

三量体オートトランスポーターの  
構造形成機構に関する研究

2018年3月  
青木 英莉子

1.	諸言 .....	4
1-1.	膜蛋白質.....	4
1-2.	外膜蛋白質の生合成.....	5
1-3.	Bam 複合体による外膜挿入 .....	5
1-4.	オートトランスポーター.....	6
1-4-1.	単量体オートトランスポーター .....	8
1-4-2.	パートナー分泌システム.....	8
1-4-3.	三量体オートトランスポーター .....	9
1-4-4.	インフルエンザ菌由来アドヘシン .....	10
2.	HiaT 発現系の確立.....	22
2-1.	序.....	22
2-2.	方法.....	24
2-2-1.	試薬.....	24
2-2-2.	プラスミドの構築 .....	24
2-2-3.	pASK-IBA12 ベクターを用いた HiaT の発現.....	24
2-2-4.	pET システムを用いた HiaT の発現 .....	25
2-2-5.	HiaT の精製.....	25
2-2-6.	HiaT 発現大腸菌の細胞分画.....	26
2-2-7.	フローサイトメトリー .....	27
2-2-8.	免疫ブロッティング .....	27
2-2-9.	ショ糖濃度勾配遠心.....	27
2-3.	結果.....	31
2-3-1.	pASK-HiaT を用いた HiaT の発現 .....	31
2-3-2.	pET-3c ベクターを用いた HiaT の発現.....	31
2-3-3.	発現誘導時間の最適化 .....	32
2-3-4.	各発現システムにおける HiaT の細胞局在 .....	35

2-4. 考察 .....	43
3. HiaT/mHiaT の三量体再構成実験 .....	47
3-1. 序 .....	47
3-2. 方法 .....	48
3-2-1. mHiaT 発現ベクターの作製 .....	48
3-2-2. HiaT/mHiaT 三量体再構成実験 .....	48
3-2-3. mHiaT の三量体形成反応の追跡 .....	49
3-2-4. 遠紫外 CD スペクトル測定 .....	49
3-2-5. 蛍光偏光解消測定 .....	49
3-3. 結果 .....	51
3-3-1. HiaT/mHiaT 三量体再構成実験 .....	51
3-3-2. mHiaT の三量体形成反応の追跡 .....	51
3-3-3. 蛍光による三量体形成反応の追跡 .....	56
3-4. 考察 .....	66
4. 三量体形成における Arg1077 の役割 .....	68
4-1. 序 .....	68
4-2. 方法 .....	71
4-2-1. 変異体プラスミドの作製と発現・精製 .....	71
4-2-2. 変異体の三量体再構成実験、遠紫外 CD スペクトル測定 .....	71
4-2-3. 大腸菌破碎液のイムノブロットィング解析 .....	71
4-2-4. 尿素中における mHiaT の安定性評価 .....	72
4-3. 結果 .....	73
4-3-1. R1077M の三量体形成反応の追跡 .....	73
4-3-2. R1077K の三量体形成反応の追跡 .....	74
4-3-3. 大腸菌における HiaT 変異体の発現レベル .....	75
4-3-4. 尿素中における mHiaT 変異体の安定性 .....	76

4-4. 考察 .....	87
5. 総論 .....	92
5-1. アルギニンクラスターの役割 .....	92
5-2. 生体内における三量体オートトランスポーターの形成機構.....	93
6. 参考文献 .....	96
7. 謝辞 .....	100

# 1. 諸言

## 1-1. 膜蛋白質

生物の基本単位である細胞は、リン脂質で構成される脂質二重膜によって自身と外界が隔てられている。また、ミトコンドリア、核、葉緑体等の細胞小器官も脂質二重膜によって囲まれており、これらの生体膜には多くの膜蛋白質が存在している。それらの膜蛋白質の中でもとりわけ重要なのが、膜貫通型の膜蛋白質である。この膜貫通型膜蛋白質は全蛋白質中の 20-30%を占めており、細胞外からの物質の取り込みや排出、エネルギー合成、シグナル伝達等の生物の生存に重要な役割を担っている(1)。このように全ての生体膜に存在する膜貫通型膜蛋白質は、構造によって大きく 2 つのグループに分類することができる。1 つは、膜貫通  $\alpha$ ヘリックス型である。この  $\alpha$ ヘリックス型には、膜を 1 回貫通している 1 回膜貫通型と複数回膜を貫通しているヘリックスバンドル型が存在する。1 回膜貫通型の膜蛋白質は、膜に隔てられた親水性領域の両側、または片側に機能を持つ球状ドメインを持つ。代表的な蛋白質はチロシンキナーゼ受容体であり、細胞の分化や分裂等のシグナル伝達に関わっている。一方、ヘリックスバンドル型の膜蛋白質には 1 回膜貫通型の蛋白質と同様に、親水性領域に機能性ドメインを有するものも存在するが、複数のヘリックスが膜を貫通する事によりチャンネルを形成して特異的な輸送を行うものが多く存在する。特異輸送を行う蛋白質の例としては、イオンチャンネルが挙げられる。イオンチャンネルが特定の無機イオンを選択的に通過させることにより、細胞の膜電位は一定に保たれている。これらの  $\alpha$ ヘリックス型の膜蛋白質は全ての生体膜に存在が確認されている。一方、 $\beta$ バレル型と呼ばれる膜蛋白質は、グラム陰性菌、ミトコンドリア、葉緑体の外膜にのみ存在する。この  $\beta$ バレル型の膜蛋白質は、複数の  $\beta$ ストランドが膜を貫通する事によりトンネル状の構造を形成している。これらの膜蛋白質には小分子を通過させるチャンネルとして機能するものや、細菌の病原性に関連するものが存在する。チャンネルとして機能する蛋白質の例としては、グラム陰性菌の外膜に存在するポーリンが挙げられる。この蛋白質は独立した  $\beta$ バレルが 3 つ集まった構造になっており、それぞれの  $\beta$ バレルによって形成される穴は 600 Da 以下の小さな水溶性分子の受動的拡散を可能としている(2)。細菌の病原性に関する  $\beta$ バレル型膜蛋白質の例としては、オートトランスポーターが挙げられる。これらの蛋白質に関しては以

降の章にて詳細を述べる。

## 1-2. 外膜蛋白質の生合成

$\beta$  バレル型の膜蛋白質は、グラム陰性菌、ミトコンドリア、葉緑体の外膜にのみ存在しているため、外膜蛋白質とも呼ばれている。外膜には $\alpha$ ヘリックス型の膜貫通蛋白質も存在するが(3)、それらは例外的な存在である為、ここでは $\beta$ バレル型の膜蛋白質についてのみ記述する。グラム陰性菌に存在する外膜蛋白質は、一般的な蛋白質と同様に細胞質でポリペプチド鎖が合成される(図 1-1)。グラム陰性菌の表層構造は細胞質と接する内膜と、その外側に存在し細胞外環境と接している外膜の 2 種類の膜から構成されている。内膜と外膜の間はペリプラズムと呼ばれており、そこにはペプチドグリカン層が存在している。内膜はリン脂質で構成されているのに対して、外膜の内側の層はリン脂質、外側の層はリポ多糖で構成される非対称的な膜となっている。細胞質で合成された外膜蛋白質が外膜へアセンブリする為には、内膜を透過する必要がある。そのため細胞質で合成された外膜蛋白質前駆体の N 末端には内膜透過の為のシグナル配列が存在する。この配列が内膜に存在する Sec 複合体によって認識されることにより、内膜を透過する事ができる。そして内膜を透過しペリプラズムへと輸送された外膜蛋白質のシグナル配列は、シグナルペプチダーゼ I によって切り離される。こうしてペリプラズムへ輸送された外膜蛋白質は、Bam( $\beta$ -barrel assembly machine)複合体によって自身の持つ $\beta$ シグナル配列が認識され外膜に挿入される(4)。この Bam 複合体による外膜蛋白質の外膜挿入方法は、現在 2 種類のモデルが有力とされている。

## 1-3. Bam 複合体による外膜挿入

外膜蛋白質の外膜挿入に重要な Bam 複合体は、約 200 kDa の複合体で 5 種の蛋白質から構成されている(図 1-2)(4-6)。Bam 複合体の主要構成要素である BamA は、16 本のストランドからなる膜貫通 $\beta$ バレルと、ペリプラズム側に存在する 5 つのポリペプチド輸送補助(POTRA)ドメインで構成される。BamA 膜貫通 $\beta$ バレルの N 末と C 末の $\beta$ ストランドの間は、側方開口部と呼ばれており、

この部分の開閉が BamA の機能に重要であると考えられている(7)。また、Bam 複合体を構成する他 4 つの蛋白質(BamB-E)はリポ蛋白質であり、N 末端に存在する脂質アンカーによって外膜に結合している。生体内では BamA と BamD のみが必須要素とされており、他の蛋白質は基質特異性と複合体の活性を調節していると考えられている(8)。

この Bam 複合体による外膜挿入方法として、現在 2 つのモデルが有力であると考えられている。その 1 つが BamA “出芽” モデルである(図 1-3)。このモデルでは、Bam 複合体によって認識された外膜蛋白質は、側方開口部が開いた BamA の N 末のストランド( $\beta 1$ )と結合する。そして、それを鋳型として $\beta$ ヘアピンが合成される。続いて標的蛋白質のストランド、または $\beta$ ヘアピンが徐々に形成される。そして大きな穴の形成を防ぐ為に、BamA のバレルから標的外膜蛋白質が“出芽”している様な形状をとる。そして全てのストランドが形成されると、標的外膜蛋白質のバレルの N 末ストランドと C 末ストランドが近づき水素結合を形成する。そして独立した $\beta$ バレルが形成され、外膜に拡散される。もう 1 つの外膜挿入モデルは、BamA “補助” モデルである(図 1-4)。BamA のバレル構造は非対称的であり、N 末のストランド( $\beta 1$ )と C 末のストランド( $\beta 16$ )の間の水素結合は、他のストランド間と比較して少ない。それに伴い $\beta 1$ 、 $\beta 16$  近傍のバレル側面は疎水性領域が狭くなっている。これにより脂質膜の配向が局所的に乱され外膜の安定性が下がると考えられる(9)。この外膜の局所的な不安定化によって、標的外膜蛋白質の外膜挿入におけるエネルギー障壁を乗り越えることが容易となる。Bam 複合体による外膜挿入に関しては上記のようなモデルが提案されているが、実際どのように外膜挿入されているかは未だ議論され続けている。

#### 1-4. オートトランスポーター

オートトランスポーター(または第 V 型分泌システム)は、グラム陰性菌が保有する蛋白質のグループであり、病原性に関する機能を持つ。オートトランスポーターには複数種類が存在し、それらは主に 3 つのグループ、単量体のオートトランスポーター (Va 型)、パートナー分泌システム (Vb 型)、三量体オートトランスポーター (Vc 型)に分類される(10)。近年では、Vd 型と Ve 型も分類さ

れている。これら全てのオートトランスポーターは、パッセンジャードメインと膜貫通ドメインで構成されている。パッセンジャードメインは、細胞外に存在する領域で基本的には病原性に関わる機能を持っている。一方、膜貫通ドメインは膜に埋もれた $\beta$ バレル構造であり、パッセンジャードメインを細胞外へ輸送するのに必要なドメインとされている。

このオートトランスポーターの生合成も一般的な外膜蛋白質と同様に、細胞質にてポリペプチド鎖が合成される。細胞質で合成されたオートトランスポーター前駆体は、内膜に存在する Sec 複合体によりシグナル配列が認識され、ペリプラズムへ輸送される。シグナル配列が切断されたオートトランスポーターの膜貫通ドメインは、Bam 複合体によって外膜へ挿入される。そして、膜貫通ドメインの挿入と同時、またはその後パッセンジャードメインが細胞外へ輸送される。このパッセンジャードメインの効率的な輸送には Tam 複合体が必要であることが示されている(11)。Tam 複合体は TamA と TamB の 2 種類の膜貫通蛋白質から構成されている。TamA は、BamA と同じ Omp85 ファミリーに属する蛋白質であり、BamA と構造がよく似ている。しかし、TamA の POTRA ドメインは BamA と異なり 3 つのみである。一方、TamB は N 末端にシグナルアンカー配列を持っており、この部分を内膜に挿入することによってペリプラズムに存在する保存された C 末ドメインを内膜に繋ぎ止めている。このドメインの半分に相当する領域の構造は、2017 年に解析されている。その結果 $\beta$ シートがタコスのように内側の疎水性領域を包み込む $\beta$ タコ構造であることが明らかとなった(12)。またオートトランスポーターが研究され始めた当初は、合成されたオートトランスポーターがペリプラズムに到達すると自発的に外膜にアセンブリし、パッセンジャードメインを細胞外へ輸送すると考えられていた。それゆえに、“オート”トランスポーターという名がつけられた。しかしながら現在では膜貫通ドメインの挿入に Bam 複合体、パッセンジャーの細胞外輸送に Tam 複合体がかかわっていると考えられている(13)。しかし、外膜への挿入やパッセンジャードメインの細胞外輸送の仕組みは未だ明らかになっていない。



#### 1-4-1. 単量体オートトランスポーター

単量体オートトランスポーターは、1本のポリペプチド鎖から構成されるオートトランスポーターである。単量体オートトランスポーターの膜貫通ドメインは、12本の $\beta$ ストランドからなる $\beta$ バレル構造を形成しており、パッセンジャードメインは主に $\beta$ ヘリックス構造を形成している。多くのパッセンジャードメインは、細胞外に輸送された後に膜貫通ドメインから切り離される。そして細胞外に分泌されたパッセンジャードメインは、プロテアーゼやアドヘシンとして働く(14)。このようなパッセンジャードメインの分泌機構の研究は、大腸菌単量体オートトランスポーターのEspPでよく行われている。EspPは腸管出血性大腸菌が持つ病原性因子の1つであり、パッセンジャードメインにセリンプロテアーゼ機能を有している(15)。このEspPにおける研究の結果、膜貫通ドメインは、ペリプラズム空間で部分的に構造を形成することが示された(図1-5)(16)。さらに膜貫通ドメイン外膜挿入時には、膜貫通ドメインとBam複合体が相互作用している事が明らかとなっている。パッセンジャードメインの細胞外輸送に関しては、膜貫通ドメイン外膜挿入時に細胞外に露出したパッセンジャードメインがC末端から構造を形成することにより、パッセンジャードメインがN末からC末の方向で細胞外に巻き上げられると考えられている(17)。

#### 1-4-2. パートナー分泌システム

パートナー分泌システムは、先の単量体のオートトランスポーターとは異なり、パッセンジャードメインと膜貫通ドメインは別々のポリペプチド鎖に存在する。それゆえパートナー分泌システムは、オートトランスポーターと名前を分けて使用される場合が多い。このパートナー分泌システムを構成する2種の蛋白質はTpsA、TpsBと呼ばれており、それぞれパッセンジャードメインと膜貫通ドメインに相当する。TpsBは16本のストランドを持つ $\beta$ バレルと、ペリプラズム側に存在する2つのPOTRA (polypeptide transport-associated)ドメインから構成される(10)。一方、TpsAの多くは長い $\beta$ ヘリックス構造を形成していると予測されている(18)。TpsAの輸送方法としては、TpsBが外膜に挿入することにより形成された穴を、TpsAが通過して細胞外へ輸送されるモデルが考えられている。TpsAのN末端には、高く保存された配列を含む約300残基のTPSドメイン

が存在しており、このドメインと TspB の POTRA ドメインが結合することによって TspA の輸送が開始される(19)。Mazer と Cotter は百日咳菌主要接着因子の糸状ヘマグルチニン(FHA)を用いた実験から、TPS ドメインと POTRA ドメインが結合を保ちつつ、TpsA が N 末から C 末の方向に輸送されるというモデルを提案した(図 1-6)。このモデルはパッセンジャードメインの輸送方向は異なるが、単量体オートトランスポーターで提案されたモデルと良く似ている(20)。一方、インフルエンザ菌高分子量接着因子の HWM1 (TspA)の最終的なトポロジーは FHA の TspA と異なり C 末端がペリプラズムに残る。HWM1 の C 末端にはジスルフィド結合が含まれており、このジスルフィド結合によって HWM1 が HWM1B (TspB)によって形成されるバレルの穴を通り抜けてしまう事を防いでいる(図 1-6)。また、この HWM1 の TPS ドメインは成熟蛋白質では切り離されているという事が知られているが、この TPS ドメインの切断が細胞内で行われるか、細胞外で行われるかは明らかとなっていない。このような HWM1 の細胞外輸送の方法は、TspA が N 末端から TspB の穴を通して輸送されるモデルが提案されている(10)。

#### 1-4-3. 三量体オートトランスポーター

三量体オートトランスポーターは3本のポリペプチド鎖から構成されるオートトランスポーターであり、病原性を持つ多くのグラム陰性菌において重要な病原性因子である。この三量体オートトランスポーターは接着因子として機能しており、パッセンジャードメインドメインを切り離す機能は持っていない。また、三量体オートトランスポーターの膜貫通ドメインは、単量体オートトランスポーターと同様に 12 本の $\beta$ ストランドから構成される $\beta$ バレル構造を形成している。しかし、単量体オートトランスポーターとは異なり、 $\beta$ ストランドは各サブユニットから 4 本ずつ提供され、3 つのサブユニットで 1 つの $\beta$ バレルを形成している。さらにパッセンジャードメインは似た構造を持つドメインの繰り返しで構成されており、細胞外へ長く伸びている(21)。過去の研究により、パッセンジャードメインの輸送には膜貫通ドメインの三量体化が重要であること、大腸菌三量体オートトランスポーターの YadA の外膜挿入では Bam 複合体が必要である事が明らかとなっている(22,

23)。しかしながら、膜貫通ドメインの外膜挿入機構やパッセンジャードメインの細胞外輸送機構に関してはほとんど研究がなされておらず、これらについてはほとんど明らかとなっていない。よって、本研究では三量体オートトランスポーターの三量体形成機構を明らかにすることを目的とした。

#### 1-4-4. インフルエンザ菌由来アドヘシン

三量体オートトランスポーターの一種であるインフルエンザ菌由来アドヘシン(Hia)は、感染の初期段階において宿主細胞への接着を仲介する重要な役割を持つ蛋白質である。この蛋白質は他のオートトランスポーターと同様に、細胞外へ輸送されるパッセンジャードメインと外膜に埋もれアンカーとしての役割を果たす膜貫通ドメインからなる。パッセンジャードメインは3本のポリペプチド鎖が撚り合わさったような構造をしており、このロープ状のポリペプチド鎖には宿主細胞に接着するための結合ドメインが含まれている(図 1-7)(24)。三量体オートトランスポーターの配列解析を行う daTAA サーバーを用いて Hia のアミノ酸配列(GenBank: AAL79949.1)を解析した結果、パッセンジャードメインには5つのドメイン型が含まれており、これらのドメインが繰り返されることによってパッセンジャードメインが形成されていることが予測された(図 1-8)。このパッセンジャードメインは部分的に構造が解析されており、残基番号 51-166 (PDBID:1s7m)、307-422 (PDBID:3emi)、549-706 (PDBID:3emf)の構造が明らかとなっている。残基番号 51-166 と 549-706 の領域は結合ドメイン(BD2、BD1)であり、同じ宿主細胞のレセプターと相互作用することが示されているが、レセプターの種類は明らかになっていない。さらに、2つの結合ドメインの結合親和性は異なっており、パッセンジャードメインのおおよそ中央部に存在する BD1 は、C 末端に存在する BD2 ドメインよりも高い親和性を持つ。BD1 の残基番号 585~705 と BD2 の 50~166 は配列相同性を持っており、アミノ酸配列の 44%が一致、76%が類似のアミノ酸で構成されている。そして立体構造においてもよく似た構造となっている。BD1 の結合ポケットは、残基番号 618 のアスパラギン酸、620 のアラニン、656 のバリンで構成されている。一方、BD2 では BD1 の残基番

号 618 にあたるアミノ酸がグルタミンとなっており、この相違が結合親和性の違いを生み出していると考えられている(25)。

また、膜貫通ドメインにおいてはパッセンジャードメインの一部を含む膜貫通ドメイン(残基番号 992-1098)と、SDS 電気泳動にて三量体構造を維持できる限界までパッセンジャードメインを切り詰めた膜貫通ドメイン(残基番号 1022-1098)の結晶構造は、2006 年に Meng らによって解析されている(26)。さらに 2008 年には、973 番目から 1098 番目の残基を含む膜貫通ドメインの結晶構造が解かれた(24)。その結果、Hia 膜貫通ドメイン(HiaT)は各サブユニットから 4 本、計 12 本の $\beta$ ストランドからなる $\beta$ バレル構造を形成し、バレル中心には $\alpha$ ヘリックスが3ヘリックスバンドルを形成していることが明らかとなった(図1-9)。この HiaT のバレル内部には特徴的な配置を持つアルギニン残基が存在しており、これらのアルギニン残基はバレルを構成する $\beta$ ストランドからバレル中心に向かって側鎖を伸ばしている(図 1-10)。そして、アルギニン側鎖の先端はバレル中心で集まり、お互いに近い位置に存在している。アルギニンは正電荷を持つアミノ酸であり、このように電荷を持つアミノ酸がバレル中心に集まるような配置は、互いに静電反発を引き起こすと考えられる。このような静電反発は 3 本のポリペプチド鎖が集まりバレル構造を形成する際や、三量体構造の安定性に不利な影響を及ぼすと考えられる。このように構造形成や安定性に不利な影響を及ぼす相互作用が、蛋白質の中心に存在することは不合理であると考えられる。よってこのアルギニン同士の静電反発が、HiaT の三量体形成に何かしらの影響を与えているのではないかと考えた。それゆえ、このアルギニンによる静電反発の三量体形成への影響を調べる事により、HiaT の三量体形成機構を明らかとする事が出来るのではないかと考えた。本研究では精製した HiaT 三量体をギ酸で解離させ、試験管内で再び三量体を形成する事を試みた。また、1077 番目のアルギニンを他のアミノ酸に置換することにより、アルギニンによる静電反発が三量体形成に与える影響を調べた。

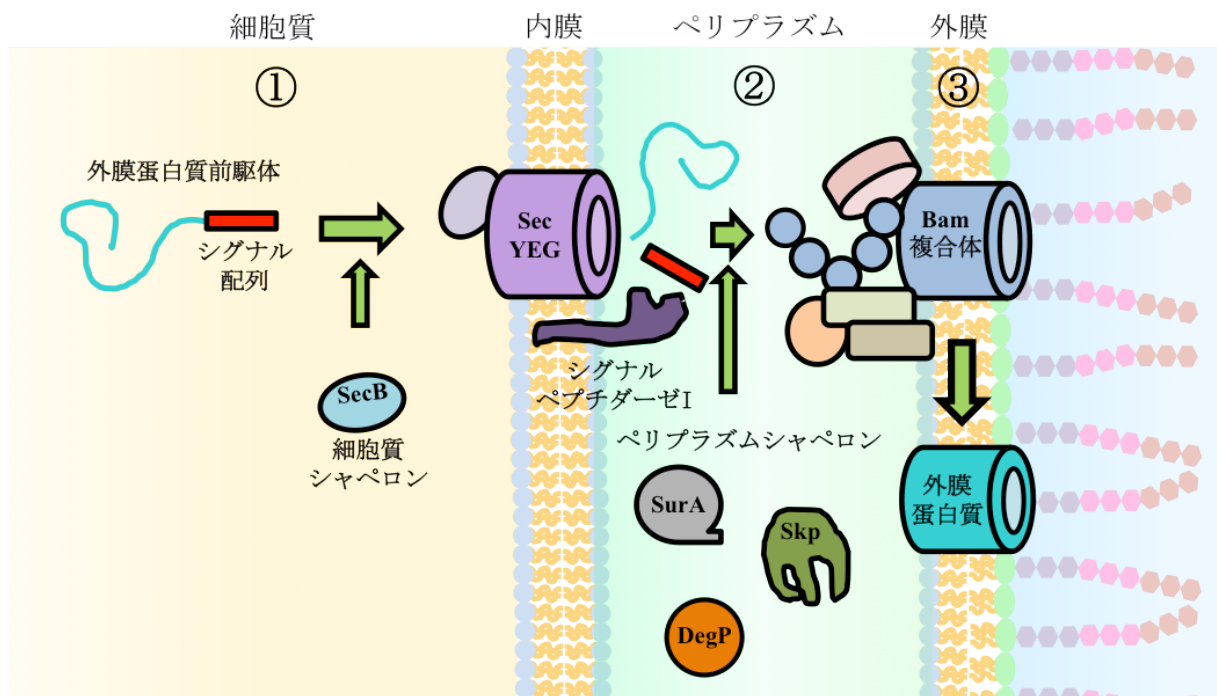


図 1-1. 外膜蛋白質の生合成モデル

細胞質で合成されたシグナル配列を含む外膜蛋白質前駆体は、SecB などの細胞質シャペロンに保護されながら Sec 複合体へ運ばれる(①)。Sec トランスロコン(SecYEG)を通りペリプラズムに輸送された外膜蛋白質は、シグナルペプチダーゼ I によってシグナル配列が切断される(②)。その後、ペリプラズムに存在するシャペロンに保護され、Bam 複合体に運ばれた後、外膜へ挿入される(③)。

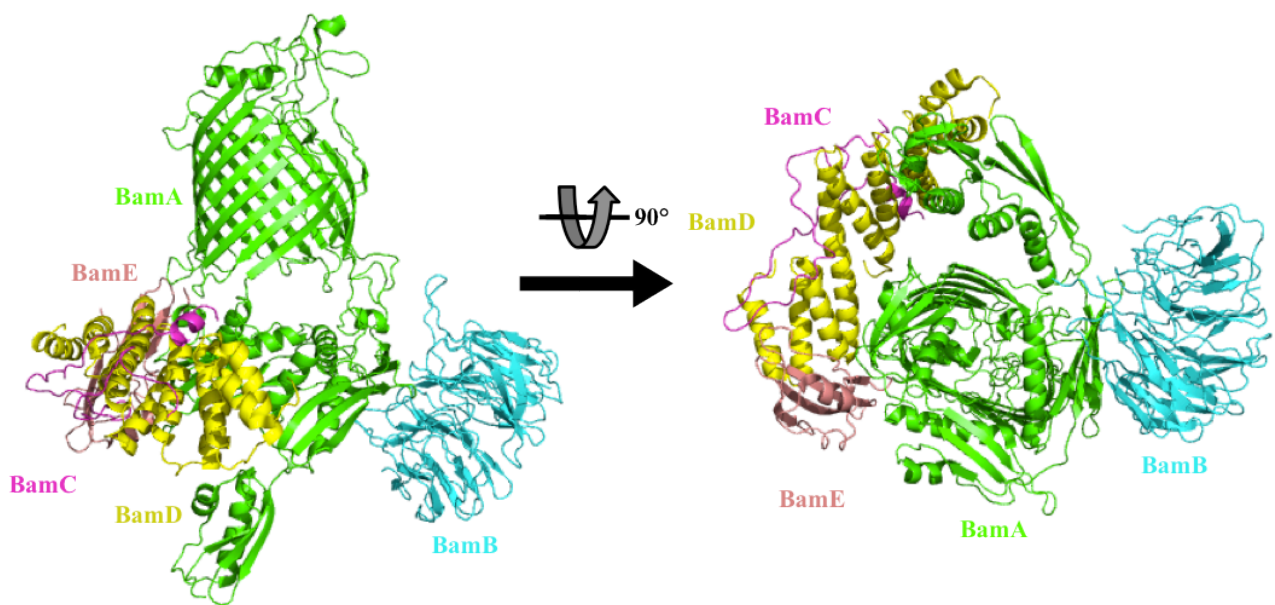


図 1-2. Bam 複合体の結晶構造

Bam 複合体の結晶構造(PDBID : 5D00)をリボン表示で示した。緑色は BamA、水色は BamB、赤紫色は BamC、黄色は BamD、乾鮭色は BamE を示す。左側の図は、BamA の膜貫通領域 ( $\beta$  バレル部分) を側面から見える様に配置した Bam 複合体である。右側の図は、左の図を  $90^\circ$  回転させたもので、Bam 複合体をペリプラズム側から見た図である。

