

大腸菌蛋白質膜透過反応における SecA の機能

秋 田 充

大腸菌蛋白質膜透過反応におけるSecAの機能

The Function of SecA in Protein Translocation in *Escherichia coli*

農芸化学専攻
平成2年度博士課程進学
氏名 秋田 充
指導教官 水島昭二

Abbreviations

本論文では、以下の略号を用いた。

AMP	Adenosine 5'-monophosphate
AMP-PNP	Adenylyl-imidodiphosphate
ADP	Adenosine 5'-diphosphate
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
C.B.B.	Coomassie brilliant blue
CTP	Cytidine 5'-triphosphate
DMS	Dimethylsulberimidate
DTT	Dithiothreitol
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FPLC	Fast protein liquid chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
Lpp	Lipoprotein
MES	2-N-Morpholino ethanesulfonic acid
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TCA	Trichloroacetic acid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
tRNA	Transfer RNA
UTP	Uridine 5'-triphosphate

目次

第1章 序論	1
第2章 SecAと分泌型蛋白質との相互作用	
第一節 序	10
第二節 材料と方法	11
第三節 結果	
1. SecAと分泌型蛋白質との相互作用	21
2. SecAと分泌型蛋白質との相互作用におけるシグナル配列の役割	28
3. SecAと分泌型蛋白質との相互作用におけるシグナル配列N末端正荷電の重要性	28
4. 塩化カリウムのSecA—OmpF-Lpp形成に及ぼす影響	32
5. SecAとproOmpF-Lppとの相互作用とproOmpF-Lppの膜透過との関係	34
第四節 考察	36
第3章 SecAと分泌型蛋白質との相互作用を促進する因子	
第一節 序	42
第二節 材料と方法	43
第三節 結果	
1. SecAと分泌型蛋白質との相互作用に及ぼす大腸菌細胞質画分の効果	50
2. 相互作用を促進する因子の精製	50
3. p22のN末端アミノ酸配列決定	55
4. <i>fms</i> 遺伝子を過剰に発現した細胞による効果	55
5. p22の大量生産・精製	55
6. 精製p22を用いた架橋実験	60

7. p22の膜透過反応に及ぼす影響	61
第四節 考察	65
引用文献	70
謝辞	74

第1章 序論

ウイルスのようなごく単純なものは除いて、生物は全て細胞(Cell)からできている。Cellとは、元来「小部屋」という意味の言葉であったが、細胞も膜という外界を遮断する壁に囲まれた「小部屋」であることにかわりはない。

さて、細胞は原核細胞と真核細胞とに分けられる。原核細胞は、比較的単純な構造をしている。一方、真核細胞は、原核細胞よりも大きく複雑であり、DNAは膜で囲まれた核に収められ、細胞質には、膜で囲まれた数多くの細胞内小器官がある。

いずれの細胞においても、その生命の維持のために、実に多種多様な生命現象がみられる。そのような細胞の営みを支えているのが蛋白質であり、蛋白質は、様々な反応における触媒として、あるいは、細胞の構造を維持してゆく上での構成物として、更には、伝達、輸送の担体として、ありとあらゆる生命現象に関わっている。蛋白質の合成は、Crickによって提唱されたセントラルドグマ(1)によって規定されている。すなわち、DNA—(転写)—→RNA—(翻訳)—→蛋白質、という遺伝情報の流れの基本を提示したものである。しかし、このような流れは、蛋白質の一次構造のみを規定するものである。蛋白質が然るべき働きをするためには、然るべき場所において、然るべき構造をとって初めて可能となる。それ故、蛋白質が然るべき場所に間違いを犯すことなく到達すること、すな

わち蛋白質の局在化は、セントラルドグマの延長線上に位置する重要な問題であると思われる。

さて、蛋白質がある特定の部位に局在するための機構は、いまだ不明の点が多い。存在が予想されている局在化の暗号についても充分には解明されていない。蛋白質局在化の過程では、蛋白質が各種の切断、あるいは修飾をうけたり、膜を透過することが知られている。特に、膜透過に関しては、蛋白質のような巨大分子が、グルコースのような低分子の透過すらままならない「膜」という障壁をいかなる機構で乗り越えるのか、という観点からしても興味尽きない。また、応用面からいっても、ホルモン等の異種蛋白質の細菌や酵母を用いての分泌生産という点から、蛋白質の膜透過・分泌機構の解明は急務である、と考えられる。

蛋白質の膜透過の研究は、動物細胞において始まった。1950年代後半、Paladeらが分泌蛋白質がER膜を通過する現象を発見したことが端緒となった(2)。1972年、Milsteinらは、*in vitro*蛋白質合成系で免疫グロブリンL鎖がN末端に余分なペプチドをもつ前駆体として合成されることを示し、この余分なN末端のペプチドが、分泌される蛋白質とそうでない蛋白質との区別をつけるための「シグナル」であると推測した(3)。さらに、1975年、BlobelとDobbersteinは、Milsteinらの考えを発展させて、「シグナル仮説」を提唱した(4)。すなわち、N末端にシグナル配列とよばれるペプチドをもつ前駆体として合成された分泌型蛋白質は、シグナル配列に導かれて、ER膜に入り、膜透過する。シグナル配列は膜透過の過程で切断され、成熟型蛋白質がER内腔に放出される、というものである。

シグナル仮説は、分泌型蛋白質のER膜透過に関して提唱されたものであるが、その概要は原核生物をも含めた生物全般にわたって適用できると考えてよからう。

真核細胞系では、現在までに分泌型蛋白質を膜へ導く機構については、詳細な研究がなされている。その機構を要約すると、

- ①遊離リボソーム上で分泌型蛋白質の合成が開始される。
- ②ペプチド鎖の合成が進み、リボソームからシグナル配列が顔を出すと、シグナル認識粒子(SRP)と相互作用し、ポリペプチド伸長が止まる。
- ③リボソームはSRPを介してER膜上のドッキング蛋白質(DP)に結合する。
- ④SRPはリボソームから遊離し、リボソームが膜に結合した状態で翻訳が再開する。
- ⑤シグナル配列はシグナル配列レセプター(SSR)や膜透過装置と相互作用して、膜透過のための穴が形成される。
- ⑥新生ポリペプチドは、膜透過し、シグナル配列はシグナルペプチダーゼで切断される。
- ⑦蛋白質合成の終了とともに、リボソームは膜を離れる。

SRPは1種類のRNA(7SL RNA)と6種類の蛋白質より構成される複合体である(5、6)。現在までに、各構成成分の機能が詳細に研究されている(7-13)。SSRは必ずしも必要ではないという報告もある(14)。

真核細胞系では、膜透過そのものについての研究はあまり進展してい

ないのが現状である。

一方、原核細胞系では、蛋白質の膜透過の研究が、①透過する蛋白質の構造、②膜透過に関与する因子、の二つの側面から進められている。

まず、透過する蛋白質の構造の問題について、シグナル配列に焦点をあてて述べて行きたい。大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌においては、分泌型蛋白質の多くは、細胞質膜を透過した後、外膜やペリプラズムにとどまり、一部のもののみが細胞外に分泌される。多くの分泌型蛋白質シグナル配列の一次構造上には、コンセンサスな配列はみられないが、以下の特徴がみられる。

- ①N末端に塩基性アミノ酸に富む、正荷電領域が存在する。
- ②中央部領域に疎水性アミノ酸のクラスターがある。
- ③シグナル配列のC末端は、側鎖の小さいアミノ酸からなっており、シグナルペプチダーゼの切断部位となっている。

以上述べたシグナル配列構造上の類似性から、InouyeとHalegouaは、分泌型蛋白質の膜透過に関するシグナル配列の役割として「ループモデル」を提唱した(15)。すなわち、分泌型蛋白質は、シグナル配列のN末端正荷電領域で、負に帯電している細胞質膜の内側と相互作用し、続く疎水領域が、膜内部の疎水部分と相互作用し、膜内に取り込まれる、というモデルである。このモデルは、現在広く受け入れられている。

実験的にも、シグナル配列のN末端正荷電領域と疎水領域に関しては、膜透過に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。N末端の正荷電を負にするとシグナル配列としての機能が失われる(16)。筆者

らの研究室では、*in vitro*実験系を用いて、N末端の正荷電の数を0から4まで変化させると、アミノ酸の種類に関係なく正荷電数に応じて膜透過効率が上昇することを明らかにした(17)。「ループモデル」においては、正荷電は細胞質膜の内側と相互作用に重要な役割を果たしていることを仮定している。分泌型蛋白質の膜透過には、酸性リン脂質が必須であることが示されており(18、19)、シグナル配列の正の荷電とシグナル配列のN末端正荷電領域とリン脂質の負の荷電が静電的相互作用をしていることは大いに考えられる。一方、本研究においては、分泌因子の一つであるSecAが、正荷電に対して重要な役割を担っていることを実験的に明らかにしている(20)。SecAは、細胞質の内側に存在する膜表在性の蛋白質である(21)。以上のことから、シグナル配列N末端正荷電は、まずSecAによって認識された後、酸性リン脂質と相互作用して、膜透過系に入っていく可能性が大きい。

さて、疎水領域の役割に関してであるが、疎水領域に親水性アミノ酸残基を挿入してやると、シグナル配列としての機能が失われる(22)。この疎水領域を構成するアミノ酸は、種類、個数がまちまちである。疎水領域の構造を単純化することによって、疎水領域の役割を解明する試みがなされている(23-25)。膜透過効率は、疎水領域の長さではなく、全体の疎水性度に大きく依存していることが明らかとなった。さらに、最近、正荷電と疎水領域のはたらきの間には、相関関係があることがわかってきた(26)。すなわち、疎水性が弱いときは、正荷電に依存して膜透過効率は良くなり、疎水性が強いときには正荷電の依存性が弱くなる。

次に、膜透過に関与する因子の問題について述べて行きたい。大腸菌において、この問題は、主に遺伝学的手法を用いて解析がなされてきた。Table I-1に示すように分泌変異には、*sec*変異と*prf*変異が報告されている(27)。これらは、取得方法に相違がある。*sec*変異は、分泌型蛋白質であるマルトース結合蛋白質(MalE)、 λ レセプター(LamB)のシグナル配列を細胞質蛋白質である β -ガラクトシダーゼ(LacZ)のN末端に結合した融合蛋白質MalE-LacZ、あるいは、LamB-LacZの分泌が欠損した変異として分離された。*prf*変異はLamBやMalEのシグナル配列中の疎水性領域の変異を抑制する、すなわち分泌能を失なった蛋白質の膜透過を回復するような変異として分離された。双方の変異は、独立に分離されてきたが、*sec*変異によって同定された*sec*遺伝子群のA、E、Yはそれぞれ、*prf*変異によって同定された*prf*遺伝子群のD、G、Aと同一であることは、これらの遺伝子が特に重要であることを示唆している。

*secA*遺伝子産物であるSecAは、901アミノ酸残基からなる分子量102k(28)のサブユニットから構成されるホモダイマーである(29、30)。前述したように、SecAは細胞質の内側に存在する膜表在性の蛋白質である(21)。SecAは分泌型蛋白質の*in vitro*膜透過反応を促進する(31、32)。N末端領域にはATP結合部位があり(33)、SecAはATPase活性を有す(34、35)。この活性が蛋白質の膜透過で重要な役割を果たしていることも示されている。SecAの機能とプロトン駆動力要求性との関連性も報告されている(36)。SecAと他のSec因子(37、38)や酸性リン脂質(39)との相互作用についても報告されている。

SecD、SecE、SecF、SecYは膜内在性の蛋白質である。SecEとSecYは、再構成系を用いた実験により、膜透過に必須であることが示されたことから(40、41)、膜透過装置を構成していると考えられる。SecEは三ヶ所の膜貫通部位をもち(42)、3個のうちのC末端の1個のみでも機能し得る(43、44)。SecYは10ヶ所の膜貫通部位をもっている(45)。SecEはSecYの安定化に寄与していることから、SecEとSecYとの間には、強い相互作用が考えられる(46)。しかしその役割については未解明である。SecD、SecFは、ペリプラズム側に大きなドメインを有することが推定されている(47)。SecDは、膜を透過した蛋白質の膜からペリプラズム領域への放出に関わっていることが示されている(48)。SecFはSecDの安定化に寄与しているらしい(Sagaraら、未発表データ)。

以上、膜透過装置を形成していると考えられている因子について述べた。細胞質には、膜透過そのものには関与しないものの分泌型蛋白質を膜透過し得る構造に保っておくシャペロンとしてはたらいている因子が存在する。

SecBは、分子量16kのサブユニット4個からなるテトラマーであるが、大腸菌外膜蛋白質OmpAやMalEの前駆体に対するシャペロンとして機能している(49)。熱ショック蛋白質であるGroEL(50)、DnaK(51)もシャペロンとしてはたらいている。他の生物に存在する、これらと相同性のある蛋白質(Rubisco結合蛋白質、Hsp70ファミリー)も、同じ機能を有している。

最近、その構造の類似性から、大腸菌にもSRP様分子が存在するので

は、という議論がなされている。SRPの構成成分である54kDa蛋白質、7SL RNAと構造的に類似しているFfh蛋白質、4.5S RNAがみつかった(52-54)。Ffh(55)と4.5S RNA(56)は、大腸菌の生育に必須である。両者は複合体を形成し(57、58)、この複合体は前駆体蛋白質と相互作用することが示されている(59)。*fth*遺伝子の発現を調節することのできる変異株を用いた*in vivo*実験では、*fth*遺伝子の発現を抑制することによって、前駆体蛋白質の蓄積が観察された(55)。

大腸菌にSRP様分子が存在するのは逆に、真核細胞においては、ER膜にSecY様蛋白質がみついている(60)。グラム陽性細菌である枯草菌においてもSecA、SecE、SecYと相同性のある蛋白質がみついている(61)。原核細胞、真核細胞を問わず、構造的に類似した因子がそれぞれの細胞に存在していたことは、非常に興味深い。

以上、蛋白質の膜透過・分泌に関する研究のこれまでの流れを俯瞰してきた。前述したように、SecAは大腸菌の膜透過に重要な役割を果たしている。本研究では、SecAがシグナル配列N末端領域の正荷電を認識することによって分泌型蛋白質と相互作用することを明らかにした。さらに、SecAと分泌型蛋白質との相互作用を顕著に促進する因子を細胞質画分に見いだした。これらのことは、蛋白質の膜透過反応の初期段階、すなわち、分泌型蛋白質の合成が完了した時点から膜透過を開始するまでのあいだの反応機構に関する研究の一里塚を築きつつある、といっても過言ではなからう。

第2章 SecAと分泌型蛋白質との相互作用

第一節 序

SecAは、分泌型蛋白質の膜透過の過程ではたらく多くの因子と相互作用することが明らかとなっており、この過程において中心的な役割を果たしていることが考えられる。本研究は、このようなSecA研究の一連の流れの中で行なわれたものである。本章において、SecAと分泌型蛋白質とが直接相互作用することを化学架橋法によって明らかにした。さらに、この相互作用は、分泌型蛋白質前駆体のシグナル配列N末端領域の正荷電によって認識されることを明らかにした。

