリウム/0.1mM DTT に懸濁した。-80℃ フリーザーで凍結融解した後、50 μ g/mlになるように DNaseI を添加して、セルミル(Vibrogen Zellmuhe) で菌体を破碎した。8,000xg,10分間の遠心で、破碎されなかった菌体を除去した後、80,000xg,2時間遠心した。上清に、12.5 μ g/mlになるようにビルビン酸キナーゼを添加した後、10mM トリス-酢酸(pH 7.8)/14mM 酢酸マグネシウム/60mM 酢酸カリウム/0.1mM DTT で透析した。8,000xg,1時間遠心し、上清画分を細胞質画分として用いた。標品は -80℃で保存した。

in vitro 翻訳反応

翻訳反応は、山根らの方法(20)に若干の改変を加え、以下の組成で 37℃、20分間行なった。反応後、終濃度 で 1%の非放射性メチオニンを添加した。

・翻訳反応液 (終濃度) :

21mM ホスホエノールビルビン酸,

30mM クレアチンリン酸,

0.1 μ g/ μ l クレアチンキナーゼ,	0.03 μ g/ μ l NADP,
0.03 μ g/ μ l FAD,	0.03 μ g/ μ l 葉酸,
2.2mM ATP,	0.56mM CTP, GTP, UTP,
1.4mM DTT,	0.1 μ g/ μ l 大腸菌 tRNA混合物,
0.35mM アミノ酸混合物(メチオニンを除く),	7mM 酢酸カルシウム,
72mM 酢酸カリウム,	40mM 酢酸マグネシウム,
0.8mM スペルミジン,	0.1 μ Ci/ μ l Tran ³⁵ S-label,
10% 転写反応液	6.5 μ gタンパク質/ μ l 細胞質画分,

翻訳反応後のゲルろ過

山根らの方法(20)で、以下のように行なった。G-75 スーパーファイン(Pharmacia)樹脂を充填したセパコールミニカラム(純粋工業)に 350 μ l の翻訳反応液をのせ、50mM リン酸カリウム(pH7.5)によって溶出し、150 μ lづつ分画した。

SecA と [³⁵S]uncleable OmpF-Lpp との架橋反応

秋田らの方法(24)で、以下のように行なった。SecA (2 μ l中 2.5 μ g)を H₂O 2.5 μ l、7.5 μ l(1.5 \times 10⁵ dpm)の [³⁵S]uncleable OmpF-Lppと混合後、25 $^{\circ}$ C で 10分間保温した後、3 μ l の 12.5mM EDAC の添加して架橋反応を開始し、50分間保温した。尚、[³⁵S]uncleable OmpF-Lpp は、ゲルろ過によって精製した標品である。5 μ lの 200mM トリス塩酸(pH 7.5)を添加することにより反応を停止した。架橋複合体は、

SDS-ポリアクリルアミド(10% アクリルアミド、0.2% N-N'-メチレンビスアクリルアミド)ゲル電気泳動の後、フルオログラムによって検出した。

イムノアフィニティカラムクロマトグラフィーによる [³⁵S]uncleableOmpF-Lpp の精製

松山と水島の方法(46)で、以下のように行なった。プロテインA-セファロースCL4B (Pharmacia)と、ラビットの抗リポプロテイン抗体を架橋剤ジメチルスベリミデートによって架橋させた後、これをセパコールミニカラム(北研製)に充填した。カラムは、20mM リン酸ナトリウム(pH 7.2)/145mM NaCl で平衡化した。 [³⁵S]uncleable OmpF-Lpp を 350 μ l の反応液中で翻訳させ、カラムにかけた。10ml の 20mM トリシュー塩酸 (pH7.5)/500mM NaCl、5ml の 10mM トリシュー塩酸 (pH7.5)/10mM NaCl で洗浄した後、200mM 酢酸/0.1% BSA.により、 [³⁵S]uncleable OmpF-Lpp を溶出し、200 μ l づつ分画した。分画後、各フラクションに 35 μ l の 1M トリスを添加した後、各フラクションの放射能を測定した。放射能の高いフラクションを集め、50mM リン酸カリウム(pH7.2)/2mM DTT により透析した。精製標品は、-80℃で保存した。

反転膜小胞の調製

第一章、第一節、1-1-§2 材料・方法に同じ。

反転膜小胞の 6M 尿素処理

タンパク質の濃度が 2mg/ml の反転膜小胞 0.5ml に対し、1.5ml の 8M 尿素 / 50mM リン酸カリウム (pH7.5) / 250mM シヨ糖 / 10% グリセリン / 1mM DTT を添加し (終濃度 6M 尿素)、水中に 1 時間放置した。150,000xg, 30 分間 遠心して反転膜小胞を回収し、100 μ l の 50mM リン酸カリウム (pH7.5) / 250mM シヨ糖 / 10% グリセリン / 1mM DTT に懸濁した。

in vitro 膜透過反応

6M の尿素で処理した反転膜小胞 5 μ g (タンパク質量) と SecA を含む 5 μ l の溶液を 37°C で 5 分間保温した後、67mM リン酸カリウム (pH7.5) / 6.7mM ATP / 6.7mM コハク酸 / 6×10^5 cpm [35 S]uncleavable OmpF-Lpp 溶液 15 μ l を添加し、さらに 10 分間保温した。尚、[35 S]uncleavable OmpF-Lpp は、イムノアフィニティカラムによって精製した標品である。膜透過が起きたかどうかは、膜透過基質の プロテイナーゼ K に対する感受性を指標にした。すなわち膜透過反応後、5mg/ml の プロテイナーゼ K を 5 μ l 添加し、氷上にて 10 分間反応させた。30% TCA を 10 μ l 添加することにより反応を停止した。15,000xg, 5 分間の遠心後、沈澱をアセトン、エーテルで洗浄し、10 μ l の 50mM リン酸ナトリウム (pH7.2) / 10% グリセリン / 1% 2-メルカプトエタノール / 0.02% プロモフェノールブルー に可溶化した後、SDS-ポリアクリルアミド (10% アクリルアミド、0.27% N-N'-メチレンビスアクリルアミド) ゲル電気泳動を行ない、フルオログラムにより、膜透過したタンパク質を X 線フィルム上にバンドとして検出した。

タンパク質の定量

Lowryらの方法(40)で行なった。標準曲線は、BSAで作成した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ことわりのない限り、Hussain らの方法(60)で行なった。

2-§3 結果

1) 変性 SecA 及び再生 SecA の構造

まず、変性及び再生操作による SecA の構造変化を解析した。

変性及び再生操作による SecA の二次構造の変化を調べるために、CDスペクトルを測定した (図18A)。

第一章でも示したように、ネイティブ SecA の CDスペクトル曲線は、 α -ヘリックスの含量の多いタンパク質に特有の曲線を示した。

これに対し、6M Guanidinium 塩酸水溶液中では、SecA の二次構造は破壊され、ランダムコイル状となっていた。希釈・透析後の SecA (再生 SecA) は、ネイティブ SecA とほとんど同様のスペクトル曲線を示した。すなわち、SecA の二次構造は、6M Guanidinium 塩酸水溶液中で破壊され、希釈・透析により、再生することが示唆された。変性及び再生操作による SecA の構造変化をさらに解析した。

第一章でも述べたように、SecA (901 アミノ酸残基) は、7 つのトリプトファン残基をもっている (349, 519, 541, 622, 701, 及び 775 残基) (47)。そこで、変性及び再生操作による SecA の三次構造の変化を調べるために、トリプトファン残基の蛍光スペクトルを測定した (図18B)。