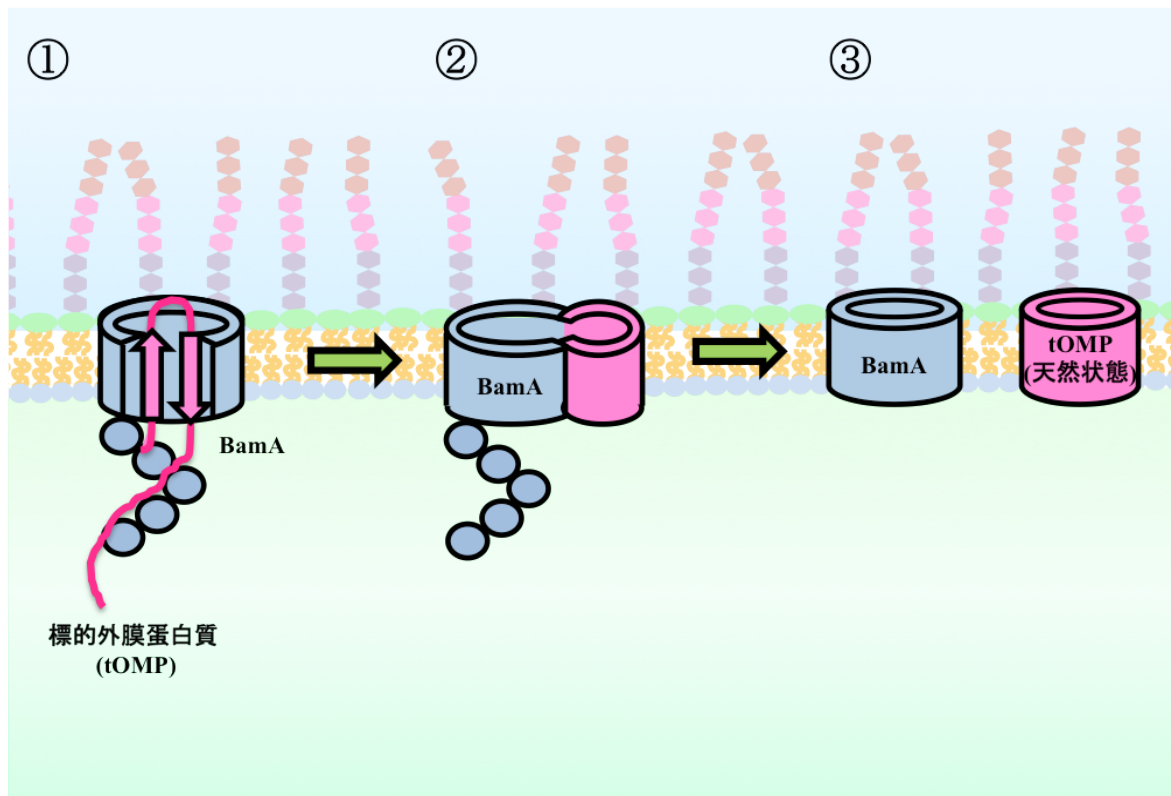


図 1-3. BamA 出芽モデル

細胞質で合成されペリプラズムへ輸送された標的外膜蛋白質(tOMP)は、BamA によって認識される。次に BamA の N 末ストランド( $\beta 1$ )を鋳型として、BamA の N 末ストランド( $\beta 1$ )と C 末ストランド( $\beta 16$ )の間に標的外膜蛋白質の $\beta$ ヘアピンが形成される(①)。1 本または 2 本ずつ標的蛋白質の $\beta$ ストランドが形成され、BamA から標的蛋白質の $\beta$ バレルが出芽したような形状となる(②)。標的蛋白質の全てのストランドが形成されると、標的蛋白質の N 末と C 末のストランドが接近して水素結合を形成し、外膜へ放出される(③)。

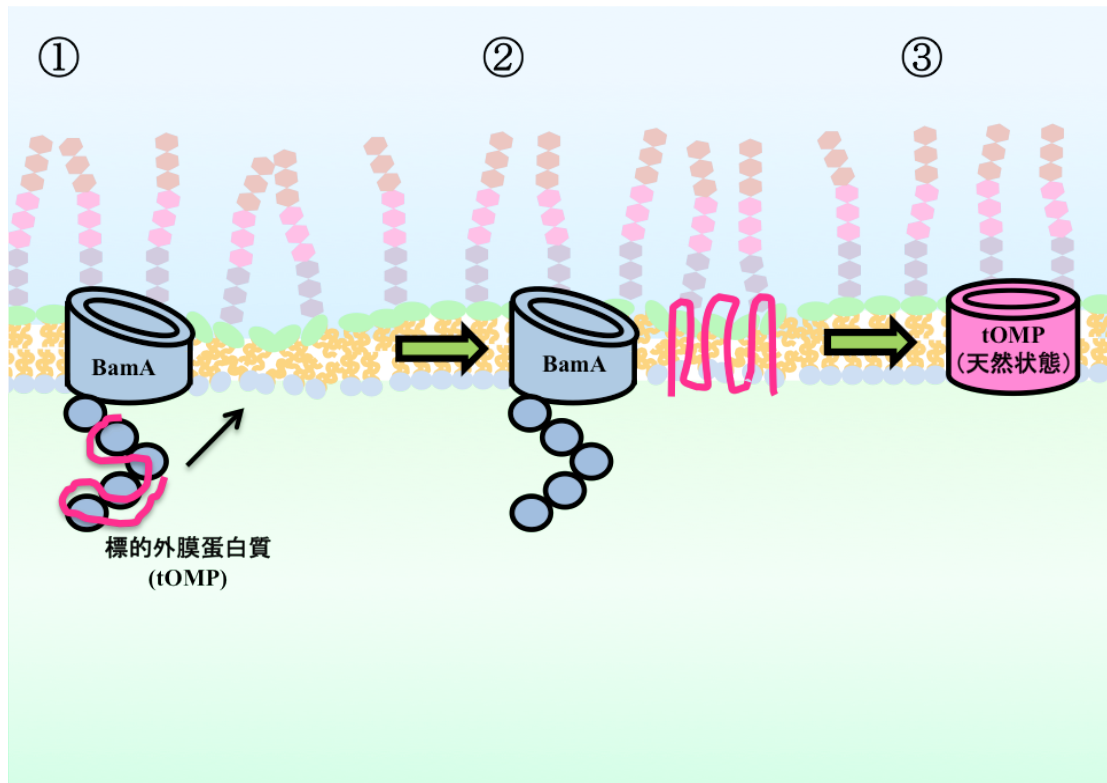


図 1-4. BamA 補助モデル

ペリプラズムへ輸送された標的外膜蛋白質は、BamA によって認識される(①)。BamA が形成するバレルは N 末と C 末の $\beta$ ストランド付近が外膜より薄くなっており、それにより外膜の配向が乱される。そして、外膜の乱された部分へ直接標的外膜蛋白質が挿入される(②)。その後、標的外膜蛋白質は天然構造を形成する(③)。



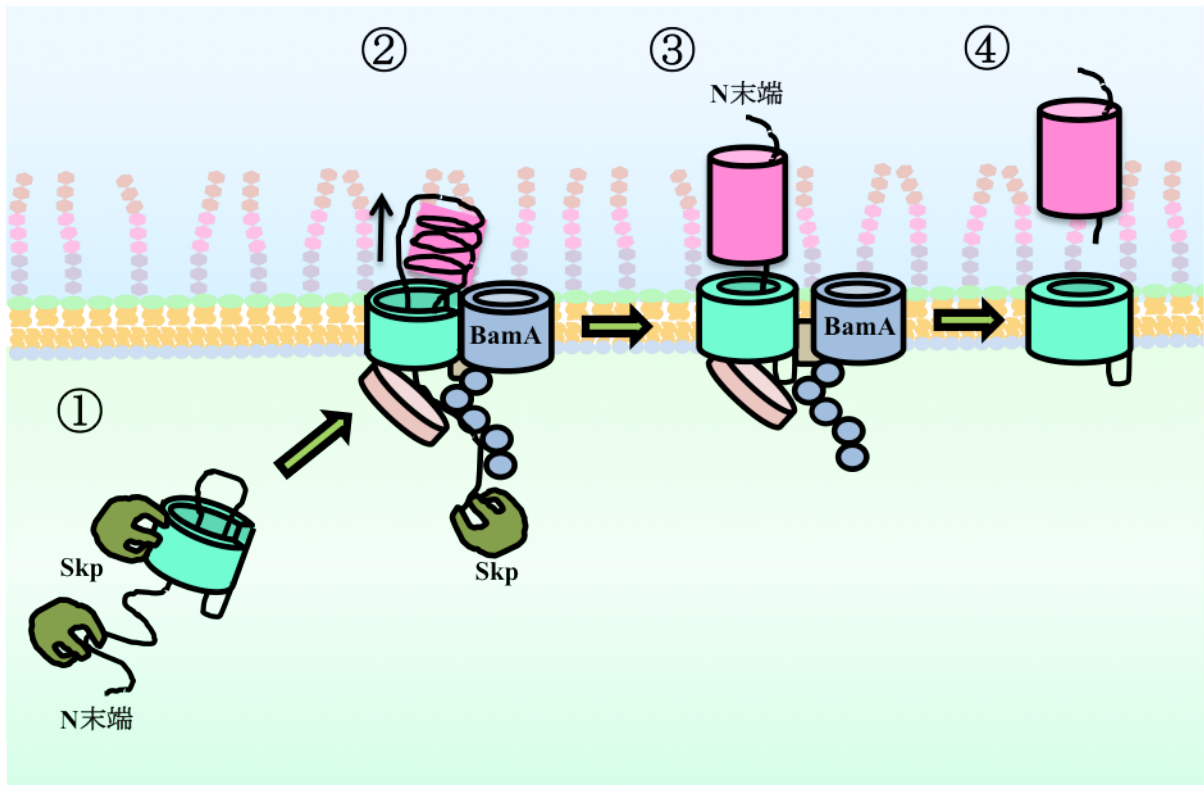


図 1-5. 単量体オートトランスポーターの生合成モデル

Sec 複合体によりペリプラズムに輸送された単量体オートトランスポーター蛋白質は、ペリプラズムにてバレル構造の元となる構造を形成する。そして、その蛋白質はペリプラズムシャペロンの Skp によって保護されている(①)。Skp によって保護されたオートトランスポーター中間体は、BamA によって膜貫通ドメインの C 末端が認識され外膜に挿入される(②)。そして、パッセンジャードメインの C 末が構造を形成(桃色部分)することにより、パッセンジャードメインが細胞外へ巻き上げられる(②、③)。細胞外へ輸送されたパッセンジャードメインの多くは切断され、細胞外へ放出される(③)。

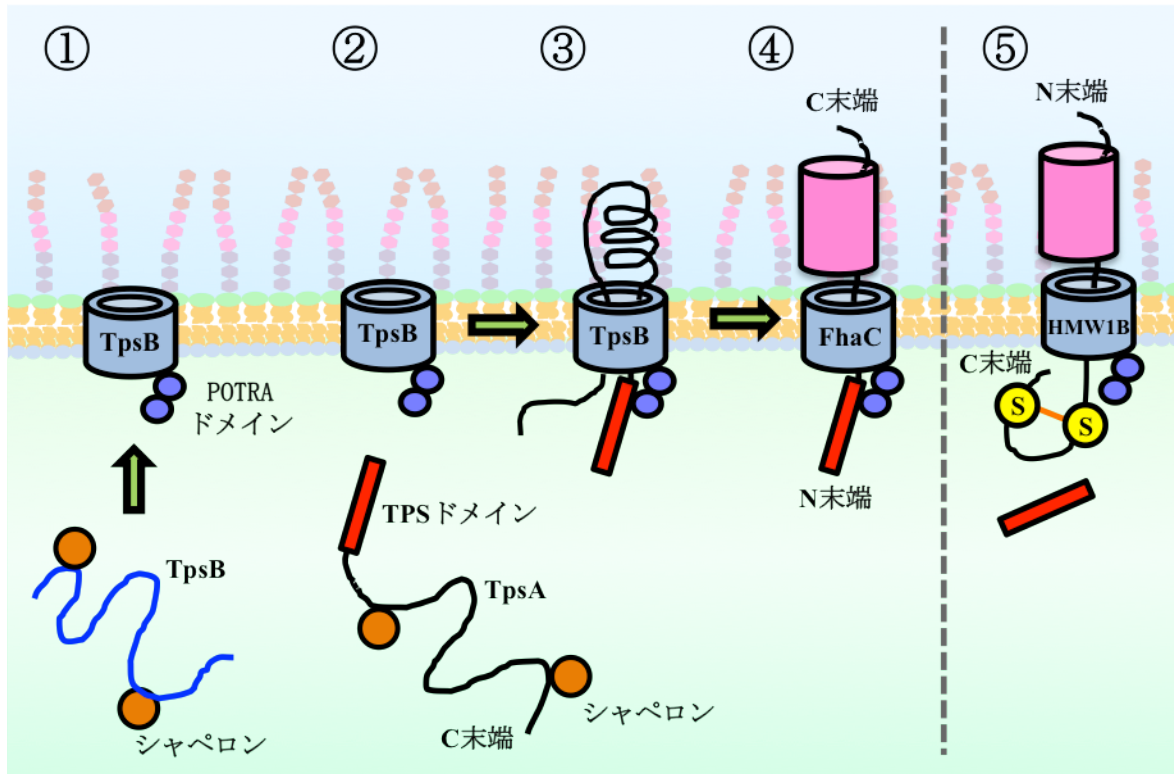


図 1-6. パートナー分泌システム蛋白質の生合成モデル

Sec 複合体によりペリプラズムに輸送された TpsB は外膜に膜貫通βバレルを形成する(①)。同様にペリプラズムに輸送された TpsA の N 末端には TPS ドメインが存在しており(②)、このドメインが TpsB の POTRA ドメイン(紫色)に認識される(③)。FHA 蛋白質では TpsA が構造を形成する事により細胞外へ輸送されると考えられている(③、④)。一方、HMW1(TpsA)は、FHA と異なり N 末端が細胞外へ露出している(⑤)。そして C 末にはジスルフィド結合(橙色の線)が形成されている事から、HMW1 の輸送は N 末端から輸送されるモデルが提案されている。

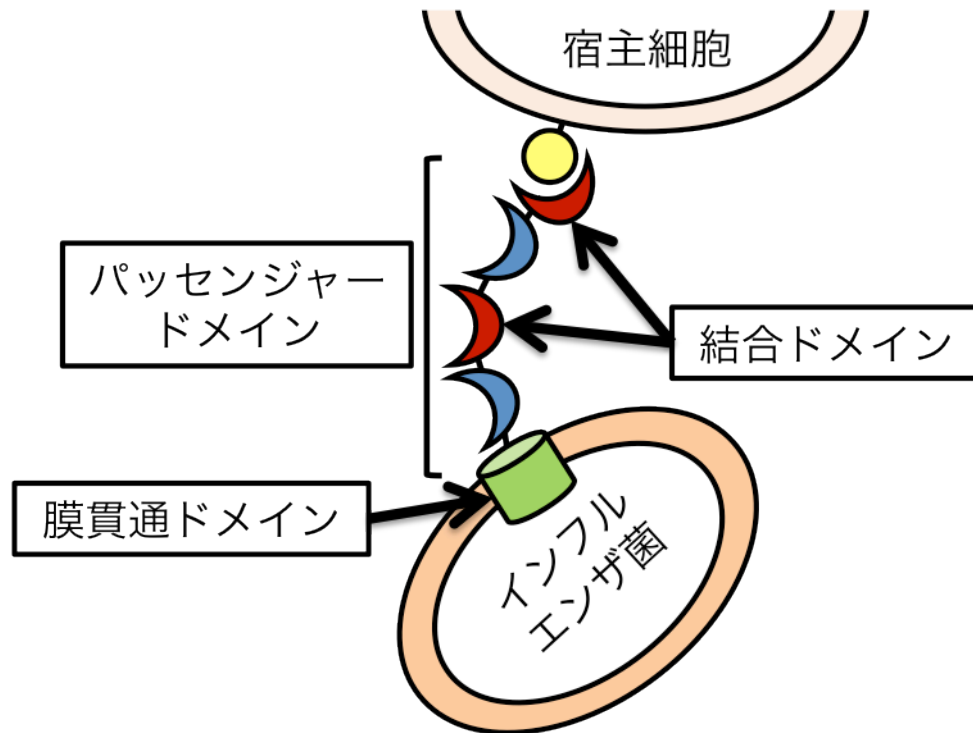


図 1-7. Hia による宿主細胞への結合モデル

外膜に存在する Hia の膜貫通ドメインから細胞外へ長く伸びるパッセンジャードメインには、結合ドメインが 2 箇所存在している。それらのドメインが宿主細胞のレセプターを認識し、結合する事によりインフルエンザ菌を宿主細胞へ固定する。

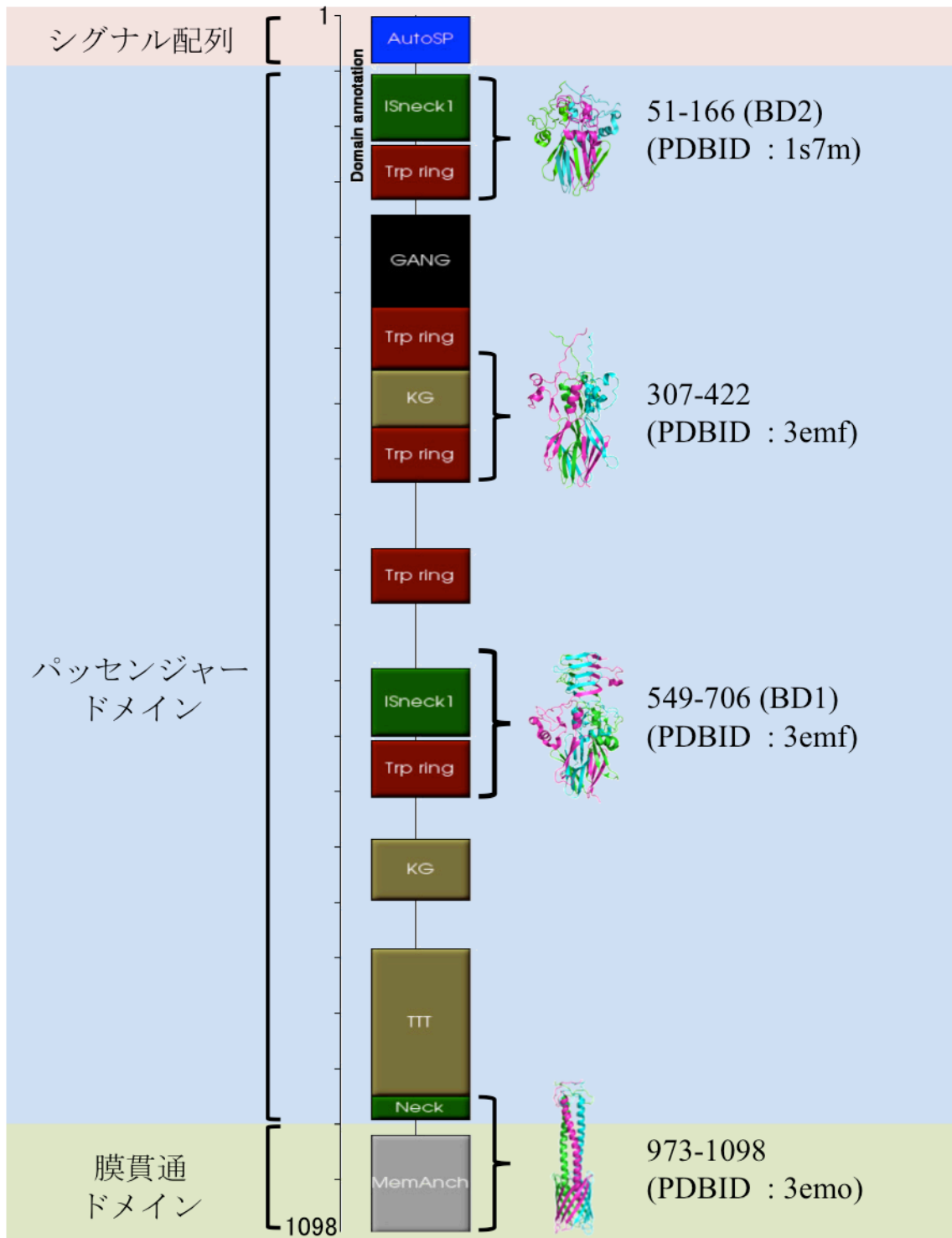


図 1-8. Hia の繰り返しドメイン構造

daTAA サーバーを用いた Hia のドメイン予測の結果を示した。構造が明らかとなっている部分については、予測結果の右側にリボン表示の構造と残基番号を示した。BD1 と BD2 は、結合ドメインを示す。

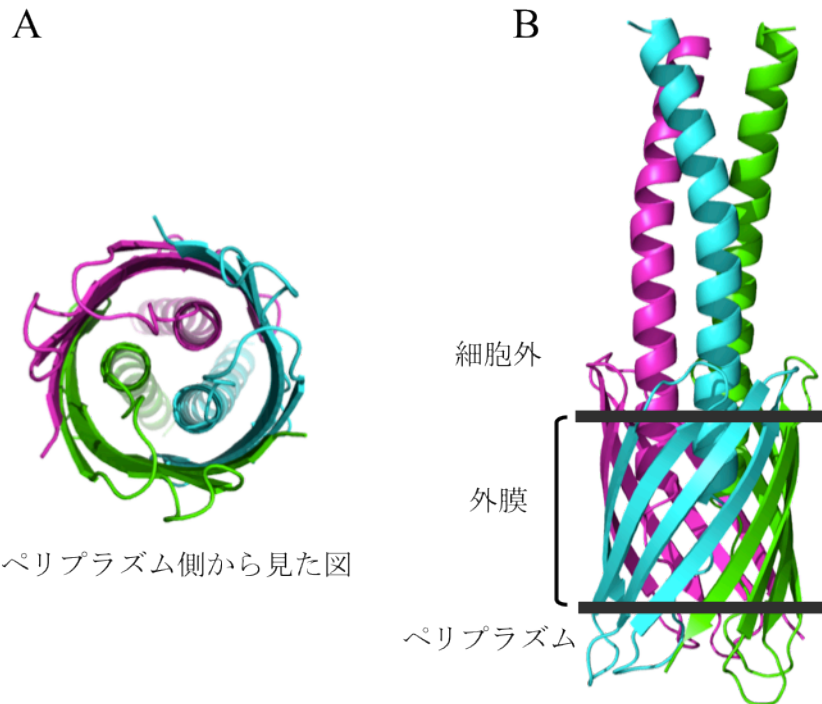


図 1-9. HiaT (残基番号 992-1098)の結晶構造

HiaT (PDBID:2gr7)の結晶構造をリボン表示で示し、各サブユニットで色分けを行った。A は HiaT の $\beta$ バレルをペリプラズム側から、B はバレル構造を横から見た構造を示した。膜との境界は太線で示した。

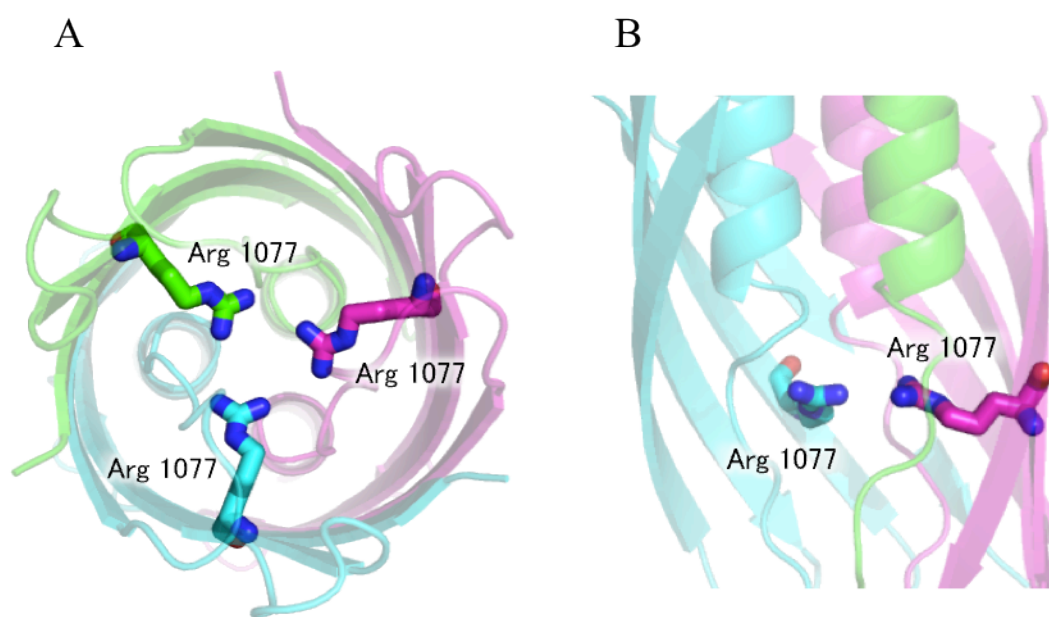


図 1-10. 特徴的なアルギニン残基

HiaT の $\beta$ バレル内に存在する特徴的な 1077 番目のアルギニン残基の位置を示した。Hia の残基番号 1022-1098 (PDBID:2gr8)の結晶構造をリボン表示で示し、1077 番目のアルギニンはスティック表示で示した。A はバレル内部をペリプラズム側から見た構造であり、B はバレルを横から見た構造である。B では 1 サブユニットの $\beta$ シートを非表示とした。

## 2. HiaT 発現系の確立

### 2-1. 序

膜蛋白質のアセンブリ実験を行うには、大量の蛋白質が必要となる。しかし、膜蛋白質は一般的に水溶性蛋白質より大量に得る事が難しいということが知られている。その理由としては、膜蛋白質は生体膜という限られた場所に存在しているという事が挙げられる。さらに、多くの膜蛋白質は疎水性の細胞膜に埋もれている。この膜蛋白質を得る為には、膜に埋もれている時の構造や活性を維持したまま可溶化しなければならない。これも膜蛋白質の大量精製が容易ではないといわれている一因である。外膜に存在する $\beta$ バレル型の膜蛋白質は、内膜や多くの生体膜に存在する $\alpha$ ヘリックス型の膜蛋白質より一般的に安定である。さらには、界面活性剤存在下で構造の再構成が可能であることが多い。それゆえ、大腸菌の細胞質で故意に凝集状態として発現させ、精製時に天然構造へ再構成させるという方法が存在する。この方法は、内膜透過の為のシグナル配列を欠失させた状態で外膜蛋白質を発現させることにより、行き場を無くした蛋白質を細胞質に蓄積させ凝集させるというものである(27)。この方法を用いると、発現量が膜の面積に制限されない為、大量に目的の蛋白質が得られる可能性がある。例を挙げると、大腸菌主要外膜蛋白質の Outer membrane protein A (OmpA)では、膜へ発現させた時の 20 倍の収量が得られたという報告がある(27)。

大腸菌における HiaT の発現系は、既に Meng らによって構築されている(26)。その発現系では、tet プロモーターを有するベクター pASK-IBA12 を用いている。このベクターで HiaT を発現させると N 末端に大腸菌 OmpA のシグナル配列、その下流に精製用の Strep-tag が付加される。この系で発現させた HiaT はシグナル配列によって内膜を透過した後、外膜に挿入される(26)。本研究では、さらなる発現量向上の為に T7 プロモーターを有する pET-3c ベクターを用いて HiaT を発現させる事を試みた。T7 プロモーターは tet プロモーターより強力なプロモーターであり、蛋白質によっては tet プロモーターで発現するより高レベルで蛋白質が発現する可能性がある。ここでは、pET-3c ベクターを用いて 2 種類の発現ベクターを構築した。1 つは、以前構築されたものと同様に HiaT の N 末端に OmpA シグナル配列、その下流に Strep-tag を付加したものである。もう 1 つは HiaT の N 末端に Strep-tag のみを付加したもので、シグナル配列を有していないものである。

この発現系ではシグナル配列が欠失しているので、細胞質で封入体を形成することが期待される。

これら 2 種類の発現ベクターを用いて、大腸菌での HiaT の発現、精製を試みた。



## 2-2. 方法

### 2-2-1. 試薬

HiaT (残基番号 992-1098) 遺伝子の合成は、Eurofin Genomics K.K. (Tokyo, Japan)に依頼した。pET-3c ベクターと pASK-IBA12 ベクターは、それぞれ IBA (Göttingen, Germany)と Novagen (WI, USA) から購入した。ウサギ抗 Strep-tag、抗 OmpA、抗 pntB (NAD(P) transhydrogenase subunit beta) 抗体は、それぞれ Gene Tex (TX, USA)、Antibody Research Corporation (MO, USA)、MyBioSource (CA, USA)から購入した。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体は Jackson Immuno Research (PA, USA)から購入した。EzWestLumiOne とクリアプロット・P プラス膜は ATTO (Tokyo, Japan) から購入した。Elugent と n-Octyltetraoxyethylene (C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>) は、それぞれ Calbiochem (CA, USA) と Bachem AG (Bubendorf, Switzerland) から購入した。Strep-tactin Chromeo 488 conjugate は、IBA から購入した。UC チューブ(14×89mm)は、Beckman Coulter (CA, USA)から購入した。

### 2-2-2. プラスミドの構築

pASK-IBA12 を用いた HiaT 発現ベクター(pASK-HiaT)は以前の研究で作製されたものを使用した(28)。次に、pASK-IBA12 由来のシグナル配列、Strep-tag、スロンビン認識サイトを含む DNA 断片と、合成された HiaT 遺伝子をつなぎ合わせた。つなぎ合わせた遺伝子を pET-3c の *NdeI* サイトと *BamHI* サイトの間に挿入する事により pET-SigHiaT 発現ベクターを構築した(図 2-2-1)。また、同様の方法を用いてシグナル配列を含まない発現ベクター、pET-HiaT を構築した(図 2-2-2)。