第二節 材料と方法

1. 試薬

架橋反応試薬である、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDAC)はSigma社より入手した。Tran³⁵S-label(70%の[³⁵S]メチオニン(37TBq/mmol)と20%の[³⁵S]システインの混合物)はICN社より入手した。ATP等の高エネルギーリン酸化合物、Pyruvate kinase(ウサギ筋肉)、Creatine kinase(ウサギ筋肉)、tRNA混合物(大腸菌)は、Boehringer-Mannheim社から入手した。SP6 RNAポリメラーゼ、制限酵素、T4 DNA ligaseは、宝酒造(株)から入手した。[³⁵S]標識SecAは名古屋大学山田寿美博士より、Taka-amylase Aは三共(株)新井守博士より贈与された。

2. 菌株

本研究では、以下の大腸菌株を用いた。細胞質画分(S100)、及び反転膜小胞の調製には、K003(62)(Lpp⁻ Δ*uncB-C-Tn10*)を、遺伝子操作にはJM83(63)を、SecA大量精製にはRR1/pMAN400(32)を用いた。

3. プラスミド

本研究では、以下のプラスミドを用いた。切断可能なシグナル配列を有するproOmpF-Lpp融合蛋白質(以下、cleavable proOmpF-Lppと称す)をコードする遺伝子をもつpK125(64)、切断不能なシグナル配列を有する

proOmpF-Lpp融合蛋白質(以下、uncleavable proOmpF-Lppと称す)をコードする遺伝子をもつpK127(20)、及び、そのシグナル配列に変異をもつpSS500、pSS502、pSS503、pSS504、pSS602、pSS604(17)、pKRN112、pKRN121、pKRN130(構築は以下に述べる)(Fig. II-1参照)、主要リボ蛋白質をコードする遺伝子をもつpSA011(構築は以下に述べる)(Fig. II-2)。これらの蛋白質は全てSP6プロモーターの支配下にある。高発現プロモーターである*tac*プロモーターの支配下にある*secA*遺伝子をもつpMAN400(32)も用いた。

4. プラスミドの構築

プラスミドpKRN112、pKRN121、pKRN130は、シグナル配列N末端に異なった数のアルギニン残基を導入したuncleavable proOmpF-Lppをコードする遺伝子をもつ。これらは、pK127から構築した(Fig. II-1)。まず、pK127を*EcoRI*と*SspI*で切断し、次の合成オリゴヌクレオチドリンカーを用いて連結した：

d(5'AATTCTAGGAGGTTTAAATTTATGATGAAACGTAACAAC3')と

d(3'GATCCTCCAAATTTAAATACTACTTTGCATTGTTG5)、

d(5'AATTCTAGGAGGTTTAAATTTATGATGAAACGTCGTAAC3')と

d(3'GATCCTCCAAATTTAAATACTACTTTGCAGCATTG5)、

d(5'AATTCTAGGAGGTTTAAATTTATGATGAAACGTCGTCGT3')と

d(3'GATCCTCCAAATTTAAATACTACTTTGCAGCAGCA5)。

これらは、それぞれpKRN112、pKRN121、pKRN130を構築するのに用い

た。

pSS500、pSS502、pSS503、pSS504、pSS602、pSS604もシグナル配列N末端領域の正荷電の数を変えたproOmpF-Lppをコードする遺伝子をもつプラスミドであり、これらのプラスミドの構築はすでに報告されている(17)。

プラスミドpSA011は、*lpp*遺伝子をもつpKEN125(65)のXbaI-EcoRI断片とSP6プロモーターをもつpSP64(Promega社より入手)のXbaI-EcoRI断片を連結することによって構築した(Fig. II-2)。

ここで構築された全ての*ompF-lpp*遺伝子の塩基配列は、Sangerらの方法(66)によって確かめられた。

5. 細胞質画分(S-100)の調製

*in vitro*における蛋白質合成に用いる、膜を含まない細胞質画分(S-100)は、大腸菌K003株より以下のように調製した。

K003株を次の培地で37℃にて培養し、 $A_{660}=1$ で集菌した。

培地(1リットル当り)：K₂HPO₄ 26g、KH₂PO₄ 5g、

Yeast Extract(Difco社) 9g

以下、操作は4℃にて行なった。

菌体を50mM Tris-Acetate(pH7.8)、10%(w/v) Sucrose溶液で洗浄した後、菌体湿重量1g当り1mlの溶液A(10mM Tris-Acetate(pH7.8)、14mM (CH₃COO)₂Mg、60mM CH₃COOK、0.1mM Dithiothreitol(DTT))を加えて懸濁し、-80℃にて凍結融解した。DNaseを50μg/mlになるように加えた

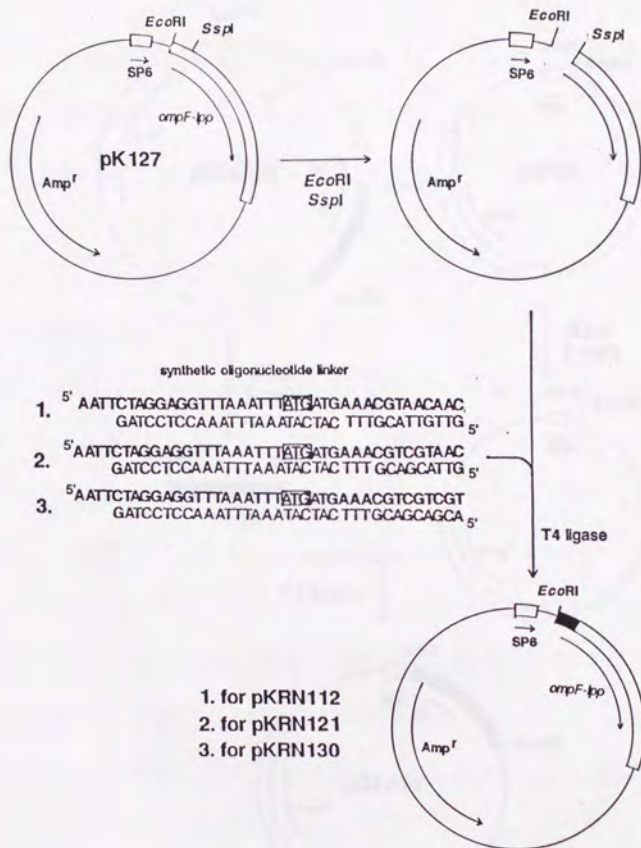


Fig. II-1 プラスミドpKRN112、pKRN121、pKRN130の構築
pK127のEcoRI-SspI断片に、1、2、3で示される合成オリゴヌク
レオチドリンカーを連結した。合成オリゴヌクレオチドリンカー
1、2、3は、それぞれpKRN112、pKRN121、pKRN130を構築
するのに用いられた。

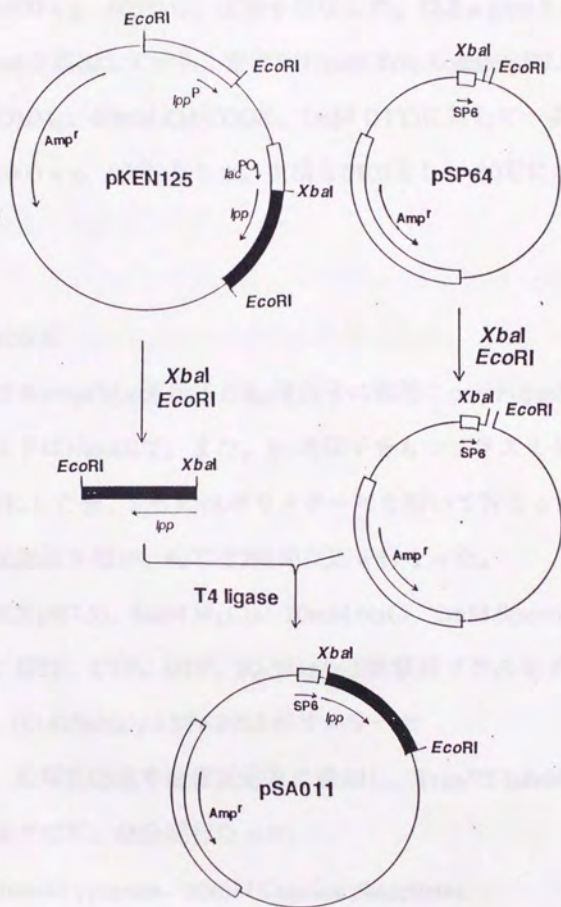


Fig. II-2 SP6プロモーター下流に*lpp*遺伝子を連結したプラスミドpSA011の構築

後、セルミル(Vibrogen Zellmuhle Vi4)で菌体を破碎した(30秒間隔、8回； $\phi=0.1\text{mm}$ ガラスビーズ)。遠心(8,500 x g、10分)によって菌体を除いた後、超遠心(80,000 x g、60分)し、上清を回収した。12.5 $\mu\text{g/ml}$ となるよう Pyruvate kinase を添加してから、溶液B(10mM Tris-Acetate(pH7.8)、14mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 、60mM CH_3COOK 、1mM DTT)に対して一晩透析、再度超遠心(80,000 x g、60分)をした。上清をS100とし、 -80°C にて保存した。

6. 転写、翻訳反応

*in vitro*における *ompF-lpp* 遺伝子と *lpp* 遺伝子の転写：*ompF-lpp* 遺伝子をもつプラスミドは *Hind*III で、また、*lpp* 遺伝子をもつプラスミドは *Eco*RI で直鎖状にした後、SP6 RNAポリメラーゼを用いて行なった(67)。以下の組成の反応液を用い、 40°C で2時間反応を行なった。

40mM Tris-HCl(pH7.5)、6mM MgCl_2 、10mM NaCl、2mM Spermidine、0.5mM ATP、GTP、CTP、UTP、20-50ng/ μl 直鎖状プラスミドDNA、10mM DTT、0.1-0.5unit/ μl SP6 RNAポリメラーゼ

翻訳反応は、転写反応液を直接反応液に添加し、Tran³⁵S-labelの存在下、以下の組成で 37°C 、45分間行なった。

21mM Phosphoenol pyruvate、30mM Creatine phosphate、0.027mg/ml FAD、0.027mg/ml NADP^+ 、0.027mg/ml Folinic acid、0.1mg/ml tRNA混合物、2.2mM ATP、0.56mM CTP、0.56mM GTP、0.56mM UTP、1.4mM DTT、0.35mM 19アミノ酸(除くメチオニン)、

58mM CH₃COOK、7.4mM (CH₃COO)₂Ca、55.2mM Tris-Acetate(pH8.0)、
33mM CH₃COONH₄、10.2mM (CH₃COO)₂Mg、0.8mM Spermidine、
16MBq/ml Tran³⁵S-label、20%(v/v) S100、5%(v/v) 転写反応液
また、Traubらの方法(68)で調製したリボソームを適量添加した。反応停
止は0.4%メチオニン添加によって行なった。

7. 翻訳反応液のゲル濾過

翻訳反応液中の低分子を以下の操作により除去した。翻訳反応液(350
μl)をSephadex G-75 Superfine(Pharmacia社)樹脂を充填したカラム(0.75 x
6 cm)に載せ、50mM Potassium phosphate(pH7.5)溶液によって溶出した。

8. SecAの精製

SecAは、SecA過剰生産菌(RR1/pMAN400)(32)から精製した。

RR1/pMAN400株をL-培地にて37℃で培養、A₆₆₀=0.8で1mM IPTG
(Isopropyl-β-D-thiogalactoside)を添加、A₆₆₀=1.6で集菌した。French
pressure cell(Aminco #4-3398A)で菌体を破碎(8,000 psi、3回)し、超遠心
(150,000 x g、2.5時間)後得た上清を10mM Tris-Acetate(pH7.8)、60mM
CH₃COOK、14mM (CH₃COO)₂Mg、1mM DTTに対して透析した。硫酸沈
澱により、SecAに富む画分(40%上清-50%沈澱画分)を10mM Sodium
phosphate(pH7.2)に対して透析し、同緩衝液で平衡化したハイドロキシル
アパタイト(Bio-Rad社)カラム(2.5 x 20 cm)に載せた。カラムを同緩衝液
で洗った後、300mlの10-250mM Sodium phosphate(pH7.2)の直線型濃度勾

配によって溶出した。SecA含量の最大の画分(SecA含量85%以上)(第3章 Fig III-2、lane 5)をCentricon 10(Amicon社)で濃縮後、実験に供した。

9. リーダーペプチダーゼの調製

粗精製のリーダーペプチダーゼは、リーダーペプチダーゼ過剰生産菌(JM103/pJT03)(Ichiharaら、未発表データ)より得た。プラスミド pJT03は、リーダーペプチダーゼ遺伝子(*lep*)を*lac*プロモーターの下流に連結している。1mM IPTGによる誘導でリーダーペプチダーゼを過剰生産させた細胞を集めた後、超音波破碎した。超遠心(100,000 x g、30分)によって得た沈澱を1% Triton X-100にて可溶化し、リーダーペプチダーゼとして供した。

10. SecAと分泌型蛋白質との架橋反応

SecA(25pmole)、ゲル濾過した翻訳反応液($[^{35}\text{S}]$ 標識分泌型蛋白質を含む) (1.5×10^5 dpm)、50mM Potassium phosphate(pH7.5)を混合して全体積が $12\mu\text{l}$ となるようにした。10分間保温した後、 $3\mu\text{l}$ の12.5mM EDAC(最終濃度2.5mM)添加により架橋反応を開始し、50分間保温した。反応の停止は、50mM Tris-HCl(pH7.5)を添加し、10分間保温することによって行なった。尚、反応は全て 25°C にて行なった。架橋複合体は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)(62)の後、フルオログラフィーにより検出した。フルオログラフィーは、処方に従って、ゲルをENLIGHTNING(NEN社)で処理することによって行なった。フルオログ

ラム上の個々のバンドの強度は、デンスリトメーター(Shimadzu CS-930)を用いて定量した。

1.1. 反転膜小胞の調製

反転膜小胞は、大腸菌K003株より以下のように調製した。

K003株を次の培地で37℃にて培養し、 $A_{660}=1.7$ で集菌した。

培地(1リットル当り)： K_2HPO_4 14.45g、 KH_2PO_4 2.8g、Yeast Extract 5g、
Bacto Tryptone 5g、Glucose 5g

