

②

主論文

大腸菌生細胞を用いたタンパク質
膜透過機構の解析

化学専攻・細胞生物化学

上口 智治

目次

第1章 序論	1
--------	---

第2章 結果と考察

第1部 膜透過中間体の検出による膜透過後期過程の解析

結果

第1節 膜透過中間体の検出	6
第2節 中間体MBPのコンフォメーションと局在	9
第3節 中間体MBPとSecAタンパク質の相互作用	12
第4節 Processed immature form の膜横断反応には プロトン駆動力が要求される	15
第5節 <i>secA51</i> 変異株におけるクロラムフェニコールの効果	20
第6節 <i>secB</i> 変異株における中間体	22
第7節 他のペリプラズムタンパク質の膜透過中間体	23

考察

第1節 MBPの膜透過中間体	27
第2節 膜透過後期フェーズにおけるエネルギーの必要性	28
第3節 膜透過後期フェーズに關与する細胞装置	29
第4節 遊離ステップは実在するか?	31
第5節 膜透過モデルと <i>sec</i> 遺伝子産物	32

第2部 *secY24* 変異を多コピー状態で抑制する遺伝子の単離と解析

結果

第1節 <i>secY24</i> 変異に対するマルチコピーサプレッサーの単離	35
第2節 他の分泌欠損変異株に対する抑制効果	41
第3節 <i>secA51</i> 変異に対するマルチコピーサプレッサーの単離	42
第4節 <i>msyA</i> 遺伝子の同定・塩基配列の決定	42

第5節	<i>msyB</i> 遺伝子の同定・塩基配列の決定	48
第6節	熱ショックタンパク質HtpGの過剰生産による サブプレッション	55
考察		
第1節	H-NSによる <i>secY</i> 変異の抑制機構	58
第2節	<i>msyB</i> の抑制機構	59
第3節	熱ショックタンパク質の過剰生産による抑制	61
第4節	マルチコピーサブレッサーに対する評価	62
第3章	材料と方法	65
第4章	文献	74
謝辞		81

第 1 章 序論

全ての細胞は、脂質二重層と種々のタンパク質から成る生体膜によって外界と区別されることで、生命活動に必要な内部環境を獲得・維持している。また高等生物の細胞内には生体膜によって区切られた各種のオルガネラが存在し、それぞれ独自の環境を作り上げ、細胞全体としての効率のよい生命活動を行なっている。このように生体膜の第一義的な役割は独立した環境をつくり出すための物理的障壁として機能するところにあり、イオンをはじめとする低分子物質に対しても障壁性は保たれる。さらに生体膜は物理的障壁性を損なうことの無い範囲で、膜の内側と外側との間での物質や情報のやりとりを行なう機能を持たねばならない。生体膜を構成するタンパク質の中には、特異的な低分子物質の取り込みにあずかるタンパク質や外界の環境変化を関知する受容体タンパク質等が存在して、生体膜の選択的透過性や信号伝達機能を保障している。

細胞内のオルガネラ等にはそれぞれ特異的なタンパク質が存在し、生命活動を営む上で中心的な役割を果たしている。こうしたタンパク質はオルガネラ自身の遺伝子から合成される例外的なものを除けば、すべて細胞質内で合成されるので、生体膜を少なくとも一回は横断して移動しなければならない。ここで、タンパク質という巨大分子が物理的障壁性を持つ生体膜をいかにして透過するのかという、タンパク質分泌（膜透過）機構の問題が生じる。

タンパク質分泌機構の問題は、いくつかの解決しなければならない重要なポイントを内包している。すなわち、分泌のためのタンパク側の情報は何か、分泌は何らかの細胞側の”装置”の働きを必要とするのか、またそうであればその実体は何か、エネルギーは要求されるのか、等である。これらの問題の解決に一つの方向を与え、以後の研究に大きく影響した考えとして、動物細胞の小胞体膜透過の研究から導かれた、Blobelらによるシグナル仮説の提唱（1975年）¹⁾が挙げられる。シグナル仮説を端緒とした一連の実験結果から、彼らは、1) 分泌の情報を担うシグナル配列の存在、2) シグナル配列を認識してタンパク質を分泌経路に乗せるための細胞装置の存在、3) 翻訳

と共役した膜透過 (co-translational translocation)、4) 膜透過がタンパク質から成る親水的な透過孔を通じて起こるという仮定、等の概念を提出した。後になってSRP (Signal Recognition Particle)²⁾や膜上のSRPレセプター^{3,4)}が発見され、シグナル配列を認識する細胞側の因子の実体解明が進み、その重要性が明確になった。一方、大腸菌や酵母などでは翻訳後にも膜透過し得る⁵⁻¹¹⁾ことがわかるなど、シグナル仮説の全ての概念がそのまま一般性を持つものではないことが示されたが、膜透過研究の初期にシグナル仮説の果たした役割は大きい(最近、大腸菌の4.5SRNAの研究から、翻訳と膜透過の共役の考えが再び唱えられ始めた¹²⁾)。シグナル仮説で提唱された「透過孔」は、タンパク質が膜を横断する反応のキーとなる細胞装置であるが、その存否を含め実体がわかっていない。この点、大腸菌では、後で述べるように、分泌に関与する膜内在性タンパク質が複数 (SecY・E・D・F) 同定されており、その作用機構の研究が開始されている。

大腸菌などのグラム陰性細菌の表層には、内膜(細胞質膜)と外膜という2種類の膜構造が存在している。これらの膜と膜間のペリプラズム空間には種々の特異的なタンパク質が局在しており、細胞と外部空間との間での物質や信号のやりとりを仲立ちしている。こうした非細胞質空間に局在するタンパク質は、細胞質で合成された後に必ず内膜を透過しなければならない。大腸菌には高等生物細胞にみられるような細胞質内の各種膜系は発達しておらず単純な膜構造より成り立っているが、タンパク質が生体膜を透過するという本質的な問題においては高等生物と同様の問題設定ができるのである。さらに大腸菌が遺伝学的解析に適しているという利点によって、遺伝子レベルでの膜透過機構の解析が進展することとなった。

分泌系に関与する遺伝子の同定は大きく分けて2つのアプローチ、すなわちシグナル配列を認識し得る因子を探索する試みと、分泌欠損変異株を分離する試みが行なわれてきた¹³⁾。ここでは詳述しないが、その結果として表1に挙げられるような分泌関連因子が現在同定されている。なお、「分泌」とは本来タンパク質が細胞外に放出されることを指すが、大腸菌の系では「膜透過」の意味でこの言葉を用いる場合が多い。

表1 大腸菌の分泌関連因子

細胞内局在性	分泌因子	<i>prl</i> 変異	分子量 (kd)	機能・コメント
細胞質	SecB	----	12	フォールディング制御・ターゲティング
	GroEL・S	----	63, 11	フォールディング制御 (Bla特異的)
	Ffs	----		4.5SRNA (Bla特異的)
細胞質膜 (表在性)	SecA	<i>prlD</i>	102	ターゲティング・膜透過 Translocation ATPase
	(内在性) SecD	----	67	膜貫通部位6ヶ所
	SecE	<i>prlG</i>	13.6	膜貫通部位3ヶ所
	SecF	----	35	膜貫通部位6ヶ所
	SecY	<i>prlA</i>	49	膜貫通部位10ヶ所
	Lep	----	36	リーダー (シグナル) ペプチダーゼ
	Lsp	----	18	リポタンパク質シグナルペプチダーゼ

分泌因子は大文字で始まる遺伝子名で表わした。

大腸菌におけるタンパク質分泌機構は、現在どこまで推定できているのであろうか。分泌過程をいくつかの時間的・空間的に区切られたステップに分けて考えることができるだろう。一般に分泌タンパク質はアミノ末端にシグナルペプチド (リーダー配列) を持つ前駆体として、細胞質のリボソームによって合成される。前駆体が分泌経路に入るためにはシグナルペプチドが細胞装置によって認識される必要がある。また膜透過可能である必要条件の一つとして、前駆体は強く折り畳まれた構造をとってはならないことが明らかとなっている¹⁴⁾。SecBタンパク質・GroELタンパク質は、前駆体を膜透過可能な状態に保つための *antifolding factor* あるいは *unfoldase* としてこのステップに関与する^{15, 16)}。膜透過を開始するためには *secA*・*secY*・*secE* 等の遺伝子産物の機能が必要であろう。SecAタンパク質は内膜の内側 (細胞質側) に結合することのできる可

溶性細胞質因子であり¹⁷⁾、ATP加水分解活性を持つ¹⁸⁾。SecY・SecEタンパク質は内膜内在性タンパク質である^{19,20)}。いずれの遺伝子においてもシグナルペプチドの機能欠損変異を抑制するallele (*prI* 変異) が見いだされている^{21,22)}ことから、これら遺伝子の産物とシグナルペプチドの間には物理的相互作用があると推定されている。前駆体タンパク質の膜への挿入はループモデル²³⁾で提唱されたように、シグナルペプチドのアミノ末端を細胞質側に残して開始され、シグナルペプチドと成熟体のアミノ末端領域がループ状に膜を透過し始めると考えられる。分泌タンパク質がどのように膜を横断するかは、本質的に重要なステップであるにもかかわらず、よく分かっていない。内膜内在性タンパク質であるSecY・SecE・SecD・SecF²⁴⁾が機能していると考えられるが、詳細は不明である。シグナルペプチドの切断点がペリプラズム側に到達すると、Leader Peptidase による切断が起こる²⁵⁾。この切断反応は膜透過の簡便な指標として用いられている。それはシグナルペプチドの切断を行う Leader Peptidase の活性中心が内膜のペリプラズム側に存在するからである²⁶⁾。切断反応そのものは膜透過を起こすことには必要ないことが分かっている²⁷⁾。ただしその切断がどのようなタイミングで起こるかは明確ではない。成熟体部分は膜透過後、膜から離れ、固有の形状に折り畳まれる。

本論文第1部では、*secA*・*secY* 温度感受性分泌欠損株では、許容条件においても分泌過程に遅れがみられることに着目して、膜透過途上にある中間体 (Processed immature form) の検出に成功したことを述べる。この中間体は成熟体と同じ一次構造からなるが、成熟体とは異なりプロテアーゼ感受性のほどけたコンフォメーションをとっており、膜中あるいは細胞質にカルボキシル末端側が位置していると考えられる。中間体から最終的な成熟体への転換にはエネルギーが必要であり、少なくともプロトン駆動力が関わっていると結論した。これらの分泌欠損変異株で膜透過中間体が検出されることは、SecA・SecY両タンパク質が中間体から成熟体への転換、すなわち分泌タンパク質が膜を実際に横断する反応において機能を果たしていることを示唆する。この解析結果をもとにして大腸菌のタンパク質膜透過のモデルを提出する。

分泌のような複雑な反応の解析に以上のような生細胞を用いたアプローチは重要ではあるが、細胞内各種反応の因果関係を明確にするには限界がある。これを乗り越えるための方法論としては、二つ考えられる。一つは試験管内の生化学反応に還元して行く方

向であり、他は遺伝学的解析をさらに徹底する方向である。我々は後者が前者の前提になるとの立場で、大腸菌における分泌関連遺伝子をさらに探求することに意義があると考えた。

第2部では、新しい分泌関連遺伝子の分離の試みについて述べる。新たな試みとして、大腸菌全染色体から系統的に、分泌欠損変異を多コピー状態で抑制する遺伝子（マルチコピーサプレッサー）を分離した。遺伝学的抑制（サプレッション）とは、ある変異（遺伝子A）による表現型が他の変異（遺伝子B）によって変化（例えば機能欠損の回復）する現象を意味し、遺伝子Aの産物と相互作用を持つ第二の遺伝子産物を同定する目的で用いられる。これまでBeckwithらやShibaらによって *secA51* , *secY24* 変異に対する遺伝子外抑制変異が多数分離されている²⁸⁻³³が、それらの中に直接分泌に関与するとわかったものはない。マルチコピーサプレッションとは、ある遺伝子（遺伝子B）の細胞内コピー数を増加させる（その遺伝子発現量が増加すると期待される）ことにより、他の遺伝子（遺伝子A）に起きた変異を抑制する現象をさす。例えば、遺伝子Bの産物（性質は変化していなくてよい）の濃度が上昇することによって遺伝子Aの産物（変異により機能が低下している）が機能し得るようになる場合が期待され、それらの遺伝子産物間の相互作用や共通の反応経路への関与が示唆される。また最近「分子シャペロン機能」³⁴⁻³⁶を持つ熱ショックタンパク質GroEの過剰生産によって *secA51* や *secY24* 分泌欠損変異の表現型が抑制されることが報告された³⁷。マルチコピーサプレッサーの分離によってGroEのようなシャペロン機能タンパク質の新たなものが同定できるだろうとも期待される。*secY24* 変異に対してマルチコピーサプレッサーを分離した結果、中性ヒストン様タンパク質H-NSと熱ショックタンパク質HtpGをコードする2種の遺伝子に加えて、これまで報告の無い酸性タンパク質をコードする遺伝子を同定したことを報告する。

第2章 結果と考察

第1部 膜透過中間体の検出による膜透過後期過程の解析

結果

第1節 膜透過中間体の検出

分泌タンパク質のほとんどはアミノ末端にシグナルペプチドを持ち、膜透過に際して特定の部位（シグナル切断部位）で切断を受ける。シグナルペプチドの切断反応はしばしば膜透過の簡便な指標として用いられる。それは、シグナルペプチドを切断する酵素（Leader Peptidase）の活性中心が膜の非細胞質側（ペリプラズム側）に存在するからである²⁶⁾。しかしシグナルペプチドの切断がどのようなタイミングで起こるかは明確になっていない。シグナル切断部位がペリプラズム側に到達すると同時に切断が起こる場合には、シグナル切断をもって膜透過の完了とすることはできない。成熟体部分の膜透過はアミノ末端側から開始し、カルボキシル末端側へという方向で起こると考えられるから、シグナルは切断されていても成熟体部分の一部または大部分はまだ膜中か細胞質側にある場合も想定できる（図1）。この考えが正しければ、膜透過中の中間体分子（シグナルペプチドは既に切断されている）が見つかってよいはずである。

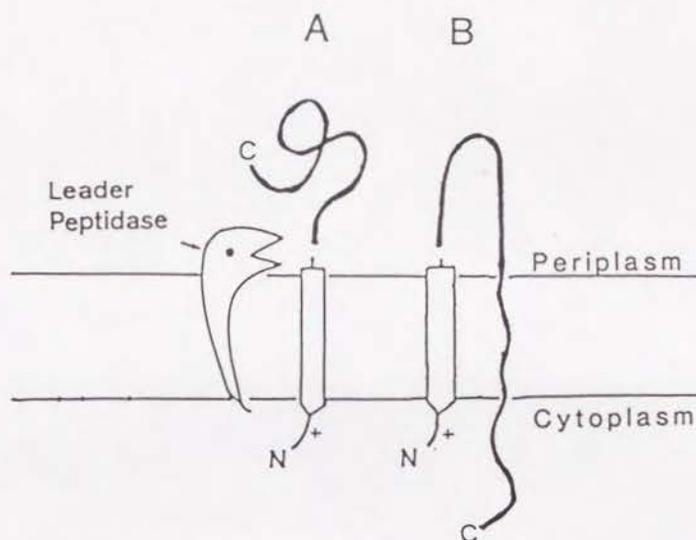


図1 シグナルペプチド切断時点における分泌タンパク質の存在状態-2つのモデル
 A; 既に膜透過が完了している場合
 B; 成熟体部分の膜透過が完了していない場合

大腸菌を30°Cで培養し、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで30秒間パルスラベルした後、非放射性メチオニンを加えてチェイスする。チェイス後各時点でサンプルを採取し、細胞をショ糖存在下でリゾチームとEDTAによる処理を行ない、遠心操作によってスフェロプラストとペリプラズムに分画後、各分画に存在するマルトース結合タンパク質 (MBP) を抗体沈澱・SDSポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) ・オートラジオグラフィーによって分析した。MBPはペリプラズム空間に局在する分泌タンパク質である。野生株の大腸菌では分泌の速度はきわめて速く、30秒間パルスラベルした時点でほとんど全てのMBP分子はシグナル切断とペリプラズム空間への移行を完了している (図2 A,)。3種類の温度感受性分泌欠損変異株 (*secA51*, *secY24*, *secY100*) においては前駆体分子がスフェロプラスト分画に検出でき、30°Cという「許容条件下」でもシグナル切断反応に遅れが生じていることがわかる。さらにこれら *sec* 変異株では、スフェロプラスト分画から成熟体分子と同じ移動度を示す分子、すなわちシグナルが切断されている分子が検出できる (図2 B-D)。デンストメーターによる定量から、この分子の全MBP分子に対する相対比はチェイス開始時点で約30~40%であり、チェイス時間の増加にともない減少し、かわってペリプラズムの成熟体分子の割合が増加していることが示される (IQ85株については図6 A)。

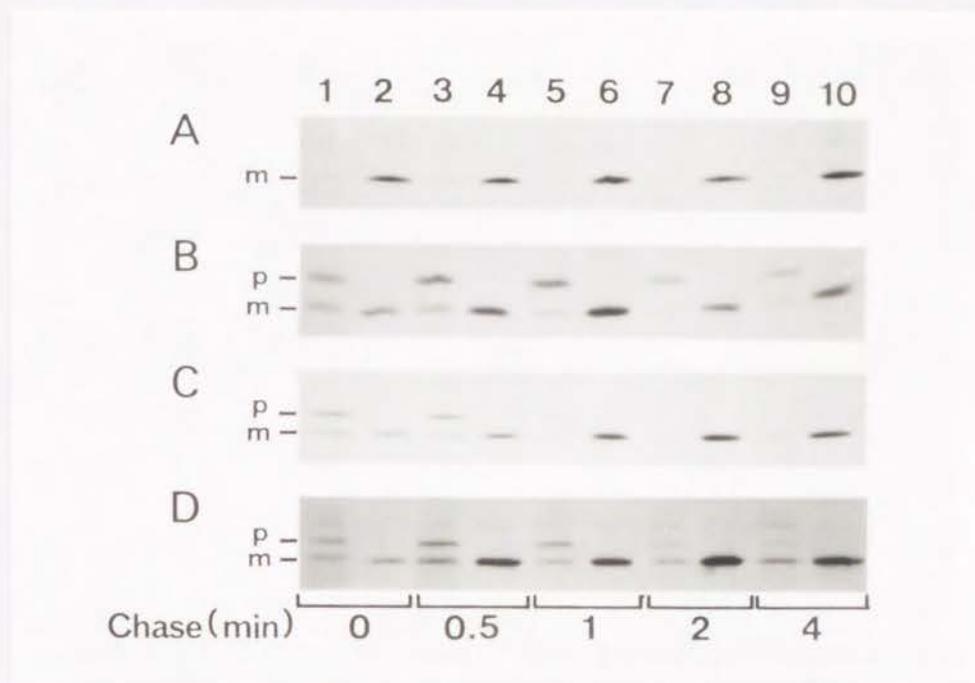


図2 MBPのラベリングカイネティクス

大腸菌を30°Cで培養し、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで30秒間のパルスラベルを行ない、さらに非放射性メチオニンを加えて図に示してある時間だけチェイスした。ラベルした細胞は水で急冷し、代謝阻害剤で処理した後にスフェロプラスト（奇数レーン）とペリプラズム（偶数レーン）に分画した。各分画のタンパク質を抗MBP抗血清で抗体沈澱し、SDS-PAGE・オートラジオグラフィーで分析した。

A; MC4100 (*sec*⁺) , B; MM52 (*secA51*) , C; IQ85 (*secY24*) , D; KI330 (*secY100*)
pとmはそれぞれMBPの前駆体とシグナル切断型分子を表わす。

スフェロプラストから回収されるシグナル切断型分子が人為的なものである可能性はないであろうか。例えば細胞分画が不十分であるためペリプラズムの成熟体分子が混入している、または *sec* 変異によって蓄積した前駆体が細胞質において、あるいは実験操作の途中で何らかのプロテアーゼによって切断を受けた、等の可能性である。これら二つの可能性は以下の理由で排除できると考えられる。前者の可能性は、1) チェイスにおいてこの分子は経時的に減少する。分画不十分であるならば、ペリプラズムの成熟体分子の増加にともない、存在比は多くなったり、サンプル毎に変動するはずである。また野生株の場合にはこのような混入はみられず、分画方法自体には問題が無いと考えられる、2) この分子はプロテアーゼに対する感受性が成熟体と異なっており、性質（高次構造）の違う分子である（第2節参照）、等の理由から考えにくい。後者については前駆体の存在量とこの分子の検出量との間に量的な相関がみられないことから排除できるであろう。実際、*secB* 変異株を用いた解析では、*secA*・*secY* 変異株に比べて多量の前駆体MBPが蓄積するが、スフェロプラストから回収されるシグナル切断型分子の量は逆に少ない（第6節参照）。

低濃度のクロラムフェニコール存在下で *secA51* 変異株を用いて上のパルス-チェイス・分画の実験を行うと、前駆体MBP量が減少するが、スフェロプラスト結合型のシグナル切断された分子の存在比は上昇し、チェイスにともなってペリプラズムの成熟体分子へ移行することがより明瞭に観察できる（第5節参照）。以上の考察から、*secA*, *secY* 両変異株で新たに検出された分子種は、ペリプラズムに局在を完了していない分泌中間体であると考えられ、前駆体からこの中間体をへて最終的な成熟体へと分泌反応が進行することが想像される。以後膜透過全過程のうち、シグナル切断を受けて中間体が生成するまでの段階を膜透過初期フェーズ、それ以降を後期フェーズと呼ぶことにする。

第2節 中間体MBPのコンフォメーションと局在

分泌タンパク質は膜透過を行う前にかたく折り畳まれた構造をとってはならず¹⁴⁾、膜透過後に折り畳まれて固有のコンフォメーションをとる。MBPをはじめとするペリプ



図3 中間体MBPのトリプシン sensitivity とトリプシン accessibility

secY 変異株 IQ85 (A; *secY24*) と KI330 (B; *secY100*) を 30°C で培養し、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで 30 秒間パルスラベルを行なった。細胞をスフェロプラスト (奇数レーン) とペリプラズム (偶数レーン) に分画した後、 $100\mu\text{g/ml}$ のトリプシンを加えて 0°C で 1 時間処理した (レーン 3-6)。レーン 5 と 6 では同時に Triton X-100 を 1% となるように加えた。レーン 1 と 2 ではトリプシンのかわりに同容量の緩衝液を加えた。トリプシン処理後、プロテアーゼインヒビター存在下で抗 MBP 抗血清による抗体沈澱を行ない、SDS-PAGE・フルオログラフィーで分析した。p と m はそれぞれ MBP の前駆体とシグナル切断型分子を表わす。

ラズムのタンパク質は、固有の高次構造に折り畳まれると高濃度のプロテアーゼに対しても耐性となることが知られている³⁸⁾。中間体MBP分子の高次構造を調べる目的でトリプシン消化実験を行った。*secY24* または *secY100* 変異株を30°Cで培養し、³⁵S]メチオニンで30秒間パルスラベル・分画し、非イオン性界面活性剤TritonX-100存在下で各分画をそれぞれトリプシン処理する。界面活性剤は膜を可溶化し、細胞質タンパク質にもトリプシンが作用し得るようにするため加えた。ペリプラズム分画の成熟体MBP分子はこの濃度のトリプシンには完全に耐性であり（図3AとB：レーン6）、界面活性剤は成熟体MBPのコンフォメーションには影響しないことがわかる。一方、スフェロプラスト分画の前駆体は折り畳みが不完全であるため、完全に消化される。さらに中間体分子のバンドも消失しており（レーン1と5を比較）、中間体のコンフォメーションは成熟体とは異なっていることが結論できる。

次に中間体分子の局在を調べるため、界面活性剤を加えずにスフェロプラストをトリプシン処理した。前駆体分子は膜が存在するため外側から加えたトリプシンの攻撃を受けず、バンドは消失しない。一方、中間体分子のうちいくぶんかはトリプシンによって分解を受けるが、無視し得ない量の中間体が分解されずに残っていることがわかる（レーン3）。中間体のうち膜によってトリプシンの攻撃から守られる割合は、*secY24* 変異株では約30%、*secY100* 変異株では約50%におよぶ。*secA51* 変異株でも同様の結果が得られた（データは省略）。

以上の結果は中間体の高次構造と局在場所が成熟体とは全く異なることを示している。正常なスフェロプラストでのトリプシン処理で消化されなかった分子は、おそらく膜中に深く埋もれた状態になっているのではないかと考えられる。シグナル切断を受けているので少なくとも切断部位を含むアミノ末端部位はペリプラズム側にあると考えられるから、このような分子はシグナル切断直後の状態にあるのであろう（図4A）。トリプシン消化を受ける分子はアミノ末端側を様々な長さだけ部分的にペリプラズムに露出しているか（B）、膜の外側に結合した状態にあるか（C）のどちらかだと考えられる。我々はこのような中間体を、プロセッシング（シグナル切断）を受けているが未成熟な分子という意味で、“Processed immature form”と命名した。（以下の文章中では簡単のために、“Processed immature form”の意味で「中間体」と表現する場合がある。）

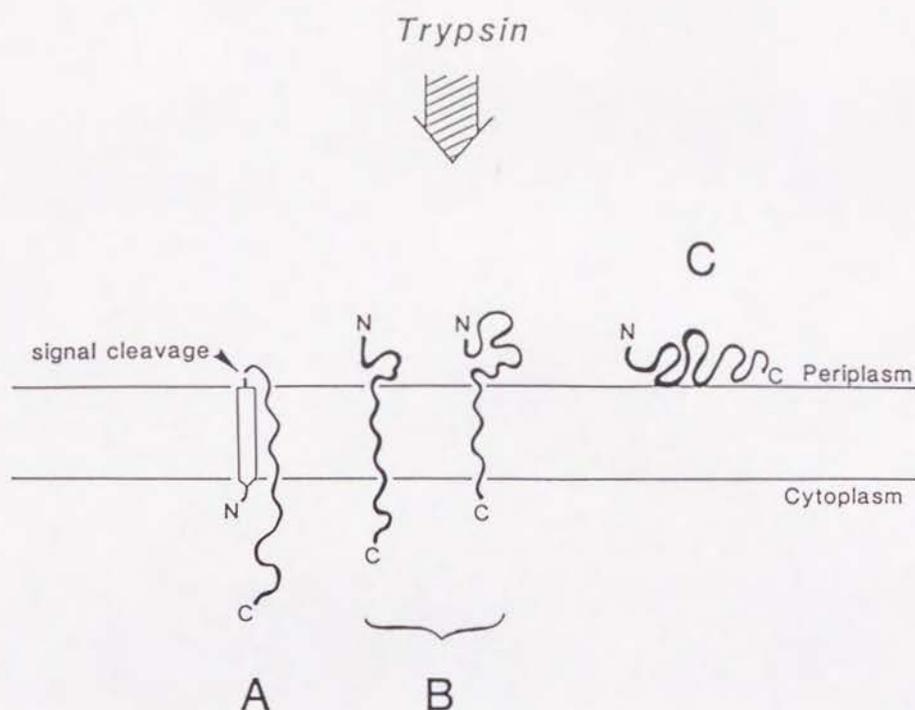


図4 中間体の存在状態に関する3つの可能性

- A; 成熟体部分のほとんどが膜中か、細胞質に存在する。
- B; 成熟体のアミノ末端側がペリプラズムに露出し、カルボキシル末端側は膜中か細胞質に存在する
- C; 成熟体は完全に膜のペリプラズム側にあり、膜に結合している