### 2-2-3. pASK-IBA12 ベクターを用いた HiaT の発現

pASK-HiaT で形質転換を行った *E. coli* BL21 (DE3)を、OD<sub>600</sub>=0.7 に達するまで LB 培地を用いて 37°C で培養した。蛋白質の発現誘導の為に anhydrotetracycline を最終濃度 0.2 mg/L になるように加

え、4時間振盪培養を行った。そして、遠心によって大腸菌を沈殿させる事により集菌を行った。

#### 2-2-4. pET システムを用いた HiaT の発現

pET-SigHiaT 発現ベクターまたは pET-HiaT 発現ベクターで形質転換した *E. coli* BL21(DE3)を、LB 培地にて OD<sub>600</sub>=0.7 に達するまで 37°C で培養した。蛋白質の発現誘導の為に β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)を最終濃度 0.4 mM になるように加え、1、2、4 時間振盪培養を行った。その後、遠心によって大腸菌を沈殿させる事により集菌を行った。

#### 2-2-5. HiaT の精製

集菌した HiaT 発現大腸菌を phosphate-buffered saline (PBS)で懸濁し、超音波破砕機で大腸菌の破砕を行った。HiaT の可溶化と精製は、以前 Meng らによって確立された方法に従って行った(26)。まず、破砕を行った大腸菌を遠心して不可溶性画分を含む外膜画分を沈殿させた。界面活性剤 Elugent (5%[w/v])を含んだ溶液で、沈殿を懸濁することにより HiaT の可溶化を行った。可溶化した HiaT は、Strep-tactin カラムによって精製した。各培養時間の収量確認では、このカラムの溶出液をサンプルとして SDS 電気泳動を行った。蛋白質はクーマシーブリリアントブルー(CBB)染色で検出した。LAS-3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan)で SDS 電気泳動ゲルの撮影を行い、ImageJ(29)を用いて検出されたバンドの数値化を行った。蛋白質濃度は、濃度既知の HiaT 蛋白質を基準として算出した。基準用 HiaT は、Strep-tactin カラムによる精製の後、さらに陰イオン交換カラムの Q-Sepharose、陽イオン交換カラムの SP-Sepharose によって精製を行った。最後に、SP-Sepharose を用いて界面活性剤を Elugent から C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>に置換して精製を完了とした。この精製した HiaT の濃度は、280 nm の吸光度を測定することにより決定した。これを HiaT 三量体のマーカーまたは濃度決定用の基準蛋白質として使用した。

また、単量体 HiaT のマーカーを作製する為に、精製した HiaT 溶液を蒸留水で 5 倍希釈し、さら

にアセトンを4倍量加えた。その後、30分間のインキュベートにより蛋白質を沈殿させた。遠心後、上清を除くことにより界面活性剤を除去した。沈殿を80%アセトンで洗浄した後、遠心によって上清を除き、沈殿を風乾させた。乾燥させた沈殿に70%ギ酸を加えて30分間インキュベートを行い、HiaT三量体を解離させた。遠心濃縮器を用いてギ酸を除き、得られたHiaT単量体の乾燥粉末を8M尿素で可溶化した。これをシグナル配列を含まない単量体HiaTマーカーとして使用した。

#### 2-2-6. HiaT 発現大腸菌の細胞分画

HiaTを4時間発現させた大腸菌培養液の遠心を $5000 \times g$ 、10分、 $4^{\circ}\text{C}$ で行い、集菌を行った。集菌した大腸菌は、 $\text{OD}_{600}=15$ と同等の密度になるように懸濁用溶液(0.75 M sucrose, 10 mM Tris-HCl [pH 7.5])で懸濁した。次にリゾチーム(最終濃度  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、PMSF (最終濃度 2 mM)、2倍量の 1.65mM EDTA (pH 7.5)を順に加えた。その後、大腸菌の超音波破碎を行った。破碎液を $5000 \times g$ 、10分、 $4^{\circ}\text{C}$ で遠心して得られた沈殿を不溶性画分(IS)とした。次に、先の遠心により得られた上清を $130\,000 \times g$ 、45分、 $4^{\circ}\text{C}$ で遠心して上清と沈殿に分けた。こうして得られた上清を可溶性画分(S)、沈殿を膜画分(M)とした。それぞれの画分は4%SDS サンプルバッファー中で5分間加熱処理を行い、10-15%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS電気泳動を行った。電気泳動で分離した蛋白質をPプラス膜(PVDF膜)に転写し、Tween-20を含むTris-buffered saline (TBS-T; 20 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.1% [w/v] Tween-20)で溶解させた5%スキムミルクで転写膜のブロッキングを行った。蛋白質をそれぞれ抗 Strep-tag 抗体(5% スキムミルク/TBS-T で 100000 倍希釈)、抗 OmpA 抗体 (5% スキムミルク/TBS-T で 100000 倍希釈)で標識した後、HRP 標識二次抗体(5% スキムミルク /TBS-T で 10000 倍希釈)と EzWestLumiOne で標識蛋白質の可視化を行った。シグナルの検出は LAS-3000 を用いて行った。

#### 2-2-7. フローサイトメトリー

各時間 HiaT を発現させた大腸菌培養液を遠心して集菌を行った。約  $1 \times 10^8$  個の菌体を PBS で 2 回洗浄後、Chromeo 488 標識 Strep-tactin 溶液(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )で懸濁を行い、4°C、1 時間のインキュベーションを行った。菌体を PBS で 2 回洗浄した後、4 %パラフォルムアルデヒドで細胞固定を行った。固定後さらに PBS で菌体を 2 回洗浄し、菌体を 1 mL PBS で懸濁した。この菌体懸濁液を希釈し、FACS Aria III フローサイトメーター(BD Bioscience, NJ, USA)を用いて HiaT の細胞表面への発現を確認した。

#### 2-2-8. イムノブロッティング

各時間 HiaT を発現させた大腸菌培養液(OD<sub>600</sub>=1、20 mL)を遠心して集菌を行った。10 mM HEPES (pH 7.4)で菌体を洗浄した後、10 mM HEPES (1mL)で懸濁を行った。超音波破碎後、5000×g、10 分、4°Cで遠心して上清と沈殿に分離した。上清を可溶性蛋白質と膜蛋白質を含む画分 (S+M)、沈殿を不可溶性画分 (IS)とした。それぞれの画分の蛋白質は、4%SDS サンプルバッファー中で 5 分間加熱処理した後、10-15%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS 電気泳動によって分離した。電気泳動で分離した蛋白質を P プラス膜に転写し、TBS-T で溶解した 5%スキムミルクで転写膜のブロッキングを行った。蛋白質を抗 Strep-tag 抗体(5% スキムミルク/TBS-T で 100000 倍希釈)で標識した後、HRP 標識二次抗体(5% スキムミルク/TBS-T で 10000 倍希釈)と EzWestLumiOne で抗体標識蛋白質の可視化を行った。シグナルの検出は LAS-3000 を用いた。

#### 2-2-9. ショ糖濃度勾配遠心

5mM EDTA (pH 7.4)を含む 30, 35, 40, 45, 50, 55% (w/w)のショ糖溶液を、UC チューブ(14×89mm)に 1.8 mL ずつ重層することにより段階的なショ糖濃度勾配を作製し、2-2-6.で分画した総膜画分 (1mL)を上層した。W40Ti ローター(Beckman Coulter, CA, USA)を用いて、膜総画分を上層したショ

糖溶液を  $256\,000 \times g$ 、17 h、4 °C で遠心することにより、外膜と内膜を分離した。遠心を行った溶液は 0.5 mL ずつ分画し、4% SDS サンプルバッファー中で 5 分加熱処理を行った。それぞれのサンプルは 10–15%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS 電気泳動を行った。電気泳動で分離した蛋白質を P プラス膜に転写し、TBS-T で溶解した 5%スキムミルクでブロッキングを行った。蛋白質をそれぞれ抗 Strep-tag 抗体、抗 OmpA 抗体、抗 pntB 抗体(5% スキムミルク/TBS-T で 100000 倍希釈)で標識した後、HRP 標識二次抗体と EzWestLumiOne で標識蛋白質を可視化した。シグナルの検出は LAS-3000 を用いて行った。

```

      10      20      30      40      50      60
CATATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCG
  M K K T A I A I A V A L A G F A T V A

      70      80      90      100     110     120
CAGGCCGCTAGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATCTGGTGGTGGTGGTGGTCTGGTT
  Q A A S W S H P Q F E K S G G G G G L V

      130     140     150     160     170     180
CCGCGTGGCTCCCGGAGAATTCGGAATGGGAGTCAGCTGTATGCCGTTGCGAAAGGTGTG
  P R G S P R I R N G S Q L Y A V A K G V

      190     200     210     220     230     240
ACGAATCTGGCTGGTCAGGTGAACAACCTGGAAGCAAAGTCAACAAGTTGGCAAACGT
  T N L A G Q V N N L E G K V N K V G K R

      250     260     270     280     290     300
CGCGATGCTGGCACAGCGAGTGCCTTAGCCGCATCTCAACTGCCGCAAGCAACCATGCCG
  A D A G T A S A L A A S Q L P Q A T M P

      310     320     330     340     350     360
GGTAAATCTATGGTTGCTATCGCTGGTTCCTCTTACCAGGGCCAGAACGGCCTGGCTATC
  G K S M V A I A G S S Y Q G Q N G L A I

      370     380     390     400     410     420
GGTGGTTTCTCGTATCTCTGACAACGGTAAAGTTATCATCCGTCTGTCTGGTACTACTAAC
  G V S R I S D N G K V I I R L S G T T N

      430     440     450     460     470
TCTCAGGGTAAACTGGTGTAGCTGCTGGTGGTTACCAGTGGTAAAGGATCC
  S Q G K T G V A A G V G Y Q W *

```

図 2-2-1. pET-SigHiaT における蛋白質発現領域の配列

各領域は、以下の色で示した。

*NdeI/BamHI* サイト：緑色

シグナル配列：青色

Strep-tag：橙色

スロンビン認識サイト：藤色

HiaT (残基番号 992-1098)：赤紫色

```

      10      20      30      40      50      60
CATATGGCTAGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATCTGGTGGTGGTGGTGGTCTGGTT
  M A S W S H P Q F E K S G G G G G L V

      70      80      90     100     110     120
CCGCGTGGCTCCCCGAGAATTCGGAATGGGAGTCAGCTGTATGCCGTTGCGAAAGGTGTG
  P R G S P R I R N G S Q L Y A V A K G V

     130     140     150     160     170     180
ACGAATCTGGCTGGTCAGGTGAACAACCTGGAAGGCAAAGTCAACAAGGTTGGCAAACGT
  T N L A G Q V N N L E G K V N K V G K R

     190     200     210     220     230     240
CGGGATGCTGGCACAGCGAGTGCCTTAGCCGCATCTCAACTGCCGCAAGCAACCATGCCG
  A D A G T A S A L A A S Q L P Q A T M P

     250     260     270     280     290     300
GGTAAATCTATGGTTGCTATCGCTGGTTCCTCTTACCAGGGCCAGAACGGCCTGGCTATC
  G K S M V A I A G S S Y Q G Q N G L A I

     310     320     330     340     350     360
GGTGTTCCTCGTATCTCTGACAACGGTAAAGTTATCATCCGTCTGTCTGGTACTACTAAC
  G V S R I S D N G K V I I R L S G T T N

     370     380     390     400     410
TCTCAGGGTAAACTGGTGTAGCTGCTGGTGGTTACCAGTGGTAAAGGATCC
  S Q G K T G V A A G V G Y Q W *

```

図 2-2-2. pET-HiaT における蛋白質発現領域の配列

各領域は、以下の色で示した。

*NdeI/BamHI* サイト：緑色

Strep-tag：橙色

スロンビン認識サイト：藤色

HiaT (残基番号 992-1098)：赤紫色

## 2-3. 結果

### 2-3-1. pASK-HiaT を用いた HiaT の発現

pASK-IBA12 ベクターを用いて HiaT を発現させると外膜へ発現するという事は、Meng らの実験により明らかにされている(26)。また、HiaT が形成する三量体は SDS と熱に対して耐性を持つ事も明らかとなっている(26)。故に、HiaT の三量体形成は SDS 電気泳動にて簡単に確認することができる。ここでは、pASK-IBA12 ベクターを用いて OmpA シグナル配列が付加された HiaT を大腸菌で発現させた。HiaT を発現した大腸菌を超音波破碎後、細胞分画を行い、可溶性画分、不溶性画分、膜画分に分画した。それらをサンプルとし SDS 電気泳動を行い、Strep-tag に対する抗体を用いてイムノブロットを行った。その結果、不溶性画分と膜画分に HiaT に由来すると考えられるバンドが複数検出された(図 2-3-1)。不溶性画分では、約 15 kDa と約 35 kDa のバンド、そして高分子量領域に梯子状のバンド(約 37、50、70、100 kDa)が検出された。一方、膜画分では約 35 kDa のバンドが強く検出された。そして、不溶性画分と同様に 15 kDa と高分子量バンドが検出された。膜画分で強く検出された約 35 kDa のバンドは、膜から精製した三量体 HiaT と泳動度が一致する為、シグナル配列が切断され外膜で三量体を形成した HiaT に由来すると考えられる。このバンドが不溶性画分で検出された理由としては、不可溶性画分に膜画分が混入したことが原因であると考えられる。また、15 kDa のバンドと高分子量のバンドは、膜画分と比較すると不溶性画分で強く検出された。この約 15 kDa のバンドは、シグナル配列を持たない単量体のバンド(約 13 kDa)よりわずかに大きい分子量を持つ。よって、このバンドはシグナル配列が切断されていない HiaT に由来すると考えられる。恐らく、Sec 複合体によってペリプラズムに輸送される前に細胞質中にて凝集し、封入体を形成した HiaT であると考えられる。一方、高分子量の領域で検出された複数のバンドは、HiaT がミスアセンブリをおこし凝集したものと考えられる。

### 2-3-2. pET-3c ベクターを用いた HiaT の発現

シグナル配列を有する HiaT を発現するベクター pET-SigHiaT を用いて HiaT の発現を行い、上



記と同様に細胞分画を行った。その結果、pASK-HiaT で得られた結果と同様のバンドパターンが確認された(図 2-3-2, A)。一方、シグナル配列欠損 HiaT を発現する pET-HiaT ベクターを用いて上記と同様に細胞分画を行った結果、予想外なことに HiaT は不溶性画分では、ほぼ検出されなかった。しかし、膜画分において三量体 HiaT と単量体 HiaT に相当するバンドが検出された(図 2-3-2, B)。この結果から、シグナル配列を付加せずに発現させた HiaT は、膜で三量体を形成している事が確認された。また水溶性画分においても膜画分と同様に、三量体と単量体に相当するバンドが確認された。膜画分における三量体と単量体のバンドの比率と水溶性画分での比率を比較すると、水溶性画分の方が単量体のバンドの割合が高い。よって、この単量体のバンドは膜画分の混入によるものではないと考えられる。またシグナル配列を含まない発現系では不可溶性画分に単量体バンドは検出されなかった。これらの結果から、シグナル配列欠損 HiaT は溶液中に溶けた状態で存在することができると考えられる。しかしながら、シグナル配列を含む発現系の可溶性画分ではシグナル配列を含む単量体のバンドは検出されず、不溶性画分においてシグナル配列を含む HiaT 単量体が検出された。この結果から、シグナル配列を含む HiaT は凝集を起こしやすいと考えられる。

### 2-3-3. 発現誘導時間の最適化

先の実験ではシグナル配列を含む発現系、含まない発現系共に膜画分に HiaT 三量体が発現している事が確認されたので、次に発現誘導時間の最適化を行なった。それぞれのベクターで形質転換した大腸菌培養液に発現誘導剤を加え、それぞれ 1、2、4 時間後に OD<sub>600</sub> を測定し、大腸菌を回収した。そして、大腸菌の膜に発現している HiaT を界面活性剤で可溶化し、Strep-tactin が固定された樹脂を用いてカラム精製を行った。この Strep-tactin は、HiaT の N 末端に存在する Strep-tag に対して強い結合能を持っている。この性質により Strep-tag を含む蛋白質を効率的に精製する事ができる。このようにして精製した HiaT をサンプルとし SDS 電気泳動を行なった。そして CBB 染色によって検出された HiaT 三量体のバンドの定量を行うことにより、培地 1 L 当たりの収量を見積もった(図 2-3-3)。その結果、シグナル配列を含む発現系、含まない発現系共に収量は 2 時間で

頭打ちとなった。そしてシグナル配列を含まない発現系の収量は、含む発現系と比較すると約 25 % であった。また、OD<sub>600</sub>の値もシグナル配列を含む発現系、含まない発現系共に 2 時間で頭打ちとなった(図 2-3-4)。しかしながら、シグナル配列を含まない発現系では、含む発現系と比較して発現誘導後の大腸菌の増殖が緩やかなものとなった。そのことよりシグナル配列を含まない HiaT を細胞質中で発現させると、細胞増殖に影響を与えられられる。これがシグナル配列を含む発現系とシグナル配列を含まない発現系で収量に差が生じた主な原因であると考えられる。

次に細胞表面に露出した HiaT の量を調べる為に、フローサイトメトリー実験を行った。HiaT が外膜へアセンブリすると N 末端の Strep-tag は細胞外へ露出する。この表面に露出した HiaT の N 末端に存在する Strep-tag を、Chromeo 488 が結合した Strep-tactin で蛍光標識する事により HiaT が細胞表面に露出している大腸菌の検出を行った。シグナル配列を含む HiaT を発現する大腸菌を用いてこの実験を行った結果、発現誘導 1 時間後の大腸菌群は単一の蛍光強度ピークを持っていた(図 2-3-5, A)。そして大腸菌の平均蛍光強度は約 7600 であった。この値は空ベクターが挿入された大腸菌の平均蛍光強度 (約 200) よりも高い値であった。よって、HiaT は細胞表面に露出していると考えられる。しかし、発現誘導から 2 時間後の大腸菌群の蛍光強度分布は、二峰性を示した。片方のピークは時間が経つにつれて蛍光強度が高くなる方に移動するが、もう一方のピークは時間が経つにつれて蛍光強度が低くなる方へ移動する。そして 4 時間後には空ベクターを有する大腸菌のピークとほぼ一致する。これは恐らく発現誘導後 1 時間までは、全ての大腸菌が HiaT を発現しているが、1 時間以降にプラスミドの欠落や遺伝子の再編成等により、HiaT を発現しない大腸菌が出現する事が原因だと考えられる。プラスミドを保持した大腸菌は、更に HiaT を発現し続けるため大腸菌の蛍光強度は強くなるが、HiaT を発現しなくなった大腸菌は分裂を繰り返す間に大腸菌当たりの表面露出 HiaT 数が少なくなる。これにより HiaT を発現しない大腸菌の蛍光強度は、空ベクターの蛍光強度に近づいていくと考えられる。また、細胞表面 HiaT 量と蛍光強度が比例すると仮定して平均蛍光強度を細胞数(OD<sub>600</sub>)で規格化し、培地一定量当たりの細胞表面露出 HiaT 量を見積もった(図 2-3-5, C)。この結果、細胞表面の HiaT 量は 2 時間で最大となり、その後 4 時間にかけて減少した。この 2 時間から 4 時間にかけての HiaT 量の減少もまた HiaT を発現し

なくなった大腸菌による影響だと考えられる。また、同様のフローサイトメトリー実験をシグナル配列欠損 HiaT 発現大腸菌で行った結果、大腸菌の蛍光分布は空ベクター導入大腸菌での結果と一致した(図 2-3-5, B)。それゆえ、シグナル配列欠損 HiaT 発現大腸菌では、HiaT は細胞表面に局在していないと考えられる。

次に、不溶性画分とその他の画分における HiaT 量の時間変化を観察する実験を行った。各プラスミドが導入された大腸菌を培養し、発現誘導を行った後、各時間培養を行った。大腸菌破碎後、低速遠心で不溶性画分(主に封入体を含む)とその他の画分(可溶性蛋白質と膜蛋白質を含む)に分離した。各分画画分をサンプルとして SDS 電気泳動を行い、イムノブロットィングで HiaT の検出を行った(図 2-3-6)。その結果、シグナル配列を含む発現系の可溶性と膜の画分(S+M)では、主に HiaT 三量体に相当するバンドが観測時間を通して検出された(図 2-3-6, A)。しかし、時間によるバンド強度の変化は見られなかった。また、同画分で単量体より僅かに大きい分子量を有するバンドが検出されたが、その量は微量であった。これは、細胞質に存在するシグナル配列を有する HiaT に由来するバンドであると考えられる。そしてそのバンドは発現誘導後 1 時間で最大量となり、その後時間が経つにつれて減少する。これは、恐らく HiaT を発現しない大腸菌が増加した事により、大腸菌当たりの細胞質存在 HiaT(シグナル配列を含む)が減少したことが原因だと考えられる。また、シグナル配列を含まない発現系においても、HiaT 三量体バンドは可溶性と膜の画分(S+M)にて観測時間を通して検出された(図 2-3-6, B)。そしてその量は時間と共に増加した。さらに、シグナル配列を含む発現系とは異なり、単量体のバンドが全ての観測時間で検出された。また、シグナル配列を含まない発現系では、不溶性画分にバンドはほぼ観察されなかった。一方、シグナル配列を含む発現系では、シグナル配列含む HiaT 単量体と高分子量多量体のバンドが全ての観測時間で検出された。そしてバンドの強度は時間と共に増加した。これは、封入体が時間と共に蓄積していく為と考えられる。しかし、シグナル配列を含まない発現系では、封入体の蓄積は確認されなかった。

#### 2-3-4. 各発現システムにおける HiaT の細胞局在

シグナル配列を含まない発現系ではフローサイトメトリー実験により、HiaT の N 末端は細胞表面に露出していない事が示された。しかしながら、細胞分画実験によって HiaT 三量体は膜画分に存在している事が示された。これらの結果から、シグナル配列を含まない発現系で観察された膜画分に存在する HiaT 三量体は、内膜に局在している可能性が考えられる。それゆえに、この HiaT 三量体が内膜と外膜どちらの膜へアセンブリしているかをショ糖濃度勾配遠心法で調べることにした。細胞分画により得られた総膜画分の分画は、30-55% (w/w) のショ糖濃度勾配を用いて行われた。外膜蛋白質と内膜蛋白質の分画位置は、内膜蛋白質の pntB と外膜蛋白質の OmpA を検出することにより判断した。その結果、内膜蛋白質の pntB は主にレーン 3 または 4 (密度 1.15 g/cm<sup>3</sup> または 1.16 g/cm<sup>3</sup>) で検出された(図 2-3-7)。一方、外膜蛋白質の OmpA は幅広く分布しており、バンドの強度が最大となったのはレーン 8 または 11 (密度 1.23 g/cm<sup>3</sup> または 1.20 g/cm<sup>3</sup>) であった。シグナル配列を含む発現系では、HiaT 三量体のバンドは OmpA と同様に広く分布しており、一番強度が高い画分は OmpA での結果と一致した。よって、シグナルが切断されて正しく三量体を形成した HiaT が、外膜へアセンブリしているという事が示された。また、シグナル配列未切断 HiaT やミスアセンブリした多量体のバンドは、外膜画分より高密度の画分で検出された。これは遠心で除ききれなかった不溶性画分の蛋白質が、検出されたものと考えられる。一方、シグナル配列を含まない発現系で発現させた HiaT も OmpA と同様に幅広く分布しており、一番強度が高い画分は OmpA での結果と一致した。そして、シグナル配列を含む発現系とは異なり、同じ分画に僅かながらの単量体バンドが検出された。これらの結果は、シグナル配列を含まない発現系で発現した HiaT が外膜にアセンブリしている事を示した。しかしながら、フローサイトメトリー実験では HiaT は細胞表面に露出していない事が示された。シグナル配列を含まない発現系で発現した HiaT は外膜にアセンブリしているが、細胞外に HiaT の N 末端が露出していないという可能性も排除しきれないが、おそらく細胞質に存在していたシグナル配列欠損 HiaT が細胞破碎後に外膜にアセンブリしてしまった可能性が高いと考えられる。

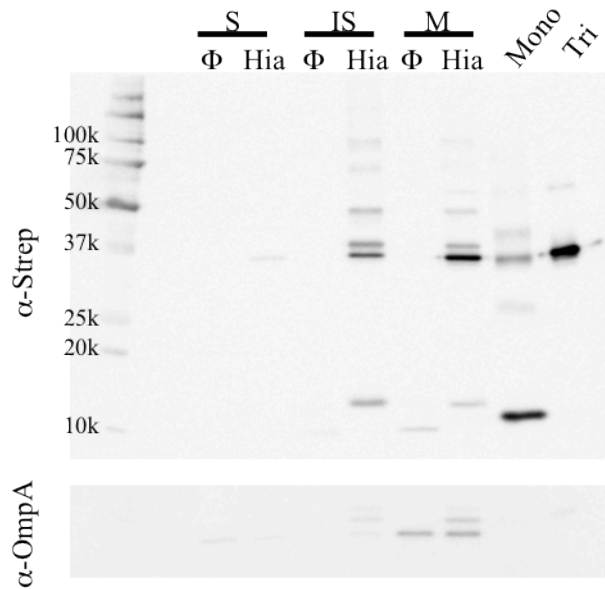


図 2-3-1. pASK-HiaT を用いた HiaT 発現大腸菌の細胞分画

pASK-HiaT ベクターで形質転換した大腸菌を培養し、シグナル配列を含む HiaT の発現を行った。HiaT を発現した大腸菌を超音波破碎した後、遠心によって可溶性画分(S)、不溶性画分(IS)、膜画分(M)に分離した。それぞれの画分をサンプルとして SDS 電気泳動とイムノブロットを行い、HiaT を Strep-tag に対する抗体を用いて検出した(上段)。また、外膜蛋白質の OmpA に対する抗体を用いて OmpA の検出を行った(下段)。“Mono” は精製した HiaT をギ酸で処理し解離したものをサンプルとし、“Tri” は膜から精製した HiaT 三量体をサンプルとした。“ $\Phi$ ” は空ベクターを導入した大腸菌、“Hia” は HiaT 発現ベクターを導入した大腸菌に由来するサンプルである。

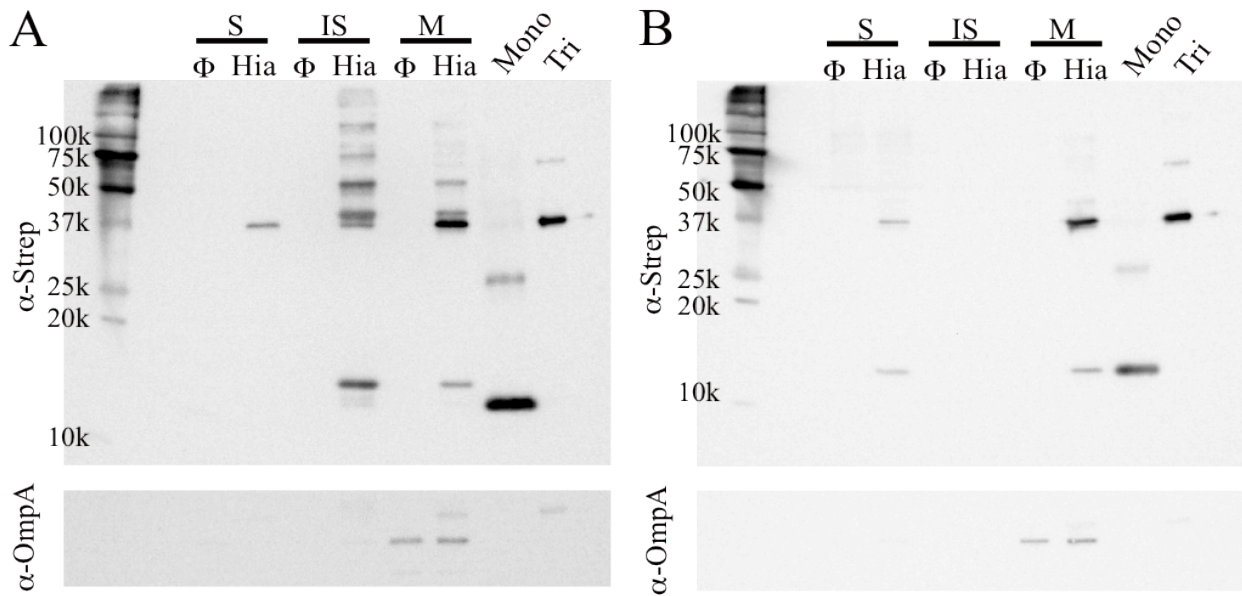


図 2-3-2. pET-SigHiaT/pET-HiaT を用いた HiaT 発現大腸菌の細胞分画

pET-SigHiaT/pET-HiaT ベクターをそれぞれ導入した大腸菌を培養し、HiaT の発現を行った。各 HiaT を発現させた大腸菌を超音波破碎した後、遠心によって可溶性画分(S)、不溶性画分(IS)、膜画分(M)に分離した。各画分をサンプルとして SDS 電気泳動とイムノブロットを行い、HiaT を Strep-tag に対する抗体を用いて検出した( $\alpha$ -Strep)。また外膜蛋白質の OmpA に対する抗体を用いて OmpA の検出を行った( $\alpha$ -OmpA)。(A)が pET-SigHiaT ベクター、(B)が pET-HiaT ベクターを導入した大腸菌での結果である。“Mono”は精製した HiaT をギ酸で処理し解離したものをサンプルとし、“Tri”は膜から精製した HiaT 三量体をサンプルとした。“ $\Phi$ ”は空ベクターを導入した大腸菌、“Hia”はそれぞれの HiaT 発現ベクターを導入した大腸菌に由来するサンプルである。

