

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15083

研究課題名(和文)大腸菌タンパク質膜挿入因子の改良による機能的膜タンパク質大量生産システムの構築

研究課題名(英文)Overproduction of functional membrane proteins by improvement of integration factors of *E. coli*

研究代表者

西山 賢一 (NISHIYAMA, Ken-ichi)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：80291334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌におけるタンパク質膜挿入反応は、SRPやSecYEG等のタンパク質因子に加え、糖脂質MPlaseが必須であるCdsAは、大腸菌におけるリン脂質質生合成とMPlase生合成の2つの反応に関与していることを示した。CdsAを欠損するとMPlaseが激減しCdsAを過剰発現するとMPlaseが増加したため、CdsAはMPlase生合成の律速段階を触媒することが明らかとなった。CdsAによるMPlaseの過剰発現とSecYEGやSRP、YidCの過剰発現を同時に達成した。この株ではF0cをはじめいくつかの膜タンパク質の過剰生産が確認できた。

研究成果の概要(英文)：Protein integration into the cytoplasmic membranes of *E. coli* requires a glycolipid termed as MPlase in addition to a series of proteinaceous factors such as SRP and SecYEG. We found that CdsA that is known to be involved in phospholipid biosynthesis, is also involved in MPlase biosynthesis. CdsA is a rate-limiting enzyme for MPlase biosynthesis, since CdsA depletion causes MPlase depletion and CdsA overproduction causes MPlase overproduction. We constructed a strain, in which not only MPlase, but also SecYEG, SRP and YidC were overproduced. By means of this strain, we achieved overproduction of several membrane proteins including F0c. F0c.

研究分野：生化学

キーワード：膜タンパク質 タンパク質膜挿入 MPlase 糖脂質酵素

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質はすべての生物で発現し、物質輸送や情報伝達等、生命活動に必須の機能を果たしている。ヒト・ゲノムプロジェクトでも機能未知の膜タンパク質が数多く存在することが明らかになっており、新規薬剤開発のターゲットとしても注目されている。しかし、膜タンパク質はその強い疎水性により取扱いが容易ではない。遺伝子工学的に大腸菌等で大量発現させても、その膜タンパク質の毒性のため大腸菌が生育しなくなる、あるいは封入体となって不可逆的に凝集してしまうといったトラブルが頻発し、必ずしも機能的な形で大量生産が達成されるわけではない。そのため、機能的膜タンパク質を大量生産する汎用的なシステムの構築が切望されていた。膜タンパク質の大量生産が容易ではない大きな理由は、タンパク質膜挿入に関わる因子群の発現量が少ないため、外来膜タンパク質を大量生産するには十分ではないことである。申請者は大腸菌におけるタンパク質膜挿入機構を明らかにし、精製因子によるタンパク質膜挿入の再構成系を確立した。タンパク質膜挿入に関わる因子群を大量生産すれば、遺伝子工学的に大量発現させた膜タンパク質も機能を保持した形で膜挿入させることができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が発見した膜挿入に関わる糖脂質酵素 MPIase を含むタンパク質膜挿入因子を過剰生産させた大腸菌を構築し、機能的膜タンパク質大量生産システムの構築を目指す。この株を用いて膜タンパク質大量生産が可能であることを検証する。

3. 研究の方法

(1) MPIase 生合成遺伝子の探索

タンパク質膜挿入にかかわる糖脂質 MPIase (図1) の生合成経路はまったく不明であった。MPIase 過剰生産のため、まず、MPIase 生合成酵素の探索を行った。MPIase 生合成はフォスファチジン酸 (PA) に GlcNAc が付加して GlcNAc-PP-DAG (compound I) (図1) が生成する反応から開始されると考えた。compound I が生成する条件を試験管内の反応で検討し、compound I 生合成酵素の同定を試みた。