第3節 中間体MBPとSecAタンパク質の相互作用

前節で明らかになったように、膜に深く埋もれた中間体MBPが存在する。この分子のアミノ末端は膜の外側によく到達したという状態にあると考えられる。約20アミノ酸残基あれば膜を横断できるから、この分子のカルボキシル末端側は細胞質内にあることが考えられる(図4A)。さらに中間体が膜横断の途上にあるならば、分泌装置を構成する因子のいずれかと相互作用していることが期待できる。SecAタンパク質は膜の細胞質側に結合して働く分泌因子であることがわかっており¹⁷⁾、中間体が相互作用している可能性が考えられる。そのような相互作用が示されれば、前節で述べた Processed

immature form の存在状態がより確かなものとなる。

secY24 変異株を 30°C で 30 秒間 [³⁵S]メチオニンでパルスラベルし、ホルムアルデヒドを加えてタンパク質同士をクロスリンクした。ホルムアルデヒドは膜を透過できるクロスリンカーであり、低温で反応し得るため、生細胞に直接作用させることができるという利点を持つ³⁹⁾。ホルムアルデヒドは重合すると同時にタンパク質のリジン残基の ε アミノ基に共有結合し、このクロスリンクは高温で開裂する⁴⁰⁾。クロスリンク反応後にタンパク質を TCA 沈澱させ、37°C で SDS に可溶化してから、抗 SecA 抗血清で抗体沈澱した。抗体沈澱物を等分し、一方を SDS sample buffer 中で煮沸することでクロスリンクを解除し（クロスリンクを解除しない場合、37°C で SDS 処理を行なう）、SDS-PAGE・フルオログラフィーで解析を行った。

クロスリンク処理をしていない細胞からのサンプルでは、抗体沈澱物の可溶化の際の SDS 処理の温度によって SecA のバンドの濃さが異なる（図 5：レーン 1 と 2 を比較）。37°C 処理では SecA よりも分子量の高い位置にスメアー状のバンドが観察された（レーン 1）。これはこの温度では SecA への SDS の結合が悪いため、SecA タンパク質のゲル上での移動度が様々な程度に減少したためではないかと考えられる。クロスリンクしたサンプルでは、37°C SDS 処理でのスメアー状のバンドはより顕著になる（レーン 3）。これらのスメアー状のものはサンプルを煮沸した場合には消失し、SecA よりも分子量の小さなバンドが多数新たに出現する（レーン 4）。100°C 処理で出現したバンドを、クロスリンクしたものとしめないものとで比較すると、前者のみに現われるバンドがいくつか見いだされた。これらのバンドは SecA と実際にクロスリンクしたものである可能性が高い。この中には前駆体と成熟体の MBP に分子量が一致するバンドが含まれている（レーン 4 と 7 を比較）。また抗 SecA 抗血清のかわりに nonimmune serum を用いた場合には MBP に相当するバンドは現われない（データは省略）。パルスラベルに引き続いて 10 分間のチェイスを行なった細胞をクロスリンクした場合には、前駆体・成熟体 MBP のどちらに相当するバンドも認めることはできない（レーン 6）。この培養条件（許容条件）下の *secY24* 変異株では、10 分間のチェイスによって、ラベルされた MBP は完全にペリプラズムへの局在を終える。細胞質の MBP 分子が SecA とクロスリンクされるならばパルスラベル直後のみ架橋を受けるであろうから、この結果は SecA と MBP の一過性の相互作用を示唆する。

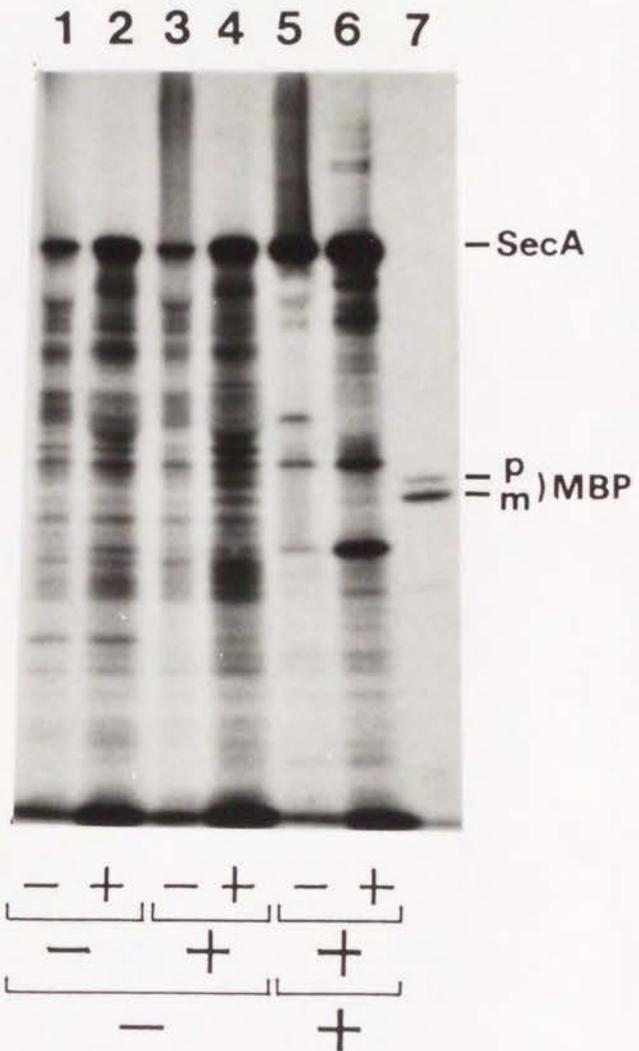


図5 ホルムアルデヒドによる *in vivo* クロスリンク

secY24 変異株 IQ85 を 30°C で培養し、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで 30 秒間パルスラベルを行なった（ないしは引き続いて 10 分間のチェイスを行なった）。菌体を KPi buffer に懸濁し、1% となるようにホルムアルデヒドを加えて 0°C で 2 時間反応させた。ホルムアルデヒドを除いた後に TCA 沈澱によってタンパク質溶液を調製し、抗 SecA 抗血清を用いた抗体沈澱を行なった。抗体沈澱物は 100°C か 37°C で SDS 処理し、SDS-PAGE とフルオログラフィーで分析した。100°C 処理・クロスリンク・チェイスの有無は図の中に示してある。

レーン4で現われたバンドがMBP由来であることを確証するため、架橋をはずした抗体沈澱物をさらに抗MBP抗血清による再抗体沈澱で分析した。これにより前駆体と成熟体に相当するMBP分子が検出された（データは省略）が、その量はきわめて少ない。おそらく二段階の抗体沈澱によるロスが大きいためだと思われる。

以上の結果がSecAとMBPの物理的相互作用を示すものであるかは検討を要する。おそらくクロスリンクの効率がきわめて低いことが原因で、クロスリンク産物のシグナルは弱い。ただしホルムアルデヒド処理によってMBPを含む数本のバンドが特異的に出現していること、これらは抗SecA抗血清に特異的に出現することは、これらがSecAとクロスリンクされたものであることを示唆している。またチェイスすることで消失する事実は、MBPの最終的な局在場所がSecAと異なることを考慮すると、この相互作用が一過性のものであり、単にクロスリンクによって分子量が増加したために抗体沈澱物に混入したものではない可能性が高い。

第4節 Processed immature form の膜横断反応にはプロトン駆動力が要求される

タンパク質の膜透過にはエネルギーが要求されることが様々な膜系で実証されている。大腸菌の場合、ATP加水分解とプロトン駆動力の存在が必要であることがわかっている^{41,42})。この要求性は膜透過反応全体を観察することで得られた結論であり、膜透過後期フェーズにエネルギーが必要であるかは不明である。このことを調べる目的でエネルギー、特にプロトン駆動力の必要性を調べた。

secY24 変異株を30°Cで培養し、^[35S]メチオニンで30秒間のパルスラベルを行なう。チェイス開始と同時に脱共役剤 carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) を50μMとなるように加え、プロトン駆動力を解消させる。CCCPを加えて30秒以上たつと、前駆体・中間体・成熟体の3者の割合は固定され、チェイス時間の増加によっても変化しない(図6B)。この濃度のCCCPがプロトン駆動力を解消できることは、プロリンの取り込みが完全に阻害されることで示した(図8)。プロリンの能動輸送はプロトン駆動力に依存する⁴³)。このことから前駆体から中間体・中間体から成熟体の両方の

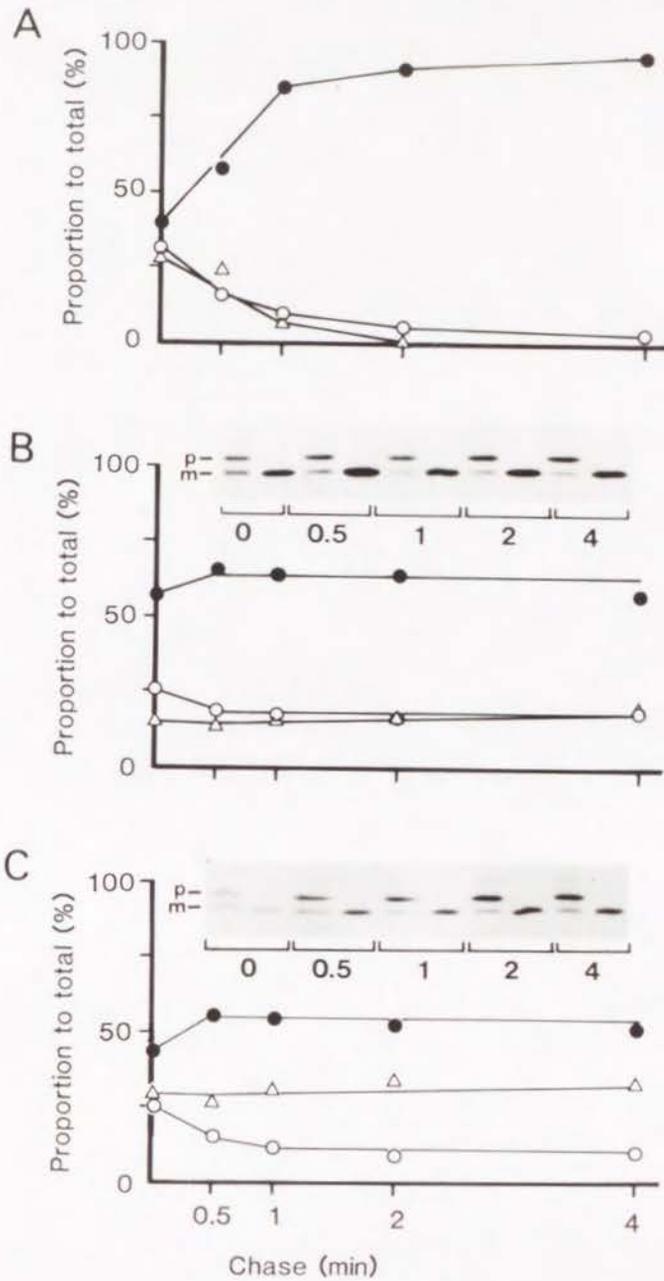


図6 MBPのラベリングカイネティクスにおけるCCCPの影響

パルス-チェイス・分画の方法は図2と同じ。ただしBとCではチェイス開始時に CCCPを $50\mu\text{M}$ となるように加えた。挿入してあるオートラジオグラムをデンストメーターにかけ、各バンドの濃度を測定した。前駆体と成熟体MBPに含まれるメチオニン残基数の差を考慮して濃度の補正を行ない、各チェイス時点における全MBP分子の量に対する前駆体(△)・中間体(○)・成熟体(●)の割合をグラフで表わした。

A; IQ85 (*secY24*; オートラジオグラムは図2 C)

B; IQ85, C; CU171 (*secY24 uncA401*)

転換にはそれぞれエネルギーが必要とされることがわかる。*secY100*・*secA51* 変異株を用いた場合も同様の実験結果が得られた（データは省略）。

ここで用いた *secY24* 変異株は F₁-F₀ATPase 機能が正常 (*unc*⁺) であり、プロトン駆動力の減少は F₁-F₀ATPase を通じて細胞内の ATP 量の減少をもたらす。従ってここで観察した効果にはプロトン駆動力だけではなく、二次的な ATP 量の減少に由来する効果が含まれる可能性がある。ATP 減少による効果を排除するため、*secY24* 変異に加えて、F₁-F₀ATPase の機能を失った *uncA401* 変異⁴⁴⁾ を導入した二重変異株を作成し、同様の実験を行なった。*uncA401* を導入したことで *secY24* 単独の場合より分泌速度がわずかに遅くなるが、膜透過カイネティックス全体に大きな影響は与えない（データは省略）。二重変異株の場合には 3 つの MBP 分子種の割合が固定されるのは CCCP 添加後約 1 分たってからと、*secY24* 単独の場合よりもわずかに遅れるが、その後は転換が完全に阻止されている（図 6 C）。このことは膜透過後期フェーズにも初期フェーズと同様にプロトン駆動力が必要であることを示している。

脱共役剤 CCCP 以外にもプロトン駆動力を減少させ得る薬剤としてアジ化ナトリウム (NaN₃) が知られている。*secY24 uncA401* 二重変異株を用いて NaN₃ の効果を調べた。CCCP の場合と同様にチェイス時に 3mM の NaN₃ を加えると、前駆体 MBP 量は変化が無いが、中間体はゆっくりと減少し、成熟体に転換していく（図 7）。すなわち、膜透過初期フェーズの反応は完全に阻害されるが後期フェーズはそうではない。3mM の NaN₃ がどの程度プロトン駆動力を減少させるかをプロリンの取り込みで調べると、正常状態の約半分程度に低下しただけであった（図 8）。このレベルのプロトン駆動力の低下は、25 μM 濃度の CCCP を用いることで実現できる（図 8）。このときの膜透過反応の阻害は部分的であり、後期フェーズに限らず初期フェーズ（シグナル切断）でも、遅くはなっているが反応は進行している（図 9）。以上の事実から NaN₃ の阻害効果は次のように説明できるだろう。1) 3mM の NaN₃ はプロトン駆動力を低下させ、膜透过后期過程の遅れを引き起こす。しかし完全な阻害効果には至らない。2) シグナル切断の完全な阻害は、プロトン駆動力の低下が原因であると言うよりも、NaN₃ が膜透過初期フェーズに必要な細胞装置の活性を直接阻害しているのではないかという可能性の方が高い。実際、最近になって NaN₃ が SecA の ATPase 活性を阻害することが、Oliver らによって明かとなった⁴⁵⁾。

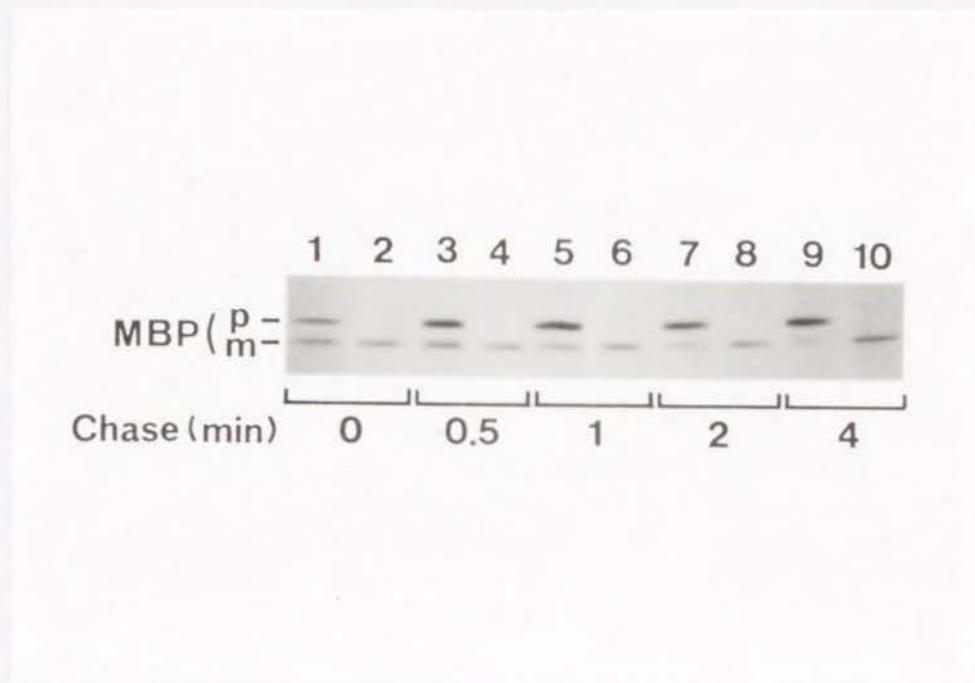


図7 MBPのラベリングカイネティクスにおけるNaN₃の効果

IQ85株 (*secY24*) を用いたパルス-チェイス・分画・分析の方法は図2と同じ。ただしチェイス開始時点でNaN₃を3mMとなるように加える。

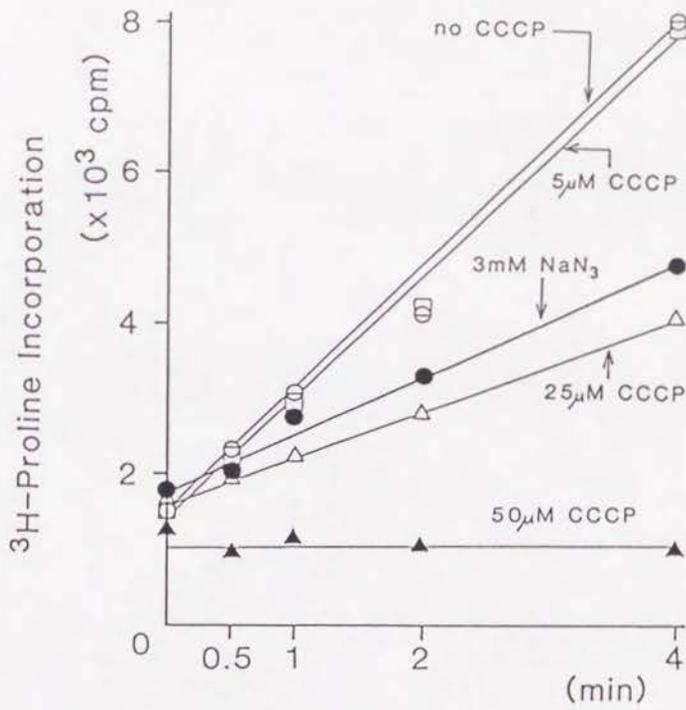


図8 プロリンの細胞内取り込みへの CCCP・NaN₃の効果

CU171株 (*secY24 uncA401*) を 30°C で培養し、[³H]proline mixture を加える。30秒後に図中に示した濃度となるように CCCP または NaN₃ を加え、表示した時間後に一部分を採取し、ニトロセルロースフィルター上にスポット・濾過してフィルターに残った放射活性をシンチレーションカウンターで計測する。

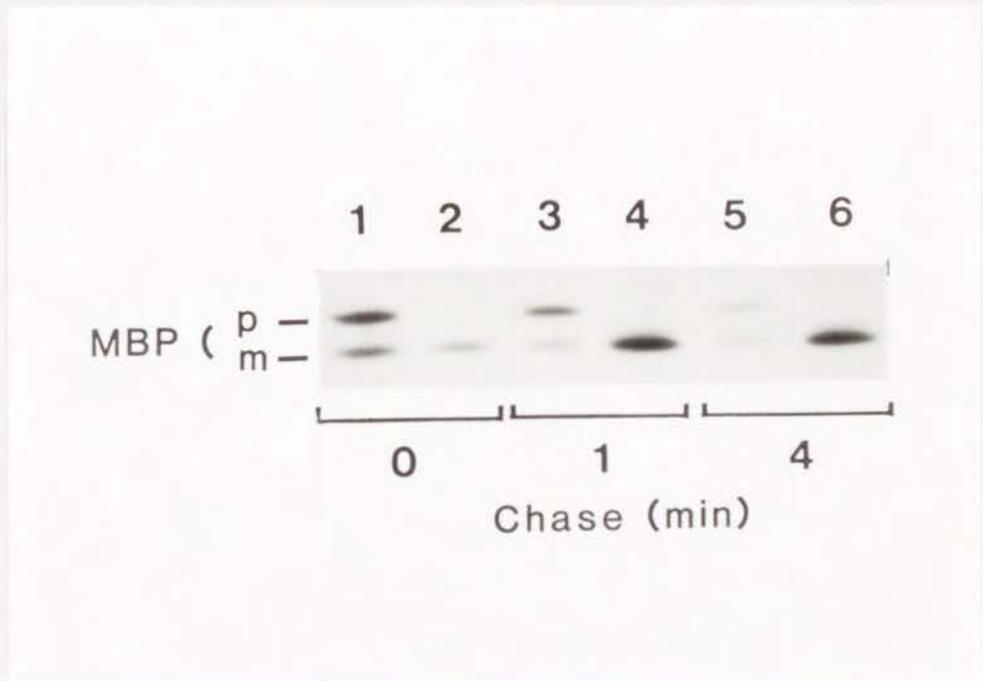


図9 MBPのラベリングカイネティクスにおける 25 μM CCCP の影響

CU171株 (*secY24 uncA401*) を用いて図6と同じ方法で解析した。チェイス開始時点で CCCP を 25 μM となるように加えた。

第5節 *secA51* 変異株におけるクロラムフェニコールの効果

secA51 や *secY24* 変異に対する遺伝子外抑制変異として、いくつかのタンパク質合成系に起こったものが得られることが報告されている^{28,30,32,33})。また *secA51* 変異については、低濃度のクロラムフェニコールが同様の抑制効果を発揮することがわかっている⁴⁶)。一つの解釈としてこれらの現象は、分泌タンパク質の合成レートの低下により分泌経路への流入量が減少するため、変異によって膜透過の capacity が低下した細胞装置でも分泌を効率よく行えるようになったとの考えがある。ではタンパク合成速度の低下は膜透過後期フェーズにも影響を与えるであろうか。

secA51 変異株を 30°C で培養し、1 μ g/ml となるようにクロラムフェニコールを加え、20分後にパルス-チェイス・分画を行なった。Lee, Beckwith が 38°C で観察したようにクロラムフェニコール処理によって、シグナル切断反応は相対的に加速されており、膜透過初期フェーズが見かけ上改善されたことがわかる(図 10 A と B を比較: 定量結果は C の点線)。ところが中間体の割合はむしろわずかながら上昇し、そのチェイスにともなう減少は薬剤処理の有無によっては変わらない(図 10)。すなわち膜透過後期フェーズにはクロラムフェニコールの効果が無い。*secA51* 変異による SecA の機能の低下が本質的には膜透过后期フェーズの遅れに現われており、初期フェーズの遅れは二次的であるため、分泌タンパク質の流入量減少によって回復するのかもしれない。言い換えると、SecA タンパク質は膜透过后期フェーズに直接関わっているのではないかということである。

薬剤処理した場合、チェイス開始時点では既に前駆体のプロセッシングはかなり終わっており、ラベルされた MBP の大半は中間体として存在している。これはチェイスに伴ってペリプラズムの成熟体へと転換しており、膜透过后期フェーズの存在をよりはっきりと示す結果である。

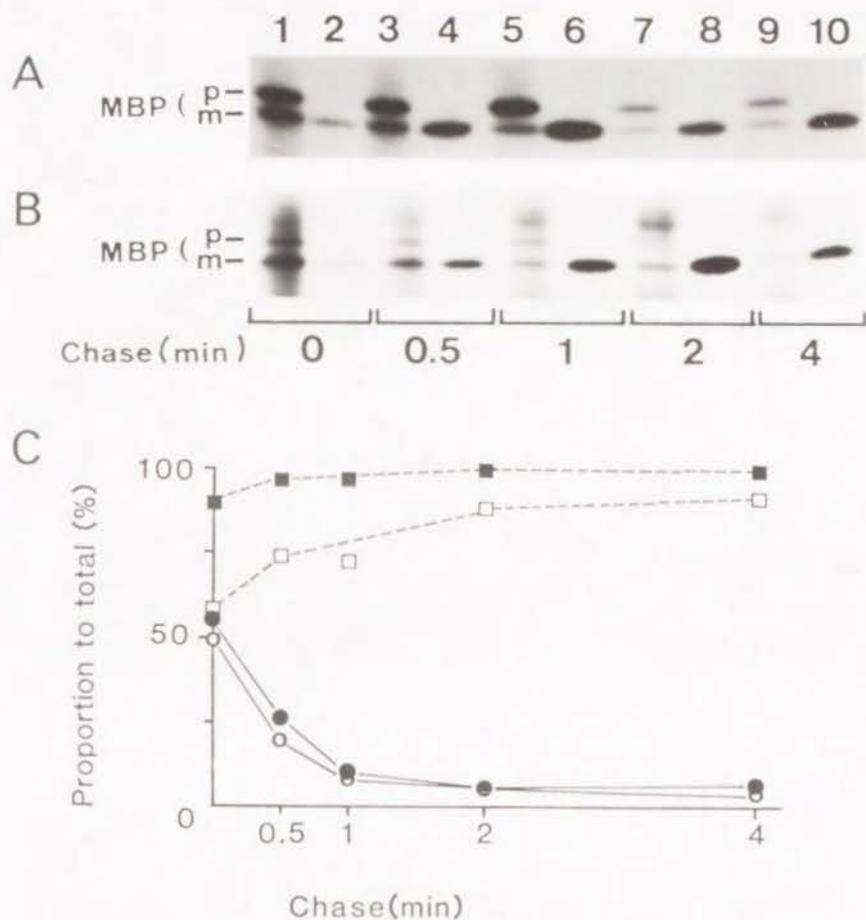


図10 *secA51* 変異株でのMBPのラベリングカイネティクスにおける低濃度クロラムフェニコール処理の影響

- A,B; MM52株 (*secA51*) を30°Cで培養し、図2と同じパルス-チェイス・分画実験を行ない、フルオログラフィーで分析した。Bではパルスラベルの20分前にクロラムフェニコールを1 μ g/mlとなるように加えた。奇数レーンはスフェロプラストを、偶数レーンはペリプラズム分画をそれぞれ表わす。
- C ; フルオログラムをデンストメーターにかけ、各MBPのバンドの濃度を測定した。チェイス各時点における全MBP分子に対する中間体MBPの割合を○と●で、シグナル切断の割合を□と■で表わした。○と□はクロラムフェニコールで処理しない場合 (A) を、●と■は処理した場合 (B) の値を表わす。

第6節 *secB* 変異株における中間体

secA と *secY* の変異株で検出された中間体は、他の分泌欠損株においても一般にみられるものなのであろうか。SecBタンパク質は前駆体分子に結合して細胞質内でのフォールディングを妨げ、膜透過可能な状態に保つ働き¹⁵⁾や、前駆体を膜に導く働き⁴⁷⁾をしていると考えられている。この機能が低下した場合、膜透過の開始あるいは初期フェーズが影響を受けると考えられるが、後期フェーズにはどのような影響を及ぼすのかを調べた。

