

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291009

研究課題名(和文) タンパク質膜透過・膜挿入に必須の糖脂質酵素MPlaseの構造と機能

研究課題名(英文) Structure and function of glycolipozyme MPlase, involved in protein translocation across and integration into membranes

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質膜挿入反応や膜透過反応にかかわる「糖脂質酵素」MPlaseの構造と機能に関して研究を進めた結果、MPlaseは細胞内でも膜挿入・膜透過に関与することが明らかとなり、大腸菌の生育にも必須であることが判明した。再構成系を用いた解析でも、調べたすべての膜タンパク質の膜挿入に必須であることを見出した。さらに、YidCとの機能的相互作用が明らかとなり、膜挿入初期過程にはMPlaseが、後期過程にはYidCが作用することが強く示唆された。また、MPlaseはSecYEGの構造を大きく変化させ、その結果SecG反転サイクルが作動し、タンパク質膜透過活性を著しく促進することを証明した。

研究成果の概要(英文)：Structure and function of MPlase were investigated. We found that MPlase is involved in protein integration and translocation in vivo as well as in vitro. We also found that MPlase is essential for cell growth. In the reconstitution system, we proved that MPlase is essential for integration of all the substrate membrane proteins tested. Moreover, the functional interaction between MPlase and YidC was unveiled, strongly suggesting that MPlase functions at an initial stage of integration, while YidC functions at a late stage. Furthermore, we demonstrated that MPlase transforms the dimer orientation of SecYEG into an activated structure in which the cycle of SecG inversion can occur, causing the significant stimulation of translocation.

研究分野：生化学

キーワード：タンパク質膜挿入 タンパク質膜透過 MPlase 糖脂質酵素 SecYEG YidC

### 1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質はすべての細胞で発現し、物質輸送、情報伝達など、生命現象に必須の役割を果たしている。タンパク質の分泌についても、細胞が外界に影響力を行行使するために欠かせない生命現象である。分泌タンパク質の膜透過や膜タンパク質の膜挿入を司る分子機構については、その根本的な部分では大腸菌から高等動物まですべての生物において保存されている。大腸菌ではタンパク質膜挿入機構として図1に示す2種の経路が知られている。上段のSec依存経路では、合成途中の膜タンパク質がシグナル認識粒子(SRP)により膜にターゲットされ、タンパク質膜透過チャンネルSecYEG(真核生物ではSec61複合体)において膜挿入が進行する。この経路はすべての生物で普遍的に観察される経路である。大腸菌では、中段のSec非依存経路も知られている。この経路に従う膜タンパク質は、膜貫通領域がSRPによる認識を受ける前にタンパク質合成が終了するため、SRP/Sec因子による作用を受けられない。申請者は、タンパク質膜挿入機構を明らかにするため、膜挿入反応の再構成系を確立した。

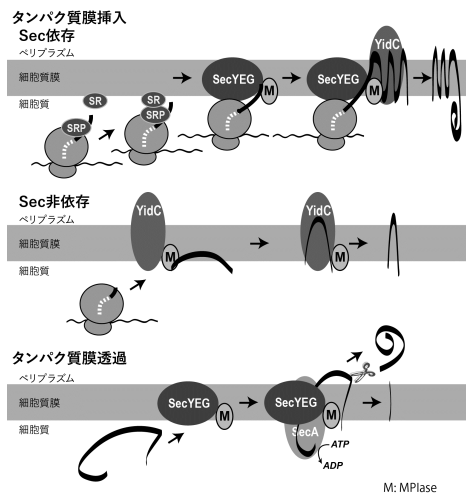


図1 大腸菌におけるタンパク質膜挿入・膜透過機構。上段はSec依存、中段はSec非依存のタンパク質膜挿入、下段はタンパク質膜透過機構を示す。SRP、シグナル認識粒子;SRP受容体;M、糖脂質酵素MPIase。タンパク質合成に共役してタンパク質膜挿入画進行する。タンパク質膜透過ではシグナルペプチドが切断される。

Sec非依存の経路には膜挿入因子が必要かどうか長い間不明であったが、申請者が開発した膜挿入反応の再構成系により、この経路にも膜挿入因子が必要であることが判明した。この因子はSec依存の経路にも必須であり、調べたすべての膜タンパク質の膜挿入に必須であった。さらに、タンパク質膜透過反応も著しく促進された。この因子は、当初の予想に反して糖脂質であったが、膜挿入反応に必須であることからMPIase (Membrane Protein Integrase)と命名し、続いてその構造を決定した(図2、Nishiyama et al. Nat.

Commun., 2012)。MPIaseの糖鎖は、N-アセチル化された3種のアミノ糖を単位とした繰り返し9~11回連続し、これがピロリン酸を介してジアシルグリセロール(DAG)に連結していた。MPIaseは、Sec依存、非依存の膜挿入反応だけでなく、分泌タンパク質の膜透過反応にも関与することが明らかとなっていた(図1、下段)。

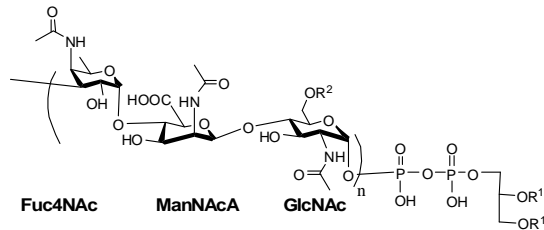


図2 MPIaseの構造。nは9~11の整数、R<sup>1</sup>は炭素鎖16~20の飽和/不飽和脂肪酸残基、R<sup>2</sup>は水素原子またはアセチル基である。また、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、ManNAcAはN-アセチルマンノサミンウロン酸、Fuc4NAcは4-N-アセトアミドフコースを示す。

