

論文の内容の要旨

論文題目 蛋白質膜透過反応における SecA と SecG の機能的相互作用ならびに SecE の構造と機能に関する研究

氏名 鈴木 浩 史

はじめに

大腸菌における分泌型蛋白質の細胞質膜透過は、Sec 因子が構成する膜透過装置により触媒されている。一般的に、分泌型蛋白質前駆体は SecB により認識され、SecY/E/G/D/F 複合体と SecA によって構成された膜透過装置へと運ばれる。SecA は、前駆体と ATP の結合によって細胞質膜へ挿入し、ATP の加水分解によって前駆体と解離し、細胞質膜から脱離する。一サイクルの膜挿入と脱離によって、前駆体蛋白質は 20~30 アミノ酸残基分が細胞質膜に挿入される。サイクルを繰り返すことによって、分泌型蛋白質の膜透過が完了すると考えられている。すなわち、SecA サイクルは膜透過反応の駆動力であり、その効率は膜透過反応の速度に直接影響する。膜透過反応に必須の因子は、SecY/E/A の三因子である。SecG は SecY/E/A により再構成された膜透過反応を強く促進し、膜透過反応に共役してその膜内配向性を反転させる。また、*secG* 遺伝子破壊株は、生育および膜透過反応が低温感受性となるが、酸性リン脂質の合成に重要な役割を果たす *pgsA* 遺伝子を過剰発現すると、低温感受性は抑制される。本研究では、膜透過反応において、もっとも大きな構造変化を示す SecA と SecG の機能的関連を調べ、酸性リン脂質が SecA サイクルを促進する理由について詳細に検討した。さらに、必須因子である SecE の構造と機能について解析を行った。

1. 蛋白質膜透過反応における SecA と SecG の機能的相互作用

phosphatidylglycerophosphate synthase をコードする *pgsA* 遺伝子の過剰発現は、*secG* 遺伝子破壊株の生育と膜透過反応の低温感受性を抑制する。*pgsA* 遺伝子が他の Sec 因子の低温感受性を抑制するかどうかを調べたところ、*secAcsR11* 変異株の生育と膜透過反応の低温感受性を特異的に抑制した。そこで、*secAcsR11* 変異株に *secG* 遺伝子破壊変異を導入したところ、常温でも膜透過反応が強く阻害され致死となった。*secAcsR11* 変異株の変異部位は分泌型蛋白質との相互作用部位にあり、精製した変異体(csSecA)は分泌型蛋白質との化学架橋効率が低下していた。反転膜小胞と前駆体蛋白質 proOmpA 存在下で、SecA の ATPase 活性を調べ、csSecA は proOmpA に対する親和性が低下しているが、充分量の proOmpA 存在下の ATPase 活性は野生型 SecA と同程度であることを明らかにした。さらに、*secG* 遺伝子破壊株から調製した反転膜小胞 (Δ SecG 膜)を用いても、proOmpA に対する SecA の親和性が低下することを見いだした。すなわち、SecG には SecA と分泌型蛋白質の親和性を高める働きがあることが示唆される。細胞質膜に挿入する SecA の量は、csSecA や Δ SecG 膜を用いると著しく減少した。 Δ SecG 膜と csSecA を用いた場合、膜挿入する SecA は全く観察されなかった。これらの結果から、二重変異株が生育できないのは、膜透過反応の駆動力である SecA サイクルがほとんど機能しないためであると考えられる。また、膜透過反応の際、反転する SecG の量は csSecA を用いると大幅に減少した。これは、SecG の反転が SecA の膜挿入に依存した反応であることを示している。プロトン駆動力は、*in vitro* における膜透過反応を強く促進することが知られている。プロトン駆動力存在下では、wtSecA と csSecA に大きな膜透過活性の差は見られなかった。しかし、SecG 非存在下や、プロトン駆動力非存在下では、csSecA による膜透過活性は著しく低下した。*in vivo* で Δ secG 変異や *secAcsR11* 変異が、単独では弱い膜透過阻害を示すのみであるのは、プロトン駆動力による強い促進があるためと考えられる。