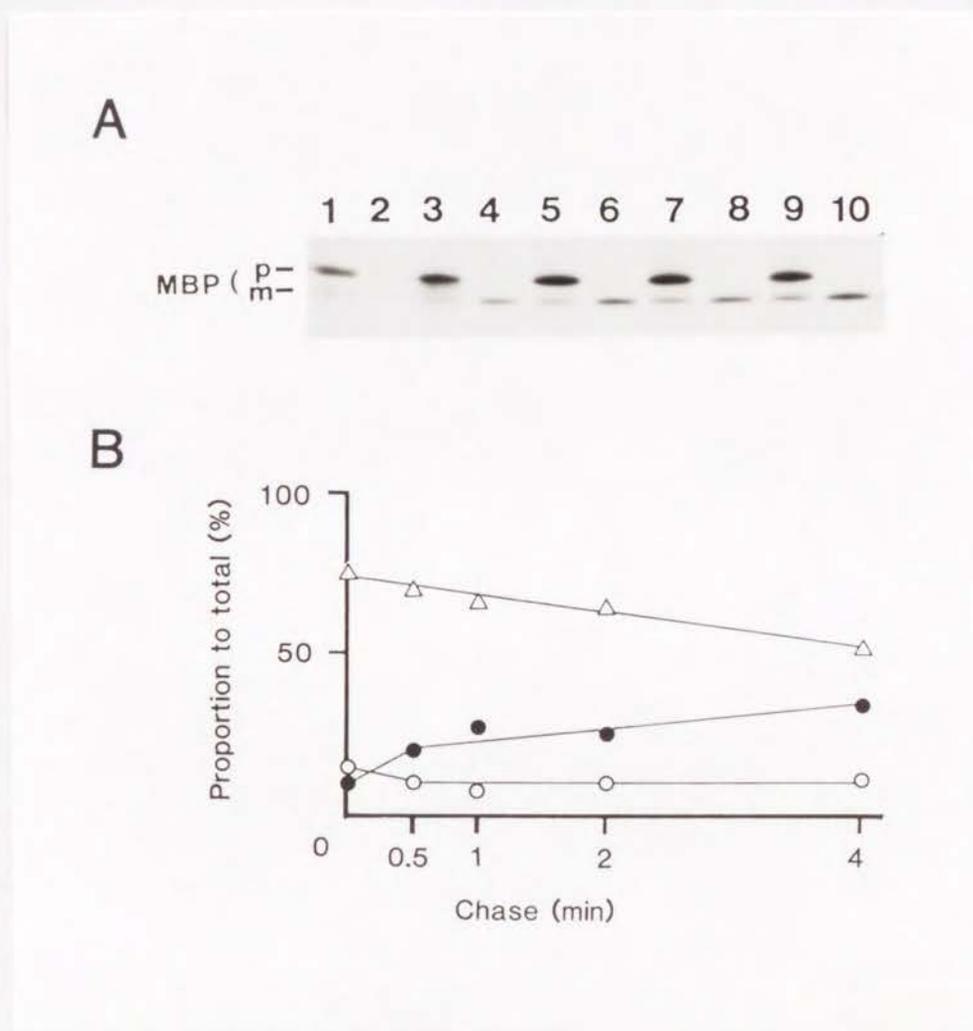


図 1.1 *secB7* 変異株におけるMBPのラベリングカイネティクス

MM150株 (*secB7*) を 30°C で培養し、図 2 と同じ方法でパルス-チェイス・分画実験を行なった。オートラジオグラムを A に示す。奇数レーンと偶数レーンはそれぞれ各チェイス時点でのスフェロプラストとペリプラズム分画を表わす。B では全 MBP に対する前駆体 (Δ)・スフェロプラストに存在するシグナル切断型分子 (\circ)・成熟体 (\bullet) の各割合を示した。

secB 変異を持つ株を30°Cでパルス-チェイス・分画し、MBPの膜透過カイネティックスを検討した。この株においては、シグナル切断の遅れが顕著にみられるが、スフェロプラストに留まったシグナル切断型分子はチェイス開始時点でも全MBP分子の約10%程度しか見られず、*secA*・*secY*変異株に比べると非常に少ない(図11AとB)。またこの量はチェイスによってもほとんど変化しない。この分子に関してはこれ以上分泌反応が進行しない状態になっていることが示唆される。*secY*, *secA*変異株で見られた Processed immature form は最終的には成熟体へと転換して行くが、*secB7*変異株での類似分子は「中間体」としての性質(チェイスによる移行)を示していない。この意味については考察で議論する。

第7節 他のペリプラズムタンパク質の膜透過中間体

MBPの膜透過を詳細に検討することで膜透過中間体を検出することができたが、他のペリプラズムタンパク質においても同様の中間体を経て膜透過されて行くのだろうか。Minskyらは β -ラクタマーゼ(Bla)の分泌を低温(15°C)で観察することで、シグナル切断の起こったBlaがスフェロプラストに存在することを報告している⁴⁸⁾。彼らはこの分子が外側から加えたプロテアーゼによって分解されることから、この中間体は膜透過を終えた分子が膜の外側に結合しているものであり、その後ペリプラズムに移行する遊離ステップがあるというモデルを提唱した。ここで報告されたBlaの中間体は我々がMBPで検出した Processed immature form と、スフェロプラストにおける局在性(プロテアーゼ感受性)を除いて非常によく似ている。Bla膜透過における中間体の検出と性質の検討を我々の系において行なった。

プラスミドpBR322を保持した野生株の大腸菌を30°Cでパルス-チェイス・分画し、Blaの膜透過カイネティックスを調べた。Blaの膜透過は他の分泌タンパク質に比べて遅く、分泌欠損変異株を用いなくても前駆体を検出することができる。また*sec*変異株においてMBPで見られたのと同様の膜透過中間体が明瞭に検出でき、チェイスによって緩やかに減少した(図12A)。Blaの膜透過速度は初期フェーズのみならず後期フェーズにお

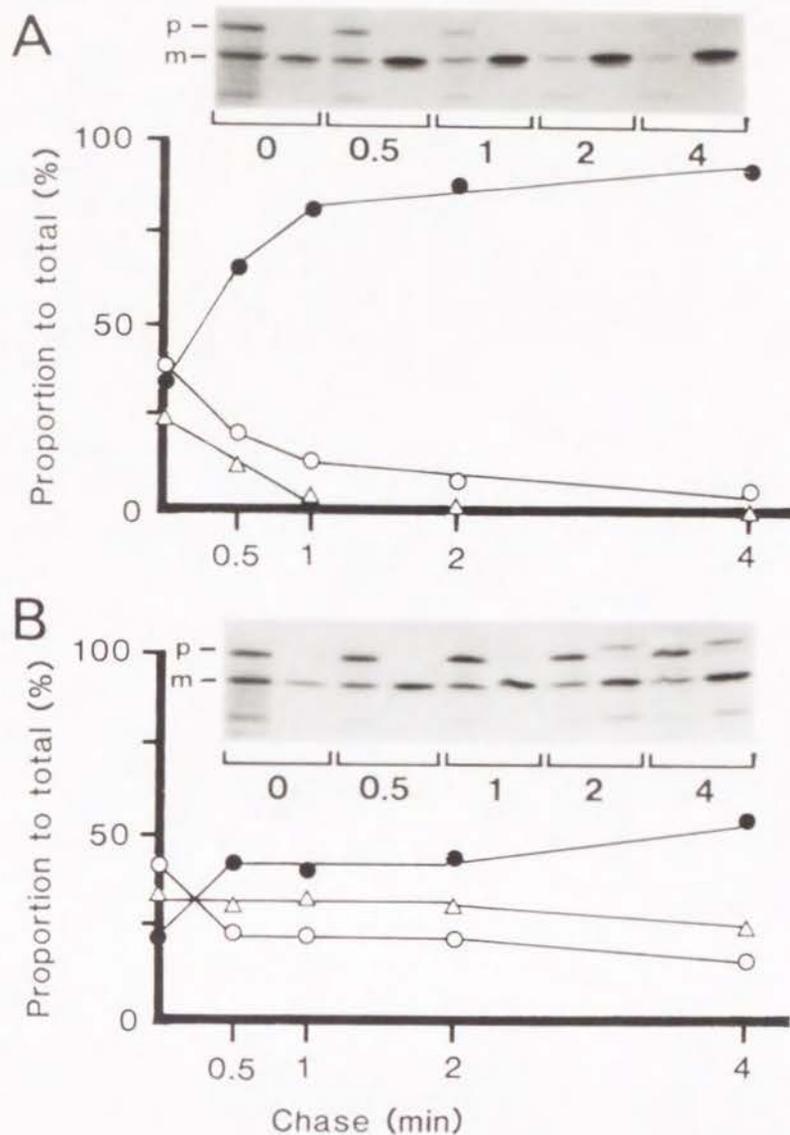


図 12 BlaのラベリングカイネティクスとCCCPの効果

MC4100 (*sec*⁺) / pBR322 (A)、AN120 (*sec*⁺ *uncA401*) / pBR322 (B) を 30°C で培養し、図 2 と同じ方法でパルス-チェイス・分画の実験を行なった。B ではチェイス開始時点で 50 μM となるように CCCP を加えた。抗体沈澱は抗 Bla 抗血清を用いて行なった。挿入したオートラジオグラムで、奇数レーンと偶数レーンはそれぞれ各チェイス時点でのスフェロプラストとペリプラズム分画を表わす。グラフは全 Bla 分子の量に対する前駆体 (Δ)・中間体 (○)・成熟体 (●) の割合を示す。前駆体 Bla の定量結果は、シグナルペプチドに含まれる余分のメチオニンの数を考慮して補正してある。

いても緩やかであり、そのため野生株においても中間体が容易に検出されたものと考えられる。次に中間体Blaの局在とコンフォメーションをプロテアーゼ消化実験によって調べた。Bla成熟体もMBPと同様にプロテアーゼ耐性構造をとることが知られている。30℃で30秒間パルスラベルした細胞をスフェロプラストとペリプラズムに分画し、トリプシンを作用させた。図13で明らかなように、ペリプラズム分画のBlaは消化を受けないが(レーン4)、スフェロプラストでは中間体が完全に消化を受ける(レーン3)。前駆体は分解されていないので、膜構造は正常であることがわかる。この結果はMinskyらの観察⁴⁸⁾と一致する。中間体Blaは完全に膜の外側に出ているか、アミノ末端部分を部分的にペリプラズムに露出しているか(図4参照)のどちらかであり、いずれの場合でもフォールディングは不十分である。また非イオン性界面活性剤 Triton X-100 存在下ではペリプラズムの成熟体Blaも消化を受けている(レーン6)。BlaはMBPの場合(図3;レーン6)とは異なり、界面活性剤に対するコンフォメーションの抵抗性が弱いのであろうか。

さらにBla膜透過のエネルギー、特にプロトン駆動力依存性を調べるため、*uncA401* 変異株を用いてCCCPの効果を確認した。チェイス時に50μMのCCCPを加えると、前駆体のシグナル切断のみならず中間体から成熟体への転換も妨げられた(図12B)。これからBlaの場合においてもMBP同様にエネルギー、特にプロトン駆動力依存的な膜透過後期フェーズが存在することがわかる。この結果は、中間体BlaはMBP同様に膜横断の途上にあることを示唆する。



図 1 3 中間体Blaのトリプシンaccessibility

MC4100/pBR322を30°Cで培養し、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで30秒間パルスラベルを行なった。細胞をスフェロプラスト（奇数レーン）とペリプラズム（偶数レーン）に分画後、 $100\mu\text{g/ml}$ のトリプシンを加え、0°Cで1時間置いた（レーン3-6）。レーン1, 2ではトリプシンのかわりに同容量の緩衝液を加えた。反応後 protease inhibitor 存在下で抗Bla抗血清を用いた抗体沈澱・SDS-PAGE・フルオログラフィーを行ない、分析した。pとmはそれぞれ前駆体・シグナル切断型Bla分子を表わす。

考察

第1節 MBPの膜透過中間体

大腸菌野生株においては、MBPのシグナル切断はタンパク質の約80%が合成されれば起こり得ることが示されている⁶⁾。このような場合、シグナル切断を受けたポリペプチド鎖のカルボキシル末端は細胞質にあるから、定義上膜をスパンした状態にあるはずである。Randallらのこの結果は、合成途上のMBP分子が内膜と結合した状態にあり得ることを示しているが、このような分子はヘテロなサイズであるため、V8プロテアーゼの限定分解で長さを揃えたアミノ末端断片として微量にしか検出できず、その成熟体への転換などの詳細な解析には用いることができなかった。その後ThomとRandallは、15秒間バルスラベルした野生株大腸菌の膜分画にシグナルペプチドを失ったMBP分子を見出し⁴⁹⁾、膜からの遊離ステップ直前の分子であろうという議論を行なっているが、そのような分子の存在の可能性を指摘するに留まっている。

我々は温度感受性分泌欠損変異 *secA51*・*secY24*・*secY100* におけるMBPの膜透過を許容温度で解析することによって、解析可能な量の膜透過中間体が検出されることを示した。これらの分泌欠損株は許容温度においては野生株と区別つかない良好な生育を示すので、変異による増殖異常の二次的な影響によってそのような現象が起こったとは考えられない。中間体 *Processed immature form* には、外側から加えたプロテアーゼ消化を受けないよう膜構造によって守られる種類のもが含まれる。Randallらの見出した合成途上の中間体は同様の条件下でプロテアーゼ消化を受けるので³⁸⁾、我々が検出した中間体はこれまで報告のない分子種を含んでいる。この分子はシグナル切断部位がペリプラズム側に到達しており、またSecAタンパク質とクロスリンクされるらしいことから膜をスパンした状態にあると考えられる。シグナル切断部位がペリプラズム側に到達し、切断された以降の膜透過反応もこれらの *sec* 変異により遅くなっているために、このような分子が蓄積するのだろう。膜構造が存在してもプロテアーゼによって消化を

受ける分子種は、アミノ末端を様々な長さに外側に突き出した分子であるか、膜横断は完全に終了して膜の外側に結合した分子かのいずれかであろう（図4参照）。プロトン駆動力を解消したときには中間体から成熟体への転換が妨げられることを考えると、後者も膜横断中の分子である可能性が高いと思われる。後に議論するように、タンパク質が膜横断完了後に膜から離れる「遊離ステップ」の存在⁴⁸⁾は証明に乏しいと考える。

Taniらは、*in vitro* 膜透過系でのOmpAタンパク質の膜透過において、プロトン駆動力を減少させた場合、シグナルペプチドが切断された状態で膜をスパンしている中間体が蓄積することを報告している⁵⁰⁾。また最近Gellerは*in vivo* においてCCCP処理した状態でパルスラベルを行なうと、MBPの中間体が膜フラクションから検出されることを報告している⁵¹⁾。特に前者の報告は、Processed immature form が膜横断の途上にある分子であって、膜横断を完了した分子ではないとの、MBPでの我々の解釈と一致する。

第2節 膜透過後期フェーズにおけるエネルギーの必要性

脱共役剤を用いた場合、膜透過初期フェーズと後期フェーズの反応は、どちらも阻害を受ける。*uncA401* 変異株を用いた解析から、少なくともプロトン駆動力がエネルギーとして必要であることが結論できる。本研究終了後、Gellerによって報告された、プロトン駆動力減少下でのMBP中間体の蓄積という結果⁵¹⁾も、後期フェーズにおけるプロトン駆動力の必要性を支持している。一方、Taniらによる*in vitro* 実験系でのOmpA中間体の蓄積の場合、OmpAタンパク質のカルボキシル末端側に起こる分子内ジスルフィド結合が生じないような還元的条件では、プロトン駆動力が形成されない条件でも膜透過はゆっくりと完了することが述べられている⁵⁰⁾。また*in vitro* 実験系の場合、プロトン駆動力は膜透過の効率を上昇させるが、必要不可欠ではないと考えられている⁵²⁾。プロトン駆動力要求の絶対性については、*in vivo* と*in vitro* では異なる結果が得られているのである。この違いが単に実験系の違いに起因するものかは即断できないが、我々は*in vivo* において細胞の生育を支えるに十分な分泌活性を発揮するためには、プロトン駆動力の存在が必須であると考えている。

大腸菌以外の膜透過系においては一般にATP（またはGTP）加水分解の必要性は認められるが、プロトン駆動力要求性に関しては一般性が無い⁵³⁾。動物細胞の小胞体膜透過系ではそもそも膜間の電気化学的ポテンシャルは形成されていないと考えられており、ミトコンドリアへのタンパク質輸送の場合は、タンパク質の透過の向きとポテンシャルの向きは大腸菌の場合とは逆になっている。プロトン駆動力が果たす役割の詳細な理解は今後の研究に残されている。

我々の結果では、プロトン駆動力は膜透過初期フェーズの進行にも必要とされる。膜透過初期フェーズはシグナル切断が起こるまでの反応であり、シグナルペプチドと成熟体のアミノ末端部分がループ状に膜に挿入される過程が含まれる。ポリペプチド鎖が膜を横断する反応にプロトン駆動力が必要であると考えれば、初期フェーズと後期フェーズにおけるプロトン駆動力の必要性は統一的に解釈できるだろう。

我々の実験結果はATP加水分解が後期フェーズに必要であるかについては何も言えない。Gellerの報告では、MBP中間体の成熟体への転換は亜ひ酸（細胞内ATP量の減少をもたらす）の添加によっては阻害されない⁵¹⁾。また *in vitro* 実験系の結果でも、加水分解を受けないATPアナログの阻害効果はシグナル切断を指標とした膜透過反応においてのみ見られ、シグナル切断を受けた中間体の膜透過には影響しないことがわかっている⁵⁰⁾。ATP加水分解は膜透過初期にのみ必要とされるのであろうか。

第3節 膜透過後期フェーズに関与する細胞装置

中間体の蓄積が *secA* や *secY* 変異株に顕著に見いだされることは、両遺伝子産物が膜透過後期フェーズに働く因子であることを示唆する。*SecY*は内膜に深く埋もれた膜内在性タンパク質であるから¹⁹⁾、分泌タンパク質の膜横断反応に直接関与することは考えやすい。*secY* 遺伝子に起こった別種の変異として、シグナルペプチドの機能欠損変異を抑制する *prlA* 変異が知られている²¹⁾。膜上でのシグナルペプチドの認識は膜透過初期フェーズで起こるのであろうから、*SecY*は膜透過の初期と後期の両方に働く因子であろう。*SecA*も膜透過中間体MBPとクロスリンクされることから、後期フェーズに直接関わ

ることが示唆される。SecAは内膜の内側に結合して機能するので、膜内在性因子と複合体を作って機能すると考えられている。例えば、SecAのATPase活性は前駆体タンパク質とSecYを含む膜小胞の両方が存在したときに顕著に見られ、抗SecY抗体によって阻害される¹⁸⁾。ただし膜透過の後期フェーズにはATP加水分解が必要とされないとすれば、またSecAのATPase活性を阻害するNa₃N₃によって膜透過後期フェーズが阻害されないという実験結果から考えると、膜透過後期フェーズにおけるSecAの働きはATP加水分解をとまなうものではない可能性がある。SecAの場合にもシグナル変異の抑制を行なう*prID* というalleleが見つかっており⁵⁴⁾、またその局在性からも後期のみならず初期にも働く因子であることが推測される。

SecBタンパク質は細胞質内で膜透過のごく初期に働く因子であるから、その変異株では中間体の蓄積はみられないと予想した。しかし量的には少ないとはいえ、スフェロプラストからシグナル切断型分子が見いだされることは、SecBが後期フェーズにも関わる因子であることを示すのだろうか。*secB7* 変異株で検出される中間体の量はチェイスによっても減少しない。SecBがMBP前駆体のフォールディングを妨げる因子である¹⁵⁾ことを考えると、*secB7* 変異株で見られる中間体は、膜透過を開始しながらもそのカルボキシル末端側がフォールディングを起こしてしまったために途中で膜透過が停止した状態になっているのではないかという可能性も考えられる(図14B)。Kumamotoは野生株細胞内で形成された前駆体タンパク質とSecBとの複合体を、抗SecB抗体カラムによるアフニティークロマトグラフィーで検出することによって、生体内でのMBP前駆体とSecBとの相互作用を示したが、同時にシグナル切断型MBPも複合体として微量に検出されたことを報告している⁵⁵⁾。中間体においてもそのカルボキシル末端側のフォールディングが膜透過の障害となり、SecBによってそれが避けられていることが考えられる。

(図14A)以上の観点に立てば、SecBは膜透過後期フェーズそのものに直接関与するというよりも、前駆体の高次構造を通して間接的に関わっているということができらる。

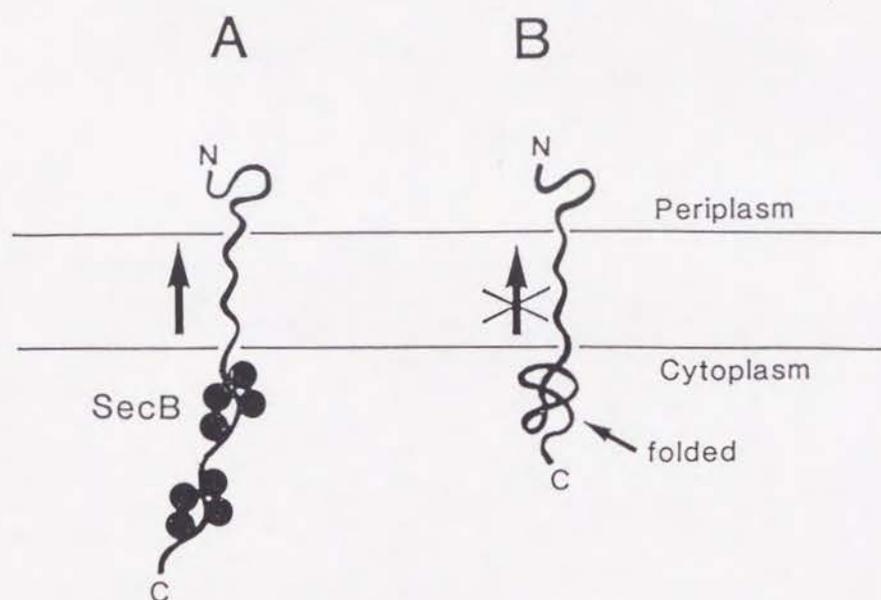


図 1 4 *secB7* 変異株におけるシグナル切断型MBP分子の存在状態—1つのモデル
 A; SecBが機能する場合—MBPのカルボキシル末端側にSecBが結合し、フォールディングを抑えている。膜透過反応は進行する。
 B; SecBが機能しない場合—MBPのカルボキシル末端側はフォールディングを起こしてしまい、膜透過反応はこれ以上進行しない。

第 4 節 遊離ステップは実在するか？

Minskyらは、15°Cという低温でパルス-チェイス・分画することによって、スフェロプラストからシグナル切断型のBla分子を検出できることを報告している⁴⁸⁾。彼らはこの中間体が外側から加えたプロテアーゼによって消化されることから、Blaポリペプチド鎖が膜横断後に膜の外側に結合しており、それがフォールディングを起こした成熟体になるためには、ペリプラズムへの「遊離ステップ」を経なければならないというモデルを提出した。我々のMBPによる解析では、膜によってプロテアーゼから守られる分子が存在することと、中間体から成熟体への転換にはプロトン駆動力が必要であることなどの理由で、シグナル切断後の膜横断ステップの存在を明らかにした。またBlaにおいても彼らが見いだしたのと同じ中間体を検出した。Blaの場合、中間体はすべて外側から加えたプロテアーゼによって消化を受ける点ではMinskyらの結果⁴⁸⁾と合致する。しかしこのBla中間体から成熟体への転換はMBP同様にプロトン駆動力に依存している。プ

ロトン駆動力が膜の内側と外側との間に形成されることを考慮すれば、Blaの場合にも中間体は膜横断途上の分子であると考えた方が合理的であろう。プロテアーゼによる消化実験の結果は、Bla中間体が種々の程度に膜透過を完了していないため、ゲル上では検出されない（図4参照）と解釈可能である。遊離ステップが独立に存在するかどうか、またそれがペリプラズムでのフォールディング反応と区別されるものかどうかなどについては何もわかっていないと言うべきであろう。

第5節 膜透過モデルと *sec* 遺伝子産物（図15）

MBPの膜透過中間体 Processed immature form の解析から、膜透過全過程を初期と後期の二つのフェーズに分けて考察することが可能になった。

初期フェーズは細胞質での前駆体タンパク質合成・フォールディング阻害・シグナルペプチドの認識と膜への誘導・アミノ末端部分からの膜への挿入・シグナルペプチドの切断といったステップが含まれるだろう。フォールディング阻害に働く因子としてSecBが知られている。SecBは前駆体タンパク質のうち、少なくとも成熟体部分を認識して結合し、フォールディングを抑えるらしい（antifolding機能）¹⁵⁾。ただしSecBは全ての分泌タンパク質に対して働くわけではなく、*secB* 変異の影響が現われないタンパク質のサブセットもある^{56, 57)}。後者のうちBlaは*groE* 変異株で膜透過が遅れるので⁵⁸⁾、この場合には熱ショックタンパク質GroEがSecB同様の機能を果たしているものと考えられる。分泌タンパク質はこの後膜へと誘導されなければならない。このステップで機能する因子はSecAであり^{47, 59)}、SecBの関与を示唆する報告⁴⁷⁾もある。SecAはシグナルペプチドと結合し得ることが遺伝学的・生化学的実験結果から推測されており^{54, 60)}、また膜の内側に結合する事ができる¹⁷⁾。SecAと膜との結合は、SecYないしはその近傍で起こるらしい⁴⁷⁾。SecAは前駆体タンパク質と膜の共存下でATPase活性が著しく上昇し、SecY機能がそれに必要であるので¹⁸⁾膜透過に共役した働きをしていると考えられている。Geller⁵¹⁾や我々の結果は、ATP加水分解が必要とされるのは膜透過初期フェーズであることを示唆するが、ATP加水分解で放出されたエネルギーが何に用いられるか

は明確ではない。

前駆体タンパク質は、シグナルペプチドのアミノ末端を膜の内側に残し、ループ状に膜へ挿入される。シグナルペプチドが膜内在性装置と相互作用することは、*prlA*, *prlG* 変異がそれぞれ *secY*, *secE* 遺伝子内に起きる^{21,22)}ことから示唆される。最近 Silhavy らは *prl/prl** 部分二倍体株における LamB-LacZ 融合タンパク質 (*prl* 変異で抑制されるシグナル変異を持つ) の振舞いを細かく解析した⁶¹⁾。彼らの解釈では、シグナルペプチドはまず SecE と相互作用する。続いて SecY と相互作用し、その時点では SecE と SecY は複合体を形成していると考えられている。シグナルペプチドの切断点がペリプラズム側に到達すれば、Leader Peptidase の作用によってシグナル切断が起こる。

膜透過後期フェーズには、成熟体部分のポリペプチド鎖の膜横断のステップ・(もしあるとすれば) 膜からの遊離ステップ・固有のコンフォメーションをとるためのフォールディングステップが含まれよう。外膜タンパク質の場合には間に外膜へのソーティングステップが加わるであろう。膜横断ステップでは既にシグナルペプチドは切断を受けていても反応が進行するので、シグナルペプチドの役割は初期フェーズで終わっているであろう。膜横断ステップで機能する細胞装置は SecA・SecY である。SecE/SecY 複合体がシグナルペプチド認識時点で働くという Silhavy らの解釈⁶¹⁾を考えると、膜横断ステップでも SecE が何らかの働きをしている可能性はあるだろう。このステップにはプロトン駆動力が必要とされる。また最近同定された膜内在性因子 SecD・SecF は、ペリプラズム側に大きなドメインを持つことから膜透過の後期過程に関わるという考えがある²⁴⁾。*secD*・*secF* の遺伝子内には *prl* 変異が見いだされておらず、少なくともシグナルペプチドの認識が必要とされるステップには関係が無いのかもしれない。