以下、操作は4℃にて行なった。菌体を水で洗浄し、17.7mlの氷水に懸濁した後、10mlの0.1M Tris-Acetate(pH7.8)、9mlの2M Sucrose、1.7mlの1% EDTA(pH7.0)、1.7mlの5mg/ml Lysozymeを順にゆっくりと加え、30分間氷冷した後、DNaseを50 μ g/mlになるように加え、French pressure cellを用いて菌体を破碎した(4,000 psi、1回)。テフロン製ホモゲナイザーでホモゲナイズした後、未破碎の菌体を遠心(8,500 x g、10分)によって除去した。超遠心(150,000 x g、2時間)によって膜画分を回収した。膜画分より、50mM Tris-Acetate(pH7.8)、250mM Sucrose、1mM EDTA(pH7.0)、1mM DTTを用いた30-48%(w/w) ショ糖密度勾配遠心(60,000 x g、15時間)によって細胞質膜画分を回収した。50mM Tris-Acetate(pH7.8)、250mM Sucrose、10% Glycerol、1mM DTTで約5倍に希釈し、超遠心(50,000 x g、2時間)によって、再度細胞質膜画分を回収した。これを反転膜小胞として、-80℃にて保存した。

12. 膜透過反応

膜透過反応は、反転膜小胞とゲル濾過したproOmpF-Lppを用いて以下のように行なった。 ^{35}S 標識proOmpF-Lppを含む溶液に、Succinate、ATPをそれぞれ1mM、5mM添加し、反転膜小胞を0.25 mg/mlとなるように加え、37°Cにて反応させた。膜透過反応は、反応液を0°Cにさらすことによって停止し、Proteinase Kによるプロテアーゼ耐性を指標に膜透過効率を定量した。膜透過産物の検出には、SDS-PAGE、フルオログラフィーを行ない、定量は、デンストメーターによって行なった。膜透過効率は、Proteinase K処理前と処理後のフルオログラム上のバンドの強度の比より求めた。

第3節 結果

1. SecAと分泌型蛋白質との相互作用

SecAが分泌型蛋白質の*in vitro*膜透過反応を促進すること(31、32)、*prl*変異がシグナル配列の変異をサプレッスすることから、SecAと分泌型蛋白質前駆体とが直接相互作用をすることが考えられた。そこで、その相互作用を化学架橋法を用いて解析した。

分泌型蛋白質のモデル蛋白質としては、主に、大腸菌外膜蛋白質OmpF前駆体と主要リポ蛋白質(Lpp)の融合蛋白質(proOmpF-Lpp)でシグナル配列の切れないもの(uncleavable proOmpF-Lpp)(69)を用いた(Fig. II-3、2)。uncleavable OmpF-Lppは、*in vitro*で非常によく膜を透過する。

架橋試薬は、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDAC)を用いた(Fig. II-4 A)。EDACは、カルボキシル基と第一アミノ基の架橋反応にあずかる(Fig. II-4 B)。*in vitro*で合成した $[^{35}\text{S}]$ 標識uncleavable proOmpF-Lppと精製SecAを混合後、EDACを加えて架橋反応を行なったところ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)上で、分子量約110kDa、77kDaに相当する位置にバンドが検出された(Fig. II-5 A)。尚、用いたuncleavable proOmpF-Lpp標品は、ゲル濾過によってATP等の低分子が除かれているが、翻訳反応液中の細胞質画分S-100は含まれている。110kDaを示す上のバンドは、抗SecA抗血清で免疫沈降したことから(Fig. II-5 A lane 5)、SecA(分子量約102k)とuncleavable proOmpF-Lpp(分子量約8.8k)の架橋によって生じたものであると結論した。以下、SecAと

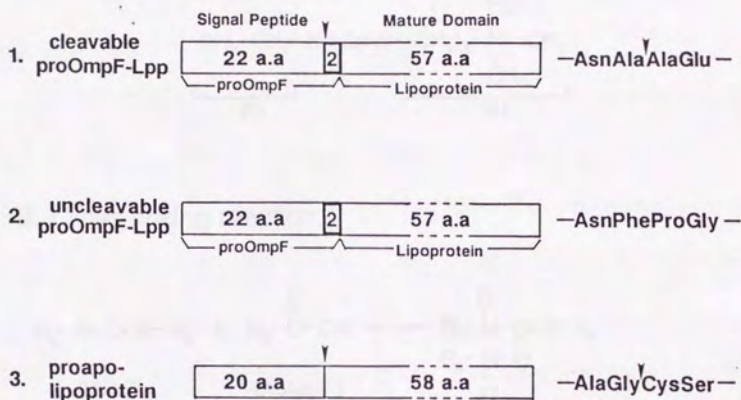
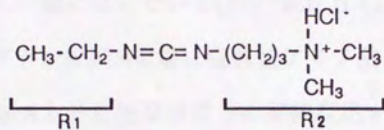


Fig. II-3 本研究に用いられたモデル蛋白質

1. cleavable proOmpF-Lpp: 切断可能なシグナル配列をもつ proOmpF と主要リポ蛋白質(Lpp)の融合蛋白質(proOmpF-Lpp)。
 2. uncleavable OmpF-Lpp: 切断不能なシグナル配列をもつ proOmpF-Lpp。
 3. proapoLpp: 主要リポ蛋白質前駆体。
- シグナル切断部位(▼)、及びその領域のアミノ酸配列を右に示す。

A. 1-Ethyl-3-(3-DimethylAminopropyl)Carbodiimide (EDAC)



B. Cross-linking reaction

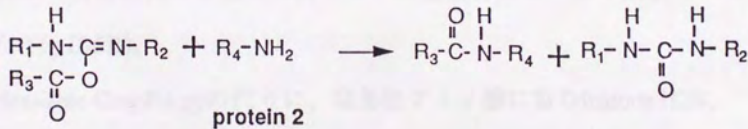
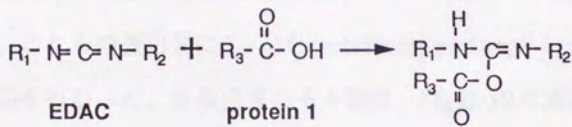


Fig. II-4 EDACの分子式(A)と架橋反応(B)

proOmpF-Lppの架橋によって生じた反応生成物をSecA—proOmpF-Lppと記す。下のバンドは、抗SecA抗血清では免疫沈降しなかった。これは、細胞質画分存在下で、proOmpF-Lppをジメチルスベリミデート(DMS)で処理したときに生じた77kDaのバンド(64)と同一のものであると考えられた。

SecAは、酸性アミノ酸に富んでいる(28)(Table II-1)。uncleavable proOmpF-Lppはシグナル配列N末端に塩基性アミノ酸に富む領域を含んでいる。そこで、SecAと分泌型蛋白質との架橋反応が非特異的な静電的なものによることが否定できなかったので、以下の実験を行なった。

酸性アミノ酸に富む蛋白質として、ウシ血清アルブミン(BSA)、Taka-amylase A、ovalbumin(Table II-1)を対照として選んだ。SecAの場合と同じく、これらの蛋白質(2.5 μ g)をuncleavable proOmpF-Lppと混合し、架橋反応を行なった。各蛋白質のモル数は、Fig.II-5Bの脚注に記してある。SecA以外の各蛋白質と分泌型蛋白質との架橋複合体は、全く観察されなかった(Fig.II-5B)。

uncleavable OmpF-Lppの代わりに、塩基性アミノ酸に富むhistone H2B、lysozyme(Table II-1)をSecAと混合し、架橋反応を行なった。データは示さないが、これらとSecAとの架橋複合体は観察されなかった。

架橋複合体の形成は、他の分泌型蛋白質前駆体、切断可能なシグナル配列をもつproOmpF-Lpp(62)(cleavable proOmpF-Lpp)(Fig. II-3、1)、主要リポ蛋白質前駆体(proapoLpp)(Fig. II-3、1)においても観察された(Fig. II-6 A、lane 2、Fig. II-6B、lane 2)。

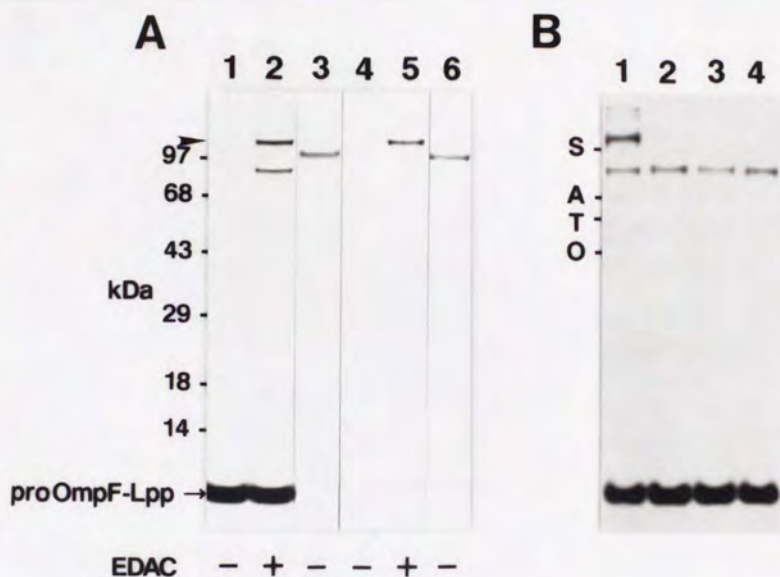


Fig. II-5 uncleavable proOmpF-LppとSecA(A)、対照蛋白質(B)との架橋反応

A、EDAC存在下(lane 2)、非存在下(lane 1)でのSecAと ^{35}S 標識 uncleavable proOmpF-Lppとの架橋反応。架橋反応生成物は、SDS-PAGE、フルオログラフィーによって検出した。lane 3には、マーカーとして ^{35}S 標識SecAを載せた。lanes 4-6はそれぞれ、lanes 1-3を抗SecA抗血清によって免疫沈降を行なったものである。矢印(►)は、SecA—uncleavable proOmpF-Lpp複合体を示す。lane 1の左側に分子量を記した。

B、用いた蛋白質とそのモル数を以下に示す。SecA(2.5 μg 、25pmole; lane 1)、ウシ血清albumin(2.5 μg 、37pmole; lane 2)、Taka-amylase A(2.5 μg 、49pmole; lane 3)、ovalbumin(2.5 μg 、58pmole; lane 4)。SecA(S)、ウシ血清albumin(A)、Taka-amylase A(T)、ovalbumin(O)の位置をlane 1の左側に記した。

Table II-1 本研究に用いた蛋白質のアミノ酸組成と等電点(pI値)

Protein	Total amino acid residues	Asp (amino acid residues / content (%))	Glu (amino acid residues / content (%))	Arg (amino acid residues / content (%))	Lys (amino acid residues / content (%))	pI value
SecA	901	53 / 5.9	92 / 10.2	65 / 7.2	51 / 5.7	4.0-4.5
BSA	606	39 / 6.4	57 / 9.4	25 / 4.1	60 / 9.9	4.7-4.9
Taka-amylase A	478	44 / 9.2	10 / 2.1	10 / 2.1	20 / 4.2	4.0
ovalbumin	386	14 / 3.6	33 / 8.5	14 / 3.6	20 / 5.2	4.6
uncleavable proOmpF-Lpp	81	8 / 9.9	0 / 0	5 / 6.2	6 / 7.4	9.2
Histone H2B	125	3 / 2.4	7 / 5.6	8 / 6.4	20 / 16.0	11.0
Lysozyme	129	8 / 6.2	2 / 1.6	11 / 8.5	6 / 4.7	11.0-11.4

a) 等電点(pI値)は、SecAは実験値、uncleavable proOmpF-Lppは計算値、その他の蛋白質は文献 70) によった。

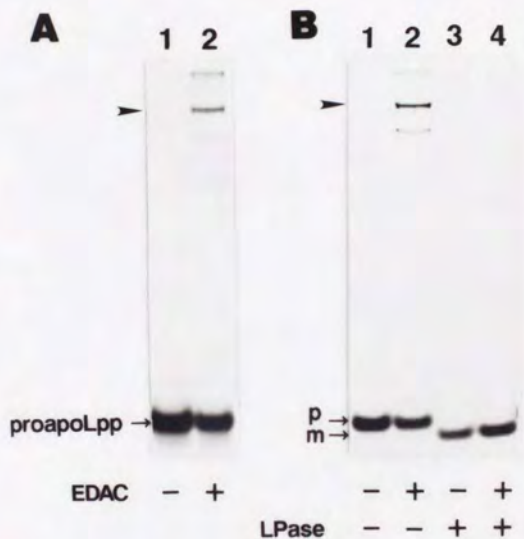


Fig. II-6 SecAと主要リポ蛋白質前駆体(proapoLpp)、cleavable OmpF-Lpp(B)との架橋反応、及び架橋反応に及ぼすシグナル配列の影響

A、EDAC存在下(lane 2)、非存在下(lane 1)におけるSecAと ^{35}S 標識proapoLppとの架橋反応。

B、EDAC存在下(lanes 2 and 4)、非存在下(lanes 1 and 3)におけるSecAと ^{35}S 標識cleavable proOmpF-Lppとの架橋反応。lane 3と4では、cleavable proOmpF-Lppをリーダーペプチダーゼ(LPase)処理してから、架橋反応を行なった。SecA—前駆体蛋白質架橋複合体の位置を矢印(▶)で示してある。cleavable OmpF-Lppの前駆体、成熟体をそれぞれ、p、mで記した。

これらの結果は、SecAと分泌型蛋白質との相互作用が特異的に起こっていること示している。

2. SecAと分泌型蛋白質との相互作用におけるシグナル配列の役割

SecAと分泌型蛋白質との相互作用がシグナル配列に依存するか否かを検討した。

[^{35}S]標識 cleavable proOmpF-Lppを粗精製リーダーペプチダーゼで処理することによって、成熟型OmpF-Lppを得た(Fig. II-6B、lane 3)。この成熟型OmpF-Lppを用いてSecAとの架橋反応を試みた。

成熟型OmpF-Lppは、5個のリジン残基と8個のアスパラギン酸残基を有しているが、SecAと架橋したバンドは検出されなかった(Fig. II-6B、lane 4)。このことから、SecAと分泌型蛋白質との相互作用はシグナル配列に依存することが明らかとなった。

3. SecAと分泌型蛋白質との相互作用におけるシグナル配列N末端正荷電の重要性

分泌型蛋白質の膜透過においてシグナル配列N末端領域の重要性が、*in vivo*(16、71、72)、あるいは*in vitro*(17)で示唆されている。SecAと分泌型蛋白質との相互作用におけるシグナル配列N末端正荷電の重要性を架橋反応を用いて検討した。

野生型uncleavable proOmpF-Lppをもとにして、佐々木とともに正荷電の数をリジン残基、あるいはアルギニン残基を導入することによって変

えた変異型uncleavable OmpF-Lppを種々作成した(Fig. II-7)。

N末端正荷電領域([Lys][Arg][Asn])を取り去って、[Asn]₄に変えた変異型proOmpF-Lppにおいては、SecAとの相互作用は観察されなかった(Fig. II-8A, lanes 1 and 2)。このことから、シグナル配列のN末端正荷電がSecAとの相互作用に重要であることが示唆された。N末端正荷電領域をいろいろな数のリジン残基で置き換えたLys series([Lys]_n[Asn]_{4-n})においては、正荷電を0から4まで順次増加させると、それにともなってSecA—proOmpF-Lppの形成率が増加した(Fig. II-8A, lanes 2-5, Table II-2)。