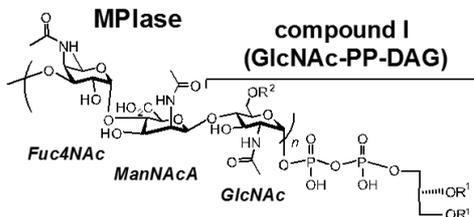


図1 MPIase と compound I の構造。R¹ は C₁₆-C₂₀ の脂肪酸、R² は H あるいは Ac、n は 9-11 の整数を示す。

(2) MPIase 過剰発現株の構築

compound I 生合成酵素を過剰発現させ、MPIase 過剰発現を試みた。

(3) タンパク質膜挿入因子過剰発現株の構築

MPIase 過剰発現株で SecYEG、YidC、SRP などを過剰発現させ、タンパク質膜挿入にかかわるすべての因子を過剰発現した株を構築した。

(4) タンパク質膜挿入因子過剰発現株の膜タンパク質生産能の検証

タンパク質膜挿入因子過剰発現株において実際に膜タンパク質が大量生産できるかどうか検証する。

4. 研究成果

(1) MPIase 生合成遺伝子の探索

compound I 生合成における基質を予想し、大腸菌細胞質画分や膜画分を添加して反応させ、compound I 生合成が進行するかどうか調べた。脂質供与体として DAG (ジアシルグリセロール)、PA、CDP-DAG を、糖供与体として UDP-GlcNAc、CDP-GlcNAc、GlcNAc-P を用いた。これらの組み合わせのうち、PA と GlcNAc に大腸菌内膜画分を混合し、さらに CTP を添加したときのみ compound I の生成が観察された。この反応系を用いて酵素の探索を行ったところ、CdsA を同定した。CdsA はリン脂質生合成中間体である CDP-DAG 生合成酵素として古くから知られている酵素である。compound I 生合成には PA、GlcNAc-P、CTP を同時に加える必要があること、CDP-DAG に GlcNAc-P を加えても compound I は生成しないことから、CdsA 上で PA と CTP から CDP-DAG がまず合成され、CdsA から解離する前に GlcNAc-P が取り込まれて compound I が生成することが強く示唆された (図2)。CdsA8 変異は高 pH でリン脂質生合成が強く阻害される変異である。この変異 CdsA では、compound I 生成量は上昇していた。CdsA8 の変異部位を調べたところ、Tyr 207 が His に置換していた。このことは、高 pH で脱プロトン化した His をもつ CdsA8 では、生成した CDP-DAG が解離しにくくなり、その結果 GlcNAc-P が取り込まれやすくなって compound I 生成量が増加したと考えられる。このことも図2のモデルを支持する結果である。以上のことから、CdsA はリン脂質生合成と MPIase 生合成の両方に関与することが明らかとなった。

cdsA 遺伝子をアラビノースプロモーター支配下にもつプラスミドの存在下で *cdsA* 遺伝子を破壊し、MPIase 発現量に及ぼす影響を調べた。アラビノースを含まない培地でしばらく培養し、CdsA を枯渇させると、MPIase の発現量は劇的に低下した。さらにこの条件ではタンパク質膜挿入反応が強く阻害されており、MPIase が *in vivo* でもタンパク質膜

挿入反応に関与することが示された。これらの結果については、論文改定中である。

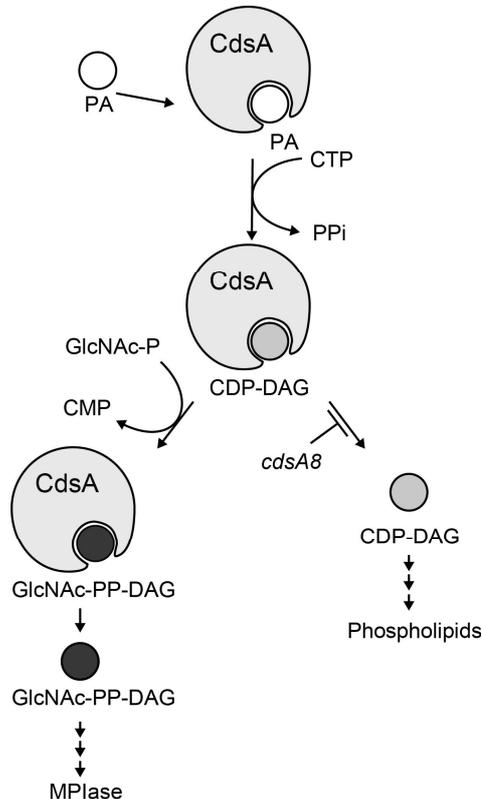


図2 CdsA による CDP-DAG と、MPIase 生合成中間体 GlcNAc-PP-DAG (compound I) の生合成のモデル。cdsA8 変異により CDP-DAG の解離が高 pH 依存的にブロックされる。

(2) MPIase 過剰発現株の構築

CdsA が MPIase 生合成に関与することが明らかになったため、CdsA を過剰発現する株を構築した。その結果、CdsA の過剰発現の程度に応じて MPIase の発現量増加が観察された (図3)。このことは、CdsA は MPIase 生合成の律速段階の反応を触媒していることを示している。

YnbB は、機能不明であるものの一部 CdsA と同様の因子である。YnbB を CdsA と同様に過剰発現させたところ、MPIase 発現量の上昇が観察された。YnbB にも CdsA と同様の機能があることがはじめて判明した。