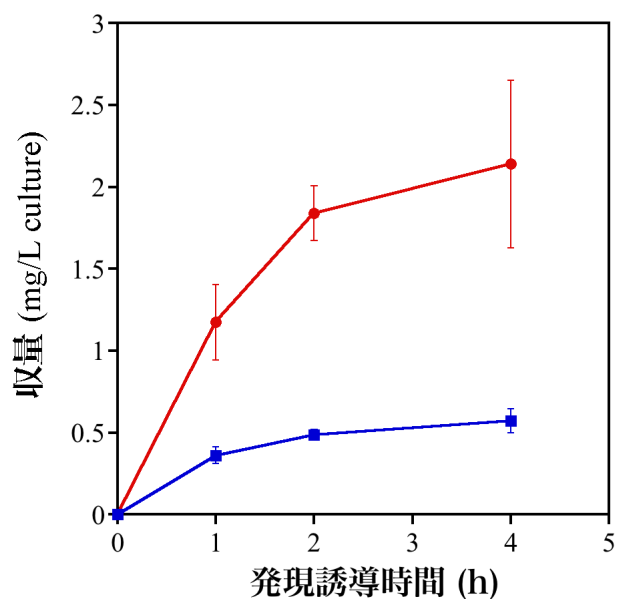


図 2-3-3. 各時間における HiaT の収量

シグナル配列を含む HiaT を発現する pET-SigHia ベクター、またはシグナル配列を含まない HiaT を発現する pET-Hia ベクターで形質転換した大腸菌を  $OD_{600}=0.7$  に達するまで培養し、HiaT の発現誘導を行った。1、2、4 時間培養後、大腸菌の集菌を行った。その後、大腸菌の超音波破碎を行い、Strep-Tactin カラムを用いて HiaT の精製を行った。精製した蛋白質をサンプルとして SDS-電気泳動を行い、電気泳動ゲルを CBB で染色した。検出された三量体のバンドを定量し、発現誘導時間に対してプロットを行った。pET-SigHia ベクター導入大腸菌での結果は赤色の線、pET-Hia ベクター導入大腸菌での結果は青色の線で示した。誤差範囲は 3 回の独立した実験の標準誤差を示す。

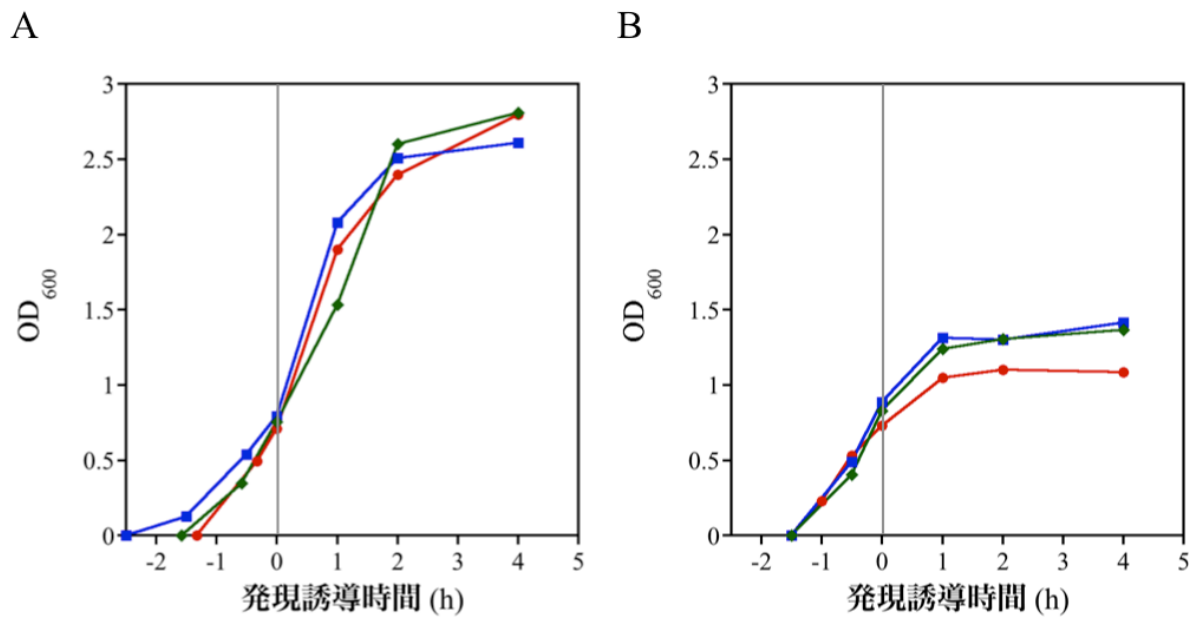


図 2-3-4. pET-SigHiaT/pET-HiaT 導入大腸菌の増殖曲線

各時間で大腸菌培養液の OD<sub>600</sub> を測定し、発現誘導剤を加えた時刻を 0 時間としてプロットを行った。A が pET-SigHiaT(シグナル配列有り)、B が pET-HiaT(シグナル配列無し)における大腸菌増殖曲線である。各発現システムともに独立した 3 回の実験の結果を示した。



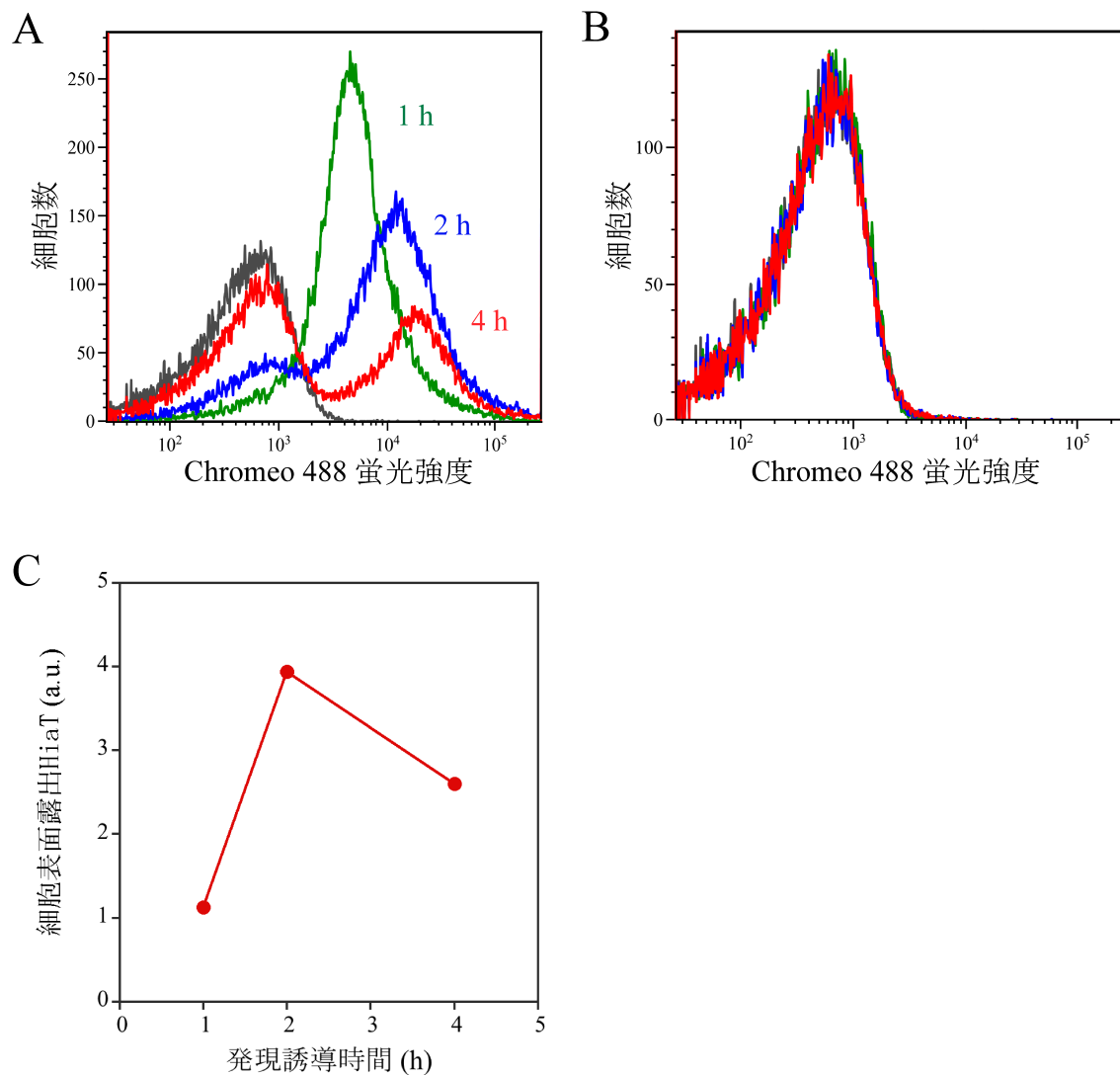


図 2-3-5. 細胞表面露出 HiaT の検出と推定収量

シグナル配列を含む HiaT または含まない HiaT を発現した大腸菌を、発現誘導後 1、2、4 時間で回収し、細胞表面に露出した HiaT を Strep-Tactin Chromeo 488 conjugate を用いて標識した。標識した HiaT はフローサイトメトリーにより検出した。A はシグナル配列を含む発現系 (pET-SigHia ベクター) での結果であり、B はシグナル配列を含まない発現系 (pET-Hia ベクター) での結果である。発現誘導後 1 時間における結果は緑色、2 時間は青色、4 時間は赤色で示した。また、空ベクター pET-3c で形質転換した大腸菌での結果は灰色で示した。A の実験より得られた各時間の平均蛍光強度と集菌時の OD<sub>600</sub> の値を乗算することにより推定される、培地量あたりの表面露出 HiaT 量を C に示した。表面露出 HiaT 量の単位の a.u. は任意単位を示す。

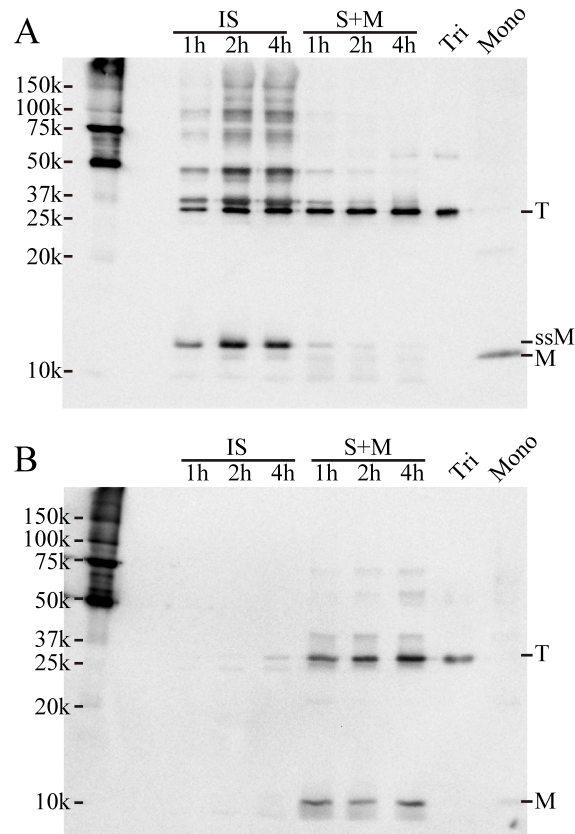


図 2-3-6. 不溶性画分とその他画分における HiaT 量の経時変化

シグナル配列を含む HiaT(A) またはシグナル配列を含まない HiaT(B) を発現した大腸菌を、発現誘導後 1、2、4 時間で回収した。集菌した大腸菌の破碎を行い、遠心により不溶性画分 (IS) と可溶性と膜の画分 (S+M) に分けた。それらの画分は SDS 電気泳動と抗 Strep-tag 抗体を用いたイムノブロットティングにより解析した。“Mono” は、シグナル配列を含まない精製済み HiaT 単量体をサンプルとしている。“Tri” は、シグナル配列を含まない精製済み HiaT 三量体をサンプルとしている。

“T”、“M”、“ssM” のラベルは、それぞれシグナル配列を含まない三量体、シグナル配列を含まない単量体、シグナル配列を含む単量体の泳動位置を示す。

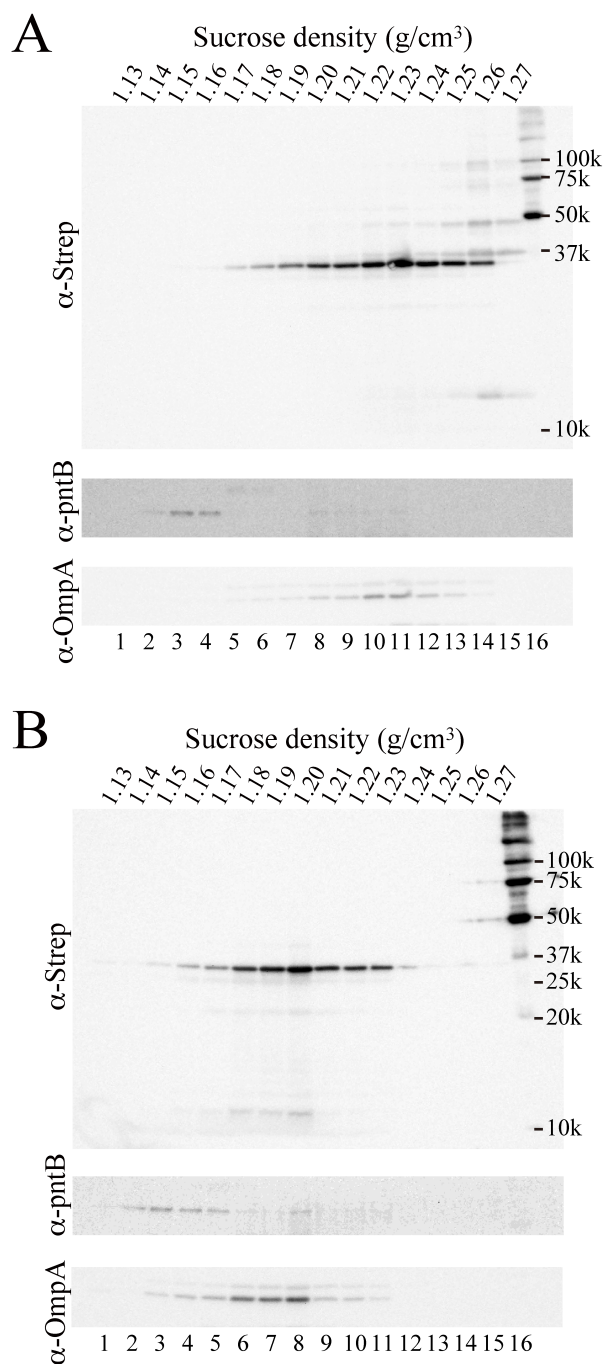


図 2-3-7. ショ糖濃度勾配遠心法による内膜と外膜の分離

シグナル配列を含む HiaT(A) またはシグナル配列を含まない HiaT(B) を発現した大腸菌から得られた膜総画分を 30%-55% (w/w) のショ糖濃度勾配溶液を用いてショ糖濃度勾配遠心を行った。各画分の蛋白質は SDS 電気泳動により分離され、抗 Strep-tag ( $\alpha$ -Strep)、抗 pntB ( $\alpha$ -pntB)、抗 OmpA ( $\alpha$ -OmpA) 抗体を用いたイムノブロッティングにより検出した。

## 2-4. 考察

シグナル配列を含む HiaT とシグナル配列を含まない HiaT を大腸菌で発現し、各発現誘導時間で収量を調べた結果、双方とも収量は 2 時間で頭打ちになる事が明らかとなった。また、シグナル配列を含む発現系の収量は、含まない発現系と比較すると約 4 倍多い事が示された。さらに、シグナル配列を含む発現系では、収量は 2 時間から 4 時間にかけて僅かに増加傾向にあるが、蛋白質を発現できる大腸菌の数が著しく減少する事が明らかとなった。このような事象が起こる要因は定かでは無いが、これらはプラスミドの不安定性に起因すると考えられる(30)。例えば、細胞分裂の際にプラスミドの分配に偏りが起こり、分裂後にプラスミドを持たない大腸菌が生じる可能性や、プラスミド DNA 構造の不安定性から転座、逆位、欠失、挿入、重複等が起こり、HiaT の発現が不可能となっていると考えられる。プラスミドを失った大腸菌は通常、培地に含まれている抗生物質により増殖が阻害されるが、今回使用したアンピシリンでは培養後 1 時間程度で分解されてしまうという例が報告されている(31)。このため、プラスミドを失った大腸菌でも培養開始から時間が経過した培地では増殖できると考えられる。このような HiaT を発現しない大腸菌が出現した原因が、プラスミドの欠失によるものなのか、プラスミドの再編成によるものなのかは本研究からは明言できない。しかしながら、プラスミド不安定性による HiaT 非発現大腸菌の増殖は、発現誘導後素早く引き起こされる事が明らかとなった。

また、本研究ではシグナル配列を含まない HiaT を大腸菌に発現させ、細胞分画実験やフローサイトメトリー実験により HiaT がどこに局在しているかを調べた。一般的に外膜蛋白質の持つシグナル配列は内膜透過に必要なものとされており、シグナル配列欠失外膜蛋白質を発現させると内膜を透過できずに細胞質で凝集すると考えられている。実際、シグナル配列を欠損させて外膜蛋白質を大量発現させると、凝集して封入体を形成するという報告がいくつかの蛋白質でなされている(27)。しかしながら、本研究で発現を行ったシグナル配列欠損 HiaT では、HiaT の凝集は確認されなかった。そして予想外なことに、外膜画分にて HiaT 三量体の形成が確認された。しかし、フローサイトメトリー実験では大腸菌表面への HiaT の露出は観察されなかった。それゆえ、細胞質で合成されたシグナル配列を含まない HiaT は、凝集せずに細胞質中で可溶化しているのではないか

と考えられる。そして、その可溶性 HiaT は外膜に三量体を形成する能力を有しており、細胞破碎の過程を経て可溶性 HiaT が Bam 複合体と相互作用して外膜へ挿入されたと考えられる。ではなぜ HiaT は他の外膜蛋白質と異なり、封入体を形成せずに細胞質で可溶性化する事ができるのだろうか。この疑問に対する答えは、おそらく HiaT の低い凝集傾向性に関係していると考えられる。ここで注目すべきは、シグナル配列を含む単量体は不溶性画分で検出されたのにたいして、シグナル配列を含まない HiaT 単量体は可溶性画分で検出されていることである(図 2-3-2, 2-3-6)。この事実はシグナル配列を含む HiaT は封入体を形成するが、シグナル配列を含まない HiaT は封入体を形成しないことを示す。そこで、シグナル配列を含む HiaT とシグナル配列を含まない HiaT の凝集傾向性を AGGRESCAN(32)にて計算し、シグナル配列の欠損により封入体を形成する外膜蛋白質 (OmpA, OmpX)とその値を比較した(表 2-4-1)。AGGRESCAN は各アミノ酸に割り当てられた凝集傾向性を基に計算されている。このアミノ酸毎の凝集傾向性は、細胞内凝集実験により得られた値となっている。AGGRESCAN によって計算された蛋白質全体の凝集傾向性(Na4vSS)は、値が大きいほど高い凝集性を示す。この Na4vSS の値は一般的な外膜蛋白質の場合、約-20~0 の範囲に分布する。シグナル配列を含まない HiaT の凝集傾向性をシグナル配列欠損 OmpA や OmpX の値と比較した結果、シグナル配列を含まない HiaT の凝集傾向性は、それらの蛋白質と比較して低い値であることが明らかとなった(表 2-4-1)。一方、シグナル配列を含む HiaT の凝集傾向性を他の蛋白質と比較した結果、シグナル配列を含む HiaT の凝集傾向性の値は、シグナル配列欠損 OmpA や OmpX と比較して僅かに大きい値となった。よって、HiaT の凝集傾向性はシグナル配列が存在することによって上昇することが示された。シグナル配列による HiaT の凝集傾向性の上昇は、おそらくシグナル配列一般に含まれている 8 残基以上のアミノ酸で構成される疎水性領域に由来すると考えられる。このシグナル配列の凝集しやすさから、シグナル配列を封入体形成用のタグとして利用することができるという報告がなされている(33)。

以上を総括すると、HiaT を高収量で回収する為にはシグナル配列を含む発現系で HiaT の発現を行うこと、発現誘導時間は短い方が好ましいことが明らかとなった。また、長時間の培養は僅かな収量の増加を期待できるが、HiaT を発現しない大腸菌の増加により大腸菌由来の蛋白質が大き

く増加すると考えられるので、HiaT の精製には好ましくないと考えられる。また、シグナル配列を含まない発現系では HiaT の封入体形成は確認されず、可溶性画分にて HiaT 単量体が検出された。よって、シグナル配列を含まない HiaT は封入体を形成せずに細胞質で可溶化していると考えられる。そして大腸菌破碎中、または破碎後に可溶性 HiaT が外膜に三量体を形成すると推測される。よって、その過程を経た後の実験では外膜画分に HiaT 三量体が検出されてしまうと考えられる。

表 2-4-1. HiaT と封入体形成外膜蛋白質の凝集傾向性

	HiaTD (シグナル配列無し)	HiaTD (シグナル配列有り)	OmpA	OmpX
シグナル配列	無	OmpA シグナル配列	無	無
精製用のタグ	Strep-tag	Strep-tag	無	無
入力配列 (PDB ID)	図 2-2-2 参照	図 2-2-1 参照	1BXW	1QJ8
配列長	129	154	172	148
凝集傾向性*	-12.4	-5.9	-7.4	-6.5

\* 凝集傾向性 (Na4vSS)は、AGGRESCAN によって算出された。.

### 3. HiaT/mHiaT の三量体再構成実験

#### 3-1. 序

一般的な水溶性蛋白質は SDS 電気泳動条件下では変性し、多量体の場合は単量体分子量に相当する位置にバンドが検出されることが知られている。しかし、HiaT では前述の通り SDS 電気泳動中も三量体構造を保ち、三量体分子量に相当する位置にバンドが検出される。この特性を利用することによって、HiaT の三量体形成反応は SDS 電気泳動にて容易に観察できると考えた。また、ここでは SDS 電気泳動にて三量体構造が維持できる限界まで HiaT の N 末端を削った mHiaT (残基番号 1022-1098) も作製した。この mHiaT も HiaT 同様に結晶構造が解かれており、外膜で三量体を形成し SDS 変性と熱変性に対して耐性がある事が知られている(26)。三量体再構成実験をするにあたり、この極めて安定な HiaT/mHiaT 三量体を単量体に解離させる必要がある。この三量体を解離させる方法としては、95%ギ酸で Hia を処理するという方法が知られている(34)。しかし、このように解離させた HiaT を三量体へ再構成する実験を行った例は報告されていない。ここでは、HiaT が自発的に三量体を形成できる能力を持っているかを調べるために、単量体化させた HiaT を試験管内で三量体化させることを試みた。



## 3-2. 方法

### 3-2-1. mHiaT 発現ベクターの作製

2-2-2. で作製した pET-HiaT ベクターを鋳型とし、*NdeI* サイト、Strep-tag、Thrombin 認識配列を含む領域を PCR で増幅させた。同様に pET-HiaT ベクターを鋳型とし、mHiaT (残基番号 1022-1098) をコードする領域とその下流の *BamHI* サイトを PCR で増幅させた。増幅させた二つの遺伝子断片をオーバーラップエクステンション法で連結して N 末端から *NdeI* サイト、Strep-tag、Thrombin 認識配列、mHiaT、*BamHI* サイトをコードする DNA 断片を作製した。作製した DNA 断片は *NdeI* と *BamHI* で制限酵素処理を行い、同様の処理を施した pET-3c ベクターに挿入し、pET-mHiaT を作製した。

### 3-2-2. HiaT/mHiaT 三量体再構成実験

2-2-4.、2-2-5. と同様の方法で、HiaT/mHiaT の発現と精製を行った。精製した HiaT/mHiaT 溶液を蒸留水で 5 倍希釈後、そこにアセトンを 4 倍量加えて 30 分間静置し、蛋白質を沈殿させた。遠心後に上清を除き、80%アセトンで沈殿を懸濁した。80%アセトンを遠心することにより除き、その後沈殿を風乾させた。乾燥させた沈殿に 70%ギ酸を加えて 30 分間のインキュベートを行うことにより HiaT/mHiaT 三量体を単量体に解離させた。次に遠心濃縮器を用いてギ酸を除き、得られた HiaT/mHiaT 単量体の乾燥粉末を 8M 尿素で可溶化した。そしてリアセンブリ溶液(20mM Tris [pH8.0], 0.6% [v/v] CsE<sub>4</sub>)で尿素を 15 倍希釈することにより、リアセンブリ反応を開始した。リアセンブリ時の蛋白質濃度は 330 µg/mL とした。リアセンブリを開始させた溶液は 25°C で各時間インキュベートを行った。各時間反応させた溶液は 5 分の煮沸処理を行い、SDS 電気泳動に供した。その後、CBB 染色により蛋白質を検出した。

### 3-2-3. mHiaT の三量体形成反応の追跡

3-2-2.と同様の方法で mHiaT をギ酸で解離させ単量体 mHiaT を作製した。解離させた mHiaT を尿素で可溶化した後、リアセンブリ溶液で尿素を 15 倍希釈することにより、リアセンブリ反応を開始した。リアセンブリ溶液には、標準条件用の溶液 (20 mM Tris [pH 8.0], 0.6% [v/v] C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>, 100 mM NaCl) と高塩濃度条件用の溶液(20 mM Tris [pH 8.0], 0.6% [v/v] C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>, 500 mM NaCl)を用意した。リアセンブリを開始した溶液は各時間インキュベートを行った後、加熱処理を行わずに SDS 電気泳動で解析を行った。蛋白質は Nimble Juice (GeneDireX, NV, USA)で染色し、LAS-3000 を用いてシグナルを検出した。それぞれのバンドの定量は ImageJ を用いて行った(29)。そして、1 サンプルから検出されたバンドのシグナル強度の総和を 100%とし、それぞれ単量体、三量体、高分子量多量体の割合を算出した。測定はそれぞれの条件で 2 回以上行い、平均と標準誤差を算出した。各バンドの割合の経時変化データに対しては、Kaleida graph (Synergy Software, Reading, PA)を用いてカーブフィッティングを行った。

### 3-2-4. 遠紫外 CD スペクトル測定

CD スペクトルは、Chirascan (Applied Photophysics, Leatherhead, U.K.)を用いて測定した。変性した蛋白質を含む 8 M 尿素溶液をリアセンブリ溶液 (20 mM Tris [pH8.0], 100 mM NaCl, 0.6% [v/v] C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>)で 15 倍希釈し、24 時間インキュベーションを行った。スペクトル測定は 25°C で光路長 1 mm のキュベットを用いて行った。蛋白濃度は CD スペクトル測定に使用した溶液を SDS 電気泳動に供し、検出されたバンドの強度から定量した。

### 3-2-5. 蛍光偏光解消測定

蛍光スペクトルは、F-2500 spectrometer (Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて測定した。変性した蛋白質を含む 8 M 尿素溶液をリアセンブリ溶液 (20 mM Tris [pH 8.0], 100 mM NaCl, 0.6% [v/v]

C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>)で15倍希釈し、各時間インキュベーションを行った。インキュベーション後、光路長3 mmのキュベットを用いて蛍光スペクトルを測定した。測定条件は、励起波長280 nm、励起バンド幅5 nm、蛍光バンド幅10 nmとした。また、蛍光異方性( $r$ )は以下の式より得られた。

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

$I_{\parallel}$ は、励起光源の偏光方向と検光子の偏光方向が平行の場合における波長340 nmの蛍光強度、 $I_{\perp}$ は垂直の場合における波長340 nmの蛍光強度である。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. HiaT/mHiaT 三量体再構成実験