遊離ステップの存在が今のところ実証に乏しいことは既に論じた。膜横断後のフォールディングに特別の因子が必要であるかについては、大腸菌ではまだ報告が無い。真核生物の小胞体に存在するシャペロン因子 BiP は、膜透過後のフォールディング・分子集合ばかりでなく、膜透過そのものにも積極的に関わるということが最近明らかになった⁶²⁾。大腸菌においてもこうしたシャペロン因子の必要性は解明されなければならないだろう。

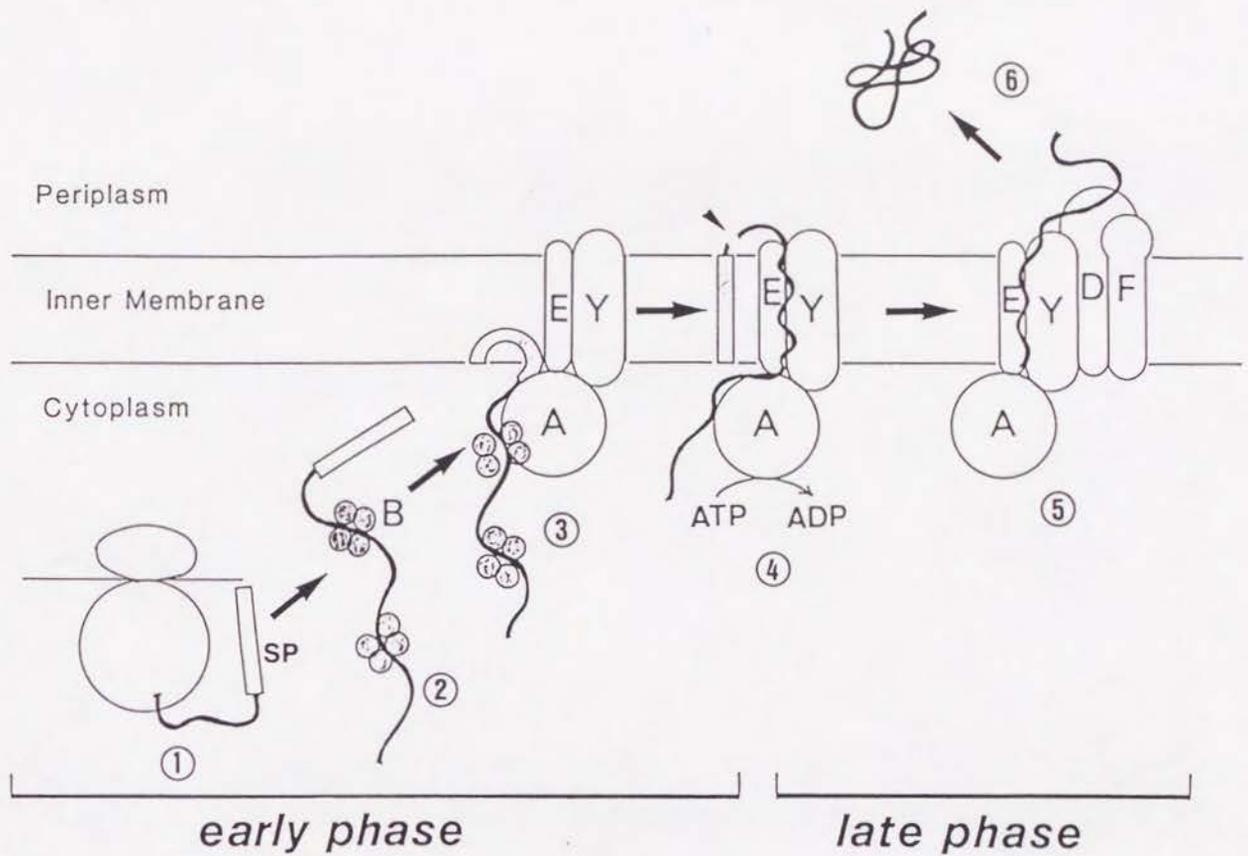


図15 膜透過過程のモデル

SPはシグナルペプチドを表わす。

- 初期フェーズ；①前駆体の合成 ②SecBの結合によるフォールディング制御
 ③SecAを介しての膜への結合とSP部分の挿入開始（SecEの関与？）
 ④SP部分の膜横断の完了と、Leader Peptidase による切断（SecA, E, Yの関与？）
- 後期フェーズ；⑤成熟体部分大半の膜横断（SecA, E, Y, D, Fの関与？）
 ⑥成熟体分子の完成

第2部 *secY24* 変異を多コピー状態で抑制する遺伝子の単離と解析

結果

第1節 *secY24* 変異に対するマルチコピーサブレッサーの単離

新たな分泌関連遺伝子・シャペロン遺伝子を探索する目的で、*secY24* に対するマルチコピーサブレッサーを単離した。野生株W3110の染色体DNAを制限酵素 *Sau3AI* で部分分解する。5-15kbの大きさに相当するDNA断片をアガロースゲルから切り出し、pBR322のレプリコンを持つ多コピープラスミド pN01575⁶³⁾ の *BamHI* サイトにクローン化して染色体DNAライブラリーを作製した。このライブラリーで *secY24* を持つ温度感受性変異株 IQ85 を形質転換する。IQ85株は高温（42°C）では生育が悪く、L培地ではつぶれたコロニーを形成し、最小培地では生育できない⁶⁴⁾。形質転換株のうち、M9最小培地で42°Cでの生育の良いものを選択し、高温耐性であることを確認し、約120,000の形質転換株から27個の高温耐性形質転換株を得た。これらの株からプラスミドを調製し、再度IQ85株を形質転換することで、25クローンが抑制（サブプレッション）活性を持つことがわかった。ここでは遺伝学用語「抑制」を用いるが、細胞の増殖活性からみると「回復」の意味である。プラスミドにクローン化されたDNA断片の制限酵素切断パターンから、独立なクローンは18個であることがわかった。さらに制限酵素地図を制限酵素 *BamHI*, *HindIII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *BglII*, *KpnI*, *PstI*, *PvuII* の8種について作製し、Koharaらによる大腸菌全染色体制限酵素地図⁶⁵⁾と対照することで、18クローンのうち12クローンの染色体上の位置を推定した(図16)。1クローン(pMSY11)は*secY*自身を含み、この場合には抑制というよりも相補活性によって選択されたことがわかる(このクローンについては作成した制限酵素地図と、既に決定されている*secY*周辺の塩基配列とを比

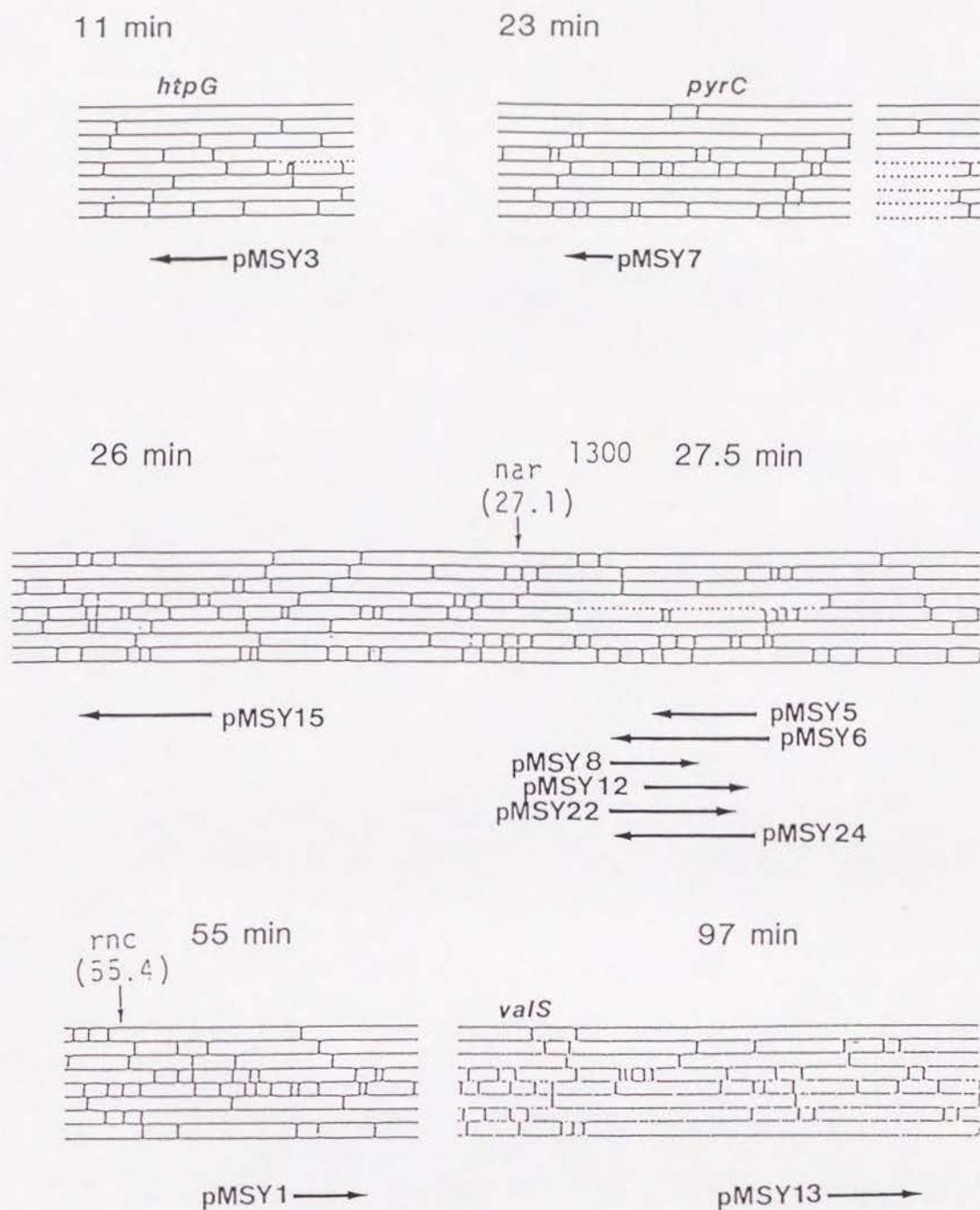


図 16 全染色体制限酵素地図上でのマルチコピーサプレッサークローンの位置

Koharaらによる大腸菌全染色体制限酵素地図上での各クローンの位置を示す。プラスミド名のついた矢印の長さでカバーしているDNA領域を表わす。矢印の向きはベクター由来の *lac* プロモーターからの転写方向を表わす。制限酵素地図の各カラムは、上から *Bam*HI・*Hind*III・*Eco*RI・*Eco*RV・*Bgl*II・*Kpn*I・*Pst*I・*Pvu*II の各制限酵素切断部位を表示している。*secY* のクローン pMSY11は、対応する領域の Koharaらによる制限酵素地図が不分明であるため、この中には含めていない。

較してマップした。) 。11クローンはそれぞれ染色体上11, 23, 26, 27.5, 55, 97 分にマップされた。このうち27.5分には独立な6クローンが重複してマップできた。抑制活性の程度を形質転換株の生育状態で判断すれば、27.5分のクローンが最も高く、23分・11分がそれについて高く、26分・55分・97分のクローンは相対的に低い活性を示す(表2)。また23分のクローンは培地にグルコースを添加すると抑制活性を示さない。各クローンの位置に相当する遺伝子のうち、既にDNA塩基配列が報告されているものとクローンの制限酵素地図を比較すると、11分のクローンが熱ショックタンパク質の一つをコードする遺伝子 *htpG*⁶⁶⁾ を含むことがわかった(図16)。その他のクローンについては、報告されている塩基配列と明確に一致するものは見いだせなかった。塩基配列の報告は1-2kb内外のものが多く、制限酵素地図と対照するには小さすぎることも一因であろう。

表2 マルチコピーサプレッサーによるIQ85株の増殖能の回復

プラスミド	30°C	42°C		
	L	M9Glu	M9Gly	L
pMSY5(27.5)	++++	++	++	+++
pMSY12(27.5)	++++	++	++	+++
pMSY7(23)	++++	-	+	++
pMSY3(11)	++++	+	+	+
pMSY15(26)	++++	N.T.	+	±
pMSY1(55)	++++	+	+	±
pMSY13(97)	++++	N.T.	+	±
pNRK267(<i>groELS</i> ⁺)	++++	+	+	±
pMSY11(<i>secY</i> ⁺)	++++	+++	+++	++++
pNO1575H	++++	-	-	(-) ^a

M9Gluは炭素源としてグルコースを、M9Glyはグリセロールを用いた最小培地。

(-)^a---つぶれたようなコロニー

プラスミド名の後の()内の数字は、染色体上の位置(min)を表わす。

N.T.= Not Tested

分泌レベルでの抑制活性を調べるために、外膜タンパク質OmpAのプロセッシング速度をパルスラベルによって確かめた。形質転換株を30°Cでアンピシリンを含むM9最小培地で培養し、42°Cに培養温度を上げてから2時間後に $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで2分間パルスラベルを行なう。標識されたタンパク質を抗OmpA抗体で抗体沈澱し、SDS-PAGE・フルオログラフィーで分析した。ライブラリー作製に使用したベクターpN01575は*lac*プロモーターからの転写を誘導すると下流の β -ラクタマーゼ(Bla)を高発現し、*secY24*変異株の分泌能を低下させるという影響を及ぼす⁶⁷⁾ため、対照としてはそのような悪影響の無いプラスミドpN01575Hを用いてある。pN01575Hはプラスミド上の*lac*プロモーターからの転写のBla方向への流れ込みを低下させるため、*lac*プロモーターの下流にフレームシフト変異を導入してある。pN01575Hによる形質転換株では前駆体OmpAの蓄積がみられるのに対し、23分(pMSY7)と27.5分(pMSY5,6,12,22,24)のクローンでは顕著なプロセッシングの良化がみられる(図17)。これら2種のクローンについてさらに詳しい抑制活性を調べるために、パルス-チェイス実験を行なった。pN01575Hを保持したIQ85株はOmpAのプロセッシングが遅くなっている。それに対してpMSY5(27.5分のクローン)では、チェイス初期段階から成熟体OmpAの量の方が多く、*secY*を含むクローンpMSY11よりもかえってプロセッシングの初期速度が速くなっていることがわかる(図18A,B)。pMSY7(23分のクローン)では、pMSY11よりも多少プロセッシングの速度が遅いが、pN01575Hよりはるかに活性が高い。ただしpMSY11ではチェイス後4分の時点ではOmpAの前駆体は全く見られないのに対し、pMSY5やpMSY7では2-3%の前駆体が観察でき、抑制が完全ではないことが示される。

27.5分・23分は共にこれまで分泌関連遺伝子ないしはその抑制変異が見い出されていない領域である。この2種類のクローンが分泌レベルにおいても顕著な抑制活性を示すことから、これらを*msyA*(27.5分)、*msyB*(23分)と命名し(*msy* = multi-copy suppressor of *secY24*)、*htpG*と併せて詳細な解析を行なうことにした。

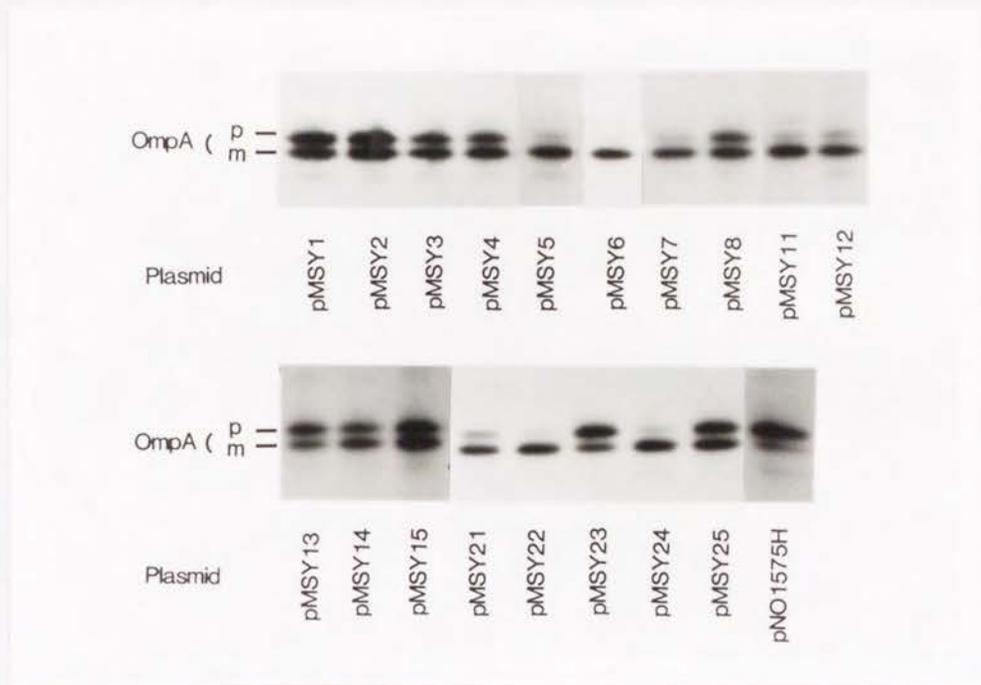


図 17 各プラスミドを保持した *secY24* 株の OmpA プロセッシング速度

図の下に表示した各プラスミドを保持する IQ85 (*secY24*) 株を 30°C で培養し、42°C に培養温度をあげてから 2 時間後に 2 分間のパルスラベルを行なった。TCA 沈澱させたタンパク質を抗 OmpA 抗血清で抗体沈澱し、SDS-PAGE・フルオログラフィーで分析した。p と m はそれぞれ OmpA の前駆体と成熟体を表わす。

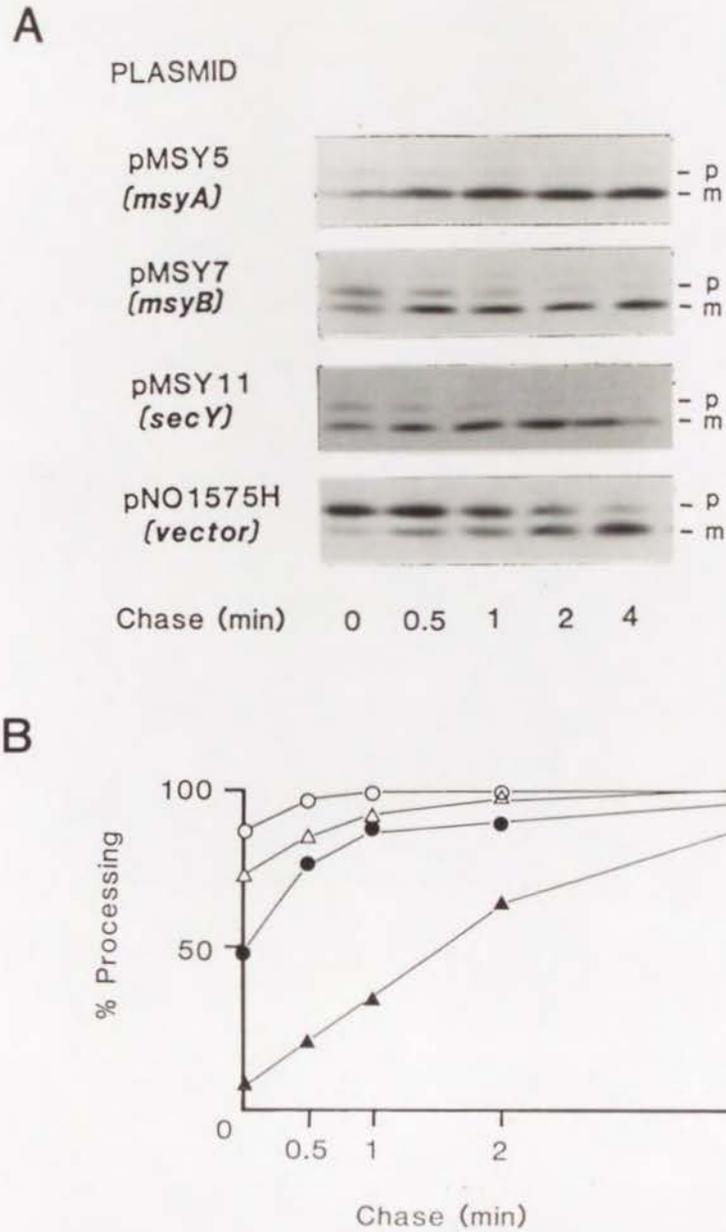


図 18 *msyA*・*msyB* による OmpA プロセッシングカインेटイクスの影響

pMSY5 (*msyA*) ないしは pMSY7 (*msyB*) を保持する IQ85 (*secY24*) 株をグルコース (pMSY7 の場合にはグリセロール) 最小培地中にて 30°C で培養し、42°C に温度シフトしてから 2 時間後に、30 秒間のパルスラベルとそれに引き続くチェイスを行なった。各サンプルは抗 OmpA 抗血清による抗体沈澱を行ない、SDS-PAGE・オートラジオグラフィで分析した。対照として、pMSY11 (*secY**) ないしはベクター pNO1575H を保持する IQ85 株でも同様の解析を行なった。

A; オートラジオグラム (p と m はそれぞれ OmpA の前駆体・成熟体を表わす)。

B; プロセッシングカインेटイクスの定量結果 (A で示したオートラジオグラムをデンストメーターで定量し、全 OmpA 分子に対するプロセッシングを受けた分子の割合を示す)。○ は pMSY5 を、● は pMSY7 を、△ は pMSY11 を、▲ は pNO1575H をそれぞれ保持した IQ85 株のパターン。

第2節 他の分泌欠損変異株に対する抑制効果

secY24 変異に対して選択されたマルチコピーサプレッサーが他の分泌欠損株に対しても抑制効果を示すかどうかを検証した。高温感受性変異株KI200 (*rp10215 (am)* 変異を持つ) は、42°CでSecYタンパク質の発現量が減少し、分泌欠損の表現型を示すことがわかっている⁸⁸⁾。*msyA*・*msyB* はどちらもこの株の高温感受性増殖を抑制することはできなかった。これら遺伝子のマルチコピー状態はSecYタンパク質の単なる量的減少には効果がないことがわかる。高温感受性ミスセンス変異*secY100* に対する効果を調べたところ、*htpG*・*msyA* は高温での増殖を回復させた。それに対して*msyB* は*secY100* 変異には全く抑制効果がないという”allele 特異性”を示す。高温感受性*secA51* 変異に対しては3つのクローンはいずれも効果が無い。*secB* 変異として*secB7* 変異とトランスポゾンによる挿入変異*secB::Tn5* の両株を選び、分泌レベルでの抑制効果を検証した (*secB* は増殖必須遺伝子ではない) が、OmpAのプロセッシングにはpN01575Hを保持する菌と有意の差はみられない(データは省略)。分泌関連遺伝子の変異とは異なった機構で分泌阻害を示すと考えられるMalE-LacZ融合タンパク質の合成誘導による増殖阻害⁸⁹⁾にも回復はみられない。

以上の結果は表3にまとめた。*msyA* と*htpG* については*secY* ミスセンス変異(質的变化)にのみ効果があり、*msyB* はその中でも*secY24* 変異を特異的に抑制することが明らかとなった。

表3 分泌欠損変異に対する
msyA・*msyB*・*htpG* の効果
表示してある各変異株の増殖・分泌能の回復を調べた。
+印は抑制活性がある場合。
-は無の場合。
^a--マルトース感受性を調べた。
N.T.--Not Tested

	Suppression						
	Ts				<i>secB7</i>	<i>secB::Tn5</i>	<i>malE-lacZ</i> ^{a)}
	<i>secY24</i>	<i>secY100</i>	<i>rp10215</i>	<i>secA51</i>			
<i>msyA</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>msyB</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>htpG</i>	+	+	N.T.	-	-	-	-

第3節 *secA51* 変異に対するマルチコピーサプレッサーの単離

Van Dykらの報告³⁷⁾によれば、熱ショックタンパク質GroEL・GroESの過剰生産が*secA51* 変異と*secY24* 変異を抑制できる。しかし我々のマルチコピーサプレッサーの探索からは*groELS* のクローンは選択できなかった（位置が未確定の6クローンの制限酵素地図は、既に塩基配列が決定されている*groELS* のものとは明らかに違う）。この結果が使用した染色体DNAライブラリーの作成方法によるものであるのかを検証するため、Van Dykらの報告にある*secA51* 変異株に同じ選択方法を適用してみた。高温感受性変異*secA51* を持つMM52株を前回用いたのと同じの染色体DNAライブラリーで形質転換し、28個の抑制効果を持つクローンを得た。制限酵素地図の作製から、このうち独立なクローンは13個であり、7クローンは*secA* 自身の遺伝子を、6クローンは*groELS* を含んでいることがわかった。この結果から*secY24* 変異のマルチコピーサプレッサーの選択に*groELS* 遺伝子が含まれていないことは、単なる実験上の問題と言うよりは、GroEがVan Dykらの報告したような抑制活性を*secY24* に対しては持たない、または活性が非常に低いのではないかという疑いが生じる。実際、*groELS* のみをクローン化したプラスミドpNRK267はMM52株に導入した場合には高温での増殖を顕著に回復させたが、IQ85株に導入した場合には*msyA,B* 程の増殖良化は観察できなかった（表2）。

第4節 *msyA* 遺伝子の同定・塩基配列の決定

msyA をコードするDNA領域を決定するため、独立なクローンpMSY5,6,12を選び、DNA断片のサブクローニングを行なった。これらのプラスミドの抑制活性をIQ85株の高温での増殖能を見ることで調べると、*SaII-EcoRI*約2kbのDNA断片上に*msyA* が存在することがわかった（図19）。

ところが、塩基配列決定のためにこの領域をプラスミドpUC119上にクローニングしようとしたが、deletionが入りやすく、安定なプラスミドを構築できなかった。*msyA* の分離に用いたプラスミドに比べ、pUC119は細胞内のコピー数が10倍以上に上昇してい

る⁷⁰⁾。このDNA領域のコピー数をある限度以上に増加させると細胞にとって致命的なのであろう。pUC119より低いコピー数で増殖し、塩基配列決定のための single strand DNA (ssDNA) をファージM13に組み込んで調製できるプラスミド (pKY184と命名) を新たに構築し、再度クローニングを試みた。pKY184はpN01575と同じpBR322由来のレプリコンを持つが、マルチクローニングサイトと ssDNA の調製に必要なDNA断片 (IG領域) がpUC119由来のプラスミドである。プラスミドとしてのコピー数が低いにもかかわらず、pUC119とほとんど変わらぬ量の ssDNA を調製できる (データは省略)。ベクター pKY184に *msyA* を含む2.9kbの *Sa*II断片を挿入し、組み換えプラスミド pKY185と pKY186を得た (図19)。両プラスミド上で、ExonucleaseIIIを用いたクローン化DNA断片の系統的な deletion プラスミドを作製し、塩基配列決定のための鋳型 ssDNA を調製した。

