

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21570110

研究課題名（和文） 大腸菌におけるジアシルグリセロールの生理的意義の解明

研究課題名（英文） Clarification of the physiological role of diacylglycerol in *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

研究成果の概要（和文）：大腸菌におけるジアシルグリセロールの生理的意義を明らかにするため、その生合成に関与する可能性が考えられる遺伝子を10種類程度リストアップし、これらの多重変異株を構築した。その結果8重変異株が構築でき、生育が低温感受性となり、ジアシルグリセロールの生成量が大幅に低下していた。しかし、完全に枯渇していなかった。一方、タンパク質膜挿入に関与する糖脂質 MPIase については、その構造決定・機能解析を行い報告した。

研究成果の概要（英文）：To clarify the physiological role of diacylglycerol in *E. coli*, ~10 genes, which may be involved in diacylglycerol biosynthesis, were listed up, and then constructed multiply knock-out strains. Resultantly, an eightfold knock-out strain could be constructed, of which the growth was cold-sensitive and the diacylglycerol content was greatly reduced. However, the depletion was not complete. On the other hand, we determined the structure and analyzed the function of glycolipid MPIase involved in protein integration into membranes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：MPIase、SecG、ジアシルグリセロール、タンパク質膜挿入、再構成、大腸菌、機能的膜タンパク質合成、自発的膜挿入

1. 研究開始当初の背景

大腸菌において膜タンパク質はタンパク質合成に共役して膜挿入する。その際いくつかの異なる経路を経ることが知られており、その中の一つが SRP（シグナル認識粒子）や SecYEG（タンパク質膜透過チャンネル）を必要としない経路である。この経路に従う膜

タンパク質は、リン脂質からなるリポソームにも膜挿入することから、膜脂質と膜タンパク質の膜貫通領域との疎水的相互作用により自発的に膜挿入すると考えられてきた。しかし、SRP や SecYEG に依存して膜挿入するタンパク質でもリポソームに自発的膜挿入することが判明し、長いあいだ提唱されて

きた自発的膜挿入は細胞内の現象を反映していないことが明らかとなった。申請者らはリポソームに生理的濃度のジアシルグリセロールを加えることにより、自発的膜挿入を完全に抑制することができることを明らかにした。大腸菌では古くからジアシルグリセロールが発現していることが知られているが、その生理的機能は全く明らかになっていなかった。そのため、大腸菌におけるジアシルグリセロールの役割は無秩序な自発的膜挿入の抑制であると考えた。

一方、SRP や SecYEG に依存しない膜タンパク質が自発的に膜挿入しないということは、この膜挿入反応に必要な未知の因子が必要であることが考えられる。申請者らはこうした膜挿入因子を探索した結果、分子量約7kDaの糖脂質を精製することに成功した。

2. 研究の目的

大腸菌では古くからジアシルグリセロールが発現することが知られていたもののその生理的な役割は全く不明であった。申請者らの研究によりジアシルグリセロールは無秩序な自発的膜挿入を抑制することが判明したため、細胞内でも実際にジアシルグリセロールに同様の作用があることを検証し、その生理的意義を明らかにすることを目的とした。また、ジアシルグリセロール存在下で膜挿入反応を進行させる膜挿入因子 MPIase を同定したため、MPIase の構造・機能解析も行い、ジアシルグリセロールと MPIase の作用の相関関係も調べることを目的とした。

3. 研究の方法

ジアシルグリセロールの生合成経路は全く不明であったが、3種の遺伝子 *mdoB*、*eptB*、*pgpB* の遺伝子産物の作用によりジアシルグリセロールが生成することが知られていた。一方、*dgkA* 遺伝子産物により、ジアシルグリセロールが消費され、フォスファチジン酸が生成することも知られていた。データベースを検索すると、ジアシルグリセロール生成に関与する可能性がある遺伝子として、*phoA*、*aphA*、*gutQ*、*bacA*、*pgpA* が検索され、さらに機能未知の遺伝子として *ynbD*、*yeiU*、*yccX*、*yfcE*、*yaeA* がリストアップされた。大腸菌の網羅的遺伝子解析で構築された KO クローンでは、個々の遺伝子がカナマイシン耐性遺伝子により置換されており、その後プラスミド pCP20 によりカナマイシン耐性遺伝子を除去できる。この KO クローンを使って上記遺伝子の多重転移株を構築し、ジアシルグリセロールの枯渇株の構築を試みた。