EDACの反応基が第一アミノ基をもつリジン残基であるため、ここで観察されたSecA—proOmpF-Lpp形成の増加が両分子間の相互作用の増大を意味するのではなく、リジン残基の数の増加による反応性の増加を意味する可能性が考えられた。そこで、リジン残基1個は残し、EDACと反応しないアルギニン残基の数を変えたLys-Arg series([Lys][Arg]_{n-1}[Asn]_{4-n})を作成し、同様の実験を行なった。

荷電を+2から+3、あるいは+4に変えると、SecA—proOmpF-Lppの形成率は増加した(Fig. II-8B, Table II-2)。しかし、荷電が+3である[Lys][Arg]₂[Asn]変異の方が、+4である[Lys][Arg]₃変異に比べ、SecA—proOmpF-Lppの形成率は大きかった。この理由については不明である。

最後に、シグナル配列の内部に全くリジン残基を含まない、すなわち、正荷電の数をアルギニンの数のみで変えた変異型proOmpF-Lpp(Arg series; [Arg]_n[Asn]_{4-n})においても正荷電の増加とともにSecA—proOmpF-Lppの形成率は増加した(Fig. II-8 C, Table II-2)。

Plasmid	Net Charge at Amino-Terminus	Signal Sequence
Wild-type		
pK127	+2	MMKRN ILAVIVPALLVAGTANF
Mutant		
pSS500	0	NNNN
pSS502	+2	KKNN
pSS503	+3	KKKN
pSS504	+4	KKKK
pKRN112	+2	KRNN
pKRN121	+3	KRRN
pKRN130	+4	KRRR
pSS602	+2	RRNN
pSS604	+4	RRRR

Fig. II-7 野生型uncleavable proOmpF-Lppと変異型uncleavable proOmpF-Lppのシグナル領域のアミノ酸配列
 太字で示した野生型uncleavable proOmpF-Lppのアミノ酸残基(KRN)を、下に示すテトラペプチドに変えた変異型uncleavable proOmpF-Lpp、及びそれらをコードする遺伝子をもつプラスミドを列記した。シグナル配列N末端の荷電の数も記してある。

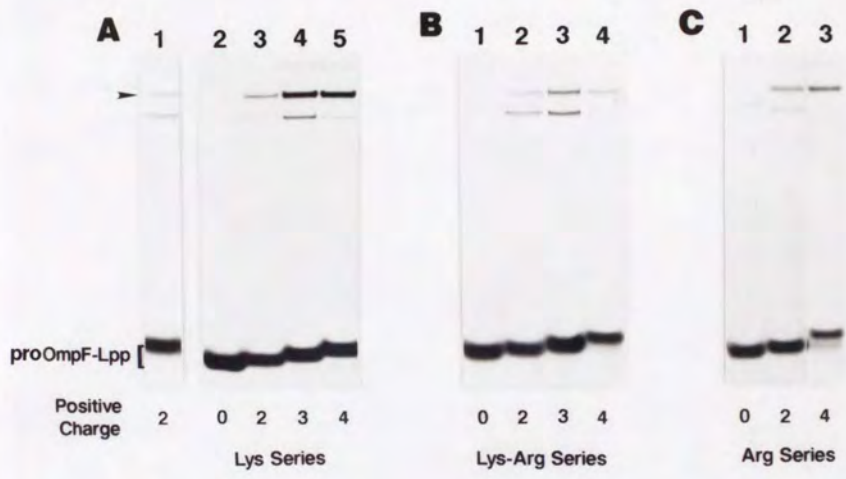


Fig. II-8 シグナル配列N末端領域の正の荷電の数をLysやArgを用いて変えた変異型uncleavable proOmpF-LppとSecAとの相互作用

異なった数のLysとAsn(Lys series;A)、Lys、Arg、Asn(Lys-Arg series;B)、Arg、Asn(Arg series;C)をFig. II-7 に示したようにN末端領域に導入した。各proOmpF-Lppをコードするプラスミドは、それぞれ、A；pK127(lane 1)、pSS500(lane 2)、pSS503(lane 3)、pSS504(lane 4)、B；pSS500(lane 1)、pKRN112(lane 2)、pKRN121(lane 3)、pKRN130(lane 4)、C；pSS500(lane 1)、pSS602(lane 2)、pSS604(lane 3)である。

矢印(➤)は、SecA—proOmpF-Lppを示している。

これらの実験により、以下のことが結論づけられた。

- ①SecAと分泌型蛋白質との相互作用には、シグナル配列N末端領域の正の荷電が重要である。
- ②SecAと前駆体蛋白質との相互作用の度合は、アミノ酸の種類に関係なく、荷電の数を反映する。

また、EDACと反応しないアルギニン残基のみをN末端にもつArg seriesにおいても、SecA—proOmpF-Lppが観察されたことから、前駆体蛋白質の成熟体部分がSecAとの架橋反応にあずかっていることが示唆された。

4. 塩化カリウムのSecA—proOmpF-Lpp形成に及ぼす影響

前項でシグナル配列N末端正荷電領域の重要性が示されたことから、SecAと分泌型蛋白質との相互作用が静電的相互作用によるものであることが考えられた。そこで、架橋反応の際、種々の濃度の塩化カリウムを添加したところ、250mM塩化カリウム存在下では、SecAと分泌型蛋白質(uncleavable proOmpF-Lpp)との架橋反応が85%阻害された(Fig. II-9)。77kDa架橋産物においても、同程度の阻害がみられた。塩化カリウムの架橋反応自体に及ぼす影響をみるために、四量体であるカタラーゼ(ウシ肝)を架橋する対照実験を行なった。データは示さないが、架橋反応に顕著な阻害はみられなかった。

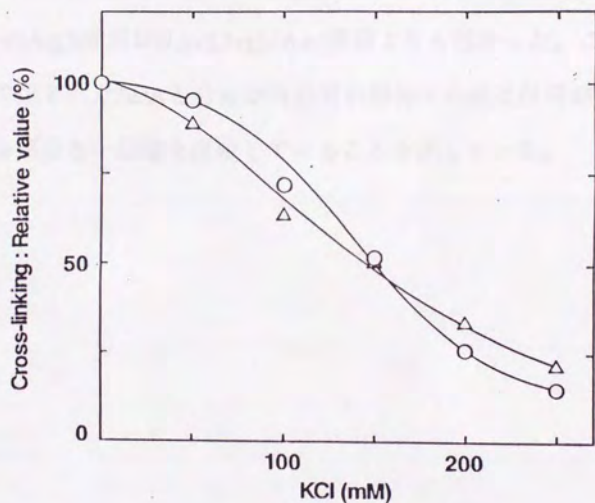


Fig. II-9 塩化カリウムの架橋反応に及ぼす影響

SecAとuncleavable proOmpF-Lppとの架橋反応をグラフに示す濃度の塩化カリウム存在下で行なった。架橋反応生成物はSDS-PAGE、フルオログラフィーを行なった後、デンストメーターによって定量した。SecA—proOmpF-Lpp(○)と77kDa架橋産物(△)の生成効率を示してある。

5. SecAとproOmpF-Lppとの相互作用とproOmpF-Lppの膜透過との関係

筆者らの研究室では、*in vitro*膜透過系を用いて、分泌型蛋白質のシグナル配列N末端領域の正荷電の重要性を示してきた(17)。そこで、本研究においても、野生型、あるいは変異型uncleavable proOmpF-Lppの膜透過効率を測定し、SecA—proOmpF-Lpp形成効率と比較した(Table II-2)。尚、この項に示した結果は、佐々木の論文から引用した(20、73)。

正荷電の増加にともなって、膜透過の効率とSecA—proOmpF-Lpp形成の効率とは、全く同様の増加傾向を示した。膜透過の効率においても[Lys][Arg]₃変異は[Lys][Arg]₂[Asn]変異よりも低かった。このことは、本章で示されたSecAと分泌型蛋白質前駆体との相互作用が膜透過反応における重要な一段階を反映していることを示している。

Table II-2 シグナル配列N末端正荷電量のSecAとの架橋反応性、及び膜透過効率への影響の間にみられる相関性

Plasmid ^{a)}	Net Charge at Amino-terminus	Cross-linking(%) ^{b)}	Translocation(%) ^{c)}
Wild-type pK127	+2	9	27
Lys Series			
pSS500	0	<1	1
pSS502	+2	12	20
pSS503	+3	22	46
pSS504	+4	25	68
Lys-Arg Series			
pKRN112	+2	10	23
pKRN121	+3	14	33
pKRN130	+4	12	27
Arg Series			
pSS602	+2	17	28
pSS604	+4	22	50

a) 野生型、あるいは変異型 *ompF-lpp* 遺伝子をもつプラスミドを示してある。

b) Fig. II-8で示したフルオログラムをデンシトメーターで定量し、未反応のproOmpF-Lppに対する架橋産物の比を求めた。

c) 37℃、1分における膜透過の初速度を測定し、加えたproOmpF-Lpp単位量当りの膜透過効率(%)とした。

第四節 考察

SecAは、分泌型蛋白質の大腸菌細胞質膜透過において重要な役割を担っている。SecAは分泌型蛋白質の*in vitro*膜透過反応を促進する(31、32)。N末端領域にはATP結合部位があり(33)、SecAはATPase活性を有す(34、35)。この活性が蛋白質の膜透過で重要な役割を果たしていることも示されている。SecAの機能とプロトン駆動力要求性との関連性も報告されている(36)。SecAと他のSec因子(37、38)や酸性リン脂質(39)との相互作用についても報告されている。本研究では、SecAの機能をさらに解明するために、SecAと分泌型蛋白質との相互作用を化学架橋法によって検討した。得られた結果を簡潔に記せば、以下のようになる。

- ①SecAと分泌型蛋白質とは直接相互作用していた。
- ②SecAと分泌型蛋白質との相互作用は、シグナル配列依存であった。
- ③SecAと分泌型蛋白質との相互作用には、シグナル配列N末端領域の正の荷電が重要であり、変異型分泌型蛋白質を用いた実験から、相互作用の度合と膜透過効率との間には相関性があった。

これらの結果から、SecAと分泌型蛋白質との相互作用は生理学的に意味をもつことが考えられる。以下、これらの結果について、考察を加えて行きたい。

本研究においては、EDACを架橋試薬として用いた。SecAは、酸性アミノ酸に富んでおり、全体に占める割合は、16.1%にも上る(28)(Table II-1)。そこで、カルボキシル基と第一アミノ基を架橋するEDACを架橋

試薬として選択した。

SecAと分泌型蛋白質との架橋反応によって架橋複合体(SecA—proOmpF-Lppまたは、SecA—proapoLpp)が観察された(Fig. II-5 A、Fig. II-6)。しかしその形成効率はそれほど高くなく、加えた分泌型蛋白質の10%が架橋複合体を形成した。SecAと分泌型蛋白質との相互作用が、蛋白質膜透過の一過程であり、SecAと分泌型蛋白質とが、絶えず、結合、解離を繰り返していると仮定すれば、架橋反応の効率が余り高くないのもうなずける。また、ここで用いた架橋反応の条件が必ずしも至適なものではないことも考えられる。実際、より高濃度のEDACを用いたり、より高温、より長時間の反応によって、架橋反応の効率には増加がみられた。しかし、このような条件の下では、かなりの割合のSecA—proOmpF-Lppが高分子側に転移し、110kDaを示すバンドの割合が減少した。これは、SecAが二量体を形成していることに起因すると思われる。Kimuraらは、ここで用いた架橋反応を改良した。すなわち、反応液中にATP(73)や1% Triton X-100(Kimuraら、未発表データ)を添加することによって架橋形成率を増加させた。また、次章で詳述するが、大腸菌細胞質画分に存在する他の蛋白質因子によっても架橋複合体の形成率が増大することを見いだした。

SecAと分泌型蛋白質との相互作用は、シグナル配列に依存していた。cleavable proOmpF-Lppのシグナル配列をリーダーペプチダーゼによって切断した成熟型OmpF-Lppでは、SecA—OmpF-Lppは観察されなかった(Fig. II-6 B、lanes 2 and 4)。

シグナル配列には、コンセンサスな配列はみられないが、以下の特徴がある。

①N末端に塩基性アミノ酸に富む正荷電領域がある。

②疎水性アミノ酸よりなる疎水領域がそれに続く。

先述したとおり、SecAは酸性アミノ酸に富んでいる(Table II-1)。それ故、SecAと分泌型蛋白質との間にみられた相互作用は、SecAの酸性アミノ酸とシグナル配列N末端塩基性アミノ酸との間の単なる非特異的な静電的相互作用に過ぎない、という可能性が否定できなかった。そこで、酸性アミノ酸に富む数種の蛋白質を用いて対照実験を行なったところ、SecA以外の蛋白質は、分泌型蛋白質と架橋複合体を形成しなかった(Fig. II-5 B)。proOmpF-Lppもシグナル配列N末端に塩基性アミノ酸に富む領域を含んでいる。塩基性アミノ酸のクラスターを有しているhistone H2Bを用いて対照実験を行なった。SecAとhistone H2Bとの架橋複合体は観察されなかった。一方、SecAとuncleavable proOmpF-Lppとの架橋反応の際、種々の濃度の塩化カリウムを添加したところ、塩化カリウム 250mMで架橋反応が85%阻害された(Fig. II-9)。先にも述べたが、Triton X-100の存在下、すなわち、疎水的な環境の下で、架橋反応が増大した。これらのことから、SecAと分泌型蛋白質との相互作用は、静電的なものであるが、特異的に起こっていることが示唆された。

シグナル配列N末端領域の正荷電の数を、LysやArgの数によって変えた変異型proOmpF-Lppにおいて、正荷電の増加に伴って架橋反応の効率も増加していた(Fig. II-8)。また、正荷電を取り去って[Asn]₄に変えた変

異型proOmpF-Lppにおいては、SecA—proOmpF-Lppはほとんど観察されなかった(Fig. II-8A、lane 2)。このことは、シグナル配列N末端領域の正荷電が分泌型蛋白質とSecAとの相互作用に重要であることを示している。

Lysのみならず、EDACの反応基となり得ないArgの数を増加させても、SecA—proOmpF-Lpp形成の増加が認められた(Fig. II-8B、C)。SecAとproOmpF-Lppとの相互作用がシグナル配列依存していたことから、成熟体部分は、SecAとの相互作用には関与しないが、架橋反応は、成熟体部分にある5個のLys、あるいは8個のAspで起こっていると考えられる。EDACは架橋反応の際、アミド結合を触媒することから(Fig. II-4)、架橋のかかった部分は近接している必要がある。すなわち、proOmpF-Lppは、シグナル配列部分でSecAと結合するだけでなく、成熟体部分でも結合していることが考えられる。このような考えに基づいて、Kimuraらは、各種欠失SecA(33)を用いた架橋実験から、SecAは一次構造上、267番目のグルタミン酸残基から340番目のスレオニン残基の間に分泌型蛋白質と結合する部位があることを報告している(73)。