ネイティブ SecA の蛍光スペクトル曲線の極大波長は、340nm 付近であった。6M Guanidinium 塩酸水溶液中では、極大波長が 350nm 付近に移動した。トリプトワンの蛍光スペクトルは、溶媒の極性が高くなるほど極大波長が長波長側へ移動する (61, 62)。

したがって、極大波長の移動は、SecA分子の内部の疎水的な環境に存在していたトリプトファン残基が、6Mグアニジン塩酸水溶液中でSecA分子が変性したために、分子の外部の親水的な環境に露出したことを示している。さらに、6Mグアニジン塩酸水溶液中では、蛍光強度が低下した。トリプトファン残基の蛍光強度は、親水的な環境では、消光する性質がある(63)。したがって、このことも、6Mグアニジン塩酸水溶液中でSecA分子が変性し、トリプトファン残基が親水的な環境に露出したことを示している。350nm付近のピークは、おそらく水のラマン散乱であろう。これに対し再生SecAのスペクトルは、ネイティブSecAとほぼ同様の曲線を示した。すなわち、再生SecAの三次構造は、ほぼ完全に回復していることが示された。

次に、再生SecAの高次構造を化学架橋法によって調べた(図19)。架橋試薬としては、EDACを用いた。EDACは、カルボキシル基とアミノ基との架橋反応にあずかる。

架橋反応により形成された架橋複合体を経時的に調べた結果、再生SecAにおいてもネイティブSecAと同様に架橋二量体が速やかに形成されていた。三量体以上のものもわずかに形成されていたが、時間の経過によって増加は認められなかった。したがって、再生SecAもネイティブSecAと同様に二量体であることが明らかとなった。

以上の結果から、再生SecAは、二次構造、三次構造、四次構造共に、定量的に回復していることが明らかとなった。

2) 再生 SecA の機能

SecA は、タンパク質の膜透過に直接関与し、ATP 及び分泌型タンパク質前駆体と相互作用する。そこで、次に、再生 SecA の諸機能を解析した。

SecA と ATP との相互作用を、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ による光親和性標識法により解析した (25) 図 20A)。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の存在下で、ネイティブ SecA 及び再生 SecA を紫外線 (254nm) で照射 (光親和性標識) した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行いフルオログラムによりバンドを検出したところ、再生 SecA もネイティブ SecA と同様に、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ により標識されていた。すなわち、再生 SecA もネイティブ SecA と同様に、ATP と相互作用し得ることが明らかとなった。

次に、再生 SecA と分泌型タンパク質前駆体との相互作用を、化学架橋法により解析した (図 20B)。分泌型タンパク質前駆体としては、大腸菌外膜タンパク質 OmpF と主要リポタンパク質 (Lpp) の融合タンパク質で、シグナル配列の切断されないもの (uncleavable OmpF-Lpp) (20) を用いた。

in vitro で合成した $[\text{}^{35}\text{S}]\text{uncleavable OmpF-Lpp}$ と SecA とを混合後、架橋試薬である EDAC を加えて架橋反応を行い、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の後、フルオログラムによりバンドを検出した。ネイティブ SecA を用いたときに検出される分子量およそ 110kDa に相当するバンドは、抗 SecA 抗体で免疫沈降するので、SecA (およそ 102kDa) と $[\text{}^{35}\text{S}]\text{uncleavable OmpF-Lpp}$ (およそ 8.8kDa) の架橋複合体である (24)。再生 SecA を用いた場合も同様に分子量 およそ 110kDa に相当する位置にバンドが検出されていることから、これも SecA と $[\text{}^{35}\text{S}]\text{uncleavable OmpF-Lpp}$ との架橋複合体であると考えられる。したがって、再生 SecA もネイティブ SecA と同様に、分

泌型タンパク質と相互作用し得ることが明らかとなった。

この実験で用いた [^{35}S]uncleable OmpF-Lpp 標品は、*in vitro* で合成後、ゲルろ過にかけたものであるが、標品中には、翻訳反応中の細胞質画分が含まれている。したがって、分子量 およそ77kDaに相当するバンドは、細胞質画分に含まれる、あるタンパク質成分と、[^{35}S]uncleable OmpF-Lpp との架橋複合体であると考えている。

次に、再生 SecA について、分泌型タンパク質前駆体を膜透過させる活性を、*in vitro* の膜透過実験系によって調べた (図21(i))。分泌型タンパク質前駆体として、[^{35}S]uncleable OmpF-Lpp を用いた。

SecA と反転膜小胞とを反応させた後、[^{35}S]uncleable OmpF-Lpp, ATP, コハク酸を添加し、膜透過反応を行なった。膜透過反応終了後、プロテイナーゼKを添加し、膜透過していない [^{35}S]uncleable OmpF-Lpp を分解した。分解反応を停止させた後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、フルオログラムによってバンドを検出した。このときに検出されるバンドは、プロテイナーゼKに対して耐性の [^{35}S]uncleable OmpF-Lpp である。プロテイナーゼKに対して耐性であることは、膜を透過したことを示している。膜透過実験系に再生 SecA を用いた場合も、ネイティブ SecA を用いた場合と同様に、SecA の濃度に依存して、[^{35}S]uncleable OmpF-Lpp の膜透過効率が上昇し、SecA の量に対して同じ膜透過活性を示した。すなわち、再生 SecA は、分泌型タンパク質を膜透過させる活性に関してもほぼ 100% 回復していることが示された。尚、この実験で用いた [^{35}S]uncleable OmpF-Lpp は、*in vitro* で合成後、抗体カラムにより精製した標品であり、反転膜小胞は、6Mの尿素で処

理を施した標品なので、細胞質画分 (S-80 画分) 由来の SecA 及び細胞質膜画分由来の SecA は、膜透過実験系には混入していない。

以上の結果、再生 SecA は、機能的にもほぼ完全に回復していることが明らかになった。

3) SecA の立体構造形成には、ジスルフィド結合は関与していない。

第一章でも述べたように、SecA (901 アミノ酸残基) は 4つのシステイン残基をもっており (98, 885, 887, 及び 896残基) (47)、3つの残基がC末端側に集中している。SecA の分子内あるいは分子間にジスルフィド結合が存在するか否かは明らかではないが、仮に存在するとすれば、それが、立体構造形成のための核になっている可能性がある。その可能性の有無を調べるために以下の実験を行なった。

3つのシステイン残基を含むC末端側の 70 アミノ酸残基を欠失させた SecA (N95-SecA) (25)に対して、6Mグアニジン塩酸による変性、希釈・透析による再生操作を施し、機能を調べた。上述した、*in vitro* の膜透過実験系により、分泌型タンパク質前駆体 ($[^{35}\text{S}]\text{uncleable OmpF-Lpp}$) を膜透過させる活性を調べたところ、再生N95-SecA を用いた場合も、ネイティブ N95-SecA を用いた場合と同様に、N95-SecA の濃度に依存して、 $[^{35}\text{S}]\text{uncleable OmpF-Lpp}$ の膜透過効率が上昇しており、その効率は、両者でほぼ一致していた (図21(ii))。すなわち、再生N95-SecA の機能は、ほぼ完全に回復していることが明らかとなった。

さらに、6Mグアニジン塩酸による SecA の変性、希釈・透析による再生操作を、す

べて還元条件下 (1mM DTT 存在下) で行なった。この場合にも、SecAは、定量的に機能回復していることが、上述した *in vitro* の膜透過実験系により明らかとなった (図21(i))。

