

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 12 年度博士課程 進学  
氏名 池上 文緒  
指導教官 徳田 元

### 論文題目

リボソーム蛋白質 L36 遺伝子欠失による蛋白質の分泌阻害

大腸菌において、蛋白質膜透過に関与する因子は現在までに、膜内在性の SecY、SecE、SecG、SecD、SecF、膜表在性の ATPase である SecA、細胞質の分子シャペロン SecB が知られている。N 末端にシグナルペプチドをもつ前駆体として翻訳された分泌型蛋白質は、SecB と結合し高次構造形成を阻害された状態で膜上に存在する SecA に受け渡される。SecA は ATP が結合することによって構造変化を起こし、SecA の C 末端の領域が SecY/E/G によって形成された膜透過チャンネルに挿入され、加水分解によって膜から脱離する。この挿入、脱離の繰り返しからなる SecA サイクルによって分泌型蛋白質は段階的に膜を通過する。このような翻訳後膜透過のほかに、大腸菌にも真核細胞の小胞体での膜透過に見られるような、翻訳に共役した膜透過機構があることも知られている。大腸菌において、翻訳と共役した膜透過の基質は内膜蛋白質であり、疎水性の高い膜貫通領域を親水的環境に露出しないために翻訳と膜透過が共役していると考えられる。膜貫通領域が翻訳されてリボソーム外に露出した時、Ffh (シグナル認識粒子) が膜貫通領域に結合する。その後、FtsY (Ffh 受容体) により膜にターゲティングされ Ffh が解離し、翻訳と共役して膜挿入がおこる。このとき、膜透過チャンネルは分泌型蛋白質と同様に SecY/E/G である。

内膜蛋白質の膜挿入では、蛋白質合成と膜透過反応が非常に密接に関連している。このことは *secY*、*secE*、*secG* 遺伝子がそれぞれリボソーム蛋白質、RNA

転写に参与する因子、tRNA をコードする遺伝子とオペロンを形成していることとも関連があるのかもしれない。

*secY* 遺伝子は、11のリボソーム蛋白質をコードしている *spc* オペロンの最後から2番目に位置しており、その下流には50Sリボソームサブユニットの蛋白質L36をコードする *rpmJ* 遺伝子が存在している。大腸菌L36は38アミノ酸よりなる塩基性蛋白質であり、このホモログはグラム陰性細菌やグラム陽性細菌はもとより、ミトコンドリアや葉緑体にも存在している。しかし、L36の機能に関する知見はほとんど得られていない。

本研究では *secY* とオペロンを形成している *rpmJ* の遺伝子産物L36に興味をもち、その機能を明らかにするために、大腸菌の *rpmJ* 欠失変異株を構築し、細胞機能に及ぼす影響を解析した。

#### *rpmJ* 欠失変異株の作製

*rpmJ* 欠失変異株は、野生型大腸菌 MC4100 の染色体上の *rpmJ* 遺伝子をトランスポゾン Tn10 由来の *tetA* 遺伝子と置換することによって構築した。取得した変異株 AY101 では *secY* の下流に *tetA* が逆向きに位置している。その理由は、*tetA* の  $\rho$  因子非依存性の転写終結信号がその構造から *secY* を含む *spc* オペロンの転写も終結させ、その mRNA の 3' 末端にヘアピン-ループ構造を付与することによって安定化に寄与すると考えたからである (図1)。また、*rpmJ* が蛋白質の膜透過に参与している場合には内膜蛋白質をコードする *tetA* では不都合が生じる可能性がある。そこで、*tetA* の転写終結信号はそのまま残して、*tetA* 遺伝子のコード領域を細胞質蛋白質をコードする *cat* 遺伝子のコード領域と置換した株 AY201 も構築した (図1)。AY101 と AY201 の染色体の構造は PCR で確認した。

#### *rpmJ* 欠失変異株の生育と形態変化

AY101 と AY201 は 30°C 以下の条件で構築したので、高温下での生育を調べた。AY101 は 37°C 以上では生育できず、長時間の培養によって溶菌し、死に至った。一方、AY201 は 42°C でも正常に生育した。

高温下でも生育できる AY201 では形態異常は見られなかった。しかし、37°C、42°C で生育させた AY101 では菌体がフィラメント状に伸びていたことから、高温下では細胞分裂が阻害されたと考えられる。AY101 と AY201 はどちらも *rpmJ* 遺伝子が欠失しているにもかかわらず、用いた薬剤耐性マーカーの違いだけで表現型が著しく異なった結果が得られたのは、AY101 の生育阻害と形態異常が単に *rpmJ* 遺伝子の欠失による影響だけではないことを示している。

#### *rpmJ* 欠失変異株におけるリボソーム蛋白質組成と蛋白質合成

大腸菌の L36 は、50S リボソームサブユニットに局在しており、細胞質に遊離した状態では存在していない。そこで、L36 欠失の影響はまず、リボソーム

に現れると考えると、L36を欠いているAY101、AY201においてリボソーム蛋白質の組成に変化があるかどうかを調べた。しかし、野生型と比較して *rpmJ* 欠失変異株のL36以外のリボソーム蛋白質の組成に変化は見られなかった。また、*rpmJ* 欠失変異株の蛋白質合成能を単位時間あたりの<sup>35</sup>S]Metの蛋白質への取り込み活性として調べた。蛋白質合成能は生育速度と強い相関が見られた。この結果は、L36がリボソームにおける蛋白質合成に必須ではないことを示唆している。

