

ターボ加速した大腸菌膜透過系の解析

東京大学応用微生物研究所 秋丸仁朗

大腸菌におけるタンパク質膜透過には、遺伝学的解析により *secA*, *secB*, *secD*, *secE*, *secF* および *secY* などの遺伝子が関与することが示されている。このうち SecA, SecB のタンパク質は精製され、*in vitro* でそれらの機能が詳細に解析されている。SecA はタンパク質膜透過に必須の膜表面タンパク質であり、膜透過に共役した ATPase 活性をもつ。SecB は分泌型タンパク質の高次構造を膜透過に適したほぐれた (unfold) 状態に保つ機能をもつ細胞質タンパク質である。したがって SecB は膜透過装置を直接構成しているタンパク質ではない。一方、SecD, SecF, SecE, SecY はすべて細胞質膜内在性のタンパク質であり、膜透過装置を構成すると考えられていたが、その機能はほとんどわかっていなかった。これらのタンパク質が直接膜透過に関与しているかどうかを明らかにするためには各因子の精製と、各因子をリボソームに組み込み膜透過活性を再現 (再構成) することがきわめて重要である。

可溶化した未精製のタンパク質をリボソームに組み込み、膜透過活性を再構成することが3つのグループによって報告されている。徳田ら¹⁾と Driessen ら²⁾は、オクタリグロコンドで膜を可溶化後、リボソームに再構成し、膜透過反応が ATP, SecA, SecY を要求することを報告した。一方、渡辺ら³⁾はコール酸で膜を可溶化再構成し、SecB 依存性の膜透過活性を検出した。コール酸では SecY は可溶化されず、プロテオリボソーム中に SecY は含まれていなかったため、膜透過反応に SecY は必要でないと報告した。したがって、これらの報告では、SecY の重要性に関し統一した結論は得られなかった。Brundage ら⁴⁾は可溶化した膜タンパク質を、イオン交換カラムにより部分精製し、膜透過活性をもつリボソームを再構成できる画分を得た。この画分には SecE, SecY と Band1 という未同定のタンパク質が主に含まれているため、これら3種のタンパク質が膜透過装置の構築に関与していると結論した。しかし、SecE, SecY, Band1 が直接膜透過装置を構成する必須の因子であるかどうかを明らかにするには、個々に精製した各タンパク質を用いた厳密な検討が必要とされていた。

存在量がきわめて少ない膜内在性の因子の精製を容易にするため、筆者らの研究室で SecE, SecY の大量発現が試みられた。*secE*, *secY* 遺伝子をクローン化し、プラスミド上で *lac* プロモーターの下流につなげることにより大腸菌細胞内で SecE と SecY の大量発現に成功した。⁵⁾ SecE は単独で大量発現することができたが SecY の大量発現は単独ではできず、SecE が大量発現している時のみ可能であった。このことは SecE, SecY が相互作用し、SecY 大量発現の毒性を大量発現した SecE が打ち消しているのではないかと考えられる。さらに SecE 大量発現株からの SecE の精製と、SecE, SecY 大量発現株からの SecY の精製を試みた。大量発現株の大腸菌細胞質膜を大腸菌リン脂質存在下にオクタリグロコンドで可溶化すると、その超遠心上清に95%以上の SecE, SecY が回収される。SecE は陰イオン交換樹脂 (MonoQ, pH 7.5) とゲルろ過カラムクロマトグラフィーに、SecY は陽イオン交換樹脂 (MonoS, pH 6.95) とゲルろ過カラムクロマトグラフィーにかけることによりほぼ均一にまで精製された。^{6,7)} その純度はいずれも80%以上であった。

精製した SecY, SecE と大腸菌リン脂質からオクタリグロコンド希釈法により再構成したリボソームは ATP と SecA に依存した膜透過活性をもつことがわかった。精製した標品には SecE, SecY 以外の微量のタンパク質が存在したが、カラムクロマトグラフィーにおける溶出パターンと再構成活性が一致したことから SecE と SecY が必須のタンパク質であることがわかった。⁷⁾ したがって SecA, SecE, SecY の3つが膜透過装置の中心的役割を果たす基本単位であることが明らかとなった。Brundage らの報告した Band1 は精製標品中には含まれておらず、このタンパク質は膜透過には関与していないと考えられる。

他の膜内在性因子である SecD や SecF は、遺伝学的解析から大きなペリプラズムのドメインをもつと考えられタンパク質膜透過の後期に関与することが示唆されている。これらの因子の機能についてはまだよくわかっておらず再構成活性にどのような影響を与えるのか、今後精製された標品を用いた検討が待たれる。

大腸菌のタンパク質膜透過には ATP とプロトン駆動力というふたつのエネルギーが必要であることがわかっている。このエネルギーが膜透過装置を構成する因子に伝達され、前駆体タンパク質と相互作用しながらどのような機構で膜透過がおこなわれるのか、より詳細な解析が今後の課題である。

- 1) Tokuda, H. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **192**, 583 (1990).
- 2) Driessen, A. J. M. and Wickner, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3107 (1990).
- 3) Watanabe, H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1960 (1990).
- 4) Brundage, L. *et al.*: *Cell*, **62**, 649 (1990).
- 5) Matsuyama, S. *et al.*: *FEBS Lett.*, **269**, 96 (1990).
- 6) Tokuda, H. *et al.*: *FEBS Lett.*, **279**, 233 (1991).
- 7) Akimaru, J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.