以上の結果、SecA の立体構造形成には、ジスルフィド結合は関与していないことが示された。

6Mグアニジン塩酸中で変性した SecA が、希釈・透析により、構造、機能共に、定量的に再生することが見い出された。グアニジンあるいは尿素などの変性剤によって変性したタンパク質が、希釈あるいは透析によって再生する例は、いくつか知られており、それらについては、再生の速度論的な解析もなされている(64)。SecA については、再生の速度論的な解析をしていない。しかし、非常に初歩的かつ厳密性に欠ける実験ではあるが、以下に示す実験結果を得ている。SecA を含む6Mグアニジン塩酸水溶液を、200倍に希釈したところ、SecA の ATPase 活性は、数秒以内に、ネイティブ SecA の 70-80%まで回復した(データ省略)。筆者の知る限りでは、これまでに研究されている、いくつかのタンパク質においては、グアニジン塩酸水溶液中で変性したタンパク質の活性が、ネイティブな状態の 70-80% まで回復するには、水溶液の希釈後、少ないものでも数十分は要している(64)。これらのタンパク質に比べて、SecA の再生は、非常に速やかに行なわれているであろうと考えている。

変性剤中で変性した状態から、定量的な再生が不可能なタンパク質もある。多くの場合、その原因は不明である。ランダムに形成されたジスルフィド結合を正確な結合へと修正する酵素(プロテインジスルフィドイソメラーゼ)を添加することによって、再生反応が促進され、しかも、定量的な再生が可能となるタンパク質もある(65-67)。したがって、ネイティブな状態とは異なるジスルフィド結合が形成されるために、定量的な再生が不可能となるタンパク質もあるであろう。SecA の再生には、ジスルフ

イド結合が関与していない(図21(i))。変性した状態から、定量的にしかも速やかな再生が可能であるのは、このためかも知れない。

変性した SecA が、定量的に、そして、おそらくは、速やかに再生するという生理学的な意味は何であろうか。SecA はタンパク質の膜透過に関与する諸因子と相互作用する。第一章で述べたが、これらの因子と相互作用したときに SecA の構造は変化するので、SecA は構造をダイナミックに変化させながら、タンパク質の膜透過反応に寄与していると考えられた。変性した状態から、定量的に、そして、おそらくは、速やかに再生するという SecA の性質は、ダイナミックに構造を変化させながら機能するという SecA の性質を反映しているのかも知れない。

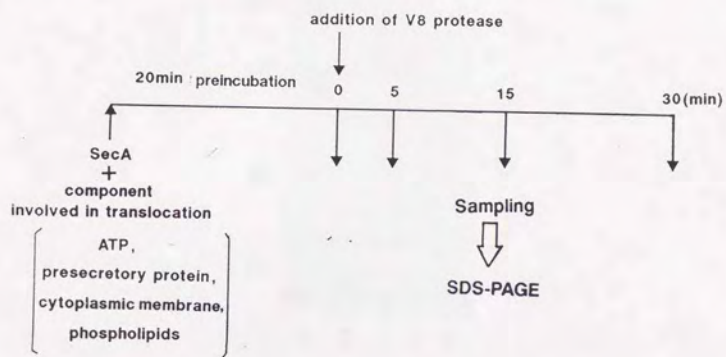


図1. SecA の V8 に対する感受性の解析方法

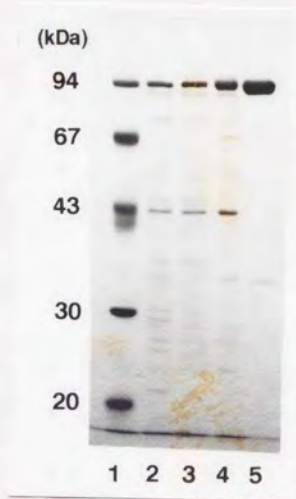


図2. SecA の精製

精製の各段階の標品 $2\mu\text{g}$ を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、クマシーブリリアントブルー(R250)による染色により、分析した。lane 1, 分子量マーカー； lane 2, 全細胞抽出液； lane 3, S-150 画分； lane 4, 40%硫酸の上清-50%硫酸の沈澱画分； lane 5, ハイドロキシルアパタイトカラムにかけたときの SecA 画分。最終精製標品(lane 5)を、CS-930 クロマトスキャナー (Shimadzu)を用いて定量した。

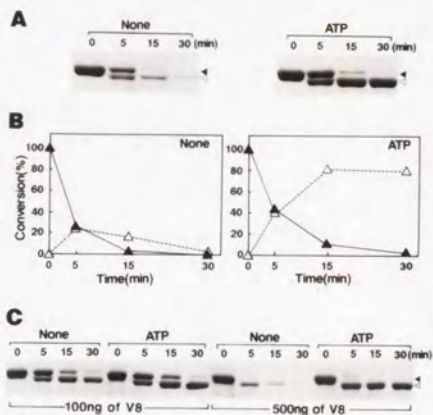


図3. SecA の V8 に対する感受性に及ぼす ATP の影響

2mM の ATP の存在下及び非存在下で、SecA を 100ng の V8 によって分解した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。尚、反応液中には、5mM の硫酸マグネシウムが含まれている。A、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の後、クマシーブリリアントブルー(R250)で染色した。▲、△ はそれぞれ、SecA、95kDaフラグメントを示す。B、Aを CS-930 クロマトスキャナー(Shimadzu)を用いて定量した。0 time の SecA の量を 100% とした。▲、△ はそれぞれ SecA、95kDaフラグメントを示す。C、V8 による分解を尿素の非存在下で行なった。添加した V8 の量は、図中に示した。

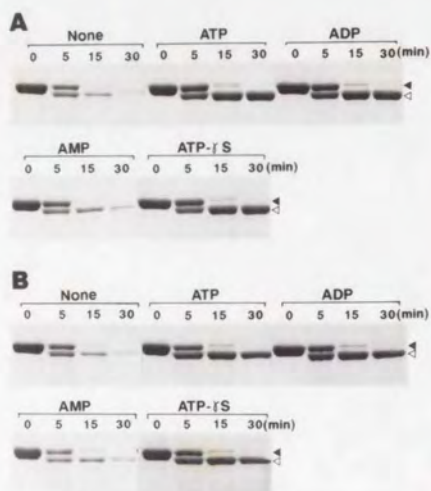


図4. SecA の V8 に対する感受性に及ぼす他のアデニンヌクレオチドの影響

ヌクレオチド (ATP, ADP, あるいは ATP- γ S) の存在下及び非存在下で, SecA を 100ng の V8 によって分解した後, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、クマシーブリリアントブルー (R250) による染色を行なった。A, B はそれぞれ、ヌクレオチドの濃度が 2mM, 5 μ M の場合である。その他の実験条件は、図3A に同じである。◀, ◁ は それぞれ SecA, 95kDa フラグメントを示す。

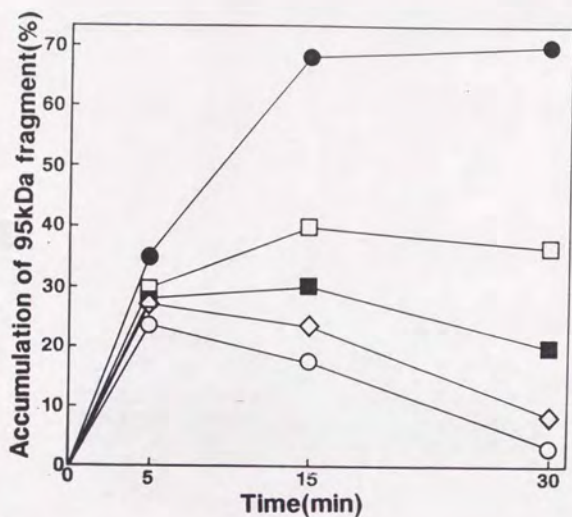


図5. 95kDaフラグメントの蓄積

ヌクレオチド (ATP, CTP, UTP, あるいは GTP) の存在下、及び非存在下で、SecA を 100ng の V8 によって分解した。ヌクレオチドの濃度は、0.3mM である。その他の実験条件は、図3A に同じである。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、クマシーブリリアントブルー (R250) による染色の後、CS-930 クロマトスキャナー (Shimadzu) を用いて定量した。0 time の SecA の量を 100% とした。○ はヌクレオチドの非存在下の場合、●, □, ■, ◇ はそれぞれ、ATP, CTP, UTP, あるいは GTP の存在下の場合である。

