

タンパク質膜透過の駆動における SecY
と SecA の相互作用

化学専攻 細胞生物化学分科
松本 弦

要旨

大腸菌において、分泌タンパク質は細胞質膜に存在するタンパク質膜透過装置の働きにより膜を越えてペリプラスムへ輸送される。前駆体タンパク質が膜を透過するためには、膜における透過経路（チャンネル）と、駆動機構が必要である。膜内在性タンパク質 SecY/SecE/SecG 複合体がチャンネルを形成し、ATPase 活性を持つ SecA が前駆体タンパク質を膜の中へ挿入させる。Wicknerらは、SecA によるタンパク質膜透過駆動の分子機構として、insertion / deinsertion モデルを提唱した。SecA がATPと前駆体タンパク質の存在下で、構造変化を起こし前駆体タンパク質を伴って膜に挿入するとWicknerらのモデルは、反転膜小胞を用いた *in vitro* 実験の結果を根拠としている。私は、SecA insertion 反応によって実際に前駆体タンパク質の膜への挿入が駆動されるのかどうか、そして、この機構が *in vivo* でも働いているのかどうか、また、このSecAの挿入において、膜内在性チャンネル因子であるSecYがどのような役割を持つのかといった未解決の問題に取り組んだ。

まず当研究室で以前に分離された多数の低温感受性 *secY* 変異株から、反転膜小胞を調製し、SecAのinsertion 反応に異常を与えるものがあるかどうかを調べた。その結果、SecYのC末端細胞質領域にアミノ酸置換を持つ SecY205 変異株から調製した反転膜小胞では、ATP と前駆体タンパク質両者が存在するとき起こる「productive な」SecA insertion 反応が損なわれているが、非水解 ATP アナログ存在下で見られる SecA 単独での「空荷の」insertion は起こることを見いだした。SecA の insertion 反応が SecY タンパク質のアミノ酸置換により特異的に損なわれることから、SecA insertion に SecY が重要な機能を果たしていることが強く示唆される。さらに、*secY205*の低温感受性増殖を回復させるサプレッサー変異体を分離した。*secY205* 変異に特異的な (allele-specific な) サプレッサー変異が *secA* に分離できたことから、この*secY* 変異がSecA-SecY 相互作用を特異的に変化させるものであることがさらに示唆される。サプレッサー変異体のひとつ (SecA36) を精製して、*in vitro* 解析を行った。SecY205 反転膜小胞は、*in vitro* で野生型 SecA と組み合わせた時ほとんどタンパク質膜透活性をもたないが、SecA36 変異タンパク質はこの膜小胞の欠損にうち勝って正常に近い膜透過を起こすことができた。さらに、SecA36 変異タンパク質は SecY205 膜に対しても、前駆体と ATP に呼応した insertion 反応をおこすことができた。このように、SecY205 膜小胞の機能不全とその SecA36 変異による回復が、オーバーオール膜透過と SecA の productive モードの insertion の二つの *in vitro* 活性において明確に示された。そし

て、このような変異による活性の変化は、*in vivo*でのこれら二つの変異の表現型とよく一致した。以上の遺伝学解析と生化学解析を組み合わせたアプローチにより、SecYとSecAの働きについて*in vivo*と*in vitro*の橋渡しをすることができ、SecAのinsertionと言う、従来考えられなかったようなダイナミックな蛋白構造の変化が、*in vivo*でも*in vitro*でも実際にタンパク質膜透過に重要な役割を演じていることが強く示唆された。

secY205 変異の低温感受性をサプレスする *secA* 変異を系統的に分離した結果、*secY205* 変異に特異的な変異 (Class I; allele-specific suppressor) と、*secY205* 以外の様々な *sec* 変異をもサプレスできる変異 (Class II; Super-active SecA) の2種類の変異を多数得た。allele 特異的なサプレッサー変異は SecA の高親和性 ATP 結合部位 (NBS I) あるいは低親和性 ATP 結合部位 (NBS II) の Walker motif A の C 末端側領域に、Super-active SecA 変異は NBS II の Walker A motif 付近に集中した。後者においては、SecA の機能が異常に昂進していることから、この命名をした。以上の結果から、SaeAの挿入による機能発現には、2つの ATP 結合ドメインが関与するSecYとの相互作用が重要であること、また SecA の NBS II ドメインが SecA の機能制御に重要であることが示唆され、SecAの構造と機能に関する考察を行った。

また、本研究では得られたSecA変異体を利用して、SecYEGチャネルのSecGサブユニットの機能に関する研究も行った。*secY205* 変異をサプレスする *secA36* 変異は、*secY205* 以外の *secY* 変異の低温感受性はサプレスしないが、*secG* 欠失変異株の低温感受性はサプレスできることがわかった。野生型SecAは SecG 欠失膜小胞にたいしては、タンパク質膜透過活性が非常に低いが、SecA36変異タンパク質はSecGが存在しなくても効率よく膜透過を駆動することができた。しかし、SecG欠失膜は低ATP濃度時には全く膜透過活性を持たず、この欠損は、SecA36変異体を用いても軽減されなかった。これらの結果から、SecG の機能は SecA 機能を補助することにより、その結果ATPエネルギーを効率的に膜透過に利用することを可能にしていると考えられる。SecA36はATPが充分濃度ある限り、SecGの補助を必要としなくなったものと考えられる。

目次

Chapter 1 序論	1
はじめに	1
1-1 タンパク質の膜透過機構の概観	1
1-1-1 運ばれるタンパク質に必要なアミノ酸配列情報	2
1-1-2 膜透過装置	3
1-1-3 Sec 因子の多くは遺伝学的手法により同定された	5
1-1-4 膜透過反応は <i>in vitro</i> 実験系で解析することができる	6
1-1-5 タンパク質の膜透過に使われるエネルギー	7
1-2 細胞質から膜へのターゲティング	8
1-2-1 SecB は前駆体タンパク質の高次構造の形成を妨げ膜へターゲットする	8
1-2-2 SRP ホモログ Ffh によるターゲティング	9
1-2-3 高次構造をとったタンパク質が膜透過されることもある	9
1-3 SecA	
1-3-1 SecA ATPase は膜透過の駆動装置である	10
1-3-2 SecA の構造	10
1-3-3 SecA の ATPase 活性	11
1-3-4 SecA は膜透過の際に膜に insertion する	11
1-3-5 SecA の N 末端ドメインも insertin する	12
1-3-6 SecA は自ら翻訳調節をしている	13
1-4 膜内在性 Sec 因子と膜透過チャネル	14
1-4-1 膜内在性 Sec 因子	14
1-4-2 SecY, SecE は普遍的に存在する	16
1-4-3 SecY と SecE の相互作用	16
1-4-4 SecG は膜透過の際にそのトポロジーを反転させる	17
1-4-5 SecYEG スーパーコンプレックス	18
1-4-6 <i>secY</i> 変異株の分離による SecY 機能の解析	18
1-5 本研究の背景と目的	20

Chapter 2	結果	22
2-1	SecA の insertion を損なう secY 変異の同定	22
2-1-1	低温感受性 secY 変異における SecA insertion	22
2-1-2	secY205変異により “productive” なSecA insertion が損なわれる	26
2-2	secY205 変異をサプレスする secA36 変異の分離と解析	29
2-2-1	secY205変異株の低温感受性をサプレスするsecA変異の分離	29
2-2-2	secA36 変異がsecY205 変異株のタンパク質分泌に与える影響	30
2-2-3	SecA36 変異タンパク質の精製	31
2-2-4	SecA36 変異タンパク質のATPase 活性	32
2-2-5	SecA36 による SecY205 IMV への <i>in vitro</i> translocation	34
2-2-6	SecA36 の SecY205 膜への insertion	35
2-3	secY205 変異をサプレスする secA 変異の系統的分離	37
2-3-1	secY205変異株の低温感受性をサプレスするsecA変異の系統的分離	37
2-3-2	Suppression の特異性と塩基配列変化	41
2-3-3	SecA の変異部位とサプレッション能力	46
2-4	膜透過装置における SecG の役割	49
2-4-1	secG 欠失変異の低温感受性	49
2-4-2	SecA36 は <i>in vitro</i> で SecG を欠く膜小胞に対しても働く	51
2-4-3	SecG は特に低 ATP 濃度の条件下で膜透過に必須である	54
2-4-4	KN370 株では MC4100 株と比べて菌体内 ATP 濃度が低下している	57
Chapter 3	考察	59
Chapter 4	材料と方法	69
4-1	材料	69
4-1-1	菌株	69
4-1-2	プラスミド	71
4-1-3	培地	71

4-1-4	合成プライマー	72
4-2	方法	73
4-2-1	P1 <i>vir</i> 形質導入	73
4-2-2	<i>secY205</i> のサブレッサー- <i>secA</i> 変異の分離	73
4-2-3	クローニングと塩基配列の決定	73
4-2-4	バルスラベル実験	74
4-2-5	大腸菌の反転膜小胞の調製	74
4-2-6	SecA タンパク質の精製	75
4-2-7	SecA ATPase 活性測定	75
4-2-8	<i>in vitro</i> 膜透過反応	76
4-2-9	SecAの ¹²⁵ Iラベル	76
4-2-10	SecAの insertion 実験	76
4-2-11	SecAの膜結合実験	77
4-2-12	菌体内 ATP 濃度測定	77
	参考文献	78
	謝辞	84

Chapter 1 序論

はじめに

ゲノム DNA は細胞が必要とするすべてのタンパク質のアミノ酸配列を決定する。ここ数年の間に、いくつかの生物のゲノム DNA の全塩基配列が決定され、大腸菌の場合、ゲノム DNA は、約 3 千種類にもおよぶタンパク質をコードしていることが示されている。それらのなかにはタンパク質の合成の場である細胞質以外に、細胞質膜に組み込まれて膜タンパク質として機能したり、細胞質膜を越えてペリプラズム空間や外膜に輸送され機能するものが少なからず存在する。そのようなタンパク質が細胞質外で働くためには、一度細胞膜を越えなくてはならないが、膜には、細胞自身と外界とを分離する、物質の透過障壁としての役割がある。それは、水素イオンなどの無機イオンですら自由には通さず、それらの濃度勾配を維持することができるほど厳密なものである。そのような膜を巨大なタンパク質分子を透過させるための機構は複雑なものであると考えられる。このような生命の根源に関わるタンパク質膜透過機構の問題に関して多くの研究がなされてきた。ここでは、主に大腸菌におけるタンパク質の膜透過機構についての知見を述べる。

1-1 タンパク質の膜透過機構の概観

分泌タンパク質や膜タンパク質は、タンパク質の合成の場である細胞質以外の場所に配置されてはじめて、その機能を発揮できる。この配置に必要な「膜を越えたタンパク質の輸送」という問題は、細胞にとってもっとも重要な問題の一つである。大腸菌の場合、細胞質以外の場所としては細胞質膜 (内膜) やペリプラズム空間、外膜がある。ここでは、細胞質膜を透過してペリプラズム側へタンパク質が輸送されることを分泌と呼ぶ。分泌されるタンパク質がある一方で、多くのタンパク質は細胞質内にとどまって、仕事

をしている。従って、分泌されるべきタンパク質のみを膜透過させ、細胞質タンパク質は膜透過させないための機構が必要である。真核細胞において分泌タンパク質が小胞体内腔に輸送される機構を説明した、シグナル仮説が1975年に提唱された(Blobel and Dobberstein, 1975)。

1-1-1 運ばれるタンパク質に必要なアミノ酸配列情報

Blobel らは、分泌タンパク質の mRNA を *in vitro* で翻訳させると、N 末端に最終産物には存在しない配列が付加された前駆体として合成されることから、この配列 (シグナル配列) がタンパク質の局在性決定していることを提唱した。彼らは、分泌タンパク質は、膜透過のためのシグナル配列がついた前駆体として合成され、このシグナル配列により小胞体に特異的に輸送されるというシグナル仮説 (1975 年) を発表した。前駆体タンパク質が膜透過するとそのシグナル配列は切断される。Blobel はシグナル仮説の中で、シグナルを持った前駆体タンパク質を合成するリボソームは、タンパク質の合成途中にシグナル配列依存的に膜へ移動して、膜内在性のタンパク質製の膜透過装置と結合し、翻訳と併役してタンパク質を膜透過をさせる (co-translational translocation) と説明した。その後、シグナル仮説を証明するたくさんの研究が行われた。、Blobel はこの業績が認められ、1999 年にノーベル医学・生理学賞を受賞した。

大腸菌においても、分泌タンパク質はシグナル配列を持った前駆体として合成される。シグナル配列は、前駆体タンパク質の N 末端に存在し、膜へのターゲティングをはじめとして、そのタンパク質が分泌されるために必要な要素である (Randall and Hardy, 1989; Schatz and Beckwith, 1990)。シグナル配列の変異によって、その前駆体タンパク質は分泌されなくなることから、その分泌への重要性が証明される。

シグナル配列は決まった一次配列である必要はないが、次のような傾向が必要とされる (von Heijne, 1985)。N 末端近くに塩基性アミノ酸を含む親水性の短い領域を持つ。次いで疎水性の高い残基が十数残基程度続き、その C 末端側には比較的親水性でシグナル配列の切断に必要な配列 (Ala-X-Ala 等) が含まれる (Nilsson and Heijne, 1991; von Heijne, 1983)。N 末端の正電荷を持った領域は通常細胞質にとどまり、疎水性のコア領域がループ状に膜に挿入し、C 末端側に続くポリペプチド鎖を膜透過させる。シグナ

ル配列の多くは、成熟体部分が膜透過した後、シグナルペプチダーゼ (Lep) による切断をうけ、成熟体部分がペリプラズム領域へ放出される。タンパク質が膜透過されたことの簡便な指標として、このようなシグナル配列の切断を観察する方法がよく利用されている。

シグナル配列に類似した疎水性に富むアミノ酸配列は膜タンパク質の膜への組み込みにも働き膜貫通領域 (TM; Transmembrane region) となる。例えば、シグナルペプチドが切断されない場合は、シグナル配列部分が膜にアンカーされ (シグナルアンカー) N-in C-out の配向をとった膜貫通領域により膜に組み込まれた膜タンパク質となる。シグナル配列によって膜透過が起こっているとき、続くポリペプチド鎖の途中に疎水性度の高い領域がくると、その領域はストップトランスファー配列として働く。ストップトランスファー配列により膜透過が中断されると、その部分が膜貫通領域 (N-out C-in) となり、上とは逆の配向の膜タンパク質となる。また、疎水性配列が膜に挿入する際、N 末端側のポリペプチド部分が膜透過し N-out C-in の膜タンパク質となる場合もある (逆シグナル)。疎水性領域の N 末端側と C 末端側のどちらが膜を越えるのか、すなわち膜組み込みの方向性は、膜貫通部位の前後の電荷バランスによるとされており、一般的には正電荷を持つ方が細胞質側になるように配向する (positive-insiderule) 傾向がある。複数の膜貫通領域を持つような膜タンパク質も、基本的にはこのような膜透過反応を繰り返すことで正しく膜に組み込まれていくと考えることができる。

1-1-2 膜透過装置

シグナル配列をもった前駆体タンパク質は、シグナル配列によって膜へターゲティングされ、膜を透過するが、膜透過の過程が実際に起こるためには、運ばれるタンパク質の性質だけでは不十分であり、他の蛋白因子の助けを借りなければならない。そのような因子は膜透過を効率よく進めるためのマシーナリーを構成している。考えてみれば、タンパク質を透過障壁を維持しつつ膜を越えて運ぶために特別のマシーナリーが必要なことは、当然予測できることであり、Blobel のシグナル仮説においても、膜透過にこのことは提唱されている。まず、可溶性フェーズで働く因子があり、前駆体タンパク質を膜にターゲティングする。ターゲティングの因子はまた、前駆体タンパク質が細胞質

で不必要な構造をとらないようにフォールディングを抑える機能も持っており、分子シャペロンとオーバーラップした働きを持つ。チャンネル因子は前駆体タンパク質が実際に膜を越えて移動するための経路を造っている膜内在性タンパク質である。タンパク質が脂質2重層を直接透過することが考えにくいことからシグナル仮説でも想定されたものであるが、最初に発見されたのは大腸菌のSecYタンパク質である。駆動因子は実際にタンパク質を膜を越えて動かすために働くもので、その意味でモータータンパク質とも呼ばれる。小胞体でのcotranslationalな経路では、リボソームがチャンネルタンパク質に強固に結合するため、翻訳されたタンパク質は自動的にチャンネルに押し出されることから、翻訳そのものが動きを駆動すると考えられているが、翻訳後の膜透過には駆動因子が必須であり、小胞体内腔の Bip タンパク質のようにタンパク質を引きずり込む方向にはたらくものと、大腸菌のSecAのように細胞質側にあってタンパク質を押し込む方向に働くものがある。

大腸菌のタンパク質膜透過に関与する因子をTable 1-1にまとめた。

Table 1-1 : 膜透過に関与するタンパク質

名称	局在性	大きさ (kDa)	染色体位置 (分)	機能
SecA/PrlD	膜表面	102(2量体)	2.5	ターゲティング、translocation ATPase
SecB	細胞質	17.3(4量体)	81	フォールディング制御、ターゲティング
SecD	膜内在	67	9.5	大きなペリプラズムドメインを持つ
SecE/PrlG	膜内在	13.6	90	3回膜貫通、膜透過に必須、SecYの安定化
SecF	膜内在	35	9.5	大きなペリプラズムドメインを持つ
SecG /PrlH	膜内在	12	69	2回膜貫通、SecAの補助
SecY/PrlA	膜内在	49	72	10回膜貫通、膜透過主要因子
YajC	膜内在?	12	9.5	SecDFとともに複合体をつくっている。

1-1-3 Sec 因子の多くは遺伝学的手法により同定された

大腸菌膜透過装置を構成する因子の多くは、分泌過程に異常をもつ変異株の分離と解析によってなされた (Schatz and Beckwith, 1990)。これまでに用いられた、大腸菌での分泌欠損変異の分離法とそれによって同定された遺伝子について簡単に述べる。分泌タンパク質 (MalE, LamB, PhoA) と細胞質タンパク質 (LacZ) を融合させたキメラタンパク質は、分泌タンパク質のシグナルにより膜透過を開始するが、膜に挿入した状態にはなるものの、完全にペリプラズム側に移行することはない。LacZ 部分に速やかに立体構造をとりやすい領域があり、その様な領域は膜を通過できないのであろうと考えられている。そのため、この融合タンパク質は膜透過装置中で「目詰まり (jamming)」を起こし、細胞毒性を発揮してしまう (Oliver and Beckwith, 1981)。この研究により、シグナル配列が決められた。なお、膜に結合した LacZ 融合体は 4 量体を形成できないので β -ガラクトシダーゼ活性を持たない。分泌活性が低下すると、LacZ が膜に運ばれることなくフォールディングし、 β -ガラクトシダーゼ活性が上昇する。このことを指標として分泌活性の低下した *sec* (secretion) 変異が分離され、その変異の遺伝子解析により *secA*、*secB*、*secD* が同定された (Gardel *et al.*, 1987; Kumamoto and Beckwith, 1983; Oliver and Beckwith, 1981)。膜透過反応は細胞にとって必須のものであるため、分泌欠損変異は条件致死となる可能性がある。非許容温度下で直接分泌活性の低下 (前駆体の蓄積) を指標にして、温度感受性株のコレクションをスクリーニングする事によって分泌欠損変異が分離され、*secY* が同定された (Ito *et al.*, 1983)。また、細胞の分泌能が低下すると *secA* 遺伝子の発現が誘導される。*secA* に *lacZ* を融合させた変異株を用いると、分泌欠損により *secA-lacZ* の発現量が増加する。従って、分泌活性の低下した変異を、LacZ 活性の増加したものとして選択することができる (Riggs *et al.*, 1988)。この方法により *secE* が同定された (Stager *et al.*, 1989)。これらとは別に、*malE*、*lamB* 等のシグナル配列に変異を持つ変異タンパク質の分泌を可能にするような変異、つまり、シグナル配列の変異をサプレスする *prl* (Protein localization) 変異が分離され、それらの解析により *prlA*、*prlD*、*prlG* などの変異が同定された。現在では、*prlA* は *secY* の、*prlD* は *secA* の、*prlG* は *secE* の変異であることが確かめられている (Bieker *et al.*, 1990)。また、Mizushima-

Tokudaらは生化学的な解析により *secG* を同定した (Nishiyama *et al.*, 1993)。*secG* の変異でも *prl* 表現型が現れる (*prlH*; Bost and Belin, 1997)。*secD* 遺伝子領域の解析において、その領域にもう一つの分泌に関わる遺伝子があることがわかり、それを *secF* と名付けた (Gardel *et al.*, 1990)。*secD* オペロン内には、もう一つ *secD* の上流に *yajC* という遺伝子が存在し、最近では SecD, SecF とともに三者複合体をつくっていると考えられている (Duong and Wickner, 1997a)。

1-1-4 膜透過反応は *in vitro* 実験系で解析することができる

タンパク質膜透過の分子機構を研究していくためには *in vitro* での実験系が不可欠である。大腸菌を lysozyme 処理をしてペプチドグリカン層を破壊し、スフェロプラストを調製する。スフェロプラストをフレンチプレスで破碎をすると、細胞質側が外側になった反転膜小胞 (IMV: Inverted Membrane Vesicle) を調製することができる。この IMV への前駆体タンパク質の膜透過反応を *in vitro* で再現することができる。IMV と SecA、ATP、前駆体タンパク質を 37°C でインキュベートし、その後プロテアーゼ処理をすると、膜透過した前駆体タンパク質は膜小胞の内部に移行するため、膜によってプロテアーゼ消化から免れたものとして観察できる。

タンパク質の性質を調べるためには、タンパク質を精製し、活性を測定するのが一般的である。膜内在性タンパク質の場合でも、膜を非イオン性界面活性剤で可溶化し、精製することができる。精製した膜タンパク質から、界面活性剤を希釈法などによって除いてリン脂質膜に再構成すると、再構成人工膜 (プロテオリポソーム) を作製することができる。大腸菌内膜を非イオン性界面活性剤で可溶化し、再構成する事により、SecA と ATP に依存した膜透過活性を与える分画として、Wickner らは SecY-SecE-Band1 (SecG) 複合体を得た (Brundage *et al.*, 1992)。Mizushima らは、過剰生産した SecY, SecE タンパク質を別々に精製し、再構成することで、タンパク質の膜透過は SecYE と SecA により基底的な活性が発揮されることを示した (Akimaru *et al.*, 1991)。しかし、SecY/ SecE による再構成リポソームの膜透過活性は非常に低い。精製 SecY, SecE タンパク質とともに再構成すると膜透過活性を促進する因子として SecG タンパク質が同定された (Hanada *et al.*, 1994; Nishiyama *et al.*, 1993)。

オクチルグルコシド (*n*-octyl- β -D-gulcopyranoside) で膜小胞を可溶化すると、SecY / SecE / SecG と SecD / SecF / YajC は別々の複合体として精製される。一方、界面活性剤 digitonin で膜小胞を可溶化すると、SecY / SecE / SecG / SecD / SecF / YajC が複合体として精製できる (Duong and Wickner, 1997a)。SecY / SecE / SecG 複合体が膜透過のチャネルの基本構造を形成し、SecD / SecF / YajC は補助的な因子として機能していると考えられる。

1-1-5 タンパク質の膜透過に使われるエネルギー

タンパク質膜透過の過程で、前駆体タンパク質はタンパク質製の膜透過チャネルの中を移動していく。前駆体タンパク質が膜透過チャネルの中を移動するにはエネルギーが必要である。大腸菌におけるタンパク質の膜透過では、ATPとPMF (Proton Motive Force) がエネルギー源として利用されている (Lill *et al.*, 1989; Schiebel *et al.*, 1991)。ATP による駆動力はATPaseであるSecAにより媒介される (Lill *et al.*, 1989)。SecAはATPの加水分解のエネルギーを利用して前駆体タンパク質の動きを駆動している因子である。SecA による前駆体タンパク質膜透過の駆動の機構として、後で詳しく述べるが、Economou と Wickner は SecA の insertion / deinsertion サイクルのモデルを提唱した (Economou and Wickner, 1994)。このモデルでは、SecAは前駆体タンパク質を伴ってATP依存的に膜に深く挿入 (insertion) し、ATPの加水分解をともなって基質を遊離して膜から脱挿入 (deinsertion) する。SecA はこのサイクルを繰り返すことにより膜透過を駆動するものと考えられる。SecAのATPaseによるATPのエネルギーの他に、PMFも膜透過に重要である (Schiebel *et al.*, 1991)。PMFがどのように膜透過反応のエネルギーとして利用されているかはよくわかっていないが、SecA の insertion / deinsertion サイクルに於いて SecA から遊離したポリペプチドが、PMFにより駆動されることにより効率よく膜透過が起こるのであろう (Ito, 1996; Wickner and Leonard, 1996)。Nishiyama らによれば、PMFはSecAにも働いているのかもしれない (Nishiyama *et al.*, 1999)。

1-2 細胞質から膜へのターゲティング

1-2-1 SecB は前駆体タンパク質の高次構造の形成を妨げ膜へターゲットする

真核生物の場合、分泌タンパク質の膜透過は小胞体上のリボソームにより、タンパク質の翻訳と膜透過がカップルした機構でおこる。大腸菌の場合、このようなタンパク質の翻訳と併役した膜透過はおこなわれず、タンパク質の翻訳が終了してから膜透過が起こると考えられている (Randall, 1983; Zimmermann and Wickner, 1983)。

ほとんどの分泌タンパク質や膜タンパク質は Sec 膜透過装置を通して膜透過すると考えられている。この Sec 膜透過装置は、高次構造をとったタンパク質を通すことはできない。従って、前駆体タンパク質が膜を透過するとき、高次構造は透過のための障害となる。前駆体タンパク質が合成されるとその直後あるいは合成中に SecB などのシャペロンタンパク質が新生ポリペプチドに結合し、フォールディングを阻害する (Lecker *et al.*, 1990; Randall and Hardy, 1989)。SecB はサブユニット分子量 17.3 kDa のホモ 4 量体の可溶性タンパク質であり、細胞質に存在するシャペロンタンパク質である。SecB の基質認識と結合に関して、Randall は次のようなモデルを提唱している (Randall and Hardy, 1989)。SecB の表面にはマイナスの電荷をもった残基が存在し、まず基質と静電的な結合をつくる。基質と静電的結合をつくると SecB のコンフォメーション変化が起こり、疎水的な部分が濾出する。そして、基質と疎水的な相互作用により結合し基質タンパク質のフォールディングを阻害する。SecB は基質タンパク質の成熟体部分と結合する (Gannon *et al.*, 1989)。DnaK/DnaJ や GroE などのシャペロンも unfold したタンパク質と結合できるため、基質タンパク質の膜透過に関与することもある (Kusukawa *et al.*, 1989; Wild *et al.*, 1992)。

SecB が結合したポリペプチドは、高次構造をとらない、伸びた状態で膜へとターゲティングされる。このターゲティングには SecB と SecA の相互作用が働いている (Hartl *et al.*, 1990)。前駆体タンパク質を結合した SecB は SecA の C 末端と特異的に結合する (Fekkes *et al.*, 1997)。このようにして、前駆体タンパク質は膜透過装置に誘導される (Hartl *et al.*, 1990)。

1-2-2 SRP ホモログ Ffh によるターゲティング

真核生物の場合、合成途上の分泌タンパク質前駆体を小胞体膜通過に運命づけるSRP (Signal Recognition Particle) は、前駆体タンパク質の N 末端のシグナル配列部分がリボソームから顔を出すと結合し、翻訳を一旦停止させる。小胞体膜には SRP 受容体タンパク質が存在し、SRP-合成途上の前駆体タンパク質-リボソーム複合体が膜に誘導される (Walter and Johnson, 1994)。そして、SRPの翻訳複合体からの解離、リボソームの膜への結合、翻訳の再開と進み、合成されたタンパク質は小胞体内腔へと押し出される。SRP は、7SL RNA と 6 種類のタンパク質からなる複合体であり、そのシグナル配列認識サブユニットである SRP54 や、SRP 受容体は、GTPase 活性を持つ。大腸菌にも SRP の成分—4.5S RNA (*ffs*), SRP54 の相同体 Ffh, SRP 受容体の相同体 FtsY—が存在する。これらは、膜タンパク質のターゲティングに関与するとの報告がいくつかある (Powers and Walter, 1997; Ulbrandt *et al.*, 1997)。疎水性領域を多く含む膜タンパク質は細胞質で合成された場合凝集などが起こりやすいであろうから、翻訳とカップルした膜への挿入は特に好都合である。しかし、大腸菌では翻訳共役系の重要な要素であるリボソームと膜との強固な結合は知られていない。 *in vitro* の実験系において、膜タンパク質と、分泌タンパク質では異なる膜へのターゲティング経路を使っているのかもしれない (Koch *et al.*, 1999; Scotti *et al.*, 1999)。膜タンパク質の場合も、膜透過には SecA を必要とする (Qi and Bernstein, 1999)。

1-2-3 高次構造をとったタンパク質が膜透過されることもある

最近になって、既に立体構造をとったタンパク質を運ぶ新たな Tat 膜透過システムの存在が知られるようになった (Sargent *et al.*, 1998; Weiner *et al.*, 1998)。この系によって、モリブデンやニッケルなどの金属原子を配位した一部のタンパク質が高次構造をとった状態で膜透過される。これらのタンパク質の前駆体は「ツインアルギニンシグナル配列」と呼ばれるシグナル配列の変形を持つ。このような巨大な分子複合体を通す Tat 膜透過系の詳細はまだわかっていない。

1-3 SecA

1-3-1 SecA ATPase は膜透過の駆動装置である

SecA は ATP のエネルギーをタンパク質の膜透過に変換する、膜透過の駆動装置である。SecA は大腸菌の膜透過装置の主要コンポーネントの一つであり、膜透過装置としては唯一の ATPase である。SecA のホモログはバクテリアと、真核生物のクロロプラストに存在する。

1-3-2 SecA の構造

SecA はサブユニット分子量 101.9 kDa (901 アミノ酸) のホモ二量体の可溶性タンパク質であり、膜表面と細胞質に存在する。SecA はプロテアーゼによる限定分解実験などから、大きく分けて N 末端を含む 65 kDa のドメインと C 末端の 30 kDa ドメインに分けられる (Eichler and Wickner, 1997; Prinz *et al.*, 1996)。N ドメインには、ATP の結合部位と、膜透過の際に基質タンパク質とクロスリンクされる前駆体結合ドメイン (267-340; Kimura *et al.*, 1991) が含まれる。SecA には ATPase に共通した Walker motif をもつ ATPase ドメインが 2 箇所存在し、両方とも N ドメインに含まれる (Michell and Oliver, 1993)。高親和性 ATP 結合部位 ($K_{D,ADP} \approx 0.15 \mu\text{M}$) の NBS I (Nucleotide Binding Site I) は 102-210 番目の領域である。また、低親和性 ATP 結合部位 ($K_{D,ADP} \approx 340 \mu\text{M}$) の NBS II は 503-653 番目の領域である (den Blaauwen *et al.*, 1996; Michell and Oliver, 1993)。2 つの ATPase ドメインの間には、前駆体タンパク質と *in vitro* でクロスリンクすることから想定された、前駆体結合ドメインが存在する。