MPIase は大腸菌を大量培養して内膜画分を調製し、尿素処理、コール酸ナトリウム抽出、トリクロロ酢酸抽出を経て、陰イオン交換カラム、分配カラムクロマトグラフィーに

より精製した。精製 MPIase を酵素消化、アルカリ・酸消化により MPIase 誘導体を調製し、タンパク質膜挿入活性を調べた。

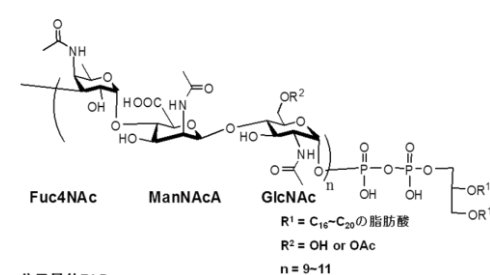
4. 研究成果

(1) ジアシルグリセロール生合成に関与する遺伝子の多重変異株の構築

まずはジアシルグリセロールを生成することが報告されている3遺伝子 (*mdoB*、*eptB*、*pgpB*) の3重変異株を構築したが、生育・ジアシルグリセロール生成量ともに全く影響を受けなかった。さらにこの3重変異株でジアシルグリセロールを消費する *dgkA* を過剰生産させても全く効果はなかった。この3重変異株の *phoA*、*aphA*、*gutQ*、*bacA*、*pgpA* 遺伝子を破壊し、8重変異株を構築したところ、生育が低温感受性を示し、ジアシルグリセロール生成量が大幅に減少していた。同様に *ynbD*、*yeiU*、*yccX*、*yfcE*、*yaeA* 遺伝子を破壊しても、生育が低温感受性を示し、ジアシルグリセロール生成量が大幅に減少していた。したがって、上記8重変異株からさらに数種の遺伝子を破壊すればジアシルグリセロールの完全枯渇株の構築が可能になると考えられ、現在も株の構築を進めている。一般にタンパク質膜挿入は低温で反応が進行しづらくなるため、ジアシルグリセロールの発現量が減少して低温感受性になるのは合理的な結果であるといえる。

(2) 糖脂質 MPIase の構造と機能

MPIase の構造を MS 分析、NMR 分析を組み合わせると図1のような構造を決定することができた。



- 分子量約7kDa
- R¹は大腸菌リン脂質に標準的な脂肪酸
- 3種のN-アセチル化アミノ糖を基本単位とした繰り返し糖鎖
- 脂質よりの約半数のR²がOAc
- 合計約35個のアセチル基

図1. MPIase の構造

続いて MPIase の構造・機能相関関係を調べた。MPIase をピロリン酸フォスファターゼ (PP) で処理すると、脂質部分を欠く水溶性の糖鎖が得られる。一方、MPIase を NaOH 処理すると、同様の糖鎖で GlcNAc のアセチル基を欠く糖鎖が得られる。PP-MPIase では未処理の MPIase よりも強い膜挿入活性が検出された。そのため、MPIase の脂質部分は活性には必要ないことが明らかとなった。一方、PP-MPIase からアセチル基を喪失した

NaOH-MPIase は全く活性が検出されなかった。このことは GlcNAc のアセチル基は活性に必須であることが判明した。PP-MPIase を用いて膜タンパク質との相互作用を解析したところ、PP-MPIase は膜タンパク質と可用性の複合体を形成することが明らかとなった。さらにこの複合体は膜挿入活性を保持していた。抗 MPIase 抗体を作成し、MPIase は確かに大腸菌内膜に局在していることが判明した。この抗 MPIase 抗体は膜挿入反応を阻害したため、細胞内でも実際に膜挿入反応に関与することが強く示唆された。以上のことから、MPIase は膜タンパク質に特化した分子シャペロン様の活性をもっていることを明らかにした。さらに MPIase は糖脂質でありながら酵素様の活性をもっていることから、MPIase は「糖脂質酵素 (Glycolipozyme)」であるという新しい概念を提唱した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Moser, M., Nagamori, S., Huber, M., Tokuda, H., Nishiyama, K., Glycolipozyme MPIase is essential for topology inversion of SecE during preprotein translocation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 2012, in press
doi: 10.1073/pnas.1303160110
- ② Nishiyama, K., Maeda, M., Yanagisawa, K., Nagase, R., Komura, H., Iwashita, T., Yamagaki, T., Kusumoto, S., Tokuda, H., Shimamoto, K., MPIase is a glycolipozyme essential for membrane protein integration, *Nat. Commun.*, 査読有, 3, Article number:1260, 2012, 1-10
doi: 10.1038/ncomms2267
- ③ Morita, K., Tokuda, H. and Nishiyama, K., Multiple SecE molecules drive protein translocation across a single translocon with SecE inversion, *J. Biol. Chem.*, 査読有, 287 巻, 2012, 455-464
doi: 10.1074/jbc.M111.301754
- ④ Nishiyama, K., Tokuda, H., Preparation of a highly translocation-competent proOmpA/SecB complex, *Protein Sci.*, 査読有, 19 巻, 2010, 2402-2408
doi: 10.1002/pro.520
- ⑤ Nishiyama, K., Maeda, M., Abe, M., Kanamori, T., Shimamoto, K., Kusumoto, S.,