2.9kbのDNA断片のうち、*msyA* を含む領域については、SequenaseTM ⁷¹⁾を用いた dideoxy chain termination 法⁷²⁾によって1993bpの塩基配列を決定した。また1ヶ所については合成プライマーを作成して塩基配列の決定に役立てた。この領域内にはプロモーターと典型的な ρ -非依存性ターミネーターを備えた2つの転写単位が、互いに向き合う形で並んでいる。大腸菌の連関地図上で時計回りに転写される転写単位にはDNA塩基配列から33キロダルトン (kd) のタンパク質をコードし得る open reading frame (ORF) が、反時計回りに転写されるものには14.5kdのタンパク質をコードするORFがそれぞれ単独に含まれている (図20A,B, 21A)。33kdタンパク質の配列は荷電したアミノ酸残基に富み、カルボキシル末端側にはATP結合モチーフ (Gly/Ala-X-X-X-X-Gly-Lys-Ser/Thr) ⁷³⁾が存在する (図21B; 波線部)。タンパク質およびDNA塩基配列データベースを検索しても、33kdタンパク質と有意にホモロジーのある配列は見いだせなかった。これに対して14.5kdタンパク質のアミノ酸配列は、大腸菌の中性ヒストン様タンパク質として既に知られていたH-NSタンパク質と一致した。H-NSをコードする遺伝子 *hns* は、以前大腸菌染色体上9.1分に存在すると報告され、DNA塩基配列も発表されている⁷⁴⁾。我々の決定した塩基配列はORF内で3ヶ所の塩基の違いがみられるが、アミノ酸配列には影響しない。なお、*msyA* 塩基配列決定中に他のグループが独立に27.5分の領域にH-NSの遺伝子があることを報告しており (塩基配列自体は未発表)、やはりH-NS構造遺伝子内にアミノ酸残基を変えない3つの塩基の違いがあることを述べている⁷⁵⁾。

```

30      40      50      60
CTGCAGAATGAGCAAACGATAACCGGGGCTAAATTTGCA
-10
90      100     110     120
TGGTACTATCGTCGCCATTTCGTATAAGTAATTGTCTTAA

150     160     170     180
TCAGAACTTAGCCCCTTCGGGGTCTGATATACTGGGAT

210     220     230     240
GTTCAAAACACGAACAGTCCAGGAGAATTTAAATGGCTG
SD MetAlaA

270     280     290     300
AAGCCGTTATCCCGTTGCGGGATTAGGAACCAGGATGT
ysAlaValIleProValAlaGlyLeuGlyThrArgMetL

330     340     350     360
CGAAAGAGATGCTGCCACTTGTGCGATAAGCCATTAATTC
roLysGluMetLeuProLeuValAspLysProLeuIleG

390     400     410     420
TTGCGGCTGGCATTACTGAAATTGTGCTGGTTACACACT
leAlaAlaGlyIleThrGluIleValLeuValThrHisS

450     460     470     480
ACCACTTTGATACCAGTTTTGAACTGGAAGCAATGCTGG
snHisPheAspThrSerPheGluLeuGluAlaMetLeuG

510     520     530     540
TGCTTGATGAAGTGCAGTCTATTTGTCCACCGCAGTGA
euLeuAspGluValGlnSerIleCysProProHisValT

570     580     590     600
GTCTGGCGAAAGGCCTGGGACACGGGTATTGTGTGCTC
lyLeuAlaLysGlyLeuGlyHisAlaValLeuCysAlaH

630     640     650     660
CGGTAGCTGTTATTTGCTGATGTTATTCTGGATGAAT
roValAlaValIleLeuProAspValIleLeuAspGluT

690     700     710     720
ATAACCTGGCAGAGATGATCCGCCGCTTTGATGAAACGG
spAsnLeuAlaGluMetIleArgArgPheAspGluThrG

750     760     770     780
AACCGTTGCTGATGTGACCGCATATGGCGTTGTGGATT
luProValAlaAspValThrAlaTyrGlyValValAspC

810     820     830     840
CGGGTGAAGCGTACCGATCGTTGGTGTGGTAGAAAAAC
roGlyGluSerValProMetValGlyValValGluLysP

870     880     890     900
CTAATCTCGCTATTGTGGGTCGTTACGTACTIONTAGCGGG
erAsnLeuAlaIleValGlyArgTyrValLeuSerAlaA

930     940     950     960
AAACCCCTCCGGGAGCTGGTGATGAAATTCAGCTCACCG
ysThrProProGlyAlaGlyAspGluIleGlnLeuThra

990     1000    1010    1020
AAAAAGAAACGGTGGAAAGCCTATCATATGAAAGGAAGA
luLysGluThrValGluAlaTyrHisMetLysGlyLysS
~~~~~~
1050     1060    1070    1080
TAGGTTACATGCAGGCCTTCGTTGAATACGGTATTTCGTC
euGlyTyrMetGlnAlaPheValGluTyrGlyIleArgH

1110     1120    1130    1140
TTAAAGCCTGGCTTGAAGAAGAGATGGGCATTAAGAAGT
heLysAlaTrpLeuGluGluGluMetGlyIleLysLys*

1170     1180    1190    1200
CACGAAACGGCGTTGAGCAATCGACGCCGTTTTTTTATA

1230     1240    1250
TTAAACCGGACAATAAAAAATCCCGCCGC

```

図20 *msyA* 領域の塩基配列

A; H-NSをコードする領域

B; "33kd"タンパク質をコードする領域

推定されるアミノ酸配列は塩基配列の下に表示した。プロモーター配列(-35, -10)・主な制限酵素切断部位は図中に示してある。向かい合う矢印は inverted repeat を表わす。Bの図で波線部はこのタンパク質のATP結合モチーフを示す(本文参照)。

A

```

10      20      30      40      50      60
GAATTCTCGTAAACACAATAACAGAAAGACTGAAGGTCGTCAGCCTACGATAATCTCC
EcoRI
70      80      90      100     110     120
CCATAAAATGTGACATGAATCAGGAAGTTTTAACCTCACGTGCTGCGAAATCATCGGTGT
130     140     150     160     170     180
AAATAGGGCTATATGCCGCGTCTTTTCTGGCTAATTTTATGAAAAGATATTTATTGGCGG
190     200     210     220     230     240
CACAAAATAAAGAAACAATTTTGAATTCCTTACATTCTGGCTATTGCACAACCTGAATTTA
EcoRI
250     260     270     280     290     300
AGGCTCTATTATTACCTCAACAAACCACCCCAATATAAGTTTGAGATTACTACAATGAGC
-10      SD      MetSer
310     320     330     340     350     360
GAAGCACTTAAATTTCTGAACAACATCCGTACTCTTCGTGCGCAGGCAAGAGAATGTACA
GluAlaLeuLysIleLeuAsnAsnIleArgThrLeuArgAlaGlnAlaArgGluCysThr
370     380     390     400     410     420
CTTGAAACGCTGGAAGAAATGCTGGAAAAATTAGAAGTTGTTGTTAACGAACGTCGCGAA
LeuGluThrLeuGluGluMetLeuGluLysLeuGluValValAsnGluArgArgGlu
430     440     450     460     470     480
GAAGAAAAGCGCGCTGCTGCTGAAGTTGAAGAGCGCACTCGTAAACTGCAGCAATATCGC
GluGluSerAlaAlaAlaAlaGluValGluGluArgThrArgLysLeuGlnGlnTyrArg
490     500     510     520     530     540
GAAATGCTGATCGCTGACGGTATTGACCCGAACGAACGCTGAATAGCCTTGCTGCCGTT
GluMetLeuIleAlaAspGlyIleAspProAsnGluLeuLeuAsnSerLeuAlaAlaVal
550     560     570     580     590     600
AAATCTGGCACAAAGCTAAACGTGCTCAGCGTCCGGCAAAATATAGCTACGTTGACGAA
LysSerGlyThrLysAlaLysArgAlaGlnArgProAlaLysTyrSerTyrValAspGlu
610     620     630     640     650     660
AACGGCGAAAATAAAACCTGGACTGGCCAAGGCCGCTACTCCAGCTGTAATCAAAAAAGCA
AsnGlyGluThrLysThrTrpThrGlyGlnGlyArgThrProAlaValIleLysLysAla
670     680     690     700     710     720
ATGGATGAGCAAGGTAATCCCTCGACGATTTCTGATCAAGCAATAATCTTTTGTAGAT
MetAspGluGlnGlyLysSerLeuAspAspPheLeuIleLysGln***
730     740     750     760     770     780
TGCACCTTGCTTAAATCCCGCCAGCGGGGGATTTTTATTGTCCGGTTAAGACAATTT
790     800
AATAAGAATAAGCTATAAAA

```

B