C 末端 30 kDa ドメインは、SecY との結合に関与していることが示唆されており (Snyders *et al.*, 1997)、さらには SecA の二量体形成にも関与していると考えられている (Hirano *et al.*, 1996)。また、もっとも C 末端に SecB 結合ドメイン (880-901) が存在する (Fekkes *et al.*, 1997)。

SecA の結晶構造解析が Hunt らのグループによっておこなわれており、その構造の発表が待たれる。

1-3-3 SecA の ATPase 活性

SecA の ATPase 活性は SecA 自体での内在性 ATPase 活性は低い、反転膜小胞により活性化される (Lill *et al.*, 1990)。反転膜小胞存在下での ATPase 活性を膜 ATPase (membrane ATPase) と呼ぶ。さらに、SecA、前駆体タンパク質と反転膜小胞の存在下、すなわち膜透過反応を起こす条件下では SecA ATPase は数十倍にも活性化される。このような膜透過反応により上昇した ATPase 活性を膜透過 ATPase (translocation ATPase) という。このように、ATPase 活性が SecA 以外のコンポーネントとの相互作用により ATPase 活性が変化するということから、SecA の ATPase 活性は厳密に制御されていると考えられる。Price らは、SecA をトリプシンで限定分解して N, C ドメインに分けて SecA の内在性 ATPase 活性を測定すると SecA の内在性 ATPase 活性が上昇し、膜の添加による活性上昇 (membrane ATPase) は観察されないと報告した (Price *et al.*, 1996)。このことは、SecA は分子内相互作用により ATPase 活性を制御していることを示唆する。Economou のグループでは、N 末端側 65 kDa 部分と、C 末端側 30 kDa を別々に発現させ、両者が結合しうることを示した。さらに C 末端の 30 kDa ドメインを過剰に添加することにより、N ドメインの ATPase 活性が抑制された (Karamanou *et al.*, 1999)。C ドメインの中でも特に保存された、767-818 の領域に欠失変異や 3 アミノ酸の挿入変異を導入すると、*in vitro* で N ドメインとの結合と ATPase 抑制効果が無くなることから、Economou らはこの領域を IRA (Intramolecular Regulator of ATP hydrolysis) と呼んだ (Karamanou *et al.*, 1999)。

1-3-4 SecA は膜透過の際に膜に insertion する

1994年に A. Economou と W. Wickner は、¹²⁵I でラベルされた SecA を用いて、SecA は proOmpA と ATP 存在下で反転膜小胞とインキュベートするとその一部が膜に深く挿入 (insertion) し、挿入した部分が膜によってプロテアーゼ消化からまもられた 30 kDa 断片として観察できることを報告した (Economou and Wickner, 1994)。これに、ラベルされていない過剰量の SecA を加えるとラベルされた SecA の脱挿入 (deinsertion) を観察することができる。この deinsertion は、ATP の非加水分解アナログ存在下では観察

されないことから、ATPの加水分解を必要とすると考えられている。Wicknerらは、これらのことからSecAは基質proOmpAを伴ってATP依存的に膜にinsertionし、ATPの加水分解にともなって基質を遊離し、膜からdeinsertionするというサイクルを繰り返すことにより、タンパク質膜透過を駆動しているとするモデルを提唱した(Economou and Wickner, 1994)。高親和性ATP結合部位であるNBS IのATPase活性を欠失させた変異SecAは基質タンパク質とATP依存的にinsertionできるが、過剰のSecAを加えてもdeinsertionが観察できない。低親和性ATP結合部位であるNBS IIのATPase活性を欠失させた変異SecAでは、insertion/deinsertionともに野生型と同様に観察される。これらのことから、NBS IがSecAのinsertion/deinsertion反応を制御していると考えられ、NBS IIへのATPの結合は膜透過には必要であるが、SecAのinsertion/deinsertion反応には必要ないとされている(Economou *et al.*, 1995)。Priceらは、前駆体とATP存在下でSecA insertion反応を行い、30 kDa断片を回収して精製し、そのアミノ酸配列を決定した。その結果、insertionしていた部分はSecAのC末端側の610-870部分であると結論した。この部分はSecAのCドメインに相当する。また、SecAの膜挿入実験をSecYEGを再構成したプロテオリポソームに対して行くと、SecAの前駆体とATPに呼応したinsertionの効率が低い。このことはSecAのinsertionした状態を安定化している因子が存在ことを示唆する。SecD/Fを欠失させた膜を用いてSecA insertion実験を行うと30 kDa断片の出現が観察されなくなり、SecD/Fを過剰発現した膜を用いて行くと30 kDa断片の出現が見られる。この効果はSecDFの量(SecF抗体で測定)に依存していることから、SecD/FはSecAのinsertionを安定化していると考えられている(Economou *et al.*, 1995)。SecD/FはPMFによる基質タンパク質の移動を調節するために、SecAのinsertionを安定化する事によりSecAのサイクリングを制御しているというモデルが提唱されている(Duong and Wickner, 1997b)。このSecA insertion断片がどのような環境にあるのかを調べた実験では、このドメインは脂質二重層膜からシールドされているという結果が得られている(Eichler *et al.*, 1997)。この結果は、SecY/E/Gチャンネルの中にSecAがinsertionしている可能性を強く示唆する。

1-3-5 SecAのN末端ドメインもinsertinする

SecA insertion を示す 30 kDa の特異的な断片は ^{125}I でラベルした ^{125}I -SecA でのみ観察できるので、ラベルを入れたことにより SecA が変化したためであるのではないかという疑問が投げかけられた (Chen *et al.*, 1996)。 ^{35}S -メチオニンでラベルした SecA を用いて同様の実験を行うと、30 kDa のバンドの他にいくつかのバンドが検出された。その中に 30 kDa のバンドと挙動を同じくする 65 kDa のバンドが観察され、65 kDa の N ドメインも C ドメインと同様に膜の中に insertion している可能性が示唆された (Eichler and Wickner, 1997)。Oliver のグループでは、ペリプラスム側が外側になる膜小胞 (RSO: Right Side Out membrane vesicles) において SecA は高濃度のプロテアーゼにより分解され、またペリプラスム側から SecA が化学修飾できることから、SecA の一部はペリプラスム側に露出していると報告している (Kim *et al.*, 1994)。さらに SecA のいろいろな部分にシステイン残基を一つだけ持つような mono-cystein SecA を作成し、mono-cystein SecA を発現させたスフェロプラストに対してシステイン特異的な修飾剤で修飾すると、複数の部位がペリプラスム側から修飾されることを報告した。ペリプラスム側から修飾されたのは、300, 350, 530, 858, 895 番目に導入されたシステイン残基で、300, 350 番目に導入したシステインは温度と ATP 依存的に修飾され、858, 895 番目のシステインは 0°C でも修飾される。なお、530 番目のシステインは細胞質側からも、ペリプラスム側からも修飾される (Ramamurthy and Oliver, 1997)。

1-3-6 SecA は自ら翻訳調節をしている

secA 遺伝子の発現制御の機構は少し変わっている。SecA は RNA 結合能を有しており、自身の mRNA に結合することでその翻訳を抑制し、SecA 分子の細胞内の数を調節している (Dolan and Oliver, 1991)。このような翻訳の調節を行っている SecA は細胞質に存在し、膜透過反応の阻害などに応答して SecA の翻訳が上昇する (Rollo and Oliver, 1988; Schmidt and Oliver, 1989)。この機構に関して、SecA が結合した mRNA が SecA の ORF の直前で 2 次構造をつくることによりリボソームの翻訳を止めているという報告がある (McNicholas *et al.*, 1997; Salavati and Oliver, 1997)。SecA の翻訳制御のメカニズムに関して、興味深い報告がなされた (Oliver *et al.*, 1998)。SecA は gene X-*secA* オペロンを形成しており、SecA の上流に位置する Gene X は膜透過のシグナル配

列を持っている (Rajapandi *et al.*, 1991)。このシグナル配列に変異がはいると、変異 Gene X の下流にある SecA の発現は制御されなくなる。この Gene X 変異による SecA の発現制御の欠損は、変異 Gene X をプラスミドから発現させた場合には効果を示さず、同じオペロン内にあることが必須である。Oliver らは Gene X が翻訳されると co-translocationally に膜へターゲティングされ、mRNA の二次構造変化により、SecA の発現を抑制するを考えた。つまり、Gene X はタンパク質分子の膜透過が正常に行われているかどうかを監視するセンサーとして働いてその下流にある SecA の発現量を決めている可能性がある (Oliver *et al.*, 1998)。

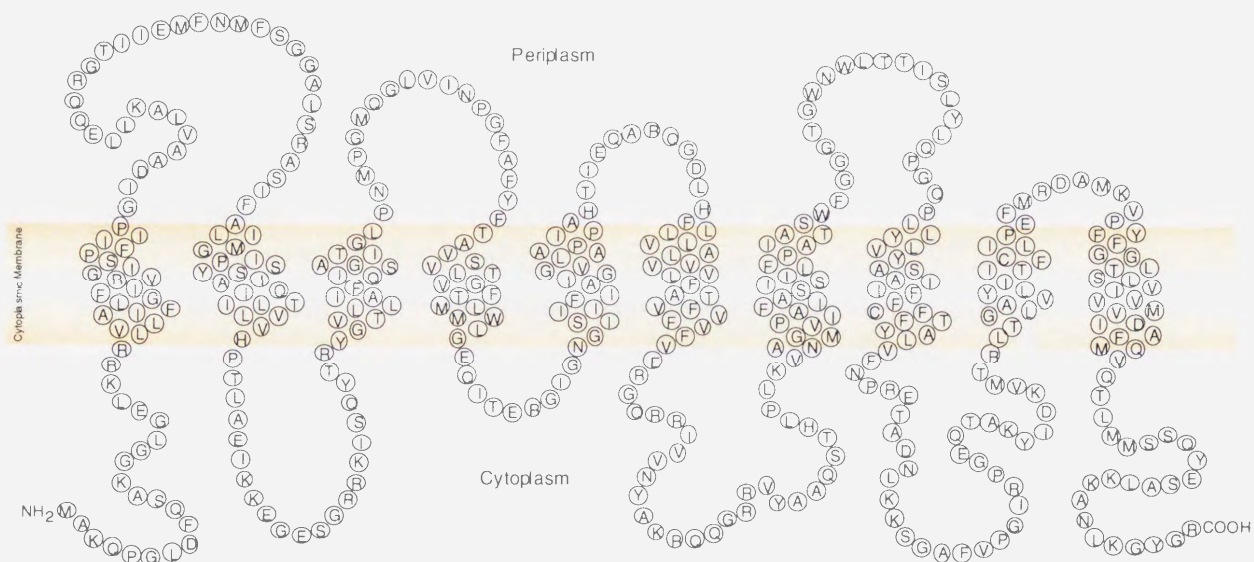
1-4 膜内在性 Sec 因子と膜透過チャネル

1-4-1 膜内在性 Sec 因子

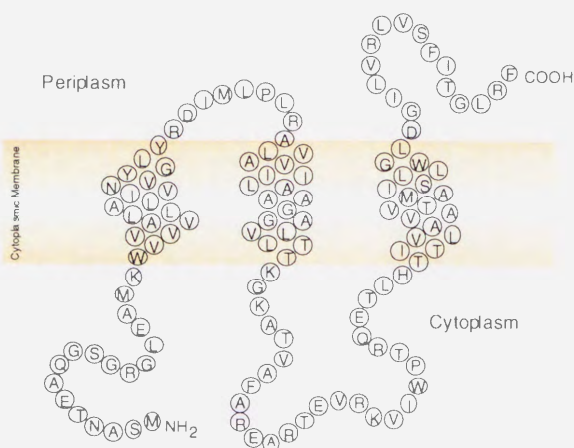
先に述べたように、SecY / SecE / SecG の三者複合体は、膜透過装置の基本構造を形成しており、その補助因子として Sec D / SecF / YajC が機能している。SecY は本研究質で同定された、分子量 49 kDa (443 アミノ酸) の膜タンパク質で、膜内在性膜透過チャネルの主要因子である。Akiyama らは、SecY の膜貫通部位と予想される領域の後ろにアルカリ性ホスファターゼを融合し、ホスファターゼ活性を調べることにより、膜貫通部位のトポロジーを決定した (Akiyama and Ito, 1987)。アルカリ性ホスファターゼはペリプラズムへ運ばれてはじめて活性を示す。その結果、SecY は 10 回膜貫通型の膜内在性タンパク質であることがわかった。そのトポロジーは N 末端と C 末端が共に細胞質側に位置している (Figure 1-1A)。SecE は 13.6 kDa (127 アミノ酸) の 3 回膜貫通型の膜内在性タンパク質で、N 末端側が細胞質、C 末端側がペリプラズムの配向をとっている (Figure 1-1B; (Schatz *et al.*, 1991))。SecG は 12 kDa (110 アミノ酸) の 2 回膜貫通型タンパク質で、N 末端および C 末端はペリプラズム空間に面している (Figure 1-1C; (Nishiyama *et al.*, 1996))。SecD と SecF はそれぞれ 67 kDa, 35 kDa の 6 回膜貫通型の膜内在性タンパク質であり、SecD / F とともにペリプラズム側に大きなドメインを持つ

(Gardel *et al.*, 1987)。YajC も 12 kDa の 1 回膜貫通型の膜内在性タンパク質であり、機能に関してはほとんどわかっていない。

A : SecY



B : SecE



C : SecG

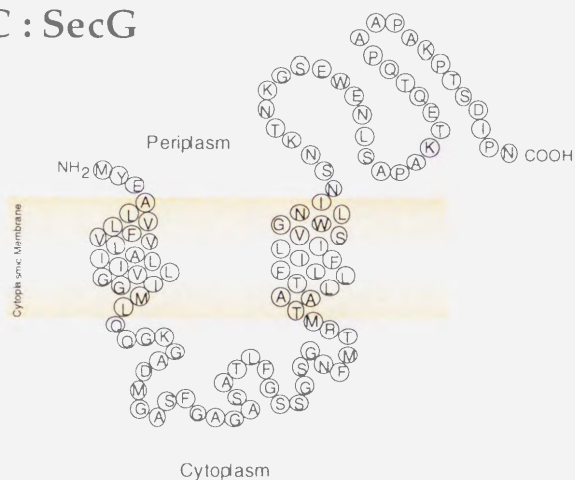


Figure 1-1: SecY (A; Akiyama *et al.* 1987), SecE (B; Schatz *et al.* 1991), SecG (C; Nishiyama *et al.* 1996) のアミノ酸配列と、膜内でのトポロジー

1-4-2 SecY, SecE は普遍的に存在する

SecY は大腸菌から酵母菌 (Sec61p)、哺乳動物 (Sec61 α) までそのホモログが見つかっており、生物に普遍的に存在するタンパク質膜透過のチャネルを構成する主要因子である。SecE にもまた、酵母菌の Sss1、哺乳動物の Sec61 γ がそのホモログとして見つかっている。一方、SecG にはそのようなホモログは報告されていない。原核生物では SecG は保存されているが、興味深いことに、グラム陽性菌では C 末端側のペリプラズム領域が大きく欠失している (van Wely *et al.*, 1999)。SecY, SecE, SecG はのそれぞれの機能と、膜透過の分子機構を探ろうとする多数の実験が、遺伝学的、生化学的におこなわれてきたが、SecYEG による膜透過の分子機構はまだ不明なところが多い。

1-4-3 SecY と SecE の相互作用

Homma らはヒスチジンタグをつけた His₆-SecE および His₆-SecY を利用した Ni²⁺-NTA アガロースカラムからの共溶出実験により、SecY と SecE, SecY と SecG がそれぞれ独立に相互作用していることを示した (Homma *et al.*, 1997)。SecYEG 複合体は、SecY に SecE, SecG がそれぞれ独立に結合していると考えられる。

secE の変異である *prlG* 変異のいくつかは *secY* の *prlA* 変異と合成致死となる。*prlA-prlG* の組み合わせ実験により、SecY の TM7,10 と SecE の TM3、SecY の P1 部分と SecE の P2 部分が SecY-SecE 相互作用に関与していることが示唆された (Flower *et al.*, 1995)。Harris と Silhavy は、*prlA3* (F67C) と *prlG3* (S120F) が合成致死になることから、*secE* (S120C) 変異をつくり、2 つのシステインの間にジスルフィド結合が形成されることを示した (Harris and Silhavy, 1999)。すなわち、SecY の P1 にある Phe と SecE の P2 にある Ser は非常に近い位置にあることが証明されたことになる。

SecY が SecE と結合していることは、単独の SecY タンパク質が不安定であることからも示されている。SecY タンパク質を単独でプラスミドから過剰発現させた場合、新規に合成された SecY タンパク質は半減期約 2 分で急速に分解される (Taura *et al.*, 1993)。この急激な分解は、SecE タンパク質を同時に過剰発現することで抑制されることから、SecYE 複合体の状態でのみ安定に存在できるものと考えられる。この SecY の分解は FtsH により行われる (Kihara *et al.*, 1995)。Baba らは、SecY の優性欠損変異

(*secY^{d1}*; Δ Arg³⁷²-Leu³⁷³-Thr³⁷⁴) と SecY の温度感受性変異株 (*secY24*; Gly240 → Asp) の研究から、SecY と SecE の相互作用には SecY の C4 領域が関与していることを示した (Baba *et al.*, 1994)。SecY と SecE の結合は、これらタンパク質がおそらく膜に局在化した後、速やかに形成され、一度 SecY-SecE 結合をつくってしまうと、交換反応はおこらないと考えられている (Joly *et al.*, 1994; Taura *et al.*, 1993)。

Rapoport のグループは、酵母菌の Sec61 複合体による小胞体への、タンパク質の翻訳後の膜透過の系を使って、タンパク質膜透過時のシグナル配列と膜透過装置の位置関係を調べた。彼らは、プレプロラクチン (pPL) のシグナル配列部分の 5, 8-29, 40-43, 56-59 番目にユニークな Lys 残基を導入したものを、Lys 残基に架橋剤がついた修飾 Lys-tRNA と ³⁵S-メチオニンを用いて *in vitro* 合成した。こうしてつくった pPL を基質として膜透過させたときに Sec61 のどの部分と架橋されるかを調べた。その結果、シグナル配列は Sec61 の TM2, TM7 とクロスリンクした。Sec61 は SecY のホモログであり、Sss1 は SecE のホモログである。以上の結果を総合して Rapoport らは、SecE の TM3 は膜透過が行われていない場合は SecY の TM2, TM7 の間に入ることでチャンネルを塞ぎ、シグナル配列がくるとシグナル配列と入れ替わりチャンネルを開くという興味深いモデルを提唱している (Plath *et al.*, 1998)。

1-4-4 SecG は膜透過の際にそのトポロジーを反転させる

SecG の抗体のエピトープは C 末端部分であるから、スフェロプラストをプロテアーゼ処理すると、ウエスタンブロットティングで SecG を検出できなくなる。逆に反転膜小胞の場合、プロテアーゼで処理すると、SecG の細胞質ドメインで切断された 9 kDa の断片が観察される。Nishiyama らは反転膜小胞において、SecG のエピトープは反転膜小胞の内側にあるはずであるのに、タンパク質の膜透過反応が SecG 抗体により阻害され、9 kDa 断片の出現パターンが、膜透過と併役して変化することを見いだした (Nishiyama *et al.*, 1996)。9 kDa 断片の出現パターンの変化が、膜透過に併役した SecA の insertion / deinsertion 反応と呼応していることから、Nishiyama と Tokuda は SecG が SecA の insertion / deinsertion 反応と併役して、膜透過の際にそのトポロジーを反転させているという、SecG inversion モデルを提唱している (Nishiyama *et al.*, 1996)。

1-4-5 SecYEG スーパーコンプレックス

シグナル仮説で仮定されていたタンパク質性の膜透過チャネルは、真核生物の Sec61 複合体が実際にリボソームの結合に依存して 3-4 個が会合してチャネル状のポアを形成していると思われる様子が電子顕微鏡で直接観察された。この Sec61 チャネルはおおよそその直径が $\sim 85 \text{ \AA}$ で、中心のポアの内径が約 $\sim 20 \text{ \AA}$ であると推定される (Hanein *et al.*, 1996)。酵母菌の Sec61 複合体と同様に近縁の枯草菌の SecY/SecE 複合体が 3-4 つ会合して、直径が $\sim 85 \text{ \AA}$ 、ポアの内径が $\sim 15\text{-}20 \text{ \AA}$ のチャネルをつくっているという報告もある (Meyer *et al.*, 1999)。大腸菌においては SecY / SecE / SecG の三者複合体がおそらく複数個会合することにより形成されると考えられているが、まだ直接観察されたという報告はない。このようなチャネルは、膜の透過障壁としての機能を保持しながらタンパク質を透過させると考えられる。Sec61 複合体では、細胞質側からはリボソームが強固に結合することにより、内側と外側を区別している。また、リボソームがチャネルから離れるときは、小胞体の内側から Bip と呼ばれるシャペロンタンパク質がチャネルをふさぐという報告もある (Hamman *et al.*, 1998; Liao *et al.*, 1997)。大腸菌では、おそらく SecA タンパク質が SecY / SecE / SecG 複合体と高親和性結合をつくるときに細胞質側からチャネルを塞いでいるのであろう。しかし、SecA がチャネルを塞いでいるという直接の証拠はない。

1-4-6 secY 変異株の分離による SecY 機能の解析

SecY の機能欠失型変異として *secY^{d1}* (C5; $\Delta\text{Arg}^{372}\text{-Leu}^{373}\text{-Thr}^{374}$) が分離されており、その過剰発現は優性欠損の表現型を示す (Shimoike *et al.*, 1992)。*secY^{d1}* の優性欠損のマルチコピーサプレッサーとして、*syd* が Shimoike らにより同定されており、Syd 自身の機能は未知であるが、単独 SecY タンパク質を安定化させるものと考えられている (Shimoike *et al.*, 1995)。Syd 過剰発現は、*secY24* に特に激しい増殖阻害を起こす。これは SecY24 が SecE との相互作用が弱まった結果、Syd が SecY24-SecE の結合に介入して、チャネルを壊してしまうためであると考えられる (Matsuo and Ito, 1998)。Matsuo らは、*in vitro* で実際に SecY24-SecE-SecG 複合体が形成する SecA の高親和性結合部位

を Syd が破壊することを示した (Matsuo, 1998)。SecE の C2 領域には高く保存された領域があり、Syd とともにホモロジーが高いことから、その部分と SecY の C4 領域が相互作用していると考えられる (Shimoike *et al.*, 1995)。

SecY の機能低下型変異の分離が Taura らにより精力的に行われ、多数の低温感受性変異が同定された (Taura *et al.*, 1994)。後で詳しく述べるが、SecY の低温感受性変異の *in vivo*, *in vitro* 膜透過活性、SecA translocation ATPase 活性が調べられ、SecY の膜透過促進活性に、C 末端近くの細胞質領域 C5, C6 が特に重要であることが見出されている (Taura *et al.*, 1994; Taura *et al.*, 1997)。

prl 変異はシグナル配列に変異をもつ分泌タンパク質でも膜透過させてしまう変異である。*prlA* が *secY* の変異であることはすでに述べた。Tomassen らは *prlA* 変異株では CCCP に対する感受性が低くなることを見だし、*prlA* 変異株より調整した反転膜小胞においても、膜透過における PMF の依存性が低下していることをしめした (Nouwen *et al.*, 1996)。SecY はシグナル配列の認識と挿入など、膜透過の初期反応に PMF を利用しているのかもしれない。彼らは、*prlA4* 変異 (F286Y, I408N) により、PMF に対する感受性が低下することから、*prlA* 変異により SecY を中心とする膜透過チャンネルがゆるんだ構造になっているのではないかという説を提唱している (Nouwen *et al.*, 1996)。*prlA* 変異は、シグナル配列の認識が甘くなった変異であるから、PrlA 反転膜小胞 (IMV) は *in vitro* でシグナル配列に変異を持つ基質を膜透過させることができる。Driessen のグループは、PrlA4 IMV において、シグナル配列に変異を持つ $\Delta 8$ proOmpA を基質とした場合、 $\Delta 8$ proOmpA の PrlA4 IMV への結合が増加し、それは SecA-SecY/PrlA の結合が野生型と比べてより強固になったためであると報告した (van der Wolk *et al.*, 1998)。そのため、PrlA4 チャンネルでは、間違ったシグナルを装置から排除することなく、膜透過させてしまうのであろう。

1-5 本研究の背景と目的

Economou らによって提唱された、SecA によるタンパク質膜透過駆動の分子機構としての insertion / deinsertion モデルは、タンパク質膜透過機構の解明する上で極めて重要なモデルである。SecA がinsertion/deinsertion サイクルを繰り返して膜透過を駆動するとすれば、その insertion が SecYEG チャンネルの中で行われるのか、それとも単に脂質層で行われるのかという問題は、膜透過の機構を考える上で非常に重要な問題である。また、SecA の insertion というダイナミックな動きが膜透過の駆動にどのように関与しているのかということや、SecA insertion 反応が *in vivo* においても実際に膜透過を駆動しているのかなども SecA の膜透過駆動機構の根本的な問題ともいえる。本研究では、このような問題点を解明すべく、当研究室の財産である SecY の低温感受性変異株を用いて、遺伝学と生化学の手法を駆使して研究を行なった。

本研究で使用した SecY の低温感受性変異は、当研究室の田浦徹也氏によって分離された。これらの *secY* 変異は、局所的導入法により *secA-lacZ* 遺伝子の発現上昇を指標として分離された (Figure 2-1; Taura *et al.*, 1994)。さらに、各 *secY* 変異株から調製した反転膜小胞を用いて、*in vitro* 膜透過反応と、SecA の translocation ATPase 活性を測定した。その結果、特に translocation-ATPase 活性が低下しているものは、SecY の C5, C6 に変異をもつ傾向があることがわかった。また、SecY の優性欠損変異である *secY*^{d1} は SecY の C5 領域に 3 アミノ酸の欠失が生じており、不活性になった変異であると考えられている。これらの結果は SecY の C5, C6 領域が SecY の機能発現と SecA との機能的な相互作用に重要であることを示唆している。

本研究以前には SecA と SecY の相互作用に関する知見は数少なく、はっきりとした証拠はなかった。報告されている SecA-SecY を関係づけるような知見としては、次のように、全て *in vitro* の実験によるものである。SecA の translocation ATPase を指標として、SecY 抗体で処理した IMV を用いた場合には SecA の translocation ATPase 活性は観察されず、SecY 抗体を SecY ペプチドで不活性化すると translocation ATPase が観察され

るようになる (Lill *et al.*, 1989)。SecYEG 過剰発現 IMV と SecA の結合実験では高親和性結合部位の数が増加し、SecY 抗体存在下で IMV と SecA の結合実験をすると、SecA の結合は SecY 抗体の濃度依存的に減少する (Douville *et al.*, 1995)。SecA とリポソームでは高親和性結合は見られないが、SecYEG を含むプロテオリポソームでは高親和性結合をおこす (Hendrick and Wickner, 1991)。IMV を低濃度トリプシンで処理すると、SecA 存在下で SecY はトリプシン消化がされにくくなる (Hartl *et al.*, 1990)。この SecA によるトリプシン消化からの SecY の保護は、proOmpA、SecB ではみられない。SecYEG 過剰発現 IMV では SecA の insertion が昂進すること (Douville *et al.*, 1995)。SDS で変性させた SecY を固定し、精製した SecA を用いたリガンドプロットティングを行うと、SecA が SecY に結合する。SecY の N 末端から 107 残基までの部分 (N 末端から TM2 まで) が SecA と結合し、その結合は SecA の C 末端領域で起こる (Snyders *et al.*, 1997)。これらの知見は、SecY-SecA の相互作用と結合を示唆するものであるが、直接的に証明したとはいえない。

当研究室で分離された機能低下型 *secY* 変異をもちいた研究は、他の研究室ではなしえない、SecY に関する重要な知見を与えてくれることが期待できる。本研究では、その点に目を付け、タンパク質膜透過における重要な問題の一つである、膜透過反応において SecA はどのようにして膜透過を駆動し、その SecA の動きに SecY がどのような関与をしているのかという問題をとりあげた。それは前駆体タンパク質・SecA 複合体の膜への insertion 反応の理解なしには解決されない。私はこの問題へのアプローチとして、まず SecA の insertion/deinsertion の過程に SecY の変異がどのような影響を与えるかを調べることから始めた。その結果、SecA の insertion 反応が *secY205* 変異により損なわれることを見いだした。また、*secY205* 変異をサプレスする SecA 変異を分離した。この結果をもとに、SecY-SecA の相互作用と、SecA の駆動のメカニズムについて考察した。変異 SecA タンパク質を精製し、生化学解析を行った。

また、この *secA36* 変異が SecG 欠失変異株の低温感受性もサプレスする事がわかり、その解析により SecG の機能に関して考察した。

Chapter 2 結果

2-1 SecA の insertion を損なう *secY* 変異の同定

2-1-1 低温感受性 *secY* 変異における SecA insertion

Economou と Wickner は、 ^{125}I でラベルされた SecA を用いて、SecA は proOmpA と ATP 存在下で反転膜小胞とインキュベートするとその一部が膜に深く挿入 (insertion) し、insertion した部分が膜によってプロテアーゼ消化からまもられた 30kDa 断片として観察できることを報告した。これに、ラベルされていない過剰量の SecA を加えるとラベルされた SecA の脱挿入 (deinsertion) を観察することができ、この deinsertion は ATP の加水分解を必要とする。これらのことから、SecA が基質 proOmpA を伴って ATP 依存的に膜に insertion し、ATP の加水分解をともなって基質を遊離し、膜から deinsertion するサイクルを繰り返すことにより、タンパク質膜透過を駆動しているものと考えた。これはタンパク質膜透過のメカニズムとして画期的なモデルといえるが、SecA insertion が実際に膜透過を駆動していること、また *in vivo* でこのメカニズムが働いていることが確立した訳ではない。さらに SecA の insertion / deinsertion が膜の脂質二重層で行われるのか、それとも SecYEG 膜透過チャンネル中で行われるのかということも、まだはっきりとは解っていなかった。本研究ではこのような問題へのアプローチとして SecA の insertion / deinsertion に SecY 変異がどのような影響を示すかを調べることにした。SecA の insertion 反応に異常を与えるような SecY 変異が同定できれば、SecA の膜への insertion 反応に SecY が関与していることの遺伝学的な証拠となり、SecA と SecYEG との相互作用による膜透過機構の研究の重要な知見となる。

まず Economou-Wickner の実験の追試を行い、それが再現できることを確認した。SecA の膜への insertion 反応は、以下のような方法で観察することができる。SecA を ^{125}I でラベルし、その ^{125}I -SecA と精製した proOmpA、SecB と高濃度の尿素処理により膜表在性 SecA を失活・除去した反転膜小胞 (IMV: Inverted Membrane Vesicle) を混