大腸菌から精製してきた天然状態 HiaT と mHiaT の溶液には界面活性剤が含まれている。この界面活性剤を除く為に、精製した蛋白質溶液にアセトンを加え、蛋白質のみを沈殿させた。沈殿させた HiaT/mHiaT は、70%ギ酸処理を 30 分間行うことにより単量体へ解離することが確認された。遠心濃縮器を用いてギ酸を除去することにより、乾燥 HiaT/mHiaT 単量体を作製した。乾燥した HiaT/mHiaT 単量体を 8 M 尿素溶液で可溶化した後、界面活性剤を含むリアセンプリ溶液(20 mM Tris [pH 8.0], 0.6% [v/v])で尿素を希釈することにより三量体形成反応を開始した。インキュベーションは最大 7 日間行った。各時間インキュベーションを行ったサンプルは、加熱処理後 SDS 電気泳動で三量体が形成されているかを確認した。その結果、リアセンプリした HiaT をサンプルとした電気泳動解析では、全ての反応時間において単量体(約 13 kDa)、三量体(約 39 kDa)、四量体(約 52 kDa)に相当するバンドが検出された(図 3-3-1, A)。さらにそれらよりも大きい分子量に相当するバンドもいくらか検出された。一方、mHiaT では単量体(約 10k Da)と三量体(約 30 kDa)に相当するバンドが強く検出され、それ以外のバンドはわずかにしか検出されなかった(図 3-3-1, B)。電気泳動により三量体のバンドが検出されたことから、HiaT と mHiaT は界面活性剤を含む溶液中で自発的に三量体を形成できるということが明らかとなった。さらに HiaT をリアセンプリさせると三量体以外の多量体が多く形成されるが、mHiaT では形成されないということが明らかとなった。HiaT と mHiaT では 3 ヘリックスバンドルの長さが異なっており、HiaT の長いヘリックスが高分子多量体の形成を引き起こしやすくしていると考えられる。これらを踏まえて、以後のアセンプリ実験では高分子多量体を形成しにくい mHiaT を用いて実験を行った。

#### 3-3-2. mHiaT の三量体形成反応の追跡

3-3-1.での mHiaT リアセンプリ実験では、反応時間 0.5 時間にて三量体のバンドが強く検出された(図 3-3-1, B)。さらに、その三量体のバンド強度は観測時間を通してほぼ変化しなかった。よっ

て、この mHiaT の三量体形成反応は、0.5 時間を経過した時点でほぼ完了してしまっていると考えられる。つまり、この条件では三量体形成反応が速すぎるため、この反応を電気泳動で追跡することができないと考えられる。これを解決する為に、リアセンブリ反応に使用する蛋白質の濃度を約 1/10 (23  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) にして、三量体形成反応を遅くする事を試みた。さらに、加熱処理により熱耐性の無い多量体が解離し、単量体として検出される可能性がある為、加熱処理を行わずに電気泳動を行う事にした。また、蛋白質濃度を低くした為に CBB 染色でのバンド検出が困難となった。これを解決する為に、より感度の高い染色剤の Nimble Juice を用いてゲルの染色を行った。こうして改良した条件 (リアセンブリ溶液 : 20 mM Tris [pH 8.0], 0.6% [v/v]  $\text{C}_8\text{E}_4$ , 100 mM NaCl、蛋白質濃度 : 23  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) でリアセンブリ反応を各時間行い、SDS 電気泳動を行った (図 3-3-2, A)。この結果、0.25 時間リアセンブリした mHiaT をサンプルとしたレーンでは、ほぼ単量体のバンドのみが検出された。そして時間が経過するとともに単量体のバンドが減少し、三量体のバンドが増加していく様子が観察された。そして 24 時間インキュベーション後には、ほぼ三量体のバンドのみが検出された。よって、この条件で三量体再構成実験を行うと三量体形成反応が追跡可能である事が明らかとなった。以降この条件を標準条件と呼ぶこととする。さらに、リアセンブリした mHiaT 三量体が天然状態の mHiaT と同様の二次構造をとっているかを調べるために、遠紫外 CD スペクトルを測定した。その結果、天然状態の mHiaT の CD スペクトルとリアセンブリした mHiaT の CD スペクトルは、ほぼ一致した(図 3-3-3)。さらに、24 時間リアセンブリを行った mHiaT の溶液に、SDS 電気泳動のサンプル調製時と同等の濃度になる様に SDS を加え、CD スペクトルを測定した。その結果、スペクトルに変化は見られ無かった。これらの結果より、リアセンブリ反応によって形成された mHiaT 三量体は、天然状態の mHiaT と同様の二次構造を有しており、SDS 変性に対しても耐性を持っている事が明らかとなった。また、尿素で可溶化したギ酸処理 mHiaT 単量体の CD スペクトルを測定した結果、天然状態と比べて著しく強度が低く、測定波長中(212-250nm)でピークが見られなかった(図 3-3-3)。このようなスペクトルは変性した蛋白質に見られる特徴であり、ギ酸で解離させた単量体 mHiaT は尿素中で変性した状態であると考えられる。よって、本研究で観測した三量体形成反応は、3 分子が集まる反応と構造を形成する反応の両方を含むことが示

された。また、SDS 電気泳動で検出された各バンドを定量化して割合を算出し、反応時間に対してプロットを行った(図 3-3-2 B)。SDS 電気泳動にて三量体と単量体以外のバンドはわずかに検出されたが軽微な量であった為、これらのバンドは考慮しないものとした(図 3-3-2 A)。よって、解離した単量体はリアセンブリ反応によって、全てが三量体を形成すると考えられる。そして中間体由来するようなバンドも確認されなかった。これらの結果より、mHiaT の三量体形成反応は 3 本のポリペプチド鎖が一斉に集まり構造を形成する三次反応であると仮定した(式 1)。



M : 単量体、T : 三量体、k : 速度定数

この三次反応の反応速度式は(式 2)の様に表す事ができる。

$$\frac{d[T]}{dt} = -\frac{1}{3} \frac{d[M]}{dt} = k[M]^3 \quad \text{(式 2)}$$

変数分離法を用いて(式 2)を変形すると、

$$\frac{1}{[M]^3} d[M] = -3k dt \quad \text{(式 3)}$$

となる。時刻 t=0 の時の M の濃度を  $[M]_0$  として、任意時刻 t における  $[M]$  の濃度を求める。(式 3)を積分すると

$$\int_{[M]_0}^{[M]} \frac{1}{[M]^3} d[M] = \int_0^t -3k dt \quad \text{(式 4)}$$

となる。これを  $[M]$  について解くと

$$[M] = \sqrt{\frac{[M]_0^2}{1+6kt[M]_0^2}} \quad \text{(式 5)}$$

となる。よって、反応液における単量体の割合は、

$$\text{Monomer\_fraction}(\%) = \sqrt{\frac{1}{1+6kt[M]_0^2}} \times 100 \quad \text{(式 6)}$$

となる。(式 6)を用いて三量体割合を表す式を求めると、

$$Trimer\_fraction(\%) = \left( 1 - \sqrt{\frac{1}{1 + 6kt[M]_0^2}} \right) \times 100 \quad (\text{式 7})$$

となる。この(式 7)を用いて電気泳動から得られた三量体形成反応のデータに対してカーブフィッティングを行った(図 3-3-2 B)。また、単量体のデータに対しても同様のモデルを仮定した三次反応式(式 6)でフィッティングを行った。その結果、得られた曲線は測定データとよく一致した(図 3-3-2, B)。よって、この三次反応モデルは妥当であると考えられる。また、このカーブフィッティングにより得られた速度定数は表 3-3-1 に示した。

もし、この mHiaT のアセンブリが上記モデルのような多分子反応であれば、リアセンブリ反応時の蛋白質濃度を高くすれば三量体形成反応が早くなるはずである。これを確かめる為に、蛋白質の濃度を 5 倍にして同様のアセンブリ実験を行った(高蛋白濃度条件)。その結果、SDS 電気泳動にて約 70 kDa を始めとする様々な大きさのバンドが高分子領域に検出された(図 3-3-4, A)。この結果から、高分子多量体の形成を考慮した三次反応モデル(式 8)を仮定し、三量体のデータに対してカーブフィッティングを行った(図 3-3-4, B)。また、このフィッティングにより得られた速度定数は表 3-3-1 に示した。

$$Trimer\_fraction(\%) = Y \left( 1 - \sqrt{\frac{1}{1 + 6kt[M]_0^2}} \right) \times 100 \quad (\text{式 8})$$

[M]<sub>0</sub> : 初濃度、t : 時間、k : 速度定数、Y : 三量体の収率

高蛋白濃度条件での結果、三量体の形成割合は 2 時間で約 50%となり、標準条件時と比較し三量体形成速度が上昇していることが明らかとなった(図 3-3-4)。また、蛋白質濃度を上げてリアセンブリ実験を行うと、高分子多量体の形成量が増えることが示された。そしてそれらの割合は最終的に約 27%にまで達した。これらの結果は、蛋白質濃度を上げたことによる分子間衝突の確率増加に起因すると考えられる。そして三量体形成反応の速度が上がると同時に、高分子多量体の形成割合も増えたと考えられる。また、この三量体形成反応が三次反応であるならば、標準条件と高蛋白濃

度条件では速度定数が一致するはずである。しかし、高蛋白濃度条件で得られた三量体形成反応の速度定数は、標準条件で得られた速度定数の約 1/3 となった(表 3-3-1)。この 2 条件間での速度定数の違いは、高蛋白濃度条件における高分子量多量体の形成に由来すると考えられる。(式 8)では、高分子多量体形成による三量体収率の減少は考慮されている。しかしながら、高分子多量体の形成が三量体と同時に形成されるのか、三量体が形成されてから高分子多量体が形成されるかが定かではない。その為、高分子多量体形成による単量体や三量体分子の濃度減少は考慮されていない。もし、高分子量多量体と三量体が同時に形成されるならば、高分子多量体の形成により三量体形成に必要な単量体分子の濃度が減少する。また、高分子多量体が三量体形成後に形成されるのであれば、高分子多量体形成によって三量体の濃度が減少する。そしてこれらの減少は、速度定数が低く見積もられる原因となる。これらの問題を考慮すると、三量体の収率が 100%に近づくにつれて(式 8)の妥当性は上昇すると考えられる。

上記の実験により mHiaT の三量体形成反応は三次反応であることが明らかとなった。三量体形成反応が三次反応であるならば、三量体中心に存在するアルギニン同士の静電反発が、三量体形成反応に影響を与えている可能性が高いと考えられる。もし、アルギニン同士の静電反発が三量体形成に影響を与えているならば、塩濃度を高くする事によりアセンブリ速度が上昇するはずである。佐藤らによるフェリチン・アセンブリ機構の研究により、イオン強度が 0.1 を超える溶液ではサブユニット間の正味電荷の反発よりも局所的な静電相互作用の影響が強く反映されることが示されている(35)。このアルギニンの局所的な相互作用の影響を調べる為に、高塩濃度条件(20 mM Tris [pH 8.0], 0.6% [v/v] C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>, 500 mM NaCl)でアセンブリ反応を行い、前述と同様にそれぞれのバンドの定量を行った(図 3-3-5)。各バンドの割合を時間に対してプロットした結果、高分子量の多量体の形成は 10%以下であることが確認された(図 3-3-5, B)。そして、三量体のデータに対しては(式 8)を用いてフィッティングを行った。その結果、高塩濃度条件における速度定数は、標準条件における速度定数の約 7 倍となった(表 3-3-1)。よって、塩濃度を高くすることにより三量体形成反応が速くなるということが明らかとなった。この反応速度の上昇は、接触面に存在する 1077 番目のアルギニン同士の静電反発が、塩によって抑えられたことに由来すると考えられる。それゆえ、1077



番目のアルギニンによる静電反発は、三量体形成速度を決定する重要な要因である事が示された。

### 3-3-3. 蛍光による三量体形成反応の追跡

さらに mHiaT の三量体形成反応を調べる為に、アセンブリ反応における蛍光スペクトルの変化と蛍光異方性の変化を追跡した。先の実験と同様に標準条件においてリアセンブリ反応を開始させ、各時間インキュベーションを行った後、蛍光スペクトルと蛍光異方性比の測定を行った(図 3-3-6)。その結果、反応開始後 15 分の蛍光スペクトルにて蛍光強度が最大となったのは、波長 342 nm であった。そして反応時間が進むにつれて、極大波長は短波長側にシフトした。このスペクトルの変化は、蛋白質に存在するトリプトファン残基の周りの環境に依存しており、トリプトファン残基の蛍光極大は溶媒極性が低くなるにつれて低波長側へ移動する(36)。蛋白質のフォールディングやアセンブリにおいては、蛋白質が変性してトリプトファンが水溶液と接している状態から、構造形成によりトリプトファンが蛋白質の疎水性部分に埋没することにより、蛍光極大が低波長側に移動する(37)。mHiaT では C 末端の 1098 番目の残基と Strep-tag にトリプトファンが存在している。よって、mHiaT が三量体を形成する事により、これらのトリプトワンの周りの環境が変化し、極大蛍光波長が時間と共に短波長側にシフトしたと考えられる。また、三量体形成反応が進み蛍光極大が短波長側へ移動するとともに、蛍光の強度も大きくなる。この変化も三量体形成に由来する変化であると考え、340 nm の蛍光強度を反応時間に対してプロットした(図 3-3-6, B)。その結果、電気泳動による三量体形成反応と同様の増加曲線が得られた。そこで、この測定データに対して先の実験と同様に三次反応を過程した式(式 9)を用いてフィッティングを行った結果、曲線はプロットデータとよく一致した。

$$A(t) = \Delta A \left( 1 - \sqrt{\frac{1}{1 + 6k[M]_0^2 t}} \right) + A_0 \quad (\text{式 9})$$

[M]<sub>0</sub> : 初濃度、t : 時間、k : 速度定数、ΔA : 最大増加値、A<sub>0</sub> : t=0 の時の蛍光強度

さらに、この式から導きだされた速度定数は、電気泳動によって導きだされた三量体形成反応の速度定数とほぼ一致した(表 3-3-2)。また、蛍光異方性を測定して時間に対してプロットを行った結果、蛍光異方性も時間とともに大きくなる事が示された(図 3-3-6, C)。この結果は mHiaT 分子のブラウン運動が時間経過に伴い遅くなっている事を示す。よって、時間の経過と共に mHiaT 分子が大きくなっていると考えられる。そしてこのデータに対し、(式 9)でカーブフィッティングを行うことにより速度定数を算出した(表 3-3-2)。その結果、電気泳動でのアセンブリ実験で算出された速度定数と同様の値を示した。これらの結果より、mHiaT の三量体形成反応は蛍光スペクトルや蛍光異方性でも追跡可能である事が示された。

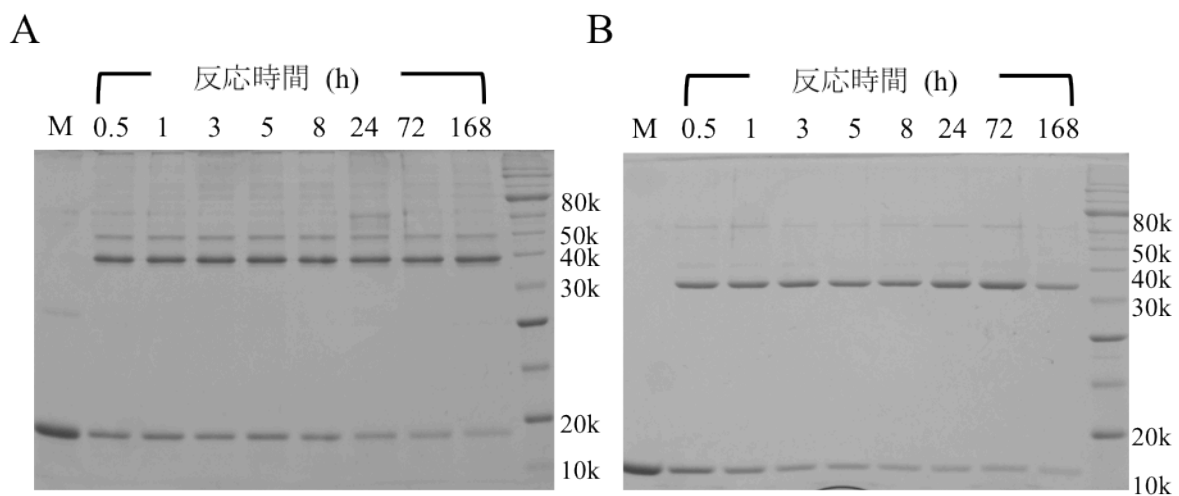


図 3-3-1. HiaT/mHiaT における三量体再構成実験

HiaT または mHiaT のリアセンブリ反応を開始させ(リアセンブリ溶液 : 20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.6% (v/v) C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>)、最大 168 時間(7 日間)インキュベーションを行った。インキュベーション後、SDS 電気泳動と CBB 染色で三量体形成を確認した。(A)が HiaT、(B)が mHiaT での結果である。レーン M は、HiaT または mHiaT をそれぞれギ酸処理し、単量体に解離させたものをサンプルとした。

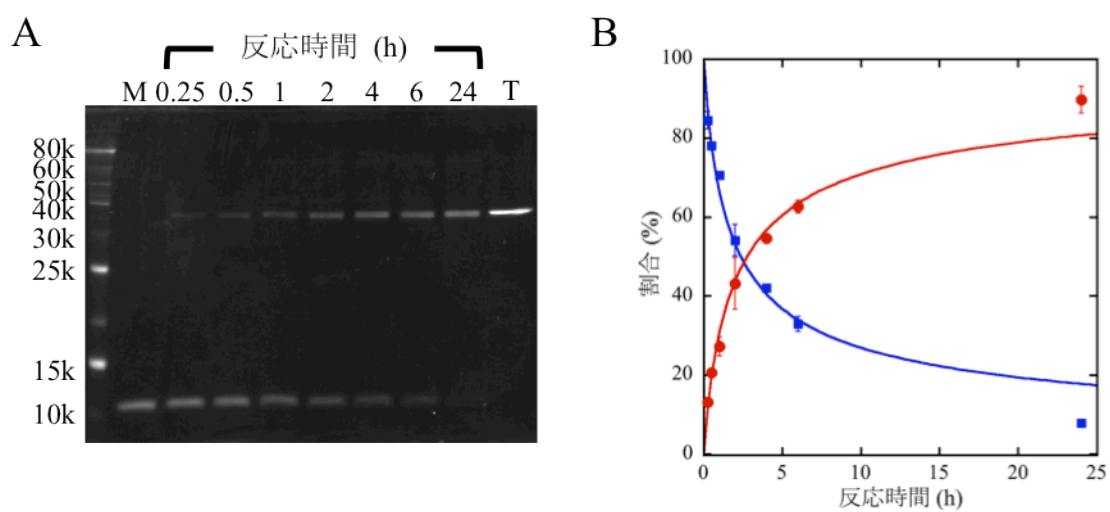


図 3-3-2. 標準条件における mHiaT 三量体形成反応の追跡

各時間リアセンブリ反応を行った mHiaT をサンプルとし、SDS 電気泳動を行った。蛋白質は Nimble Juice によって可視化した(A)。レーン M は単量体に解離させた mHiaT をサンプルとし、レーン T は天然状態の mHiaT をサンプルとした。また、検出された三量体と単量体に相当するバンドを定量して各バンドの割合を算出し、その値を時間に対してプロットした(B)。三量体のデータに対しては、(式 6)を用いてフィッティングを行った。カーブフィッティングに使用したパラメーターは、表 3-3-1 に示した。また、誤差範囲は 2 回の実験の標準誤差を示す。三量体の割合は赤色、単量体は青色で示した。

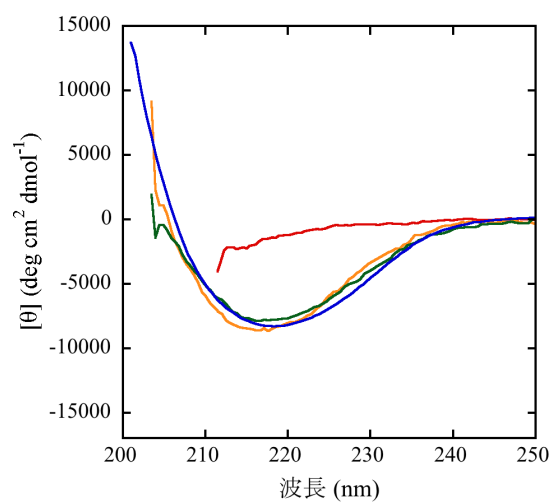


図 3-3-3. mHiaT 再構成三量体の CD スペクトル

尿素で可溶化したギ酸処理 mHiaT 単量体のスペクトルを赤色、mHiaT 三量体再構成溶液のスペクトルを橙色、天然状態 mHiaT のスペクトルを青色の線で示した。さらに mHiaT 三量体再構成溶液に SDS を加えた溶液のスペクトルを緑色で示した。

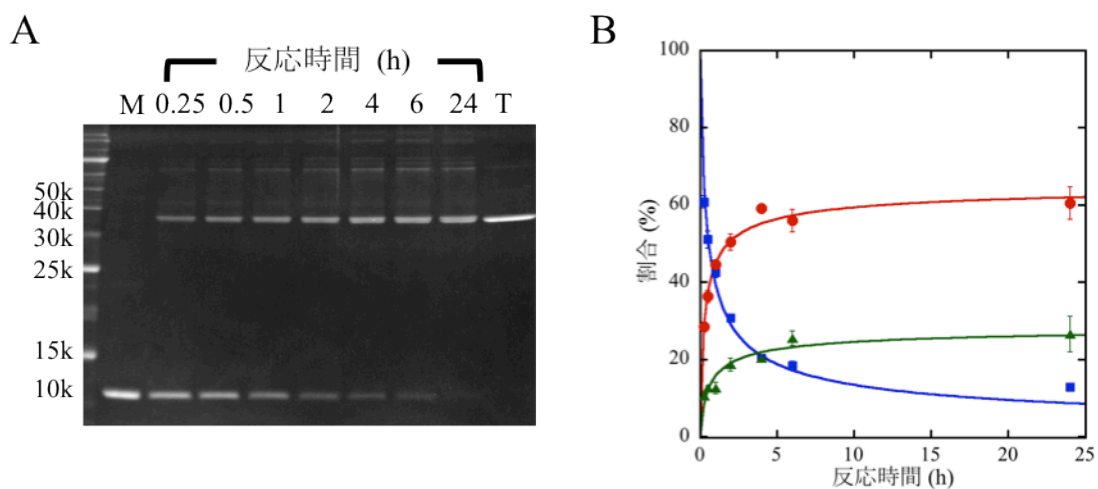


図 3-3-4. 高濃度条件下における mHiaT 三量体形成反応の追跡

各時間リアセンブリ反応を行った mHiaT をサンプルとし、SDS 電気泳動を行った。蛋白質は Nimble Juice によって可視化した(A)。レーン M は単量体に解離させた mHiaT をサンプルとし、レーン T は天然状態の mHiaT をサンプルとした。また、各バンドを定量して割合を算出し、時間に対してプロットを行った(B)。三量体のデータに対しては、(式 8)を用いてフィッティングを行った。カーブフィッティングに使用したパラメーターは、表 3-3-1 に示した。また、誤差範囲は 2 回の実験の標準誤差を示す。三量体の割合は赤色、単量体は青色、高分子量多量体は緑色で示した。

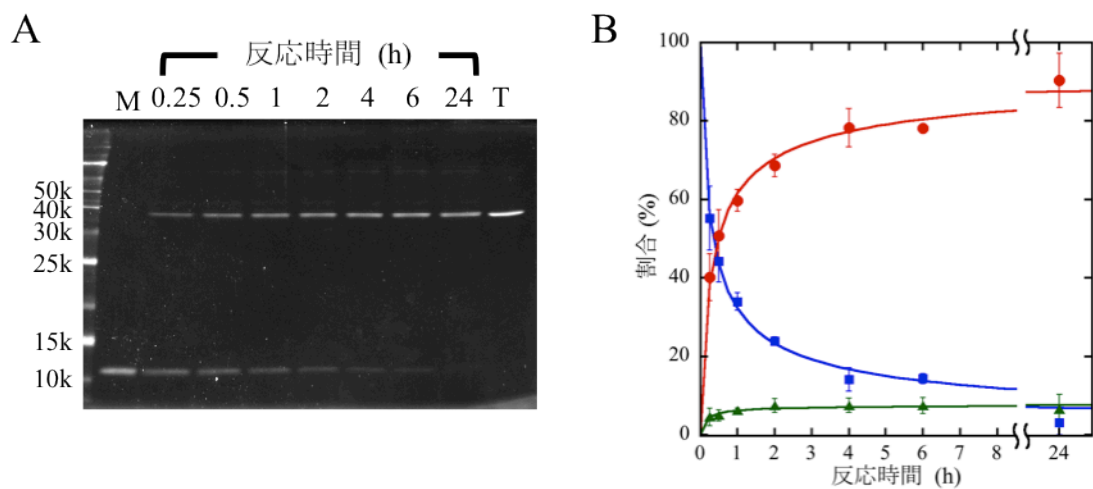


図 3-3-5. 高塩濃度条件における mHiaT 三量体形成反応の追跡

各時間リアセンブリ反応を行った mHiaT をサンプルとし、SDS 電気泳動を行った。蛋白質は Nimble Juice によって可視化した(A)。レーン M は単量体に解離させた mHiaT をサンプルとし、レーン T は天然状態の mHiaT をサンプルとした。また、各バンドを定量することにより割合を算出し、時間に対してプロットを行った(B)。三量体のデータに対しては、(式 8)を用いてフィッティングを行った。カーブフィッティングに使用したパラメーターは、表 3-3-1 に示した。また、誤差範囲は 2 回の実験の標準誤差を示す。三量体の割合は赤色、単量体は青色、高分子多量体は緑色で示した。

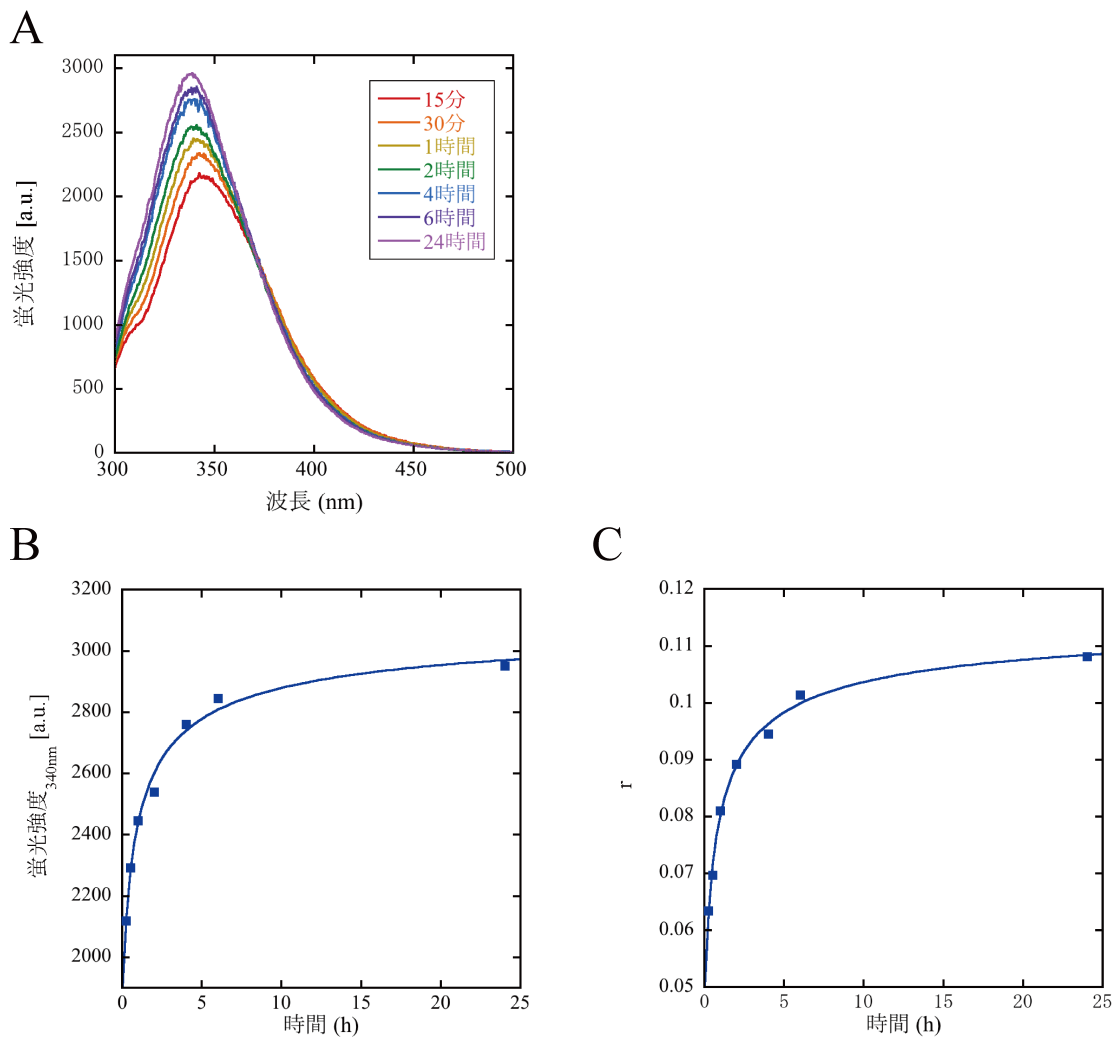


図 3-3-6 蛍光測定による mHiaT 三量体形成反応の追跡(標準条件)

(A) mHiaT のリアセンブリにおける蛍光スペクトルの経時変化。(B) mHiaT のリアセンブリに伴う 340nm における蛍光強度の経時変化。カーブフィッティングは(式 9)を用いて行った。カーブフィッティングに使用したパラメーターは、表 3-3-2 に示した。(C) mHiaT のリアセンブリに伴う蛍光異方性( $r$ )の経時変化。カーブフィッティングは(式 9)を用いて行った。カーブフィッティングに使用したパラメーターは、表 3-3-2 に示した。