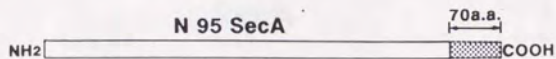
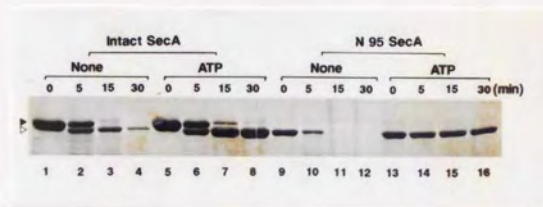
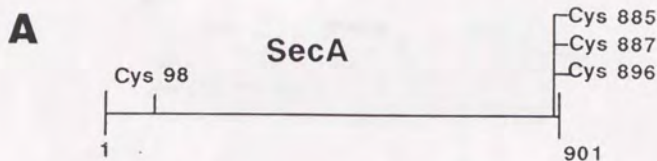
A**B**

図6. N95-SecA の V8 に対する感受性

A, N95-SecA を模式的に表した。B, SecA (lanes 1-8) 及び N95-SecA (lanes 9-16) を、2mM の ATP の存在下及び非存在下で、100ng の V8 によって分解した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、クマシーブリアントブルー (R250) による染色を行なった。その他の実験条件は、図3A に同じである。



B

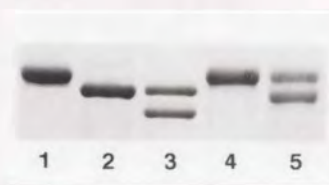


図7. SecA 及び 95kDaフラグメントの、NTCB による分解

A, SecA のシステイン残基の位置を示した。B, 10 μ g の SecA (lane 1) を、2mM の ATP, 5mM の硫酸マグネシウムの存在下で、100ng の V8 により、37 $^{\circ}$ C で 30分間分解した (lane 2) 後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。95kDaフラグメントを電気泳動によってゲルから回収し、NTCB によって分解した (lane 3)。SecA (lane 4) を直接 NTCB によって分解した (lane 5)。各々の試料から、1 μ g ずつサンプリングし、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、クマシーブリリアントブルー (R250) による染色を行なった。

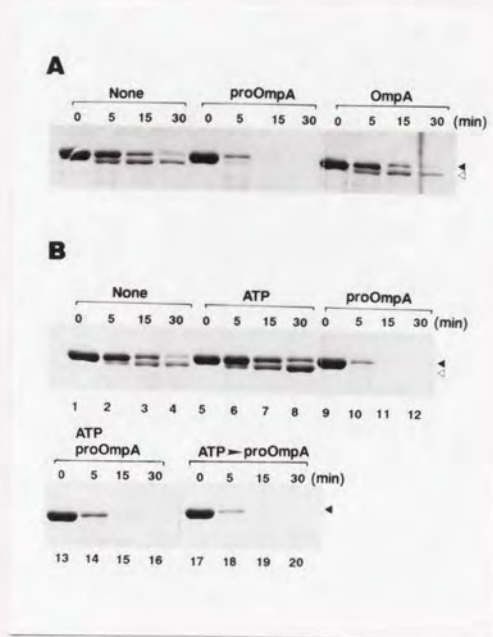


図8. SecA の V8 に対する感受性に及ぼす proOmpA の影響

A, proOmpA あるいは OmpA の存在下、及び非存在下で、SecA を 50ng の V8 によって分解した。proOmpA あるいは OmpA と、SecA とのモル比は、proOmpA(OmpA) : SecA=5 : 1 である。(10 μ g の SecA に対して、22 μ g の proOmpA あるいは 19 μ g の OmpA) B, 2mM の ATP の存在下 (lanes 5-8), 22 μ g の proOmpA の存在下 (lanes 9-12), 及び 2mM の ATP と 22 μ g の proOmpA の両方の存在下 (lanes 13-20) で、SecA を 50ng の V8 によって分解した。lanes 13-16 は、反応液に、ATP と proOmpA を同時に加えた場合である。lanes 17-20 は、反応液に、ATP を添加して 20分間保温した後に、proOmpA を添加して 5分間保温した場合である。尚、反応液中には、5mM の硫酸マグネシウムが含まれている。分解反応の後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、クマシーブリリアントブルー(R250)による染色を行なった。◀, ◁ はそれぞれ、SecA, 95kDaフラグメントを示す。



図9. SecA の V8 に対する感受性に及ぼす反転膜小胞の影響
 4M の尿素で処理を施した反転膜小胞(MV) の存在下及び非存在下で、Sec A を 25ng の V8 によって分解した。反応液に添加した反転膜小胞の量は、尿素処理を施す前の反転膜小胞 42 μ g あるいは 250 μ g(タンパク質の量)に相当する量である。分解反応の後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、クマシーブリリアントブルー(R250)による染色を行なった。◀, ◁はそれぞれ、SecA, 95kDaフラグメントを示す。

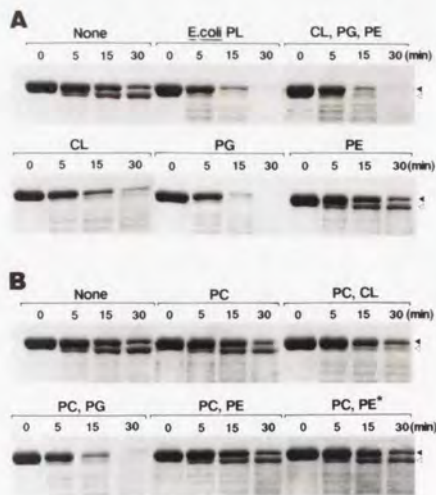


図10. SecA の V8 に対する感受性に及ぼすリン脂質の影響

A, 大腸菌の全リン脂質(*E. coli* PL)(125 μ g), CL(12.5 μ g)とPG(12.5 μ g)とPE(100 μ g)との混合リポソーム, CL(12.5 μ g), PG(12.5 μ g), あるいはPE(100 μ g)の存在下及び非存在下で, SecA を 25ng の V8 によって分解した。CL と PG と PE の混合リポソームは, 1mg の CL と 1mg の PG と 8mg の PE とを混合し, 1ml の 2mM 2-メルカプトエタノールを加え, 超音波洗浄器(Branson)中で超音波処理を行なうことによつて, 作成した。分解反応の後, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動, クマシーブリリアントブルー(R250)による染色を行なつた。◀, ◁ はそれぞれ, SecA, 95kDaフラグメントを示す。B, PC(100 μ g), PC(100 μ g)とCL(12.5 μ g)との混合リポソーム, PC(100 μ g)とPG(12.5 μ g)との混合リポソーム, PC(100 μ g)とPE(12.5 μ g)との混合リポソーム, あるいはPC(100 μ g)とPE(100 μ g)との混合リポソーム(PC, PE*)の存在下及び非存在下で, SecA を 25ng の V8 によって分解した。PC と CL, PC と PG, 及び PC と PE の混合リポソームは, 8mg の PC と 1mg の CL, 1mg の PG, 1mg の PE, あるいは 8mg の PE を混合し, 1ml の 2mM 2-メルカプトエタノールを加え, 超音波洗浄器(Branson)中で超音波処理を行なうことによつて作成した。◀, ◁ はそれぞれ, SecA, 95kDaフラグメントを示す。その他の実験条件は, 図10A に同じである。