合し、37°Cでインキュベートする。その後、氷上でトリプシン処理することで、膜によりトリプシン消化から免れた30 kDaのSecA断片が観察される。このSecAの30 kDa断片は界面活性剤TritonX-100で膜を可溶化するとトリプシン消化を受けて観察されなくなることから膜によりプロテアーゼから保護されたものと考えられる。すなわちSecAはproOmpAとATP依存的に膜に深くinsertionするものであることが示唆される。非加水分解アナログであるATP- γ -SやAMP-PNP存在下でも30 kDa断片は出現するから、insertionにはATPは必要であるが、その加水分解は必要でないことがいえる。なお、反転膜小胞が存在しなくてもSecA自体低濃度のトリプシン処理によって30 kDa断片を含むいくつかの断片を生じるが、これらは膜挿入実験で用いる高濃度のトリプシンにより完全に消化されてしまう。また、0°CではSecAのinsertionは起こらない。proOmpA, ATP存在下でSecAの「insertion」を起こさせた後、過剰量の非標識SecAを加えて更にインキュベートすると、¹²⁵Iラベルを持つトリプシン耐性の30 kDa断片は消失する。ATP- γ -S存在下ではこの消失は起こらない。従ってATPの結合に伴って膜にinsertionしたSecAは加水分解を伴いdeinsertionを起こすものと考えられる。

proOmpAとATPの存在下で観察されるSecAの30 kDa断片は、¹²⁵I-SecAのATP依存的膜挿入(insertion)と、ATPの加水分解依存的脱挿入(deinsertion)の平衡による定常状態を見たものである。過剰量の非標識SecAの添加によるチェースの実験は、¹²⁵I-SecAと後から加えた非標識SecAの交換が起きていることを意味する。なお、ATP- γ -SやAMP-PNP存在下ではSecAのinsertionがproOmpAを加えなくても観察される。このことは基質がないときでもSecAのinsertionはある程度の頻度で起こっており、非加水分解アナログ存在下ではinsertionしたSecAのdeinsertionが阻害されるためこのような「空荷」のSecAのinsertionが観察可能になるものと考えられる。

大腸菌の分泌タンパク質の膜透過に働く、膜内在性タンパク質SecY / SecE / SecG三者複合体と膜表在性のSecAの相互作用に関してはあまりよくわかっていない。特にSecAの膜へのinsertionがはたしてSecYEG「チャネル」部位でチャネルの中に起こるのかとすることは、膜透過機構の重要な問題である。secY変異のなかからSecAのinsertion / deinsertionの挙動を変化させるものを同定することができれば、SecAの膜挿入にSecYが関与していることの証拠となる。

我々の研究室で Taura らにより分離同定された 11 種類の SecY の低温感受性変異株 (Figure 2-1) から、反転膜小胞を調整し、SecAの膜への insertion 反応に異常がみられるものがあるかどうかを調べた。Taura らによれば、SecY の C5, C6 領域に変異をもつものは、*in vivo*, *in vitro* における膜透過活性、translocation ATPase 活性が低い傾向が見られる。また、P1 に変異をもつ *secY125* は、*in vivo* の分泌活性が低いのが、*in vitro* で膜透過活性、translocation ATPase 活性は野生型とあまり変わらない (Figure 2-1)。

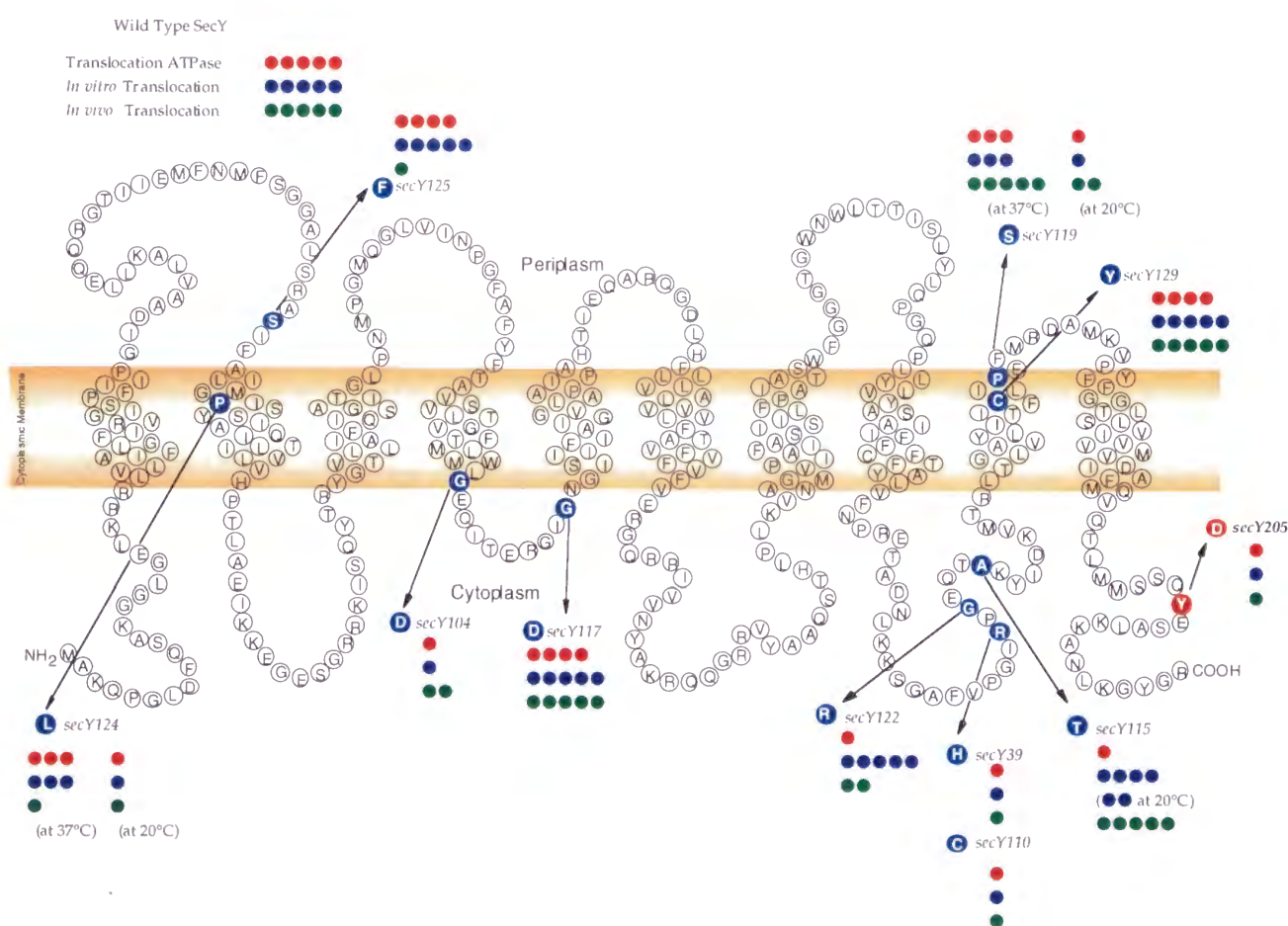


Figure 2-1 : 本研究で使用した低温感受性secY変異株の変異部位とアミノ酸置換、translocation ATPase 活性、*in vivo*, *in vitro* translocation 活性はをしめた (Taura, *et al.* 1994, Taura, *et al.* 1997)

私は、まず、全ての変異 *secY* 遺伝子を P1 ファージによる形質導入によって *uncB-C*

欠損株 (TW155) のバックグラウンドに移した。これは ATPase 活性の測定に影響を及ぼしたり、プロトン駆動力 (PMF: Proton Motive Force) の生成を複雑にすると考えられる F1-F0 ATPase を含まない膜小胞を使用するためである。 *secY* 遺伝子を P1 形質導入するために、 *secY* 遺伝子近傍の *zhd33::Tn10* (テトラサイクリン耐性) を選択マーカーとして利用した。なお、このトランスポゾン (*zhd33::Tn10*) の挿入位置は、大腸菌染色体上の *secY* 遺伝子から *rpsE* と同じ側に約 23 kbp 離れた *bfr* 上にあることがわかった。*bfr* 遺伝子は、バクテリオフェリチン (bacterioferritin) の構造遺伝子で、鉄イオンを細胞内に蓄えるためのタンパク質らしい。*bfr* 中の *zhd33::Tn10* 変異自身はタンパク質分泌に影響しない。11 種類の *secY* 変異を *zhd33::Tn10* を選択マーカーとして TW155 に P1 形質導入し、 *unc* の *secY* 変異株を構築した。これら *unc* の *secY* 変異株より反転膜小胞を調製し、膜表面に存在する SecA タンパク質を 6 M の尿素で失活させその一部を除去した。これらの反転膜小胞中に含まれる SecY の量がほぼ同程度であることは、ウエスタンブロッティングにより SecY を定量する事により確認した。

urea 処理をした反転膜小胞を ATP, proOmpA の存在下または非存在下で ¹²⁵I-SecA を用いて SecA insertion assay を行ったところ、2 つの変異株において異常が観察された。後で詳しく述べるが、 *secY205* では proOmpA と ATP の存在下でも SecA の 30 kDa 断片の形成がまったく観察されなかった (Figure 2-2) 。 *secY125* 変異株からの膜小胞では野生型と比べて SecA の 30 kDa 断片の形成に顕著な昂進が観察された (データ省略)。その他の変異株からの膜小胞では著しい異常は観察できなかった。例えば、激しい分泌欠損を示す *secY39* 変異でも、 ATP と proOmpA に依存した SecA の膜への挿入反応に関しては正常に近く起こっていた。その他の 20°C で生育できない *secY104*、 *secY115*、 *secY129* でも顕著な異常は認められなかった。それ以外の変異株についても実験によっては多少の差は観察されたが再現性よく異常が顕著に認められるものはなかった。

2-1-2 *secY205*変異により “productive” な SecA insertion が損なわれる

secY205 変異株より調製した反転膜小胞では、ATP と proOmpA に依存した SecA の 30 kDa 断片は全く検出できない (Figure 2-2; レーン 2)。一方、ATP の非加水分解アナログ (ATP- γ -S、AMP-PNP) の存在下では SecA の膜挿入は *secY205* の膜へも野生株の膜小胞の場合に比べて同等ないし少し弱い (1/2~1/3) 程度に起こった (Figure 2-2; レーン 4,5,9,10)。ATP アナログ存在下では proOmpA が存在しなくてもこの insertion は起こる。即ち、*secY205* においては ATP と proOmpA とに依存した (膜透過と共役した) insertion のみが損なわれているように見える。

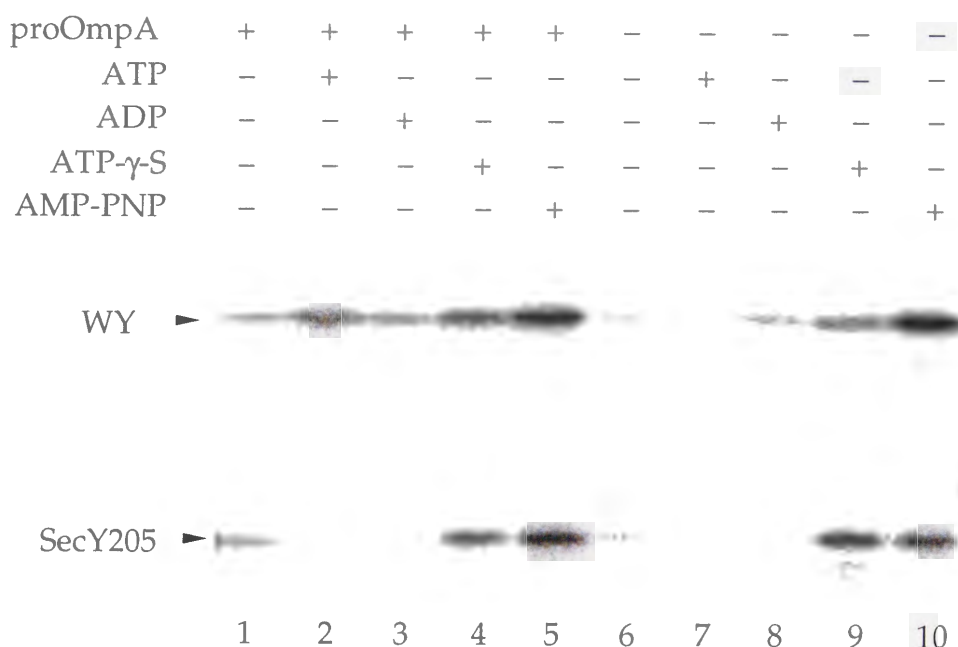


Figure 2-2 : *secY205* における SecA insertion の欠損

125 I-SecA と IMV を 0°C で 30 分間インキュベートし遠心分離して 125 I-SecA を結合した IMV を調製した。その IMV を図に示した条件で SecB とともに 37°C で 15 分間インキュベートし、1 mg/ml のトリプシンで処理 (0°C、15 分) した。SDS-PAGE によるタンパク質の分離後、オートラジオグラフィーで SecA の 30 kDa 断片 (矢印) を検出した。

SecY205 は SecA との親和性が極端に低下して、高親和性結合部位を形成できていないために、SecA insertion が観察できないという可能性を考え、SecA の反転膜小胞への

結合アッセイ (Scatchard analysis) を行った (Figure 2-3) 。 SecY205 変異株からの反転膜小胞との高親和性結合の K_D 値は 61 nM、野生型では 16 nMで、SecY205 では野生型の約 40% 程度の値であったが、高親和性結合部位の数は野生株とほぼ等しかった。SecY205 変異では SecA と膜との親和性の低下が見られたが、SecA の膜挿入実験では K_D 値よりはるかに高濃度 (1000 μ M) の SecA を使用しているので、膜挿入の欠損にたかだか 2.5 倍程度の K_D 値の違いが反映されているとは考えにくいように思われる。

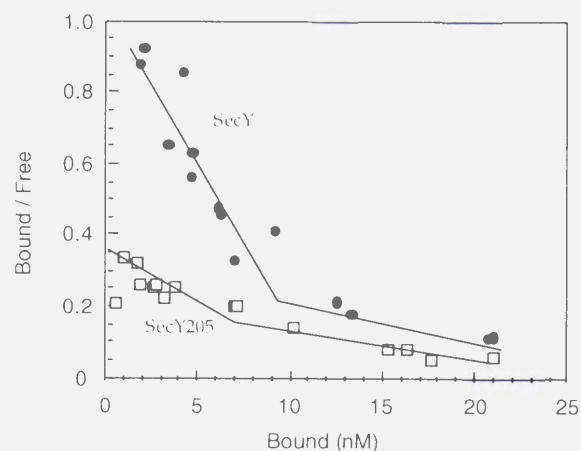


Figure 2-3: SecA の反転膜小胞に対する親和性の解析

125 I-SecA を SecY205 または野生型の反転膜小胞 (5 μ g) と混ぜ、50 μ l の反応系で 0°C で 30 分間インキュベートした。遠心分離 (13,000 rpm、10 分) により上清と膜画分とに遠心分離し、それぞれの放射能を測定した。解離定数 (Kd) と結合部位の数はそれぞれ野生型 (●) では 16 nM、 3.3×10^{12} 個/ μ g-IMV、SecY205 (□) では 61 nM、 4×10^{12} 個/ μ g-IMV であった。

ところで、ATP の非加水分解アナログ存在下では proOmpA の存在、

非存在に関わらず SecA insertion が起こるが、この反応は SecY205 でも起こった。このことは、i) ATP と proOmpA に依存した (膜透過と共役した) SecA の insertion は損なうが、空荷での insertion は損なわない、ii) 両者とも同等に損なわれているが、ATP アナログ存在下での実験では insertion したものが徐々に蓄積してくるために一見欠損の度合いが小さく見える、の 2 つの可能性が考えられる。これらの可能性を検討するため、AMP-PNP 存在下、かつ proOmpA の非存在下での SecA の insertion の初速度を野生型膜と SecY205 膜とで比較した。i) の可能性の場合、SecA insertion は野生型と同様の kinetics でおこり、平衡状態になることが予想され、ii) の場合では、SecY205 膜では insertion は大幅に遅いが徐々に 30 kDa 断片が蓄積していくと予想される。実験結果 Figure 2-4 は、SecA の膜への insertion のレベルは、野生型と比べて secY205 変異では 1/3 程度ではあるが、野生型と同様の kinetics で約 3 分で頂点に達した。従って、AMP-PNP 存在下における proOmpA に依存しない空荷の SecA insertion は、SecY205 の反転膜小胞でも 1/3 程度にしか欠損していないことが示された。なお、Taura らの研究で、

SecY205 はtranslocation ATPase 活性が低下している変異であることがわかっており、私も確認した (2-2-4 参照)。SecA の deinsertion は ATP の加水分解をとまなうものであるから、SecY205 で deinsertion が昂進しているとは考えにくい。

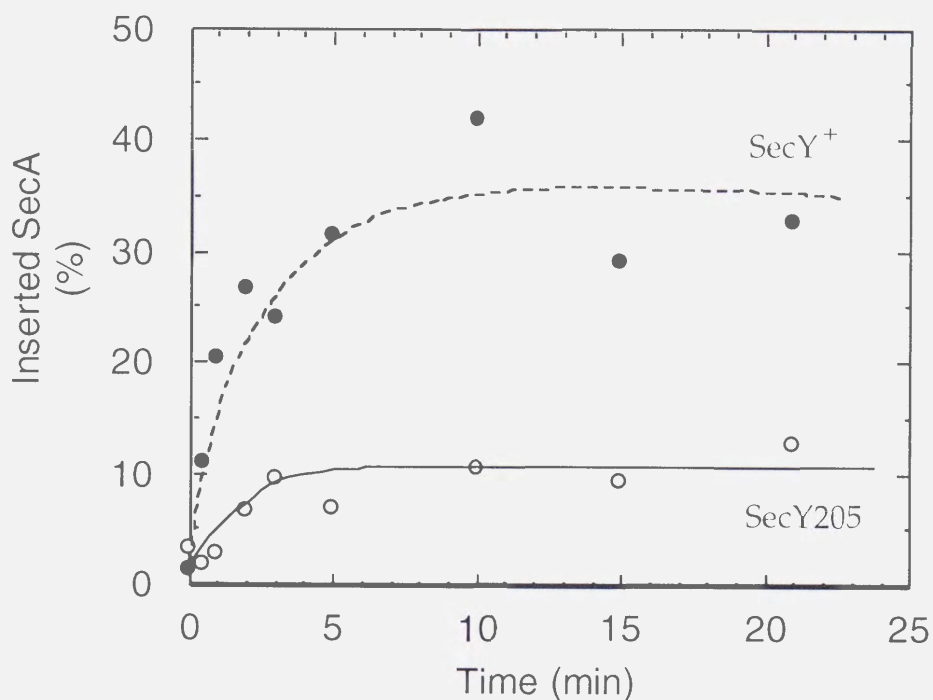


Figure 2-4 : AMP-PNP存在下でのSecA膜挿入のkinetics

¹²⁵I-SecAと野生型またはsecY205のIMVを0℃、30分間インキュベートし、遠心分離により¹²⁵I-SecAが結合したIMVを調整した。このIMVとAMP-PNPを37℃でインキュベートし、それぞれの時間に一部取り出し15分間のトリプシン消化をした。SDS-PAGEによるタンパク質の分離後、オートラジオグラフィーでSecAの30kDa断片を検出し、デンストメーターによりバンドを定量、プロットした。反応に使用したSecAの量を100としたSecA 30kDa断片の割合をInserted SecA (%)とした。野生型を●、SecY205を○で表した。

以上述べたように、SecY205 は proOmpA と ATP に依存した“productive”な SecA の insertion が特異的に欠損した変異である。このような secY 変異が存在することは、SecA の insertion に SecY が深く関わっていることを示唆している。

2-2 *secY205* 変異をサプレスする *secA36* 変異の分離と解析

2-2-1 *secY205*変異株の低温感受性をサプレスする *secA*変異の分離

前節で述べたように、*secY205* 変異により ATP、proOmpA に依存した SecA の膜への挿入が損なわれる。*secY205* 変異により SecY-SecA の相互作用が特異的に変化し、このことが *secY205* 変異株のタンパク質分泌と増殖を低温感受性としている可能性が考えられる。もしそうであれば、今度は *secA* 側の変異により SecY205 変異タンパク質の機能欠損を回復させることができるかもしれない。即ち *secY205* の低温感受性をサプレスするような *secA* 変異を分離することができれば、*secY205* が SecY-SecA 相互作用の変異であることがわかり、ひいては SecY と SecA の間に特異的な相互作用が存在し、膜透過において重要な役割を果たしていることの遺伝学的な証拠となり得る。*secY205* 変異株は、本来 20°C で生育できないが、さらに変異を起こさせることにより 20°C でも増殖可能となったものを分離した。次節で詳しく述べるが、変異体の分離には、*secA* 遺伝子近傍の *leu* 遺伝子の内部にトランスポゾン Tn10 (テトラサイクリン耐性マーカーを持つ) が挿入した菌株を N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NG) で処理して変異を誘起させ、P1 *vir* フェージによる形質導入を利用した局所の変異誘起法 (localized mutagenesis) により、20°C で *secY205* 変異の増殖を回復させる SecA 領域の変異を分離した。3-6 株はそのうちの 一つである。3-6 株について *secA* 遺伝子の塩基配列の決定をおこなった。その結果、*secA* 遺伝子内に C355T の 1 塩基置換が生じていた。この塩基置換は、SecA の高親和性 ATP 結合部位 (NBS I) の領域にあり、Ala 112 を Val に置換させるものである。この *secA* 変異を *secA36* と命名した。

secA36 変異による低温感受性(Cs)の抑制が *secY205* 変異に特異的なものであるのかを調べた。*secY205*以外の低温感受性*secY*変異株にそれぞれのサプレッサー*secA*変異を P1形質導入により選択マーカー*leu::Tn10*を利用して導入した。テトラサイクリン耐性の形質導入体の20°Cでの増殖を調べた。サプレッションが起これば約40%の頻度でCs⁺の形質導入体が現れるはずである。しかし、*secA36* 変異株を donor としても Cs⁺ の形質導入体は*secY205* を recipient とした時にのみ出現し、その他の*secY*変異(*secY39*, *secY104*, *secY125*, *secY129*) および、*secE501* 変異の低温感受性変異株を recipient とした時には得

られなかった。これら形質導入株から再び P1 *vir* 溶菌液を調製し、再度 *secY205* 変異株に形質導入することにより、サプレッサー変異が確実に導入されていることを確認した。従って、*secA36* 変異は *secY205* 以外の *secY* 変異をサプレスしない。言い換えれば、サプレッションは allele 特異的なものであるといえる。allele 特異性は遺伝学ではサプレッションの機構を考える上で重要な情報であり、タンパク-タンパク相互作用の「鍵と鍵穴」的な相互認識の変化を示唆するものである。

これらの結果より *secA36* 変異による Cs のサプレッションが *secY205* 特異的であるということは、SecA タンパク質が SecY タンパク質と直接の相互作用をすることに関する初めての遺伝学的な証拠である。

2-2-2 *secA36* 変異が *secY205* 変異株のタンパク質分泌に与える影響

secA36 変異が *secY205* の低温での分泌欠損を回復させるかどうかを調べた。マルトース結合タンパク質 (MBP) と OmpA タンパク質の分泌をパルスラベル法により調べた。MBP と OmpA は分泌タンパク質前駆体 (precursor) として合成された後、*sec* 因子依存的に細胞質膜を透過し、シグナル配列が切られて成熟体 (mature form) となる。37°C で培養した培養液を、20°C に移してから 20 分後に、³⁵S-メチオニンでパルスラベルした (37°C では 30 秒、20°C では 1 分間: Figure 2-5)。

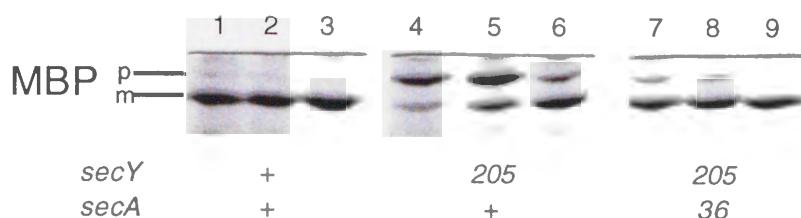


Figure 2-5: *secA* サプレッサー変異による *secY205* の低温感受性分泌欠損の回復

野生株 (GN40、レーン 1-3)、*secY205* 変異株 (GN17、レーン 4-6) あるいは *secY205* からのサプレッサー変異株 GN25 (*secA36 secY205*: レーン 7-9) を 37°C で培養し、20°C に移して 20 分培養してから [³⁵S]メチオニンを用いてパルスラベルし、コールドメチオニンで 0.5 (lanes 1, 4, 7, 1 (lanes 2, 5, 8), 5 (lanes 3, 6, 9) 分間チェイスした。標識培養液は直ちに TCA 処理により全タンパク質を沈殿させ、SDS にて可溶化後、MBP の抗体で抗体沈殿をおこない、MBP

をオートラジオグラフィーにより検出した。p、mはそれぞれ前駆体(precursor)、成熟体(mature)を表す。

secY205 変異単独では、37°C でも若干の分泌阻害が起きており、20°C へ温度シフトするとさらに激しい分泌阻害が観察された。これに対し、*secA36* との二重変異株では MBP の前駆体の蓄積が 7 割がた減少するほど分泌阻害の回復が顕著に見られた。よって、*secA36* は *secY205* の分泌阻害を回復させる変異である。*secA36* 変異が *secY205* の分泌欠損を allele 特異的に回復させることは、SecA が SecY と相互作用することによりタンパク質の分泌を駆動していることを強く示唆する。

2-2-3 SecA36 変異タンパク質の精製

SecA36 変異タンパク質を精製し、*in vitro* でその性質を解析した。

secA36 変異遺伝子をクローニングし、大量発現可能なプラスミドを構築した (pGN101)。このプラスミドから SecA タンパク質は、1 mM IPTG で誘導することにより大過剰に発現する (Figure 2-6)。SecA36 と

SecA⁺ タンパク質を以下の要領で精製した (データ省略)。対数増殖

期にある培養液に 1 mM IPTG を加え、2 時間後に菌体を回収した。超音波で菌体を破碎し、超遠心分離で膜画分を除去した無細胞抽出液を RED-Agerose カラムにかけた。このカラムは ATP アナログが担体についており、ATP 結合タンパク質を特異的に結合させることができる。60 mM から 2 M の KCl の塩濃度勾配で溶出させると SecA タンパク質は、高塩濃度の部分まで幅広く溶出するが、その他のタンパク質は低塩濃度の画

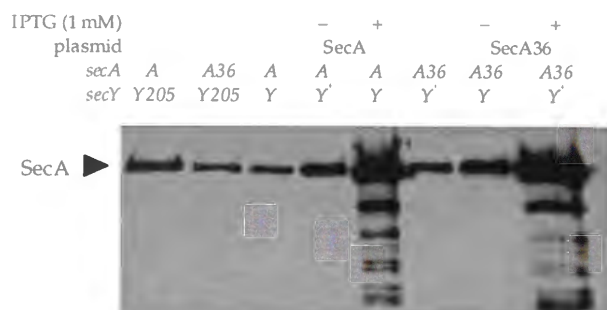


Figure 2-6: SecA の発現量; クレットユニット = 60 まで培養した菌を TCA 沈殿し、SecA 抗体で Western blotting した。

分で溶出するので、高塩濃度側の画分を一分取した。透析後、陰イオン交換カラム (DEAE) にかけて濃縮し、ゲル濾過により脱塩した。この精製過程により約 90% 以上の均一さで精製できた。

2-2-4 SecA36 変異タンパク質の ATPase 活性

SecA の ATPase 活性に関して、3 種類の活性が定義されている。SecA タンパク質単独の内在的 ATPase (endogenous ATPase)、基質タンパク質が存在しない状態で、膜が存在する場合の膜 ATPase (membrane-ATPase)、そして、膜透過の基質タンパク質と SecYEG を含む膜が存在する場合の、タンパク質膜透過反応と共役した膜透過 ATPase (translocation-ATPase) である。translocation ATPase 活性は、基質タンパク質存在下で得られた ATPase 活性から、基質非存在下での membrane ATPase 活性を差し引いた値と定義する。ATPase 活性の測定には i) マラカイトグリーンとモリブデンの反応を利用した遊離したリン酸の濃度を比色定量する方法 (マラカイト法) と ii) ATP の加水分解によってできた ADP を NADH から NAD^+ に変換する反応に置き換え、NADH の吸光 (340 nm に吸収極大を持つ) の減少を測定する方法 (酵素カップリング法) の 2 通りの測定のしかたがある。i) のマラカイト法を利用して、SecA36 の ATPase 活性の測定を行った。TW156 (SecY^+ , SecA^+), GN5 (SecY205 , SecA^+) から調製した反転膜小胞を 6 M urea で処理して、膜表面に結合している SecA タンパク質を除去した。この urea 膜と精製 SecA^+ , SecA36 タンパク質を proOmpA 存在下、非存在下で ATPase を測定した。translocation ATPase 活性を Figure 2-7A に示し、この時の membrane ATPase 活性を Figure 2-7B に示す。SecA36 では SecY205 , SecY^+ とともに membrane ATPase 活性が 2 倍程度上昇していた。SecA36 は野生型と比べて、membrane ATPase 活性が高くなっている。また、データは省略するが、endogenous-ATPase 活性も SecA36 が野生型の約 2 倍程度高いという結果を得ている。

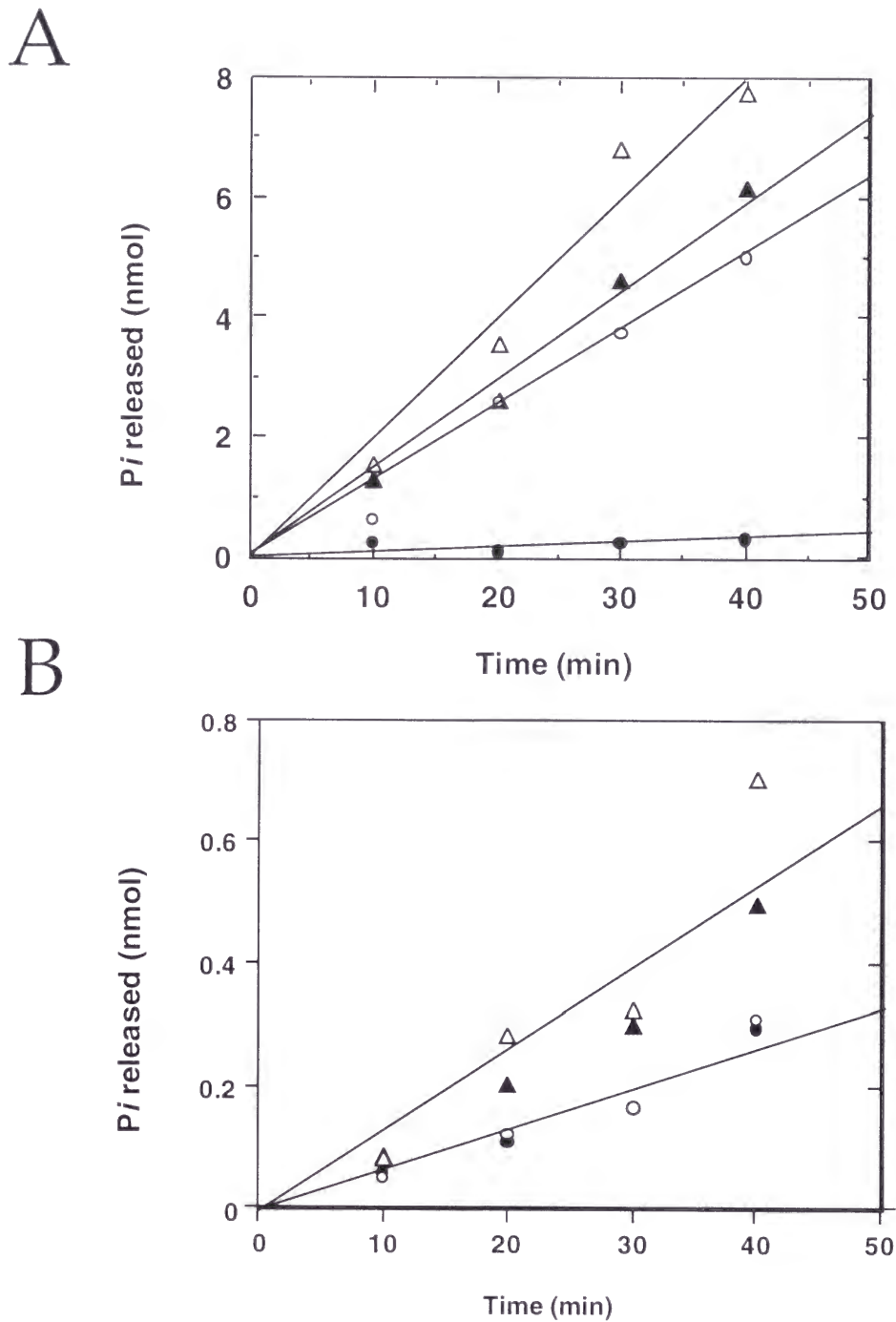


Figure 2-7: SecA36 の ATPase 活性

SecA⁺, SecA36 を SecY⁺, SecY205 IMV と組み合わせ、37°C での ATPase 活性を proOmpA 存在下、非存在下で測定した。A; 膜透過 ATPase (Translocation ATPase) proOmpA 存在下での値と proOmpA 非存在下での値の差を膜透過 ATPase 活性とした。B; 膜 ATPase (membrane ATPase) \circ ; SecY⁺ IMV-SecA⁺, Δ ; SecY⁺ IMV-SecA36, \bullet ; SecY205 IMV-SecA⁺, \blacktriangle ; SecY205 IMV-SecA36.