各変異型proOmpF-Lppについて、膜透過効率も調べた(Table II-2)。正の荷電の増加に伴って、膜透過効率も上昇した。興味深いことに、架橋反応、膜透過、両者において、[Lys][Arg]₃変異の方が[Lys][Arg]₂[Asn]変異よりも効率が低かった。Chou-Fasmanの方法(74)によって両者の変異をもつシグナル配列部分の二次構造を予測したが、差はみられなかった(data not shown)。今のところ、この理由については不明である。

先にも述べたが、シグナル配列は、①N末端の正荷電領域、②それに

続く疎水領域、を特徴としてもっている。本研究は①を主眼において進められてきた。SecAと蛋白質前駆体との相互作用における疎水領域の果たす役割については、単純化したシグナル配列をもつ変異型proOmpF-Lppを用いた実験から興味あるデータが得られつつある。すなわち、正荷電と疎水領域のはたらきの間には、相関関係がみられ、疎水性が弱いときは、正荷電に依存して膜透過効率は良くなり、疎水性が強いときには正荷電の依存性が弱くなる(26)。疎水性の強い変異型proOmpF-Lppを架橋反応中に添加すると、正荷電の多いものは架橋複合体の形成を阻害したが、0のものでは阻害が観察されなかった(Arakiら、未発表データ)。一方で、正荷電の多いものほど*in vitro*膜透過反応におけるSecAの濃度依存性が小さかった。これらのことを考えあわせると、SecAと分泌型蛋白質との相互作用においては、疎水領域の強弱は関係がない、と考えてよさそうである。

本研究は、SecAと分泌型蛋白質とが溶液中で相互作用することを示したものである。SecAは、膜表在性の蛋白質であり、細胞質、細胞質膜両方に存在する(21)。SecAを尿素で洗い去った膜を用いた膜透過実験では、精製したSecAを加えることによって膜透過活性は回復する(31、32)。それ故、膜透過の過程においてSecAが膜に結合、解離を繰り返していることが考えられる。そのような観点からすれば、SecAと分泌型蛋白質との相互作用は、細胞質で起こり、SecA分泌型蛋白質前駆体複合体が膜の表面に結合し、膜透過が起こることも考えられる。あるいは、細胞質においては、他の蛋白質因子が分泌型蛋白質前駆体とまず相互作用し、その

因子が膜に存在するSecAに蛋白質前駆体を導くことも考えられる。

Wicknerらは、SecAをもった膜に結合した蛋白質前駆体のみが膜を透過し得ることを報告している(76)。このことは、後者の可能性を示唆している。しかし、シグナル配列N末端領域の正荷電の少ないものほど、膜透過反応におけるSecAの依存性は大きくなることから(Arakiら、未発表データ)、前者の可能性は必ずしも否定されたわけではない。

これまでにSecAは様々な膜透過因子と相互作用することが報告されているが、本研究において、SecAが分泌型蛋白質と特異的に相互作用することが初めて示された。このことは、SecAの膜透過反応における重要性に対する認識を更に高めることとなった。

第3章 SecAと分泌型蛋白質との相互作用を促進する因子

第一節 序

前章において、SecAと分泌型蛋白質とが相互作用することを述べた。本章においては、その相互作用を促進する大腸菌細胞質因子について述べる。架橋複合体の形成を指標にこの因子の精製を行なったところ、最終的に分子量約22kの蛋白質を主として含む画分を得た。この22k蛋白質(p22)のN末端アミノ酸配列を決定し、相同性をもつ蛋白質を検索したところ、機能不明の遺伝子(*fms*)の産物と同一であった。そこで、*fms*遺伝子を*tac*プロモーターの支配下に連結したプラスミドを作成した。このプラスミドをもつ細胞をIPTGで処理したところ、その抽出液は、SecAと分泌型蛋白質との相互作用を著しく増大させた。このことから、p22は*fms*遺伝子産物であると結論した。

第二節 材料と方法

1. 試薬

用いた試薬は、第二章と同じである。

2. 菌株

本章では、細胞質画分(S150)、p22大量精製にMC4100(*F'*、*araD136* Δ (*argF-lac*) *U169 relA1 rpsL thi*(77))を用いた。その他は第二章と同じである。

3. プラスミド

本研究では、*fms*遺伝子を高発現プロモーターの支配下に連結したpKYM101を用いた。pKYM101は、*fms*遺伝子をもつプラスミドpMAN165(78)の*XbaI-PstI*断片と*tac*プロモーターをもつプラスミドpTTQ18(Amersham社)の*PstI-XbaI*断片を連結した(Fig. III-1)。

4. 細胞質画分(S-150)の調製

SecAと分泌型蛋白質との相互作用を増大する因子を精製するために用いた細胞質画分(S-150)は大腸菌MC4100株より以下のように調製した。

MC4100株をL培地で37℃にて培養し、 $A_{660}=2.5$ で集菌した。

以下、操作は4℃にて行なった。菌体を50mM Tris-Acetate(pH7.8)-10%(w/v) Sucrose溶液で洗浄した後、菌体湿重量1g当り1mlの溶液A

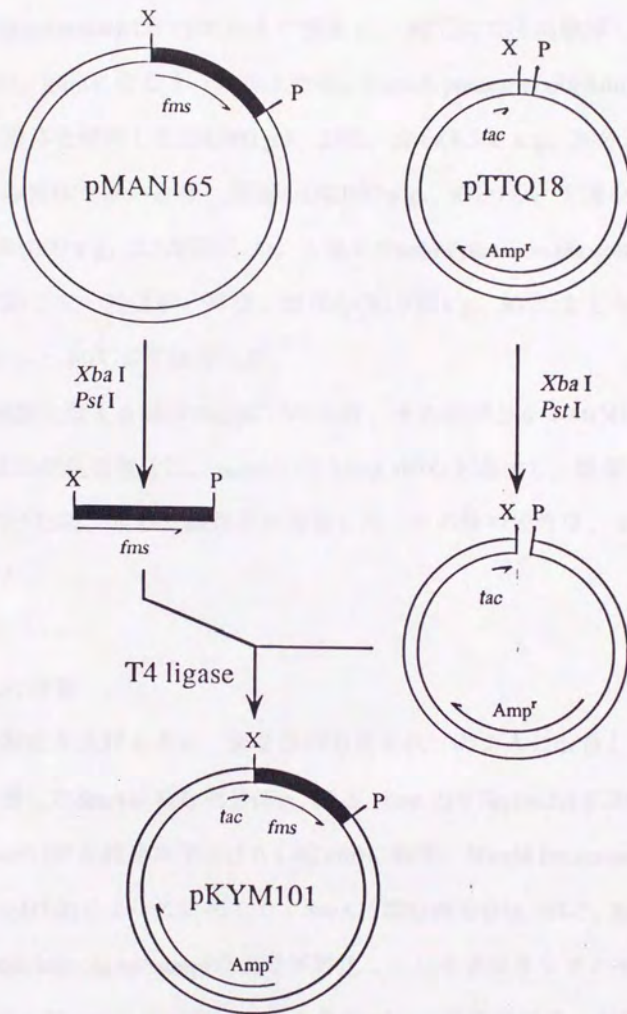


Fig. III-1 *tac*プロモーターの下流に*fms*遺伝子を連結したプラスミドpKYM101の構築

(10mM Tris-Acetate(pH7.8)、14mM (CH₃COO)₂Mg、60mM CH₃COOK、0.1mM Dithiothreitol(DTT))を加えて懸濁し、-80℃にて凍結融解した。DNaseを50 μg/mlになるように加えた後、French pressure cell(Aminco #4-3398A)で菌体を破碎した(14,000 psi、2回)。遠心(8,500 x g、20分)によって未破碎の菌体を除いた後、超遠心(30,000 x g、30分)し、上清をさらに超遠心(150,000 x g、2.5時間)した。上清を50mM Potassium phosphate (pH7.5)に対して一晚透析、再度、超遠心(30,000 x g、30分)をした。上清をS-150とし、-80℃にて保存した。

p22を過剰生産するMC4100/pKYM101株、その対照となるMC4100/pTTQ18株の細胞質画分は、A₆₆₀=0.6で1mM IPTGを添加し、培養を更に2.5時間続けた後、集めた細胞より調製した。その後の操作は、上と同様に行なった。

5. SecAの調製

SecAの純度を上げるため、第2章の方法を以下のように改良した。

硫酸沈澱したSecAに富む画分(Fig. III-2、lane 2)をSephaclyl S-300 (Pharmacia社)ゲル濾過カラム(1.6 x 90 cm)に載せ、50mM Potassium phosphate(pH7.2)によって溶出した。SecAに富む画分(Fig. III-2、lane 3)を、50mM Potassium phosphate(pH7.2)で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(2.5 x 20 cm)に載せた。カラムを60mlの同緩衝液で洗った後、300mlの50-250mM Potassium phosphate(pH7.2)の直線型濃度勾配によって溶出した。純度95%以上のSecAを得た(Fig. III-2、lane 4)。

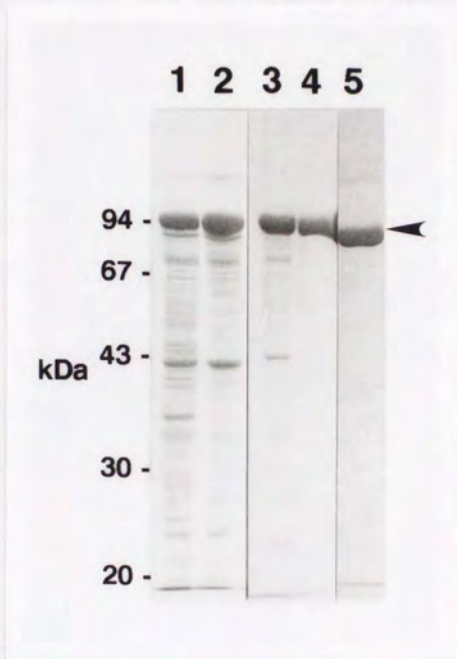


Fig. III-2 SecAの精製

SecAを大量に発現した大腸菌RR1/pMAN400株の細胞質画分 (lane 1)を硫酸沈澱(lane 2)し、Sephacryl S-300によるゲル濾過を行なった(lane 3)後、ハイドロキシルアパタイトによる精製(lane 4)を行なった。lane 5は、第2章で述べた方法で精製したSecAである。尚、lane 5はlanes 1-4とは別のゲルを用いたのでSecAの移動度に少しずれがある。

6. 翻訳反応液の脱塩

翻訳反応液中の脱塩は、ゲル濾過法、または、TCA(Trichloroacetic acid)沈澱法によって行なった。ゲル濾過法の場合は基本的には、第2章の方法と同様であるが、ゲル濾過の担体としてSephadex G-25 Superfine (Pharmacia社)を用いた。TCA法の場合は、翻訳反応液に10%(w/v)TCAを添加して、氷上に5分間放置した。遠心(14,000 x g、4℃、5分)で得た沈澱をAcetone、Diethyl etherの順に洗浄し風乾させた。乾固した沈澱を8M Urea、50mM Potassium phosphate(pH7.5)、1mM DTTに溶解した。アッセイには、10-20倍に希釈して用いた。

7. SecAと分泌型蛋白質との架橋反応(Fig. III-3)

第2章の方法に改変を加えた。SecA(10pmole)、脱塩した翻訳反応液($[^{35}\text{S}]$ 標識分泌型蛋白質を含む)(1.5×10^5 dpm)、10mM ATP、2mM MgSO_4 、分画したS-150を混合、50mM Potassium phosphateを添加して全体積が $45 \mu\text{l}$ となるようにした。10分間保温した後、 $5 \mu\text{l}$ の25mM EDAC(最終濃度2.5mM)添加により架橋反応を開始し、50分間保温した。反応の停止は、50mM Tris-HCl(pH7.5)を添加し、10分間保温することによって行なった。尚、反応は全て25℃にて行なった。架橋複合体の検出は、第2章と同様に行なった。

8. p22のN末端アミノ酸配列の決定

S150をMono S、Mono Q、Superose 12で分画したサンプルをSDS-PAGE

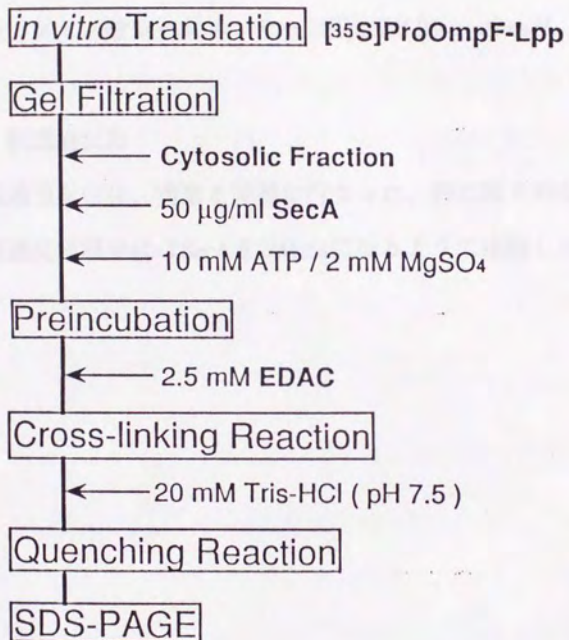


Fig. III-3 架橋反応の方法

(79)した後、Immobilon-P⁸⁰フィルター(Millipore社)にエレクトロブロッティングした。このフィルターを10mM Sodium Borate(pH8.0)-25mM NaCl、H₂Oの順に洗浄してから、0.2% C.B.B.(Coomassie brilliant blue) R-250-50% Methanol-10% Acetic acidで染色した後、50% Methanol-7.5% Acetic acidで脱色した。目的のバンドを切り出し、H₂Oで洗浄、乾燥させた後、アミノ酸シークエンサー (Applied Biosystems社、477A)にかけた。

9. 膜透過反応

膜透過反応は、前章と同様に行なった。特に断りのない場合を除いて、膜透過反応液中にはSecAを200nMになるように添加した。

第三節 結果

1. SecAと分泌型蛋白質との相互作用に及ぼす大腸菌細胞質画分の効果
架橋実験によりATPやATPのアナログがSecAと分泌型蛋白質との相互作用を促進することが報告されている(74)。本研究においては、相互作用を促進する蛋白質因子が大腸菌細胞質中に存在することを見出した。大腸菌細胞質画分(S-150)をSecAとuncleavable proOmpF-Lppの架橋反応液中に添加したところ、架橋生成物の著しい増加が観察された(Fig. III-4)。第2章では、架橋反応液中にSecAを $1.7\mu\text{M}$ 添加したのに対し、本章においては、 $0.2\mu\text{M}$ となるように添加した。また、本章においては、更に純度の高いSecAを用いた(Fig. III-2, lane 4)。そのため架橋複合体の形成率は、第2章のときに比べ、S-150を添加していないサンプル(Fig. III-4, lane 1)では著しく減少している。