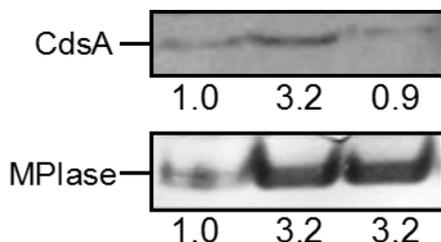


図3 CdsA、YnbB 過剰発現による MPIase 発現量の上昇。(左レーン)野生株、(中レーン) CdsA 過剰発現株、(右レーン) YnbB 過剰発現株を示す。上段は抗 CdsA 抗体を用いたイムノブロットティング、下段は抗 MPIase 抗体を用いたイムノブロットティングを示す。数字は野生株に対する相対値を示す。

野生株の大腸菌を 37 度で培養した後 20 度に移して数時間培養したところ、MPIase の発現量は 3 ~ 5 倍程度上昇していた。このこと

は、MPIase の発現は低温で上昇することを示している。このとき CdsA の発現量も増加していた。これらの結果は論文投稿中である。

(3) タンパク質膜挿入因子過剰発現株の構築

CdsA を過剰発現させて MPIase 発現量を上昇させた株で SecYEG、YidC、SRP を過剰発現させ、タンパク質膜挿入にかかわるすべての因子を過剰発現した株を構築した。抗体を保有している SecYEG、YidC、MPIase の過剰発現が観察された。

(4) タンパク質膜挿入因子過剰発現株の膜タンパク質生産能の検証

(3) で構築した、タンパク質膜挿入因子過剰発現株において実際に膜タンパク質が大量生産できるかどうか検証した。SecYEG や YidC も膜タンパク質である。これらの因子を単独で発現させるより MPIase 過剰発現下の方が発現量が増加していた。このことは、この株において膜タンパク質が大量生産できることを強く示唆している。F₀c は F₀F₁ ATPase の c サブユニットである。この株で F₀c を過剰発現させると F₀c の大量生産が観察された。今後は、他の膜タンパク質の大量生産能の検証や、膜タンパク質大量発現用のベクターの開発等を行い、機能的膜タンパク質を大量生産する汎用的なシステムの構築を続ける。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Saito, H., Morishita, T., Mizukami, T., Nishiyama, K., Kawaguchi, K., Nagao, H. Molecular dynamics study of binary POPC bilayers: molecular condensing effects on membrane structure and dynamics. *J. Physics* (査読有), in press. (2018)

Nakamura, S., Suzuki, S., Saito, H., Nishiyama, K. Cholesterol blocks spontaneous insertion of membrane proteins into liposomes of phosphatidylcholine. *J. Biochem.* (査読有), 163, 313-319 (2017) doi: 10.1093/jb/mvx083

Nishikawa, H., Sasaki, M., Nishiyama, K. Membrane insertion of F₀ c subunit of F₀F₁ ATPase depends on glycolipoyzyme MPIase and is stimulated by YidC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有), 487, 477-482 (2017) doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.095

Nishiyama, K., Tokuda, H. Novel translocation intermediate allows re-evaluation of roles of ATP, proton

motive force and SecE at the late stage of preprotein translocation
Genes Cells (査読有), 21, 1353-1364 (2016)
doi: 10.1111/gtc.12447

西山賢一

タンパク質膜挿入・膜透過に関与する多機能性糖脂質 MPLase
生化学 (査読有), 88, 744-747 (2016)
doi:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880744

[学会発表](計35件)

Nishikawa, H., Sasaki, M., Nishiyama, K.
Membrane insertion of F_0 c subunit of F_0F_1 ATPase depends on glycolipoyzyme MPLase and is stimulated by YidC.
Gordon Research Conference on Protein Transport Across Cell Membranes. (Hotel Galvez, Galveston, TX, USA) 11-16 Mar (2018)

Sawasato, K., Sato, R., Nishikawa, H., Iimura, N., Kamemoto, Y., Fujikawa, K., Yamaguchi, T., Kuruma, Y., Tamura, Y., Endo, T., Ueda, T., Shimamoto, K., Nishiyama, K.