SecY205 膜と、SecA⁺ の組み合わせでは、translocation ATPase 活性はほとんど観察されない。ところで、SecA insertion / deinsertion のサイクルにおいて、SecA insertion には ATP の結合が、deinsertion には ATP の加水分解が必要でと考えられている。SecY205 膜において、SecA⁺ が非常に低い translocation-ATPase 活性しか示さないということは、SecY205 における膜透過と共役した SecA insertion が観察されない (Figure 2-2 参照) 原因が、deinsertion の昂進ではないことを示唆する。SecY205 と SecA36 を組み合わせると、野生型と同等まで translocation ATPase 活性が回復していた。SecA36 は SecY205 膜に対しても、野生型どうしの組み合わせと同等の translocation ATPase 活性を示すことは、SecA36 タンパク質は SecY205 変異膜透過チャネルにたいしても機能できることを示している。

2-2-5 SecA36 による SecY205 IMV への *in vitro* translocation

SecA36-SecY205 の組み合わせにより、SecA translocation ATPase 活性は回復していたが、実際の膜透過活性はどうであろうか。*in vitro* 翻訳した ³⁵S-proOmpA を用いて *in vitro* 膜透過実験を行った。urea 処理をした反転膜小胞 (IMV), SecA タンパク質, ATP, ³⁵S-proOmpA を 37°C で incubate し、各時間にサンプルの一部を取り出し、1 mg/ml trypsin で 15 分間消化する事により、膜小胞の外にある ³⁵S-proOmpA 分子を除いた。その後、SDS-PAGE でタンパク質を分離し、膜によって trypsin 消化から免れた ³⁵S-OmpA の量を定量した (Figure 2-8)。SecA⁺ の場合、野生型 SecY の IMV では 5 分間で約 50% の ³⁵S-proOmpA の膜透過が起きるのに対して、SecY205 IMV では約 8% 程しか膜透過しない。SecA36 との組み合わせにより、SecY205 IMV でも SecA⁺-SecY⁺ の組み合わせとほぼ同等の *in vitro* 膜透過活性を示した。明らかに、SecA36 変異タンパク質は SecY205 反転膜小胞へ proOmpA を野生型 SecA-SecY の組み合わせと同等の効率で駆動できる。*in vitro* においても *in vivo* の場合と同様に、SecY205 変異による膜透過欠損は SecA36 により効率よく回復される。

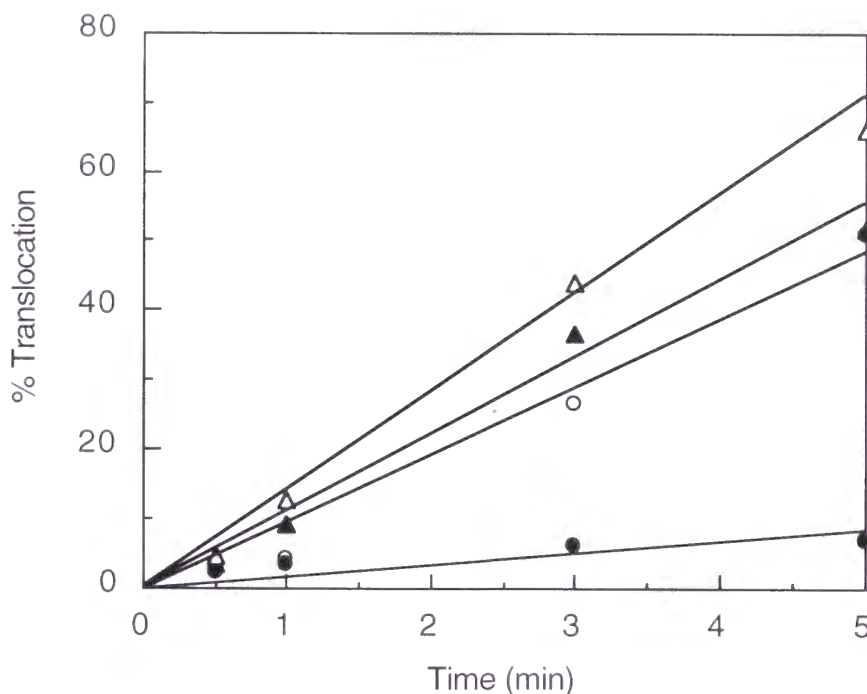


Figure 2-8: SecA36 の *in vitro* 膜透過活性

野生型 SecA タンパク質と SecA36 変異タンパク質を urea 処理した野生型または SecY205 IMV と組み合わせて ^{35}S -ラベルした proOmpA の膜透過活性を示した。各時間にサンプルを取り出し、前駆体 proAmpA と成熟体 OmpA の量を定量し、前駆体と成熟体の和に対する成熟体の割合をプロットした。

2-2-6 SecA36 の SecY205 膜への insertion

SecY205 は、先の実験により、膜透過と共役した SecA insertion に欠損を持った変異である。SecA36 変異タンパク質は、SecY205 IMV に対しても SecA translocation-ATPase 活性および *in vitro* 膜透過活性を野生型どうしの組み合わせと同等まで回復させるが、SecA insertion 反応はどうであろうか。SecA36 タンパク質を、野生型 SecA と同様に、 ^{125}I で放射ラベルした。野生型 SecA および SecA36 変異タンパク質のタンパク質あたりの放射活性はほぼ同じであった (SecA⁺: 2.64×10^6 cpm/ μg -SecA, SecA36: 2.23×10^6 cpm/ μg -SecA)。 ^{125}I -SecA, ^{125}I -SecA36 を用いて、SecY⁺, SecY205 の IMV への SecA insertion 実験を行った (Figure 2-9)。 ^{125}I -SecA36 変異タンパク質は、野生型の IMV に対して、proOmpA と ATP に呼応して SecA の膜挿入が観察される。さらに、 ^{125}I -SecA36 は SecY205 IMV に対しても、野生型より弱い有意に前駆体と ATP に呼応し

た SecA の膜挿入が観察された。なお、SecA36 の場合、野生型 SecA と比べて、AMP-PNP 存在下での SecA insertion が弱くなっているようにも見える。

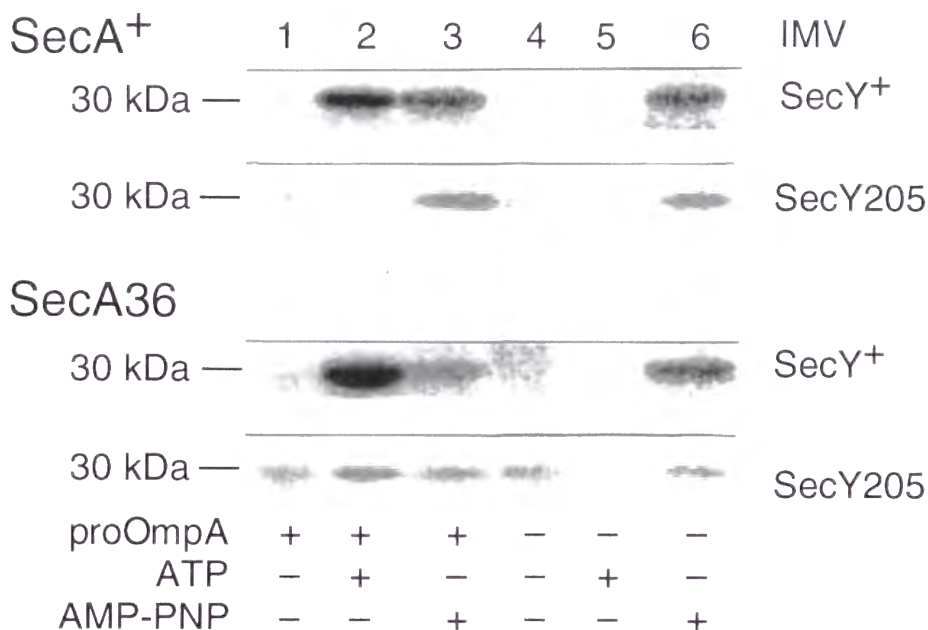


Figure 2-9: SecA36 の SecA insertion 実験

¹²⁵I-SecA⁺, ¹²⁵I-SecA36 (4 μg) を SecY⁺ または SecY205 IMV (35 μg protein/ 200 μl) と組み合わせ、0°C で 30 分間インキュベートし、遠心分離して¹²⁵I-SecA または¹²⁵I-SecA36 を結合した IMV を調製した。¹²⁵I-SecA (¹²⁵I-SecA36)-IMV 複合体 (5 μg) を ATP または AMP-PNP (2 mM), proOmpA (3.3 μg) の存在下、非存在下で SecB (4 μg) とともに 37°C で 15 分間インキュベートし、1 mg/ml のトリプシンで処理 (0°C、15 分) した。SDS-PAGE によるタンパク質の分離後、オートラジオグラフィーで SecA の 30 kDa 断片を検出した。

以上の結果は、SecA36 変異により、SecY205 の欠損は *in vivo*, *in vitro* 共にサプレスされることを示している。SecY205 は膜透過と共役した SecA insertion に欠損を持ち、それがサプレッサー SecA タンパク質により回復することは、SecA が直接 SecY と相互作用することにより、タンパク質の膜透過を駆動していること、SecA の膜への insertion 反応が膜透過の過程において実際に重要な役割を担っていることを強く示唆す

る。さらに、*in vivo* と *in vitro* の表現型を遺伝学、生化学的につなぎ合わせたことで、SecA の insertin 反応が *in vivo* でもタンパク質の膜透過に重要な役割を担っていることが強く示唆される。

2-3 *secY205*変異をサプレスする *secA* 変異の系統的分離

2-3-1 *secY205*変異株の低温感受性をサプレスする *secA*変異の系統的分離

secY205 変異は SecY-SecA の特異的相互作用に欠損を持つ変異であると考えられる。*secY205* 変異をサプレスする *secA* 変異は、SecY-SecAの相互作用に関わる変異が生じると考えられる。先に述べた SecA36 でこのアプローチの有効性が示されたので、SecY と SecA の機能的、物理的相互作用に関する知見をさらに得るため、*secY205* 変異をサプレスする *secA* 変異を系統的に分離した。変異体の分離には、P1 ファージによる形質導入を利用した局所的変異誘起法 (localized mutagenesis) を用いた。その概略を Figure 2-10 に示した。

secA 遺伝子は大腸菌の染色体地図の 2.3 分の位置にある。*secA* 遺伝子の近傍の 1.7 分の *leu* 遺伝子の内部にトランスポゾン Tn10 (テトラサイクリン耐性マーカーを持つ: SecA との co-transduction 効率は約 40%) が挿入した菌株 (IQ97) から P1 *vir* ファージ形質導入により、GN15 (*secY205*) に *leu::Tn10* マーカーを導入した。この形質導入株 (GN17) は *secY205* 変異と *leu::Tn10* の両方をもつ。変異の誘起には 2 種類の方法を用いた。N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NG) 処理、または UV 照射である。ニトロソグアニジンにより変異を誘起させた GN17 の培養液を希釈して、プレートにまき 37°C、20°C で培養したところ、20°C (3日間) では 37°C の約 $1\sim 5\times 10^{-3}$ のプレート効率でコロニーが出現した。NG 処理をしなかった場合のプレート効率は $<10^{-5}$ であった。これらの Cs⁺コロニーをプールして培養し、P1 *vir* ファージ溶菌液を調製した。8 つの独立な revertant のプールを作成した。

NG 処理の場合、A-C が G-C に変わるような変異が主に起こる。異なるタイプの変異も得るため、UV による変異の誘起法も用いた。UV 照射 (14 J/m^2) により変異を誘

起した後、培地を加えて褐色試験管で一晩 37°C で振盪培養した。培養液を希釈してプレートにまき 20°C で 3日間培養した。10²-10³ 個のコロニーが 10⁻⁴ のプレート効率で得られた。10 の独立な revertant のプールから、P1 *vir* 溶菌液を調製した。

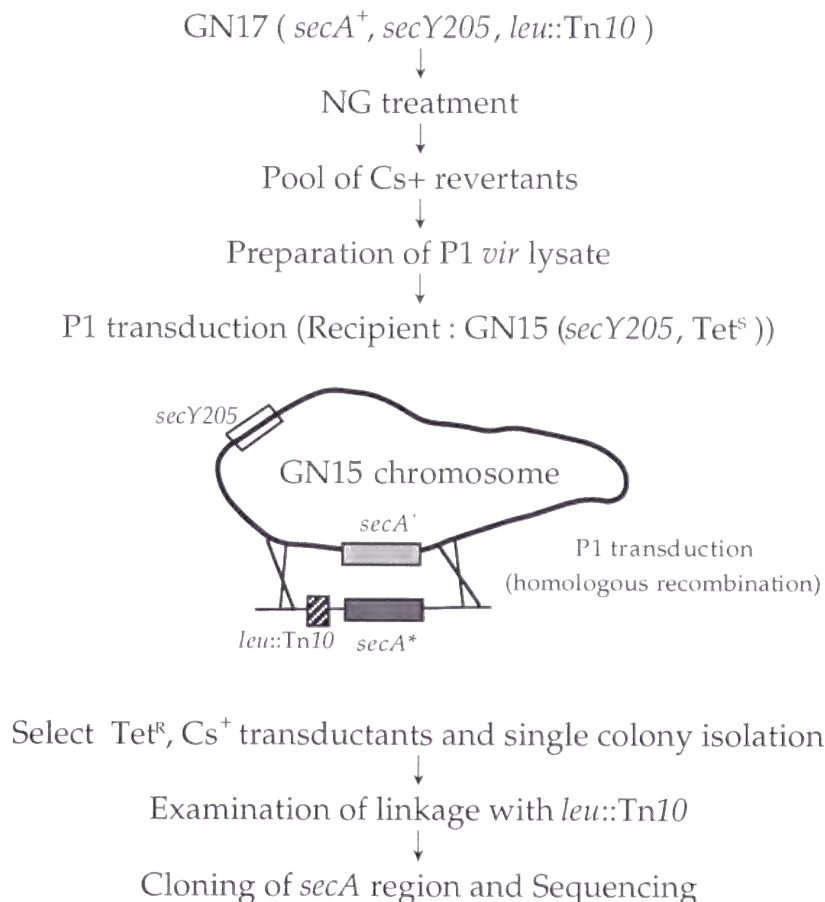


Figure2-10 : *secY205*の低温感受性を抑制する*secA*変異の分離

これらの P1 *vir* ファージを用いて再び GN15 に感染させテトラサイクリン耐性の形質導入体を 20°C で選択した。各独立な P1 *vir* 溶菌液から得られた形質導入体を数個ずつ純化して 20°C における *secY205* の増殖回復を確認した。また、*secA* 変異に特有に起こりうるアザイド (NaN₃) 感受性の変化について調べたところ、0.2-2 mM の様々な濃度の NaN₃ に耐性を示すものが高頻度で含まれていた。最終的に 53 個の独立な変異が得られた。中には、42°C で増殖できない (高温感受性 : Ts) 変異株 (8-1, UV102) も見い

でした。これら独立の変異株から再び P1 溶菌液を調製し、*secY205* 変異株 (GN15) に形質導入して *secY205* のサプレッションを示す変異が *leu::Tn10* にリンクして存在することを確認した。それぞれの suppressor 変異と *leu::Tn10* との co-transduction 効率はおよそ 35-50% であった。 suppressor 変異の co-transduction 効率は *secA* のそれにはほぼ等しい。このことは、 suppressor 変異は *secA* 遺伝子上に生じていることを強く示唆している。

これらの変異株の SecA 遺伝子の塩基配列の決定を行なった。 3-6, 3-1, 8-1 変異株から染色体 DNA を調製し、 *secA* 遺伝子をクローニングした。また、その他の変異株の *secA* 遺伝子領域を PCR によって増幅した。 *secA* 遺伝子を含む DNA 断片を *secA* 領域の約 300 塩基ごと、 18 塩基の配列からなるオリゴヌクレオチドを合成しプライマーとして用て、 ABI PRISM™ dye terminator による dideoxy Cycle Sequencing 法により、それぞれの *secA* 遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、すべての suppressor 変異の *secA* 遺伝子内に塩基置換が生じていた (Table 2-1)。ほとんどの変異株の *secA* 遺伝子内にはアミノ酸置換を伴う 1 塩基置換が起きていた。 1-10, 4-1, UV1912 では *secA* 遺伝子内に 2 つの塩基置換が生じていた。 4-1 では 2 つの隣り合った塩基置換により 1 アミノ酸置換が生じ、 UV1912 の一つの塩基置換はアミノ酸変化を伴わないものであった。 1-10 は二重変異であった。異なるアミノ酸置換変異に対して、一つの allele 名を付与した。 *secA71*, *secA119*, *secA273* は以前に報告されている *prlD20*, *prlD5*, *azi-17* とそれぞれ、同じ変異であった。また、

secA2810, *secA195*, *secA117* はそれぞれ、 *prlD4*, *prlD43*, *prlD2* と同じ場所に異なるアミノ酸置換を持っていた。いくつかの変異株について、細胞内の SecA 分子の量をプロットイングにより調べたところ、 SecA の量が特に変動しているものはなかった (Figure 2-11)。従って、単

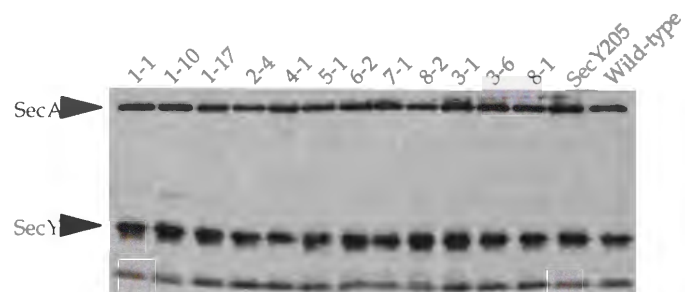


Figure 2-11: 菌体内 SecA および SecY の量
各菌株をクレットユニット=60 まで増殖させ、TCA でタンパク質を沈殿させ、SecA と SecY 抗体で Western blotting した。

に SecA の量が増加したために低温感受性をサプレスしたわけではない。

Table 2-1 : *secY205*をサプレスする *secA* 変異

NG mutagenized series

mutant#	Base Change	Amino Acid Cange	<i>secA</i> allele assigned
1-1	G2559A	D580N	<i>secA11</i>
1-10	A1426G, C2302T	K203E, A494V	<i>secA110</i>
1-17	G2283A	A488T	<i>secA117</i>
1-19	C1939T	A373V	<i>secA119</i>
2-4	A2356G	D512N	<i>secA24</i>
3-1 [†]	C1168T	A116V	<i>secA31</i>
3-6 [†]	C1156T	A112V	<i>secA36</i>
4-1	A2560G	D580G	<i>secA41</i>
5-1	G1155A	A112T	<i>secA511</i>
6-2	C1156T	A112V	(<i>secA36</i>)
7-1	C2341T	A507V	<i>secA71</i>
8-1 ^{†,¶}	G2368A	G516D	<i>secA81</i>
8-2	C1939T	A373V	(<i>secA119</i>)

UV mutagenized series

mutant#	Base Change	Amino Acid Cange	<i>secA</i> allele assigned
UV23	G2274T	A485S	<i>secA23</i>
UV25	G2274T	A485S	(<i>secA23</i>)
UV33	G2508A	E563K	<i>secA33</i>
UV41*	C2270T, C2271T	H484Y	(<i>secA195</i>)
UV53*	C1746T	H309Y	(<i>secA283</i>)
UV84	C1459T	S213F	<i>secA84</i>
UV95	G2775A	A651T	<i>secA95</i>
UV101*	T2464A	V548E	<i>secA101</i>
UV102	A2169C	Q450P	<i>secA102</i>
UV111*	C2311T	P497L	<i>secA111</i>
UV121	C1100T	L94F	<i>secA121</i>
UV131	T1149A	L110R	<i>secA131</i>
UV132	G1249C	N143K	<i>secA132</i>
UV143	T1265C	F149L	<i>secA143</i>
UV151	T2910G	L697R	<i>secA151</i>
UV161	A2454C	H545P	<i>secA161</i>

UV171	T1536G	V239G	<i>secA171</i>
UV173*	A2455T	H545L	<i>secA173</i>
UV181	A2186T	T456S	<i>secA181</i>
UV182	C2275T	A485V	<i>secA182</i>
UV192	T1032A	V71E	<i>secA192</i>
UV195*	C2271T	H484Y	<i>secA195</i>
UV198	C1119G	A100G	<i>secA198</i>
UV199	A1956G	N379S	<i>secA199</i>
UV1912	A1173T, C2890G	L118Q	<i>secA1912</i>
UV211	T1032A	V71E	(<i>secA192</i>)
UV212	C2450G	R544G	<i>secA212</i>
UV221*	C2271T	H484Y	(<i>secA195</i>)
UV223	T1496G	S226A	<i>secA223</i>
UV231*	C2454T	H545Y	<i>secA231</i>
UV233*	C2454T	H545Y	<i>secA231</i>
UV236*	G2559A	D580N	(<i>secA11</i>)
UV239	A2351T	T511L	<i>secA239</i>
UV241*	C2311T	P497L	(<i>secA111</i>)
UV262*	T2482C	L554P	<i>secA262</i>
UV264	T1022C	F68L	<i>secA264</i>
UV271*	C2271T	H484Y	(<i>secA195</i>)
UV272	T1211G	V131G	<i>secA272</i>
UV273	T1220A	Y134N	<i>secA273</i>
UV283*	C1746T	H309Y	<i>secA283</i>
UV289	C2275T	A485V	(<i>secA182</i>)
UV2810	A1151G	T111A	<i>secA2810</i>
UV291*	C2341T	A507V	(<i>secA71</i>)
UV294	A1956G	N379S	(<i>secA199</i>)

独立に分離された変異で同じアミノ酸置換を持つもののallele名は括弧でしめた。

*: 中川 仁氏により、塩基配列の決定がなされた

†: Matsumoto et al., 1997

‡: Nakatogawa et al., submitted manuscript

2-3-2 Suppression の特異性と塩基配列変化

secA 変異による *secY205* 変異の低温感受性のサプレッションが *secY205* 変異に対して allele 特異的なものであるかについて調べた。既に述べたように allele 特異性は遺伝学ではサプレッションの機構を考える上で重要な情報であり、タンパク-タンパク相互作用

用の「鍵と鍵穴」的な相互認識の変化を示唆するものである。

secY39 は低温感受性変異で 20°C ではほとんど増殖しない。*secY39* の低温感受性をサプレッサーかどうかについて、まず調べた。*secY39* 変異株である GN31 にサプレッサー *secA* 変異を *leu::Tn10* を選択マーカーとして P1 形質導入によりそれぞれ導入した。16 個の形質導入体を非選択培地で純化し、テトラサイクリン耐性の形質導入体の 20°C での増殖を調べた。サプレッションが起これば約 40% の頻度で Cs⁺ の形質導入体が現れるはずである。Table 2-2 にその結果を示した。suppressor-*secA* 変異を *secY205* 変異株に *leu::Tn10* を選択マーカーとして形質導入すると 40% 前後の頻度で Cs⁺ のものが現れる。しかし、*secY39* へ形質導入した場合は、見かけ上 80% 以上の頻度で Cs⁺ が現れるか、全て Cs のどちらかであった。*secA* と選択マーカーの co-transduction の頻度は約 40% であるので、*secA* 変異が *secY39* もサプレッサーするのであれば 16 個の形質導入体の 3-4 個が Cs⁺ となると予想される。従って、Cs⁺ の形質導入体が現れない場合は、その *secA* 変異は *secY39* をサプレッサーできないと判断できる。*secY39* の形質導入体の 80% 以上が Cs⁺ となったのは、サプレッサーが導入されたものは生育がはやいため、無意識のうちに優先的に選んでしまったためであると思われる。なお、*secY39* 変異株の増殖速度は 37°C でもおそい。

Table 2-2: *secA* 変異による *secY205*, *secY39* の Cs⁺-transductants の数

NG mutagenized series			mutant#	<i>secY205</i>	<i>secY39</i>
mutant#	<i>secY205</i>	<i>secY39</i>			
			UV161	5/16	0/16
3-1	41/95	0/16	UV171	5/16	0/16
3-6	39/96	0/16	UV173	1/16	10/16
8-1	19/48	0/16	UV181	4/16	0/16
1-1	19/40	12/14	UV182	6/16	0/16
1-10	19/39	13/16	UV183	10/16	0/16
1-17	16/40	14/16	UV192	7/16	0/16
1-19	20/40	5/16	UV195	7/16	11/16
2-4	24/40	0/16	UV198	4/16	0/16
4-1	21/40	10/16	UV199	8/16	0/16
5-1	24/40	0/16	UV1912	7/16	0/16
6-2	16/38	0/16	UV211	10/16	0/15
7-1	16/36	14/16	UV212	5/16	0/16

8-2	20/36	12/16			
UV mutagenized series			UV221	8/16	14/16
UV23	5/16	0/16	UV223	8/16	0/16
UV25	8/16	0/16	UV231	3/16	11/15
UV33	7/16	0/16	UV233	10/16	15/15
UV41	7/16	8/16	UV236	8/16	11/16
UV53	10/16	11/16	UV239	7/16	0/16
UV84	8/16	0/16	UV241	9/16	7/16
UV95	6/16	0/16	UV262	10/16	15/16
UV101	5/16	9/16	UV263	5/16	16/16
UV102	6/16	0/16	UV264	8/16	0/16
UV111	8/16	10/16	UV271	8/16	13/15
UV121	8/16	0/16	UV272	6/16	0/16
UV131	5/16	0/16	UV273	9/16	0/16
UV132	4/16	0/16	UV283	7/16	16/16
UV143	4/16	0/16	UV289	8/16	0/16
UV151	8/16	0/16	UV2810	7/16	0/16
			UV291	9/16	16/16
			UV294	8/16	0/16

Cs+ の transductants の数 / 調べた transductants の数を示した。

secA 変異の中には *secY205* だけでなく *secY39* もサプレスできるものが存在する。従って、*secA* 変異は *secY39* をサプレスできないもの (Class I) とできるもの (Class II) の 2 種類に分類できる。Class I には 28、Class II には 12 の変異がそれぞれ分類できた。中戸川仁氏の協力を得て、*secY* 変異株 (*secY39*, *secY104*, *secY125*, *secY129*, *secY115*; Figure 2-1 参照)、*secE501*, *secG::kan*, *secD1* の低温感受性変異株に *secA* 変異を *leu::Tn10* を選択マーカーとして P1 形質導入し、それぞれ 16 個の transductants に対して 20°C での生育を調べた。*secE501* は *secE* 遺伝子のプロモーター領域に変異をもち、SecE の発現量を減少させることが知られている。また、*secG* 欠失変異株は、バックグラウンドのストレーンにより低温感受性がことなるが、KN370 株 (C600, *recD*, *secG::kan*) は低温感受性の増殖をしめす (Figure 2-14 参照)。各 *secA* 変異と、*sec* 変異の組み合わせでの 20°C における生育の結果を Table 2-3 にしめす。

Table 2-3: 種々の *sec* 変異に対する *secA* 変異の suppression ability

<i>secA</i> allele	A.A. change	# indep. isolates	Suppression against <i>sec</i> (Cs) mutation ¹									
			Y205	Y39	Y104	Y115	Y125	Y129	E501	ΔG	D1	
<i>secA</i> ⁺			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Class I mutations												
<i>secA31</i>	A116V	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>secA36</i>	A112V	2	+	-	-	-	-	-	-	-	+	nt
<i>secA81</i>	G516D	1	+ ²	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>secA24</i>	D512N	1	+	-	+	-	-	-	-	-	+	nt
<i>secA511</i>	A112T	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>secA23</i>	A485S	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>secA33</i>	E563K	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>secA84</i>	S213F	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>secA95</i>	A651T	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>secA121</i>	L94F	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>secA131</i>	L110R	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>secA132</i>	N143K	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>secA143</i>	F149L	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>secA151</i>	L697R	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>secA161</i>	H545P	1	+	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt
<i>secA171</i>	V239G	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>secA181</i>	T456S	1	+	-	-	-	-	-	-	-	(-)	nt
<i>secA192</i>	V71E	2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>secA198</i>	A100G	1	+	-	-	-	-	-	-	-	(-)	nt
<i>secA199</i>	N379S	2	+	-	-	-	-	-	-	-	+	nt
<i>secA1912</i> ³	L118Q	1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	nt
<i>secA212</i>	R544G	1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	nt
<i>secA223</i>	S226A	1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	nt
<i>secA239</i>	T511L	1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	nt
<i>secA264</i>	F68L	1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	nt
<i>secA272</i>	V131G	1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	nt
<i>secA273</i>	Y134N	1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	nt
<i>secA2810</i>	T111A	1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	nt
Class II mutations												
<i>secA11</i>	D580N	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>secA117</i>	A488T	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>secA119</i>	A373V	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>secA41</i>	D580G	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>secA71</i>	A507V	2	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>secA101</i>	V548E	1	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>secA111</i>	P497L	2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>secA173</i>	H545L	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>secA195</i>	H484Y	4	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>secA231</i>	H545Y	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