Ueda, T., Tokuda, H., A novel complete reconstitution system for membrane integration of the simplest membrane protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 394 巻, 2010, 733-736
doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.061

⑥ Nishiyama, K., Tokuda, H., Development of a functional in vitro integration system for an integral membrane protein, SecE, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 390 巻, 2009, 920-924
doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.078

[学会発表] (計 20 件)

- ① 西山賢一、大腸菌のタンパク質膜挿入に必須の糖脂質酵素 (Glycolipozyme) MPIase の構造と機能、日本農芸化学会 2013 年度大会シンポジウム「グラム陰性細菌細胞表層構造の形成機構とバイオテクノロジー」、2013 年 03 月 27 日、東北大学川内北キャンパス (宮城県)
- ② 西山賢一、大腸菌のタンパク質膜挿入に必須の糖脂質酵素 (Glycolipozyme) MPIase の構造と機能、第 7 回無細胞生命科学研究会、2012 年 11 月 17 日、愛媛大学南加記念ホール (愛媛県)
- ③ Ken-ichi Nishiyama, MPIase as a glycolipozyme essential for membrane protein integration, Gordon Research Conference on Bacterial Cell Surface, 2012 年 06 月 27 日~2012 年 06 月 28 日, Mount Snow Resort, West Dover, VT, USA
- ④ 西山賢一、タンパク質膜挿入に必須の糖脂質酵素 MPIase の構造と機能、第 9 回 21 世紀大腸菌研究会、2012 年 06 月 22 日、長浜ロイヤルホテル (滋賀県)
- ⑤ 西山賢一、タンパク質膜挿入・膜透過に関与する糖脂質 MPIase の構造と機能、第 6 回無細胞生命科学研究会、2011 年 11 月 16 日、兵庫県立大学 (兵庫県)
- ⑥ 西山賢一、タンパク質膜挿入に関与する新規複合糖脂質 MPIase の構造と機能、第 84 回生化学会大会、2011 年 9 月 24 日、京都国際会館 (京都)
- ⑦ Ken-ichi Nishiyama, MPIase, a novel glycolipid involved in membrane protein integration and preprotein translocation, The 3rd International Symposium on Protein Community, 2010 年 9 月 14 日、ホテル日航奈良 (奈良)

⑧ Ken-ichi Nishiyama, A novel complete reconstitution system for membrane integration of the simplest membrane protein, Gordon Research Conference on Bacterial Cell Surfaces, 2010年6月30日, New London, NH, USA

⑨ 西山賢一、機能的膜タンパク質の in vitro 合成と膜挿入、第4回無細胞生命科学研究会、2009年11月16日、下呂市民会館(岐阜)

⑩ 西山賢一、大腸菌におけるタンパク質膜挿入機構、第6回21世紀大腸菌研究会、2009年6月12日、KKRホテル熱海(静岡)

[図書] (計1件)

① 西山賢一、島本啓子、化学同人、「膜タンパク質の鍵は糖脂質にあり—すべての生体膜挿入に必須な因子を求めて—」、月刊化学、68巻、2013、30-34

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：大腸菌膜タンパク質挿入因子

発明者：楠本正一、島本啓子、前田将秀、

西山賢一、徳田元、上田卓也、金森崇

権利者：サントリーホールディングス株式会社

種類：特許

番号：特願 2010-048520

出願年月日：H22年3月5日出願、

H23年3月1日修正

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://news7al.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：80291334