2018. CdsA is involved in biosynthesis of MPLase essential for membrane protein integration in vivo. Gordon Research Conference on Protein Transport Across Cell Membranes. (Hotel Galvez, Galveston, TX, USA) 11 - 16 Mar

沢里克宏、佐藤諒、西川華子、飯村直樹、藤川紘樹、山口敏幸、車ゆうてつ、田村康、遠藤斗志也、上田 卓也、島本啓子、西山賢一
タンパク質膜挿入反応に関与する糖脂質酵素 MPLase は生育に必須である
2017 年度生命科学系学会合同年次大会(神戸国際展示場、神戸市) 2017 年 12 月 6 日~9 日

佐々木優、松林英明、車ゆうてつ、上田卓也、西山賢一
大腸菌におけるタンパク質膜挿入は糖脂質酵素 MPLase に依存し、YidC によって促進される
2017 年度生命科学系学会合同年次大会(神戸国際展示場、神戸市) 2017 年 12 月 6 日~9 日

鈴木苑実、藤川紘樹、島本啓子、西山賢一
タンパク質膜挿入反応に関与する糖脂質酵素 MPLase の部分化学合成標品を用いた構造と機能の解析
第 12 回 無細胞生命科学研究会(東京大学柏キャンパス図書館、千葉県・柏市) 2017 年

11 月 27 日~28 日

西川華子、佐々木優、西山賢一
 F_0F_1 -ATPase c サブユニット (F_0c) の膜挿入は糖脂質酵素 MPLase に依存し、YidC により促進される
第 14 回 21 世紀大腸菌研究会 (KKR ホテル熱海、静岡県・熱海市) 2017 年 6 月 8 日~9 日

沢里克宏、鈴木苑実、西山賢一
タンパク質膜挿入反応に必須の糖脂質酵素 MPLase の低温下における発現誘導機構の解析
第 14 回 21 世紀大腸菌研究会 (KKR ホテル熱海、静岡県・熱海市) 2017 年 6 月 8 日~9 日

西川華子、佐々木優、西山賢一
 F_0F_1 -ATPase c サブユニット (F_0-c) の膜挿入の再構成
デザイン生命工学研究会第 2 回大会 (神戸大学統合研究拠点、神戸市) 2017 年 3 月 21 日

池田汐里、藤川紘樹、島本啓子、西山賢一
化学合成標品を用いたタンパク質膜挿入に関与する糖脂質酵素 MPLase の構造と機能の解析
日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都女子大学、京都市) 2017 年 3 月 18 日~20 日

Sawasato, K., Sato, R., Moser, M., Tamura, Y., Endo, T., Nishiyama, K.
In vivo analysis of MPLase (Membrane Protein Integrase) involved in protein integration and translocation
Conference on Protein Secretion in Bacteria, Zing Conferences (Sirata Beach Resort, Tampa, FL, USA) 09-12 Nov, 2016

沢里克宏、佐藤諒、Michael Moser、田村康、遠藤斗志也、西山賢一
タンパク質膜挿入反応・膜透過反応に関与する糖脂質 MPLase (Membrane Protein Integrase) の *in vivo* における機能解析
第 11 回 無細胞生命科学研究会 (ゆこたんの森、岩手県・雫石町) 2016 年 10 月 6 日~7 日

佐藤諒、沢里克宏、藤川紘樹、山口敏幸、Moser Michael、島本啓子、西山賢一
タンパク質膜挿入に必須の糖脂質酵素 MPLase 生合成に関する研究
第 11 回 無細胞生命科学研究会 (ゆこたんの森、岩手県・雫石町) 2016 年 10 月 6 日~7 日

鈴木苑実、沢里克宏、西山賢一
タンパク質膜挿入阻害による糖脂質酵素 MPLase 発現誘導機構の解析
第 89 回 日本生化学会大会 (仙台国際センター、仙台市) 2016 年 9 月 25 日~27 日

沢里克宏、Michael Moser、佐藤諒、田村康、遠藤斗志也、西山賢一
タンパク質膜挿入反応に關与する糖脂質酵素 MPlase (Membrane Protein Integrase) の in vivo における機能解析
第 13 回 21 世紀大腸菌研究会 (グリーンピア南阿蘇、熊本県・南阿蘇村) 2016 年 6 月 2 日 ~ 3 日

西川華子、西山賢一
 F_0F_1 -ATPase c サブユニット (F_0 -c) の膜挿入機構の解明
第 13 回 21 世紀大腸菌研究会 (グリーンピア南阿蘇、熊本県・南阿蘇村) 2016 年 6 月 2 日 ~ 3 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
岩手大学農学部応用生物化学科分子生物学研究室
<http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~sec/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 賢一 (NISHIYAMA, Ken-ichi)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号： 8 0 2 9 1 3 3 4

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

島本 啓子 (SHIMAMOTO, Keiko)
公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・主幹研究員
研究者番号： 7 0 2 3 5 6 3 8

(4) 研究協力者