<i>secA262</i>	L554P	1	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>secA283</i>	H309Y	2	+	+	-	+	+	+	+	+	-

¹: *lmc::Tn10* を利用して *secA* 変異を *sec* 変異 (Cs) の recipient に P1 形質導入し、16 個のテトラサイクリン耐性の transductant を 37°C で選択した transductant を 20°C で 2 日培養し、Cs が 30-50% 程度の頻度であらわれるものを suppression-positive (+) とした。その他のものを suppression-negative (-) とした。

²: *secA81-secY205* の組み合わせは特異的に温度感受性 (Ts) となる (Matsumoto *et al.*, 1997)

³: この allele は C2890G のサイレント変異を含む

太字は Class I の変異で、分泌活性が高いものを示す

Class I のもののサプレッションはほぼ *secY205* allele に特異的であった。*secA36* を含むいくつかのものは、 $\Delta secG$ の Cs をサプレスした。Class II のものはほとんどの *sec* 変異をサプレスした。ただし、いくつかのものは *secY104*, *secE501*, *secD1* の低温感受性をサプレスできなかった。Class II に属する *secA* 変異による suppression が allele 特異性を示さないということは、これら *secA* 変異により SecA の機能が昂進したために、*sec* 変異による膜透過能の低下を補うことができたのではないかと考えられる。そこで、これら Class II に属する変異 *secA* を「Super-active SecA」と呼ぶこととした。

変異 SecA 自身の性質を調べるため、*secA* 変異単独の変異株を作成した。*secY* 遺伝子は *rps* オペロンの *rpsE* 遺伝子 (スペクチノマイシン耐性) の下流に位置し、*rpsE* と *secY* の co-transduction 効率は約 90% である。野生型 *secY* 遺伝子を *rpsE* のスペクチノマイシン耐性を選択マーカーとして、変異 *secA-secY205* 二重変異株に P1 形質導入した。野生型 *secY* が導入されていることは、*secY* 遺伝子部分の DNA 塩基配列を決定することで確認した。*secA* 単独変異株を、L 培地で 20°C および 42°C で培養したが、どれも顕著な増殖阻害を起こすものはなかった。各 *secA* 変異株の azide 感受性を調べた。Table 2-4 に、1: 0.2 mM NaN_3 感受性; 2: 0.2 mM NaN_3 耐性; 3: 0.5 mM NaN_3 耐性; 4: 1.0 mM NaN_3 耐性; 5: 2.0 mM NaN_3 耐性の 5 段階評価として記した。野生型 SecA は 0.5 mM azide に耐性であった。Azide 耐性に関しては、変異部位やサプレッションとの顕著な相関はみられなかったが、Class I のものに関しては、*secY205* の分泌欠損をよく回復させるものは Azide 耐性になる傾向がある。すでに報告されている通り、*prlD20* (*secA71*) は Azide 超感受性を示した。

2-3-3 SecA の変異部位とサプレッション能力

変異 *secA* のアミノ酸置換位置を、SecA の一次配列上にプロットした (Figure 2-12)。変異は SecA の一次配列上のいろいろな場所に位置していたが、その中でもいくつかの傾向がみられた。Class I に属するものの多くは SecA の NBS I (Nucleotide Binding Site) の領域と NBS II 領域に集約される傾向があった。特に、NBS I の Walker A motif を周辺にもっとも多く Class I 変異が集中していた。Class II (Super-active SecA) の片方を除き NBS II 領域の Walker motif A 付近に集約した。

次に、それぞれ *secA* 変異が *secY205* の低温での分泌欠損をどの程度回復させているのかどうかを調べた。マルトース結合タンパク質 (MBP; Maltose Binding Protein) の分泌をパルスラベル法により調べた。37°C で培養した培養液を、20°C に移してから 20 分後に、³⁵S-メチオニンで 1 分間パルスラベルし、ラベルされた MBP に対する成熟体の割合を求めた (Table 2-4)。

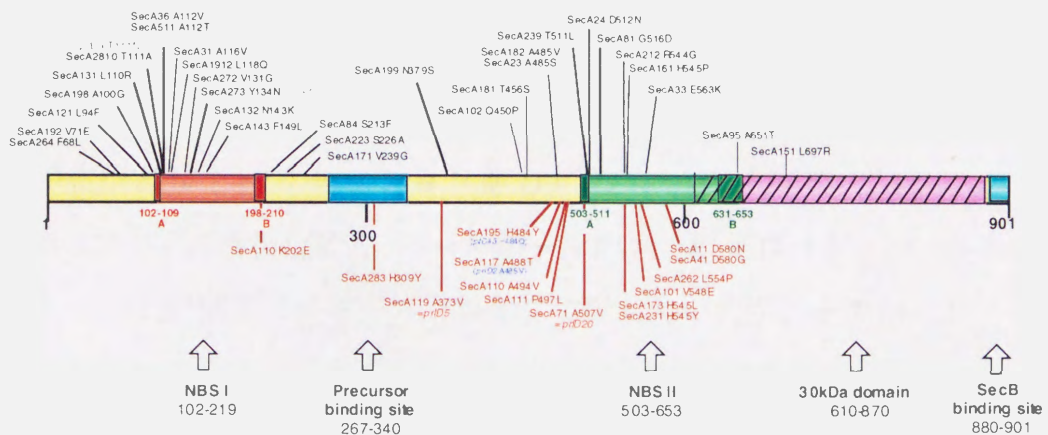


Figure 2-12 : *secY205* suppressor *secA* 変異体のアミノ酸置換の位置を SecA の一次配列上にプロットした。高親和性 ATP 結合ドメイン (NBS I; 102-219) は赤で、低親和性 ATP 結合ドメイン (NBS II; 503-653) は緑でしめした。SecA の 30kDa フラグメントに相当する部分を斜線で、SecB の結合部分 (880-901)、前駆体タンパク質結合部分 (267-340) をそれぞれ色分けした。Class I (allele 特異的) は上側に黒で、Class II (Super-active SecA) は下側に赤で示す。太い線は、サプレッション能力の高いものを示す (本文参照)

Table 2-4. *secA* 変異による、NaN₃ 耐性と MBP 分泌活性

allele	NaN ₃ sensitivity ¹ (<i>secY</i> ⁺)	MBP export ² (<i>secY205</i>)	allele	NaN ₃ sensitivity ¹ (<i>secY</i> ⁺)	MBP export ² (<i>secY205</i>)
<i>secA</i> ⁺	3	32			
Class I mutations			<i>secA1912</i>	4	47
<i>secA31</i>	3	55	<i>secA212</i>	2	49
<i>secA36</i>	5	71	<i>secA223</i>	2	49
<i>secA81</i>	4	76	<i>secA239</i>	4	70
<i>secA24</i>	2.5	69	<i>secA264</i>	4	49
<i>secA511</i>	5	78	<i>secA272</i>	4	46
<i>secA23</i>	2.5	39	<i>secA273</i>	5	68
<i>secA33</i>	5	59	<i>secA2810</i>	5	73
<i>secA84</i>	5	49	Class II mutations³		
<i>secA95</i>	3	41	<i>secA11</i>	2	73
<i>secA121</i>	2	61	<i>secA117</i>	2	85
<i>secA131</i>	5	66	<i>secA119</i>	5	83
<i>secA132</i>	3	51	<i>secA41</i>	2	82
<i>secA143</i>	4	43	<i>secA71</i>	1	89
<i>secA151</i>	3	31	<i>secA101</i>	3	74
<i>secA161</i>	nt	59	<i>secA111</i>	2	72
<i>secA171</i>	3	45	<i>secA173</i>	4	82
<i>secA181</i>	4	35	<i>secA195</i>	3	75
<i>secA192</i>	4	54	<i>secA231</i>	3	71
<i>secA198</i>	3.5	50	<i>secA262</i>	5	80
<i>secA199</i>	5	68	<i>secA283</i>	3	69

¹ *secA* 変異を *sec*⁺ のバックグラウンドに移した。0-1 mM の NaN₃ を含む L-培地で 37°C で一晚培養した。1-5 段階で NaN₃ に対する感受性を評価した。1: 0.2 mM NaN₃ 感受性; 2: 0.2 mM 以下 NaN₃ 耐性; 3: 0.5 mM 以下 NaN₃ 耐性; 4: 1.0 mM 以下 NaN₃ 耐性; 5: 2.0 mM 以上 NaN₃ 耐性

² *secY205* と suppressor *secA* の二重変異株を 20°C で 1 分間、³⁵S-メチオニンでラベルした。ラベルされた MBP の成熟体の割合 (%) をしめした。野生型 (*secY*⁺ *secA*⁺) では約 90% がこの条件下で成熟体として検出される。Class I のうち、65% 以上の値を示すものを太字で示した。

³ Class II の変異 *secA* の解析は中戸川氏による。

太字は Class I の変異で、分泌活性が高いものを示す。

Figure 2-13 では、ラベルされた MBP に対する成熟体の割合 (processing %) を *SecA* の一次配列上の変異アミノ酸の番号に対してプロットした。その結果、興味深い傾向を

見出すことができた。

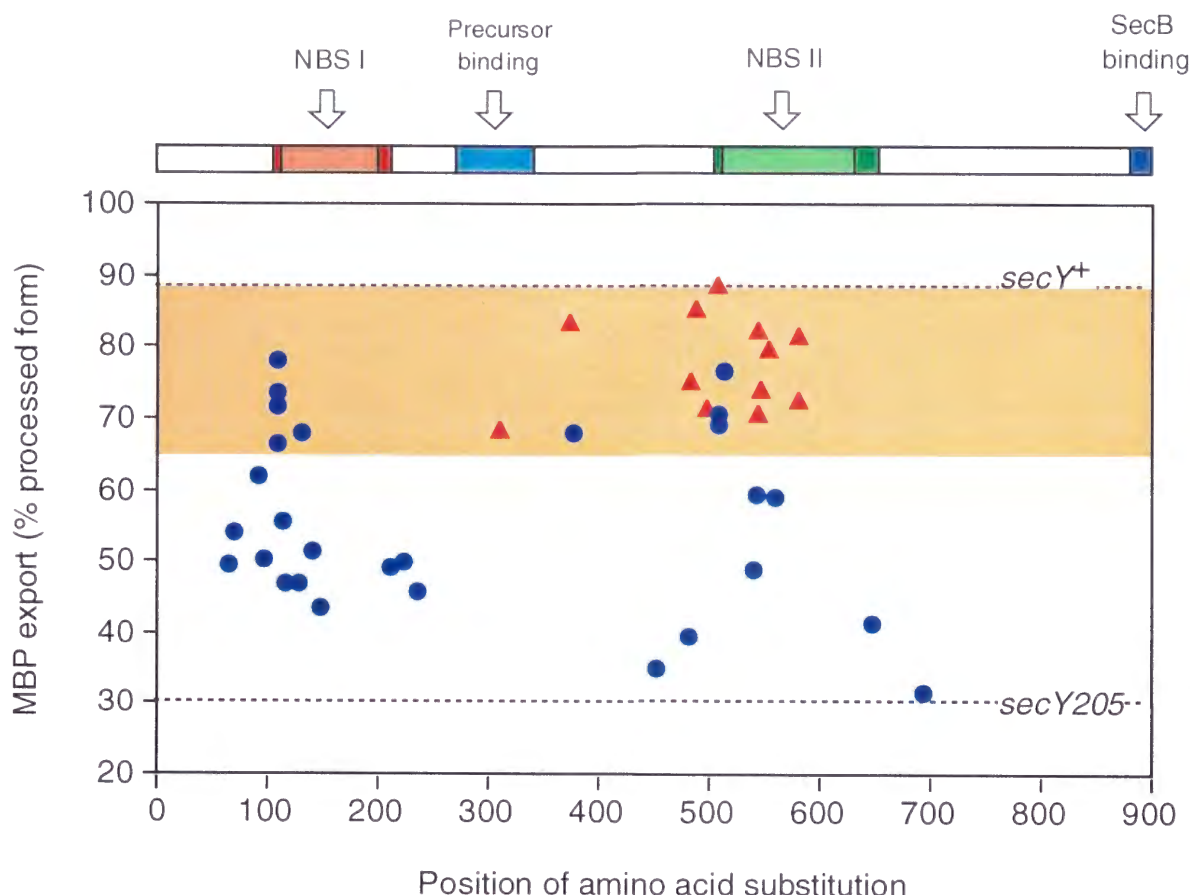


Figure 2-13: *secY205-secA** 二重変異株の分泌活性

secA 変異株を 37°C で増殖させ、20°C に 20 分間温度シフトさせた後、35S-メチオニンでパルスラベルした。マルトース結合タンパク質 (MBP) を免疫沈降し、MBP の前駆体と成熟体を定量し、ラベルされた MBP のうち成熟体の占める割合を、SecA の一次配列上の *secA* 変異の変異位置に対してプロットした。Class I を ●、Class II を ▲ とした。

Class I の変異 SecA は、NBS I および NBS II の Walker A motif に付近にサプレッション活性のピークが存在した。即ち、Walker A motif に近い程、サプレッション活性が高くなる傾向がみられた。Class II では、どれも高いサプレッション活性を示した。Class I 変異に関しては、サプレッションが弱いものがあり、それらは見かけ上 allele 特異的に見えるだけなのかもしれない。しかし、いくつかのものは SecY205 の分泌欠損を Super-active SecA とほぼ同等にサプレスした。これらのものは、確かに allele 特異的な

サプレッサーであると見なすことができる。Class II の SecA variant では 1 分間パルスラベルされた MBP の 69-89% が成熟体となっていた。Class I では *secA2810* (T111A), *secA36* (A112V), *secA511* (A112T), *secA239* (T511L), *secA81* (G516D) の 5 つが Class II のものと同程度に、パルスラベルされた MBP の 70% 以上が成熟体となっていた。これら 5 の変異を特に *secY205* allele 特異的 suppressor と呼ぶことにし、その他は、Class I と呼ぶことにする。以降、断りがない場合、allele 特異的 *secA* 変異という場合は、上記の 5 つの変異を指すこととする。変異の場所とサプレッションの機構に関しては、考察の章で考察する。

2-4 膜透過装置における SecG の役割

2-4-1 *secG* 欠失変異の低温感受性

secG 遺伝子が同定されたとき、*secG* 欠失変異株は低温感受性であると報告された。確かに、その解析で使用された菌株 (KN370) は 20°C で増殖できない。しかし、低温感受性は菌のバックグラウンドによって異なる。*secG* 欠失変異 (*secG::kan*) を MC4100 に P1 形質導入し、20°C での増殖を serial dilution 法により調べた (Figure 2-14)。その結果、Bost と Belin が以前から報告している通り <Bost, 1995 #85>、MC4100 を遺伝的バックグラウンドに持つ菌株では $\Delta secG$ 変異は低温感受性を示さなかった。低温感受性を示す KN370 に *secY205* のサプレッサー *secA* 変異を P1 形質導入し、*secA* 変異の allele 特異性を調べたところ (Table 2-3)、Super-active SecA のほとんどと、Class I の変異のいくつかのものが KN370 の低温感受性をサプレスした。Class I の変異によるサプレッション能と変異部位の間には有意な相関は見いだせなかった。SecA36 によるサプレッションは *secY* 変異に関しては allele 特異的であり、*in vitro* においても *secY205* を効果的にサプレスする。この *secA36* 変異は $\Delta secG$ をもサプレスすることがわかった。

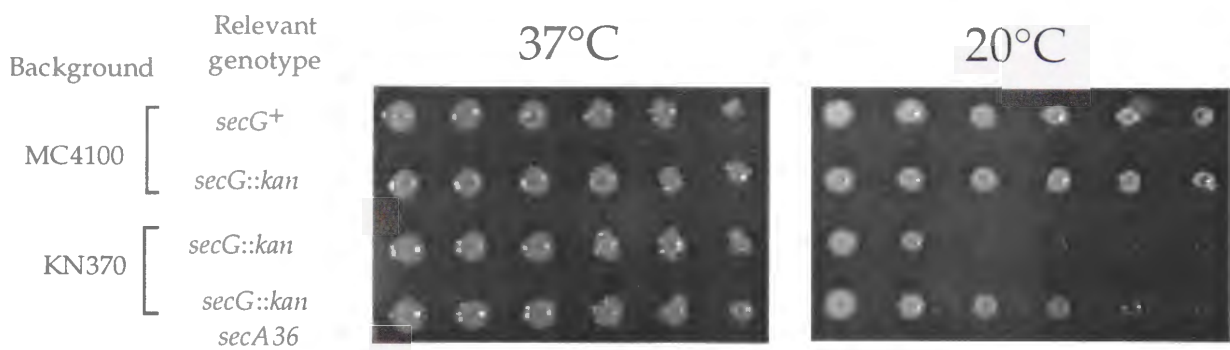


Figure 2-14: バックグラウンドの違いによる *secG::kan* 変異株の低温感受性

GN80 (MC4100 *leu::Tn10*), GN82 (MC4100 *secG::kan leu::Tn10*), GN20 (KN370 *leu::Tn10*), GN30 (KN370 *secA36 leu::Tn10*) を一晩培養した培養液を、1/10づつ希釈して、37°C (一晩) または 20°C (2日間) でそれぞれ培養した。

このサプレッションが分泌活性を回復させるものか調べた。KN370に *secA36* を導入した (GN30) 変異株とその *secA*⁺ 株 (GN20)、KN370に *secG*⁺ 遺伝子を導入した菌株 (THE454) を野生型コントロールとして 20°C における分泌活性を pulse-chase 実験によって調べた (Figure 2-15)。 $\Delta secG$ 株は、以前の報告通り、低温で激しい分泌欠損を示した。*secA36* 変異を導入した $\Delta secG$ 、*secA36* 二重変異株では、 $\Delta secG$ による分泌欠損は回復した。このような結果から *secG* 欠失変異による *in vivo* での低温感受性分泌阻害は、*secA36* 変異により野生型近くまでサプレスされることがわかった。MC4100 を遺伝的バックグラウンドに持つ *secG* 欠失変異株 (GN78) でも、有意な分泌阻害が観察された (データ省略)。すなわち、このバックグラウンドでは *secG* 欠失変異は増殖における低温感受性の表現型は示さないものの、タンパク質分泌は低温感受性である。

SecA36 による *secG* 欠失変異のサプレッションを *in vitro* で解析するために、MC4100 $\Delta ompT$ 株に *secG::kan* を P1 形質導入した。ATP と PMF の膜透過における効果を分けて考えられるようにするため、さらに $\Delta(uncB-uncC)$ を P1 形質導入して、F1-F0 ATPase を欠失させた。この菌株から反転膜小胞を調製し、2-2-3 で述べた精製 *SecA36* タンパ

ク質を用いて、以下の実験を行った。

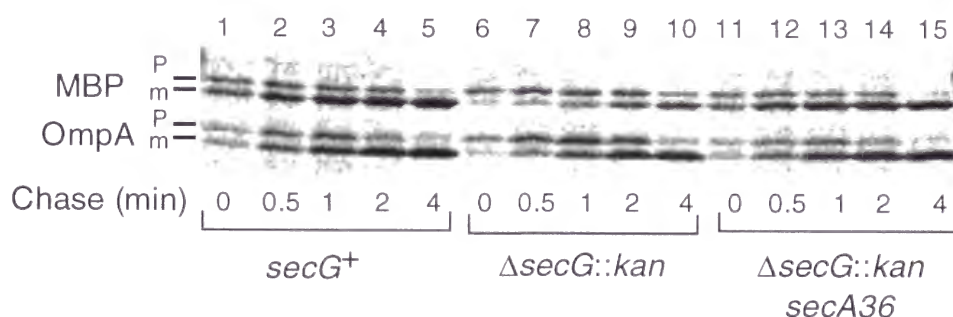


Figure 2-15: *secG::kan* の 20°C でのタンパク質分泌

THE454 (wt), GN20 (*secG::kan*), GN30 (*secG::kan, secA36*) を 37°C で培養し、20°C に移してから 20 分後に³⁵S-メチオニンで 1 分間ラベルし、過剰のメチオニンでチェイスした。各時間毎にサンプルを取り出し、MBP または proOmpA の抗体で免疫沈降した。

2-4-2 SecA36 は *in vitro* で SecG を欠く膜小胞に対しても働く

GN67 (SecG⁺), GN68 (Δ SecG) 株から反転膜小胞 (IMV) を調製し、6 M urea で処理した。野生型 IMV と Δ SecG IMV は単位タンパク質量あたりにはほぼ同量の SecY を含んでいることをウエスタンブロッティングにより確認した (データ省略)。精製した SecA または SecA36 と野生型、あるいは Δ SecG IMV との組み合わせで *in vitro* 膜透過実験を行った (Figure 2-16)。 *in vitro* 合成した ³⁵S-proOmpA を用いて、urea-IMV への膜透過を 37°C と 20°C で経時的に調べた。37°C において野生型 IMV の場合、膜透過は迅速におこった。 Δ SecG IMV の場合、SecA⁺との組み合わせでは野生型どうしの組み合わせと比べて遅くなっていたが、SecA36 と組み合わせると野生型どうしの組み合わせと同等の膜透過活性を示した。20°C では、野生型の IMV では、SecA⁺, SecA36 とともに膜透過反応が起こったが、 Δ SecG IMV では、SecA⁺との組み合わせではほとんど膜透過活性を示さなかった。SecA36 は 20°C で Δ SecG IMV においても、野生型 IMV の場合に近いレベルまで膜透過を駆動した。このように、SecG 非存在下における低温でのタンパク質膜透過活性の欠損は、*in vitro* でも SecA36 変異タンパク質によりサプレスされるこ

とが示された。

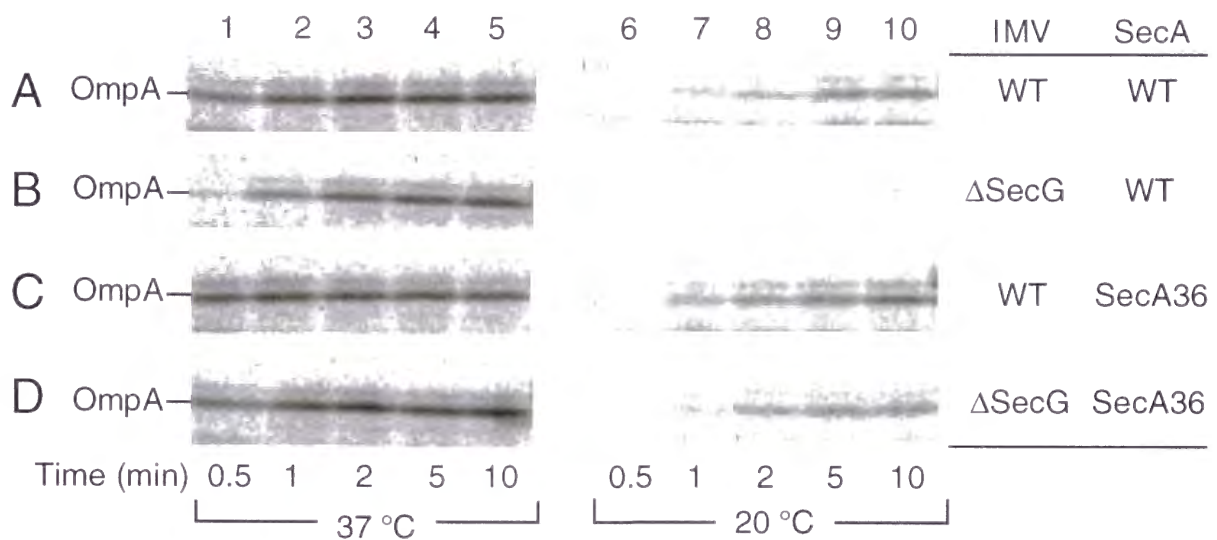


Figure 2-16: SecA36 の ^{35}S -proOmpA の ΔSecG IMV への *in vitro* 膜透過活性
 urea 処理をした secG^+ IMV (GN67; A と C) または $\Delta\text{secG}::\text{kan}$ IMV (GN68; B と C) を野生型
 SecA (A と B) または SecA36 (C と D) と組み合わせ ^{35}S -メチオニンを用いて *in vitro* 合成した
 ^{35}S -proOmpA を 37°C (レーン 1-5), 20°C (レーン 6-10) で *in vitro* 膜透過させた。各時間毎にサ
 ンプルの一部を取り出し、トリプシン処理した後、SDS-PAGE でタンパク質を分離し、膜透
 過した OmpA を可視化した。

過剰量の精製した proOmpA を使った場合でも、同様の結果が得られた。SecA36 変異タンパク質は、タンパク質の膜透過を SecG がなくても効率よく進めることができる。このことは、逆に、野生型の SecA は SecG の働きがなければ膜透過を効率よく進めることができないことを意味する。

SecG 欠失変異が SecA の機能に及ぼす影響をより直接的に調べるために、ATPase 活性をマラカイト法により測定した。Figure 2-17 に 20°C における、SecA translocation-ATPase を示した。野生型の IMV の場合、いずれの SecA も同程度の translocation ATPase 活性をしめした (○; SecG^+ , SecA^+ , ●; SecG^+ , SecA36)。 ΔSecG IMV の場合、野生型 SecA による translocation-ATPase 活性は野生型 IMV の場合の 1/10 程度であった (△; ΔSecG , SecA^+)。SecA36 では ΔSecG IMV に対しても野生型 IMV の場合と同程度の

ATPase 活性をしめした(▲; Δ SecG, SecA36)。SecG は SecA の活性発現を助けており、SecA36 ではその効果がなくても十分に translocation ATPase 活性を発揮できるものと考えられる。

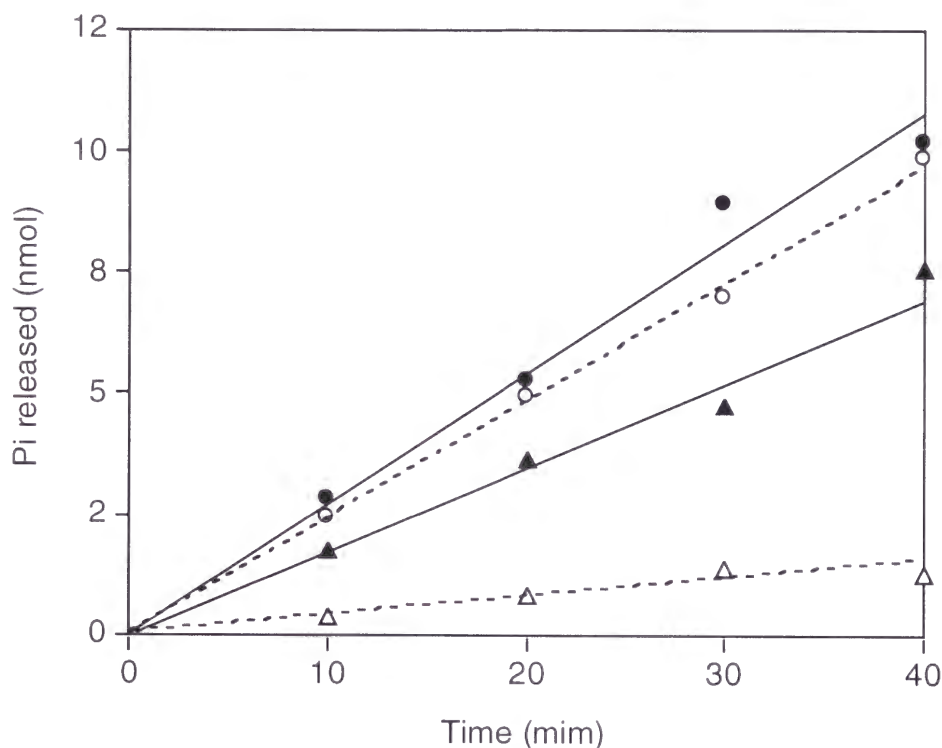


Figure 2-17: Δ SecG膜に対するSecA, SecA36 の膜透過 ATPase 活性

野生型または Δ SecG IMV (40 μ g/ml)、SecA または SecA36 タンパク質 (40 μ g/ml)、2 mM ATP を proOmpA 存在下、非存在下で 20°C でインキュベートした。各時間毎にサンプルの一部を取り出し、含有する無機リン酸の量をマラカイト法により比色定量した。proOmpA 存在下での値と proOmpA 非存在下での値の差を膜透過 ATPase 活性とした。

○; SecG⁺ SecA⁺, ●; SecG⁺, SecA36, △; Δ SecG, SecA⁺, ▲; Δ SecG, SecA36

SecA insertion 反応への SecG の関与について調べた。SecA⁺, SecA36 を ¹²⁵I で放射ラベルし、SecA insertion 実験を 37°C と 20°C で、proOmpA 存在下と非存在下でおこなった。野生型 SecA は、野生型 IMV に対しては、proOmpA と ATP に依存して SecA の insertion を起こしたが、 Δ SecG IMV では野生型 SecA の insertion は低下していた (Figure 2-18; レーン 1-4)。その他に見えるバックグラウンドのバンドがほぼ同じ濃さで

観察されるので、 Δ SecG IMV で特異的に SecA insertion 反応が低下していると考えられる。 Δ SecG IMV による野生型 SecA の insertion 反応の低下は、20°C でより顕著に現れる。SecA36 は、野生型と比べれば多少弱い、 Δ SecG IMV へも明らかに insertion できるようになっていた (レーン 7, 8)。SecG の欠失により SecA insertion が低下するということは、SecG が SecA の insertion 反応をも助けていることが示唆される。

以上のように、SecG は SecA の insertion 反応を補助して、効率よく膜へinsertion できるようにする役割を担っているものと考えられる。SecA36 変異により、SecG がなくても膜へ効率よく insertion できるようになり、膜透過活性も回復することから、SecA36 変異による SecA の変化した機能の一部は、SecG の機能とオーバーラップしているとも考えられる。

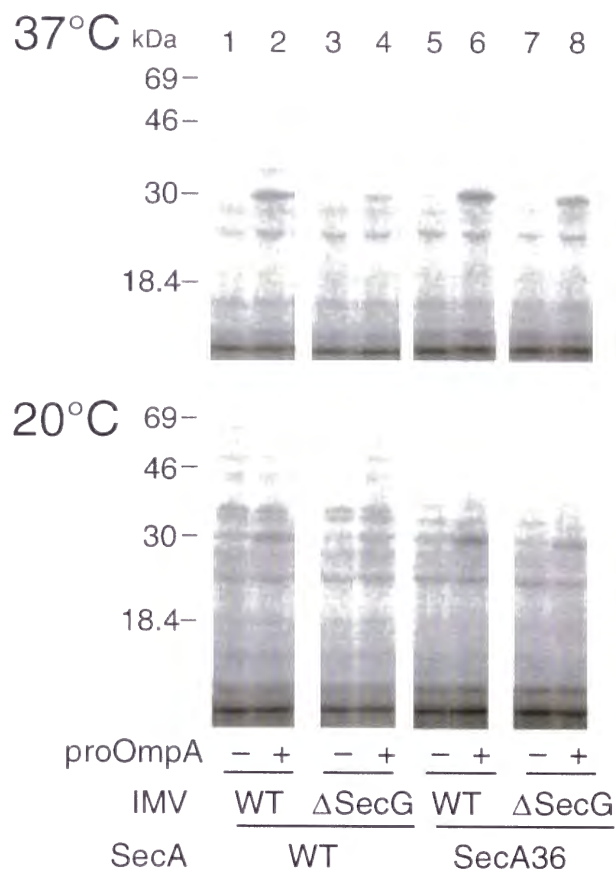


Figure 2-18: SecA^{*}, SecA36 の Δ SecG膜へのSecA insertion

¹²⁵I-SecA (100 μ g/ml, 1.33×10^5 cpm/ μ g; レーン 1-4) または ¹²⁵I-SecA36 (100 μ g/ml, 2×10^5 cpm/ μ g; レーン 5-8) を urea 処理したIMV (100 μ g/ml)、2 mM ATPとともに proOmpA の存在下、非存在下で、37°C または 20°C で 15 分間インキュベートし、その後 1 mg/ml トリプシンで処理 (0°C, 15 分) した。