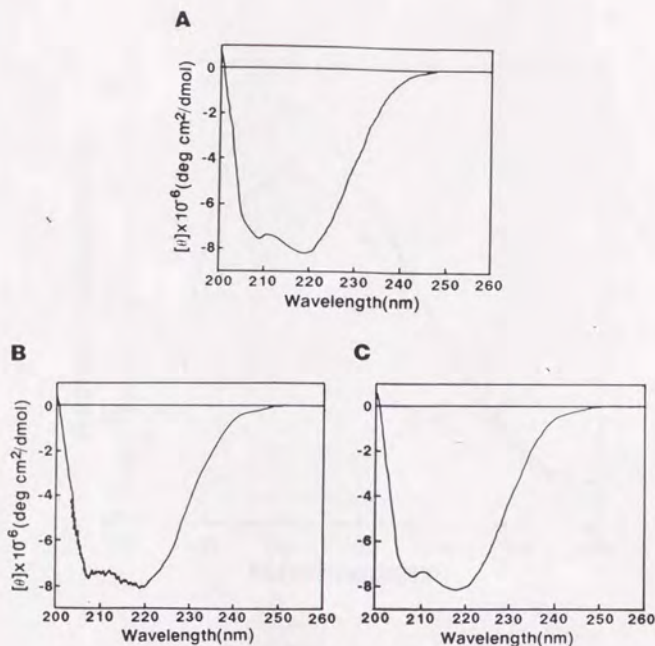


図11. ATP あるいはリン脂質の存在下における、SecA の CDスペクトル
 SecA の CDスペクトルを測定した後、終濃度 2mM の ATP, あるいは 500 μ g/ml の大腸菌の全リン脂質を添加し、37 $^{\circ}$ Cで 20分間保温した後、CDスペクトルを測定した。A, SecA ; B, SecA + ATP ; C, SecA + 大腸菌の全リン脂質。スペクトルは、それぞれ、試料と緩衝液 (A, 50mM リン酸カリウム (pH7.5) ; B, 50mM リン酸カリウム (pH7.5) / 2mM ATP ; C, 50mM リン酸カリウム (pH7.5) / 500 μ g/ml 大腸菌の全リン脂質) との差スペクトルである。縦軸はモル分子楕円率を示す。

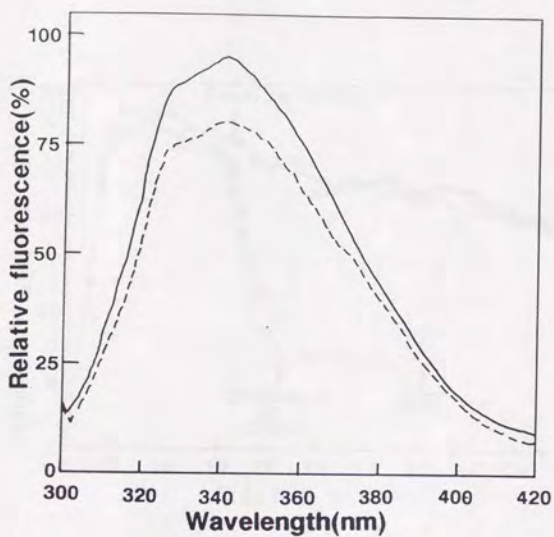


図12. ATP の存在下における SecA の蛍光スペクトル

SecA の蛍光スペクトルを測定し(——)、分光光度計 UV-160(Shimadzu)で 290nm の吸光度を測定した後、2mM になるように ATP を添加した。37℃で 20分間保温した後、蛍光スペクトルを測定した(-----)。蛍光スペクトルを測定した後、290nm の吸光度を測定した。縦軸は、蛍光強度の相対値を示す。

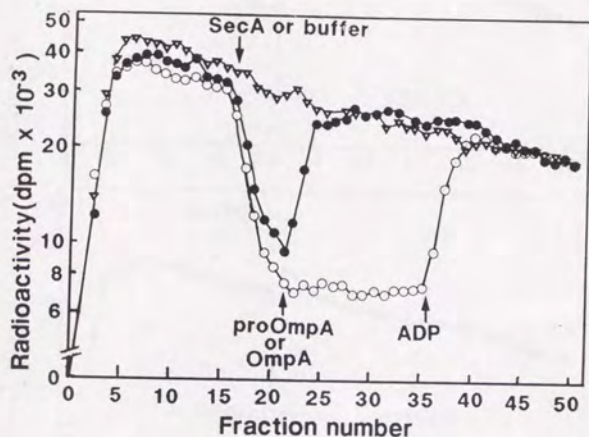


図13. SecA に結合した ADP の、SecA からの遊離
 $[^3\text{H}]\text{ADP}$ (26.4Ci/mmol) を、 $0.25\mu\text{M}$ になるように、上槽に添加した後、矢印で示したところで、上槽に、SecA(●, ○), proOmpA(●), OmpA(○), 及び非放射性 ADP(●, ○)をそれぞれ、 $4\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, 2mM になるように添加した。尚、反応液中に混入してくる尿素の量は、終濃度で 0.4M である。対照実験(▽)では、上槽に、SecAの代わりに、等量の 50mM リン酸カリウム (pH7.5)を添加し、矢印で示したところで、proOmpA, 及び非放射性 ADPを添加した。

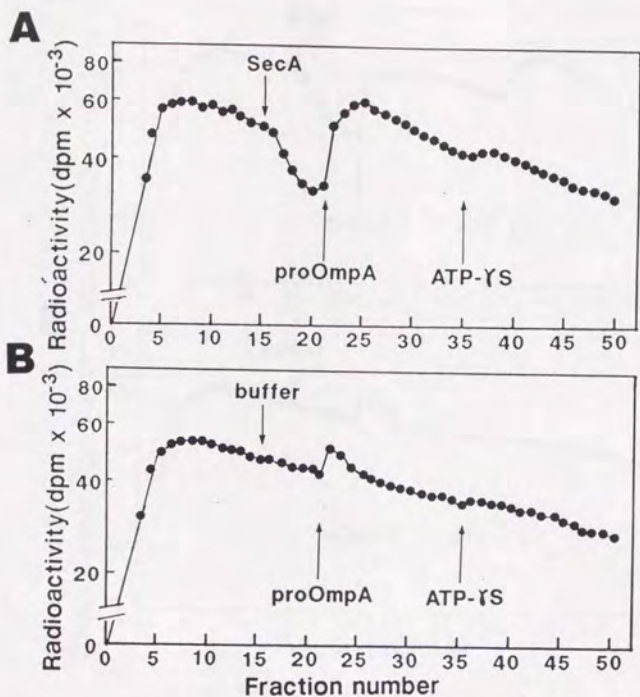


図14. SecA に結合した ATP-γS の、SecA からの遊離 (proOmpA の影響)
 A, 上槽に、 $[^{35}\text{S}]\text{ATP-}\gamma\text{S}$ (65Ci/mmol) を、 $0.25\mu\text{M}$ になるように添加し、
 矢印で示したところで、SecA, proOmpA, 及び非放射性 ATP-γS を、それ
 ぞれ $4\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, 2mM になるように添加した。B, Aにおいて SecA を添
 加したところで、同量の 50mM リン酸カリウム (pH7.5) を添加した。尚、
 反応液中に混入してくる尿素の量は、終濃度で 0.4M である。