```

10      20      30      40      50      60
GTCCGACTGCGCTTGATGTTGTCTGCAGAATGAGCAAACGATAACGGGGCTAAATTTGCA
Sall
70      80      90      100     110     120
TTACCTGCTAATGTCGGCTGGTGGTACTATCGTCGCCATTTCGTATAAGTAATTGTCTTAA
130     140     150     160     170     180
TTATGCTAACTCGCCTCCTTTTTCAGAACTTAGCCCTTCGGGGTGTGATATACTGGGAT
190     200     210     220     230     240
GCGATACAGAAATATGAACACGTTCAAAAACACGAACAGTCCAGGAGAATTTAAATGGCTG
SD      MetAlaA
250     260     270     280     290     300
CCATTAATACGAAAAGTCAAAAAAGCCGTTATCCCGTTGCGGGATTAGGAACCAGGATGT
IleIleAsnThrLysValLysLysAlaValIleProValAlaGlyLeuGlyThrArgMetL
310     320     330     340     350     360
TGCCGGCGACGAAAGCCATCCCGAAAGAGATGCTGCCACTTGTGATAAGCCATTAATTC
euProAlaThrLysAlaIleProLysGluMetLeuProLysValAspLysProLeuIleG
370     380     390     400     410     420
AAATACGTCGTGAATGAATGTTGCGGCTGGCATTACTGAAATTTGTGCTGGTTACACACT
IleTyrValValAsnGluCysIleAlaAlaGlyIleThrGluIleValLeuValThrHisS
430     440     450     460     470     480
CATCTAAAACTCTATTGAAAACCACTTTGATACCAGTTTTGAACTGGAAGCAATGCTGG
erSerLysAsnSerIleGluAsnHisPheAspThrSerPheGluLeuGluAlaMetLeuG
490     500     510     520     530     540
AAAAACGTGTAACCGTCAACTGCTTGTGATGAAGTGCAGTCTATTTGTCCACCGCACGTA
luLysArgValLysArgGlnLeuLeuAspGluValGlnSerIleCysProProHisValT
550     560     570     580     590     600
CTATTATGCAAGTTCGTCAGGGTCTGGCGAAAGCCCTGGGACACGCGGTATTGTGTGCTC
hrIleMetGlnValArgGlnGlyLeuAlaLysGlyLeuGlyHisAlaValLeuCysAlaH
610     620     630     640     650     660
ACCCGGTAGTGGGTGATGAACCGGTAGCTGTTATTTTGCCTGATGTTATTCTGGATGAAT
isProValValGlyAspGluProValAlaValIleLeuProAspValIleLeuAspGluT
670     680     690     700     710     720
ATGAATCCGATTTGTACAGGATAACCTGGCAGAGATGATCCCGCCTTTGATGAAACGG
yrGluSerAspLeuSerGlnAspAsnLeuAlaGluMetIleArgArgPheAspGluThrG
730     740     750     760     770     780
GTCATAGCCAGATCATGGTTGAACCGGTTGCTGATGTGACCCCATATGGCGTTGTGGATT
lyHisSerGlnIleMetValGluProValAlaAspValThrAlaTyrGlyValValAspC
790     800     810     820     830     840
GCAAAGCGTTGATTAAGCCCGGGTGAAGCGTACCGATGGTGGTGGTAGAAAAAC
ysLysGlyValGluLeuAlaProGlyGluSerValProMetValGlyValValGluLysP
850     860     870     880     890     900
CGAAAGCGGATGTTGCGCGCTAATCTCGCTATTGTGGGTCGTTACGTTACGTTAGCGCGG
roLysAlaAspValAlaProSerAsnLeuAlaIleValGlyArgTyrValLeuSerAlaA
910     920     930     940     950     960
ATATTTGGCCGTTGCTGGCAAAAACCCCTCCGGGAGCTGGTGAATTCAGCTCACCG
spIleTrpProLeuLeuAlaLysThrProProGlyAlaGlyAspGluIleGlnLeuThrA
970     980     990     1000    1010    1020
ACGCAATTGATATGCTGATCGAAAAAGAAACGGTGAAGCCTATCATATGAAAGGGAAGA
spAlaIleAspMetLeuIleGluLysGluThrValGluAlaTyrHisMetLysGlyLysS
1030    1040    1050    1060    1070    1080
GCCATGACTGCGGTAATAAATTAGGTTACATGCAAGCCCTTCGTTGAATACGGTATTTCGTC
erHisAspCysGlyAsnLysLeuGlyTyrMetGlnAlaPheValGluTyrGlyIleArgH
1090    1100    1110    1120    1130    1140
ATAACACCCCTGGCACGGAATTTAAAGCCTGGCTTGAAGAAGAGATGGGCATTAAGAAGT
isAsnThrLeuGlyThrGluPheLysAlaTrpLeuGluGluMetGlyIleLysLys*
1150    1160    1170    1180    1190    1200
AACATCCGATCCGGTGTATCCACGAAACGGCGTTGAGCAATCGACCGGTTTTTTTATA
**
1210    1220    1230    1240    1250
GCTTATTCTTATTAATTTGTCTTAAACCGGACAATAAAAAATCCCGCCCG

```

図20 *msyA* 領域の塩基配列

A; H-NSをコードする領域

B; "33kd"タンパク質をコードする領域

推定されるアミノ酸配列は塩基配列の下に表示した。プロモーター配列(-35, -10)・主な制限酵素切断部位は図中に示してある。向かい合う矢印は inverted repeat を表わす。Bの図で波線部はこのタンパク質のATP結合モチーフを示す(本文参照)。

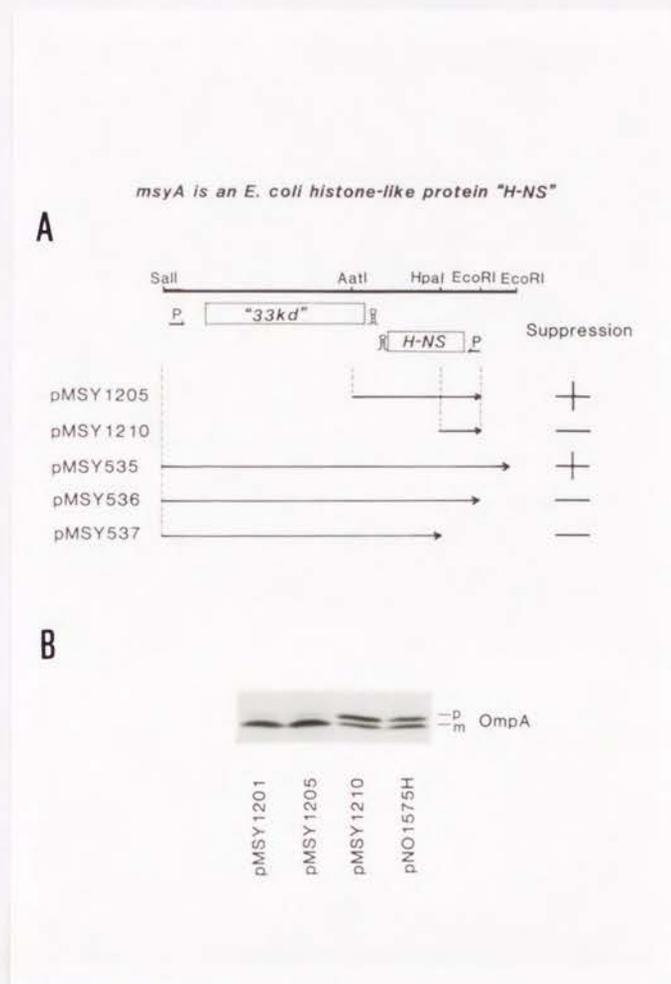


図 2 1 *msyA* をコードする ORF の決定

A; サブクローニングしたプラスミドの抑制活性

P は各転写単位のプロモーターを、stem and loop の記号は ρ -非依存性ターミネーターを表わす。各プラスミドの抑制活性の有無を図の右に表示した。

B; OmpA のプロセッシング

各プラスミドを保持した IQ85 (*secY24*) 株を 30°C で培養後、42°C に温度シフトしてから 2 時間後に 2 分間のパルスラベルを行なった。標識されたタンパク質は抗 OmpA 抗血清を用いた抗体沈澱後、SDS-PAGE・オートラジオグラフィで分析した。

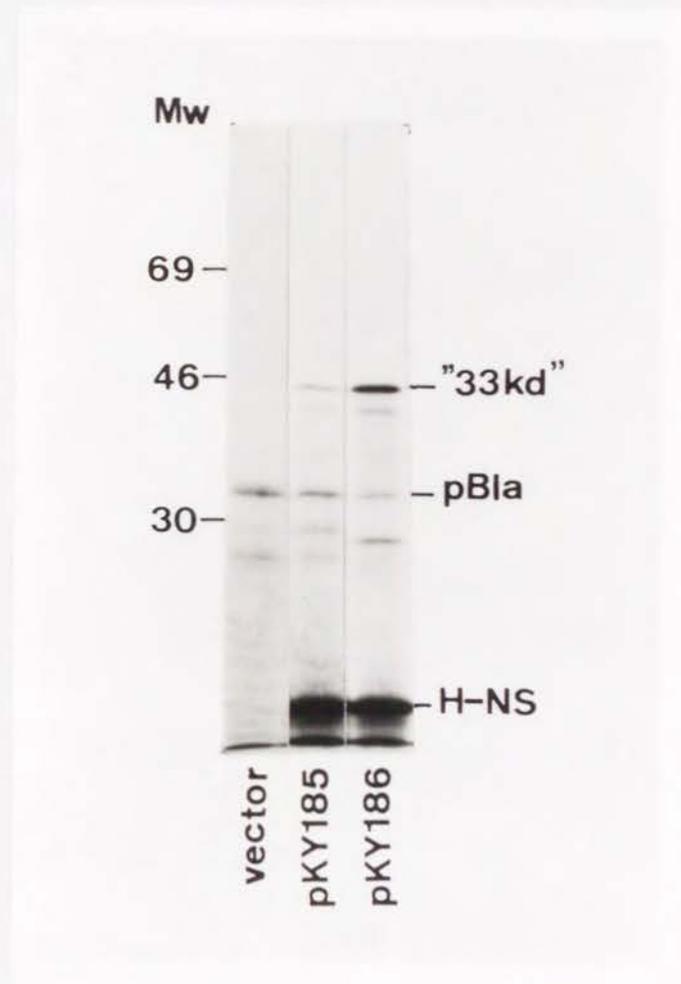


図22 *msyA* 領域を持つプラスミドを用いた *in vitro* タンパク質合成

pKY185・pKY186 (図19参照)・ベクターpKY184のDNA 1μ gをAmersham社の *in vitro* 発現キットを用いて転写・翻訳させた。タンパク質は $[^{35}\text{S}]$ メチオニンを用いて標識し、15% acrylamide-0.12% bis-13.5mM NaCl 濃度のSDS-PAGE・オートラジオグラフィで検出した。pBlaは、ベクター由来のBla前駆体タンパク質を表わす。

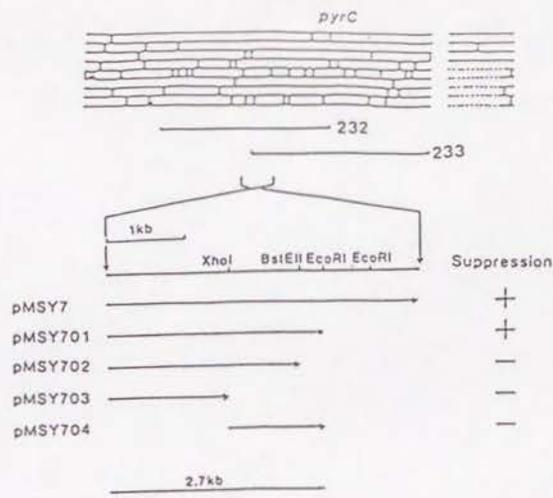
以上の2つのORFが実際にタンパク質に翻訳されることを、*in vitro* 転写・翻訳系を用いて確認した。pKY185・pKY186を鋳型として転写・翻訳させると、ベクター由来のBla前駆体の他に約45kdと約15kdのバンドが確認できる(図22)。15kdのバンドはH-NSの分子量によく一致するが、45kdの方は予想される分子量33kdよりもかなり移動度が小さい(見かけの分子量が大きい)。またこのバンドの移動度は使用するゲル濃度によっても変化し、10%Laemmligelでは約40kdの移動度を示す(データは省略)。この移動度の異常は、33kdタンパク質が荷電したアミノ酸残基に富むことによると考えられる(後述)。pKY185に比べてpKY186の場合の方が翻訳量が多いことは、pKY186ではベクター上の*lac* プロモーターからの転写の流れ込みと33kdタンパク質の転写方向が一致している事実とよく符合する。これらのバンドは2つのORFからの翻訳産物であると考えてよい。

次に33kdタンパク質とH-NSのどちらが*msyA* であるのかを検証した。プラスミドpMSY1205はH-NSのみを持つプラスミドで、IQ85株の高温での増殖・分泌能を抑制できるのに対し、H-NSのカルボキシル末端側を削除すると抑制活性は失われる(図21A,B)。また塩基配列決定のために作製したpMSY535・536・537の抑制活性を調べると、pMSY535のみがIQ85株の高温での増殖を回復させた(図21A)。これらのプラスミドはいずれも33kdタンパク質を正常に持つが、pMSY536・537ではH-NSのプロモーターを欠いているか(pMSY536)、構造遺伝子のアミノ末端まで欠いている(pMSY537)。以上の結果から、*msyA* はH-NSの遺伝子であることが結論できる。

第5節 *msyB* 遺伝子の同定・塩基配列の決定

msyB をコードするDNA領域を決定するため、3.3kbのDNA断片をサブクローニングし、*Sau3AI-EcoRI*の約2.7kbに増殖レベルでの抑制活性があることを確かめた(図23A)。この領域が大腸菌染色体上23分に位置することを確認するため、*XhoI-BstEII*約0.8kbのDNA断片をプローブとしてKohara整列ファージクローンとのフィルターハイブリダイゼーションを行なったところ、この位置をカバーするファージクローン232と233でのみ

A



B

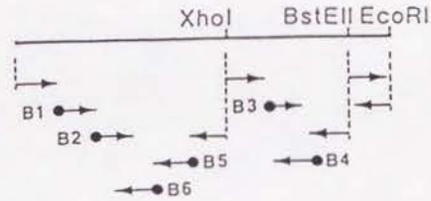


図 2 3 *msyB* 領域の決定

A; サブクローニングした各プラスミドが持つDNA領域を矢印の長さで表わす。矢印の向きはベクター由来の *lac* プロモーターの転写方向を示す。各プラスミドの抑制活性を右に表示した。Koharaらによる染色体制限酵素地図の下に示した太い線は、該当部分のDNAを保持する整列ファージクローンである。

B; sequencing strategy

●印は合成プライマーを、矢印の向きはsequencing 反応の向きを表わす。

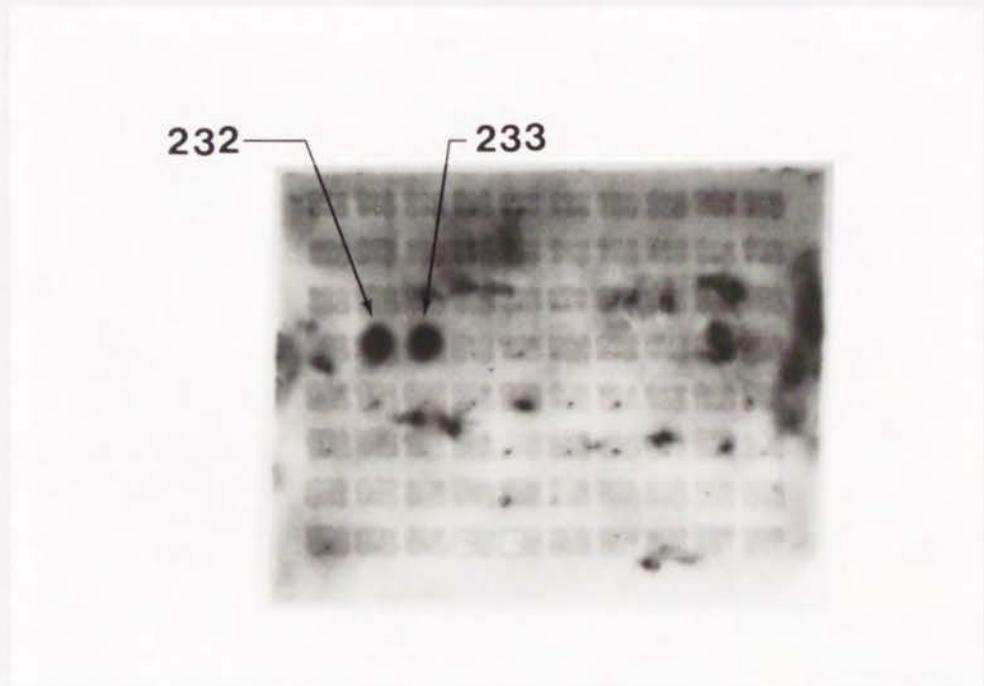


図 2 4 Kohara整列ファージクローンを用いたフィルターハイブリダイゼーション
XhoI-*BstEII*約0.8kbのDNA (図 2 3 参照) をプローブとしてフィルターハイブリダイゼーションを行なった (方法については第 3 章に詳述)。

陽性のシグナルが検出された（図23Aと図24）。この2.7kbのDNA断片をpKY184に再クローニングして、サブクローニングと合成プライマーを用いて塩基配列を決定した（sequencing strategyは図23B）。その結果、この領域から2つの完全なORFと、それらの5'側上流に不完全なORF（カルボキシル末端側に相当）が見い出された（図25）。2つの完全なORF（5'側から順番にORF1, ORF2と命名した）の上流にはプロモーター様の配列が、下流には ρ -非依存性ターミネーターとなり得る配列が存在するため、これらはオペロン構造をとっているものと考えられる。ORF1と不完全ORFとの間には2ヶ所に inverted repeat が存在する。ORF1はアミノ酸残基数408（分子量44kd）の疎水性の強いタンパク質をコードし、このタンパク質はハイドロパシー解析（Kyte-Doolittleの方法⁷⁶）による）・膜貫通部位の検索（Klein-Kanehisaのプログラム⁷⁷）による）から、10ヶ所の膜貫通部位を持つ内膜タンパク質であることが予測できる（図26）。ただし正の電荷を持つアミノ酸残基が膜の内側に来るようにモデルを考えると⁷⁸）、10ヶ所の内の2ヶ所は実際には膜貫通部位としては機能していない可能性がある。タンパク質データベースの検索では、ORF1は大腸菌のトランスポゾンTn10やプラスミドpBR322由来のテトラサイクリン耐性遺伝子産物とホモロジーを示す。ORF2はアミノ酸残基数124（分子量14kd）のうち、グルタミン酸が24、アスパラギン酸が14も含まれるのに対し、塩基性残基（リジン・アルギニン）は合計5個と、強い酸性タンパク質をコードする。不完全ORFとORF2はともにデータベースの検索からは有意にホモロジーのあるタンパク質は見い出せなかった。これらのORFの転写方向は、pMSY7上ではベクター側の *lac* プロモーターの方向と一致している。

msyB がORF1とORF2のどちらであるかを検証するため、様々なサブクローニングを行い、IQ85株の増殖と分泌欠損の抑制活性を調べた。両ORFを正常に持ちながらもターミネーター配列を欠いたプラスミドpMSY702は抑制活性がなく、オペロン下流の構造が重要であることを示唆する（図27）。正常レベルの発現量を保つためには下流領域の存在が必要である例は、幾つかの遺伝子で知られている⁷⁹⁻⁸¹）。さらにORF1とORF2を単独に持つどのプラスミドでも増殖レベルでの抑制活性は見い出せず、ORF1とORF2の両方が必要ではないかという疑いが出てきた。ところがこれらの形質転換株の分泌能を調べると、増殖レベルでは抑制活性がみられなかったものの中に、顕著に分泌能が回復してい

1350 1360 1370 1380
 ATCGAATCGGACCCGAAAAGATCCTGATTACAGCGCTG
 pArgIleGlyProGluLysIleLeuIleThrAlaLeu
 1410 1420 1430 1440
 TCCCAATGTCTTACGTTACAGACGCCATTGCAACTGGG
 leProMetSerTyrValGlnThrProLeuGlnLeuGly
 1470 1480 1490 1500
 CCGCCGATGGTGCACACTACTCCCCGCCGTACAGACACTG
 laAlaAspGlyAlaLeuLeuProAlaValGlnThrLeu
 1530 1540 1550 1560
 AGATCGCCGGCGTATCTTCAGCTATAACCAATCGTTT
 InIleAlaGlyArgIlePheSerTyrAsnGlnSerPhe
 1590 1600 1610 1620
 GACCAATTGATGGGAGCAGCGATTTTCAGCGAACTACGGT
 lyProLeuMetGlyAlaAlaIleSerAlaAsnTyrGly
 1650 1660 1670 1680
 CCGCTGGCGTAGTGTATTCAACGCAGTCTATTCAATGG
 hrAlaGlyValValLeuPheAsnAlaValTyrSerTrp
 1710 1720 1730 1740
 FACCCAGGTATCGAACTGATTTTTTCGCCTTTCATACT
 leProGlnValSerAsn***
 1770 1780 1790 1800
 TCCTTTTCCCTGAAACCTCATCAACTCAAAGGGAGAAT
 1830 1840 1850 1860
 CTTGAAGAAGCCATTGACGCTGCACGCGAAGAATTTCT
 LeuGluGluAlaIleAspAlaAlaArgGluGluPheLe
 1890 1900 1910 1920
 GCCGAAGATGCGAATGTGCAACAGTTCAATGCCCAAAA
 AlaGluAspAlaAsnValGlnGlnPheAsnAlaGlnLy
 1950 1960 1970 1980
 ATCATGTGGCAAGTTGAGTTTTTTCGCCGACGAAGGGGA
 IleMetTrpGlnValGluPhePheAlaAspGluGlyGI
 2010 2020 2030 2040
 CTTAGCGGTGAAGCCGCGCAAAGTGTTTTTGATGGCGA
 LeuSerGlyGluAlaAlaGlnSerValPheAspGlyAs
 2070 2080 2090 2100
 CAGGAGTGGCAGGAAGAGAATACATTACATGAATGGGA
 GlnGluTrpGlnGluGluAsnThrLeuHisGluTrpAs
 2130 2140 2150 2160
 CCACCGCTGGATACCGAGGAAGGACGCGCAGCAGCTGA
 ProProLeuAspThrGluGluGlyArgAlaAlaAlaAs
 2190 2200 2210 2220
 CTCATACGGGCCATGATGAATGTCGATCGGCAGCAGTA
 2250 2260 2270 2280
 TGGCAGATCAAGGATCGTGACATAACGCCAGGCGGAGT
 2310 2320 2330 2340
 GGGATAATATTGGTTGCCATGCCCTGCCCGGTATAG
 2370 2380 2390 2400
 GCCACTCAGCAAGGTCACCATGATGCTCACCACAATTA
 2430 2440 2450 2460
 TAAAAAATACCGGCATAACGCCGGTATTTTTATTGGC
 BstEII
 2490 2500 2510 2520
 CGTGAACGCCTTATCCGACCCACAAAGTCTTGCAAAAT
 2550 2560 2570 2580
 AGGCCTGATAAGCGTAGCGCATCAGGCAACTACGTTTTT
 2610 2620 2630 2640
 TACGCAATGCCAGTGGATTGAGCTTTATCCCTTCGTAA
 2670
 TCTCCGGGAATTC
 EcoRI

図 25 *msyB* 領域の DNA塩基配列

プロモーター配列 (-35, -10) 主
 な制限酵素切断部位は図中に記した
 向かい合う矢印は inverted repeat
 を示す。不完全 ORF と ORF1・ORF2 の排
 定されるアミノ酸配列は塩基配列の
 に記してある。

10 20 30 40 50 60
 GATCATGATTACGGCCCGCTCAAGCGTTTTTCGTCGCCGTTGTTTGGCGTTGAGCAGGCT
 AspHisAspTyrGlyProArgSerSerValPheValProLeuPheAlaValGluGlnAla

70 80 90 100 110 120
 GCGACCACGACCGGAACCTGGATGCTGGCAGGATGTCCGGCCGATGTCTGGTGCCCTTC
 AlaThrThrThrGlyThrTrpMetLeuAlaArgMetSerGlyAlaCysLeuValProPhe

130 140 150 160 170 180
 GTTCCACGCGTAAGCCAGATGGCAAAGGGTATCAATTGATTATGCTGCCCGCAGAGTGT
 ValProArgArgLysProAspGlyLysGlyTyrGlnLeuIleMetLeuProProGluCys

190 200 210 220 230 240
 TCTCCGCACTGGATGATGCCGAACTACCGCCGCGTGGATGAACAAAGTGGTCGAAAAA
 SerProProLeuAspAspAlaGluThrThrAlaAlaTrpMetAsnLysValValGluLys

250 260 270 280 290 300
 TGCATCATGATGGCACCAGAGCAGTATATGTGGTTACACCGTCCGCTTTAAACACGCCCC
 CysIleMetMetAlaProGluGlnTyrMetTrpLeuHisArgArgPheLysThrArgPro

310 320 330 340 350 360
 GAAGGCGTTCCTTACGCTATTAATCTCCCATGCCGGATGCTTCAAGATGGCATCCGGC
 GluGlyValProSerArgTyr***

370 380 390 400 410 420
 ATTACCACAGCAAATCCCCTGATTTAGCGATAAAAGCTCTCTGGATTCGCCCCCTGGAA
 -35
 AGTCGGCGCATAATAGTGTGCTTATCTTTCTTCTTATGTTCCACGCGCCTGGCGCAC

430 440 450 460 470 480
 -10 **ORF1**
 CAACAGCGGATTGCTATGTACCCTGTGAAAATGACACCCCTATAAACTGGAAACGAAAC
 SD MetSerProCysGluAsnAspThrProIleAsnTrpLysArgAsn

490 500 510 520 530 540
 CTGATCGTCCGCTGGCTAGGCTGTTTCTTACCGGTGCCGCTTCACTGGTAATGCC
 LeuIleValAlaTrpLeuGlyCysPheLeuThrGlyAlaAlaPheSerLeuValMetPro

550 560 570 580 590 600
 TTCTTACCCCTCTACGTTGAGCAGCTTGGCGTTACCGGTCACTCCGCCCTGAATATGG
 PheLeuProLeuTyrValGluGlnLeuGlyValThrGlyHisSerAlaLeuAsnMetTrp

610 620 630 640 650 660
 TCCGGTATTGTCTTACGATTACATTTTTATTTTCGGCCATCGCCTCACGTTTTGGGGT
 SerGlyIleValPheSerIleThrPheLeuPheSerAlaIleAlaSerProPheTrpGly

670 680 690 700 710 720
 GGACTCGCCGACCGTAAAGGCCGAAACTCATGCTATTACGCTCTGCCCTCGGCATGGGC
 GlyLeuAlaAspArgLysGlyArgLysLeuMetLeuLeuArgSerAlaLeuGlyMetGly

730 740 750 760 770 780
 ATCGTGATGGTGTGATGGGGTGGCACAATAATCTGGCAGTTTTTGATCCTGGCGGCG
 IleValMetValLeuMetGlyLeuAlaGlnAsnIleTrpGlnPheLeuIleLeuArgAla

790 800 810 820 830 840
 CTTCTGGGTTACTTGGCGGATTTGTCCCAACGCTAATGCTCTTATCGCCACACAAGTA
 LeuLeuGlyLeuLeuGlyGlyPheValProAsnAlaAsnAlaLeuIleAlaThrGlnVal

850 860 870 880 890 900
 CCGCGTAATAAAAGCGGCTGGCGCTGGGTACGCTCTCCACAGCGCGTTAGTGGTGGC
 ProArgAsnLysSerGlyTrpAlaLeuGlyThrLeuSerThrGlyGlyValSerGlyAla

910 920 930 940 950 960
 TTGCTCGGCCAATGGCTGGCGGCTGCTCGCCGATAGCTACGGCTTACGTCCGGTATTC
 LeuLeuGlyProMetAlaGlyGlyLeuLeuAlaAspSerTyrGlyLeuArgProValPhe

970 980 990 1000 1010 1020
 TTTATTACCGCCAGTGTGCTCATACTCTGCTTTTTTCGTCACCTGTTTTGCATCAGAGAA
 PheIleThrAlaSerValLeuIleLeuCysPhePheValThrLeuPheCysIleArgGlu

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 AAATTCAGCCGGTCAAGCAAAAAGAGATGCTGCACATGCGGGAAGTGGTGACATCACTT
 LysPheGlnProValSerLysLysGluMetLeuHisMetArgGluValValThrSerLeu

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 AAAAACCCGAACTGGTACTCAGCCTGTTGTCACTACGTTAATCATCCAGTGCGGACG
 LysAsnProLysLeuValLeuSerLeuPheValThrThrLeuIleIleGlnValAlaThr

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GGCTCAATTGCCCCATTCTGACGCTGTATGTCGGCAACTGGCGGTAACGTCAAGTAAAC
 GlySerIleAlaProIleLeuThrLeuTyrValArgGluLeuAlaGlyAsnValSerAsn

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GTCGCTTTATCAGTGGCATGATCGCCTCGGTGCCAGGCGTGGCGGCTCTGCTAAGTGCA
 ValAlaPheIleSerGlyMetIleAlaSerValProGlyValAlaAlaLeuLeuSerAla

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CCACGACTCGGCAAACTTGGCGATCGAATCGGACCCGAAAAGATCCTGATTACAGCGCTG
 ProArgLeuGlyLysLeuGlyAspArgIleGlyProGluLysIleLeuIleThrAlaLeu

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 ATCTTTCTGTACTGCTGTTGATCCCAATGTCTTACGTTACAGCCGCTTGCACCTTGGG
 IlePheSerValLeuLeuIleProMetSerTyrValGlnThrProLeuGlnLeuGly

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 ATTTTACGTTTTTGGCTCGGTCGCGGATGGTGCCTACTCCCGCGGTACAGACACTG
 IleLeuArgPheLeuLeuGlyAlaAlaAspGlyAlaLeuLeuProAlaValGlnThrLeu

1510 **XhoI** 1520 1530 1540 1550 1560
 TTGGTTTACAACCTCGAGCAACAGATCGCCGGCGTATCTTACAGTATAACCAATCGTTT
 LeuValTyrAsnSerSerAsnGlnIleAlaGlyArgIlePheSerTyrAsnGlnSerPhe

1570 1580 1590 1600 1610 1620
 CGTGATATTGGCAACGTTACCGGACCATGATGGGAGCAGCGATTTACGCGAACTACGGT
 ArgAspIleGlyAsnValThrGlyProLeuMetGlyAlaAlaIleSerAlaAsnTyrGly

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 TTCAGAGCGGTATTTCTCGTCACCGCTGGCGTAGTGTATTTCACGCACTTATTCATGG
 PheArgAlaValPheLeuValThrAlaGlyValValLeuPheAsnAlaValTyrSerTrp

1690 1700 1710 1720 1730 1740
 AACAGTCTACGTCGTCGAATACCCAGGTATCGAACTGATTTTTTCGCTTTCATACT
 AsnSerLeuArgArgArgArgIleProGlnValSerAsn***

1750 1760 1770 1780 1790 1800
 TGCAAAAGCGGAGAATCAGCTATCCTTTCCCTGAAACCTCATCAACTCAAAGGAGAAAT
ORF2 SD 1860
 CGTGATGACCATGTACCAACGCTTGAAGAAGCCATTGACGCTGCACCGGAAGAATTTCT
 MetThrMetTyrAlaThrLeuGluGluAlaIleAspAlaAlaArgGluGluPheLeu

1870 1880 1890 1900 1910 1920
 TGCAGACAACCCGGCATCGACCGCAAGATGCGAATGTGCAACAGTTCAATGCCAAAA
 uAlaAspAsnProGlyIleAspAlaGluAspAlaAsnValGlnGlnPheAsnAlaGlnLys

1930 1940 1950 1960 1970 1980
 ATACGTTTTGCGAGACGGGACATCATGTGGCAAGTTGAGTTTTTTCGCGACGAGGGGA
 sTyrValLeuGlnAspGlyAspIleMetTrpGlnValGluPhePheAlaAspGluGlyGln

1990 2000 2010 2020 2030 2040
 AGAAGGTGAATGTTTACCTATGCTTAGCGGTGAAGCCGCGCAAGTGTTTTTGATGGCGA
 uGluGlyGluCysLeuProMetLeuSerGlyGluAlaAlaGlnSerValPheAspGlyAs

2050 2060 2070 2080 2090 2100
 CTATGATGAGATAGAGATACGCCAGGAGTGGCAGGAAGAGAATACATTACATGAATGGGA
 pTyrAspGluIleGluIleArgGlnGluTrpGlnGluGluAsnThrLeuHisGluTrpAs

2110 2120 2130 2140 2150 2160
 CGAGGGGAATTTTACGCTTGGAGCACCCTGGATACCGAGGAAGGACCGCAGCAGTGA
 pGluGlyGluPheGlnLeuGluProProLeuAspThrGluGluGlyArgAlaAlaAlaAs

2170 2180 2190 2200 2210 2220
 TGAGTGGGATGAACGTTAATCACTCATACGGCCATGATGAATGTCGATCGGCAGCAGTA
 pGluTrpAspGluArg***

2230 2240 2250 2260 2270 2280
 AAGTATCAAAAACAGAGAGAATGGCAGATCAAGGATCGTGACATAACCCAGCGGAGT

2290 2300 2310 2320 2330 2340
 CACGCACATCCCATTGCACACCGGGATAATATTGGTTGCCATGCCCTGCCCGGTATAG

2350 2360 2370 2380 2390 2400
 TGGGACTAATAATGCTGCCACAGCCACTCAGCAAGGTCACCATGATGCTCACCACAATTA

2410 2420 2430 **BstEII** 2450 2460
 AACGCATTTGATACCTCTTTTCGTAATAAAATACCGGCATAACCGCGGTATTTTATTGGC

2470 2480 2490 2500 2510 2520
 TCGTTGTTTTTGGCGGATGCGGCGTGAACGCTTATCCGACCCAAAAGTCTTGCAAAAT

2530 2540 2550 2560 2570 2580
 CAATAAATGCAGGAACGATGTAGCCCTGATAAGCGTAGGCGATCAGGCAACTACGTTTT

2590 2600 2610 2620 2630 2640
 TATTGCGAAGCCGCATCCGGTTTACGCAATGCCAGTGGATTGAGCTTTATCCCTTCGTAA

2650 2660 2670
 TAACTCACCCATGAAGAATATCTCTCCGGGAATTC
EcoRI

図 25 *msyB* 領域の DNA塩基配列
 プロモーター配列 (-35, -10) ・主
 な制限酵素切断部位は図中に記した。
 向かい合う矢印は inverted repeat