2-4-3 SecG は特に低 ATP 濃度の条件下で膜透過に必須である

SecG 機能と SecA 機能の関係を調べるため、SecG 欠失膜における低濃度の ATP 条件下での膜透過活性を 37°C で調べた (Figure 2-19)。

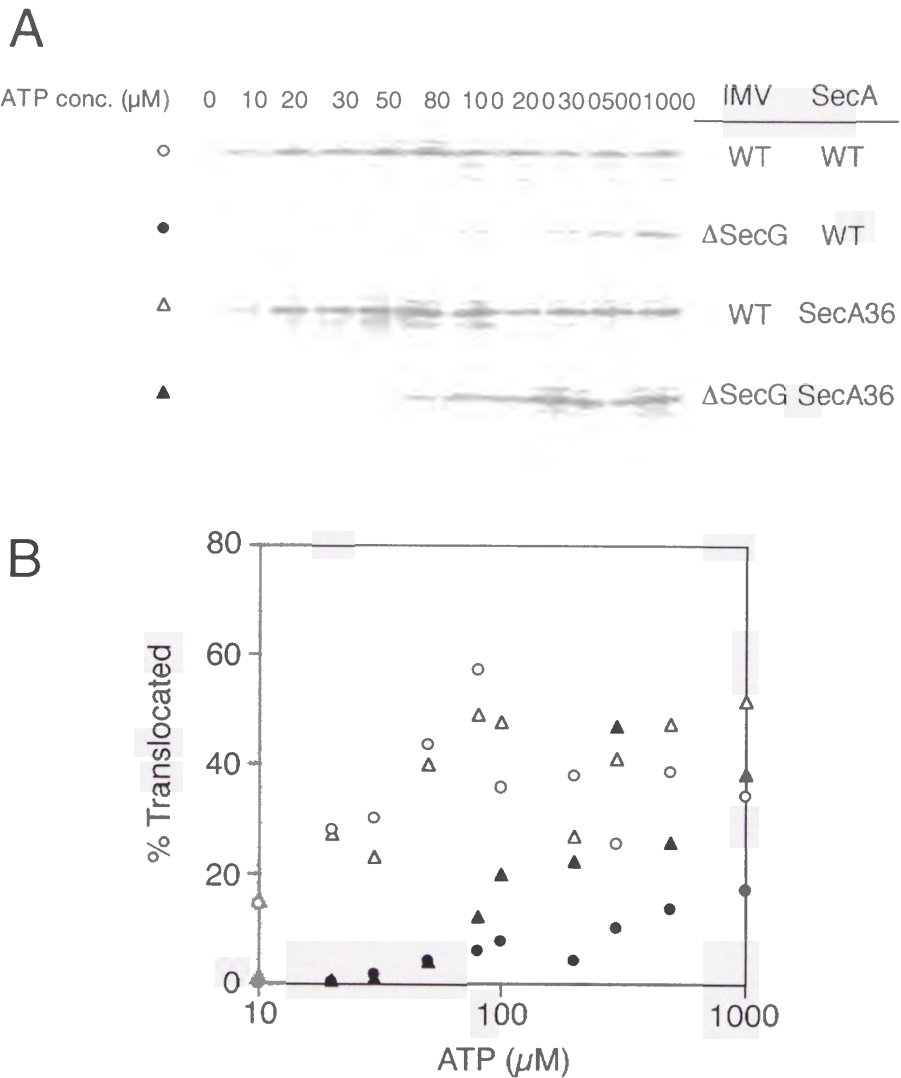


Figure 2-19 proOmpA 膜透過反応の ATP 要求性

A: ^{35}S -proOmpA の膜透過をさまざまな濃度の ATP 存在下において 37°C で測定した。B: 膜透過した OmpA を定量し、グラフ化した。

○; SecG⁺, SecA⁺, ●; ΔSecG , SecA⁺, △; SecG⁺, SecA36, ▲; ΔSecG , SecA36

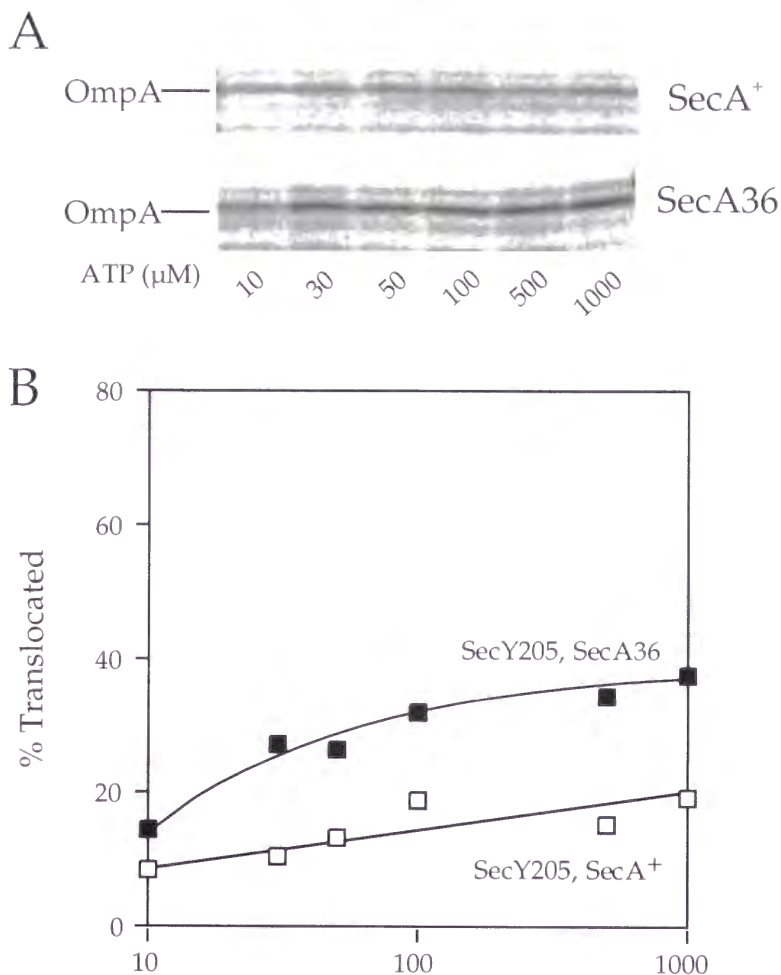


Figure 2-20: SecY205 IMV における proOmpA 膜透過反応の ATP 要求性

A: ³⁵S-proOmpA の膜透過をさまざまな濃度の ATP 存在下において 37°C で測定した。B: 膜透過した OmpA を定量し、グラフ化した。

■; SecA36, □; SecA⁺

in vitro 膜透過実験では ATP 再生成システムとして、ホスホクレアチンとクレアチンキナーゼを反応液中に含んでるため、ADP → ATP の再生反応が起こり、ATP の濃度は反応の開始から終わりまで一定している。膜透過における ATP の寄与を評価するために、PMF (Proton Motive Force) を形成しない実験条件で測定をおこなった。野生型 IMV の場合、最大活性を得るのに必要な ATP の濃度は 50 μM 程度であったが、ΔSecG IMV の場合は約 300 μM の ATP 濃度が必要であった。100 μM 以下の ATP 濃度では

Δ SecG IMV では膜透過が全く観察されなかった。この Δ SecG IMVにおける ATP の濃度要求性の上昇は、低温感受性サプレッサー SecA の SecA36 変異タンパク質により膜透過を駆動させても変わらなかった。つまり、proOmpA の膜透過反応を野生型 SecA で駆動した場合も、SecA36 で駆動した場合でも、ATP の濃度要求性のプロファイルは変わらず、ある濃度以下の ATP では全く機能できない。ATP が十分に存在しない場合では、SecA36 は SecG 欠失による膜透過活性の欠損をサプレスできない。

37°C における低濃度の ATP による Δ SecG IMV の膜透過活性の欠損は SecG 欠失膜に特異的なものか、それとも単に膜透過活性が低下したために起きた非特異的なものなのかを調べるため、SecY205 膜における膜透過の ATP 濃度要求性を調べた。前述したように SecY205 IMV への膜透過は、野生型 SecA との組み合わせでは膜透過欠損を示し、SecA36 によりサプレスされる。SecY205 IMV と SecA⁺/SecA36 の組み合わせでの ATP 濃度要求性を調べた (Figure 2-20)。SecY205 IMV の場合では SecA⁺/SecA36 のどちらの組み合わせでも ATP 濃度が 10 μ M と低い場合でも、有意な膜透過活性が観察された。従って、 Δ SecG IMV における膜透過の高濃度 ATP 濃度要求性は、SecG の欠失による特徴的な現象であると考えられる。これらの結果から、SecG は SecA が ATP を効率的に利用することを補助していることが考えられる。

2-4-4 KN370 株では MC4100 株と比べて菌体内 ATP 濃度が低下している

KN370 は *secG* 欠失変異体で増殖が低温感受性となるが、同じく *secG* 欠失変異を MC4100 に移すと低温感受性でなくなることは、2-4-1 で述べた。この違いは何に由来するのだろうか。前節で述べたように、SecG の欠失により膜透過の ATP 濃度依存性が増す。secG 欠失変異により低温感受性を示す菌株としめさない菌株では、菌体内の ATP 濃度に違いが生じている可能性を考え、実際に菌体内の ATP 濃度を測定した。37°C で培養したほぼ同数の細胞を過塩素酸で処理し、その後、強アルカリを加え pH を中性にして、過塩素酸塩と変性タンパク質を遠心分離により除去した。このようにして調製した、抽出液には低分子量の分子のみが含まれている。この抽出液中の ATP 濃度を、ルシフェリン/ルシフェラーゼの反応系により測定した。その結果を Figure 2-21

にまとめた。培地には Free の ATP は含まれていなかった。テトラサイクリン耐性遺伝子をもたない菌株 (GN78, MC4100) はそれを持つものに比べて、1.5 倍程度高かった。また、MC4100 Tn10 のバックグラウンドをもつ菌株間の菌体内 ATP 含有量はほぼひとしかった。これに対して、KN370 と同じ遺伝的バックグラウンド (C600) をもつものは、すべて菌体内の ATP 含有量が MC4100 の半分以下であった。これらの結果から、KN370 株が低温感受性となるのは、菌体内 ATP 濃度が低下していることが一因となっている可能性が考えられる。

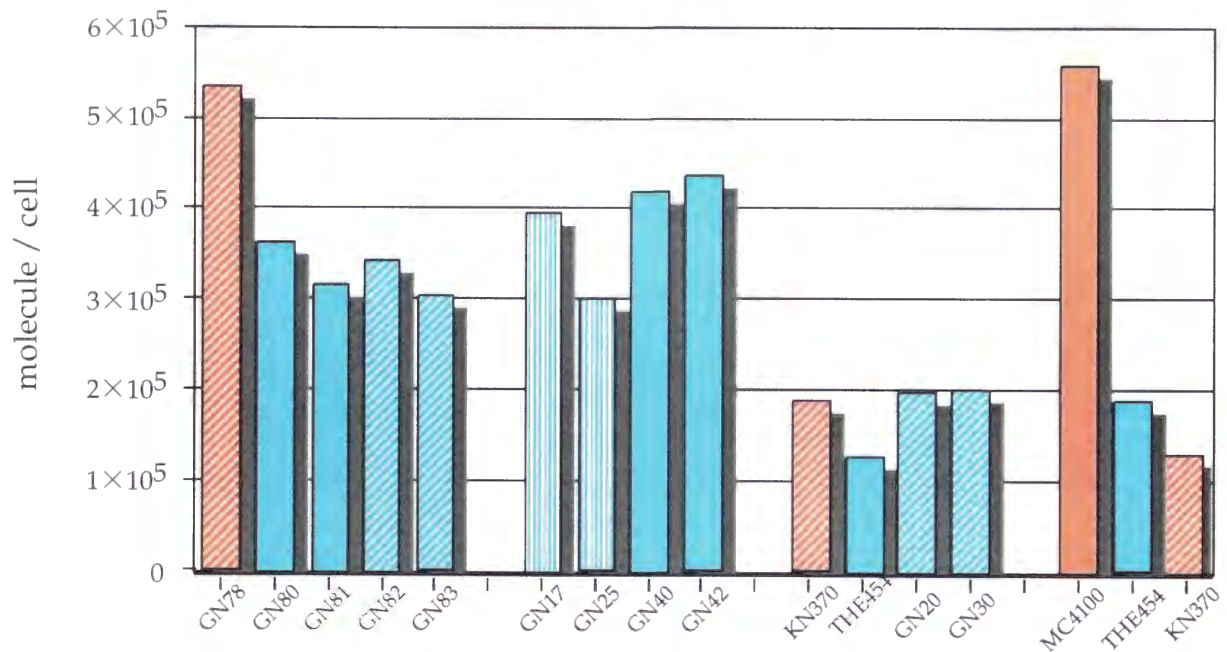


Figure 2-21 : 菌体内 ATP 濃度

約 6×10^7 個の細胞を当量の 12% HClO_4 , 5 mM Na_2HPO_4 で処理し、氷上で 30 分放置した後、2 M KOH, 0.3 M HEPES で中和した。遠心分離により、変性タンパク質および KClO_4 の結晶を除去した。この溶液中の ATP 含有量をルシフェリン/ルシフェラーゼ反応を利用してルミノメーターにより測定した。赤は Tn10 遺伝子をもたないもの、青は Tn10 遺伝子をもつもの、斜線は *secG::kan*、縦線は *secY205* をそれぞれ示す。各 strain の ATP 濃度の測定は 2 回行い、その平均を示した。重複するものは、それぞれ独立の培養液から調製したサンプルについての測定結果である。各菌株の遺伝型は次の通りである。GN78; MC4100 *secG::kan*, GN80; MC4100 *leu::Tn10*, GN81; MC4100 *leu::Tn10 secA36*, GN82; MC4100 *leu::Tn10 secG::kan*, GN83; MC4100 *leu::Tn10 secG::kan secA36*, GN17; AD202 *secY205 leu::Tn10*, GN25; AD202 *secY205 leu::Tn10 secA36*, GN40; AD202 *leu::Tn10*, GN42; AD202 *secA36 leu::Tn10*, KN370; C600 *recD secG::kan*, THE454; C600 *recD zgj203::Tn10 (nlp::Tn10)*, GN20; C600 *recD secG::kan zgj203::Tn10*, GN30; C600 *recDsecG::kan zgj203::Tn10 secA36*

Chapter 3 考察

SecA によるタンパク質膜透過駆動の分子機構として提唱された、insertion / deinsertion モデルは、タンパク質膜透過機構の解明する上で極めて重要なモデルである。本研究を始めた当時は、Wickner 研究室以外からの SecA の insertion 反応に関する追試実験の報告はなかった。私は SecA insertion 反応を再現させることに成功し、確認することができた。そして、SecA insertion 反応に異常を生じさせる SecY 変異を同定する事ができた。本研究によって SecY が SecA insertion 反応に対して確かに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

SecA の insertion 反応が膜透過と併役しているという Wickner らのモデルは、反転膜小胞を用いた *in vitro* 実験の結果を根拠としている。この SecA insertion 反応によって実際に前駆体タンパク質の膜への挿入が駆動されるのかどうか、そして、この機構が *in vivo* でも働いているのかどうかといった問題は疑問として残る。また、種々のことから、この SecA insertion 反応には、SecA と膜内在性の SecYEG 複合体との相互作用が重要であるとされているが、SecA-SecY 相互作用に関しては断片的な知見が多く、特に機能的な観点からの解析がほとんどなかった。この問題は前駆体タンパク質は SecA とともに膜透過チャンネルに挿入するのかどうかという、タンパク質膜透過チャンネルの性質を考える上で根本的な問題点にもつながる。上記が正しければ、「タンパク質膜透過」とは、正確には「タンパク質 - SecA 複合体の膜透過」と言わなければならないことともなるかもしれない。

本研究で私は、SecA insertion 反応に異常を生じさせる SecY205 変異を見出した。この変異株から調製した反転膜小胞は、ATP と前駆体タンパク質両者が存在するとき起こる「productive な」SecA insertion 反応を許さないが、非水解 ATP アナログ存在下で見られる SecA 単独での「空荷の」insertion は許す。SecA の insertion 反応が SecY

タンパク質中のアミノ酸置換により特異的に損なわれることから、SecA insertion に SecY が重要な機能を果たしていることが強く示唆される。

Taura らは、SecY の C 末端の C5, C6 領域の多くの変異により、SecA の機能が損なわれることを報告している。C5 領域のそれらの変異により SecA の translocation ATPase 活性の活性化が起こらない。しかし、本研究で行った、変異 SecY 膜への SecA insertion 反応のアッセイでは、顕著な insertion 反応の欠損を示したのは SecY205 だけであった。例えば、SecY39 は激しい膜透過活性の欠損が見られる変異であるが、SecA insertion 反応は起こった。SecA は SecY39EG に結合し、insertion を起こすところまでは反応が進むが、その後のステップ—SecA からの前駆体の解離やその後の動き—に欠損があると解釈することが可能である。このことはこの変異を持つ膜では SecA translocation ATPase 活性が低いことと一致する。このように、SecY205 変異における SecA insertion の欠損は膜透過欠損のため二次的に見られたのではなく、この変異に特異的なステップの欠損である。

secY205 変異が SecA-SecY 相互作用を特異的に変化させる変異であることは、この変異に特異的な (allele-specific な) サプレッサー変異が secA に起こることから、さらに強く示唆される。SecY205 反転膜小胞は、*in vitro* で野生型 SecA と組み合わせた時ほとんどタンパク質膜透過活性をもたない。しかし SecA36 変異タンパク質を用いれば、SecY205 膜に対しても正常に近い膜透過が起こる。さらに、SecA36 変異タンパク質は SecY205 膜に対しても、前駆体と ATP に呼応した insertion 反応をおこすことができる。このように *in vitro* において、SecY205 における活性不全とその SecA36 変異による活性回復が、オーバーオール膜透過と SecA の productive モードの insertion の二つの側面において明確に示された。そして、このような変異による活性の変化は、*in vivo* でのこれら二つの変異の表現型とよく一致している。我々は、この遺伝学解析と生化学解析の組み合わせによって、SecY と SecA の働きについて、*in vivo* と *in vitro* の橋渡しをすることができたと考えている。SecA の insertion という、従来考えられなかったようなダイナミックな蛋白構造の変化は、*in vivo* でも *in vitro* でも実際にタンパク質膜透

過に重要な役割を演じていることが強く示唆される。

SecA の insertion 反応は、前駆体と ATP 両者があるときに見られる productive-insertion と、非水解 ATP アナログが存在する場合に観察できる、基質を伴わない空荷の idling-insertion の 2 つのモードがある。SecY205 変異により、productive-insertion のみが損なわれる。SecA はリン脂質と相互作用することが詳しい研究により明らかとなっているが、もし空荷の insertion は脂質部分で起こり得るのなら、それが secY 変異の影響を受けないのは当然であり、SecY205 における欠損は単純な機能欠損と区別できない。Matsuo らは、SecE との相互作用が弱まった SecY24 変異株 IMV に SecY と相互作用する Syd 蛋白質を添加すると、高親和性 SecA 結合が失われ、非水解 ATP アナログ存在下の SecA 挿入も完全に阻害されることを示した。すなわち、空荷の挿入もインタクトな SecYE 複合体の存在を必要とする反応である。従って、上記の理屈にしたがい、SecY205 チャンネルでは、productive insertion 反応が特異的に欠損していることが結論できる。

SecA は前駆体を伴った状態では野生型チャンネルには挿入できるが、SecY205 変異で変化したチャンネルには挿入できないものと考えられる。この SecY205 によるチャンネルの性質変化とはどのようなものであろうか？例えば、単純にチャンネルの大きさが小さくなったため、単独 SecA は受け入れるが前駆体-SecA 複合体は受け入れないと言った変化が考えられるし、より複雑な構造の適合性の問題かもしれない。あるいは、SecY は前駆体結合型の SecA との相互作用により構造変化を起こし、膜透過のためのゲートがオープンするが、SecY205 変異によりこのゲートオープンに必要な SecA-SecY 相互作用が損なわれたかもしれない。あるいはゲートオープンのための構造変化自体を起こしにくくなったという可能性も考えられる。なお、SecY との相互作用の仕方によって SecA 側の構造変化の仕方が影響されることもあり得る。この場合には SecA36 変異体は前駆体との結合状態で挿入に都合のよい構造を誘起されやすいのかもしれない。上で挙げた可能性は、必ずしも相互に排除するものでないことも当然である。

既に述べたように、SecA が本当に SecY/E/G チャネルの中に挿入するのかという問題は、膜透過の分子機構を考えていく上で、重要な問題である。本研究で示したように、SecA の productive-insertion は SecY 変異により影響を受ける。SecA insertion が SecY との相互作用によって誘起されるとすれば、insertion 自体が SecY の近くで起こることは考えやすく、前駆体とともにチャネルの中に挿入することは大いに考えられる。現在 SecYEG が本当にチャネル構造をつくっていること自体確立したわけでもない（後述）ことを、念頭に置きつつ、この問題をもう少し考察したい。SecYEG 過剰発現膜では、SecA の insertion が昂進することは、チャネルへの挿入と矛盾しない (Duong and Wickner, 1997a) 膜透過の中間状態をつくり出してクロスリンク実験をすると、前駆体ポリペプチドは、SecY または SecA とクロスリンクするが、脂質とはしない (Joly and Wickner, 1993)、productive-insertion した SecA の 30 kDa ドメインは脂溶性のクロスリンカーによっても、脂質とはクロスリンクを起こさない (Eichler *et al.*, 1997) などの報告も、SecA の productive-insertion が脂質二重層の中ではなく、SecY/E/G チャネルの中で起こることを支持する結果である。

idling-insertion の場合も、SecY/E/G 複合体を再構成したプロテオリポソームでは観察されるが、リポソームでは観察されない (Economou *et al.*, 1995)、SecY-SecE 相互作用を Syd により特異的に壊した膜では起こらない (Matsuo, 1998) などの報告があり、SecYEG 膜透過チャネルの中で起きていると考えられる。idling-insertion がどのような意味を持っているのかは不明であるが、例えば SecA を膜表面で「アイドリング」させていることで、前駆体タンパク質が膜にターゲティングされたときに膜透過を迅速に開始させることができるように待機しているのかもしれないし、膜透過していないチャネルを塞いで透過障壁を保つのかもかもしれない。

以上のことから、SecA には前駆体に伴う productive insertion と空荷の insertion を起こす能力があるが、SecY205 変異により特異的に前駆体をともなった productive なモードでの insertion 反応が損なわれると考えられる。

SecA 変異による SecY205 のサプレッションについて

SecY205 は2つのモードの insertion 反応が異なる影響を受けた変異であり、SecA-SecY の特異的相互作用の遺伝学的解析に極めて適している。本研究では、*secY205* 変異の低温感受性をサプレスする *secA* 変異を系統的に分離した。その結果、変異は *secY205* allele に特異的なもの (Class I) と、*secY205* 以外の *sec* 変異もサプレスできるもの (Class II; Super-active SecA) の2つのクラスに分類された。Class I 変異に関しては、サプレッションが弱いものがあり、それらは見かけ上 allele 特異的に見えるだけなのかもしれない。しかし、いくつかのものは SecY205 の分泌欠損を Super-active SecA とほぼ同等にサプレスした。これらのものは、確かに allele 特異的なサプレッサーであると見なすことができる。allele 特異的なサプレッサー変異は、しばしば、二つのタンパク質間での物理的相互作用の存在を示唆するものとみなされる。つまり、このような変異は「鍵と鍵穴」的に、もとの変異による構造変化を相補するような、新たな構造変化を生じさせていると考えられる (Jarvik and Botstein, 1975)。これらの allele 特異的なサプレッサー変異は、SecA の NBS I 及び NBS II の Walker motif A の C 末端側にアミノ酸置換を生じさせるものであった。この離れた2つの領域は空間的に近接しており、SecY の C6 ドメインと相互作用しているのかもしれない。2つの Walker A motif 領域が SecY と相互作用することにより、SecA は前駆体を結合して SecYEG チャンネルの中に insertion するためのコンフォメーション変化を引き起こし、SecYEG 複合体も前駆体と SecA が入ることができるようにコンフォメーション変化をしてゲートをオープンするというモデルが考えられる。

Class II の変異は、*secY205* 以外の様々な *sec* 変異の欠損を回復させることができるので、SecA の機能を昂進させる変異であると考えられる。SecA には NBS I (高親和性) と NBS II (低親和性) の2つの ATPase ドメインが存在することが知られているが、NBS II の役割についてはほとんどわかっていない。Super-active SecA 変異のほとんどすべてが NBS II の Walker A motif 付近に集中していることは、この領域が SecA の機能制御に重要であることを示唆する。いくつかの Super-active SecA (*secA117*, *secA119*, *secA71*) を精製して ATPase 活性を測定すると、内在性 ATPase 活性が異常に高くなっ

ていた (Mori 未発表データ)。NBS II ドメインは NBS I と相互作用して、NBS I の ATPase 活性を抑制的に制御している可能性が示唆される。

SecA は N 末端側の 65 kDa の N ドメインと C 末端 30 kDa の C ドメインに大きく分けられる。N ドメインには 2 つの ATP 結合部位と、前駆体結合部位が含まれる。SecA insertion 実験で観察される、トリプシン耐性な 30 kDa の insertion 断片は、SecA の C ドメインに相当する (Eichler *et al.*, 1997)。本研究では、この C ドメインにはサプレッサー変異は見いだせなかった。また、N ドメインも膜に前駆体と ATP 依存的に膜に挿入しているという報告がある (Eichler and Wickner, 1997)。N ドメインの膜挿入が SecY205 変異により影響されるのかどうかについては不明である。この問題については、今後検討していきたいと考えている。

膜透過チャネルについて

大腸菌の膜透過装置は SecY, SecE, SecG の三者複合体で構成されている。真核生物における Sec61 は SecY のホモログであり、SecY の膜透過装置は生物間で広く保存されている。タンパク質は膜を透過していくときに、膜内在性の膜透過チャネルの中を通過していくと考えられている。SecY の変異により SecA の insertion が損なわれること、SecA の変異で SecY の変異をサプレスして insertion も回復することなどから、SecY と SecA が直接相互作用をしていることを示した。そのようなチャネル構造は SecY/E/G の三者複合体が一つで形成しうるのか、それとも複数集まったスーパーコンプレックスをつくっているのか。Sec61 複合体と枯草菌の SecY/E 複合体が電子顕微鏡により直接観察され、3-4 個のユニットから構成されていると考えられる像が得られている (Hanein *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1999)。大腸菌の SecYEG 複合体については、まだ電子顕微鏡での観察報告はないが、SecE の TM3 領域にシステインを導入した変異 SecE タンパク質は、前駆体存在下で ATP 非加水分解アナログ存在下 (ATP ではない) でダイマーを形成し (Kaufmann *et al.*, 1999)、SecG もまた、ペリプラズムドメインにシステインを導入した変異 SecG タンパク質どうしがダイマー形成をする (Nagamori and Tokuda

私信)。これらの結果は、SecY/E/G のユニットが複数個 (おそらく偶数個) が会合して一つの膜透過チャネルを形成していることを強く示唆している。

膜は透過障壁としての機能を持っている。これに対し、膜透過チャネルはタンパク質のような大きな分子を透過させるための穴をつくる。相反する二つの性質を共存させるためには、膜透過をしていない時は穴を閉じておき、膜透過している時はできるだけ漏れがないようにしておく必要がある。真核生物の場合では、リボソームは Sec61 と強固な結合をつくり、膜の透過障壁維持に寄与していると考えられる。リボソームが離れてしまったチャネルでは、小胞体の内腔側から Bip タンパク質がチャネルを塞ぎ、膜の透過障壁を維持するという報告もある (Hamman *et al.*, 1998; Liao *et al.*, 1997)。また、リボソームが膜に結合するとチャネルの内径が大きくなることが電子顕微鏡による観察から示唆されており (Hanein *et al.*, 1996)、リボソームによりチャネルの開閉が行われているらしい。大腸菌の場合では、SecA は SecY とおそらく直接結合しているため、大腸菌では SecA が小胞体膜におけるリボソームのように細胞質側から膜の透過障壁を維持しているのかもしれない。そして、膜透過のためのゲートの開閉が SecA と SecY の相互作用により制御されているというモデルも十分考えられる。この可能性を検証するためには SecY の構造変化を観察するような実験が必要である。そのためには、SecY のような膜内在性タンパク質の構造変化を観察する方法を開発していかなければならない。例えば、走査型電子顕微鏡による直接的な観察が非常に有効であると考えられるし、異なる状態の SecYEG 複合体の 2 次元結晶や 3 次元結晶が得られれば、理想的である。膜透過装置の構造変化を調べるためには、様々な条件で観察を行い上記のようなモデルとの比較検討が必要である。SecY205 変異とそのサプレッサー SecA 変異はそのためのよい材料になると思われる。

SecG の機能

膜タンパク質としては SecY と SecE のみを再構成する事により、基本的なタンパク質膜透過活性を再構成する事ができる (Akimaru *et al.*, 1991)。SecG は、SecY, SecE とともにプロテオリボソームに再構成すると膜透過の効率を上昇させる (Hanada *et al.*, 1996;

Nishiyama *et al.*, 1993)。secG の欠損変異株は低温感受性であるが (Nishiyama *et al.*, 1994)、しかし、菌株によって低温感受性の表現型が異なる。低温感受性増殖を示さないバックグラウンドでも低温では分泌活性の低下が見られる。SecG は低温条件下で、特に膜透過に重要な役割を果たすと考えられる。Nishiyama らは SecG は SecA の insertion とカップルしてそのトポロジーを反転させると報告し、このトポロジー反転により SecA の insertion を補助しているというモデルを提唱している (Nishiyama *et al.*, 1996)。また、secAcsR11 変異は secG 欠失変異と合成致死となることは上記モデルと一致し、SecG が 37°C でも機能することを示している (Suzuki *et al.*, 1998)。