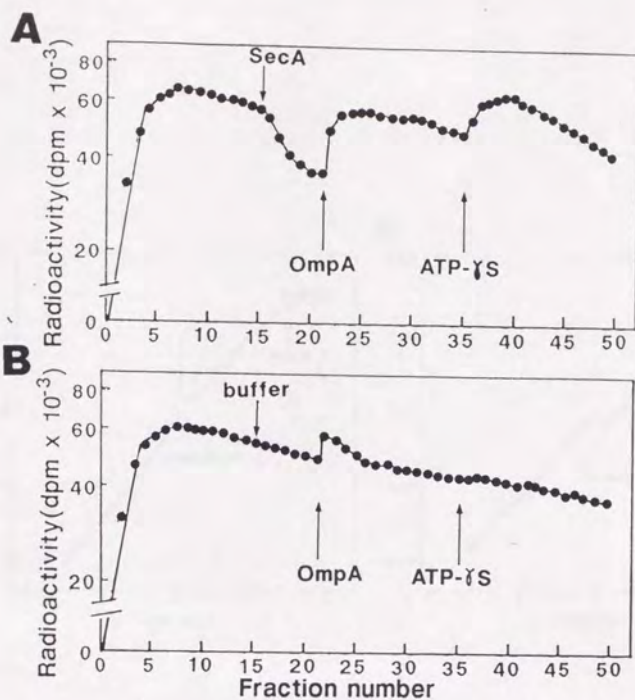


図15. SecA に結合した ATP- γ S の、SecA からの遊離(OmpA の影響)
 A, 上槽に、 $[^{35}\text{S}]\text{ATP-}\gamma\text{S}$ (65Ci/mmol)を、 $0.25\mu\text{M}$ になるように添加し、
 矢印で示したところで、SecA, OmpA, 及び非放射性 ATP- γ S を、それぞれ、
 $4\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, 2mM になるように添加した。B, Aにおいて SecA を添加し
 たところで、同量の 50mM リン酸カリウム(pH7.5)を添加した。尚、反応
 液中に混入してくる尿素の量は、終濃度で 0.4M である。

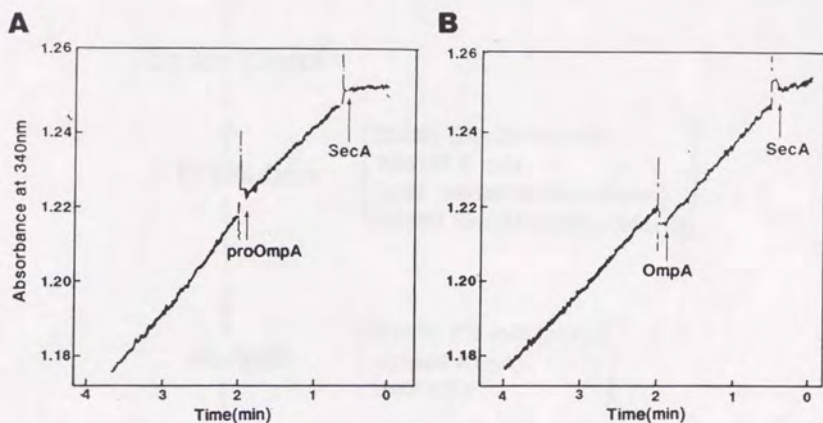


図16. SecA の ATPase 活性の測定

反応液に、5mg/ml の SecA を 7 μ l 添加した後、矢印で示したところで、30mg/ml の proOmpA を 20 μ l 添加した場合 (A) 及び 26mg/ml の OmpA を 20 μ l 添加した場合 (B) の 340nm における吸光度の減少を示した。尚、反応液中に混入してくる尿素有の量は、終濃度で 0.08M である。

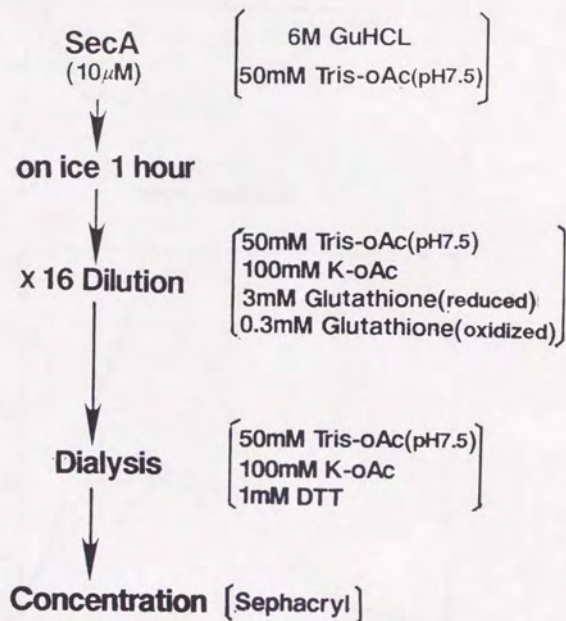


図17. SecA の変性・再生方法

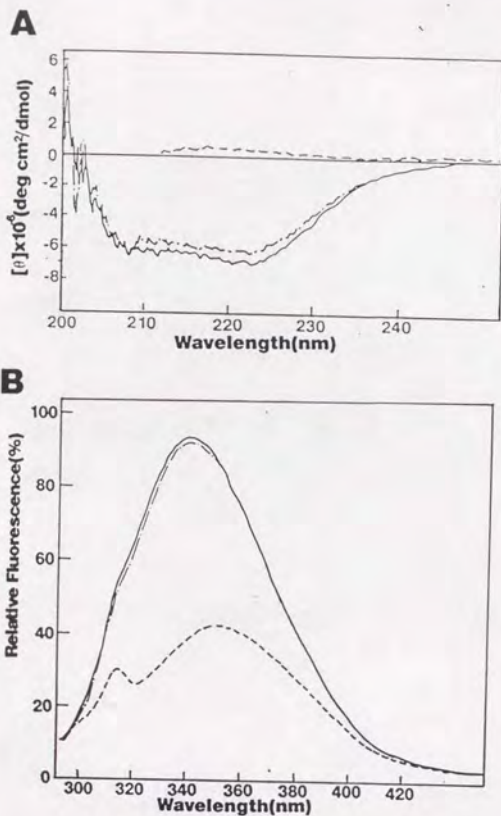


図18. CDスペクトル曲線と蛍光スペクトル曲線

A, ネイティブ SecA(——), 変性 SecA(-----), 及び再生 SecA(— · — · —), の CDスペクトル曲線. スペクトル曲線は、それぞれ、試料と緩衝液(ネイティブ SecA 及び再生 SecA の場合、50mM トリス-酢酸(pH7.5)/100mM 酢酸カリウム/1mM DTT; 変性 SecA の場合、6M グアニジン塩酸/50mM トリス-酢酸(pH7.5)) との差スペクトルである。どのスペクトルも、4回の測定を平均したものである。縦軸は、モル分子楕円率を示す。尚、200nm-210nm の波長は、グアニジン塩酸によって吸収されるので、変性 SecA の場合、この波長領域のスペクトルは測定できなかった。

B, ネイティブ SecA(——), 変性 SecA(-----), 及び再生 SecA(— · — · —), の蛍光スペクトル曲線。縦軸は、蛍光強度の相対値を示す。