2. *pgsA* 遺伝子の過剰発現による Δ *secG* 変異株と *secAcsR11* 変異株の低温感受性抑制機構

pgsA 遺伝子の過剰発現が Δ *secG* 株と *secAcsR11* 変異株の膜透過に与える影響を調べた。*pgsA* 遺伝子を過剰発現すると、 Δ *secG* 変異株や *secAcsR11* 変異株の 20℃での膜透過反応は促進された。膜のリン脂質組成を調べたところ、*pgsA* 遺伝子の過剰発現によって、酸性リン脂質である phosphatidylglycerol 量が上昇し、中性リン脂質 phosphatidylethanolamine 量が減少することが分かった。反転膜小胞において、proOmpA の膜透過反応を調べたところ、*pgsA* 遺伝子の過剰発現による酸性リン脂質量の増加は、csSecA や Δ SecG 膜を用いた時の膜透過を強く促進することが分かった。膜透過反応に依存した SecA の ATPase 活性を測定したところ、酸性リン脂質量の増加は、20℃における csSecA もしくは Δ SecG 膜による ATPase 活性を特異的に強く促進することがわかった。この酸性リン脂質量増加による ATPase 活性の促進は、低温下のみで観察された。低温下での SecA の膜挿入を調べたところ、酸性リン脂質量の増加は、SecA の挿入反応と脱離反応の両方を促進する活性をもつことが示唆された。SecG の主要な機能は、低温下において SecA の挿入-脱離サイクルを効率的に進行させることであると考えられるが、その機能は酸性リン脂質により部分的に代替可能であると考えられる。

3. SecE の N 末端領域の機能

膜透過反応の必須因子である SecE のホモログは、細菌から動物細胞まで広く存在する。大腸菌と数種のグラム陰性細菌の SecE には、膜を貫通する領域が 3 カ所ある。しかし、大部分の SecE ホモログの膜貫通領域は 1 カ所であり、これは大腸菌 SecE の C 末端側 3 番目の膜貫通領域に相当する。大腸菌 SecE の N 末端側の 2 カ所の膜貫通領域は SecE 機能に必須ではないことが知られている。しかし、なぜ大腸菌をはじめとする数種のグラム陰性細菌の SecE には、3 カ所の膜貫通領域があるのか不明である。そこで SecE の N 末端領域を欠失した変異体の安定性や、膜透過活性について詳細に解析した。

SecE の C 末端領域(SecE-C)を発現する株、および SecE-C と N 末端領域(SecE-N)を同時に発現する株において SecE-C の安定性を調べたところ、SecE-C は Sec-N によって安定化されることが分かった。また、AAA プロテアーゼである FtsH の温度感受性変異株を用いた場合、非許容温度において SecE-C が安定となることから、SecE-C の分解には、FtsH が関与していることがわかった。しかし、SecE-N による SecE-C の安定化は、膜透過反応を促進せず、むしろわずかな阻害が見られた。SecY/E/G は複合体を形成しており、細胞質膜を可溶化した後 SecY/E/G のどの抗体によっても免疫沈降が可能である。しかし、SecE-C は SecY 抗体および SecG 抗体によって免疫沈降しなかった。また、SecE-N を共発現した場合でも免疫沈降する SecE-C は増加しなかった。これらの結果は、SecE-C と SecE-N の相互作用が Sec 装置外で起こっており、そのために SecE-C の Sec 装置への組み込みが減少していることを示唆している。また、SecE-C は SecY や SecG との複合体形成が不安定になっていると考えられる。SecE-C および SecY から再構成したプロテオリポソームによる膜透過活性は、SecE-N を同時に再構成してもほとんど影響されなかった。以上の結果から、SecE-N は膜透過反応を促進する活性はないことが示された。

まとめ

本研究によって、膜透過反応の駆動力である SecA の膜挿入と脱離には、SecG、リン脂質組成、プロトン駆動力などが大きく影響することが明らかとなった。中でも、SecG の反転は SecA サイクルを円滑に進めるために重要な働きをしている。SecG ホモログが広く細菌に存在することも、この因子の機能が重要であることを示していると考えられる。低温下やプロトン駆動力の形成が充分でない場合、SecG の機能は膜透過反応を円滑に進めるために必須になると考えられる。