本研究では、SecA36 変異によって、secG 欠失変異がサプレスされることを示した。SecA36 は SecA の NBS I に Ala 112 → Val の変異を持ち、secG 欠失変異の低温感受性の増殖と分泌欠損を *in vivo* で回復させた。secG 欠失変株から調製した ΔSecG 膜を用いた *in vitro* 実験で、野生型 SecA は 20°C で膜透過活性、translocation ATPase 活性をともに発揮できない。SecA36 では 20°C においても *in vitro* 膜透過を駆動できるし、translocation ATPase 活性も野生型膜との組み合わせと同等である。SecA36 は変異により 20°C においても SecG の機能を必要としなくなったものと思われる。言い換えれば、SecA は通常は 20°C で SecG の機能を必要としている。Duong と Wickner は 37°C において SecG 欠失膜でも野生型膜と同程度の translocation ATPase 活性を示すと報告したが、我々の実験では、SecG 欠失膜に対して SecA は translocation ATPase 活性を示さない。Duong らは SecYE 過剰発現膜を用いて実験を行っているため、我々の実験系と異なる。そのため、このような違いが生じた可能性が考えられる。

野生型 SecA は ΔSecG 膜に対して SecA insertion 反応の効率が低い。SecA36 は野生型膜と同等に ΔSecG 膜に対しても insertion 反応を起こした。SecG により活性化される SecA の機能には、SecA insertion 反応も含まれていると考えられ、SecA36 は膜への insertion 反応に SecG を必要としないと考えられる。SecG 欠失膜では、SecA の translocation ATPase 活性も低下するので、deinsertion が昂進しているとは考えにくい。逆に、SecA36 変異により ΔSecG 欠失膜への前駆体タンパク質に依存した SecA insertion 反応が昂進しているのは、deinsertion が減少したためという考えも可能だが、SecA36 は通常状態で ATPase 活性が野生型よりも高いことは、この考えと矛盾する。

タンパク質の膜透過反応を ATP 濃度を変えて測定したグラフのプロファイルは Δ SecG IMV と野生型とでは異なっていた。 Δ SecG IMV では 30 μ M 以下の ATP 濃度では 37°C で膜透過活性がない。 SecG を含む野生型 IMV では、この濃度の ATP でも十分に膜透過活性を示す。 SecA36 は Δ SecG IMV に対しても ATP が十分に存在する場合は、野生型近くまで膜透過を駆動する事ができるが、低 ATP 濃度下では Δ SecG IMV への膜透過の駆動ができない。つまり低 ATP 濃度の条件下では SecA36 の膜透過活性も、野生型 SecA の場合と同様に SecG に依存する。 SecY205 膜への膜透過反応を SecA36 によって駆動した場合、野生型膜の場合と同じく、低 ATP 濃度でも膜透過反応が起きた。従って、膜透過における ATP 濃度要求性の変化は、SecG 欠失変異に特異的なものであると考えられる。 SecG には ATP 結合のモチーフはないので SecG が ATP を SecA に渡すというのは考えにくい。 SecG には PMF とオーバーラップした機能があると報告されている。 PMF は前駆体タンパク質が細胞質からペリプラズムへの方角で移動する動きを促進する。また、PMF は前駆体の逆向きの動きを妨げる。本研究の実験条件では、PMF はかかっていない状態で膜透過活性を測定しているので、SecG 欠失膜における ATP 要求性と、PMF 要求性は同じことを見ているのかもしれない。例えば、SecG は直接タンパク質結合して、逆向きの動きを妨げているというモデルも可能である。

SecG の機能は 20°C において SecA に必要とされることは明らかであり、その SecG の必要性は SecA36 変異により軽減される。本研究では *in vivo* 及び *in vitro* 実験により、このことを証明した。よって、SecA36 は SecG を必要としなくなるように機能強化されており、タンパク質膜透過において有利になっているのかもしれない。では、なぜこのような能力の高い SecA が進化において選択されず、SecG が存在するようになったのであろうか？おそらく、このような機能亢進型 SecA が SecG のない膜透過システムを使うことに、不利となること——例えば、チャネルのゲーティングの機構や前駆体の疎水性部分を脂質に放す機構の制御が壊れているなど——があるのかもしれない。 SecA36 型の SecA により亢進した機能は完全に SecG の機能と置き換えることはできない。 SecA36 とオーバーラップした SecG の機能とはなにか、野生型では SecG はその機能をどのようにして発揮しているのかという分子レベルでの SecG の役割の解明が期待

される。

タンパク質の膜透過装置の構造を解明することは、今後に残された大きな課題である。この装置は、従来考えられた以上にダイナミックな動きを伴って機能しているため、最終的には種々の異なる状態の構造を決める必要があるであろう。今後のさらなる研究を行うことにより、タンパク質の膜透過機構の全貌の解明に貢献していきたい。

Chapter 4 材料と方法

4-1 材料

本研究で使用した試薬は、特にことわりがないかぎり和光純薬、ナカライテスク、シグマアルドリッチジャパン、Bio-Rad から購入した

4-1-1 菌株

本研究で使用した大腸菌株 (*Escherichia coli*) を Table 4-1 に示す

Table 4-1 本研究で使用した菌株

菌株 / 別名	遺伝子型	文献
MC4100	F ⁻ , <i>araD139</i> , $\Delta(\text{argF-lac})\text{U169}$, <i>rpsL150</i> , <i>relA1</i> , <i>flbB5301</i> , <i>deoC1</i> , <i>ptsF25</i> , <i>rbsR</i>	(Silhavy <i>et al.</i> , 1984)
AD16	CSH126/F ⁻ <i>lacI^H</i> : F ⁻ <i>lacI^H</i> <i>lacZ</i> Δ M15 Y ⁺ A ⁺ <i>pro+</i> / Δ <i>pro-lac</i> , <i>thi</i> , <i>ara</i> ⁺	(Akiyama and Ito, 1985)
C600	<i>supE</i>	(Stahl <i>et al.</i> , 1986)
AD179	MC4100, Δ <i>ompT</i>	(Akiyama and Ito, 1990)
AD202	MC4100, <i>ompT::kan</i>	(Akiyama <i>et al.</i> , 1990)
AD208	MC4100, <i>ompT::kan</i> , <i>zhd33::Tn10</i> <i>secY39</i>	(Baba <i>et al.</i> , 1990)
K1437	MC4100 <i>secA-lacZ</i> (λ PR9)	(Miller, 1972)
KN370	C600, <i>recD1009</i> , <i>secG::kan</i>	(Nishiyama <i>et al.</i> , 1994)
NH146	MC4100, <i>secD1</i> Tet ^S	
NH192	MC4100, <i>secE501</i> <i>argE</i> ⁺	
IQ97	F ⁻ , <i>leu-82::Tn10</i> , $\Delta(\text{argF-lpd})74$, $\Delta(\text{argF-lac})205$, H.Liebkes strain.	J.Gen.Microbiol. 99:263.
PR520	<i>flbB5301</i> , <i>ptsF25</i> , <i>relA1</i> , <i>rpsL150</i> , <i>deoC1</i> , λ - MC4100, <i>secE501</i> (Cs), <i>argE::Tn10</i>	(Riggs <i>et al.</i> , 1988)
THE453	KN370, <i>secG::kan</i> <i>zgj203::Tn10</i>	
THE454	C600, <i>recD1009</i> , <i>zgj203::Tn10</i>	
THE494	MC4100, Δ <i>ompT</i> , <i>secG::Kan</i>	
TW155	MC4100, <i>ompT::kan</i> $\Delta(\text{uncB-uncC})$	
TW156	MC4100, <i>ompT::kan</i> , <i>secY</i> ⁺ , <i>zhd-33::Tn10</i> , $\Delta(\text{uncB-uncC})$	
TY0	MC4100, <i>ompT::kan</i> , <i>zhd33::Tn10</i> <i>rpsE</i>	(Taura <i>et al.</i> , 1994)
TY 1	MC4100, <i>ompT::kan</i> , <i>zhd33::Tn10</i> <i>secY205</i>	(Taura <i>et al.</i> , 1994)
TY 2	MC4100, <i>ompT::kan</i> , <i>zhd33::Tn10</i> <i>secY110</i> , <i>rpsE</i>	(Taura <i>et al.</i> , 1994)
TY 4	MC4100, <i>ompT::kan</i> , <i>zhd33::Tn10</i> <i>secY117</i> , <i>rpsE</i>	(Taura <i>et al.</i> , 1994)
TY 8	MC4100, <i>ompT::kan</i> , <i>zhd33::Tn10</i> <i>secY125</i> , <i>rpsE</i>	(Taura <i>et al.</i> , 1994)
TY15	MC4100, <i>ompT::kan</i> , <i>zhd33::Tn10</i> <i>secY104</i> , <i>rpsE</i>	(Taura <i>et al.</i> , 1994)
TY16	MC4100, <i>ompT::kan</i> , <i>zhd33::Tn10</i> <i>secY124</i> , <i>rpsE</i>	(Taura <i>et al.</i> , 1994)
TY22	MC4100, <i>ompT::kan</i> , <i>zhd33::Tn10</i> <i>secY115</i> , <i>rpsE</i>	(Taura <i>et al.</i> , 1994)
TY23	MC4100, <i>ompT::kan</i> , <i>zhd33::Tn10</i> <i>secY119</i> , <i>rpsE</i>	(Taura <i>et al.</i> , 1994)
TY24	MC4100, <i>ompT::kan</i> , <i>zhd33::Tn10</i> <i>secY129</i> , <i>rpsE</i>	(Taura <i>et al.</i> , 1994)
TY25	MC4100, <i>ompT::kan</i> , <i>zhd33::Tn10</i> <i>secY122</i> , <i>rpsE</i>	(Taura <i>et al.</i> , 1994)
TYE078	MC4100, <i>lamB560::Tn5</i> (Kan r), <i>prlA4</i>	(Emr and Jr., 1982)
TYE098	MC4100, <i>cya283</i> / F ⁻ <i>lacI^H</i> <i>lacPL8</i> <i>lacZ</i> ⁺ Y ⁺ A ⁺ <i>pro</i> ⁺ / pKY173	(Yoshihisa and Ito, 1996)
GN04	MC4100, <i>ompT::kan</i> , <i>zhd33::Tn10</i> <i>secY39</i> , $\Delta(\text{uncB-uncC})$	
GN05	MC4100, <i>ompT::kan</i> , <i>zhd33::Tn10</i> <i>secY205</i> , $\Delta(\text{uncB-uncC})$	

GN06	MC4100, <i>ompT::kan, zhd33::Tn10 rpsE, secY110, ΔuncB-uncC</i>
GN07	MC4100, <i>ompT::kan, zhd33::Tn10 rpsE, secY117, ΔuncB-uncC</i>
GN08	MC4100, <i>ompT::kan, zhd33::Tn10 rpsE, secY125, ΔuncB-uncC</i>
GN09	MC4100, <i>ompT::kan, zhd33::Tn10 rpsE, secY104, ΔuncB-uncC</i>
GN10	MC4100, <i>ompT::kan, zhd33::Tn10 rpsE, secY124, ΔuncB-uncC</i>
GN11	MC4100, <i>ompT::kan, zhd33::Tn10 rpsE, secY115, ΔuncB-uncC</i>
GN12	MC4100, <i>ompT::kan, zhd33::Tn10 rpsE, secY119, ΔuncB-uncC</i>
GN13	MC4100, <i>ompT::kan, zhd33::Tn10 rpsE, secY129, ΔuncB-uncC</i>
GN14	MC4100, <i>ompT::kan, zhd33::Tn10 rpsE, secY122, ΔuncB-uncC</i>
GN15	MC4100, <i>ompT::kan, secY205</i>
GN17	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, leu-82::Tn10</i>
GN20	C600, <i>recD1009, secG::kan, leu-82::Tn10</i>
GN21/ 3-1	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, leu-82::Tn10, secA31</i>
GN25/ 3-6	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, leu-82::Tn10, secA36</i>
GN29/ 8-1	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, leu-82::Tn10, secA81</i>
GN30	KN370, <i>secA36, leu-82::Tn10</i>
GN31	MC4100, <i>ompT::kan, secY39, Tet^S</i>
GN32	MC4100, <i>ompT::kan, secY125, Tet^S</i>
GN33	MC4100, <i>ompT::kan, secY104, Tet^S</i>
GN34	MC4100, <i>ompT::kan, secY115, Tet^S</i>
GN35	MC4100, <i>ompT::kan, secY129, Tet^S</i>
GN36	PR520 Tet ^S
GN40	MC4100, <i>ompT::kan, leu-82::Tn10</i>
GN41	MC4100, <i>ompT::kan, leu-82::Tn10, secA31</i>
GN42	MC4100, <i>ompT::kan, leu-82::Tn10, secA36</i>
GN43	MC4100, <i>ompT::kan, leu-82::Tn10, secA81</i>
GN45	MC4100, <i>ompT::kan leu-82::Tn10 / F' lac^f lacPL8 lacZ⁺ Y⁺ A⁺ pro⁺</i>
GN47	MC4100, <i>ompT::kan leu-82::Tn10, secA36 / F' lac^f lacPL8 lacZ⁺ Y⁺ A⁺ pro⁺</i>
GN48	MC4100, <i>ompT::kan leu-82::Tn10, secA81/ F' lac^f lacPL8 lacZ⁺ Y⁺ A⁺ pro⁺</i>
GN50	GN45/ pKY173
GN51	GN49/ pKY173
GN80	MC4100, <i>leu-82::Tn10</i>
GN82	MC4100, <i>leu-82::Tn10, secG::kan</i>
GN131/ 5-1	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA511, leu-82::Tn10</i>
GN132/ UV23	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA23, leu-82::Tn10</i>
GN133/ UV33	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA33, leu-82::Tn10</i>
GN134/ UV84	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA84, leu-82::Tn10</i>
GN135/ UV95	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA95, leu-82::Tn10</i>
GN136/ UV102	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA102, leu-82::Tn10</i>
GN137/ UV121	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA121, leu-82::Tn10</i>
GN138/ UV131	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA131, leu-82::Tn10</i>
GN139/ UV132	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA132, leu-82::Tn10</i>
GN140/ UV143	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA143, leu-82::Tn10</i>
GN141/ UV151	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA151, leu-82::Tn10</i>
GN142/ UV171	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA171, leu-82::Tn10</i>
GN143/ UV181	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA181, leu-82::Tn10</i>
GN144/ UV192	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA192, leu-82::Tn10</i>
GN145/ UV198	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA198, leu-82::Tn10</i>
GN146/ UV199	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA199, leu-82::Tn10</i>
GN147/ UV1912	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA1912, leu-82::Tn10</i>
GN148/ UV212	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA212, leu-82::Tn10</i>
GN149/ UV223	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA223, leu-82::Tn10</i>
GN150/ UV239	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA239, leu-82::Tn10</i>
GN151/ UV264	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA264, leu-82::Tn10</i>
GN152/ UV272	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA272, leu-82::Tn10</i>

GN153/ UV273	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA273, leu-82::Tn10</i>
GN154/ UV2810	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA2810, leu-82::Tn10</i>
GN155/ 1-1	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA11, leu-82::Tn10</i>
GN156/ 1-10	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA110, leu-82::Tn10</i>
GN157/ 1-17	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA117, leu-82::Tn10</i>
GN158/ 1-19	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA119, leu-82::Tn10</i>
GN159/ 4-1	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA41, leu-82::Tn10</i>
GN160/ 7-1	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA71, leu-82::Tn10</i>
GN161/ UV101	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA101, leu-82::Tn10</i>
GN162/ UV111	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA111, leu-82::Tn10</i>
GN163/ UV173	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA173, leu-82::Tn10</i>
GN164/ UV195	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA195, leu-82::Tn10</i>
GN165/ UV231	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA231, leu-82::Tn10</i>
GN166/ UV262	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA262, leu-82::Tn10</i>
GN167/ UV283	MC4100, <i>ompT::kan, secY205, secA283, leu-82::Tn10</i>
GN168	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA24, leu-82::Tn10</i>
GN169	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA511, leu-82::Tn10</i>
GN170	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA33, leu-82::Tn10</i>
GN171	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA84, leu-82::Tn10</i>
GN172	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA102, leu-82::Tn10</i>
GN173	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA121, leu-82::Tn10</i>
GN174	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA131, leu-82::Tn10</i>
GN175	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA151, leu-82::Tn10</i>
GN176	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA171, leu-82::Tn10</i>
GN177	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA198, leu-82::Tn10</i>
GN178	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA1912, leu-82::Tn10</i>
GN179	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA223, leu-82::Tn10</i>
GN180	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA239, leu-82::Tn10</i>
GN181	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA23, leu-82::Tn10</i>
GN182	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA95, leu-82::Tn10</i>
GN183	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA143, leu-82::Tn10</i>
GN184	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA192, leu-82::Tn10</i>
GN185	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA199, leu-82::Tn10</i>
GN186	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA212, leu-82::Tn10</i>
GN187	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA264, leu-82::Tn10</i>
GN188	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA272, leu-82::Tn10</i>
GN189	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA132, leu-82::Tn10</i>
GN190	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA181, leu-82::Tn10</i>
GN191	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA273, leu-82::Tn10</i>
GN192	MC4100, <i>ompT::kan, rpsE, secY⁺, secA2810, leu-82::Tn10</i>

本研究で使用した菌株のすべてを示した。
結果に含まれないが、菌株を構築する上での中間段階に相当するものも含む。
引用文献の記載がないものは本研究で構築した。

4-1-2 プラスミド

pKY173 は野生型 SecA タンパク質の大量発現プラスミドである (Yoshihisa and Ito, 1996) pKY173 は pNO1575 ベクターの *lac* プロモーター下に 3.3 kbp の SecA *EcoRI* フラグメントが挿入されている

pGN101 は SecA36 変異タンパク質の大量発現プラスミドで、pKY173 の SecA の 0.8 kbp の *EcoRI* 断片を *secA36* 変異株のクロモソームからクローニングした同様の断片と入れ替えて構築した

4-1-3 培地

大腸菌の培養には、L 培地 (1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl, 1.7 mM NaOH) および M9 培地 (42.3 mM Na_2HPO_4 , 22 mM K_2HPO_4 , 8.6 mM NaCl, 18.9 mM NH_4Cl , 1 mM MgSO_4 , 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ thiamine) を用いた (Silhavy *et al.*, 1984)。L 寒天培地は L 培地に 1.2% Agar を加えた。パルスラベル実験では、M9 に L-Met, L-Cys を除く 18 アミノ酸 (各 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、炭素源 (0.4% glucose または 0.4% maltose と 0.4% glycerol) を加えた。P1 形質導入時の薬剤耐性株の選択などには 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ テトラサイクリンを、またプラスミドを持つ株の培養には 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンをそれぞれ必要に応じて L 培地に加えた (Ausubel *et al.*, 1990)。 NaN_3 耐性を調べる実験では、0.2 mM、0.5 mM、1.0 mM、2.0 mM の NaN_3 を加えた L 寒天培地を用いた。Tet^r selection 培地は 0.5% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl, 0.05mg/ml chlortetracycline-hydrochloride をオートクレーブした後 fusaric acid (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1%), ZnCl_2 (1mM) を加えた (Maloy and Nunn, 1981)

4-1-4 合成プライマー

secA 変異株の塩基配列の決定に使用したプライマーを Table 4-2 にまとめた。*secA* のプライマーは、DNA シンセサイザー model 380B (Applied Biosystems) で合成した (*secA* sequence primer)。その他のプライマーは株式会社 サワディーテクノロジーに合成を依頼した。

Table 4-2 本研究で使用したプライマーの塩基配列

PCR primers		
SecA PCR-N	:	5' - ATCCGTGCTGGCCCTCAACGCCTC -3'
SecA PCR-C	:	5' - ATAATACCTACCGCAATTTCAGC -3'
SecG PCR-N	:	5' - TTCACACCCGCTTCAGTGG -3'
SecG PCR-C2	:	5' - CCTATTGGGCACTACCACCTCAA -3'
SecY PCR-N	:	5' - CGTGTTACTAAAGGCGCTCG -3'
SecY PCR-C	:	5' - TTTACTCTCCGTAACCTCTC -3'
Sequence Primers		
SecA sequence		
Primer 1-2	:	5' - CCGAGTAACTGAACGTCG -3'
Primer 2	:	5' - CGCAGGTAGTCAAAGCCG -3'
Primer 3	:	5' - AATCAGCACCAGACCACG -3'
Primer 4	:	5' - ATCGAAGCCAGCGTTTGG -3'
Primer 5-2	:	5' - TCGATGGAGATAGTACCC -3'
Primer 6	:	5' - ACCGATGATATGCAGGCC -3'
Primer 7	:	5' - GCCACGTCATCATATTCC -3'
Primer 8	:	5' - ATGGACTGCCCCAGAAATG -3'
Primer 9-2	:	5' - CCATACGACGCTGTTGTT -3'
Primer 10-2	:	5' - TTCATTGTCTTAAACCTATAA -3'
Primer rev-2	:	5' - CAGTTACTCGCGGTATGG -3'
Primer rev-6	:	5' - TCCGGCTGCGGTGACTAT -3'
Primer rev-8	:	5' - GCCAATTGCCGAGTGGCT -3'
SecY sequence		
secY-1	:	5' - CTGCTGGCGTAAAATCG -3'

secY-2	:	5' - CTGTACTTGCCAAACTGC -3'
secY-3	:	5' - TTAAGTGAACGAGGTATCG -3'
secY-4	:	5' - TGTGTTACTCTATGCGTC -3'
YS-2	:	5' - TTCTATCTTTGCTCTGG -3'
YS-5	:	5' - ATAACCTGAAGAAGTCCG -3'

4-2 方法

4-2-1 P1 *vir* 形質導入

P1 *vir* ファージを用いる形質導入は、Miller の本に従った (Miller, 1972) 一晚培養した培養液 1 ml に P1 *vir* ファージ溶菌液を 10 - 50 μ l 加え 37°C、20 分間ファージを吸着させた。10 mM Na₃citrate を含む L 培地を加えて洗浄し、L-Tet 寒天培地上、37°C で培養した。各形質導入体は非選択完全培地での S.C.I. (Single Colony Isolation) 純化を経てから選択マーカーを含む遺伝子マーカーを生理食塩水懸濁ケンザン法で調べた。

4-2-2 *secY205* のサプレッサー *secA* 変異の分離

NG Mutagenesis

GN17 (*secY205, leu::Tn10*) をクレットユニット (KU : KU=20 が 1×10^8 個の細胞に相当する) 100 まで増殖させた後、菌体を回収し 0.1 M Na-citrate pH5.5 の Buffer で洗菌した後、再び同じ Buffer に懸濁し、25-75 μ g/ml の N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NG) を用いて 37°C で 30 分間静置することにより変異を誘起させた。変異が誘起されたことは、30 μ g/ml ナリジキシン酸を含む L 寒天培地上で培養し、NaI^R 変異を起こしたコロニーの形成率が変異剤未処理のものに比べて顕著に増加することにより確認した。変異を誘起した細胞は L 培地で 2 回洗浄した後、L 培地中で 37°C、4 時間振盪培養した。この培養液を 10^2 および 10^3 に希釈し、L-Tet 寒天培地上で 20°C、3 日間培養した。Cs⁺ となったコロニー (約 100~1000 個) をあつめてプールし、そこから P1 *vir* ファージ溶菌液を調製した。この P1 *vir* 溶菌液を GN15 に感染させ、テトラサイクリン耐性のコロニーを 20°C で選択し、S.C.I. 純化したものをストックした。

UV Mutagenesis

GN17 (*secY205, leu::Tn10*) または GN96 (*secY104, zgj203-Tn10*) を KU = 60 まで増殖させた培養液 10 ml から菌体を回収し、10 ml の 0.1 M MgSO₄ に懸濁した後、UV 照射 (14 J/m²) により変異を誘起させた。0.9 ml づつ 10 本の褐色試験管に分注し、3 ml の L 培地を加えて一晚 37°C で培養した。培養液を 10^2 に希釈し、0.1 ml を L-Tet 寒天培地上で 20°C で 3 日間培養した。Cs⁺ のコロニーをプールし、P1 溶菌液を調製し、それぞれ GN15 (*secY205, Tet^S*) および GN94 (*secY104, Tet^S*) に P1 形質導入した。テトラサイクリン耐性のコロニーを 20°C で選択し、S.C.I. 純化したものをストックした。

4-2-3 クローニングと塩基配列の決定

大腸菌コロニーから直接目的の遺伝子を増幅した。変異株のコロニーを懸濁した 20 μ l の Milli-Q 水に、PCR-N, C プライマー (それぞれ 20 pmol; Table 4-2) と Ready-To-GoTM PCR Beads (Amersham Pharmacia)

一つを加えて PCR 反応を行った GeneAmp[®] PCR System 9700 (The Perkin-Elmer Applied Biosystems) により 95°C 5 分間の熱処理後、95°C, 30 秒 - 55°C 30 秒 - 72°C 1 分のサイクルを 25 サイクル行った。電気泳動で DNA の増幅を確認した後、増幅バンドをゲルからの回収することにより、もしくは MicroSpin[™] S-400 スピнкаラム (amersham pharmacia biotech) でプライマーを除いた。増幅された DNA をテンプレートとして、適当なプライマー (3.2 pmol; Table 4-2) を用いて、ABI PRISM[™] Cycle Sequence Kit による、dyedideoxy cycle sequence 反応を行い、ABI DNA シークエンサー Model 373A, 377 で泳動し塩基配列を解析した。

結果には示さなかったが、野生型 *secA* 遺伝子 (pMA34: 野生型 *secA* 遺伝子をもつプラスミド) を含む全ての変異株にデータベースにある配列と異なる部分があることがわかった。データベース上では 2211 番目は C と 2212 番目は G と報告されているが、今回の塩基配列の決定により 2211 番目は G、2212 番目は C であることがわかった。これは全ての変異および野生型 *secA* プラスミドで同じであり、DNA 鎖を両方から読んで確認した。データベースに間違いがある可能性が考えられる。

SecA36, SecA81 は次のようにしてクローニングした。変異株より調製した染色体 DNA (20 μg) を制限酵素 *EcoRI* (40 units) で 37°C、6 時間消化し、0.8% アガロース電気泳動 (40 V、9 時間) により DNA 断片を分離した。アガロースゲルから 2.5 kbp と 0.8 kbp の DNA 断片を切り出し、回収した。クローニングベクターとしては、pUC118 を用いた。pUC118 ベクターを *EcoRI* で切断後、1% アガロース電気泳動により直鎖化されたものを回収し、CIP 処理をした。これと染色体 DNA 由来の 2.5 kbp 断片 (*secA* 遺伝子の *EcoRI* 切断による C 末断片を含む) および 0.8 kbp 断片 (*secA* 遺伝子の *EcoRI* 切断による N 末断片を含む) をライゲーション (16°C、2 時間: TAKARA Ligation Kit ver.2) した。これを AD16 にルビジウム法で形質転換し、L-Amp 寒天培地上、37°C で培養した。*secA* 遺伝子断片を含むものの選択は、*secA* の制限酵素マップより、特定の制限酵素切断による断片の大きさを指標として選択した。

4-2-4 パルスラベル実験

M9-グルコース-アミノ酸 (-Cys、-Met) 培地で 37°C で前培養培養した細胞を、M9-グリセロール-アミノ酸 (-Cys、-Met) -0.4% マルトース + 5 mM cAMP 培地に移し、KU = 30 まで 37°C で培養した。培養液に [³⁵S]メチオニン (5~13 μCi / ml) を加えて 37°C では 30 秒間パルスラベルした。あるいは、20°C に移して 20 分培養してから 60 秒間パルスラベルをした。反応は等量の 10% TCA 溶液を加えて停止させた。TCA 処理により変性した全タンパク質を遠心分離 (13000 rpm、3 分) により沈殿させ、アセトンで洗浄した後、SDS-Tris-EDTA 溶液 (1% SDS、50 mM TrisHCl (pH8.1)、1 mM EDTA) に溶解した。98°C で 3 分間処理して、タンパク質-SDS 複合体として可溶化した後、Triton buffer (50 mM TrisHCl (pH8.1)、1 mM EDTA、0.15 M NaCl、0.1% TritonX-100) で 34 倍に希釈し、13000 rpm で 10 分間遠心分離して非特異的沈殿を除去した。この上清に MBP 及び OmpA の抗体と ProteinA-Sepharose ビーズを加え、4°C で一晩放置することでタンパク質-抗体複合体を形成させ、複合体をビーズに結合させた。4°C で 10 秒間遠心して上清を除き、沈殿を再び Triton buffer、次に 10 mM TrisHCl (pH8.1) に懸濁し、再遠心することで洗浄した。SDS-Sample buffer で沈殿を懸濁し 98°C、3 分間処理で抗体からタンパク質を遊離させ、タンパク質を可溶化した。SDS-PAGE (10% レムリゲル) によりタンパク質を分離し、BAS2000 または BAS1800 バイオイメージングアナライザーで解析し、定量した。

4-2-5 大腸菌の反転膜小胞の調製

細胞を 2 リットルの L 培地で培養し、KU = 90-100 まで培養した。培養液から遠心分離により菌体を回収し、200 ml の 10 mM Tris-HCl (pH 8.1) で洗浄後、25 ml の (Spheroplast buffer: 20% (v/v) sucrose、

30 mM Tris-HCl (pH 8.1)、1 mM DTT) に懸濁し、2.5 ml の lysozyme 溶液 (1 mg/ml lysozyme in 0.1 M EDTA (pH 7.0)) を加え、0°C で30分間インキュベートした。遠心分離によりスフェロプラストを回収し、25 ml の (Lysate buffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8.1)、20 % sucrose、3 mM EDTA、1 mM DTT) に懸濁した後、フレンチプレス処理 (6000 psi) を2回行う (この時点で反転膜小胞が形成される)。遠心分離によりを除いた後、超遠心分離 (38,000 rpm、1時間、Beckman 70 Tiローター使用) により膜画分を沈殿として回収する。膜を5 ml の3 mM EDTA、1 mM DTT に懸濁し、遠心により上清を回収する。この上清をしょ糖等密度勾配 (33 %、40 %、48 %、54 %、62 %、70 % sucrose in 3 mM EDTA、1 mM DTT) にのせ、超遠心分離 (27,000 rpm、16時間、Beckman SW28ローター使用) により内膜画分 (約5 ml) を分離回収する。内膜画分を15 ml の (50 mM HEPES-KOH pH7.5、50 mM KCl、10 mM Mg(Ac)₂、10 mM β-mercaptoethanol) に懸濁し、超遠心分離 (38,000 rpm、1時間、Beckman 70 Tiローター使用) により内膜を回収し、0.5 ml の (50 mM HEPES-KOH pH7.5、50 mM KCl、10 mM Mg(Ac)₂、10 mM β-mercaptoethanol) にホモジェナイザーを用いて懸濁した。反転内膜小胞は6 M の尿素中 (50 mM HEPES-KOH pH7.5、6 M urea、50 mM KCl、10 mM Mg(Ac)₂、10 mM β-mercaptoethanol) で4°C、2時間処理し、尿素を除去した後、タンパク定量により反転膜小胞のタンパク質濃度を決定し、ドライアイスエタノール槽または、液体窒素により凍結し、-80°C で保存した。

