

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 10 年度博士課程進学

氏名 永森收志

指導教官 徳田 元

論文題目 蛋白質膜透過装置における SecG の構造解析

蛋白質膜透過機構は、あらゆる生物の細胞に普遍的に存在している。大腸菌における分泌蛋白質の細胞質膜透過は Sec 因子（現在、SecA/B/D/E/F/G/Y の 7 種類が知られている）から構成される膜透過装置によって行われる。このうち、SecA、SecY、SecE、SecG が膜透過反応において中心的な役割を担っている。細胞質で合成された分泌蛋白質前駆体は、分子シャペロンである SecB と結合し、細胞質膜上で SecA に受け渡される。SecA は、膜内在性蛋白質である SecYEG 複合体に前駆体蛋白質を送り込む。ATPase である SecA は ATP の結合により膜に深く挿入し、ATP 加水分解で膜から脱離する。この挿入・脱離サイクルの繰り返しによって、前駆体蛋白質が段階的に膜透過すると考えられている。SecG は、膜透過活性を促進する因子として当研究室で発見された。SecG は 110 アミノ酸残基からなり、N 末端と C 末端をペリプラズム側に、2 カ所の膜貫通領域間を細胞質側に露出していることが、プロテアーゼによる消化実験やアルカリフォスファターゼとの融合蛋白質の解析、さらにアミノ酸配列による配向性予測によって示唆されている。近年、当研究室では SecG の膜内配向性が膜透過反応に共役して反転することを提唱している。一方、膜内在性蛋白質は一般に唯一の膜内配向性で存在すると考えられてきた。したがって、SecG の配向性反転はきわめて特異な性質であり、膜透過を促進する SecG の機能と密接に関連していることが示唆されている。しかし、SecG-アルカリフォスファターゼ融合蛋白質は SecG 活性を持たず、機能的な SecG

の配向性を解析するには適さない。そこでまず、機能を持った SecG についてその配向性を詳しく決定し、さらに膜透過反応中において SecG がどのような構造変化をするか明らかにすることを目的として本研究を行った。

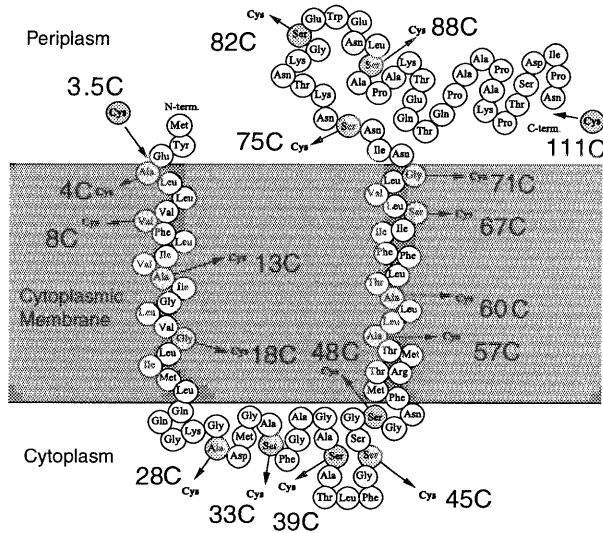


図. 構築したSecG変異体

1. 膜透過装置内における SecG の構造

SecG 分子内にはシステイン残基が含まれないため、様々な位置にシステイン残基を一残基持つ SecG 変異体を 18 種構築した (図)。すべての変異体は、in vivo での SecG 遺伝子破壊株の低温感受性を抑制し、反転膜小胞を用いた in vitro 膜透過実験では膜透過活性を促進した。つまりすべての変異体は in vivo、in vitro 両方で SecG 機能を保持していた。これらの変異体を用いてより詳細な配向性の

解析を試みた。SH 基特異的化學修飾試薬である *N*-ethylmaleimide (NEM) や 4-acetamide-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid (AMS) は、膜外に露出しているシステイン残基のみに反応することが知られている。AMS は膜透過性が低いいため、反転膜小胞を用いて修飾実験を行うと細胞質側のシステイン残基が修飾されるが、ペリプラズム側のシステイン残基は界面活性剤による可溶化によってはじめて修飾されると考えられる。

還元剤で処理した反転膜小胞にこれらの試薬を用いた解析の結果、膜透過反応非存在下における SecG では、N 末端と C 末端がペリプラズム側に存在し、二つの膜貫通領域の間が細胞質に露出していることが明らかになった。これらの結果は、提唱されている SecG の膜内配向性モデルが正しいことを示している。さらに、一番目の膜貫通領域と二番目の膜貫通領域は、界面活性剤で可溶化した際に受ける AMS 修飾の温度依存性が異なっていた。また、NEM による膜透過活性の阻害効果も、二つの膜貫通領域の間で違いが見られた。アミノ酸配列を比較すると二番目の膜貫通領域は、一番目と比べて極性残基を多く持っていた。膜貫通領域の性質の違いは、大腸菌以外の SecG ホモログにも共通している。このことは、二つの膜貫通領域が膜透過装置内において異なった環境下に存在していることを示していると考えられる。

N 末端および C 末端側にシステイン残基を持つ変異体は、非還元状態ではジスルフィド結合によりホモ二量体を形成していた。これは N 末端と C 末端が酸化的なペリプラズムに