2. 相互作用を促進する細胞質因子の精製

前項で示したように、大腸菌細胞質中に、SecAと分泌型蛋白質との相互作用を促進する因子が存在していたので、架橋複合体の形成を指標にこの因子の精製を行なった(Fig. III-5)。

まず、硫酸沈澱で分画を試みたが、実験を行なう度、活性のある画分に関して再現性のある結果が得られなかったため(data not shown)、硫酸沈澱による分画をあきらめS-150を直接カラムに載せることにした。

予備実験として、Mono Q(Pharmacia社)陰イオン交換カラムを用いた

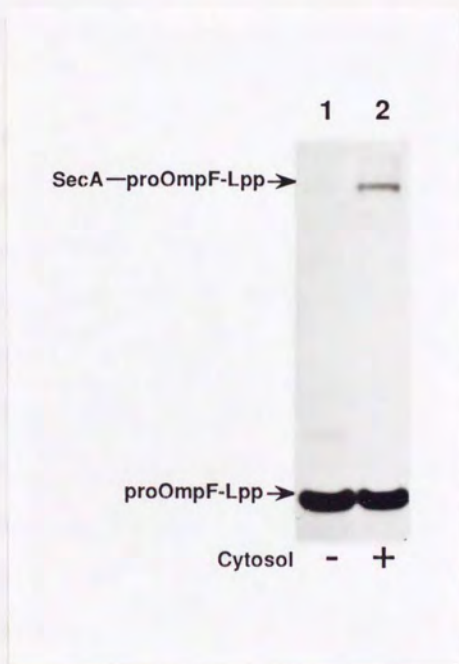


Fig. III-4 SecAと分泌型蛋白質との相互作用に及ぼす大腸菌細胞質画分(S-150)の効果

SecAとproOmpF-Lppとの架橋反応液中にS-150を $30\mu\text{g}$ 添加した(lane 2)。lane 1には、対照としてS-150を添加していないサンプルをのせた。

分画を行なったところ、良好な結果が得られた。しかし、活性のある画分には、かなり多くの蛋白質が共存していた(data not shown)。Mono S (Pharmacia社)陽イオン交換カラムによる分画を試みたところ、ほとんどの蛋白質は素通り画分に回収されたが、弱いながらも吸着画分に活性が認められた(data not shown)。素通り画分にも活性は認められた(data not shown)。そこで、この二種のカラムを組み合わせで精製を行なうことにした。

S-150を透析によって、50mM 2-N-Morpholino ethanesulfonic acid(MES)-NaOH(pH 6.0)に置換した後、同緩衝液で平衡化したMono S陽イオン交換カラム(1 x 10 cm)に載せた。60mlの同緩衝液で洗った後、全量160mlの同緩衝液中0-430mM NaCl濃度勾配で溶出した。NaCl濃度100mM前後で溶出される画分に活性が観察された(data not shown)。活性のある画分を50mM Tris-HCl(pH7.5)に対して透析した後、同緩衝液で平衡化したMono Q陰イオン交換カラム(1 x 10 cm)に載せた。64mlの同緩衝液で洗った後、全量160mlの同緩衝液中0-350mM NaCl濃度勾配で溶出した。NaCl濃度約150-200mMで溶出される画分中に活性は観察された(data not shown)。この活性画分を集め、濃縮した後、50mM Potassium phosphate(pH7.5)で平衡化したSuperose 12(Pharmacia社)ゲル濾過カラム(1 x 30 cm)に載せ、同緩衝液で溶出した(Fig. III-6A、B)。推定分子量約25kの位置に分画されてくる画分中に活性が認められた(Fig. III-6A、C)。この画分中には、分子量約22kの蛋白質(p22)が主として含まれていた。

E.coli Cytosol

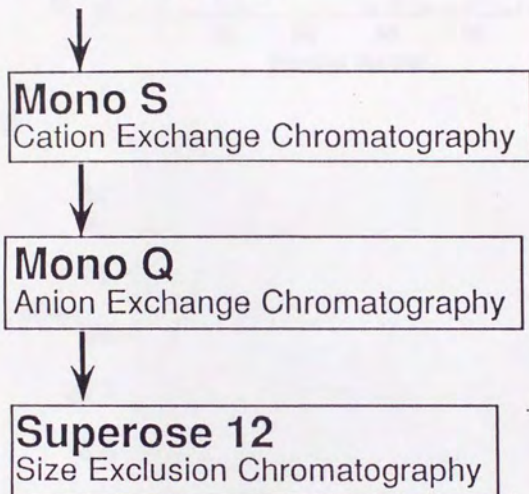


Fig. III-5 SecAと分泌型蛋白質との相互作用を促進する因子の精製方法

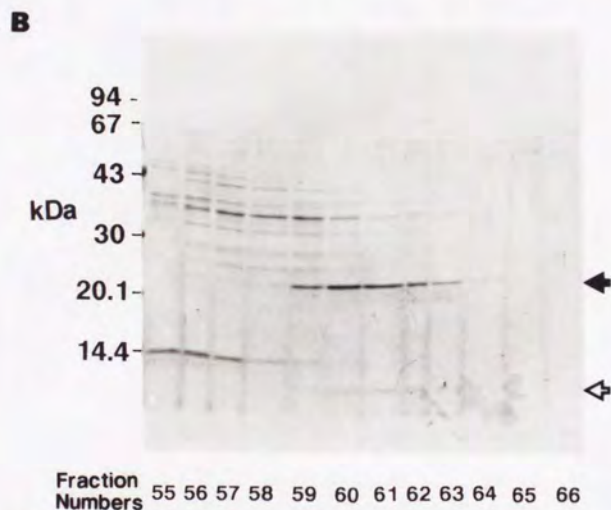
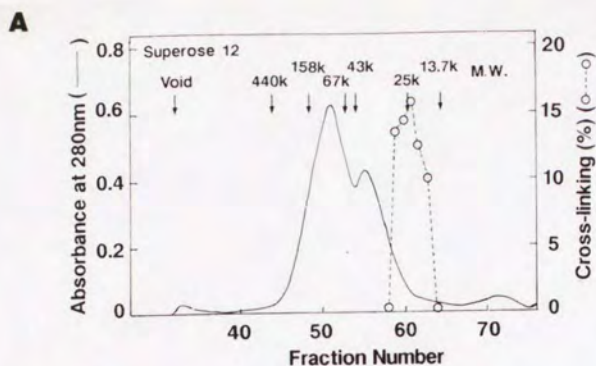


Fig. III-6 Superose 12ゲル濾過カラムの溶出パターン(A、B)と各画分を用いた架橋反応(A、C)

大腸菌細胞質画分(S-150)をMono S、Mono Qで分画した後、Superose 12カラムを用いてゲル濾過を行なった。

A、クロマトグラム(—)。各画分を添加した架橋反応における架橋複合体形成率(○---○)、マーカー蛋白質の溶出位置も載せた。Voはボイド容積を表す。

B、各画分をSDS-PAGEした後、C.B.B.で染色したもの。黒矢印(◄)はp22を、白抜きの矢印(◄)は10kDaの蛋白質を示している。

C、各画分を添加した架橋反応。矢印(►)は、架橋複合体を示している。

3. p22のN末端アミノ酸配列決定

p22のN末端18アミノ酸配列を決定した(Fig. III-7A)。SWISS-PROTデータベースによって相同性をもつ蛋白質を検索したところ、機能不明の遺伝子(*fms*)(80)の産物と同一であった(Fig. III-7B)。

4. *fms*遺伝子産物の大量発現

p22をコードする*fms*遺伝子を*tac*プロモーターの支配下に連結したプラスミド(pKYM010)を作成した(Fig. III-1)。pKYM010を保持している大腸菌(MC4100/pKYM010)の培養液に1mM IPTGを添加したところ、*fms*遺伝子産物を大量に発現していた(Fig. III-8)。*fms*遺伝子産物を大量発現しても細菌の生育には、ほとんど影響は見られなかった(data not shown)。*fms*遺伝子産物を大量に発現した大腸菌のS-150を架橋反応中に添加すると、SecAと分泌型蛋白質との相互作用を著しく増大させた(Fig. III-9)。このことから、p22は*fms*遺伝子産物であると結論した。

5. p22の精製

p22を過剰生産させた細胞のS-150(Fig. III-12, lane 2)から、Fig. III-10に示す手順で、p22の精製した。p22の精製は、架橋反応によらず、分画後の各画分の一部をSDS-PAGEして、p22の含まれる画分を確認しながら進めた。

S-150を硫酸沈澱(70%上清-90%沈澱)(Fig. III-12, lane 3)する。沈澱を50mM Tris-HCl(pH7.5)に溶解し、同緩衝液で透析した後、Mono Q陰イオ

- A. SVLQVLHIPDERLRKVAK

 B. MSVLQVLHIPDERLRKVAK PVEEVNAEIQRIVDD
MFETMYAEEGIGLAATQVD IHQRIIVIDVSENRD
ERLVLINPELLEKSGETGIEEGCLSIPEQRALVP
RAEKVKIRALDRDGKPF ELEADGLLAICIQHEMD
HLVGKLFMDYLSPLKQQRIRQKVEKLDRLKARA

Fig. III-7 p22のN末端アミノ酸配列(A)と*fms*遺伝子産物の推定アミノ酸配列(80)(B)との比較。下線を引いた部分は、金属ペプチダーゼの亜鉛結合部位(81)と相同性のある部分である。

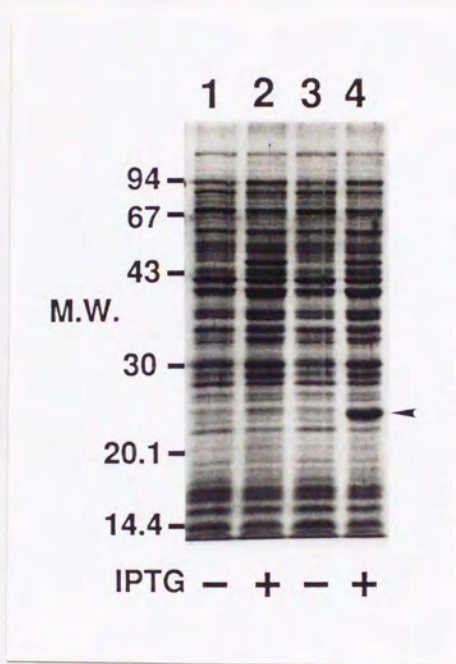


Fig. III-8 *fms*遺伝子産物の大量発現

*fms*遺伝子産物を大量発現するプラスミドを保持する大腸菌 MC4100/pKYM101(lanes 3 and 4)、及びベクタープラスミドを保持する大腸菌MC4100/pTTQ18(lanes 1 and 2)の全蛋白質をSDS-PAGE後、C.B.B.で染色した。IPTGによる誘導前(lanes 1 and 3)、誘導後2.5時間培養後(lanes 2 and 4)の全蛋白質をゲルに載せた。矢印(▶)は*fms*遺伝子産物を示している。

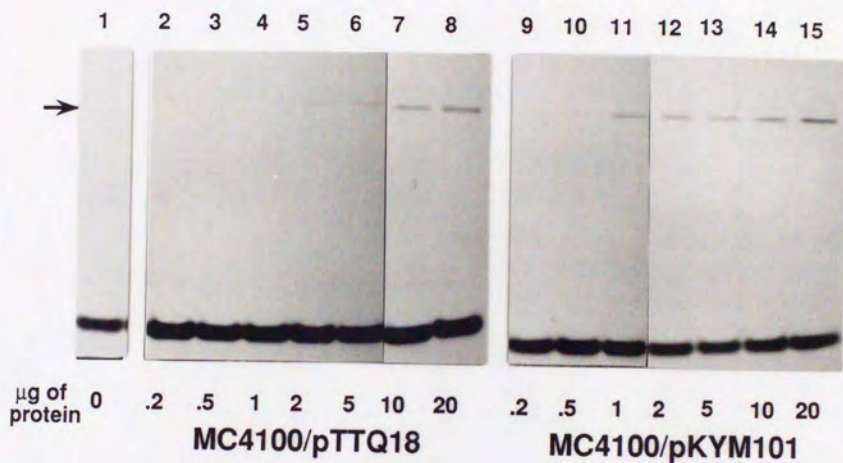


Fig. III-9 *fms*遺伝子産物を大量発現した大腸菌細胞質画分の効果
*fms*遺伝子産物を大量発現した大腸菌MC4100/pKYM101(lanes 9-15)から調製したS-150を下に示す蛋白量架橋反応液中に添加した。対照としてベクターのみを保持する大腸菌MC4100/pTTQ18のS-150を架橋反応液中に添加した。

E. coli Cytosol

Ammonium Sulfate
70-90% Saturation

Mono Q
Anion Exchange Column

TSKgel HA-1000
Hydroxyapatite Column

Superose 12
Size Exclusion Column

Fig. III-10 p22の精製方法

ン交換カラム(1 x 10 cm)に載せた。64mlの同緩衝液で洗った後、全量96mlの同緩衝液中0-400mM NaCl濃度勾配で溶出した(data not shown)。p22に富む画分(Fig. III-12, lane 4)は、第2項と同様にNaCl濃度約150-250mMで溶出された(data not shown)。この画分を硫酸沈澱(90%沈澱)し、沈澱を10mM Sodium phosphate(pH7.2)に溶解した後、同緩衝液で透析した。同緩衝液で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(TSKgel HA-1000)(Tosoh社)に載せてから、同緩衝液160mlで洗い、全量160mlの10-160mM Sodium phosphate(pH7.2)濃度勾配で溶出した(data not shown)。p22に富む画分(Fig. III-12, lane 5)は、Sodium phosphate濃度約80mMで溶出された(data not shown)。この画分をCentricon-10で濃縮した後、Superose 12ゲル濾過カラムに載せ、50mM Potassium phosphate(pH7.5)で溶出した(Fig. III-11, Fig. III-12, lane 6)。最終p22標品の純度は95%以上であった。

6. 精製p22を用いた架橋実験

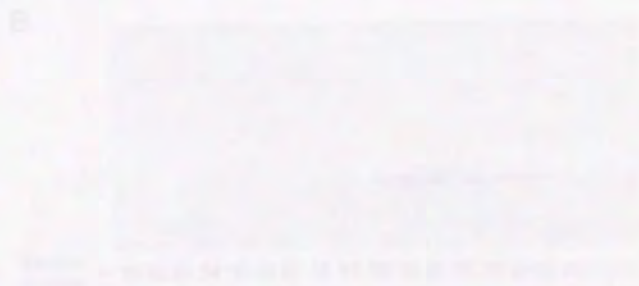
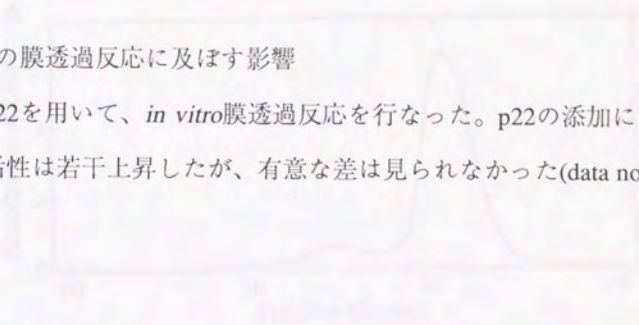
Superose 12ゲル濾過カラムによって分画した各画分を用いて架橋実験を行なったところ、p22の溶出パターンに呼応して架橋反応の促進が観察された(Fig. III-11)。SecAとproOmpF-Lppとの架橋複合体のみならず、30kDaの位置にproOmpF-Lppとp22の架橋産物と推定されるバンドも観察された。

架橋反応におけるp22の濃度依存性を調べた(Fig. III-13)。200nMのSecA存在下、種々の濃度のp22を架橋反応液中に添加した。1 μ Mのp22を添加したとき架橋反応は最大となり、それ以上p22を加えても促進は

みられなかった。

7. p22の膜透過反応に及ぼす影響

精製p22を用いて、*in vitro*膜透過反応を行なった。p22の添加により、膜透過活性は若干上昇したが、有意な差は見られなかった(data not shown)。



The following figure shows the results of the *in vitro* membrane permeability assay. The x-axis represents time in minutes, and the y-axis represents membrane permeability activity. The solid line represents the control, and the dashed line represents the p22-treated sample. Both curves show a peak around 15-20 minutes, indicating that p22 treatment does not significantly affect membrane permeability activity.