4-2-6 SecA タンパク質の精製

TYE098 株 (SecA⁺) またはGN52 (SecA36) を2リットルのL-グルコース (0.4%) 培地で KU = 60 まで37°C で振盪培養し、1 mM IPTG (isopropyl-b-D-thiogalactoside) および0.5 mM cyclic AMP を添加してさらに37°C で2時間振盪培養した。菌体を回収し、50 ml の SecA buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、12 mM 酢酸マグネシウム、60 mM KCl、1 mM DTT (dithiothreitol)、0.2 mM PMSF (phenyl-methyl sulfonyl fluoride)) に懸濁後、超音波で破碎した。細胞破碎液から低速遠心分離により未破碎の細胞を除去し、超遠心分離 (38 krpm; 70 Ti ローター) により膜画分を除去した。細胞抽出液を Red-アガロースアフィニティーカラム (12 ml) にかけて、250 ml の SecA buffer でカラムを洗浄後、0.06-2 M KCl の濃度勾配をかけて SecA タンパク質を溶出した。SecA タンパク質の純度が高いフラクションを回収し、2.4 L の SecA buffer で透析後、DEAE-sepharose カラム (15 ml) にかけて30 ml の SecA buffer でカラムを洗浄後、0.06-0.5 M KCl の濃度勾配をかけて溶出し、SecA タンパク質を濃縮した。NAP-25 カラムで脱塩し、タンパク質濃度を Bio-Rad protein assay solution により牛γグロブリンをスタンダードとして比色定量し、-80°C で保存した。

4-2-7 SecA ATPase 活性測定

マラカイト法

この方法は、ATP が加水分解されて得られる無機リン酸の量を直接マラカイトグリーンとモリブデン酸アンモニウムにより比色定量する (Lanzetta *et al.*, 1979; Lill *et al.*, 1990)

2 μg 反転膜小胞、2 μg SecA と2 mM ATP を含む50 μl の反応溶液 (50 mM Tris HCl (pH 7.2)、30 mM KCl、30 mM NH₄Cl、5 mM 酢酸マグネシウム) に2 μl proOmpA (1.82 μg in 6 M urea) または2 μl 6 M urea を加えて37°C でインキュベートした。時間ごとに10 μl の反応液を取り出し、240 μl の mixed reagent (0.271% マラカイトグリーン、0.387% polyvinyl alcohol、0.953% モリブデン酸アンモニウム 1 M HCl) に加え、1分後に34% クエン酸を30 μl を添加して呈色反応を止めた。室温で30分以上放置して呈色反応が安定した後に、630 nm の吸光度を測定した。

酵素カップリング法

この方法は、ATPase 活性による ADP の生成を酵素反応 と組み合わせて NADH の酸化による吸光度の減少として観察する。ADP とホスホエノールピルビン酸 (phosphoenolpyruvate) はピルビン酸キナーゼ (pyruvate kinase) により ATP とピルビン酸 (pyruvate) に変換される。ピルビン酸は乳酸脱水素酵素 (Lactate dehydrogenase) により乳酸になるが、そのとき NADH が酸化されて NAD^+ が生成する。

反転膜小胞 (0.2 mg/ml), SecA (20 mg/ml), SecB (24 mg/ml), ATP (2 mM), KCN (5 mM), NADH (250 mM), ホスホエノールピルビン酸 (PEP; 3 mM), ピルビン酸キナーゼ (5 units), 乳酸脱水素酵素 (7.5 units) を含む 200 μl の 50 mM HEPES-KOH pH7.5, 2 mM MgCl_2 buffer に 1 μl の proOmpA (9.2 mg/ml in 6 M urea) または 6 M urea を加えて 37°C または 20°C でインキュベートした。Beckman DU¹ 640 吸光光度計により 340 nm の吸光度の減少を経時的に 5-10 分間測定した。吸光の減少速度が一定の範囲で、ATP の加水分解速度を求めた。

4-2-8 *in vitro* 膜透過反応

in vitro 転写した proOmpA の mRNA を [³⁵S] メチオニン 存在下で *in vitro* 翻訳することにより、³⁵S で放射標識された proOmpA を合成した (Uchida *et al.*, 1995)。*in vitro* 翻訳された proOmpA を TCA 沈殿し、7.5% TCA で洗浄後、6 M urea-50 mM Tris HCl (pH 7.5), 2mM DTT buffer に懸濁した。

IMV (150 mg protein/ml), SecA (100 mg/ml), SecB (25 mg/ml), ATP (2 mM), ホスホクレアチン (50 mM), クレアチンキナーゼ (100 mg/ml) を含む 20 μl の translocation buffer (TL buffer: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 200 mg/ml BSA, 10 mM β -メルカプトエタノール) を 37°C で 1 分間インキュベートした後、³⁵S で放射標識した proOmpA を 1 μl 加えて、37°C で 15 分間インキュベートした。1 mg/ml のトリプシンで 0°C、15 分間処理した後、SDS-PAGE (10% laemmli gel) によりタンパク質を分離し、BAS2000 または BAS1800 で解析した。

4-2-9 SecA の ¹²⁵I ラベル

SecA のラベル法は、Economou らの方法 (Economou and Wickner, 1994) を改変しておこなった。エッペンチューブの内面に 100 μg の IODO-GEN[®] (1,3,4,6-Tetrachloro-3a,6a-diphenylglycouril; PIERCE 社) の被膜をつくった。1 mg の精製した SecA を 200 μl の buffer BA (50mM Tris-HCl pH7.5, 50 mM KCl, 5 mM Mg-acetate, 10% glycerol) 中で Na^{125}I (1 mCi; ICN 社) とともに氷上で 20 分間インキュベートすることで放射ラベルした。反応を 50 mM の β -メルカプトエタノールでとめ、NAP-5 カラムで未反応の Na^{125}I を除去した。溶出された ¹²⁵I-SecA (¹²⁵I-SecA36) タンパク質濃度を Bio-Rad protein assay solution により牛 γ -グロブリン をスタンダードとして比色定量し、-80°C で保存した。比放射活性は SecA^+ : 2.64×10^6 cpm/ μg -SecA, SecA36: 2.23×10^6 cpm/ μg -SecA であった。

4-2-10 SecA の insertion 実験

Economou らの方法 (Economou and Wickner, 1994) を一部改変して行った。6 M 尿素で洗った IMV と ¹²⁵I-SecA (100nM) または ¹²⁵I-SecA36 を 0°C で 30 分間放置した後、微量遠心分離 (13000rpm, 30分) により ¹²⁵I-SecA (¹²⁵I-SecA36) を結合した IMV を回収した。この IMV (5 μg /assay) をスクレオチド (1mM)、SecB (4 μg)、proOmpA (3.3 μg)、ATP regeneration system (50mM phosphocreatine, 0.1mg/ml creatine kinase : ATP の場合のみ) を 50 μl の translocation buffer (50 mM TrisHCl pH8.0, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 200 μg /ml BSA, 10 mM β -メルカプトエタノール) 中で 37°C、15 分間 (経時変化の測定の場合は各時間) インキュベートした。0°C に冷却した 2 mg/ml トリプシンを等量加え、0°C で 15 分間消化した。トリプシン消化

後、TCA 沈殿し、SDS-sample bufferで可溶化した。SDS-PAGE (12.5% レムリゲル) でタンパク質を分離し、イメージングプレートを用いたオートラジオグラフィーを行い、BAS2000 または BAS1800 イメージングアナライザーで解析し、バンドを定量した。

4-2-11 SecAの膜結合実験

SecAのIMVとの結合は、Hartlらの方法に従った (Hartl *et al.*, 1990) 4-400nMのSecA (うち4 nM ^{125}I -SecA を含む) と IMV (5 μg) を 50 μl の反応系で 0°C、30 分間インキュベートし、40 μl を 0.2 M ショ糖のクッションを通して、微量遠心分離 (13000rpm、20分) し、上清と沈殿画分および反応溶液の放射活性を LKB γ -カウンターで測定した。

4-2-12 菌体内 ATP 濃度測定

菌株を 37°C で KU = 60 まで増殖させた培養液 200 μl を、200 μl の 12% HClO_4 + 5 mM Na_2HPO_4 に加え、室温で 30 分放置した。240 μl の 2 M KOH + 0.3 M HEPES を加えて、中和し KHClO_4 を沈殿させた。凍結融解を 2 回行った後、微量遠心分離により沈殿したタンパク質と KClO_4 を除去し、上澄に含まれる ATP の濃度を Bioluminescent somatic cell assay kit (SIGMA) により 1251 ルミノメーター (バイオオービット社) を用いて測定した。

参考文献

- 1) Akimaru, J., Matsuyama, S.-i., Tokuda, H. and Mizushima, S. (1991) Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6545-6549.
- 2) Akiyama, Y., Inada, T., Nakamura, Y. and Ito, K. (1990) SecY, a multispinning integral membrane protein, contains a potential leader peptidase cleavage site. *J. Bacteriol.*, **172**, 2888-2893.
- 3) Akiyama, Y. and Ito, K. (1985) The SecY membrane component of the bacterial protein export machinery: Analysis by new electrophoretic methods for integral membrane proteins. *EMBO J.*, **4**, 3351-3356.
- 4) Akiyama, Y. and Ito, K. (1987) Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **6**, 3465-3470.
- 5) Akiyama, Y. and Ito, K. (1990) SecY protein, a membrane-embedded secretion factor of *E. coli*, is cleaved by the OmpT protease *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **167**, 711-715.
- 6) Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1990) Current protocols in molecular biology. *John Wiley & Sons*.
- 7) Baba, T., Jacq, A., Brickman, E., Beckwith, J., Taura, T., Ueguchi, C., Akiyama, Y. and Ito, K. (1990) Characterization of cold-sensitive *secY* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **172**, 7005-7010.
- 8) Baba, T., Taura, T., Shimoike, T., Akiyama, Y., Yoshihisa, T. and Ito, K. (1994) A cytoplasmic domain is important for the formation of a SecY-SecE translocator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4539-4543.
- 9) Bieker, K.L., Phillips, G.J. and Shihavy, T.J. (1990) The *sec* and *prl* gene of *Escherichia coli*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22**, 291-310.
- 10) Blobel, G. and Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes. *J. Cell. Biol.*, **67**, 835-862.
- 11) Bost, S. and Belin, D. (1997) *prl* mutations in the *Escherichia coli secG* gene. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4087-4093.
- 12) Brundage, L., Fimmel, C.J., Mizushima, S. and Wickner, W. (1992) SecY, SecE, and band1 form the membrane-embedded domain of *Escherichia coli* preprotein translocase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 4166-4170.
- 13) Chen, X., Xu, H. and Tai, P.C. (1996) A significant fraction of functional SecA is permanently embedded in the membrane. *J. Biol. Chem.*, **271**, 29698-29706.
- 14) den Blaauwen, T., Fekkes, P., de Wit, J.G., Kuiper, W. and Driessen, A.J.M. (1996) Domain interaction of the peripheral protein *Translocase* subunit SecA. *Biochemistry*, **35**, 11994-12004.
- 15) Dolan, K.M. and Oliver, D.B. (1991) Characterization of *Escherichia coli* SecA protein binding to a site on its mRNA involved in autoregulation. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23329-23333.
- 16) Douville, K., Price, A., Eichler, J., Economou, A. and Wickner, W. (1995) SecYEG and SecA are the stoichiometric components of preprotein translocase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 20106-20111.
- 17) Duong, F. and Wickner, W. (1997a) Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J.*, **16**, 2756-2768.
- 18) Duong, F. and Wickner, W. (1997b) The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J.*, **16**, 4871-4879.
- 19) Economou, A., Pogliano, J.A., Beckwith, J., Oliver, D.B. and Wickner, W. (1995) SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by

- SecD and SecF. *Cell*, **83**, 1171-1181.
- 20) Economou, A. and Wickner, W. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell*, **78**, 835-843.
 - 21) Eichler, J., Brunner, J. and Wickner, W. (1997) The protease-protected 30kDa domain of SecA is largely inaccessible to the membrane lipid phase. *EMBO J.*, **16**, 2188-2196.
 - 22) Eichler, J. and Wickner, W. (1997) Both an N-terminal 65-kDa domain and a C-terminal 30-kDa domain of SecA cycle into the membrane at SecYEG during translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5574-5581.
 - 23) Emr, S.D. and Jr., P.J.B. (1982) Localization and processing of outer membrane and periplasmic proteins in *Escherichia coli* strains harboring export-specific suppressor mutations. *J. Biol. Chem.*, **257**, 5852-5860.
 - 24) Fekkes, P., van der Does, C. and Driessen, A.J.M. (1997) The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J.*, **16**, 6015-6133.
 - 25) Flower, A.M., Osborne, R.S. and Silhavy, T.J. (1995) The allele-specific synthetic lethality of *prlA-prlG* double mutants predicts interactive domains of SecY and SecE. *EMBO J.*, **14**, 884-893.
 - 26) Gannon, P.M., Li, P. and Kumamoto, C.A. (1989) The mature protein of *Escherichia coli* maltose-binding protein (MBP) determines the dependence of MBP on SecB for export. *J. Bacteriol.*, **171**, 813-818.
 - 27) Gardel, C., Benson, S., Hunt, J., Michaelis, S. and Beckwith, J. (1987) *secD*, a new gene involved in protein export in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **169**, 1286-1290.
 - 28) Gardel, C., Johnson, K., Jacq, A. and Beckwith, J. (1990) The *secD* locus of *E.coli* codes for two membrane proteins required for protein export. *EMBO J.*, **9**, 3209-3216.
 - 29) Hamman, B.D., Hendershot, L.M. and Johnson, A.E. (1998) BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the lumenal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell*, **92**, 747-758.
 - 30) Hanada, M., Nishiyama, K.-i., Mizushima, S. and Tokuda, H. (1994) Reconstitution of an efficient protein translocation machinery comprising SecA and the three membrane proteins, SecY, SecE, and SecG (p12). *J. Biol. Chem.*, **269**, 23625-23631.
 - 31) Hanada, M., Nishiyama, K.-i. and Tokuda, H. (1996) SecG plays a critical role in protein translocation in the absence of the proton motive force as well as at low temperature. *FEBS Lett.*, **381**, 25-28.
 - 32) Hanein, D., Matlack, K.E.S., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K.-U., Miller, K.R., Rapoport, T.A. and Akey, C.W. (1996) Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell*, **87**, 721-732.
 - 33) Harris, C.R. and Silhavy, T.J. (1999) Mapping an interface of SecY (PrlA) and SecE (PrlG) by using synthetic phenotypes and in vivo cross-linking. *J. Bacteriol.*, **181**, 3438-3444.
 - 34) Hartl, F.-U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J.P. and Wickner, W. (1990) The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell*, **63**, 269-279.
 - 35) Hendrick, J.P. and Wickner, W. (1991) SecA protein needs both acidic phospholipids and SecY/E protein for functional high-affinity binding to the *Escherichia coli* plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, **266**, 24596-24600.
 - 36) Hirano, M., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (1996) The carboxyl-terminal region is essential for SecA dimerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **229**, 90-95.

- 37) Homma, T., Yoshihisa, T. and Ito, K. (1997) Subunit interactions in the *Escherichia coli* protein translocase: SecE and SecG associate independently with SecY. *FEBS Lett.*, **408**, 11-15.
- 38) Ito, K. (1996) The major pathways of protein translocation across membranes. *Genes to Cells*, **1**, 337-346.
- 39) Ito, K., Wittekind, M., Nomura, M., Shiba, K., Yura, T., Miura, A. and Nashimoto, H. (1983) A temperature-sensitive mutant of *E. coli* exhibiting slow processing of exported proteins. *Cell*, **32**, 789-797.
- 40) Jarvik, J. and Botstein, D. (1975) Conditional-lethal mutations that suppress genetic defects in morphogenesis by altering structural proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2738-2742.
- 41) Joly, J.C., Leonard, M.R. and Wickner, W.T. (1994) Subunit dynamics in *Escherichia coli* preprotein translocase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 4703-4707.
- 42) Joly, J.C. and Wickner, W. (1993) The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids. *EMBO J.*, **12**, 255-263.
- 43) Karamanou, S., Vrontou, E., Sianidis, G., Baud, C., Roos, T., Kuhn, A., Politou, A.S. and Economou, A. (1999) A molecular switch in SecA protein couples ATP hydrolysis to protein translocation. *Mol. Microbiol.*, **in press**.
- 44) Kaufmann, A., Manting, E.H., Veenendaal, A.K., Driessen, A.J.M. and van der Does, C. (1999) Cysteine-directed cross-linking demonstrates that helix 3 of SecE is close to helix 2 of SecY and helix 3 of a neighboring SecE. *Biochemistry*, **38**, 9115-9125.
- 45) Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (1995) FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecA, an essential protein translocation subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4532-4536.
- 46) Kim, Y.J., Rajapandi, T. and Oliver, D. (1994) SecA protein is exposed to the periplasmic surface of the *E. coli* inner membrane in its active state. *Cell*, **78**, 845-853.
- 47) Kimura, E., Akita, M., Matsuyama, S.-i. and Mizushima, S. (1991) Determination of a region in SecA that interacts with presecretory protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 6600-6606.
- 48) Koch, H.-G., Hengelage, T., Neumann-Haefelin, C., MacFarlane, J., Hoffschulte, H.K., Schimz, K.-L., Mechler, B. and Müller, M. (1999) In vitro studies with purified components reveal signal recognition particle (SRP) and SecA/SecB as constituents of two independent protein-targeting pathways of *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 2163-2173.
- 49) Kumamoto, C.A. and Beckwith, J. (1983) Mutations in new gene, secB, cause defective protein localization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **154**, 254-260.
- 50) Kusukawa, N., Yura, T., Ueguchi, C., Akiyama, Y. and Ito, K. (1989) Effects of mutations in heat-shock genes *groES* and *groEL* on protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **8**, 3517-3521.
- 51) Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S. and Candia, O.A. (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.*, **100**, 95-97.
- 52) Lecker, S.H., J.M. Driessen, A. and Wickner, W. (1990) ProOmpA contains secondary and tertiary structure prior to translocation and is shielded from aggregation by association with SecB protein. *EMBO J.*, **9**, 2309-2314.
- 53) Liao, S., Lin, J., Do, H. and Johnson, A.E. (1997) Both luminal and cytosolic gating of the aqueous ER translocation pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. *Cell*, **90**, 31-41.
- 54) Lill, R., Cunningham, K., Brundage, L.A., Ito, K., Oliver, D. and Wickner, W. (1989) SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia*

- coli*. *EMBO J.*, **8**, 961-966.
- 55) Lill, R., Dowhan, W. and Wickner, W. (1990) The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell*, **60**, 271-280.
 - 56) Maloy, S.R. and Nunn, W.D. (1981) Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **145**, 1110-1112.
 - 57) Matsuo, E., Mori, H., Shimoike, T. and Ito, K. (1998) Syd, a SecY-interacting protein, excludes SecA from the SecYE complex with altered SecY24 subunit. *J. Biol. Chem.* **273**, 18835-18840, **273**, 18835-18840.
 - 58) Matsuo, E. and Ito, K. (1998) Genetic analysis of an essential cytoplasmic domain of *Escherichia coli* SecY using resistance to Syd, a SecY-interacting protein. *Mol. Gen. Genet.*, **258**, 240-249.
 - 59) McNicholas, P., Salavati, R. and Oliver, D. (1997) Dual regulation of *Escherichia coli* *secA* translation by distinct upstream elements. *J Mol Biol*, **265**, 128-141.
 - 60) Meyer, T.H., Ménétret, J.-F., Breitling, R., Miller, K.R., Akey, C.W. and Rapoport, T.A. (1999) The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eucaryotic Sec61p complex. *J. Mol. Biol.*, **285**, 1789-1800.
 - 61) Michell, C. and Oliver, D.B. (1993) Two distinct ATP-binding domains are need to promote protein export by *Escherichia coli* SecA ATPase. *Mol. Microbiol.*, **10**, 483-497.
 - 62) Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
 - 63) Nilsson, I. and Heijne, G.v. (1991) A *de novo* designed signal peptide cleavage cassette fuctions *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 3408-3410.
 - 64) Nishiyama, K., Fukuda, A., Morita, K. and Tokuda, H. (1999) Membrane deinsertion of SecA underlying proton motive force-dependent stimulation of protein translocation. *EMBO J.*, **18**, 1049-1058.
 - 65) Nishiyama, K.-i., Hanada, M. and Tokuda, H. (1994) Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.*, **13**, 3272-3277.
 - 66) Nishiyama, K.-i., Mizushima, S. and Tokuda, H. (1993) A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **12**, 3409-3415.
 - 67) Nishiyama, K.-i., Suzuki, T. and Tokuda, H. (1996) Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent protein translocation. *Cell*, **85**, 71-81.
 - 68) Nouwen, N., Kruijff, B.d. and Tommassen, J. (1996) *prlA* suppressors in *Escherichia coli* relieve the proton electrochemical gradient dependency of translocation of wild-type precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 5953-5957.
 - 69) Oliver, D., Norman, J. and Sarker, S. (1998) Regulation of *Escherichia coli* *secA* by cellular protein secretion proficiency requires an intact Gene X signal sequence and an active translocon. *J. Bacteriol.*, **180**, 5240-5242.
 - 70) Oliver, D.B. and Beckwith, J. (1981) *E. coli* mutant pleiotropically defective in the export of secreted proteins. *Cell*, **25**, 765-772.
 - 71) Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B.M., Stirling, C.J. and Rapoport, T.A. (1998) Signal Sequence recognition in posttranslational protein transport across the Yeast ER membrane. *Cell*, **94**, 795-807.
 - 72) Powers, T. and Walter, P. (1997) Co-translational protein targeting catalyzed by the *Escherichia coli* signal recognition particle and its receptor. *EMBO J.*, **16**, 4880-4886.
 - 73) Price, A., Economou, A., Duong, F. and Wickner, W. (1996) Separable ATPase and membrane insertion domains of the SecA subunit of preprotein translocase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 31580-31584.

- 74) Prinz, W.A., Spiess, C., Ehrmann, M., Schierle, C. and Beckwith, J. (1996) Targeting of signal sequenceless protein for export in *Escherichia coli* with altered protein translocase. *EMBO J.*, **15**, 5209-5217.
- 75) Qi, H.Y. and Bernstein, H.D. (1999) SecA is required for the insertion of inner membrane proteins targeted by the *Escherichia coli* signal recognition particle. *J Biol Chem*, **274**, 8993-8997.
- 76) Rajapandi, T., Dolan, K.M. and Oliver, D.B. (1991) The first gene in the *Escherichia coli* *secA* operon, Gene X, encodes a nonessential secretory protein. *J. Bacteriol.*, **173**, 7092-7097.
- 77) Ramamurthy, V. and Oliver, D. (1997) Topology of the integral membrane form of *Escherichia coli* SecA protein reveals multiple periplasmically exposed regions and modulation by ATP binding. *J. Biol. Chem.*, **272**, 23239-23246.
- 78) Randall, L.L. (1983) Translocation of domains of nascent periplasmic proteins across the cytoplasmic membrane is independent of elongation. *Cell*, **33**, 231-240.
- 79) Randall, L.L. and Hardy, S.J.S. (1989) Unity in function in the absence of consensus in sequence: role of leader peptides in export. *Science*, **243**, 1156-1159.
- 80) Riggs, P.D., Derman, A.I. and Beckwith, J. (1988) A mutation affecting the regulation of a *secA-lacZ* fusion defines a new *sec* gene. *Genetics*, **118**, 571-579.
- 81) Rollo, E.E. and Oliver, D.B. (1988) Regulation of the *Escherichia coli* *secA* gene by protein secretion defects: analysis of *secA*, *secB*, *secD*, and *secY* mutants. *J. Bacteriol.*, **170**, 3281-3282.
- 82) Salavati, R. and Oliver, D. (1997) Identification of elements on GeneX-secA RNA of *Escherichia coli* required for SecA binding and *secA* auto-regulation. *J Mol Biol*, **265**, 142-152.
- 83) Sargent, F., Bogsch, E.G., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Berkes, B.C. and Palmer, T. (1998) Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.*, **17**, 3640-3650.
- 84) Schatz, P.J. and Beckwith, J. (1990) Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.*, **24**, 215-248.
- 85) Schatz, P.J., Bieker, K.L., Ottemann, K.M., Shilhavy, T.J. and Beckwith, J. (1991) One of three transmembrane stretches is sufficient for the functioning of the SecE protein, a membrane component of the E.coli secretion machinery. *EMBO J.*, **10**, 1749-1757.
- 86) Schiebel, E., Driessen, A.J.M., Hartl, F.-U. and Wickner, W. (1991) $\Delta\mu_1^+$ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell*, **64**, 927-939.
- 87) Schmidt, M.G. and Oliver, D.B. (1989) SecA protein autogenously represses its own translation during normal protein secretion in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, **171**, 643-649.
- 88) Scotti, P.A., Valent, Q.A., Manting, E.H., Urbanus, M.L., Driessen, A.J.M., Oudega, B. and Luirink, J. (1999) SecA is not required for signal recognition particle-mediated targeting and initial membrane insertion of a nascent inner membrane protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 29883-29888.
- 89) Shimoike, T., Akiyama, Y., Baba, T., Taura, T. and Ito, K. (1992) SecY variants that interfere with *Escherichia coli* protein export in the presence of normal *secY*. *Mol. Microbiol.*, **6**, 1205-1210.
- 90) Shimoike, T., Taura, T., Kihara, A., Yoshihisa, T., Akiyama, Y., Cannon, K. and Ito, K. (1995) Product of a new gene, *syd*, functionally interacts with SecY when overproduced in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 5519-5526.
- 91) Silhavy, T.J., Berman, M.L. and Enquist, L.W. (1984) Experiments with Gene Fusions. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- 92) Snyders, S., Ramamurethy, V. and Oliver, D. (1997) Identification of a region of interaction between *Escherichia coli* SecA and SecY proteins. *J. Biol. Chem.*, **272**, 11302-11306.

- 93) Stager, J., Gansheroff, L.J. and Shiloh, T.J. (1989) New suppressors of signal-sequence mutations, *prlG*, are linked to *secE* gene of *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, **3**, 1045-1052.
- 94) Stahl, F.W., Kobayashi, I., Thaler, D. and Stahl, M.M. (1986) Direction of travel of RecBC recombinase through bacteriophage lambda DNA. *Genetics*, **113**, 215-227.
- 95) Suzuki, H., Nishiyama, K.-i. and Tokuda, H. (1998) Coupled structure change of SecA and SecE revealed by the synthetic lethality of the *secAcsR11* and Δ *secG::kan* double mutant. *Mol. Microbiol.*, **29**, 331-342.
- 96) Taura, T., Akiyama, Y. and Ito, K. (1994) Genetic analysis of SecY: Additional export-defective mutations and factors affecting their phenotypes. *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 261-269.
- 97) Taura, T., Baba, T., Akiyama, Y. and Ito, K. (1993) Determinants of the quantity of the stable SecY complex in the *Escherichia coli* cell. *J. Bacteriol.*, **175**, 7771-7775.
- 98) Taura, T., Yoshihisa, T. and Ito, K. (1997) Protein translocation functions of *Escherichia coli* SecY: *In vitro* characterization of cold-sensitive *secY* mutants. *Biochimie*, **79**, 517-512.
- 99) Uchida, K., Mori, H. and Mizushima, S. (1995) Stepwise movement of preproteins in the process of translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 30862-30868.
- 100) Ulbrandt, N.D., Newitt, J.A. and Bemstein, H.D. (1997) The *E. coli* signal recognition particle is required for the insertion of a subset of the inner membrane proteins. *Cell*, **88**, 187-196.
- 101) van der Wolk, J.P., Fekkes, P., Boorsma, A., Huie, J.L., Silhavy, T.J. and Driessen, A.J.M. (1998) PrlA4 prevents the rejection of signal sequence defective preproteins by stabilizing the SecA-SecY interaction during the initiation of translocation. *EMBO J.*, **17**, 3631-3639.
- 102) van Wely, K.H.M., Swaving, J., Broekhuizen, C.P., Rose, M., Quax, W.J. and Driessen, A.J.M. (1999) Functional identification of the product of the *Bacillus subtilis yoaL* gene as a SecE homologue. *J. Bacteriol.*, **181**, 1786-1792.
- 103) von Heijne, G. (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.*, **133**, 17-21.
- 104) von Heijne, G. (1985) Signal sequence the limits of variation. *J. Mol. Biol.*, **184**, 99-105.
- 105) Walter, P. and Johnson, A.E. (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **10**, 78-119.
- 106) Weiner, J.H., Bilous, P.T., Shaw, G.M., Lubitz, S.P., Frost, L., Thomas, G.H., Cole, J.A. and Turner, R.J. (1998) A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell*, **93**, 93-101.
- 107) Wickner, W. and Leonard, M.R. (1996) Minireview: *Escherichia coli* Preprotein translocase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 29514-29516.
- 108) Wild, J., Altman, E., Yura, T. and Gross, C.A. (1992) The DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *E. coli*. *Genes Dev.*, **6**, 1165-1172.
- 109) Yoshihisa, T. and Ito, K. (1996) Pro-OmpA derivatives with a His6 Tag in their N-terminal "Translocation initiation domains" are arrested by Ni²⁺ at an early post-targeting stage of translocation. *J. Biol. Chem.*, **271**, 9429-9436.
- 110) Zimmermann, R. and Wickner, W. (1983) Energetic and intermediates of the assembly of protein OmpA into the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **258**, 3920-3925.

謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々にお世話になりました。この場をかりて、御礼申し上げます。

伊藤維昭教授には本研究を進めるにあたり熱心にご指導いただきました。このような研究ができましたのも、伊藤先生が終始にわたりの確な助言をして下さったおかげです。本当にありがとうございました。この御恩は、今後私がよい研究をすることでしかお返しできないと思っています。これからもよろしくご指導下さいますようお願い申し上げます。

森博幸博士、吉久徹博士には多くの実験技術を教えていただいたばかりでなく、貴重な実験材料をいただきました。両博士のご助力なしでは、この研究はなしえなかったと思います。秋山芳展博士には、多くの助言と客観的な批評して頂きました。ありがとうございました。

構造形成学分野の研究室のみなさんには大変お世話になりました、望月清子さんには、事務的なことばかりでなく、研究が進めやすい環境を整備して頂きました。中戸川仁君には、貴重なデータをいただき、研究を一緒に進めて頂きました。松尾英一博士には、公私にわたり相談に乗っていただいたり、遊んでいただいたりと本当にお世話になりました。本間貴之さんには、車でいろいろなところに連れて行っていただきました。岸上哲士博士、白井良憲博士、木原章雄博士、曾根道夫博士には、実験の方法とコツを教えてくださいました。高橋由貴さん、清水祐介君、矢部俊樹君には実験の補助をしていただきました。小林妙子さんには一緒にコンサートに行ってくださいました。才川直哉君、千葉志信君、千葉和彦君、佐藤康成君にもいろいろと手伝ってもらいました。植田邦子さん、山崎麻紀さん、北沢友美さん、山口恵さん、桜井涼子さん、八又政子さん、中沢さとのさん、塚崎昌子さんには、実験補助と洗い物をしていただきました。ありがとうございました。

その他、個々に名前をあげなかった人達にもお世話になりました。ありがとうございました。

1999年 12月 松本 弦

松本 弦