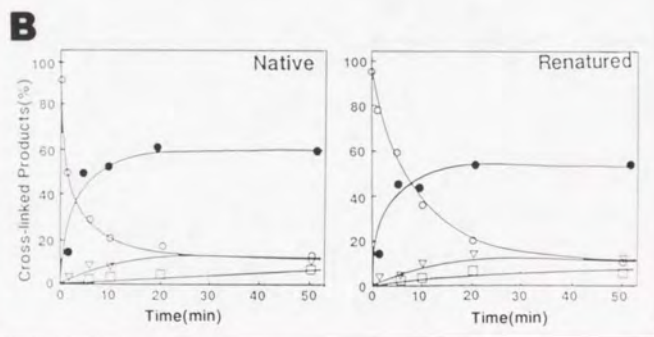
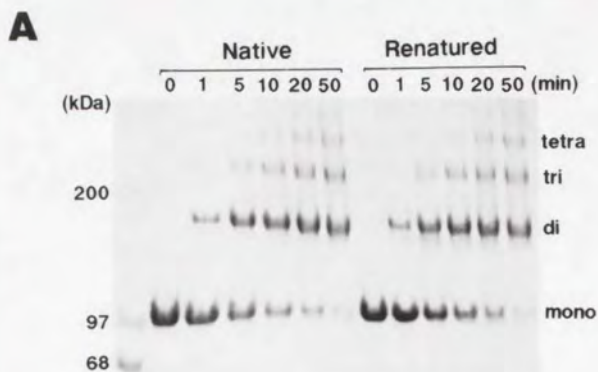


図19. ネイティブ SecA 及び再生 SecA の架橋実験

A, EDAC による架橋複合体の形成を経時的に調べた。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、クマシーブリリアントブルー(R250)による染色によって、架橋複合体を検出した。左端は、分子量マーカである。mono, di, tri, tetra はそれぞれ、単量体、二量体、三量体、四量体を示す。B, AのゲルをCS-930クロマトスキャナー(Shimadzu)を用いて定量した。○, ●, ▽, □ はそれぞれ、単量体、二量体、三量体、四量体を示す。

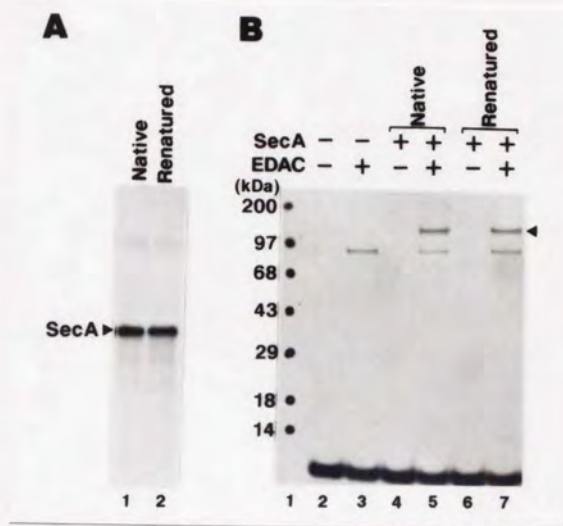


図20. A, ネイティブ SecA 及び再生 SecA の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ による光親和性標識 光親和性標識反応の後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、フルオログラムを行なった。B, ネイティブ SecA 及び再生 SecA と $[\text{}^{35}\text{S}]\text{uncleable OmpF-Lpp}$ との架橋実験 EDAC の存在下 (lanes 3, 5, 7) 及び非存在下 (lanes 2, 4, 6) での、 $[\text{}^{35}\text{S}]\text{uncleable OmpF-Lpp}$ とネイティブ SecA (lanes 4, 5) 及び再生 SecA (lanes 6, 7) との架橋反応。lane 1, 分子量マーカー; lane 2, 3, SecA 非存在下。架橋反応の後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、フルオログラムを行なった。◀ は、SecA と $[\text{}^{35}\text{S}]\text{uncleable OmpF-Lpp}$ との複合体の位置を示す。

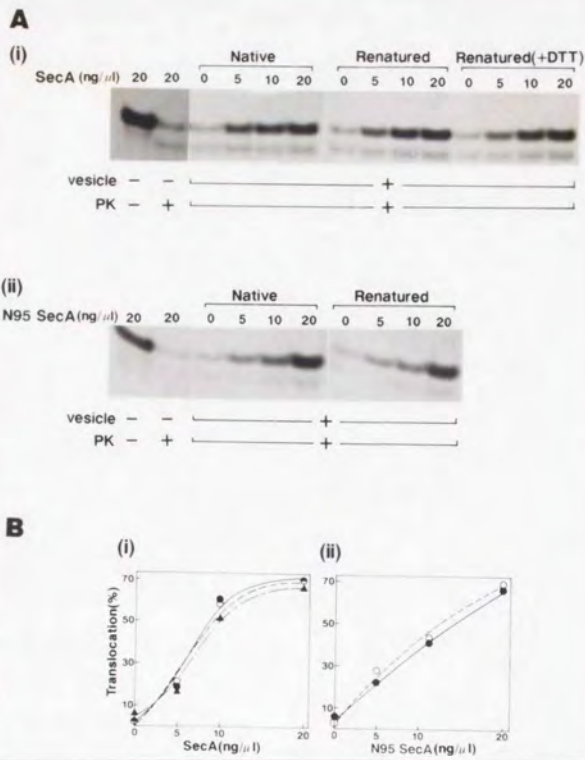


図21. *in vitro* の膜透過実験

A, 膜透過実験の後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、フルオログラムを行なった。B, Aの結果を、CS-930クロマトスキャナー(Shimadzu)を用いて定量した。(i), SecAを用いた場合 (ii), N95-SecAを用いた場合である。Native --○--, Renatured —●—, Renatured(+DTT) —▲—, はそれぞれ、ネイティブ SecAs, 再生 SecAs, 及び変性・再生操作を 1mM DTT の存在下で行なった場合を示す。

参考文献

1. Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975) *J. Cell. Biol.* 67, 835-851
2. Talmadge, K., Kanfman, J., and Gilbert, W.
(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3988-3992
3. Müller, M., Ibrahimi, I., Chan, C. N., Walter, P., and Blobel, G.
(1982) *J. Biol. Chem.* 257, 11860-11863
4. Yamada, H., Yamagata, H., Mizushima, S. (1984) *FEBS Lett.* 166, 179-182
5. Zwizinski, C., and Wickner, W. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 7973-7977
6. Inouye, M., and Halegoua, S. (1980) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 7, 339-371
7. Gennity, J., Goldstein, J., and Inouye, M. (1990) *J. Bioenerg. Biomembr.* 22, 233-269
8. Bankaitis, V. A., Rasmussen, B. A., and Bassford, P. J., Jr. (1984) *Cell* 37, 243-252
9. Hall, M., Schwartz, M., Silhavy, T. (1982) *J. Mol. Biol.* 156, 93-112
10. Oliver, D., and Beckwith, J. (1981) *Cell* 25, 765-772
11. Ito, K., Wittekind, W., Nomura, M., Shiba, K., Yura, Y., Miura, A., and Hashimoto, H.
(1983) *Cell* 32, 789-797
12. Riggs, P. D., Derman, A. I., and Beckwith, J. (1988) *Genetics* 118, 571-579
13. Gardel, C., Benson, P., Hunt, J., Michaelis, S., and Beckwith, J.
(1987) *J. Bacteriol.* 169, 1286-1290
14. Gardel, C., Johnson, K., Jacq, A., and Beckwith, J. (1990) *EMBO J.* 9, 3209-3216
15. Oliver, D. B., and Beckwith, J. (1982) *Cell* 30, 311-319
16. Kumamoto, C. A., and Nault, A. K. (1989) *Gene* 75, 167-175
17. Ito, K., and Akiyama, Y. (1987) *EMBO J.* 6, 3465-3470
18. Schatz, P. J., Riggs, P. D., Jacq, A., Fath, M. J., and Beckwith, J.
(1989) *Genes Dev.* 3, 1035-1044
19. Yamane, K., Ichihara, S., and Mizushima, S. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 2358-2362
20. Yamane, K., Matsuyama, S., and Mizushima, S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 5368-5372
21. Kawasaki, H., Matsuyama, S., Sasaki, S., Akita, M., and Mizushima, S.
(1989) *FEBS Lett.* 242, 431-434