 を示す。不完全 ORF と ORF1・ORF2 の推
 定されるアミノ酸配列は塩基配列の下
 に記してある。

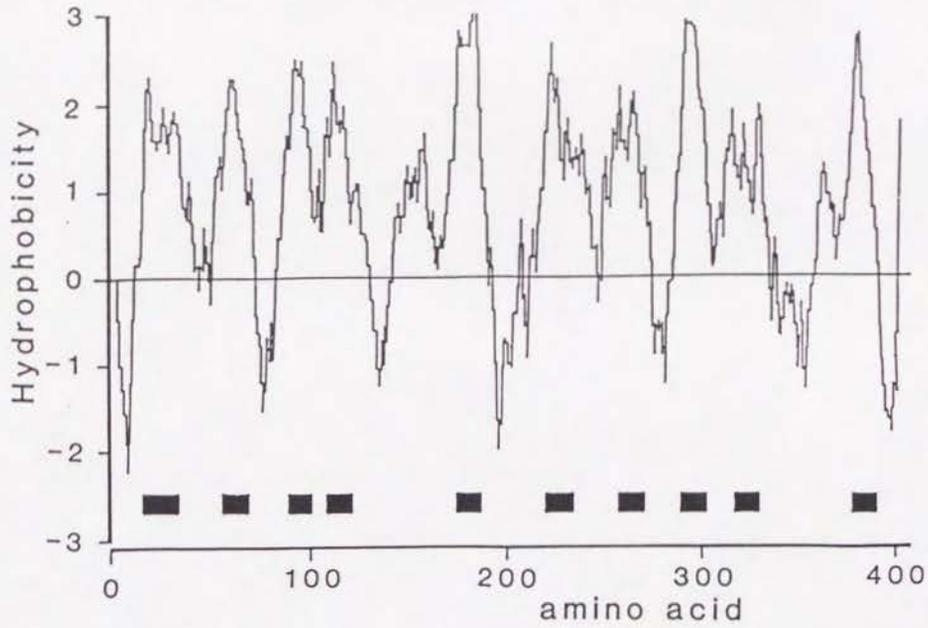


図 26 ORF1のハイドロバシープロファイル

ORF1のアミノ酸配列を Kyte-Doolittle の方法で解析した。図の下に示した黒い box は、Klein-Kanehisa のプログラムから膜貫通部位と推定された箇所である。

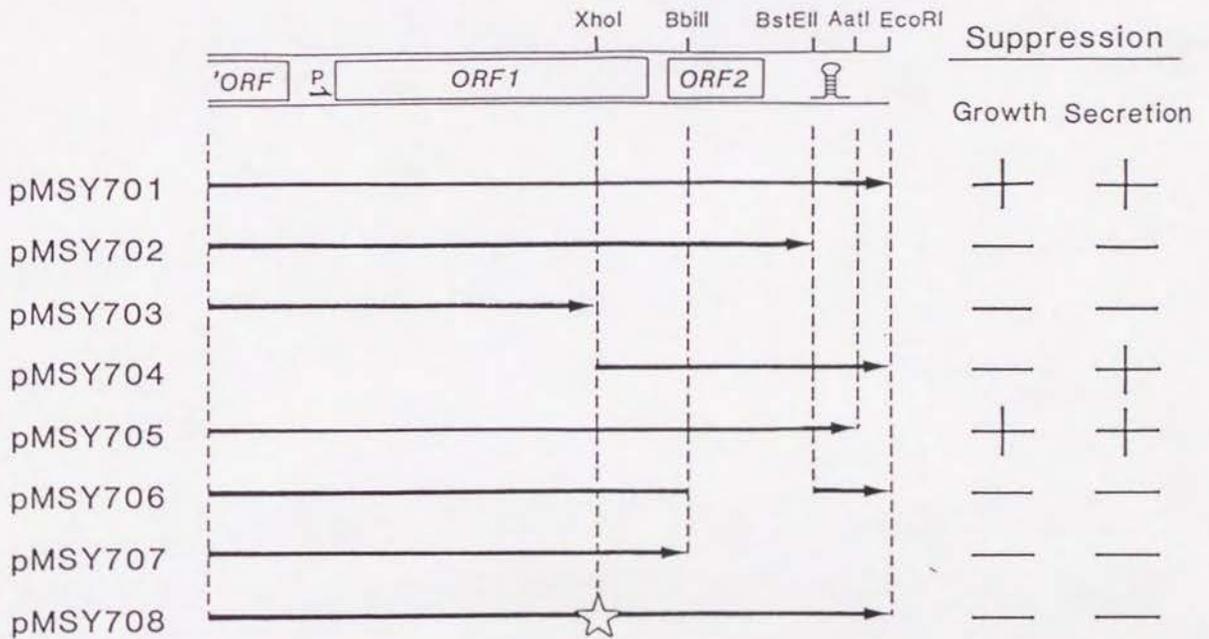


図 27 *msyB* をコードする ORF の決定

サブクローニングしたプラスミドが保持する DNA 領域を矢印の長さで表わした。図の右には各プラスミドの、増殖・分泌各レベルでの抑制活性の有無を表示した。矢印の向きは、ベクター由来の *lac* プロモーターからの転写方向を示す。pMSY708 中にある星印はフレームシフトを表わす。

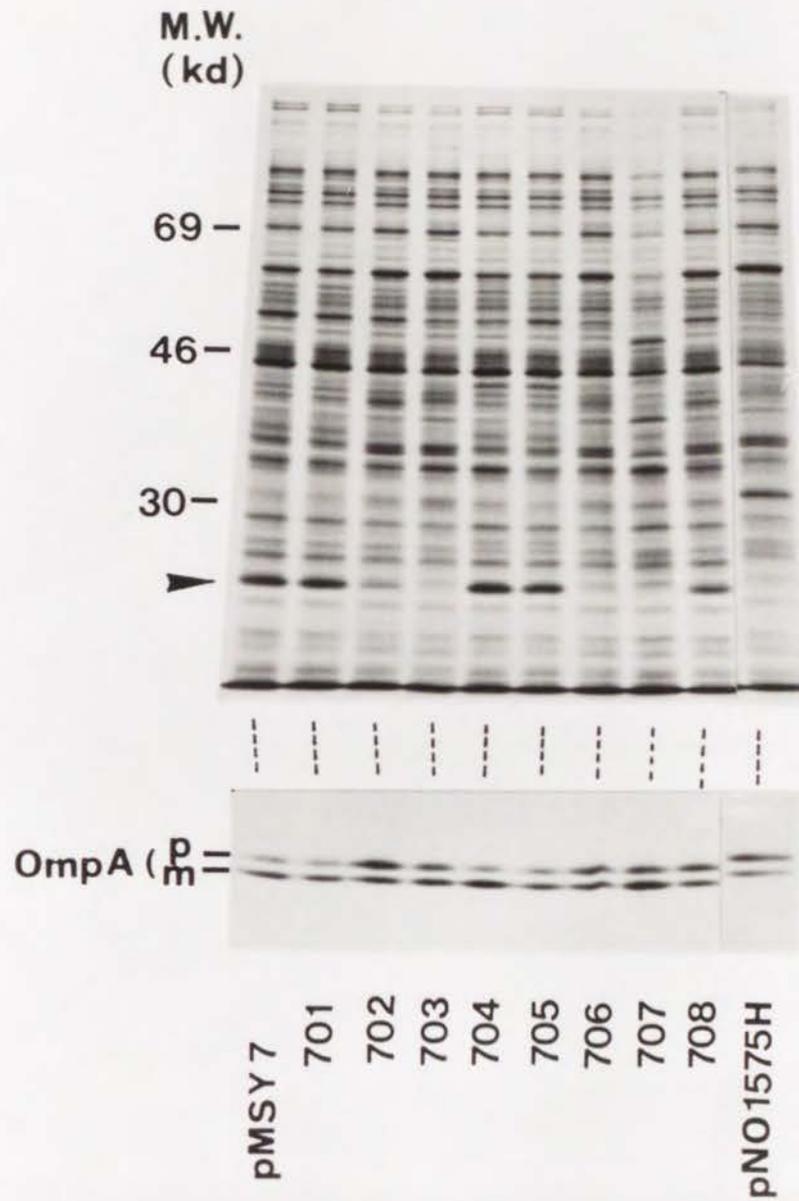


図28 *msyB* 領域のサブクローニングプラスミドによる *secY24* 変異の抑制活性

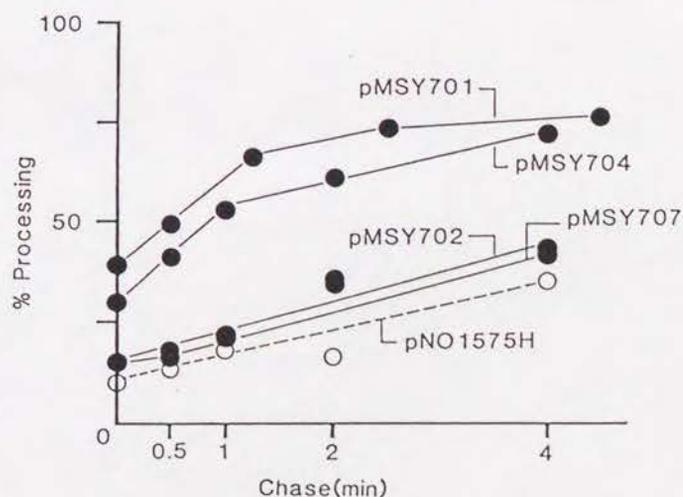
msyB 領域のDNAをサブクローニングしたプラスミドによるIQ85 (*secY24*) 株の形質転換株をグリセロール最小培地中にて30°Cで培養し、42°Cに温度シフト後2時間で2分間のパルスラベルを行なった。標識された全タンパク質のパターン(上のパネル)と抗体沈澱によるOmpAタンパク質(下のパネル)をSDS-PAGE・オートラジオグラフィーで検出した。上のパネル中の矢印は本文中の25kdタンパク質を表わす。

るものがあった。2分間のパルスラベルを行い、OmpAのプロセッシングを調べると、pMSY704によるIQ85形質転換株では前駆体の蓄積がpMSY701レベルに減少している（図28）。このプラスミドはORF2を正常に持ち、ORF1は大半を欠いている。ORF2を欠いたプラスミド（pMSY703・706・707）では分泌能の回復はみられない。さらに他の分泌タンパク質MBPのプロセッシングカイネティックスを調べても、同様の結果が得られた（図29）。以上の結果は *msyB* 遺伝子機能はORF2にコードされることを示している。ただしORF1内のカルボキシル末端側にフレームシフトを導入したプラスミドpMSY708は、ORF2を正常に持ちながらも抑制活性が低い。この理由については考察で議論する。

以上の解析に用いたプラスミドの形質転換株の全タンパク質パターンを見ると、ORF2を完全に持つpMSY7・701・702・704・705・708においては、約25kdに相当する分子量のバンドが現われている（図28；矢印）。ORF2の分子量はDNA塩基配列からの予測では14kdであり、これがORF2の産物であれば移動度が小さすぎる。しかしORF2がコードするタンパク質は酸性度が大きく、SDSの結合が悪いと考えれば説明可能であろう（後述）。pMSY702やpMSY708による形質転換株ではこのバンドが減少していることは ρ -非依存性ターミネーターを失ったためにメッセンジャーRNAが不安定化した（pMSY702）、ないしはフレームシフトによって上流のORF1の翻訳が途中で停止したことによる極性効果が起こった（pMSY708）と考えればうまく説明できる。pMSY708の場合、フレームシフトによってORF1の翻訳は通常よりも56アミノ酸短い段階で停止する。

図29 MBPのプロセッシング
カイネティックス

プラスミドpMSY701,702,704,707,pNO1575Hをそれぞれ保持したIQ85 (*secY24*) 株をグリセロール最小培地中にて30°Cで培養し、42°Cに温度シフト後2時間目に30秒間のパルスラベルとそれに引き続くチェイスを行なう。各サンプルは抗MBP抗血清を用いた抗体沈澱後、SDS-PAGE・オートラジオグラフィーで分析した。グラフはデンストメーターによる定量から算出したプロセッシングの割合をプロットしたものである。



第6節 熱ショックタンパク質HtpGの過剰生産によるサブプレッション

pMSY3はクローン化されたDNA断片中に *htpG* 遺伝子を含み、*htpG* の下流にはアデニル酸キナーゼの遺伝子 (*adk*) が続く (図30)⁶⁶⁾。*htpG* のみをサブクローニングしたプラスミド pMSY301を構築し、その抑制活性を調べた。pMSY301はpMSY3と異なり、*htpG* の転写方向がベクター上の *lac* プロモーターの転写方向と一致している。pMSY301は、グルコースを炭素源としたM9最小培地上でIQ85株の増殖を良好させるが、炭素源をグリセロールに変更すると生育が悪化する (表4)。またグリセロール培地での増殖阻害は野生株においても見られる。この結果から、1) *htpG* が *secY24* のマルチコピーサブプレッサーであること。2) *htpG* 自身のプロモーター (熱ショックプロモーター) に加え、*lac* プロモーターからも発現を誘導すると、細胞増殖に悪影響を与えること、が示唆される。

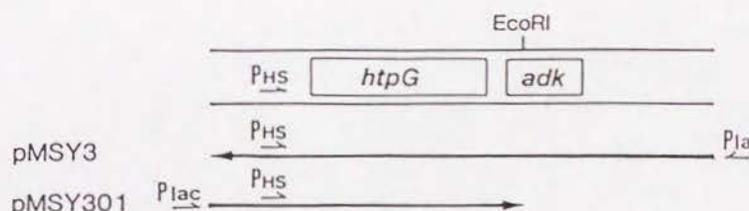
表4 *htpG* を持つプラスミドによるIQ85株の増殖回復

プラスミド	30°C	42°C		
	L	M9Glu	M9Gly	L
pMSY3	++++	+	+	+
pMSY301	++++	+	-	±
pN01575H	++++	-	-	(-) ^a

^a----つぶれたようなコロニー

図30 *htpG* 領域の遺伝子構成

とプラスミド pMSY3, 301の構成
各プラスミドが保持するDNA領域を矢印の長さで表わす。P_{lac} は *lac* プロモーターを、P_{HS} は *htpG* の熱ショックプロモーターを示し、矢印の向きは転写の向きに一致している。



ついて分泌レベルでの抑制活性がみられるかどうかを検証した。pMSY3ないしはpMSY301を保持するIQ85株を温度シフト後2時間目に2分間のパルスラベルを行い、全タンパク質のパターンとOmpAのプロセッシングを調べた。全タンパク質のパターンを見ると、pMSY301ではHtpGの発現が炭素源に応じて上昇している（図3 1；全タンパク質のパターン；レーン3,4）。pMSY3でも同様にHtpGの発現量が増しているが、pMSY301程ではない。またpMSY301では前駆体OmpA量が減少しており、特にグリセロールを炭素源とした場合に著しい（OmpA抗体沈澱のパターン；レーン3,4）。明らかにHtpGの発現量と分泌能の回復の間には正の相関がみられる。

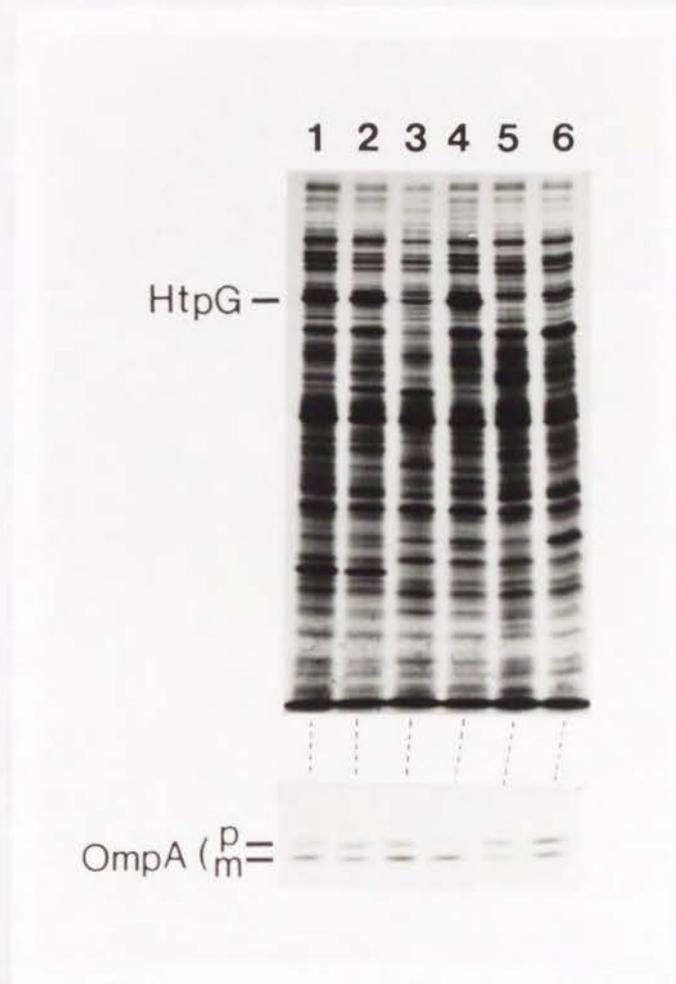


図 3 1 HtpGの過剰生産による *secY24* 変異株の分泌活性の影響

pMSY3 (レーン1,2), pMSY301 (レーン3,4), pNO1575H (レーン5,6) をそれぞれ保持した IQ85 (*secY24*) 株を、グルコース最小培地 (奇数レーン) ないしはグリセロール最小培地 (偶数レーン) にて 30°C で培養し、42°C に温度シフト後 2 時間目に 2 分間のパルスラベルを行なった。標識された全タンパク質 (上のパネル) ないしは抗体沈澱による OmpA タンパク質のパターン (下のパネル) を示す。HtpG タンパク質・前駆体 (p) および成熟体 (m) OmpA の位置は図中に表示した。

考察

第1節 H-NSによる *secY* 変異の抑制機構

msyA 遺伝子は大腸菌中性ヒストン様タンパク質H-NSをコードする事が明かとなった。H-NSは初め、大腸菌の染色体DNAと強く結合し、クロマチン構造を構成するタンパク質として同定された⁸²⁻⁸⁵⁾。この一年間、H-NSに関する遺伝学的・生化学的解析の結果報告があいつぎ、このタンパク質が大腸菌のグローバルな遺伝子発現制御に関与する可能性が示唆されている。以前から大腸菌染色体上27.5分には、*bgly*⁸⁶⁾・*cur*⁸⁷⁾・*pilG*⁸⁸⁾・*osmZ*⁸⁹⁾・*virR*⁹⁰⁾ 等の変異が位置づけられてきた。例えば *bgly* 変異は、 β -グルコシド代謝に関する遺伝子群の発現を誘導する変異（大腸菌K-12野生株では通常この遺伝子群は転写されない）⁸⁶⁾として、*osmZ* 変異は、*proU* 遺伝子の発現に係る変異⁸⁹⁾として同定されたものである。本研究遂行中、Uhlinらのグループはこうした変異に加えて、大腸菌 *pap* オペロン（繊毛遺伝子オペロン）の温度依存的発現がこの位置に起こった変異 *drdX* によって影響を受けること、さらに塩基配列レベルでの解析から *drdX* はH-NSをコードする遺伝子に生じた変異であることを明らかにした⁷⁵⁾。彼らは *drdX* 変異株が *bgly* 変異と同じ表現型（ β -グルコシドを炭素源として利用できる）を示すことを述べ、H-NSタンパク質が遺伝子の発現を抑制する”サイレンサー”機能を持っているという解釈を下している。*osmZ* 変異に対してもこれがH-NSの遺伝子であることが最近報告されている^{91,92)}。*osmZ* 変異の場合には、*proU* 遺伝子の発現が上昇するだけでなく、外膜タンパク質OmpFの発現は逆に低下しており⁸⁹⁾、H-NSの機能阻害に伴う”サイレンサー”機能の消失といった単純な解釈では不十分である。Higginsらは *osmZ* 変異株ではDNAの負の超らせんの量が増加していることから、H-NSタンパク質がDNAのトポロジーを調節することで遺伝子の発現を制御しているという解釈を行なっている⁹¹⁾。こうした遺伝学的解析とは別に、H-NSが湾曲DNA（curved DNA ないしは bent DNA）に対して特異的に結合できるとの報告⁹³⁾がなされた。DNAの特異的な配列に起因する湾曲

構造は遺伝子発現の制御領域にしばしば見いだされ、転写レベルでの発現調節に関与する例^{94,95)}が知られている。以上の報告は、H-NSタンパク質が何らかの機構で転写活性を制御し得る因子であることを示唆している。

ではH-NSプラスミドによる *secY* 変異の抑制機構はどのようなものだと考えられるだろうか。一般論として、マルチコピーサプレッサーによる抑制機構の可能性としては、1) *SecY*を必要としない分泌のバイパスルートを形成する、2) 濃度上昇により変異 *SecY*との物理的相互作用を回復する、3) 変異 *SecY*タンパク質の機能安定化を図る、4) タンパク質合成レートを低下させることで分泌活性を見かけ上回復させる、等が考えられる。*msyA* の抑制活性は *secY* ミスセンス変異に限られているので、*msyA* の抑制には *SecY*タンパク質自体が必要である、すなわち1)の可能性は考えにくいことがわかる。またH-NSがDNA結合タンパク質であることから、これが *SecY*と直接相互作用する可能性は低い。また変異株の成長速度に遅れはみられないことから、4)の可能性はないだろう。最近のH-NSに関する報告から考えて、*msyA* は他の遺伝子産物、例えば *SecY*と直接相互作用するタンパク質や、シャペロン機能を持つタンパク質の発現を変化させることで、間接的に抑制を行なっているのではないかと考えられる。またH-NSの増加が遺伝子発現の抑止の方向に働く場合には、分泌を抑制的に制御している因子の発現を抑える可能性も考えられる。

当初H-NSの遺伝子 *hns* は、染色体上9.1分に位置すると報告された⁷⁴⁾が、我々の選択では27.5分の領域からしか *msyA* は分離できなかった。*drdX* 変異・*osmZ* 変異も同様に27.5分に位置づけられている。H-NS遺伝子が複数ある可能性もないではないが、おそらく最初のマップ位置は間違っているであろう。

第2節 *msyB* の抑制機構

msyB は分子量14kdの強酸性タンパク質をコードすると考えられる。*msyB* の抑制活性は *secY24* 変異に限って見られる。2種の *secY* ミスセンス変異のうち、*secY24* 変異は4

番目の細胞質側ドメインに1ヶ所⁶⁴⁾、*secY100* 変異は膜貫通領域とペリプラズムドメインに3ヶ所位置づけられている⁶⁷⁾ (図32)。*msyB* が示す”allele 特異性”から、*MsyB*タンパク質が*SecY*の細胞質側ドメインと物理的相互作用を行なうことが考えられる。*SecY*の細胞質側ドメインには正に荷電したアミノ酸残基が多くみられ、強い酸性タンパク質である*MsyB*との相互作用は考え易いだろう。このように、過剰生産された*MsyB*タンパク質が*SecY*と直接相互作用する可能性が考えられるが、*MsyB*自身分泌に関与するものであるのかはさらに追究する必要があるだろう。

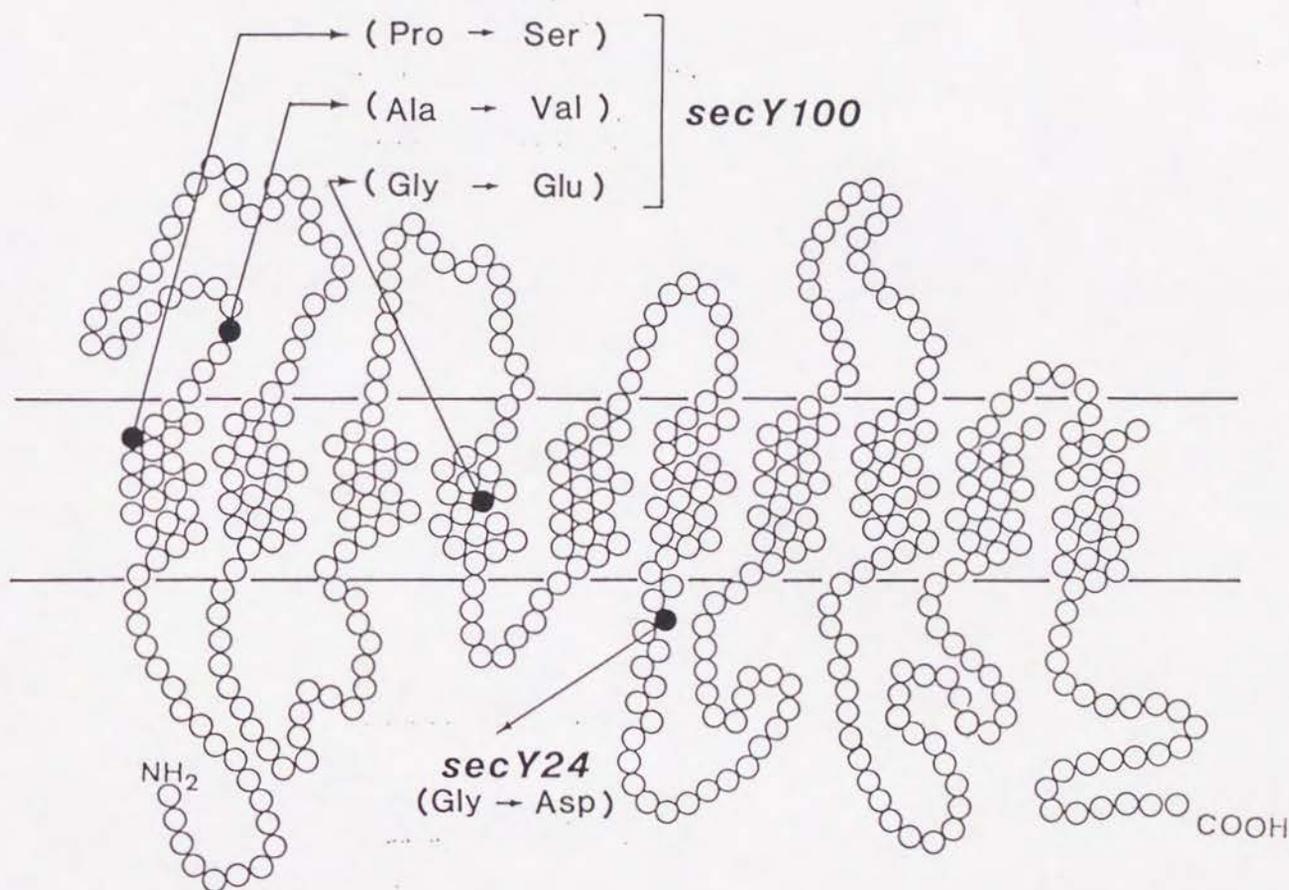


図32 *SecY*タンパク質の膜配向モデルと突然変異の位置

msyB の抑制活性は、ORF2産物が十分に供給された場合に限って発揮されるのではないと思われる。 ρ -非依存性ターミネーターの削除した場合 (pMSY702) や、上流遺伝子の翻訳が途中で停止する場合 (pMSY708) に抑制活性が消失するのは、ORF2の発現がいずれの場合においても低下するためと考えれば矛盾なく説明できる。またpMSY7の抑制活性は培地へのグルコースの添加によって消失したが、ベクター上の *lac* プロモーターからの転写が誘導されない場合には、十分量のMsyBタンパク質が供給されないと考えれば辻つまは合う。また以下で述べるようにSDS-PAGE上で検出される約25kdのタンパク質がMsyBタンパク質であるとすれば、pMSY702やpMSY708でこのバンドが減少している事実と符合する。

我々はSDS-PAGEで検出された約25kdのバンドが *msyB* 遺伝子産物であろうと推定した。この移動度は塩基配列から推定される分子量よりもかなり大きい。この移動度の異常は *msyA* に隣合う "33kd" タンパク質についても観察された。両方のタンパク質について共通する性質は、荷電したアミノ酸残基に富むということである。電荷に富むタンパク質へのSDSの結合は悪いであろうと予想される。実際、FtsYタンパク質において酸性アミノ酸残基に富む領域がSDS-PAGE上では移動度が極端に遅くなり、見かけ上2倍以上の分子量を与えることが報告されている⁹⁶⁾。

第3節 熱ショックタンパク質の過剰生産による抑制

熱ショックタンパク質GroEは、他のタンパク質の正しいフォールディングや分子集合を促進する機能 (シャペロン機能) を持つと考えられている⁹⁷⁾。GroEの過剰生産によって大腸菌やサルモネラ菌の様々な種類の温度感受性・低温感受性変異が抑制されること報告されている³⁷⁾が、この結果はGroEが変異タンパク質の高次構造を回復させたことによると解釈されている。GroEのマルチコピーサプレッションは分泌欠損変異 *secA51* に対しても観察されるが、この場合SecAタンパク質自身の高次構造か、SecAと他の分泌関連因子間の相互作用がGroEによって正常に回復していると考えられる。Van Dyk らはGroE過剰生産によって *secY24* 変異も抑制されると報告した³⁷⁾が、実際にはその抑制効

果は低く、*secA51* 変異の場合と同列に論じることはできない。

我々の *secY24* 変異に対するマルチコピーサブレッサーの選択では、*groELS* のクローンは分離されないかわりに、他の熱ショックタンパク質として知られる HtpG をコードするクローンが得られた。HtpG は真核生物の Hsp90 ファミリーの大腸菌ホモログとして同定されたタンパク質で、二量体構造をとることがわかっている⁹⁸⁾。細胞内の機能については、真核生物での研究において Hsp90 がステロイドホルモンレセプター・アクチンフィラメントと結合して、ホルモンのない条件下ではレセプターを細胞質にとどめておく機能があることが知られてきた⁹⁹⁾が、大腸菌の場合はあまり情報が無い。*htpG* 遺伝子は増殖必須遺伝子ではなく、欠失変異株が作成されている。この株は野生型に比べて生育が若干悪く、生育限界温度の上限が野生型より 1°C ばかり低いことが報告されているに過ぎない¹⁰⁰⁾。また我々が *htpG* 欠失変異株を用いて調べたところ、分泌活性自体は正常であった（データは省略）。

HtpG の *secY24* 変異に対する抑制機構は GroE の *secA51* 変異に対する場合と同じように考えられるかもしれない。もし HtpG が GroE 同様のシャペロン機能を持つとすれば、SecA に対しては GroE が、SecY に対しては HtpG が働くという特異性の違いがあるのかも知れない。

第 4 節 マルチコピーサブレッサーに対する評価

secY24 変異に対してはすでに Shiba らによって、8 種類の遺伝子外抑制変異 *ssyA-H* のシリーズが分離されている^{31,32)}。これらのうち、*ssyF*・*G* はそれぞれリボソームタンパク質 S1・翻訳開始因子 IF2 に起こった変異であることが証明されている^{32,33)}。また *ssyE* は *spc* オペロン内のリボソームタンパク質の変異である可能性が高い³²⁾。また *secA51* 変異に対して分離された遺伝子外抑制変異の中にもリボソームタンパク質 S15 に起こったもの (*secC*)²⁸⁾、同 L34 に起こったもの (*ssaF*)³⁰⁾ など、タンパク質合成系の変異が目立つ。これらの抑制機構についてはよくわからないことが多い。タンパク質合成阻害剤を用いた場合、*secA51* 変異の分泌欠損表現型が見かけ上抑制される例⁴⁶⁾

と同様に解釈する考えもある。*secY24* 変異に対する抑制変異 *ssyF* や *ssyG* は *secA51* 変異に対しても部分的な抑制効果を発揮し³²⁾、*secY* 変異に対して特異的というわけでもない。即断することはできないが、これら遺伝子外抑制変異によるサブプレッションは、タンパク質間の鍵と鍵穴式の相互作用を前提とした「古典的な」抑制とは異なる機構によるものと考えられる。

我々が今回用いたマルチコピーサブプレッサーの単離によって、これまで分離されていた *secA51* 変異や *secY24* 変異に対する遺伝子外抑制変異とは全く異なる遺伝子を見いだすことができた。*secA51* 変異に対してはサブプレッサーとしては *groELS* 遺伝子が分離されたのみで、これは Van Dyk らの報告³⁷⁾と合致する。また他の遺伝子が見い出せないことは、この選択によってはタンパク質合成レートの低下といった形で抑制する遺伝子は分離できないことを示唆しているのではないだろうか。*secY24* 変異に対する選択では、*secY* 変異に特異的に働く (*msyB* は *secY24* 変異のみに) 遺伝子が単離できた。このうち *msyA* と *htpG* は増殖必須遺伝子ではないことがわかっている^{75,100)}。*ssy* 変異の単離では解析のし易さから高温感受性を抑制すると同時に低温感受性になるものが選ばれており、仮に *msyA* や *htpG* に遺伝子外抑制変異が起こり得るとしても見いだせなかったのであろう。

我々の現時点の解析結果では、マルチコピーサブプレッサーの単離が当初の目標—分泌関連遺伝子・シャペロン因子の解析—に対してどの程度の寄与をしたのかを判断することは難しい。*HtpG*は熱ショックタンパク質であるということから、*GroE*のようにシャペロン機能を持つのではないかと推測されるが、結論するには *HtpG*の働く他の例を探したり、*in vitro*での効果を調べる必要があるだろう。*msyA*はDNA結合タンパク質であることから、直接分泌経路にかかわる因子であるとは考えにくい。それに対し、*msyB*は抑制効果に”allele 特異性”が見られることから、*SecY*と直接相互作用する因子である可能性がある。*msyB*の機能に関してはさらに遺伝学的・生化学的解析を行なう必要がある。マルチコピーサブプレッサーを用いた解析としては、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*の小胞体からゴルジ体への膜小胞輸送に関する変異 *sec12*をマルチコピーで抑制する遺伝子 *SAR1*の例が存在する¹⁰¹⁾。*SAR1*遺伝子産物はそれ自体膜小胞輸送に関与する因子であることがわかっている。マルチコピーサブプレッサーの単離による解析

は、その遺伝子解析が容易であるという利点もあり、関連遺伝子の網羅という意味で遺伝子外抑制変異の分離と並んで用いられれば有効であり得る。作用機作についてはあらゆる可能性を考慮しなければならないことは変異解析一般についてあてはまることであるが、サプレッサーを用いた解析においては特に留意すべきである。

第3章 材料と方法

(第1部)

1) 使用した大腸菌株

一連の実験で用いた大腸菌株は、全てK-12株に由来する。遺伝型は表5にまとめた。CU171株は *uncA401 secY24* 二重変異株であり、ファージP1による形質導入法を用いて以下のようにして構築した。IQ85株を宿主として増殖させたP1vir ファージ溶液をAN120株に感染させ、25 μ g/mlのテトラサイクリンを含むL寒天培地上にまく。30°Cで保温し、出現したテトラサイクリン耐性形質導入コロニーのうち、42°Cで増殖の悪化する高温感受性のものを保存して使用した。

表5 使用した大腸菌株 (第2部で使用した株も含む)

株	遺伝型	文献
MC4100	F ⁻ <i>araD</i> Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL relA flbB deoC ptsF rbsR</i>	102)
W3110	F ⁻	our stock
MM52	MC4100 <i>secA51(Ts)</i>	103)
IQ85	MC4100 <i>zhd-33::Tn10 rpsE secY24(Ts)</i>	64)
KI330	MC4100 <i>zhd-33::Tn10 rpsE secY100(Ts)</i>	67)
KI200	MC4100 <i>zhd-33::Tn10 rpsE rp10215(am)</i> (ϕ 80 <i>sus2 psuIII^{ts6}</i>)	68)
CK1953	MC4100 <i>secB::Tn5</i>	56)
MM150	MC4100 <i>secB7 malt^c Tn10</i>	56)
AN120	<i>argE3 thi-1 str uncA401</i>	44)
CU171	AN120 <i>zhd-33::Tn10 rpsE secY24(Ts)</i>	This study
MM18	MC4100 (<i>malE-lacZ</i>)hyb72-47	104)
MV1184	<i>ara</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL thi</i> (ϕ 80 <i>lacZ^{AM15}</i>) Δ (<i>str- recA</i>)306::Tn10 /F' <i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ^{AM15}</i>	70)
KI262	Δ (<i>pro-lac</i>) <i>thi</i> /F' <i>lacI^q Z^{AM15} Y⁺ pro⁺</i>	Our stock
CU193	MC4100 <i>zba-315::Km^R</i>	This study
CU194	MC4100 <i>zba-315::Km^R Δ htpG1::lacZ⁺</i>	This study

2) 使用した培地、試薬

以下の組成の培地を用いた。なお、寒天培地の場合には寒天を1.2%になるよう加える。

最小培地 (M9培地) ¹⁰⁵⁾

Na ₂ HPO ₄	0.6%
KH ₂ PO ₄	0.3%
NaCl	0.05%
NH ₄ Cl	0.1%
MgSO ₄	1mM

この他にビタミンB₁を2 μ g/mlとなるように加える。炭素源としては0.5%のグリセロールを用い、MBPを誘導する際にはマルトースを0.5%となるように加えた。[³⁵S]メチオニンでのラベル実験の際にはメチオニンとシステインを除くアミノ酸を各20 μ g/ml加える。抗生物質を用いる際にはアンピシリン (明治製菓) を50 μ g/mlとなるように加えた。

P 培地

Polypeptone	2%
NaCl	0.5%

1M NaOH を加えてpHを7.4に調整する。

L 培地

Bacto tryptone (Difco Co.)	1%
Yeast Extract (Difco Co.)	0.5%
NaCl	0.5%

1M NaOH を加えてpH を7.4に調整する。テトラサイクリンは25 μ g/mlになるように加える。

2xYT培地

Bacto tryptone (Difco Co.)	1.6%
Yeast Extract (Difco Co.)	1%
NaCl	0.5%

1M NaOH を加えてpHを7.6に調整する。

使用した試薬は明示しない限りNacalai Tesque ・和光純薬各社のものを用いた。また制限酵素・DNA修飾酵素は宝酒造・東洋紡各社の製品を用いた。

3) 形質導入・形質転換

P1形質導入はMillerの方法¹⁰⁵⁾による。プラスミドによる大腸菌の形質転換にはRbCl法¹⁰⁶⁾を用いた。

4) パルス-チェイス・分画実験・抗体沈澱

大腸菌を30°CでM9最小培地中で培養する。MBP合成を誘導する場合、培地に0.5%のマルトースを加える。対数増殖期の培養液1.1mlを取り、20 μ Ciの³⁵S]メチオニンを加え、パルスラベルする。30秒後に非放射性のL-メチオニンを0.2mg/mlとなるように加え、チェイスを開始する。この際必要であればCCCPを50 μ M、ないしはNaN₃を3mMとなるように同時に加える。チェイス0, 0.5, 1, 2, 4分ごとに0.2mlの培養液を、砕いた氷のかけら・クロラムフェニコール(0.1mg/ml最終濃度)・CCCP(50 μ M)・NaN₃(3mM)を含むエッペンドルフチューブにサンプリングし、急冷すると同時に細胞の代謝等を停止させる。以後の操作は0-4°Cで行なう。

遠心(10,000xg; 4分)により細胞を集め、0.2mlの10mM Tris·Cl(pH8.0)緩衝液(0.1mg/mlのクロラムフェニコールと3mM NaN₃を含む)に懸濁する。再び遠心し、細胞を0.2mlの Spheroplasting buffer (20% sucrose, 30mM Tris·Cl(pH8.0), 0.1mg/mlクロラムフェニコール, 3mM NaN₃)に再懸濁する。1/10容量のリゾチーム(1mg/ml 0.1M EDTA(pH7.5)溶液)を加え、0°Cで30分置くことで細胞をスフェロプラスト化する。遠心(10,000xg; 10分)上澄み画分をペリプラズム分画として分離し、等量の10%トリクロロ酢酸(TCA)を加えてタンパク質を沈澱させる。遠心沈澱物はスフェロプラスト分画として、0.2mlの10mM Tris·Cl(pH8.0)緩衝液に懸濁後、同様にTCA沈澱させる。TCA沈澱物を遠心(10,000xg; 2分)によって集め、アセトン洗浄後(ペリプラズム分画の場合にはアセトン洗浄の前に5%TCAで一回洗う)、30 μ lの1%SDS-50mM Tris·Cl(pH8.0)-1mMEDTA溶液に懸濁し、100°Cで3分間煮沸することでタンパク質を可溶化させる。このタンパク質溶液に33倍量の Lubrol buffer (50mM Tris·Cl(pH8)-0.15M NaCl-0.1mM EDTA-0.1% Lubrol PX)を加え、遠心(10,000xg; 10分)で非特異的沈澱を除いた後、抗血清と混ぜて4°Cで一晩放置する。抗原-抗体複合体を Protein A を含む *Staphylococcus aureus* 死菌(The Enzyme Center, IgG-sorb)に吸着させて遠心で回収

し、洗浄の後に SDS sample buffer 中で3分間煮沸して、SDS-PAGE・オートラジオグラフィまたはフルオログラフィーによって分離・検出した。

5) トリプシン消化実験

M9最小培地で対数増殖させた大腸菌0.2mlを、 $5\mu\text{Ci}$ の $[^{35}\text{S}]$ メチオニンでパルスラベルする。細胞は前述の操作でスフェロプラスト化する。スフェロプラスト分画は遠心によって集め、0.6mlの Spheroplasting buffer (10mM MgCl_2 を含む) に再懸濁する。スフェロプラスト・ペリプラズム両分画を3等分し、トリプシン (bovine trypsin; Sigma Chemical Co., type III) を $100\mu\text{g/ml}$ となるように加え (トリプシン処理しない場合には同容量の 10mM Tris·Cl (pH8) を加える)、 0°C で1時間置く。反応後、soybean trypsin inhibitor (Sigma Chemical Co., $100\mu\text{g/ml}$)・phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; 1mM)・*p*-toluenesulfonyl-L-lysine chloromethylketone hydrochloride (TLCK; 3mM) をそれぞれ加えてトリプシンを失活させる。その後の抗体沈澱においてもPMSFとTLCKを共存させ、操作中のタンパク質の消化を防ぐ。トリプシン処理の際、必要な場合には非イオン性界面活性剤Triton X-100を1%濃度となるよう加える。

6) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGEはLaemmliの方法¹⁰⁷⁾とそれを改良したItoの方法^{69,108)}による。特に明示しない場合には10% Laemmli ゲルを用いてある。泳動終了後、ゲルを脱色液 (25% エタノール-10% 酢酸) に30分間浸し、乾燥してからX線フィルム (富士フィルム) をあててオートラジオグラムをとる。増感する場合、脱色液による固定後に脱イオン水に15分間浸し、1M サリチル酸ナトリウム水溶液に30分間浸して乾燥させ、フルオログラムをとる¹⁰⁹⁾。オートラジオグラム・フルオログラムの定量は Biomed laser scanning densitometer にかけて行なった。定量値のうち、前駆体タンパク質の値は成熟体に比べて余分に存在するメチオニン残基数を考慮して補正してある。

7) ホルムアルデヒドを用いたクロスリンク実験

M9最小培地で対数増殖させた大腸菌培養液1mlを50 μ Ciの [³⁵S]メチオニンで30秒間バルスラベルする。ラベル後すぐに、培養液をあらかじめ氷冷したエッペンドルフチューブに移し、クロラムフェニコール (0.1mg/ml) とNaN₃ (3mM) で代謝反応を止める。チエイスする場合は非放射性メチオニンを0.2mg/mlとなるように加え、10分間振とうした後、後にサンプリングする。遠心 (10,000xg; 1分) して細胞を集め、1mlの KPi buffer (10mM K₃PO₄ pH6.8) で洗浄後再び遠心 (同上) して1mlの KPi buffer に懸濁する。ホルムアルデヒド (33% formaldehyde) を1%となるように加え、0°Cで2時間置き、クロスリンクさせる。遠心して細胞を集め、1mlの KPi buffer で洗って残ったホルムアルデヒドを除き、20 μ lの10mM Tris·Cl (pH8) -5mM EDTA 緩衝液に懸濁する。1/10容量のリゾチーム溶液 (10mg/ml) を加えて3回 freeze-thaw を繰り返して細胞を破壊する。0°Cに30分間置いた後、8 μ lの10%SDS水溶液と52 μ lの10mM Tris·Cl(pH8)-5mM EDTA緩衝液を加え、37°Cで10分間保温してSDS処理を行なう。カウントを合わせた後、1mlの Lubrol buffer で希釈し、遠心上澄みを抗SecA抗血清と混ぜて抗体沈澱を行なう。抗体沈澱物は2等分し、SDS sample buffer 中で37°C・10分間の保温 (クロスリンクをはずさない場合) または100°Cで5分間煮沸 (クロスリンクをはずす場合) し、SDS-PAGEにかけ、フルオログラフィーで検出する。

8) プロリンの取り込み測定実験

M9最小培地で対数増殖させた大腸菌培養液1.1mlに、11 μ lの [³H]proline mixture (0.2 μ Ci/ μ l; 5mM proline 濃度) を加える。30秒後に様々な濃度の CCCPまたはNaN₃ (薬剤を加えない場合にはCCCPの溶媒である4.5 μ lのジメチルスルホキシド (DMSO)) を加えて0, 0.5, 1, 2, 4分後に0.2mlをサンプリングする。サンプルはあらかじめM9培地に浸しておいたニトロセルロースフィルター上にスポットし、アスピレーターで吸引して濾過する。フィルターをM9培地で2回洗浄し、乾燥後にシンチレーションカウンターで放射活性を測定する。

(第2部--第1部と重複するものは省略した)

1) 使用したプラスミド

使用したプラスミドのうち、pN01575・pN01575Hについては文献^{67,68)}を参照。pNRK267は楠川典子博士よりいただいた。この研究で作成したプラスミドについては作成方法を以下にまとめる。使用したプラスミドは全てアンピシリン耐性遺伝子を選択マーカーとして持つ。

i) 塩基配列決定に用いたプラスミド