露出しているためだと思われる。ほぼすべての SecG 変異体が二量体を形成していても *in vivo* における蛋白質の膜透過は促進された。さらに共免疫沈降実験によりホモ二量体は、膜透過装置内で他の Sec 因子と相互作用していることが明らかになった。ジスルフィド結合の形成は非常に近接した分子間でのみ起きる。推測されている膜透過装置の大きさを考えると、異なった二つの装置内に存在する SecG 分子間で二量体が形成されたとは考えにくい。これらのことから、SecG が膜透過装置内に少なくとも二分子は存在していることがわかった。最近の電子顕微鏡を用いた解析の結果、SecYEG 複合体は複数で膜透過装置を形成していることが示唆されている。今回得られた知見は、その結果を生化学的に支持していると考えられる。

SecG の膜透過促進機能は、膜透過反応に共役した配向性の反転と密接に関係すると考えられている。そこで二量体となっても配向性を反転させるかを調べた。ATP の非加水分解アナログである AMP-PNP を加えると、膜透過基質が無くても SecA は膜に挿入する。同条件下において、SecG 変異体の二量体形成は AMP-PNP に依存して増加した。AMP-PNP のみでは、SecG の反転は起こらないが、SecA の膜挿入によって二分子の SecG がより近接して存在するようになると考えられる。ATP と膜透過基質である proOmpA を加えて膜透過を開始後、AMP-PNP で反応を止めると膜に挿入した SecA は安定化し、野生型 SecG は配向性を反転させる。変異 SecG の二量体はジスルフィド結合を保持した状態で、野生型同様に配向性が反転していた。二量体の片方のみが反転したような SecG 変異体は検出されなかったことから、SecG の膜透過反応に共役した配向性反転は、二分子の SecG で同時に起きている可能性が考えられる。

以上の結果から、SecG の正確な膜内配向性が明らかになり、二つの膜貫通領域が異なった環境に存在する可能性が示唆された。また、SecG 分子は膜透過装置内に複数存在し、非常に近接していることがわかった。さらに一つの膜透過装置内に存在する SecG 分子は、同調して膜内配向性を反転させている可能性が示唆された。

2. SecG の膜内配向性反転

構築したシステイン変異体を用いて、SecG の配向性反転をシステイン特異的的化学修飾により解析することを試みた。システイン残基をペリプラズム側に持つ SecG 変異体の反転膜小胞を還元後、AMS による SecG の修飾を調べた。ATP を加えて膜透過反応を開始した後 AMS を添加すると、AMS に修飾された SecG の量が増加した。すなわち、膜透過反応進行中に AMS を加えると、本来ペリプラズム側(小胞内側)に存在するシステイン残基が、細胞質側に存在する AMS の修飾を受けると考えられる。AMS の膜透過性は低いため、ペ

リプラズム側のシステイン残基が細胞質側に露出した結果、AMSによって修飾されたことが強く示唆された。さらにペリプラズム側のシステイン残基が修飾されるためには、ATP、SecA、膜透過基質である proOmpA が必須であり、この現象が蛋白質膜透過反応に依存していることが明らかになった。

細胞質、ペリプラズム、膜貫通領域にそれぞれシステイン残基を持つ代表的な変異体の反転膜小胞を用いて、同様の修飾実験を行った。その結果、ペリプラズム領域にシステイン残基を持つ変異体は、C末端の近くにシステイン残基を持つものほど、膜透過反応に依存したAMSの修飾効率が上昇した。反対に、細胞質側にシステイン残基を持つ変異体は、膜透過反応に依存して、修飾効率が若干低下した。N末端側のペリプラズム領域にシステイン残基を持つ変異体や膜貫通領域にシステイン残基を持つものは、膜透過反応存在下・非存在下に関わらず修飾を受けなかった。

AMSによる修飾を、システイン変異体 SecG を発現させた SecG 遺伝子破壊株から調製したスフェロプラストを用いて行った。細胞質側にシステイン残基を持つ変異体のスフェロプラストを使用した場合、蛋白質膜透過が進行している条件下でのみ SecG が修飾された。ペリプラズム領域にシステイン残基を持つ変異体では、膜透過反応の存在に関わらず修飾を受けた。細胞質に存在する蛋白質 EF-Tu はいずれの場合も修飾を受けなかったことから、細胞質側のシステイン残基が SecG の反転によってペリプラズム側に露出し、AMSにより修飾されたと考えられる。

以上の結果から、反転膜小胞では、SecG のペリプラズム側が膜透過反応に依存して、細胞質領域に露出することが明らかになり、スフェロプラストでは、膜透過反応に依存して SecG の細胞質領域がペリプラズム側に露出することが示された。つまり、膜透過反応に依存した SecG の膜内配向性反転を、AMS を用いた修飾実験によって検出することが可能になった。これまで、SecG の配向性反転は、膜透過反応を AMP-PNP で停止し、SecA の膜挿入を固定した条件下で、SecG 分子のプロテアーゼ切断部位が変化することによって観察されている。AMP-PNP のみで SecA が膜挿入するように、AMP-PNP が原因で蛋白質が通常生体内では取らない構造をとる可能性が考えられる。プロテアーゼは、SecA や SecY などの膜透過装置を構成する他の因子も消化するため、装置を構成する一因子である SecG は生体内における構造とは異なった状態になる可能性もある。これらの理由により、プロテアーゼや AMP-PNP を用いないで反転を検出する方法が望まれていた。今回構築した AMS による実験系では、膜透過装置全体の構造を維持したまま、SecG の配向性反転を検出することができる。本研究によって SecG の膜内配向性の反転を検出する新しい実験系が確立されたと考える。