22. Matsuyama, S., Akimaru, J., and Mizushima, S. (1990) *FEBS Lett.* 269, 96-100
23. Yamada, H., Matsuyama, S., Tokuda, H., and Mizushima, S.
(1989) *J. Biol. Chem.* 264, 18577-18581
24. Akita, M., Sasaki, S., Matsuyama, S., and Mizushima, S.
(1990) *J. Biol. Chem.* 265, 8164-8169
25. Matsuyama, K., Kimura, E., and Mizushima, S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 8760-8765
26. Lill, R., Cunningham, K., Brundage, L. A., Ito, K., Oliver, D., and Wickner, W.
(1989) *EMBO J.* 8, 961-966
27. Hartl, F. U., Lecker, S., Schiebel, J. P., and Wickner, W.
(1990) *Cell* 63, 269-279
28. Hasselbach, W., and Oetliker, H. (1983) *Annu. Rev. Physiol.* 45, 325-339
29. Geider, K., and Hoffman-Berling, H. (1981) *Annu. Rev. Biochem.* 50, 233-260
30. Maire, M., Lund, S., Viel, A., Champeil, P., and Moller, J. V.
(1990) *J. Biol. Chem.* 265, 1111-1123
31. Chao, K., and Lohman, T. M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 1067-1076
32. Mizushima, S., and Tokuda, H. (1990) *J. Bioenerg. Biomembr.* 22, 389-399
33. Shibui, T., Uchida, M., and Teranishi, Y. (1988) *Agric. Biol. Chem.* 52, 983-988
34. Crooke, E., Guthrie, B., Lecker, S., Lill, R., and Wickner, W.
(1988) *Cell* 54, 1033-1011
35. Ozawa, Y., Mizuno, T., and Mizushima, S. (1987) *J. Bacteriol.* 169, 1331-1334
36. Yamada, H., Tokuda, H., and Mizushima, S. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 1723-1728
37. Viitanen, P., Newman, M. J., Foster, D. L., Wilson, T. H., and Kaback, H. R.
(1986) *Methods. Enzymol.* 125, 429-452
38. Stollery, J. G., and Vail, W. J. (1977) *Biochim. Biophys. Acta.* 471, 372-390
39. Jacobson, G. R., Schaffer, M. H., Stark, G. R., and Vanaman, T. C.
(1973) *J. Biol. Chem.* 248, 6583-6591
40. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.
(1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
41. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685

42. Bartlett, G. R. (1959) *Anal. Chem.* 234, 466-468
43. Crooke, E., Brundage, L., Rice, M., and Wickner, W. (1988) *EMBO J.* 7, 1831-1835
44. Kimura, E., Akita, M., Matsuyama, S., and Mizushima, S. *J. Biol. Chem.* in press
45. Chen, L., and Tai, P. C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4384-4388
46. Matsuyama, S., and Mizushima, S. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 3583-3587
47. Schmidt, M. G., Rollo, E. E., Grodberg, J., and Oliver, D. B.
(1988) *J. Bacteriol.* 170, 3404-3414
48. 陸紅美 (1990) 名古屋大学大学院農学系研究科 修士論文
49. Mizushima, S., and Yamada, H. (1975) *Biochim. Biophys. Acta.* 375, 44-53
50. Papahadjopoulos, D., and Miller, N. (1967) *Biochim. Biophys. Acta.* 135, 624-638
51. Papahadjopoulos, D., and Watkins, J. C.
(1967) *Biochim. Biophys. Acta.* 135, 639-652
52. Greenfield, N., and Fasman, G. D. (1969) *Biochemistry* 8, 4108-4116
53. Helene, C., Brun, F., and Yaniv, M. (1971) *J. Mol. Biol.* 58, 349-365
54. Colowick, S. P., and Womack, F. C. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 774-777
55. Kawasaki, S., Tokuda, H., and Mizushima, S. unpublished observation
56. Lill, R., Dowhan, W., and Wickner, W. (1990) *Cell* 60, 271-280
57. Brickman, E. R., Oliver, D. B., Garwin, J. L., Kumamoto, C., and Beckwith, J.
(1984) *Mol. Gen. Genet.* 196, 24-27
58. Fandl, J. R., Cabelli, R., Oliver, D. and Tai, P. C.
(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8953-8957
59. Saxena, V. P., and Wetlaufer, D. B. (1970) *Biochemistry* 9, 5015-5023
60. Hussain, M., Ichihara, S., and Mizushima, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3707-3712
61. Teale, F. W. J. (1960) *Biochem. J.* 76, 381-388
62. Cowgill, R. W. (1967) *Biochim. Biophys. Acta.* 133, 6-18
63. Cowgill, R. W. (1970) *Biochim. Biophys. Acta.* 200, 18-25
64. Jaenicke, R. (1987) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 49, 117-237
65. Goldberger, R. F., Epstein, C. J., and Anfinsen, C. B.
(1964) *J. Biol. Chem.* 239, 1406-1410

66. Givol, D., Goldberger, R. F., and Anfinsen, C. B.
(1964) *J. Biol. Chem.* 239, 3114-3116
67. Steiner, R. F. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 4648-4651

論文目録

- 1、 「The conformation of SecA, as revealed by its protease sensitivity, is altered upon interaction with ATP, presecretory proteins, everted membrane vesicles, and phospholipids.」

Akeo Shinkai, Lu Hong Mei, Hajime Tokuda, and Shoji Mizushima

The Journal of Biological Chemistry

in press

- 2、 「Quantitative renaturation from a guanidine-denatured state of the SecA Dimer, a 200 kDa protein involved in protein secretion in *Escherichia coli*.」

Akeo Shinkai, Mituru Akita, Shin-ichi Matsuyama, and Shoji Mizushima

Biochemical and Biophysical Research Communications

Volume 172, Number 3, November 15, 1990, Pages 1217-1223

謝辞

本研究を行なうにあたり、終始、懇切なるご指導、ご鞭撻をいただきました、
東京大学応用微生物研究所 水島昭二 先生に感謝致します。

有益なご助言、ご助力をいただきました、東京大学応用微生物研究所
徳田 元 先生、松山伸一 先生に感謝致します。

CDスペクトル、蛍光スペクトルの測定の際にお世話になりました、東京大学理学部
横山茂之 先生、名古屋大学理学部 遠藤斗志也 先生に感謝致します。

本論文には記載していませんが、 Stopped flow 装置を用いた実験の際にお世話に
なりました、名古屋市立大学薬学部 中西 守 先生に感謝致します。

いろいろな面で、良い相談相手になって頂いた、東京大学応用微生物研究所第四研
究部の皆様に感謝致します。

学部、修士課程を通して三年間お世話になりました、名古屋大学農学部醸酵化学研
究室の皆様に感謝致します。