表 3-3-1. 三量体形成反応における速度定数と三量体の収率

	標準条件	高塩濃度条件	高蛋白質濃度条件
速度定数 ( $\times 10^{-10} \text{M}^{-2} \text{h}^{-1}$ )	3.77 $\pm$ 0.39	24.8 $\pm$ 2.8	1.15 $\pm$ 0.17
三量体収率 (%)	100	95	67

表 3-3-2. 蛍光測定における mHiaT 三量体形成の速度定数(標準条件)

		速度定数 $\times 10^{-10}$ (1/M <sup>2</sup> h)
WT	蛍光強度	$7.6 \pm 3.2$
	異方性比	$8.4 \pm 2.4$

### 3-4. 考察

ギ酸処理により単量体へ解離した HiaT/mHiaT を界面活性剤が含まれる溶液でリアセンプリを行った結果、SDS 電気泳動にて三量体分子量に相当する位置にバンドが確認された(図 3-3-1)。しかしながら HiaT では三量体が形成されるとともに高分子多量体も多く形成された。この現象は HiaT のバレル中心に存在する長いヘリックスによって引き起こされていると考えられる。生体内で Hia が外膜にアセンブリする場合、ペリプラズム輸送中のパッセンジャードメインには、シャペロンが結合しており、これによりパッセンジャードメインの構造形成を防いでいると考えられている。しかし、今回行った試験管内での実験では、シャペロンのような分子は存在しない。よって、パッセンジャードメインの一部である $\alpha$ ヘリックスが $\beta$ バレルより先に、または同時に構造を形成する可能性が考えられる。そして、その $\alpha$ ヘリックスの形成により HiaT では高分子多量体の形成が促進されたと考えられる。一方、mHiaT では $\alpha$ ヘリックスの長さが短くなっているため、高分子多量体の形成がほとんど観察されなかったと考えられる。また、再構成した三量体の二次構造が天然状態と一致するかを調べる為に、解離させた mHiaT を 24 時間リアセンプリさせた溶液の CD スペクトルを測定した(図 3-3-3)。その結果、リアセンプリ溶液の CD スペクトルは、天然状態の mHiaT 三量体のスペクトルとほぼ一致した。これらの結果からリアセンプリさせた mHiaT の構造は、天然構造と同じであると考えられる。そして、ギ酸で解離させた mHiaT 単量体の CD スペクトルは、解離した mHiaT に二次構造が存在しないことを示した。よって、mHiaT は界面活性剤存在下で自発的に三量体を形成する能力を有していることが明らかとなった。この結果より、mHiaT の三量体形成には他の蛋白質による構造形成補助が必要ではないことが示された。

また、解離させた mHiaT のリアセンプリを標準条件で行い、SDS 電気泳動に供することによって得られた単量体と三量体のバンドの割合を時間に対してプロットした。そして、単量体から三量体が三次反応で形成されるモデルを仮定してフィッティングを行った結果、フィッティングカーブは観測データによく当てはまった(図 3-3-2, B)。よって、この三量体形成反応は三次反応であると考えられる。また、蛋白質濃度を高くして同様の実験を行った結果、高分子多量体の形成が確認された(図 3-3-4)。これらの高分子多量体も天然構造の三量体と同様に、熱と SDS 変性に対して耐

性があった。それらの高分子多量体のバンドは、おおよそ 4 量体や 6 量体の分子量に相当する位置に観察された。よって、これらの高分子多量体は、3 つ以上のサブユニットで大きなバレルを形成してしまった多量体か、バレルのストランド数を変化させずに 3 つ以上のサブユニットでバレルを形成してしまった多量体である可能性が考えられる。また、6 量体分子量に相当する位置に観察された多量体に関しては、2 つの三量体バレルが何らかの相互作用によって結合してしまった可能性も考えられる。いずれの場合も蛋白質濃度を高くしたことにより、一度に数多くのサブユニットが衝突しやすくなったことによる影響であると考えられる。また、この条件では高分子多量体が形成されたため、高分子多量体の形成を加味した三次反応式を用いてカーブフィッティングを行った。その結果、速度定数は標準条件の約 1/3 となった(表 3-3-1)。これは恐らく高分子多量体の形成により、時間と共に単量体または三量体の量が減少してしまったために速度定数が低く見積もられたと考えられる。よって、高分子多量体の形成が少ない条件であれば、速度定数は標準条件と同じになり、アセンブリ反応が三次反応であることに矛盾しないと考えられる。

さらに三量体形成における 1077 番目に存在するアルギニンの静電反発の影響を調べる為に、高塩濃度溶液でリアセンブリ実験を行った。その結果、三量体の形成速度は標準条件時よりも速くなった。佐藤らの研究(35)から、標準条件と高塩濃度条件ではサブユニット間での正味電荷の影響は低くなっていると考えられる。よって、塩濃度を高くすることにより局所的な静電反発が抑えられ、三量体形成速度が速くなったと考えられる。そして、この局所的な静電反発は、特徴的な配置を持つ 1077 番目のアルギニンが主に引き起こしていると推測し、以下の研究を行った。

## 4. 三量体形成における Arg1077 の役割

### 4-1. 序

mHiaT のバレルの内部には各サブユニットの $\beta$ ストランドから中心に向かって伸びるアルギニンが存在し、それらはお互いに反発しているような位置に存在している。この位置にアルギニンを持つ三量体オートトランスポーターは多くはないが、同じ正電荷を持つアミノ酸のリジンがこの位置に持つ三量体オートトランスポーターは多く存在する(図 4-1-1)。この特徴的なアルギニンの配置がアセンブリにおいてどのような影響を及ぼしているかを確かめるために、mHiaT の 1077 番目のアルギニンを電荷のないアミノ酸に置換した変異体を作製した。複数存在する電荷を持たないアミノ酸の中から適当なアミノ酸を選び出す為に、立体構造上で 1077 番目のアルギニンを他のアミノ酸に置換し、側鎖が近傍のアミノ酸に接触しないアミノ酸を探しだした。さらに、その中からアルギニンに一番近い大きさのアミノ酸のメチオニンを選び出した。このアミノ酸で 1077 番目のアルギニンを置換することによりバレル中心の静電反発を無効化する変異体(R1077M)を作製した。そして、前章と同様の実験を行い、この変異がアセンブリにどのような影響を与えるかを調べた。しかし、この変異体のみでは置換によって生じた影響が、アルギニンをメチオニンに置換したことによる影響であるのか、静電反発を無効化したことによる影響なのか判別が付かない。それゆえ、1077 番目のアルギニンをアルギニンと同様に正電荷をもつアミノ酸のリジンに置換した変異体(R1077K)も作製した。そしてこれらの変異がアセンブリ反応にどのような影響を与えるかを調べた。

\_1\_\_\_\_\_YADA FRQLDNRLDKLDTRVVDKGLASSAALNSLFPQYGVG---KVNFTAGVGGYRSSQALAI GSGYRV--NENVALKAGVAYAGSSD-----VMYNASFNIEW  
 \_2\_gi| 21230133 ---IEDRLRRQNRRLDRQGAMGSAMLNMSASVAGI-ASQNRIGAGVGFQNGESALSVGYQRAI--SPRATVTIGGALSDD-----SSIGVGAGFGW  
 \_3\_gi| 22996732 ---VNGQMRRODRRISRQAMGAAMLNMTSAAGI-HTQNRVAVGAGVGFQNGQALSLGYQRAI--SDRSTVTIGGAFSSD-----SSVGIGAGFGW  
 \_4\_gi| 23115151 ---MEWKLKQDQRI DRMGAMTAAMVQMSASASGL-RTQNRVAVGAGVGFQNGEQALSIGYQRAI--SDRATFTVGGAFSDSE-----SSAGVGLGFGW  
 \_5\_gi| 32028865 LHATNQRLLEEVNKDAKAGIAAAMAFKEVPFVPGK----WSYAAGAAHYSSESA VSLNLGRTS-ANGKYAISGGISSDSRGR-----VGFRVGISGVF  
 \_6\_gi| 23115364 RAEVNDRFEDLDRRI RRNGAMSAAMSQMSANSAYAKPGRGRLAVGAGFQDGESGLAIGYGR--INENVSVSIGAAFGSE-----SSGGVGFVVDL  
 \_7\_gi| 46313782 IGQVNSFNLDLKKDMYGGVASAMAVAGLPQPTGAG---RSMVSAATS NYHGQQGFAAGYSYVT-ESNRWVVKASVTGNTRSD-----FGAVVGAGYQF  
 \_8\_gi| 16273668 VTNLAGQVNVKVKRADAGTASALAAASQLPQASMPG---KSMVSIAGSSYQGGSLAIGVSRIS-DNGKVIIRLSGTTNSQGK-----TGVAAGVGYQW  
 \_9\_gi| 38638179 FSELNDRVNRNESRANAGIAGAMAMSAIPYLNNYV---DNSFGMATSTFRGETAIASGYQRQ--INPYVNVRLSSSWDTSNG-----VGVAAGVALGW  
 10\_gi| 23467016 NNELRTQLNTTDRNL RAGIAGALAAAGLPMSVPG---KSMFAASAGSYKQSAVALGYSRV---SDNGKITLRLQGTSSSTG----DVGGVGVGYQW  
 11\_gi| 96988 FRQLDNRLDKLDTRVVDKGLASSAALNSLFPQYGVG---KVNFTAGVGGYRSSQALAI GSGYRV--NESVALKAGVAYAGSSD-----VMYNASFNIEW  
 12\_gi| 16565696 FRQLRDQINKNRKRS DAGIAGAMAMTAIPMIDGKQ---YSFGMAASNYRDEQAIAAGIIFRT--SENTVVRLNNTSWDTQHG-----TGVATGMSIGW  
 13\_gi| 45516184 ISNLSNRIDGAQRDANAGTASAMALAGLPQSVLPG---KGMVALAGSTYSGQSALALGVSKLD--SGRWVFKGGVTSNTRRN-----VGATVGAGFHW  
 14\_gi| 46312900 INSLGSQLQQTDMAKQGIAAVGAMASIPQLDRDA---NFGMGVGTSTFLGQKAMAVNQARI--TENLKASINGGFSGGQK-----VIGAGMLYQW  
 15\_gi| 22997603 KQYTDGVVGLRRD TDGGVAAAIA TANLPQAYIPG---RGMTSVGVSSYRGQSAI AVGVSSVS---ESGRWVFKFSGSANTRS----QVIGAGVGYQW  
 16\_gi| 23467579 LVDVNRKVDTLDKNTKAGIASAVALGMLPQSTAPG---KSLVSLGVGHHRGQSATAIGVSSMS---SNGKWVVKGMSYDTQR----HATFGGSVGFVFF  
 17\_gi| 7228558 AQNLNLRIDNVDGNARAGIAQAIATAGLVQAYLPG---KSMMAIGGGTYRGEAGYAI GYSSIS---DGGNWI IKG TASGNRSG----HFGASASVGYQW  
 18\_gi| 46156455 NNALRTQIHHADRRLRAGIAGANAAAALASVSMGP---KSMVAIAAAGHDGESALAI GYSRIS---DNGKVMLKLQGNNSNSQG----KVSGAVSVGYQW  
 19\_gi| 15677822 IDS LDKNVANLRKETRQGLAEQAALSGLFPYNVG---RFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFT--ENFAAKAGVAVGTSSGS----SAAYHVG VNYEW  
 20\_gi| 42631179 FTQVDTRLNRTDLRINRLGASAAALASLKPQALGE--DDKFALSLGVGSYKNAQAMAMGAVFKPA--ENVLLNVAGFSFSDSE-----KTFGAGVSWKF  
 21\_gi| 24114871 MVEMDNKLSKTESKLSGGIASAMAMTGLPQAYTPG---ASMASIGGGTYNGESAVALGVSMVS---ANGRWVYKLGSTNSQG----EYSAALGAGIQW  
 22\_gi| 8572547 GQHFNNRISAVERQTAGGIANAIATLPSPSRAG---EHHVLFSGSYHNGQA AVSLGAAGLSD-TGKSTYKIGLSWSDAGG-----LSGGVGGSYRW  
 23\_gi| 15800223 FSSLKNEVDDNRKEANAGTASAIASQPOVKTGD---VMMVSAGAGTFNGESA VSVGTSFNAG--THTVLKAGISADTQSD-----FGAGVGVGYSF  
 24\_gi| 33151932 MEQNTHNINKLSKELQ TGLANQSALSMLVQPNGVG---KTSVSAAVGGYRDKTALAI GVGSRIT--DRFTA KAGVAFNTYNG-----GMSY GASVGYEF  
 25\_gi| 22988498 INAVQNGVNQVAKNAYAGIAAATALTMIPDVQGK---TIAVGVGGGSYKGSQAV ALGISARIT--QNLKMKAGAGTSSQG-----TTVGLGASYQW  
 26\_gi| 46143244 VGHVNQRINKVNKELRAGIAGANAAAAGLPQAYIPG---KSMMAVAAGTYKNESALAVGYSRSS---DNGKVILKLQGNANTRG----DLGGSVGVGYQW  
 27\_gi| 23467834 NNELRTQMNNDRNMRAGVAQVAQANLPINILPG---KSTLSLATGNMGTQAF AVGYSRVS---DNGKLSVKFSLGHGDK----KTSVGAGVGYSW  
 28\_gi| 46917051 QDNFEKRLDKMDKMDGVMAGTHAVTNARPFAGNG---QTAMGVGTGFAGSAQAVAI GVSHNFQ--DSAWSMSATTNVSTGSGVK--TDVSGGVGAHYVF  
 29\_gi| 13472521 LSQ LNSDLGGIRDEARQAAAIGLAAASLR YDDRPG---KLSVAAGGGFWRDSSALAFGAGYTS---EDGRI RGNVSGTAAGGH-----VGVGAGISFTL  
 30\_gi| 46156748 FNQLENRFDAFSKESRAGIAGSNAAAALPTISIPG---KSVLSVSAGTYKQSAVALGYSRVSD--NGKVLLKLHGNNSNSVGD-----FGGGVGI GWAW  
 31\_gi| 23500987 FGKLNEDIVATRIEARQAAAIGLAAASLR YDDRPG---KISAAIGGGFWRGEGAV ALGLGHTSE--DQRMRSNLSAATS GGN-----WGMGAGFSYTF  
 32\_gi| 34762484 RNEVNEKIDDVKDEVRTVGSLSAALAGLHPMQYDP--KAPVQVMAALGHYRDKQSVAVGASYFF--NDRFMMSTGIALS GEKRT----KTMANVGFTLKL  
 33\_gi| 18568377 VNAFDGRITALDSKVENGMAAQAALSGLFPYPSVG---KFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRV--NPNLAFKAGAAINTSGNK----KGSYNI G VNYEF  
 34\_gi| 22127163 YSELKQDLRKQNSVLSAGIASAMMASLTQPYTSG---SSMTTIGAASYRGQSALSGLVSSIS--DSGRWVSKLQASSNTQGD-----FGIGVGVGYQW  
 35\_gi| 46192873 VGQLNDGLREVSAGVAMSMAMAQLPAPLDGSNH-----SFGVAVGGFDGQEAALAGGTAIV--NNNVTLRGALSHAGGK-----TGAGVGVGWSF  
 36\_gi| 23467645 LNNLEHKFDMSNKNLRAGIAGANAAAAGLASVSMGP---KSMLAISAAGYDGENAVAVGYSRMS--DNGKVMLKLQGNNSNSR GK-----VGGSVSVGYQW  
 37\_gi| 15964211 FAQLSGEIGQVRSEARQAAAIGLAAASLRFDNEPG---KLSVALGGGFWRSEGALAFGAGYTS--EDGRVRANLTGAAAGGN-----VGVGAGLSITL  
 38\_gi| 23466952 NNELRTQLHSVNRESRSGIAGANAAAALPMIAMPG---KSALAVSAGAYKQSAVALGYSRMS--DNGKIMLKLHGNSTSTGD-----FGGGVGI GWAW

```

39_gi|46143665 VANIDNRVSKLDRKVRGIGANAAAASSLPQVYIPG---KSMVALAGGAYSGASAVAVGYSRAS--DNGKVIKLVNGTANSAGH-----YSGGVGVGYQW
40_gi|46316503 VGAIQQGVNDLARNAYSGIAIAGALAGMPQVDPGK--VISVGAGFGNYGGYTAIAVGGSSARI---AQNTVIKLVGTVNGSR-----MMVNGGIGHSW
41_gi|15602579 INKLDGHINKVDKDLRAGIAGATAVAFQRPNEAG---KSIVSLVGVGSYRSESAIAVGYARNS--DNNKISIKLVGGMNSRGD-----VNFVGGSIGYQW
42_gi|23466874 VNRLDNVISTNNRTLQAGIAGANAAAALPTVTMPG---KSTIALSAGTYKGRNAVAIGYSRSL--DNGKITLKLQGNNSAGD-----FGGGVGVGWTW
43_gi|7532792 LDSQQRQINENHKEMKRAAAQSAALTGLFQPYISVG---KFNASAAVGGYSDEQALAVGVGYRF--NEQTAAGVAFSDGD-----ASWNVGVNFEF
44_gi|33152901 IQQIDQRILHQFRKEMHMNTANTAAAMSSLNFGNGY---GVSVGAAGGGHKGQYSLALGTAYTD--YQTQVNVKIALPVKQPKPS----NITYGVGFVYNF
45_gi|27380558 LAALNGRVDNLTRESRGGVALAASSLQFDPGK---KISVSGGFGNFQGGSLAVGLGYSY--SDAMRFNAAFATAQQA-----IGVRAGASWTL
46_gi|32028660 NNELRTLQNNLDRTLRAGIAGSNAAGLASVSMGP---KSMLAISAAAGYGGENAVAIGYSRMS---DNGKIMLQLOGNRNSRG-----KAAGSVSIGYQW
47_gi|19703806 -----EIIYKIDTVGSLSAALAGLHPMQYDS--KTPAQVMAALGHYKKNKHSVAVGASYFF--NDRFMMSTGIALSGEKRP----KTMANIGFTLKL
48_gi|46322712 ADAAADPADRFDFGARGIAATAGMASIPHMDRDS-----FAMGGGTATFQGRKAMAVGVQARI--TENLKATVNVGFAGSQR-----VVGAGMLYQW
49_gi|15603435 YNILNLRINKVDKDLRAGIAGANAAAGLPQAYIPG---KSMVAVAAGTYKQNAIALGMSRISD--NGKVIKLVNGTNSRGD-----FGASIGAGYQW
50_gi|22982300 NSYTDQIRRSARRDSYGGTASAMAMAGLPQAVLPG---HGMVAMAGGTYAGQSAFAIGVSQLSE--TGKWVYKLVQGTDSRGO-----FGASIGAGMHW
51_gi|32029187 VNRLDNAISTNNRLQAGIAGALATGGLPITVMPG---KSMLAASAGSYKQSAVALGYSRMSD--NGKIMLRLQGTSTSTGD-----VGGVGVGYQW
52_gi|19568164 IDRLLSRVNELDKEVKNGLASQAALSGLFQPYNVG---SLNLSAAVGGYKSKTALAVGSGYRF--NQNVAAKAGVAVSTNGGS-----ATYNVGLNFEW
53_gi|22000944 TNELDHRIHQENKANAGISSAMAMASMPQAYIPG---RSMVTGGIATHNGQAVAVGLSKLS--DNGQWVFKLVINGSADTQGH-----VGAAVGAGFHF
54_gi|27380649 IGSLOSEITANQEQEARRGIVAASAAPVLMPSARG---RTTAVNAGYYRGQSGVIGIGISHRLDWTTPVLFVGGYSNNGGSE-----HIGRAGMAVEF
55_gi|16121668 FGGFDKINQKQKQLNAGIAATMAAAVIPQKSGSK---VSIQVGLAGYSDQAGSVGAIWHV--NQRITMNTTMTYDTQRGV-----SLLTGLSIGI
56_gi|23466989 FNHLDNKIEIFNKDLRAGVAGAHAAAALPTVTMPG---KSSLALSAGTYKGNNAVALGYSRSL--DNGKIMLKLHGSRNSAGD----FGGGVGVGWTW
57_gi|16121667 YNQLSDKVNKNFNKTNAGISGAMAMSGIPQKFGYE---KSFMAIGAYRGQSALAVGGDWNII--NHKTITLVNVVSADTEGGV-----GVAAGFAFGI
58_gi|22983404 MGNMSNSINNVDRNAAKGIASASALNIVTPYLPGR---TTLNAGVANRYGYQSVGLGVSRWN--EKGTINYNLGVSTSGGNS----TIVRAGIGIVL
59_gi|46314378 LTQMQQIQOQTDMSAREGIAATAAMASIPHMDRDS---NFAMVGVTATFQGGKAMAVGVQARV--TENLKATLNGGFAGSQR-----VVGAGMLYQW
60_gi|16766976 MGEMNSKIKGVENKMSGGIASAMAMAGLPQAYAPG---ANMTSIAAGGTFNGESAVAIGVSMVS---ESGGWVYKLVQGTNSNSQGD----YSAAGAGFQW
61_gi|46317988 INSVRDEMSKYRKDADAGTASAIAMANMPQAVLPG---EKVVALGGGTYGGQSAMAVGLSFAT---TKWLKLVGSVTTAVSGHGS----FGAGAGVGYRW
62_gi|46315938 AGQLQQGINDTARKAYSGVAAATALTMIPDVKDK---VLSVGVGVGSYQGYSAVALGATARI--TENIKMLRAGASLGGSG-----TAIGMGASMQW
63_gi|46132846 NSYTDQRVDALSREAHAGTAAAMAMAGLPQATIPG---KSMIALGGATYRGQSLAIGASVMS---PGGRWVYKLVGTSTARNT-----YGASLAAGFHW
64_gi|17549839 IGMVRQGISQVARGAYSGIAAATALTMIPDVDQGK---SIAIGIGSATYKGYQAVLALGASARI--SHNLKAKLVGVGYSSEGT-----TVGMGASYQW
65_gi|17986489 VDGLQGGINSARKEARAGANAALSLRLYDNRPG---KVSIAITGVGGFKGSTALAAAGIGYTSK--NENARYNVSVAYNEAGT-----SWNAGASFTL
66_gi|22988648 MQQFQGGLSDMARNAYSQTASALALTAIPEVDSSK---NLAIGVGTAGYKGYQAVAVGLSARV--TQSLKVLKLVGAGISSATT-----AVTA

```

図 4-1-1 三量体オートトランスポーター膜貫通ドメインのアミノ酸配列アライメント

配列アライメントデータは、daTAA サーバー (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/dataa>)より取得した。Hia の配列は緑色で示し、1077 番目のアルギニンは青色で示した。他の三量体オートトランスポーターにて、Hia の 1077 番目に相当するアミノ酸がアルギニンまたはリジンの場合も青色で示した。

## 4-2. 方法

### 4-2-1. 変異体プラスミドの作製と発現・精製

Quikchange site-directed mutagenesis kit を用いて pET-mHiaT または pASK-HiaT ベクターの Hia1077 番目のアルギニンに当たるコドンをメチオニンまたはリジンのコドンと置換した。それぞれの変異体の発現と精製は、2-2-4.、2-2-5.と同様の方法を用いて行った。

### 4-2-2. 変異体の三量体再構成実験、遠紫外 CD スペクトル測定

精製を行った変異体は、3-2-3.と同様の方法を用いて変異体の三量体形成反応を観測した。まず、精製した各変異体は、ギ酸処理によって三量体から単量体に解離させた。ギ酸除去後、解離した変異体を尿素で可溶化し、リアセンブリ溶液で尿素を希釈することによりアセンブリ反応を開始させた。各時間インキュベーションを行った反応液をサンプルとして、SDS 電気泳動を行った。検出された単量体、三量体、高分子量多量体のバンドの割合を算出し、反応時間に対してプロットを行った。R1077K のデータに対しては、(式 8)を用いてカーブフィッティングを行った。

CD スペクトルは、3-2-4.と同様の方法で測定した。ギ酸処理により解離した mHiaT 変異体が溶解した尿素溶液をリアセンブリ溶液(20 mM Tris [pH 8.0], 100 mM NaCl, 0.6% [v/v] C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>)で 15 倍希釈し、24 時間インキュベーションを行った後に遠紫外 CD スペクトル測定を行った。蛋白質濃度は測定に使用した溶液の SDS 電気泳動解析により推算された。

### 4-2-3. 大腸菌破碎液のイムノプロットング解析

シグナル配列を含む HiaT 野生型、R1077K 変異体、R1077M 変異体を発現する各ベクター (pASK-HiaT\_WT, pASK-HiaT\_R1077K, pASK-HiaT\_R1077M)を導入した大腸菌 BL21 (DE3)を LB 培地に植菌し、OD<sub>600</sub> が 0.6-0.8 になるまで 37°Cで培養した。OD<sub>600</sub>が目的値に到達した後、0.2 mg/L になる様に anhydrotetracycline を加え発現誘導を行った。発現誘導から 2 時間後、5000×



g、4℃、10 分間の遠心により大腸菌の集菌を行った。沈殿した菌体を PBS で懸濁し、超音波破碎を行った。大腸破碎液を 4% SDS を含むサンプルバッファー中で 5 分間加熱処理後、SDS 電気泳動に供した。電気泳動には、11-14%濃度勾配アクリルアミドゲル(DRC, Tokyo, Japan)を用いた。電気泳動で分離した蛋白質を P プラス膜に転写し、TBS-T で溶解した 5%スキムミルクでブロッキングを行った。転写した蛋白質を抗 Strep-tag 抗体(5% スキムミルク/TBS-T で 100000 倍希釈)で標識した後、HRP 標識二次抗体(5% スキムミルク/TBS-T で 10000 倍希釈)と EzWestLumiOne で可視化した。シグナルの検出は LAS-3000 を用いて行った。

#### 4-2-4. 尿素中における mHiaT の安定性評価

最初に実験に使用する 3 種類の溶液、①精製した mHiaT 野生型/変異体溶液 (蛋白質濃度 : 0.34 mg/mL, 溶液 : 20 mM MES [pH 5.2], 1 M NaCl, 0.6% C8E4)、②10M 尿度溶液、③10×緩衝液 (200 mM Tris [pH 8.0], 6 % [v/v] C8E4)を用意した。そして、①~③の溶液を 1 : 8 : 1 の割合で混合し、25℃で各時間インキュベーションを行った。インキュベーションした溶液は SDS 電気泳動に供し、蛋白質の可視化は Nimble Juice を用いた。

## 4-3. 結果

### 4-3-1. R1077M の三量体形成反応の追跡

mHiaT の 1077 番目のアルギニンをメチオニンに置換したプラスミドを作製し、変異体 R1077M の発現と精製を行った。そして、精製した R1077M の CD スペクトルを測定したところ野生型のスペクトルと一致した(図 4-3-1)。よって、変異による二次構造の変化は起こっていないと考えられる。次に 3-3-2.と同様に三量体形成反応追跡実験を行い、各時間における三量体バンドの割合を算出して時間に対してプロットした(図 4-3-2)。標準条件で三量体形成反応を追跡した結果、三量体の量は 2 時間までに急速に増加し、その後 6 時間までは緩やかな上昇となる。しかし、その後 24 時間にかけて三量体の増加量が大きくなった(図 4-3-2, A)。よって、この三量体形成反応は少なくとも 2 つの反応が含まれていると考えられる。さらに、三量体形成の初期反応は極めて速く、カーブフィッティングをおこなう事はできなかった。また、高塩濃度条件、高蛋白質濃度条件においても、測定 1 点目(0.25 時間)にて三量体形成反応はほぼ終了していたので、カーブフィッティングは行わなかった(図 4-3-2, B, C)。次に、標準条件での R1077M の三量体形成反応を野生型と比較したところ、R1077M における測定 1 点目(0.25 時間)の三量体割合は約 30%に達しているのに対して野生型は約 10%であった。よって、R1077M 変異体では三量体形成速度が上昇していることが明らかとなった(図 3-3-2, B、図 4-3-2, A)。よって、1077 番目のアルギニンの静電反発がアセンブリ反応速度に影響を与えている可能性が高いと考えられる。また、R1077M 変異体では三量体形成反応が速いにも関わらず、24 時間後の三量体形成量は野生型と比較し極めて低かった(図 3-3-2, B、図 4-3-2, A)。しかしながら、全てのアセンブリ条件にて高分子多量体は 10%未満であった。また、野生型と異なり高蛋白質濃度条件でも高分子多量体は増加することはなかった(図 4-3-2, C)。そしてリアセンブリ反応開始 24 時間後においても多くの単量体のバンドが確認された。なぜ R1077M の三量体形成反応は速いにも関わらず、反応開始から 24 時間後まで多くの単量体バンドが存在しているのだろうか。その理由としては、2 つの可能性が考えられる。1 つは、単量体がミスフォールドして三量体構造を形成できない状態に陥ってしまった可能性が考えられる。2 つ目は、SDS 耐性を持たない多量体が形成されている可能性が考えられる。この場合、溶液中では多量体を形成しているが、