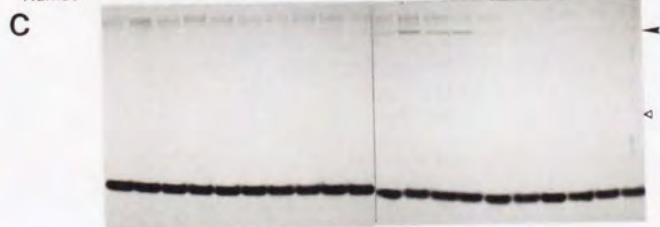
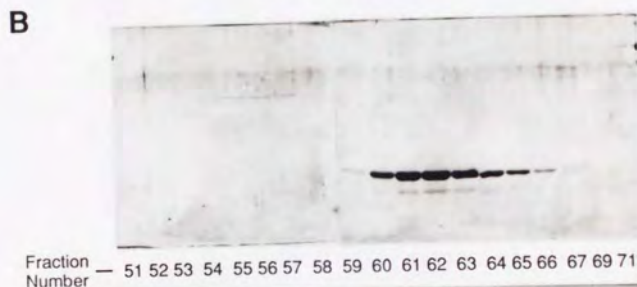
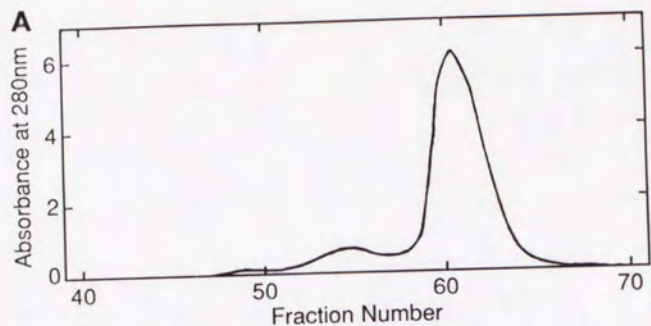


Fig. III-11 Superose 12によるp22の精製
 p22を大量発現した大腸菌から調製したS-150を硫酸沈澱、Mono Q陰イオン交換カラム、ハイドロキシアパタイトカラムで分画した後、Superose 12ゲル濾過カラムで精製した。

A、クロマトグラム。

B、各画分をSDS-PAGEした後、C.B.B.で染色したもの。

C、各画分を添加した架橋反応。矢印(►)は、SecAとproOmpF-Lppの架橋複合体を、(△)はp22とproOmpF-Lppの架橋複合体を示している。

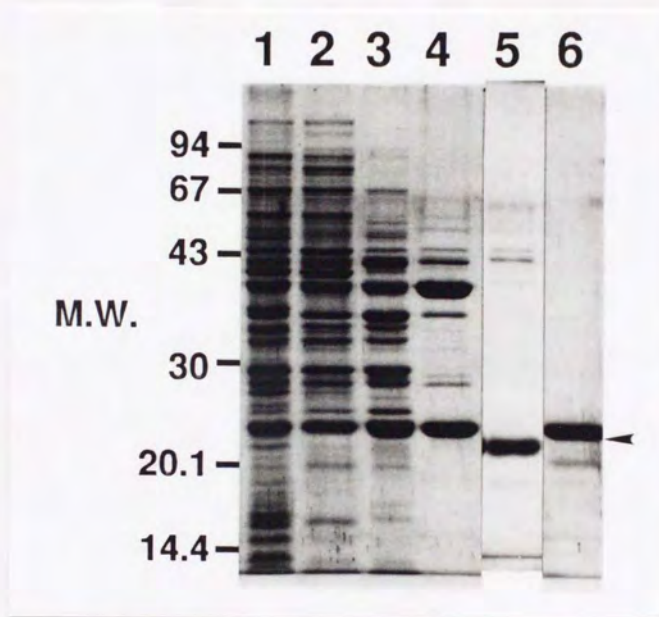


Fig. III-12 p22の精製のまとめ
 p22精製における各段階のサンプルをSDS-PAGE後、C.B.B.染色した。lane 1:全蛋白質、lane 2:S-150、lane 3:硫安沈澱(70%上清-90%沈澱)、lane 4:Mono Q陰イオン交換カラム、lane 5:ハイドロキシアパタイトカラム、lane 6:Superose 12ゲル濾過カラム
 尚、lane 5は、lane 1-4、6とは別のゲルを用いたので、p22の移動度に少しずれがある。

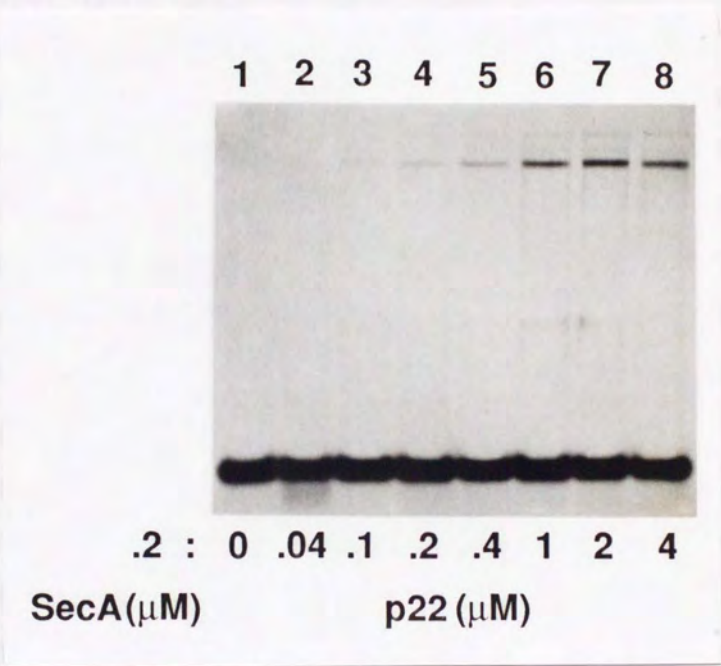


Fig. III-13 精製p22を用いた架橋実験
 SecA二量体のモル濃度に対する添加した精製p22のモル濃度の比を下に示してある。

第四節 考察

翻訳反応液から、抗Lpp抗体を固定した抗体カラムで精製した proOmpF-Lppを用いて、高純度のSecAとの架橋反応を行なったところ、架橋複合体の形成率は著しく減少していた(data not shown)。第2章で架橋反応に用いたproOmpF-Lpp溶液中には、大腸菌細胞質画分が含まれている。これらの結果から、SecAとproOmpF-Lppとの相互作用に大腸菌細胞質画分中の何らかの因子が関与していることが考えられた。そこで、架橋反応液中にS-150を添加したところ、架橋生成物の著しい増加が観察された(Fig. III-4)。第2章でも述べたが、SecAと分泌型蛋白質との相互作用は、ATPやATPアナログ(74)、あるいは、1% Triton -X100 (Kimuraら、未発表データ)の存在下で促進された。S-150は調製の際、透析によって脱塩されている。そのため、架橋反応は、ATP等の低分子とは別の、何らかの因子によって促進されている可能性が考えられた。

大腸菌細胞質中には、膜透過そのものには関与しないものの分泌型蛋白質を膜透過し得る構造に保っておくシャペロンとしてはたらいている因子が存在する。シャペロン分子として報告のあるSecB(49)、GroEL(50)の、精製標品をそれぞれ架橋反応液に添加したが、SecAと分泌型蛋白質との架橋反応になんら影響を及ぼさなかった(data not shown)。SecBの場合は、過剰のSecBの存在下で、SecBとproOmpF-Lppとの架橋複合体が観察された。このことは、SecBがproOmpF-Lppとも相互作用し得る可能性を示唆している。

架橋反応の促進を指標にSecAと分泌型蛋白質との相互作用を促進する因子の精製を行なった(Fig. III-5)。最終標品中には主に、分子量22kの蛋白質(p22)が含まれていた(Fig. III-6)。マーカー蛋白質の溶出位置をもとにp22の分子量を推定したところ、25kであったので、p22は単量体として存在すると考えられた。

次に、p22のN末端アミノ酸配列を決定した。データベースで検索したところ、機能不明の遺伝子(*fms*)(80)の産物の推定アミノ酸配列と一致していた(Fig. III-7)。

当研究室のMatsuyamaは、*fms*遺伝子を含む領域を組み込んだプラスミドpMAN165を構築していた(76)。そこで、pMAN165から、*fms*遺伝子を切り出して、高発現プロモーターであるtacプロモーターの下流に連結したプラスミドpKYM101を構築した(Fig. III-1)。このプラスミドを大腸菌MC4100株に形質転換した。この細菌を培養して、対数増殖期に1mM IPTGを添加したところ、細菌の生育にはほとんど影響を及ぼすことなく(data not shown)、*fms*遺伝子産物を高発現した(Fig. III-8)。IPTGを添加しても、*fms*遺伝子産物以外の蛋白質は、発現は誘導されなかった。

*fms*遺伝子産物を大量に発現した細胞のS-150を架橋反応液中に添加したところ、ベクタープラスミドのみを保持する細胞のS-150に比べて、約20倍架橋反応を促進した(Fig. III-9)。以上のことから、p22は*fms*遺伝子産物であり、p22が、SecAと分泌型蛋白質との相互作用を増大させる大腸菌細胞質因子である、と結論した。

p22を大量発現した細胞のS-150から、p22の精製を行なった。純度95

%以上の標品を得た。精製標品を用いた架橋実験においても、架橋反応は促進された。また、SecA二量体1分子に対して、p22を5分子添加したときに、架橋反応の促進は、最大となった(Fig. III-11)。

精製p22を用いて、*in vitro*膜透過実験を行なった。膜透過活性は、p22の添加により若干の促進が観察されたが、有意な差とはなり得ない程度であった(data not shown)。p22を大量発現していない細胞から得たS-150をMono Qカラム、ハイドロキシアパタイトカラムで分画したサンプルを用いて、*in vitro*膜透過実験を行なったときには、proOmpF-Lppの膜透過は促進された(data not shown)。そのため、SecAと分泌型蛋白質との相互作用は、p22単独で促進することが可能であるが、膜透過反応の促進には、p22と共に他の因子が関わっている可能性も考えられる。p22を含む画分中には、約10kの蛋白質も共存していた(Fig. III-6)。この蛋白質がp22とともに膜透過に関与している可能性もある。Mono Q画分中には、他にも多くの蛋白質が共存している状態なので、膜透過活性が、10kの蛋白質とは別の因子によって促進される可能性は否定できない。

p22はどのようにして、SecAと分泌型蛋白質との相互作用を促進しているのだろうか。p22は、分泌型蛋白質の翻訳反応が終了した後、SecAと相互作用するまでの何らかのステップに関与している可能性が考えられる。fms遺伝子から推定したp22の全アミノ酸配列を他の蛋白質と比較したところ、シャペロン分子、SRPを構成している蛋白質、分泌因子はもちろんのこと、これまで報告のあった全ての蛋白質と相同性は見られなかった。唯一、金属ペプチダーゼの亜鉛結合部位(81)と相同性が

見られたが、実際にp22が金属ペプチダーゼであるかどうか不明である。

Fig. III-11では、p22とproOmpF-Lppとの架橋複合体が観察されたことから、p22と分泌型蛋白質が直接相互作用する可能性が考えられる。この点から考えると、p22もSecBやGroELの様にシャペロン分子として機能しているのかも知れない。proOmpFは、*in vitro*膜透過系で、膜透過が観察されていない。本研究においては、分泌型蛋白質としてproOmpF-Lppを用いている。これらのことから、p22がproOmpFのシャペロン分子としてはたらいっていることは大いに考えられる。

一方、SecAとp22が相互作用することによって、SecAが分泌型蛋白質との相互作用をし易い構造に変化することも考えられる。Shinkaiらは、SecAのV8プロテアーゼに対する感受性の変化から、蛋白質の膜透過に関与する諸因子によってSecAが構造変化することを報告している(82)。分泌型蛋白質前駆体、ATPの存在下で、SecAのV8プロテアーゼに対する感受性をみたが、p22の有無による差異は認められなかった(data not shown)。

*fms*遺伝子は、大腸菌ホルミルトランスフェラーゼ(FMT)をコードする遺伝子(*fmt*)の上流に位置しており、*fmt*遺伝子とともに大腸菌染色体上、72.4分の位置でオペロンを形成している。ホルミルメチオニル-tRNA (fMet-tRNA)は、大腸菌の翻訳開始に必須である。FMTは、メチオニル-tRNA(Met-tRNA)にホルミル基を転移してfMet-tRNAを合成する反応を触媒する酵素である。また、このオペロンはリボソーム蛋白質をコードする遺伝子群の近傍に位置している。以上のような知見は、p22の機能を考える上で非常に興味深い。*spc*オペロンには、蛋白質の合成と膜透過の