pKY184; pUC119のマルチクローニングサイトとIG領域を含む980bpのHindIII-AatII断片を、pN01575のoriを含む3868bpHindIII-AatII断片とつないで作成した。

pKY185; *msyA* を含む約2.9kbSalI断片をpKY184のSalIサイトに挿入した。

pKY186; 同上。ただし挿入された方向が逆。

pKY187; *msyB* を含む約2.7kbHindIII (ベクター上のサイト) -EcoRI断片をT4DNA polymerase で平滑化し、8bpのBamHIリンカーDNA (東洋紡) を接続後、pKY184のBamHIサイトに挿入した。

pKY188; 同上。ただし挿入された方向が逆。

以上のプラスミドを元にしてサブクローニング・系統的なdeletionを行なうことで、塩基配列決定のためのプラスミドをさらに構築した。

msyA 塩基配列決定

pMSY511-524; pKY185をBamHIとKpnIで切断し、ExonucleaseIII処理を行なう。経時的にサンプリングして反応を止め、さらにMung Bean Nuclease 処理を行なう。T4DNA polymeraseで末端を平滑化して、self-ligationさせ、約200~300bp程度の間隔で一方向から短くなったクローンのシリーズを選び出す。

pMSY531-542; 同上。ただし初めの基質として、pKY186を用いる。

msyB 塩基配列決定

pMSY711; = pKY187

pMSY712; pKY187をBstEIIとEcoRIで切断し、T4DNA polymerase で末端平滑化後、self-ligation させる。

pMSY713; pKY187をXhoIとEcoRIで切断し、T4 DNA polymerase で末端部位を平滑にし、self-ligation させる。

pMSY721; = pKY188

pMSY722; pKY188をXhoIとEcoRIで切断し、T4 DNA polymerase 処理後、self-ligation させる。

pMSY723; pKY188をBstEIIとEcoRIで切断し、T4 DNA polymerase 処理後、self-ligation させる。

ii) *msyA* 領域の決定

pMSY501; pMSY5をEcoRIで処理し、self-ligation させた。

pMSY1201; pMSY12をEcoRIで処理し、self-ligation させた。

- pMSY1202 ; pMSY1201を *HindIII*と *EcoRV*で切断し、T4 DNA polymerase で末端を平滑にし、self-ligation させた。
- pMSY1203 ; pMSY1201を *HindIII*と *MluI*で切断後、T4 DNA polymerase で処理し、self-ligation させた。
- pMSY1204 ; pMSY1201を *BglIII*と *EcoRI*で切断し、T4 DNA polymerase 処理を行ない、self-ligation させた。
- pMSY1205 ; pMSY1201を *HindIII*と *AatI*で切断し、T4 DNA polymerase で末端を平滑にし、self-ligation させた。
- pMSY1210 ; pMSY1201を *HindIII*と *HpaI*で切断し、T4 DNA polymerase 処理し、self-ligation させた。
- pMSY606 ; pMSY6のうち、約2.9kbの *SaII*断片をpN01575の *SaII*サイトに挿入した。
- i i i) *msyB* 領域の決定
- pMSY701 ; pMSY7を *EcoRI*で処理し、self-ligation させた。
- pMSY702 ; pMSY701を *BstEII*と *EcoRI*で切断後、T4 DNA polymerase 処理を行い、self-ligation させた。
- pMSY703 ; pMSY701を *XhoI*と *EcoRI*で切断し、T4 DNA polymerase 処理を行ない、self-ligation させた。
- pMSY704 ; pMSY701を *HindIII*と *XhoI*で切断し、T4 DNA polymerase 処理を行ない、self-ligation させた。
- pMSY705 ; pMSY701を *AatI*と *EcoRI*で切断し、T4 DNA polymerase 処理を行ない、self-ligation させた。
- pMSY706 ; ORF1のカルボキシル末端からORF2のアミノ末端を含む455bpの *BbiIII*断片をpMSY701から調製し、T4 DNA polymerase で両端を平滑にする。これを *XhoI*で切断し、ORF2のアミノ末端を含む365bpのDNA断片を作成する。これを *XhoI*と *BstEII*で切断して末端平滑化したpMSY701に挿入する。
- pMSY707 ; 上記の365bpDNA断片を、*XhoI*と *EcoRI*で切断して末端平滑化したpMSY701に挿入する。
- pMSY708 ; pMSY701を *XhoI*で切断し、T4 DNA polymerase 処理してつなぐ。
- i v) *htpG* を持つプラスミド
- pMSY301 ; *htpG* を含む3.3kbの *EcoRI*断片をpMSY3から調製し、pN01575の *EcoRI*サイトに挿入した。

3) パルスラベル・パルス-チェイス実験

第1部に準じる。ただし標識された細胞はすぐに等量の10%TCAを加えてタンパク質を沈澱させる。

4) DNA塩基配列の決定

i) 鋳型 ssDNAの調製

プラスミドの宿主としてはMV1184株⁷⁰⁾を用いる。全ての培地には50 μ g/mlの

アンピシリンを加えておく。37°Cで対数増殖させた形質転換株を10mlの2xYT培地に植え継ぎ、1時間培養する。ヘルパーファージM13K07をm.o.i.が約10となるように加え、37°Cで30分間静置して感染させる。カナマイシン（明治製菓）を70 $\mu\text{g/ml}$ となるように加えて、さらに16時間培養を続ける（160rpmで回転振とう）。遠心操作で菌体を除き、上澄みに1.6mlの20% polyethylene glycol 6000(PEG)-2.5M NaClを加えて室温で15分静置し、ファージ粒子を沈澱させる。遠心によってファージ粒子を集め、PEG-NaCl水溶液に懸濁してエッペンドルフチューブに移し、再度遠心する。沈澱以外のPEGを十分に除き、300 μl のTE buffer に懸濁後、フェノール/クロロホルム処理を2回行なって水層を回収する。その後エタノール沈澱でssDNAを集める。

i i) 合成プライマー

msyA の塩基配列決定では1ヶ所、*msyB* の場合には6ヶ所で合成プライマーを用いた。いずれも Applied Biosystems 社のDNAシンセサイザーを用いて合成を行った。合成プライマーの配列は以下の通り。

msyA; A1 5'-CGTGCCAAGGGTGTAT-3'
msyB; B1 5'-TGAACAAAGTGGTCGAA-3'
B2 5'-CAACAGCGGATTGCTAT-3'
B3 5'-CATACTTGCAAAAGCGG-3'
B4 5'-AGCTGCTGCGCCTT-3'
B5 5'-GCACCGAGGCGATCATG-3'
B6 5'-CTGGCGGTAATAAAGAA-3'

i i i) Sequencing

塩基配列の決定は Sequenase Ver. 2.0 (United states Biochemical Co.) を用いた dideoxy chain termination 法⁷²⁾ によって行なった。ラベルは [³²P] dCTP (400Ci/mmol; New England Nuclear) で行なった。

5) *in vitro* 転写・翻訳実験

DeVrie-Zubayの方法¹¹⁰⁾によるDNA発現キット (Amersham) を用いて行なった。

5) フィルターハイブリダイゼーション

プローブDNAの標識は random primer labeling kit (宝酒造) によって行なった。プレハイブリダイゼーション (25mlの 5xSSPE-5xDenhardt's solution-0.5%SDS溶液中に 20 μ g/mlの 超音波破碎・熱変性させた salmon sperm DNA(Sigma Chemical Co.,TypeIII)を含む; 65°Cで1時間振とう) を行なった Kohara 整列ファージクローンフィルター (宝酒造) に標識したプローブDNAを加え、65°Cで12時間ゆっくりと振とうする。Stringent washing は以下の要領で行なった。まず室温で10分間 2xSSPE-0.1%SDS溶液中での振とうを2回行い、つづいて65°Cで15分間 1xSSPE-0.1%SDS溶液中での振とうを行なう。最後に65°Cで0.1xSSPE-0.1%SDS溶液中での振とうを2回行なった後、フィルターをサララップにくるんでX線フィルムに感光させ、オートラジオグラムをとる。

第 4 章 文 献

- 1) Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975) *J. Cell. Biol.* 67, 835-851
- 2) Walter, P., and Blobel, G. (1982) *Nature* 299 691-698
- 3) Meyer, D. I., Krause, E., and Dobberstein, B. (1982) *Nature* 297, 647-650
- 4) Gilmore, R., Walter, P., and Blobel, G. (1982) *J. Cell. Biol.* 95, 470-477
- 5) Ito, K., Mandel, G., and Wickner, W. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 1199-1203
- 6) Joseffson, L.-G., and Landall, L. L. (1981) *Cell* 25, 151-157
- 7) Koshland, D., and Botstein, D. (1982) *Cell* 30, 893-902
- 8) Rothblatt, J. A., and Meyer, D. I. (1986) *Cell* 44, 619-628
- 9) Hansen, W., Garcia, P. D., and Walter, P. (1986) *Cell* 45, 397-406
- 10) Waters, M. G., and Blobel, G. (1986) *J. Cell. Biol.* 102, 1543-1550
- 11) Lolle, S. J., and Bussey, H. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6, 4274-4280
- 12) Poritz, M. A., Bernstein, H. D., Strub, K., Zopf, D., Wilhelm, H., and Walter, P. (1990) *Science* 250, 1111-1117
- 13) Bieker, K. L., Phillips, G. J., and Silhavy, T. J. (1990) *J. Bioenerg. Biomemb.* 22, 291-310
- 14) Randall, L. L., and Hardy, S. J. S. (1986) *Cell* 46, 921-928
- 15) Collier, D. N., Bankaitis, V. A., Weiss, J. B., and Bassford, Jr., P. J. (1988) *Cell* 53, 273-283
- 16) Bochkareva, E. S., Lissin, N. M., and Girshovich, A. S. (1988) *Nature* 336, 254-257
- 17) Oliver, D. B., and Beckwith, J. (1982) *Cell* 30, 311-319
- 18) Lill, R., Cunningham, K., Brundage, L. A., Ito, K., Oliver, D., and Wickner, W. (1989) *EMBO J.* 8, 961-966
- 19) Akiyama, Y., and Ito, K. (1985) *EMBO J.* 4, 3351-3356

- 20) Schatz, P. J., Riggs, P. D., Jacq, A., Fath, M. J., and Beckwith, J. (1989) *Genes Dev.* 3, 1035-1044
- 21) Shultz, J., Silhavy, T., Berman, M., Fiil, N., and Emr, S. D. (1982) *Cell* 31, 227-235
- 22) Stader, J., Gansheroff, L. J., and Silhavy, T. J. (1989) *Genes Dev.* 3, 1045-1052
- 23) Inouye, M., and Halegoua, S. (1980) *Crit. Rev. Biochem.* 7, 339-371
- 24) Gardel, C., Johnson, K., Jacq, A., and Beckwith, J. (1990) *EMBO J.* 9, 3209-3216
- 25) Zwizinski, C., and Wickner, W. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 7973-7977
- 26) Wolfe, P. B., Wickner, W., and Goodman, J. M. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 12073-12080
- 27) Dalbey, R. E., and Wickner, W. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 15925-15931
- 28) Ferro-Novick, S., Honma, M., and Beckwith, J. (1984) *Cell* 38, 211-217
- 29) Brickman, E., Oliver, D., Garwin, J., Kumamoto, C., and Beckwith, J. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 196, 24-27
- 30) Oliver, D. B. (1985) *J. Bacteriol.* 161, 285-291
- 31) Shiba, K., Ito, K., and Yura, T. (1984) *J. Bacteriol.* 160, 696-701
- 32) Shiba, K., Ito, K., and Yura, T. (1986) *J. Bacteriol.* 166, 849-856
- 33) Shiba, K., Ito, K., Nakamura, Y., Dondon, J., and Grunberg-Manago, M. (1986) *EMBO J.* 5, 3001-3006
- 34) Pelham, H. R. B. (1986) *Cell* 46, 959-961
- 35) Ellis, J. (1987) *Nature* 328, 378-379
- 36) Hemmingsen, S. M., Woolford, C, van der Vies, S. M., Tilly, K., Dennis, D. T., Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., and Ellis, R. J., (1988) *Nature* 333, 330-334
- 37) Van Dyk, T. K., Gatenby, A. A., and LaRossa, R. A. (1989) *Nature* 342, 451-453

- 38) Randall, L. L. (1983) *Cell* 33, 231-240
- 39) Peters, K., and Richards, F. M. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46, 523-551
- 40) Jackson, V., and Chalkey, R. (1974) *Biochemistry* 13, 3952-3956
- 41) Geller, B. L., Movva, N. R., and Wickner, W. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4219-4222
- 42) Yamane, K., Ichihara, S., and Mizushima, S. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 2358-2362
- 43) Date, T., Goodman, J. M., and Wickner, W. R. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 4669-4673
- 44) Butlin, J. D., Cox, G. B., and Gibson, F. (1971) *Biochem. J.* 124, 75-81
- 45) Oliver, D. B., Cabelli, R. J., Dolan, K. M., and Jarosik, G. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8227-8231
- 46) Lee, C. A., and Beckwith, J. (1986) *J. Bacteriol.* 166, 878-883
- 47) Hartl, F.-U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J. P., and Wickner, W. (1990) *Cell* 63, 269-279
- 48) Minsky, A., Summers, R. G., and Knowles, J. R. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4180-4184
- 49) Thom, J. R., and Randall, L. L. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 5654-5661
- 50) Tani, K., Shiozuka, K., Tokuda, H., and Mizushima, S. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 18582-18588
- 51) Geller, B. L. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 4870-4876
- 52) Yamada, H., Tokuda, H., and Mizushima, S. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 1723-1728
- 53) Eilers, M., and Schatz, G. (1988) *Cell* 52, 481-483
- 54) Fikes, J. D., and Bassford, Jr., P. J. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 402-409
- 55) Kumamoto, C. A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 5320-5324
- 56) Kumamoto, C. A., and Beckwith, J. (1985) *J. Bacteriol.* 163, 267-274
- 57) Gannon, P. M., Li, P., and Kumamoto, C. A. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 813-

- 58) Kusukawa, N., Yura, T., Ueguchi, C., Akiyama, Y., and Ito, K. (1989) *EMBO J.* 8, 3517-3521
- 59) Swidersky, U. E., Hoffschulte, H. K., and Müller, M. (1990) *EMBO J.* 9, 1777-1785
- 60) Akita, M., Sasaki, S., Matsuyama, S. and Mizushima, S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 8164-8169
- 61) Bieker, K. L., and Silhavy, T. J. (1990) *Cell* 61, 833-842
- 62) Vogel, J., Misra, L., and Rose, M. (1990) *J. Cell. Biol.* 110, 1885-1895
- 63) Ito, K., Wittekind, M., Nomura, M., Shiba, K., Yura, T., Miura, A., and Nashimoto, H. (1983) *Cell* 32, 789-797
- 64) Shiba, K., Ito, K., Yura, T., and Cerretti, D. P. (1984) *EMBO J.* 3, 631-635
- 65) Kohara, Y., Akiyama, K., and Isono, K. (1987) *Cell* 50, 495-508
- 66) Bardwell, J. C. A., and Craig, E. A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5177-5181
- 67) Ito, K., Hirota, Y., and Akiyama, Y. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 1742-1743
- 68) Ito, K., Cerretti, D. P., Nashimoto, H., and Nomura, M. (1984) *EMBO J.* 3, 2319-2324
- 69) Ito, K., Bassford, Jr., P. J., and Beckwith, J. R. (1981) *Cell* 24, 707-717
- 70) Vieira, J., and Messing, J. (1987) *Methods in Enzymol.* 153, 3-11
- 71) Tabor, S., and Richardson, C. C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 4767-4771
- 72) Sanger, F., Nicklen, B., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463-5467
- 73) Higgins, C. F., Hiles, I. D., Salmond, G. P. C., Gill, D. R., Downie, J.

- A., Evans, I. J., Holland, I. B., Gray, L., Buckl, S. D., Bell, A. W., and Hermodson, M. A. (1986) *Nature* 323, 448-450
- 74) Pon, C. L., Calogero, R. A., and Gualerzi, C. O. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 212, 199-202
- 75) Göransson, M., Sönden, B., Nilson, P., Dagberg, B., Forsman, K., Emanuelsson, K., and Uhlin, B. E. (1990) *Nature* 344, 682-685
- 76) Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132
- 77) Klein, P., Kanehisa, M., and DeLisi, C. (1985) *Biochem. Biophys. Acta* 815, 468-476
- 78) von Heijne, G., and Gavel, Y. (1988) *Eur. J. Biochem.* 174, 671-678
- 79) Wong, H. C., and Chang, S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 3233-3237
- 80) Hayashi, M. N., and Hayashi, M. (1985) *Nucleic Acid Res.* 13, 5937-5948
- 81) Ueguchi, C., Wittekind, M., Nomura, M., Akiyama, Y., and Ito, K. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 217, 1-5
- 82) Cukier-Kahn, R., Jacquet, M., and Gros, F. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69, 3643-3647
- 83) Varshavsky, A. J., Nedospasov, S. A., Bakayev, V. V., Bakayeva, T. G., and Georgiev, G. P. (1977) *Nucleic Acids Res.* 4, 2725-2745
- 84) Laine, B., Sautiere, P., Spassky, A., and Rimsky, S. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 1147-1153
- 85) Spassky, A., Rimsky, S., Garreau, H., and Buc, H. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 5321-5340
- 86) Defez, R., and DeFelice, M. (1981) *Genetics* 97, 11-25
- 87) Diderichsen, B. (1980) *Mol. Gen. Genet.* 180, 425-428
- 88) Spears, P. A., Schauer, D., and Orndorff, P. E. (1986) *J. Bacteriol.* 168, 179-185
- 89) Higgins, C. F., Dorman, C. J., Stirling, D. A., Waddell, L.,

- Booth, I. R., May, G., and Bremer, E. (1988) *Cell* 52, 569-584
- 90) Hromockyj, A. E., and Maurelli, A. T. (1989) *J. Bacteriol.* 711, 2879-2881
- 91) Hulton, C. S. J., Seirafi, A., Hinton, J. C. D., Sidebotham, J. M., Waddell, L., Pavitt, G. D., Owen-Hughes, T., Spassky, A., Buc, H., and Higgins, C. F. (1990) *Cell* 63, 631-642
- 92) May, G., Dersch, P., Haardt, M., Middendorf, A., and Bremer, E. (1990) *Mol. Gen. Genet.* 224, 81-90
- 93) Yamada, H., Muramatsu, S., and Mizuno, T. (1990) *J. Biochem.* 108, 420-425
- 94) McAllister, C. F., and Achberger, E. C. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 10451-10456
- 95) Bracco, L., Kotlarz, D., Kolb, A., Diekmann, S., and Buc, H. (1989) *EMBO J.* 8, 4289-4296
- 96) Gill, D. R., and Salmond, G. P. C. (1990) *Molec. Microbiol.* 4, 575-583
- 97) Ellis, R. J., and Hemmingsen, S. M. (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14, 339-
- 98) Spence, J., and Georgopoulos, C. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 4398-4403
- 99) Schlesinger, M. J. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 12111-12114
- 100) Bardwell, J. C. A., and Craig, E. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5177-5181
- 101) Nakano, A., and Muramatsu, M. (1989) *J. Cell. Biol.* 109, 2677-2691
- 102) Casadaban, M. (1976) *J. Mol. Biol.* 104, 541-555
- 103) Oliver, D. B., and Beckwith, J. (1981) *Cell* 25, 765-772
- 104) Bassford, Jr., P. J., Silhavy, T. J., and Beckwith, J. (1979) *J. Bacteriol.* 139, 19-31
- 105) Miller, J. H. (1972) *Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 106) Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557-580
- 107) Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685
- 108) Ito, K., Date, T., and Wickner, W. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2123-2130

109) Chamberlain, J. P. (1979) *Anal. Biochem.* **98**, 132-135

110) DeVries, J. K., and Zubay, G. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **57**,
1010-1012

謝辞

修士課程から博士後期過程まで5年にわたって丁寧な指導を与えて下さった伊藤維昭教授に最大限の感謝の意を表します。タンパク質膜透過機構の解析が急速に進展を見せたこの間、この問題に取り組めたことは幸運なことでした。

また同じ研究室で様々な discussion の相手になって下さった秋山博士にも感謝致します。本研究の中にも discussion の成果が生かされているものと思います。また実験・事務などで望月清子さんと片岡順子さんにはたいへんお世話になりました。改めて感謝致します。ウイルス研細胞生物学部門の院生のみなさんにもお世話になりました。

ウイルス研の遺伝子動態調節大部門の由良教授・今井教授を初めとするスタッフ・院生のみなさんにはセミナー等で大変お世話になりました。各分野での第一級の研究が進展する様を見て、勉強になると同時に励まされる思いがしました。

東大応微研の水島昭二教授には抗SecA抗血清を、カリフォルニア大学 Davis 校の R. Doi 博士には抗Bla抗血清をそれぞれ快く分与して頂きました。またプラスミド pNRK267 は楠川典子博士（現・宝酒造）に分けて頂きました。京大化学研究所の中井先生には、膜貫通部位の検索をやって頂きました。みなさんに深く感謝致します。