SDS 耐性が無いため SDS 電気泳動においては単量体として検出される。もし、後者の理由が原因であるならば、リアセンブリ反応時の蛋白質濃度が上がるとミスアセンブリ多量体も多く形成されることが考えられる。実際、高蛋白質濃度条件での 24 時間後の単量体割合は、標準条件での単量体割合よりもわずかに多くなっていた (図 4-3-2, A, C)。よって、R1077M のリアセンブリを行うとミスアセンブリした多量体が形成される可能性が高いと考えられる。

次に、ミスフォールドまたはミスアセンブリした R1077M の構造を調べる為に、24 時間リアセンブリ反応を行った溶液の CD スペクトル測定を行った(図 4-3-3)。SDS 電気泳動による三量体形成反応追跡実験の結果から、標準条件で 24 時間アセンブリを行うと三量体割合は約 60%、単量体割合は約 30%になる (図 4-3-2, A)。もし、三量体がすべて天然状態で単量体に変性状態であるならば、CD スペクトルの強度は天然状態よりも全体的に小さくなると考えられる。しかし、今回測定したスペクトルの強度は天然状態のもの比べて大きく、215 nm に強いピークを持っていた(図 4-3-3)。215 nm のピークはβシート構造に由来し、アミロイドのようにβシートが連なった構造をとると 215 nm の強度が大きくなると知られている(38)。よって、このリアセンブリ溶液にはミスアセンブリした R1077M 変異体が含まれており、それらは分子間βシートを含む構造であると考えられる。また、SDS を加えたリアセンブリ溶液の CD スペクトルを測定した結果、スペクトルの強度が著しく減少した(図 4-3-3)。天然状態の R1077M 変異体は SDS 変性に対して耐性がある為、この現象はミスアセンブリした R1077M が SDS によって変性した結果であると考えられる。また、R1077M についても、3-3-3.と同様に蛍光強度と蛍光異方性を測定した(図 4-3-4)。その結果、双方ともに最初に蛍光強度または蛍光異方性が減少し、その後時間と共に蛍光強度または蛍光異方性が上昇した。なぜこのような結果になったのかは明らかではないが、野生型とは明らかに異なる結果となった。

#### 4-3-2. R1077K の三量体形成反応の追跡

R1077M で見られた野生型と異なる特徴は、正電荷のアミノ酸を電荷のないアミノ酸に置換したゆえに生じたのか、メチオニンに置換したゆえに生じたのかを調べるために、アルギニンと同じく

正電荷を持つアミノ酸のリジンに置換した変異体 R1077K を作製した。そして、精製した R1077K の CD スペクトルを測定したところ野生型のスペクトルと一致した(図 4-3-1)。よって、変異による二次構造の変化は起こっていないと考えられる。次に 3-3-2. と同様に精製してギ酸処理で解離させた変性 R1077K を用いて、標準条件と高塩濃度条件でリアセンブリ反応を行った。次に、電気泳動で検出された各バンドの割合を反応時間に対してプロットした(図 4-3-5)。電気泳動の結果、高分子多量体の形成が 10%ほど観察されたため、高分子量多量体の形成を加味した三次反応モデル式(式 8)を用いて三量体のデータに対してフィッティングを行った。その結果、フィッティングカーブは観測データとよく一致した。そこから導き出された速度定数(表 4-3-1)は、同条件での野生型の速度定数(表 3-3-1)と同様の値を示した。よって、R1077K 変異体はリアセンブリすると野生型よりわずかに高分子量多量体の形成が多くなるが、三量体形成速度はほぼ同じであることが示された。また、リアセンブリ溶液の CD スペクトルを測定したところ、天然状態の R1077K のスペクトルと一致し、SDS を加えてもスペクトルが変化することは無かった(図 4-3-6)。また、蛍光強度と蛍光異方性を測定した結果、蛍光強度の変化と蛍光異方性の時間における変化は、野生型と同様であった(図 4-3-4)。

これらの結果より、R1077K のアセンブリ反応では、R1077M で観察されたようなミスアセンブリした多量体の形成は確認されなかった。よって、mHiaT の 1077 番目の正電荷アミノ酸は、mHiaT がミスアセンブリすることを防ぐと考えられる。

#### 4-3-3. 大腸菌における HiaT 変異体の発現レベル

1077 番目のアミノ酸の変異は、細胞内にてどのような影響を与えるかを調べる為に、OmpA シグナル配列を含む HiaT 野生型と各変異体が大腸菌で発現させた。その大腸菌破砕液をサンプルとし SDS 電気泳動を行った後、イムノブロットングによって HiaT を検出した(図 4-3-7)。その結果、三量体、単量体、シグナル配列を含む単量体に相当するバンドが野生型と変異体全てで検出された。そして発現量や三量体と単量体の存在比に大きな違いは見られなかった。よって、生体内において

R1077M のアセンブリの不具合は観察されなかった。

#### 4-3-4. 尿素中における mHiaT 変異体の安定性

mHiaT 野生型と変異体の安定性を調べる為に、天然状態の mHiaT 野生型と変異体を 8 M 尿素溶存在下で各時間インキュベーションを行った。インキュベーション後、SDS 電気泳動に供し、Nimble Juice で蛋白質を検出した (図 4-3-8)。その結果、WT と R1077K では、全ての時間において三量体のバンドしか確認されなかった (図 4-3-8, A, B)。しかし、R1077M ではインキュベート 1 時間後に単量体のバンドが確認された (図 4-3-8, C)。そして、この単量体のバンド強度は観測した時間を通して変化する事は無かった。この結果より、膜から抽出したメチオニン変異体には、野生型と同様に 8 M 尿素中でも安定な三量体と、8 M 尿素中で単量体に解離してしまう三量体の両方が存在していることが明らかとなった。おそらくこの三量体は一部分間違った構造をとっているために安定性が低くなっていると考えられる。この実験により、膜から精製したメチオニン変異体には、僅かに構造安定性の異なる三量体が含まれている事が明らかとなった。

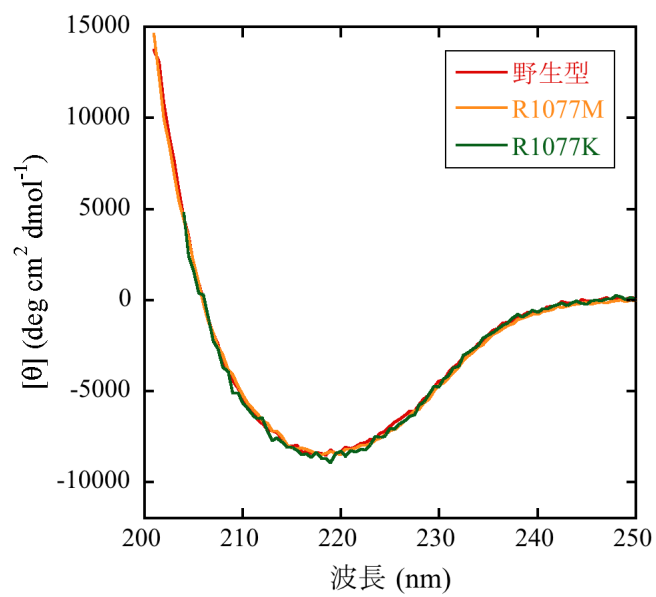


図 4-3-1 天然状態の mHiaT 野生型と各変異体の CD スペクトル

大腸菌で発現させた mHiaT の野生型または変異体を精製し、CD スペクトルを測定した。野生型は青色、R1077M は橙色、R1077K は緑色で示した。

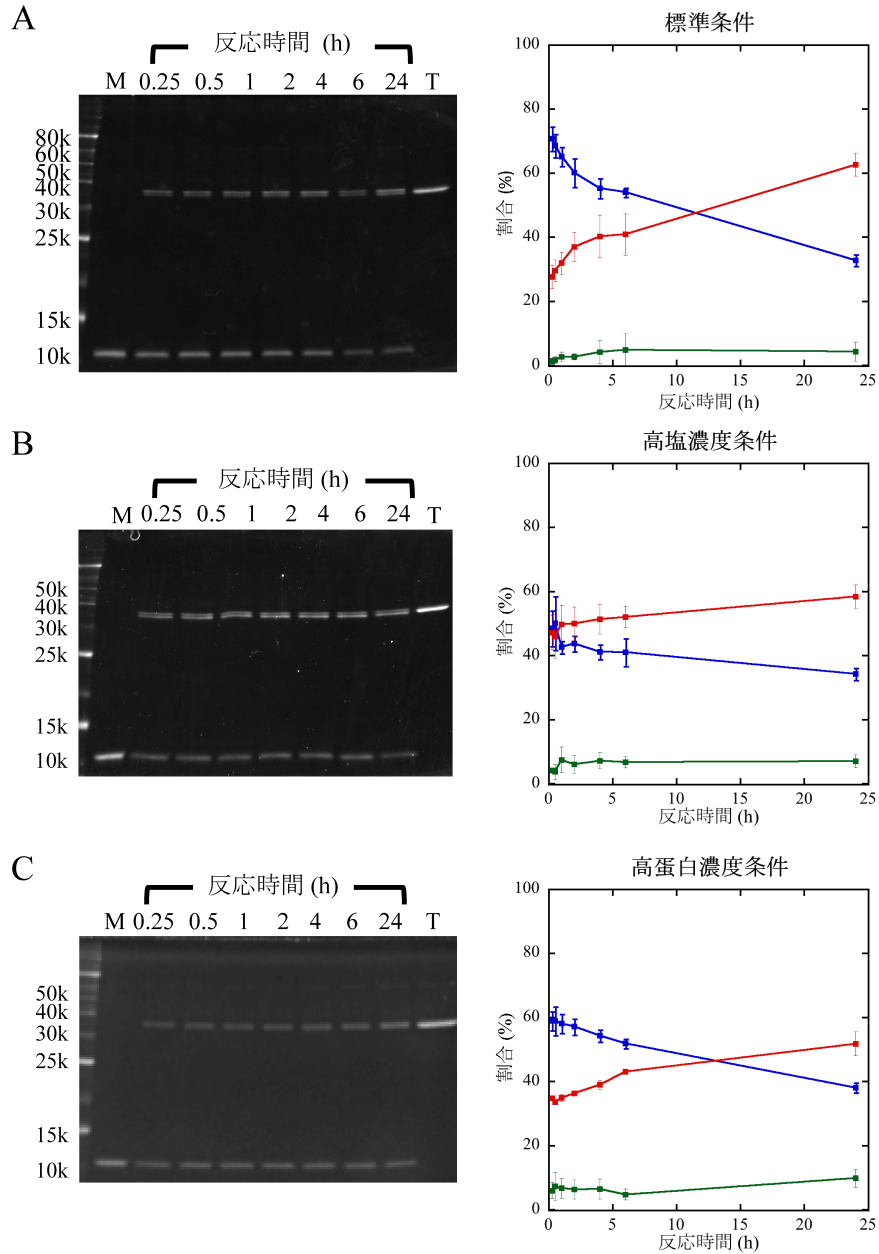


図 4-3-2. 各条件における R1077M 三量体形成反応の追跡

R1077M のリアセンブリ反応を開始させ、最大 24 時間インキュベーションを行った。インキュベーション後、SDS 電気泳動を行った(左)。バンド強度から割合を算出し、反応時間に対してプロットした(右)。三量体の割合は赤色、単量体は青色、高分子多量体は緑色で示した。(A)が標準条件、(B)は高塩濃度条件、(C)は高蛋白質濃度条件での実験結果である。レーン M は単量体 R1077M をサンプルとし、レーン T は天然状態 R1077M をサンプルとした。また、誤差範囲は 3-4 回の実験の標準誤差を示す。

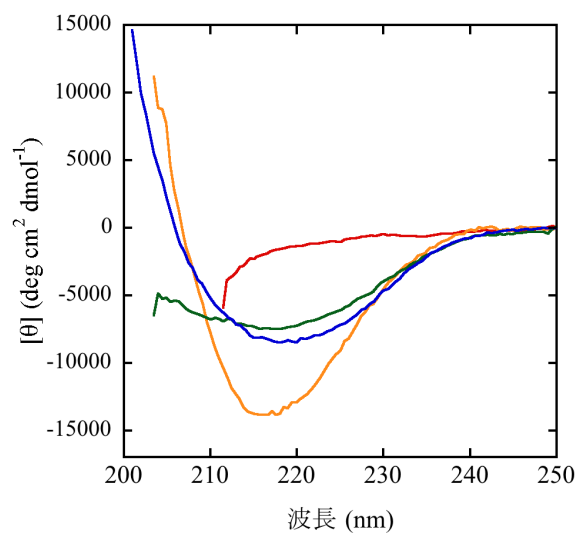


図 4-3-3. R1077M リアセンブリ溶液の遠紫外 CD スペクトル

ギ酸処理によって単量体に解離した R1077M のスペクトルを赤線で示した。また、解離した R1077M を標準条件で 24 時間リアセンブリ反応を行い測定したスペクトルを橙線、SDS を加えたリアセンブリ溶液のスペクトルを緑線で示した。また、天然状態 R1077M のスペクトルは青線で示した。



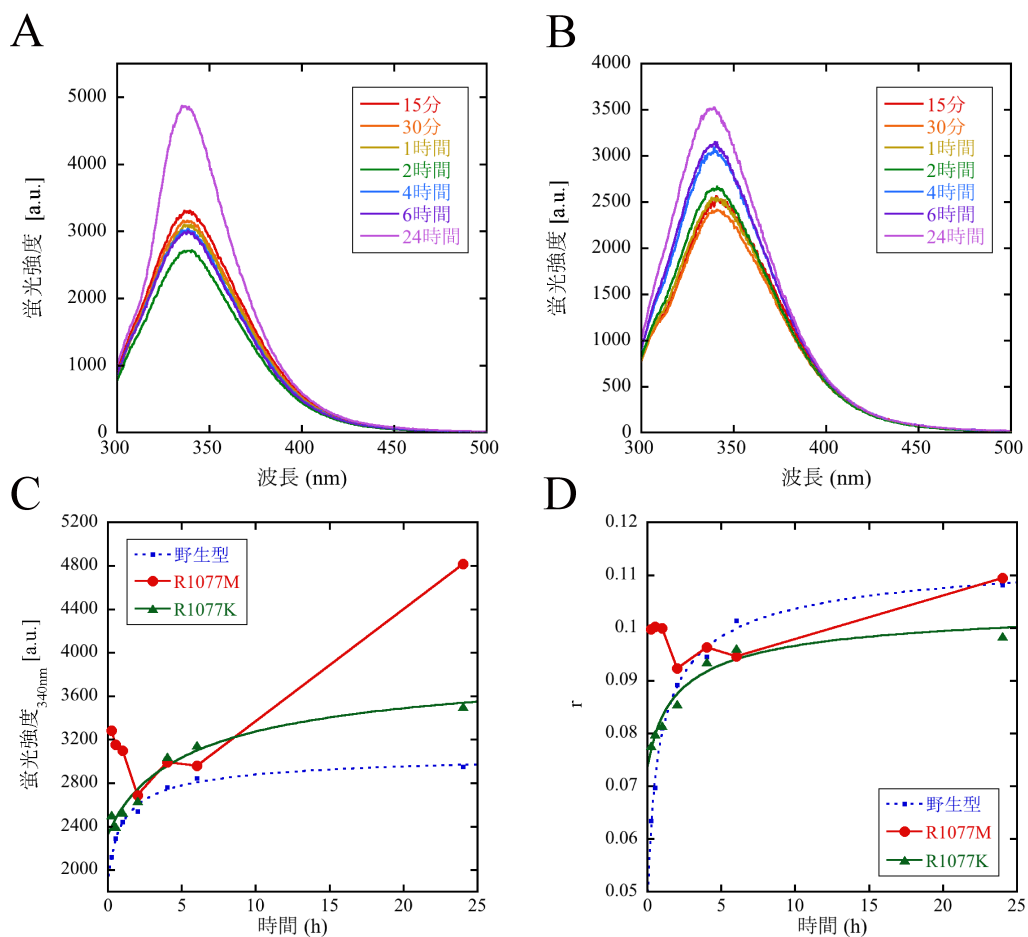


図 4-3-4. 蛍光による R1077M または R1077K の三量体形成反応の追跡

(A) R1077M のリアセンブリ反応における蛍光スペクトル変化。(B) R1077K のリアセンブリ反応における蛍光スペクトル変化。(C) R1077M/R1077K のリアセンブリ反応における 340 nm の蛍光強度の経時変化。(D) R1077M/R1077K のリアセンブリ反応における蛍光異方性の経時変化。(C)(D) のカーブフィッティングに使用したパラメーターは、野生型は表 3-3-2、R1077M は表 4-3-2 に示した。

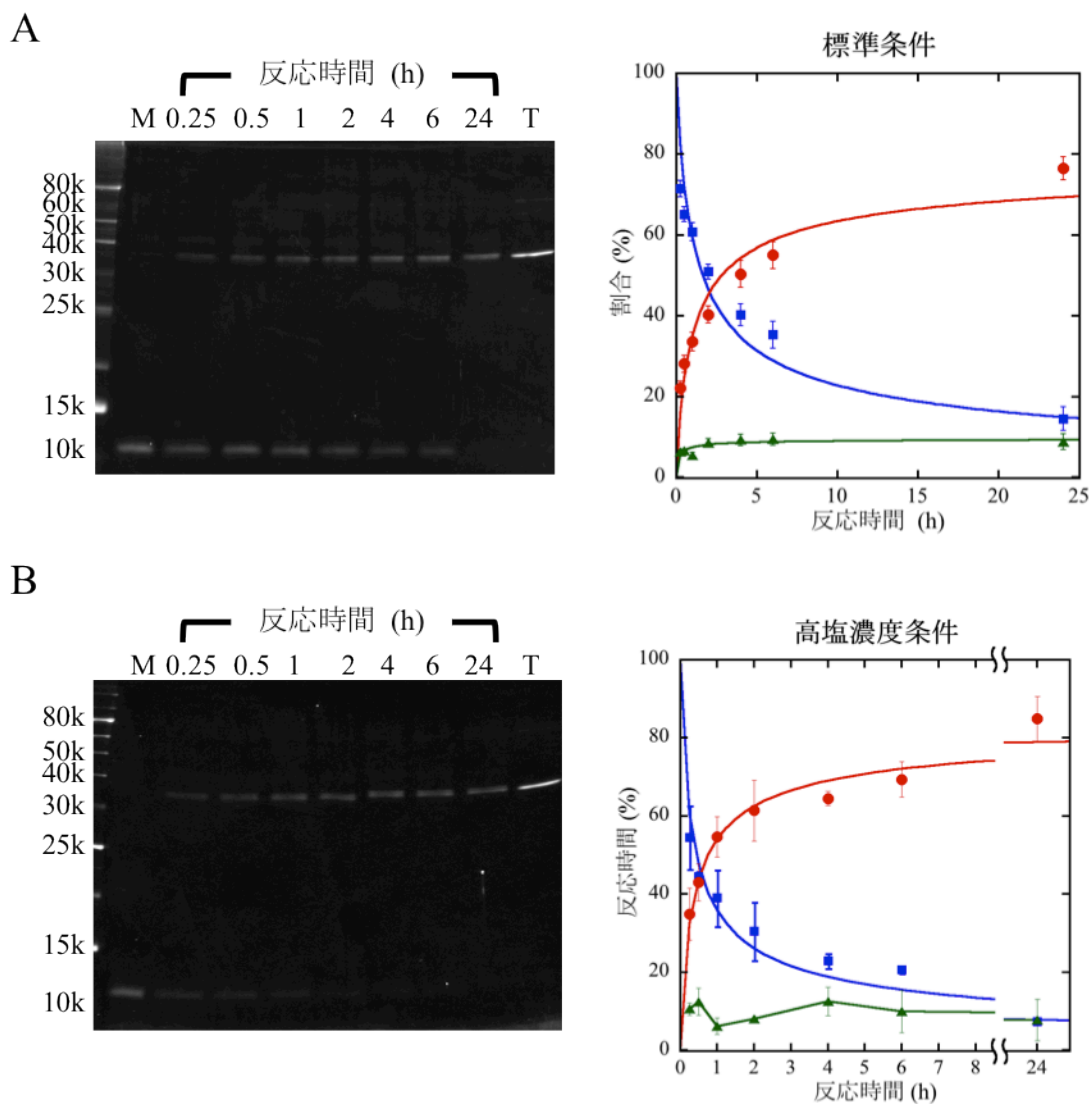


図 4-3-5. 各条件における R1077K 三量体形成反応の追跡

各時間リアセンブリ反応を行った R1077K リアセンブリ溶液をサンプルとして SDS 電気泳動を行った。そして蛋白質は Nimble Juice によって可視化した(左)。レーン M は単量体に解離した R1077K をサンプルとし、レーン T は天然状態の R1077K をサンプルとした。また、各バンドの強度を定量することにより割合を算出して時間に対してプロットを行った(右)。三量体の割合は赤色、単量体は青色、高分子多量体は緑色で示した。三量体のデータに対しては、(式 8)を用いてフィッティングを行った。カーブフィッティングに使用したパラメーターは、表 4-3-1 に示した。また、誤差範囲は 2 回または 5 回の実験の標準誤差を示す。(A)が標準条件、(B)は高塩濃度条件で三量体再構成実験を行った結果である。

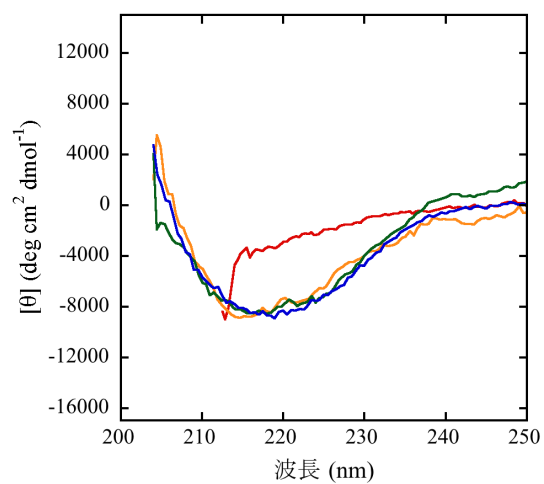


図 4-3-6. R1077K リアセンブリ溶液の CD スペクトル

ギ酸処理によって単量体に解離した R1077K のスペクトルを赤線で示した。また、解離した R1077K を標準条件で 24 時間リアセンブリ反応を行い測定したスペクトルを橙線、SDS を加えたリアセンブリ溶液のスペクトルを緑線で示した。また、天然状態の R1077K のスペクトルは青線で示した。

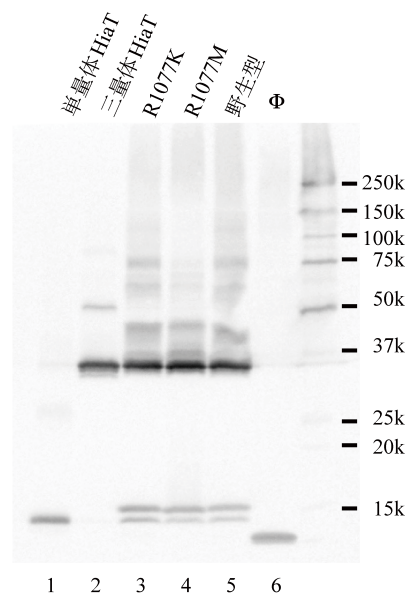


図 4-3-7. HiaT 野生型, R1077K, R1077M の発現レベル

野生型または変異体の HiaT 遺伝子が挿入された pASK-IBA12 ベクターを有する大腸菌に各蛋白質を発現させた。蛋白質を発現した大腸菌を OD<sub>600</sub> の値で規格化した後、超音波破碎を行い、SDS 電気泳動に供した。蛋白質は抗 Strep-tag 抗体を用いて検出した。Φは空ベクターが導入された大腸菌由来のサンプルである。

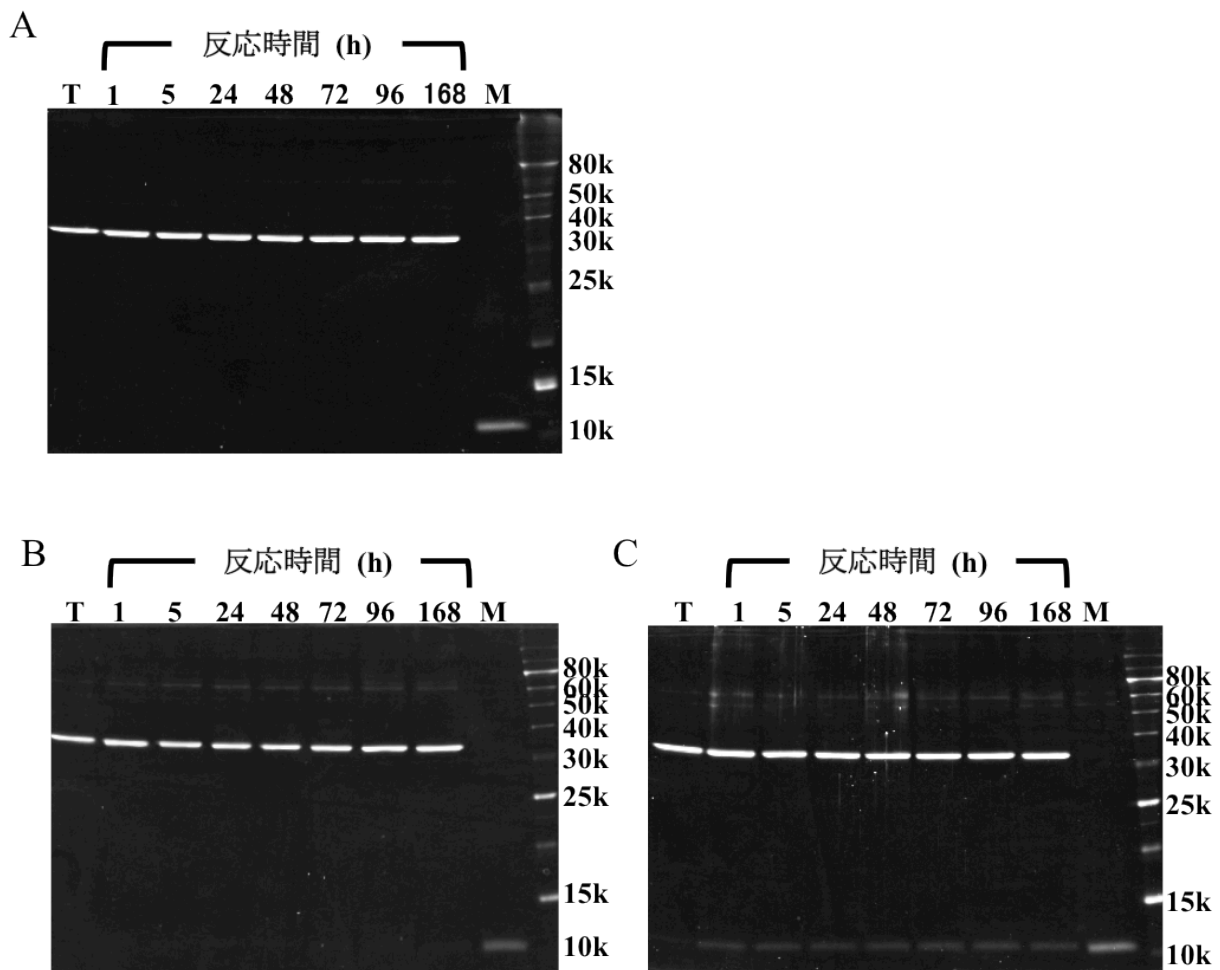


図 4-3-8. 8 M 尿素中における各蛋白質の三量体安定性

精製した野生型 mHiaT または変異体に尿素を 8 M になるまで加え、各時間インキュベートを行った。その後、SDS 電気泳動と Nimble Juice による蛋白質の可視化を行った。(A)が野生型、(B)が R1077K、(C)が R1077M での結果である。

表 4-3-1. R1077K 三量体形成反応の速度定数と三量体収率

	標準条件	高塩濃度条件
速度定数 $\times 10^{-10}$ (1/M <sup>2</sup> h)	7.29 $\pm$ 2.33	21.7 $\pm$ 4.4
三量体の収率 (%)	81 $\pm$ 7	86 $\pm$ 3

表 4-3-2. 蛍光測定における R1077K 三量体形成反応の速度定数

	速度定数 $\times 10^{-10}$ (1/M <sup>2</sup> h)
蛍光強度	$1.2 \pm 0.6$
異方性比	$3.4 \pm 2.1$