関係を探求する過程で見つかったsecY遺伝子が存在している(83)。しかし、蛋白質の合成と膜透過との関係、という観点からの研究は、SecYはもちろんのこと、膜透過全般にわたって進んでいないのが現状である。前述したように、p22は、分泌型蛋白質の翻訳反応が終了した後、SecAと相互作用するまでの何らかのステップに関与している可能性が大きいことから、p22が蛋白質の合成と膜透過との関係を解くキー蛋白質となる可能性もある。更なるp22の機能解析を続けて行きたい。

引用文献

1. Crick, F. H. C. (1958) *Symp. Soci. Exp. Biol.* **12**, 548-555.
2. Palade, G. E. (1955) *J. Biophys. Biochim. Cytol.* **1**, 59.
3. Milstein, C., Brownlee, G. G., Harrison, T.M., and Mathews, M. B. (1972) *Nature* **239**, 117-120.
4. Blobel, G. and Dobberstein, B. (1975) *J. Cell Biol.* **67**, 835-851.
5. Walter, P. and Blobel, G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7112-7116.
6. Walter, P. and Blobel, G. (1982) *Nature*, **299**, 691-698.
7. Walter, P. and Blobel, G. (1983) *Cell* **34**, 525-533.
8. Gundelfinger, E. D., Krause, E., Melli, M., and Dobberstein, B. (1983) *Nucleic Acids Res.* **11**, 7363-7374.
9. Siegel, V and Walter, P. (1985) *J. Cell Biol.* **100**, 1913-1921.
10. Kurchalia, T. V., Wiedmann, M., Girshovich, A. S., Bochkareva, E. S., Bielka, H., and Rapoport, T. A. (1986) *Nature* **320**, 634-636.
11. Siegel, V and Walter, P. (1986) *Nature*, **320**, 81-84.
12. Siegel, V and Walter, P. (1988) *Cell* **52**, 39-49.
13. Siegel, V and Walter, P. (1988) *Trends Biochem. Sci.* **13**, 314-316.
14. Magliaccio, G., Nicchitta, C. V., and Blobel, G. (1992) *J. Cell Biol.* **117**, 15-25.
15. Inouye, M. and Halegoua, S. (1980) *CRC Crit. Rev. Biochem.* **7**, 339-371.
16. Inouye, S., Soberon, X., Franceschini, T., Nakamura, K., Itakura, K., and Inouye, M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3438-3441.
17. Sasaki S., Matsuyama, S., and Mizushima, S (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4358-4363.
18. de Vrije, T., de Swart, R. L., Dowhan, W., Tomassen, J., and Kruijff, B. (1988) *Nature* **334**, 173-175.
19. Lill, R., Dowhan, W., and Wickner, W. (1990) *Cell* **60**, 271-280.
20. Akita, M., Sasaki, S., Matsuyama, S., and Mizushima, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 8164-8169.
21. Oliver, D. B. and Beckwith, J. (1982) *Cell* **30**, 311-319.
22. Goldstein, J., Lehnhardt, S., and Inouye, M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 14413-14417.
23. Chou, M. M. and Kendall, D. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 2873-2880.
24. Yamamoto, Y., Taniyama, Y., Kikuchi, M., and Ikehara, M., (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 431-436.

25. Hikita, C. and Mizushima, S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 4882-4888.
26. Hikita, C. and Mizushima, S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 12375-12379.
27. Bieker, K.L., Phillips, G. J., and Silhavy, T. J. (1990) *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**, 291-310.
28. Schmidt, M. G., Rollo, E. E., Grodberg, J., and Oliver, D. B. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 3404-3414.
29. Akita, M., Shinkai, A., Matsuyama, S., and Mizushima, S. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 211-216.
30. Cabelli, R. J., Dolan, K. M., Qian, L., and Oliver, D. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 24420-24427.
31. Cabelli, R. J., Chen, L., Tai, P. C., and Oliver, D. B. (1988) *Cell* **55**, 683-692.
32. Kawasaki, H., Sasaki, S., Matsuyama, S., Akita, M., and Mizushima, S. (1989) *FEBS Lett.* **242**, 431-434.
33. Matsuyama, S., Kimura, E., and Mizushima, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 8761-8765.
34. Lill, R., Cunningham, K., Brundage, L. A., Ito, K., Oliver, D., and Wickner, W (1989) *EMBO J.* **8**, 961-966.
35. Cunningham, K. and Wickner, W. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8630-8634.
36. Yamada, H., Matsuyama, S., Tokuda, H., and Mizushima, S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 18577-18581.
37. Fandl, J. P., Cabelli, R., Oliver, D., and Tai, P. C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8953-8957.
38. Hartl, F. -U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J. B., and Wickner, W. (1990) *Cell* **63**, 269-279.
39. Hendrick, J. P. and Wickner, W. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 24596-24600.
40. Akimaru, J., Matsuyama, S., Tokuda, H., and Mizushima, S (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6545-6549.
41. Brundage, L., Hendrick, J. P., Schiebel, E., Driessen, A. J. M., and Wickner, W. (1990) *Cell* **62**, 649-657.
42. Schatz, P.J., Riggs, P. D., Jacq, A., Fath, M. J., and Beckwith, J. (1989) *Genes Dev.* **3**, 1035-1044.
43. Schatz, P. J., Bieker, K. L., Ottemann, K., Silhavy, T. J., and Beckwith, J. (1991) *EMBO J.* **10**, 1749-1757.
44. Nishiyama, K., Mizushima, S., and Tokuda, H. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 7170-7176.

45. Akiyama, Y. and Ito, K. (1985) *EMBO J.* **4** 3351-3356.
46. Matsuyama, S., Akimaru, J., and Mizushima, S. (1990) *FEBS Lett.* **269**, 96-100.
47. Gardel, C., Johnson, K., Jacq, A., and Beckwith, J. (1990) *EMBO J.* **9**, 3209-3216.
48. Matsuyama, S., Fujita, Y., and Mizushima, S. (1993) *EMBO J.* **12**, in press.
49. Randall, L. L., Topping, T. B., and Hardy, S. J. S. (1990) *Science* **248**, 860-863.
50. Bochkareva, E. S., Lissin, N. M., and Girshovich, A. S. (1988) *Nature* **336**, 254-257.
51. Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M. K. and Hartl, F. -U. (1992) *Nature* **356**, 683-689.
52. Poritz, M. A., Straub, K., and Walter, P. (1988) *Cell* **55**, 4-6.
53. Romisch, K., Webb, J., Herz, J., Prehn, S., Frank, R., Vingron, M., and Dobberstein, B. (1989) *Nature* **340**, 478-482.
54. Bernstein, H. D., Poritz M. A., Straub, K., Hoben, P. J., Brenner, S. and Walter, P. (1989) *Nature* **340**, 482-486.
55. Phillips, G. J. and Silhavy, T. J., (1992) *Nature* **359**, 744-746.
56. Brown, S. and Fournier, M. J. (1984) *J. Mol. Biol.* **178**, 533-550.
57. Rives, V., Romisch, K., Giner, A., Dobberstein, B., and Tollervey, D. (1990) *Cell* **63**, 591-600.
58. Poritz, M. A., Bernstein, H. D., Straub, K., Zopf, D., Wilhelm, H., and Walter, P. (1990) *Science* **250**, 1111-1117.
59. Luirink, J., High, S., Wood, H., Giner, A., Tollervey, D., and Dobberstein, B. (1992) *Nature* **359**, 744-746.
60. Gorlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K. -U., and Rapoport, T. A. (1992) *Cell* **71**, 489-503.
61. Nakamura, K., Takamatsu, H., Akiyama, Y., Ito, K., and Yamane, K. (1990) *FEBS Lett.* **273**, 75-78.
62. Yamane, K., Ichihara, S., and Mizushima, S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 2358-2362.
63. Vieira, J. and Messing, J. (1982) *Gene(Amst.)* **19**, 259-268.
64. Yamane, K. and Mizushima, S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 19690-19696.
65. Nakamura, K., Masui, Y., and Inouye, M. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 289-299.
66. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
67. Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K., and Green, M. R. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 7035-7056.

68. Traub, P., Mizushima, S., Lowry, C., and Nomura, M. (1971) *Methods Enzymol.* **20**, 391-407.
69. Yamane, K., Matsuyama, S., and Mizushima, S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 5368-5372.
70. 井村伸正編 (1984) 生化学ハンドブック, 54-73.
71. Iino, T., Takahashi, M., and Sako, T. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 7412-7417.
72. Bosch, D., de Boer, P., Bitter, W., and Tomassen, J. (1989) *Biochim. Biophys. Acta.* **979**, 69-76.
73. 佐々木正一 (1990) 東京大学大学院農学系研究科博士論文
74. Kimura, E., Akita, M., Matsuyama, S., and Mizushima, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 6600-6606.
75. Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1974) *Biochemistry* **13**, 211-245.
76. Cunningham, K., Lill, R., Crook, W., Rice, M., Moore, K., and Wickner, W. (1989) *EMBO J.* **8**, 955-959.
77. Casadaban, M. J. (1976) *J. Mol. Biol.* **104**, 541-555.
78. Matsuyama, S. and Mizushima, S. (1987) *J. Mol. Biol.* **195**, 847-853.
79. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
80. Guillon, J. -M., Mechulam, Y., Schmitter, J. -M., Blanquet, S., and Fayat, G. (1992) *J. Bacteriol.* **174**, 4294-4301.
81. Jongeneel, C., Bouvier, J., and Bairoch, A. (1989) *FEBS Lett.* **242**, 211-214.
82. Shinkai, A., Lu, H. -M., Tokuda, H., and Mizushima, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 5827-5833.
83. Ito, K., Wittekind, M., Nomura, M., Shiba, K., Yura, T., Miura, A., and Nashimoto, H. (1983) *Cell* **32**, 789-797.

謝 辞

本研究を遂行するにあたって、終始、懇切なるご指導・御鞭撻を賜りました東京大学応用微生物研究所、水島昭二先生に心から感謝致します。

実験上の適切な御指導と多くの有益な御助言、御助力を賜りました東京大学応用微生物研究所、徳田 元先生、並びに松山伸一先生に深く感謝致します。

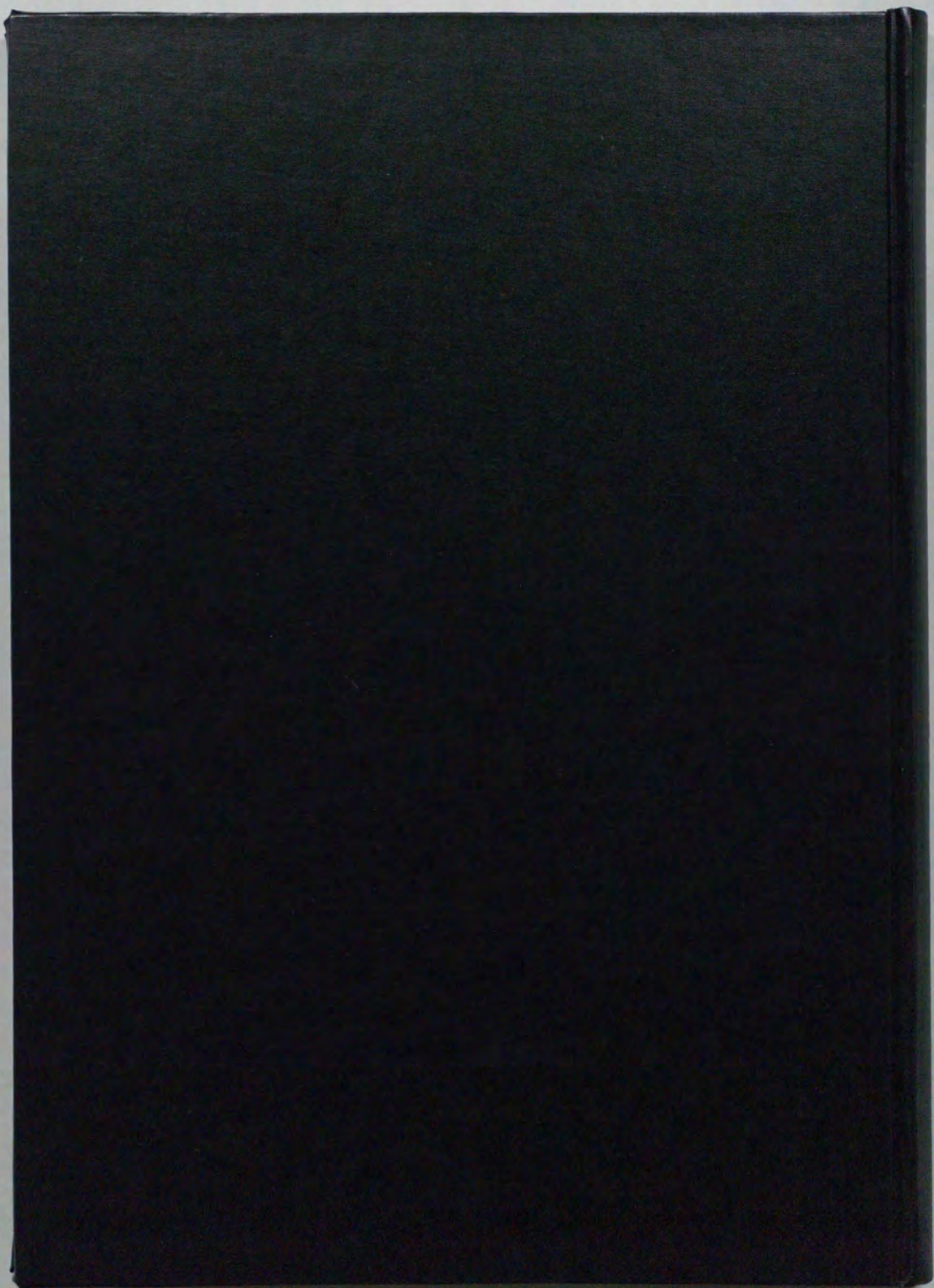
p22 蛋白質のN末端アミノ酸配列のデータ検索を行なっていただきました、京都大学ウィルス研究所、伊藤維昭先生に厚く御礼申し上げます。

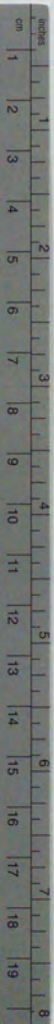
[³⁵S]標識SecAとプラスミドpJT03を分与していただきました、名古屋大学農学部、山田寿美博士、並びに市原茂幸博士に御礼申し上げます。

Taka-amylase Aを分与していただきました、三共株式会社、新井 守博士に感謝致します。

研究面はもちろんのこと、いろいろな面でお世話になりました東京大学応用微生物研究所第四研究部の皆々様に深く感謝致します。

最後になりましたが、大学院における研究生活を送るに当り、経済的なことはもとより、自らの体験に基いて研究に対する姿勢や心構えを示して下さいました両親に感謝致します。





Kodak Color Control Patches

© Kodak 2007 TM Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

Kodak Gray Scale



© Kodak 2007 TM Kodak

A	1	2	3	4	5	6	M	8	9	10	11	12	13	14	15	B	17	18	19