#### *rpmJ* 欠失変異株における蛋白質組成の変化

次に *rpmJ* 欠失変異によって合成される蛋白質種に変化が見られるかどうかを調べるために、37℃で3時間培養したAY101とAY201の細胞を、細胞質、内膜、外膜およびペリプラズム画分に分画してそれぞれの画分における蛋白質組成を調べた。野生株MC4100と比べてAY101、AY201ともに細胞質と外膜蛋白質の組成にはあまり変化は見られなかったが、AY101を溶菌がはじまるまで37℃で長時間培養するとLpp量は減少していた。しかし、培養時間にかかわらず、*rpmJ* 欠失変異株のペリプラズム画分には顕著に減少している蛋白質が多数観察された。N末端アミノ酸配列解析から、これらの蛋白質は糖、アミノ酸などの輸送系における基質結合蛋白質であることがわかった。さらに、AY101の内膜画分にはAY201やMC4100と比べ強く発現する25kDaの蛋白質が見られた。N末端アミノ酸配列の解析から、この蛋白質はバクテリオファージの感染により発現が誘導されることが知られているファージショック蛋白質PspAであることが明らかとなった。PspAは蛋白質の膜透過が阻害されたり、プロトン駆動力が減少したりしても発現が誘導されることから、AY101では *rpmJ* 欠失変異によってある種のストレスが生じていることが示唆された。

#### *rpmJ* 欠失変異株における SecY 量の減少と SecA 量の増加

*rpmJ* 欠失変異によるストレスは分泌型蛋白質に影響を及ぼしていたので、内膜で生じている可能性が考えられた。そこで、AY101、AY201における、膜透過因子 (SecY/E/G/D/F/A) の量を野生型と比較した。AY201では野生型と比べ、SecY/E量がおよそ半分に減少していたが、他の膜内在性膜透過因子の量は変わらなかった。AY101では、SecYが野生型の20%しか存在しておらず、SecE/F/Gの量もおよそ半分に減少していた。さらに、SecA量はAY101、AY201においてそれぞれ野生型のおよそ2.5倍、3倍に増加していた。これらの結果から、*rpmJ* 欠失変異株では、内在性膜透過因子の減少による膜透過阻害が生じている可能性が考えられた。

#### *rpmJ* 欠失変異株における分泌型蛋白質前駆体の蓄積

実際にAY101とAY201で蛋白質の膜透過が阻害されているのかを確かめるために、外膜蛋白質OmpAとペリプラズム蛋白質MalEの前駆体が蓄積してい

るのかどうかをイムノブロット解析で調べた。AY101 と AY201 はともに培養温度にかかわらず、OmpA と MalE の前駆体が蓄積していた。以上の結果は、L36 の欠失が膜内在性 Sec 因子の減少を引き起こしたことによって分泌型蛋白質前駆体が蓄積したことを示唆している。

rpmJ 欠失変異は secY によって相補される

rpmJ 欠失変異株において見られた生育の温度感受性、分泌型蛋白質前駆体の蓄積、ペリプラズム蛋白質の減少、および PspA の発現誘導などの表現型が、L36 の欠失による内在性 Sec 因子、とりわけ SecY の減少に帰因していることを確かめるために、相補試験を行った。AY101 に rpmJ 遺伝子を発現するプラスミドを導入したが、rpmJ 欠失変異の表現型は相補されなかった。そこで secY-rpmJ を発現するプラスミドを導入したところ、すべての表現型が相補された。同じ結果は secY のみを発現するプラスミドを導入した場合にも得られた。これらの結果より、rpmJ 欠失変異によって引き起こされた表現型の直接の原因は、L36 の消失によるものではなく、SecY 量の減少によるものであることが強く示唆された。

rpmJ 欠失変異株における secY mRNA の定量

なぜ L36 の欠失によって SecY 量が減少するのかを調べるために、rpmJ 欠失株の secY mRNA 量を Reverse Transcription-PCR を用いて解析した。AY101、AY201 および野生型における secY mRNA 量には差が見られなかった。この結果から、L36 の欠失によって SecY 量が減少する原因は翻訳か内膜への組み込みの段階にあることが示唆された。

まとめ

rpmJ 遺伝子の欠失によって分泌型蛋白質前駆体が蓄積したのは、SecY 量の減少が原因であることを示す結果を得た。この結果は L36 が SecY の生合成に関与していることを示唆しており、いまだ明らかにされていない蛋白質膜透過装置を構成する膜内在性因子の生合成機構の解明に道を開いたと考える。

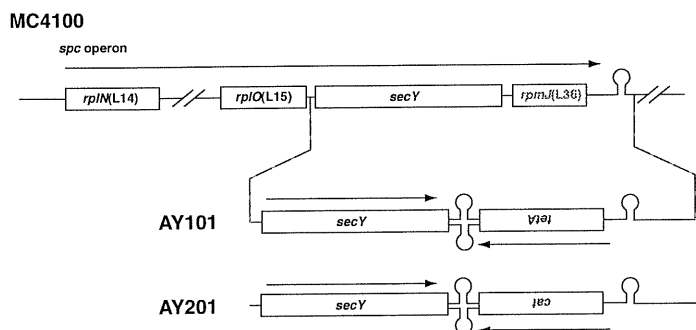


図1：構築したrpmJ欠失変異株の遺伝子構造  
AY101、AY201の遺伝子構造を示す。 $\Omega$ は $\rho$ 因子非依存性の転写終結信号を表す。AY101、AY201におけるsecY遺伝子の下流に位置する転写終結信号はtetA由来である。矢印は転写の方向を示す。