#### 4-4. 考察

mHiaT の Arg1077 によるバレル中心での静電反発の影響を調べる為に、このアミノ酸を電荷のないメチオニン、またはアルギニンと同じ正電荷を持つリジンに置換した変異体を作製し、三量体形成反応を追跡した。その結果、R1077M では野生型と比較して全ての条件で三量体の形成速度が、上昇していることが明らかとなった(図 4-3-2)。しかし、R1077K では三量体の形成速度は、野生型とほぼ変わらなかった(図 4-3-5)。これらの結果より、R1077M において三量体形成速度が上昇した原因は、正電荷のアミノ酸を電荷のないアミノ酸に置換したことに依ると考えられる。つまり、正電荷を持つアミノ酸を電荷のないアミノ酸に置換した結果、局所的な静電反発が抑えられ、アセンブリの速度が上がったと考えられる。また、R1077M のリアセンブリ実験では、SDS 耐性を持つ高分子多量体の形成はほぼ検出されなかった(図 4-3-2)。しかし、リアセンブリ溶液の CD スペクトルにより、リアセンブリ溶液にはミスアセンブリした蛋白質が含まれることが明らかとなった(図 4-3-3)。この間違っただ構造を持つ R1077M 多量体は、SDS を加えると変性することが CD スペクトルによって示された。よって、この間違っただ構造を持つ R1077M が多量体構造を形成していたとしても、電気泳動においては単量体のバンドとして観測されると考えられる。そして、SDS 電気泳動によるリアセンブリ実験にて、24 時間反応溶液では単量体の割合が標準条件で約 30%、高蛋白質濃度で約 40%となった。リアセンブリ反応時の蛋白質濃度を上げると三量体形成反応が速くなるにも関わらず、24 時間での単量体の割合は増加する。これらの結果より、R1077M はリアセンブリすると、天然状態の三量体と異なる多量体を形成すると考えられる。そして、この多量体は SDS によって変性すると考えられる(図 4-4-1)。一方、R1077K で同様の三量体形成反応の追跡実験を行った結果、三量体形成反応は野生型と同じ三次反応のモデルでフィッティングする事が出来た(図 4-3-5)。さらにミスアセンブリした SDS 非耐性多量体の存在も確認されなかった。これらの結果より、Hia の Arg1077 同士の静電反発はサブユニット同士の接近を抑制し、好ましくない相互作用が形成されるのを防いでいると考えられる。よって、静電反発が存在しない場合、サブユニット同士の接近が起りやすくなり構造の形成速度が上がるが、好ましくない相互作用を形成してミスアセンブリする可能性が高くなる。1077 番目に正電荷アミノ酸が存在する場合、好ましく



ない相互作用は正電荷同士の反発によって解消される。しかし、R1077M の様に 1077 番目に電荷の反発が存在しない場合、好ましくない相互作用は解消できず、そのまま安定化しミスアセンブリを引き起こしてしまうと考えられる。

また、このようにアルギニンが回転対称の中心に集まり特徴的な配置を形成している現象は、他の多量体蛋白質でも観察されている(39)。そのようなアルギニンの配置を持つ蛋白質の例としては、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のキャプシド蛋白質が挙げられる。この蛋白質は HIV のキャプシドを構成する蛋白質で、六量体と少量の五量体が組み合わさることによってカプセル状の構造を形成する。この基本ブロックの五量体と六量体の回転対称の中心には、各サブユニットからのアルギニンがクラスターを形成している。HIV キャプシド蛋白質の野生型は六量体を多く形成するが、このアルギニンを電荷のないアミノ酸に置換すると五量体を多く形成するようになる(40)。よって、この回転中心でのアルギニン同士の反発は、多量体形成に重要な役割を持っていると考えられる。また、このようなアルギニンクラスターを形成するアルギニンの C<sub>γ</sub>間の距離は 5Å以下の距離に存在するが、それらの正電荷の 90%以上は近くのカルボキシル基や結合したイオンによって中和されている。しかしながら HiaT の場合、1077 番目のアルギニンの近くには、この電荷を打ち消すような負電荷を持つアミノ酸は存在しない。よって、Meng らはヘリックス双極子モーメントがアルギニン正電荷を中和しているのではないかと提案している(26)。また、水分子とアルギニンの相互作用も蛋白質の安定化に寄与していると考えられており、他の蛋白質で観察されたアルギニンクラスターにおいても 79%が水分子と水素結合を形成していた。このような水分子とアルギニンの相互作用は、mHiaT の結晶構造(PDBID: 2gr8)においても観察される。mHiaT の結晶構造には、2つの三量体βバレル構造が含まれている。その内の1つの三量体構造(A, C, D 鎖)では、アルギニンの N<sub>η</sub>分子と相互作用している水分子が存在する(図 4-4-2)。これらの水分子は、Arg1077 の N<sub>η</sub>分子、Ala1034, Ser1035, Leu1037 の主鎖のカルボニル酸素と水素結合をして、水素結合ネットワークを形成しているように見える。しかし、もう一方の三量体バレルでは、前者と一致する位置の水分子は1つしか存在しなかった。また、別の HiaT 結晶構造(PDBID: 2gr7)で水分子の位置を確認したところ、1つの三量体(A-C 鎖)で、2gr8 三量体構造(A, C, D 鎖)で観察された水分子と同じ位置に相当する

水分子が1つ確認された。よって、Arg1077と相互作用する水分子の位置はいくらか決まっていると考えられ、水分子とArg1077の側鎖または蛋白質主鎖との水素結合は静的なものではなく、動的なものであると考えられる。そして、これらの水素結合ネットワークが三量体を安定化させている可能性が考えられる。

また、メチオニンに置換した変異体R1077Mは、野生型と同様に熱とSDS変性に対して耐性を持っており、野生型との安定性の違いは確認されなかった。しかし、リアセンブリ実験において野生型と変異体R1077Mには大きな違いがみられた。これらの事より1077番目のアルギニン同士の静電反発は、アセンブリ反応の過程で重要な役割を果たしていると考えられる。一方、大腸菌内でこの変異体を発現させたところ三量体形成に影響は見られなかった(図4-3-7)。しかし、膜から抽出したR1077M変異体には、僅かだが野生型と異なる安定性を持つ三量体が含まれていた(図4-3-8)。よって、外膜へのアセンブリにもアルギニンの存在が影響を与えるという可能性は排除できない。

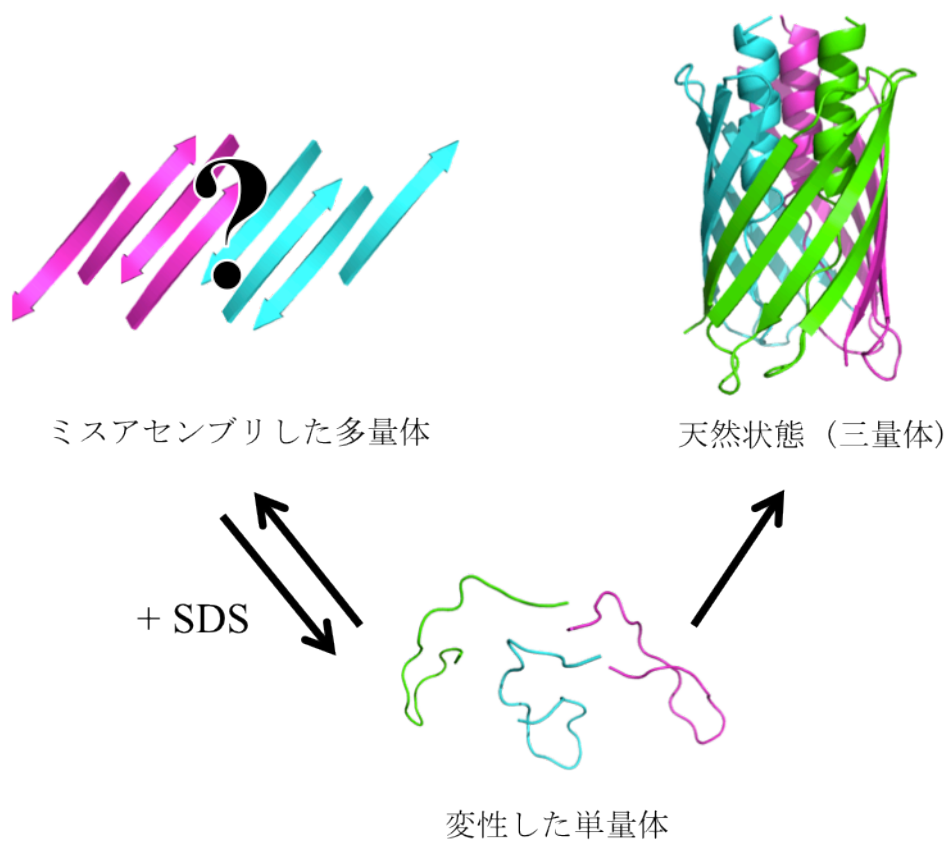


図 4-4-1. R1077M におけるアセンブリモデル

変性した R1077M 単量体をリアセンブリさせると、天然状態とミスアセンブリした多量体を形成する。このミスアセンブリした多量体は SDS によって解離する。

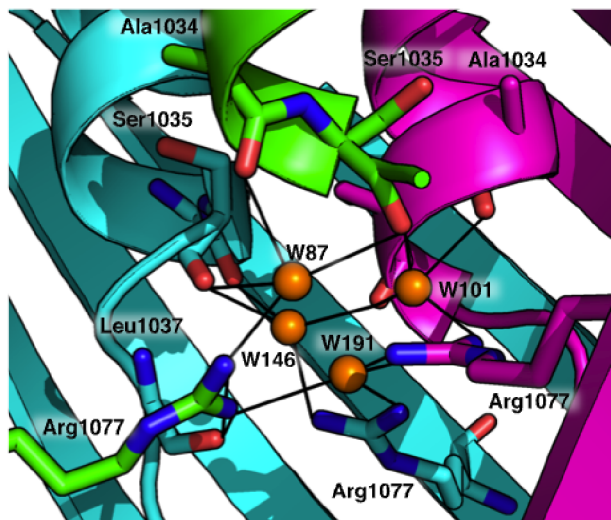


図 4-4-2. 1077 番目のアルギニンの周囲に存在する水分子

mHiaT 三量体 $\beta$ バレルの構造は、PDBID 2gr8 の A, C, D 鎖を使用した。Arg1077, Ser1035, Ala1034, Leu1037 はスティックで表示、水分子は橙色の球で示した。水素結合可能な原子間は、黒色の線で表示した。

## 5. 総論

### 5-1. アルギニンクラスターの役割

今回注目したアルギニンは、アミノ酸の中でもとりわけ長い側鎖と正電荷を持ち、さらに最大 5 つの水素結合のドナーとなれるグアニド基を持つ特徴的なアミノ酸である。いくらかの多量体蛋白質の接触面において、このアルギニンがクラスターを形成している事が確認されている。特に特徴的なものは円状に配置されるアルギニンクラスターである。このようなアルギニンクラスターのアルギニンを電荷の無いアミノ酸に置換すると、多量体を形成するサブユニット数に影響を与えるという報告もある(40)。本研究においても、mHiaT のバレルの中心に存在する 1077 番目のアルギニンで構成されるアルギニンクラスターを非電荷アミノ酸に置換した結果、この変異体は SDS 非耐性多量体の形成を引き起こした。しかし、アルギニンと同じ正電荷を持つアミノ酸に置換した結果、野生型と同様の三量体形成反応を示した。これらの結果は、多量体形成反応において電荷の反発が重要であることを示す。本研究の mHiaT における三量体形成実験では、この 1077 番目のアルギニンの反発は mHiaT のミスアセンブリを防いでいた。これらの結果より、アルギニンの反発は多量体構造形成中に形成される正しくない相互作用を解消していると考えられる。一般的に蛋白質の構造形成や多量体形成において、速すぎる反応や強すぎる相互作用がミスフォールディングやミスアセンブリを起こすという事は知られている(41, 42)。これらの現象は、蛋白質のアセンブリやフォールディング中に形成される好ましくない相互作用を解消する力よりも、そのような相互作用を維持する力が勝った結果だと考えられる。よって蛋白質の構造形成、特に多量体形成においては、構造を不安定化させる負の相互作用が正しい構造形成に重要であると考えられる。今までこのような負の相互作用は、蛋白質の構造を不安定化させると判断される事が多かった。しかし、本研究によって負の相互作用が正しい構造形成に重要である事が示された。よって本研究での結果は、負の相互作用は蛋白質の不安定化のみをもたらすという認識の是正に一石を投じることができるだろう。また、この知見は人工蛋白質の設計においても重要であると考えられる。近年、人工設計蛋白質の分野において Rosetta というソフトウェアスイートをを用いた蛋白質のデザインが成果をあげている。Rosetta には蛋白質の構造モデリングや構造解析の為に数多くのプログラム(人工蛋白質設計、

リガンド結合、構造予測等)が含まれている。このプログラムを用いて人工蛋白質を作製する場合、モンテカルロ法を用いて鋳型となる構造に、アミノ酸をランダムに配置することにより作製された構造をエネルギー関数により評価し、メトロポリス法によって構造の採択を判断する(43)。このように設計された蛋白質は、エネルギーが最小となる様に作製されており、全ての相互作用が正の相互作用となっていると考えられる。これらの蛋白質は理想的な相互作用によって、目的以外の構造に落ち込むことなく目的の構造を形成する(44)。そして、このようにデザインされた蛋白質は一概に安定性が高い。一方、自然界に存在する蛋白質は僅かな安定性しか持っていない場合が多い。この安定性の低さによって蛋白質が機能する為の構造変化を可能にしていると考えられる。僅かな安定性を持つ蛋白質をデザインするためには、目的構造の安定性を保ちつつ、目的以外の構造を不安定化させなければならない。しかし、目的構造以外の全ての構造を考慮すると膨大な数となるため、それらを全て不安定化させるデザインを行うことは至極困難であると考えられる。本研究ではサブユニット間の接触面に存在する負の相互作用が、蛋白質のミスフォールドまたはミスアセンブリを防いでいるという可能性を示した。このように蛋白質の構造から負の相互作用を導入すべき場所が判別できれば、構造の柔軟性を保ったまま目的の構造を形成させることが出来ると考えられる。そのようなことが可能であれば、機能を持つ蛋白質を自由にデザイン出来る未来はそう遠くないだろう。

## 5-2. 生体内における三量体オートトランスポーターの形成機構

外膜蛋白質の挿入には Bam 複合体が重要であるという事は以前より明らかであった。しかし、Bam 複合体の重要な構成要素である膜貫通領域の構造は、長い間不明のままであった。しかし、2013年に Noinaj らによって結晶構造が明らかにされた結果、BamA の $\beta$ バレルは開口状態と閉口状態が存在するという可能性が示された(9)。そして現在、1-3.で記述した様に Bam による外膜蛋白質の外膜挿入モデルは、現在 2 種類のモデルが有力とされている。しかし、実際どちらのモデルが正しいのかは現在も活発に議論されている。

本研究では、三量体オートトランスポーターの **mHiaT** は試験管内で三量体形成が可能であることが明らかとなり、そしてその三量体形成反応は三次反応である事が示唆された。もし、**mHiaT** が **BamA** 出芽モデルで外膜に挿入されるのであれば、多量体外膜蛋白質のポリペプチド鎖は 1 本ずつ外膜に挿入されると考えられる。そしてこの場合、多量体形成には **Bam** 複合体が必要となると考えられる。しかし本研究では、**mHiaT** は試験管内で三量体を形成した。よって **mHiaT** の三量体形成には **Bam** 複合体は必要ではないということが示唆された。一方、多量体外膜蛋白質が **BamA** 補助モデルで外膜に挿入されるのであれば、外膜へ 1 本ずつポリペプチド鎖が挿入されるという可能性も排除出来ないものの、ペリプラズムで多量体を形成して外膜に挿入されると考えられる。この場合、本研究で示された **mHiaT** の三量体形成に **Bam** 複合体は必要でないという結果と矛盾しない。さらに、近年 **Sikdar** らによって報告された大腸菌三量体オートトランスポーター **UpaG** がペリプラズムにて天然様  $\beta$  バレル中間体を形成するという報告とも一致する(45)。これらのことから、本研究で得られた知見は、三量体オートトランスポーターの外膜挿入は **BamA** 補助モデルによって行われていることを支持する。

また、他の三量体オートトランスポーターで観察された天然様  $\beta$  バレル中間体の形成は、試験管内実験と同様に 3 本のポリペプチドが同時に集まると考えられる。もしそうであれば、この過程において正電荷の反発が影響を与えると考えられる。よって、**R1077M** はペリプラズムでミスアセンブリを起こすと考えられる。そしてペリプラズムでミスアセンブリを起こした **R1077M** は、生体内ではペリプラズムに存在するプロテアーゼによって速やかに分解されると考えられる。しかし、本実験で大腸菌を用いて **R1077M** 変異体を発現させたところ、発現量と三量体形成に問題は見られなかった。しかし、膜から精製した変異体の尿素に対する安定性を調べた結果、僅かながら天然構造と異なる三量体の形成が観察された。よって、1077 番目のアルギニンの反発は生体内における構造形成に影響を及ぼしていると考えられるが、観察された影響は僅かであり、試験管内で観察されたほど著しい影響は観察されなかった。本実験では富栄養培地を用いて 37°C で大腸菌を培養しており、このような条件で蛋白質を発現すると短時間に大量の蛋白質が合成される。このような場合、**Sec** システムによる内膜透過や **Bam** 複合体による外膜挿入反応が飽和してしまうと考えら

れる。それが原因となり、R1077M のミスアセンブリによる影響が細胞内で観察されにくくなった可能性が考えられる。実際、三量体オートトランスポーターの UpaG に、Bam 複合体との相互作用に影響を及ぼす変異を導入し、BamA との相互作用を観察した結果、富栄養培地では変異の影響が見られなかった。しかし、最小培地で同様の実験を行った結果、変異を入れたことによる BamA との相互作用の影響を観察する事ができた(45)。また外膜は 600 Da 以下の分子を透過させるため、ペリプラズム空間は細胞外の環境に大きく依存している。よって pH 変化や塩濃度等の浸透圧変化にもさらされやすい。そして、それらの pH 変化は蛋白質の荷電状態や安定性に影響を及ぼす。実際、電荷を利用した外膜蛋白質 OmpA とペリプラズムシャペロン Skp の相互作用は、溶液の pH により結合のしやすさが変化する(46)。このようなペリプラズムの環境の厳しさから、ペリプラズムの蛋白質には様々な環境に対応できるように、様々な品質制御機構が存在する(47, 48)。よってバレル中心での電荷反発を無効化した R1077M 変異体を様々な条件下で発現し、その影響を観察することによって多量体外膜蛋白質の生合成機構の更なる知見が得られる可能性がある。



## 6. 参考文献

1. Wallin, E., and von Heijne, G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms, *Protein science : a publication of the Protein Society* 7, 1029-1038.
2. Koebnik, R., Locher, K. P., and Van Gelder, P. (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell, *Molecular microbiology* 37, 239-253.
3. Dong, C., Beis, K., Nesper, J., Brunkan-Lamontagne, A. L., Clarke, B. R., Whitfield, C., and Naismith, J. H. (2006) Wza the translocon for E. coli capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein, *Nature* 444, 226-229.
4. Noinaj, N., Gumbart, J. C., and Buchanan, S. K. (2017) The beta-barrel assembly machinery in motion, *Nature reviews. Microbiology* 15, 197-204.
5. Han, L., Zheng, J., Wang, Y., Yang, X., Liu, Y., Sun, C., Cao, B., Zhou, H., Ni, D., Lou, J., Zhao, Y., and Huang, Y. (2016) Structure of the BAM complex and its implications for biogenesis of outer-membrane proteins, *Nature structural & molecular biology* 23, 192-196.
6. Gu, Y., Li, H., Dong, H., Zeng, Y., Zhang, Z., Paterson, N. G., Stansfeld, P. J., Wang, Z., Zhang, Y., Wang, W., and Dong, C. (2016) Structural basis of outer membrane protein insertion by the BAM complex, *Nature* 531, 64-69.
7. Noinaj, N., Kuszak, A. J., Balusek, C., Gumbart, J. C., and Buchanan, S. K. (2014) Lateral opening and exit pore formation are required for BamA function, *Structure* 22, 1055-1062.
8. Mahoney, T. F., Ricci, D. P., and Silhavy, T. J. (2016) Classifying beta-Barrel Assembly Substrates by Manipulating Essential Bam Complex Members, *Journal of bacteriology* 198, 1984-1992.
9. Noinaj, N., Kuszak, A. J., Gumbart, J. C., Lukacik, P., Chang, H., Easley, N. C., Lithgow, T., and Buchanan, S. K. (2013) Structural insight into the biogenesis of beta-barrel membrane proteins, *Nature* 501, 385-390.
10. Leo, J. C., Grin, I., and Linke, D. (2012) Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 367, 1088-1101.
11. Selkrig, J., Leyton, D. L., Webb, C. T., and Lithgow, T. (2014) Assembly of beta-barrel proteins into bacterial outer membranes, *Biochimica et biophysica acta* 1843, 1542-1550.
12. Josts, I., Stubenrauch, C. J., Vadlamani, G., Mosbahi, K., Walker, D., Lithgow, T., and Grinter, R. (2017) The Structure of a Conserved Domain of TamB Reveals a Hydrophobic beta Taco Fold, *Structure* 25, 1898-1906 e1895.
13. Selkrig, J., Mosbahi, K., Webb, C. T., Belousoff, M. J., Perry, A. J., Wells, T. J., Morris, F., Leyton, D. L., Totsika, M., Phan, M. D., Celik, N., Kelly, M., Oates, C., Hartland, E. L., Robins-Browne, R. M., Ramarathinam, S. H., Purcell, A. W., Schembri, M. A., Strugnell, R. A., Henderson, I. R., Walker, D., and Lithgow, T. (2012) Discovery of an archetypal protein transport system in bacterial outer membranes, *Nature structural & molecular biology* 19, 506-510, S501.

14. Henderson, I. R., and Nataro, J. P. (2001) Virulence functions of autotransporter proteins, *Infection and immunity* 69, 1231-1243.
15. Weiss, A., and Brockmeyer, J. (2012) Prevalence, biogenesis, and functionality of the serine protease autotransporter EspP, *Toxins (Basel)* 5, 25-48.
16. Ieva, R., Skillman, K. M., and Bernstein, H. D. (2008) Incorporation of a polypeptide segment into the beta-domain pore during the assembly of a bacterial autotransporter, *Molecular microbiology* 67, 188-201.
17. Grijpstra, J., Arenas, J., Rutten, L., and Tommassen, J. (2013) Autotransporter secretion: varying on a theme, *Research in microbiology* 164, 562-582.
18. Kajava, A. V., Cheng, N., Cleaver, R., Kessel, M., Simon, M. N., Willery, E., Jacob-Dubuisson, F., Lochter, C., and Steven, A. C. (2001) Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins, *Molecular microbiology* 42, 279-292.
19. Jacob-Dubuisson, F., Lochter, C., and Antoine, R. (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins, *Molecular microbiology* 40, 306-313.
20. Mazar, J., and Cotter, P. A. (2006) Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion, *Molecular microbiology* 62, 641-654.
21. Fan, E., Chauhan, N., Udatha, D. B., Leo, J. C., and Linke, D. (2016) Type V Secretion Systems in Bacteria, *Microbiology spectrum* 4.
22. Mikula, K. M., Leo, J. C., Lyskowski, A., Kedracka-Krok, S., Pirog, A., and Goldman, A. (2012) The translocation domain in trimeric autotransporter adhesins is necessary and sufficient for trimerization and autotransportation, *Journal of bacteriology* 194, 827-838.
23. Lehr, U., Schutz, M., Oberhettinger, P., Ruiz-Perez, F., Donald, J. W., Palmer, T., Linke, D., Henderson, I. R., and Autenrieth, I. B. (2010) C-terminal amino acid residues of the trimeric autotransporter adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica* are decisive for its recognition and assembly by BamA, *Molecular microbiology* 78, 932-946.
24. Meng, G., St Geme, J. W., 3rd, and Waksman, G. (2008) Repetitive architecture of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter, *Journal of molecular biology* 384, 824-836.
25. Yeo, H. J., Cotter, S. E., Laarmann, S., Juehne, T., St Geme, J. W., 3rd, and Waksman, G. (2004) Structural basis for host recognition by the *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter, *The EMBO journal* 23, 1245-1256.
26. Meng, G., Surana, N. K., St Geme, J. W., 3rd, and Waksman, G. (2006) Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter, *The EMBO journal* 25, 2297-2304.
27. Bannwarth, M., and Schulz, G. E. (2003) The expression of outer membrane proteins for crystallization, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1610, 37-45.
28. 青木英莉子. (2008 年度) *H. influenzae* 由来 adhesin の translocator domain の発現系の構築、および変異体 ES1 の発現系の構築, 創価大学卒業論文.
29. Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image

- analysis, *Nature Methods* 9, 671-675.
30. Silva, F., Queiroz, J. A., and Domingues, F. C. (2012) Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*, *Biotechnol Adv* 30, 691-708.
  31. Collins, T., Azevedo-Silva, J., da Costa, A., Branca, F., Machado, R., and Casal, M. (2013) Batch production of a silk-elastin-like protein in *E. coli* BL21(DE3): key parameters for optimisation, *Microb Cell Fact* 12, 21.
  32. Conchillo-Solé, O., de Groot, N. S., Avilés, F. X., Vendrell, J., Daura, X., and Ventura, S. (2007) AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides, *BMC Bioinformatics* 8, 65-65.
  33. Jong, W. S. P., Vikström, D., Houben, D., van den Berg van Saparoea, H. B., de Gier, J.-W., and Luirink, J. (2017) Application of an *E. coli* signal sequence as a versatile inclusion body tag, *Microbial Cell Factories* 16, 50.
  34. Surana, N. K., Cutter, D., Barenkamp, S. J., and St Geme, J. W., 3rd. (2004) The Haemophilus influenzae Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain, *The Journal of biological chemistry* 279, 14679-14685.
  35. Sato, D., Takebe, S., Kurobe, A., Ohtomo, H., Fujiwara, K., and Ikeguchi, M. (2016) Electrostatic Repulsion during Ferritin Assembly and Its Screening by Ions, *Biochemistry* 55, 482-488.
  36. Cowgill, R. W. (1967) Fluorescence and protein structure. X. Reappraisal of solvent and structural effects, *Biochimica et biophysica acta* 133, 6-18.
  37. Duy, C., and Fitter, J. (2006) How aggregation and conformational scrambling of unfolded states govern fluorescence emission spectra, *Biophys J* 90, 3704-3711.
  38. Danoff, E. J., and Fleming, K. G. (2015) Aqueous, Unfolded OmpA Forms Amyloid-Like Fibrils upon Self-Association, *PLoS ONE* 10, e0132301.
  39. Neves, M. A., Yeager, M., and Abagyan, R. (2012) Unusual arginine formations in protein function and assembly: rings, strings, and stacks, *The journal of physical chemistry. B* 116, 7006-7013.
  40. Ganser-Pornillos, B. K., von Schwedler, U. K., Stray, K. M., Aiken, C., and Sundquist, W. I. (2004) Assembly Properties of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 CA Protein, *Journal of Virology* 78, 2545-2552.
  41. Chang, J. Y., Li, L., and Lai, P. H. (2001) A major kinetic trap for the oxidative folding of human epidermal growth factor, *The Journal of Biological Chemistry* 276, 4845-4852.
  42. Zlotnick, A. (2003) Are weak protein-protein interactions the general rule in capsid assembly?, *Virology* 315, 269-274.
  43. Kuhlman, B., Dantas, G., Ireton, G. C., Varani, G., Stoddard, B. L., and Baker, D. (2003) Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy, *Science* 302, 1364-1368.
  44. Koga, N., Tatsumi-Koga, R., Liu, G., Xiao, R., Acton, T. B., Montelione, G. T., and Baker, D. (2012) Principles for designing ideal protein structures, *Nature* 491, 222-227.
  45. Sikdar, R., Peterson, J. H., Anderson, D. E., and Bernstein, H. D. (2017) Folding of a bacterial integral outer membrane protein is initiated in the periplasm, *Nat Commun* 8, 1309.

46. Patel, G. J., Behrens-Kneip, S., Holst, O., and Kleinschmidt, J. H. (2009) The periplasmic chaperone Skp facilitates targeting, insertion, and folding of OmpA into lipid membranes with a negative membrane surface potential, *Biochemistry* 48, 10235-10245.
47. Hong, W., Wu, Y. E., Fu, X., and Chang, Z. (2012) Chaperone-dependent mechanisms for acid resistance in enteric bacteria, *Trends in microbiology* 20, 328-335.
48. Duguay, A. R., and Silhavy, T. J. (2004) Quality control in the bacterial periplasm, *Biochimica et biophysica acta* 1694, 121-134.

## 7. 謝辞

本研究を進めるにあたり、直接のご指導をいただいた池口雅道教授に心から感謝いたします。また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた藤原和夫准教授に心から感謝致します。ウェスタンブロットの実験においてご助言を頂いた青山由利教授、中嶋一行教授に深く感謝致します。フローサイトメーター実験に関してご助言を頂いた清水昭夫教授、高瀬明教授、斉藤広輝さん、加地伸一さん、ベックマン・コールター株式会社の長坂安彦さんに深く感謝いたします。SDS 電気泳動実験に関してご助言を頂いた、ディー・アール・シー株式会社の永野富朗博士に心より感謝致します。また、佐藤大輔助教、菊池宣明さんにはサンプル調製と測定にご協力いただきました。心より感謝いたします。

最後に、本研究を進めるにあたり多くの方々にお世話になりました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。