### 2. 研究の目的

本研究では、タンパク質膜挿入・膜透過に関与する「糖脂質酵素」MPIaseの構造と機能の相関関係を明らかにすることを目的とし、以下の研究を実施した。

#### (1) MPIase 生合成に関与する遺伝子の同定とそれらの変異体解析

MPIaseは新規化合物であるため、その生合成経路は全く不明である。MPIaseの生合成基質と考えられる物質に大腸菌の膜画分や細胞質画分を混合し、反応を触媒する酵素を精製・同定する。得られた酵素をコードする遺伝子破壊株を構築し、MPIaseがin vivoでもタンパク質膜挿入反応に関与することを証明する。

#### (2) MPIaseの作用機構の解明

MPIaseの作用機構を明らかにするため、MPIaseの変異体・誘導体を調製する。また、基質膜タンパク質との相互作用変化を調べる。MPIaseはSec依存の膜挿入反応や膜透過反応においても重要な役割を果たす。MPIaseがタンパク質膜透過反応を促進する機構についてもMPIase変異体・誘導体を用いて調べる。

MPIaseは当初の予想に反して糖脂質であったが、膜挿入反応を触媒するという点では酵素様の働きをする。申請者はMPIaseが糖脂質酵素(Glycolipozyme)であるという、全く新しい概念を提唱している(Nishiyama et al. Nat. Commun., 2012)。本研究によりタンパク質膜透過・膜挿入機構の詳細がより明らかになるだけでなく、Glycolipozymeという概念は糖脂質生物学においても大きなインパクトをもたらすことが期待される。

### 3. 研究の方法

MPIase の構造と機能の相関関係を明らかにするため、以下の研究を実施する。

まず、「(1) MPIase 生合成に関与する遺伝子の同定とそれらの変異体解析」のため、MPIase 生合成遺伝子を同定する。MPIase 生合成の第一段階は、UDP-GlcNAc とフォスファチジン酸から GlcNAc-PP-DAG が生成する反応であると推定される。この反応に関与する酵素を同定する。反応にかかわる酵素を同定した後は、その酵素をコードする遺伝子の破壊株を構築し、菌の生育やタンパク質膜透過・膜挿入に及ぼす影響を調べ、MPIase が *in vivo* でもタンパク質膜透過・膜挿入に関与することを証明する。

「(2) MPIase の作用機構の解明」に関しては、MPIase 変異体を精製し、基質膜タンパク質との相互作用や膜挿入活性を詳細に調べる。脂質部分を欠く MPIase 誘導体 (PP-MPIase) は、Sec 非依存の基質膜タンパク質と膜挿入能を保持した水溶性の複合体を形成する。基質膜タンパク質は MPIase 非存在下で試験管内合成すると大部分が凝集体を形成し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにおいてポイド画分に溶出する。一方、PP-MPIase 存在下では、100 kDa 前後の画分に溶出する。この実験系を用いて、各 MPIase 変異体・誘導体と基質膜タンパク質の相互作用に変化があるかどうか調べる。膜挿入活性と水溶性複合体形成能を比較し、膜挿入中間体が得られるかどうか調べる。

MPIase は基質膜タンパク質だけでなく、SecYEG や YidC 等、膜挿入装置を構成する因子とも相互作用する可能性が高い。これらの因子との相互作用についても、共沈降実験や化学架橋実験により明らかにし、その相互作用が膜挿入・膜透過反応における意義について解析する。

### 4. 研究成果

(1) MPIase 生合成に関与する遺伝子の同定とそれらの変異体解析について

MPIase 生合成因子の探索を試みた。MPIase 生合成の最初の段階はフォスファチジン酸 (PA) に N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が結合する反応であると推定し、PA と UDP-GlcNAc に細胞質画分や内膜画分を加えたところ、膜画分に反応を触媒する活性が検出された。この活性を指標に種々のカラムクロマトグラフィーを行い、精製を進めたところ、YnbB が同定された。YnbB は、リン脂質生合成に係わる CDP-ジアシルグリセロールシンターゼ CdsA と高い相同性を示

すタンパク質である。そこで、YnbB と CdsA をクローン化し、それらの過剰生産を試みた。YnbB や CdsA を過剰生産させた膜小胞では、MPIase 生合成第一段階と考えられる反応が著しく促進されていた。さらには、YnbB や CdsA を過剰生産させたとき、MPIase の発現量が大幅に増加していた。cgsA 遺伝子 ynbB 遺伝子を欠失させると MPIase の発現量が激減し、さらに膜タンパク質や分泌タンパク質の前駆体が蓄積することを見出した。すなわち、*in vitro* 実験系で同定した MPIase は *in vivo* でも同様の機能をもつことを明らかにした。しかし、CdsA は全てのリン脂質生合成前駆体である CDP-DAG 生合成酵素として知られている因子である。cgsA 遺伝子は必須遺伝子であるが、リン脂質生合成は細胞にとって必須であるため、MPIase が菌の生育に必須かどうかは結論できなかった。Tam41 は酵母ミトコンドリアのタンパク質であり、CDP-DAG 生合成活性をもつことが知られている。Tam41 と CdsA には全く相同性がないため、Tam41 には MPIase 生合成活性はないと考えた。cgsA、ynbB 遺伝子破壊株に Tam41 を導入した株を構築し、その生育やタンパク質膜挿入反応、リン脂質生合成活性について調べた。その結果、Tam41 を発現させることによりリン脂質生合成は正常になったが、MPIase 生合成は阻害されたままであった。このとき、タンパク質膜挿入は阻害されたままであり、生育も回復しなかった。これらの結果から、MPIase は菌の生育に必須であることが明らかとなった。

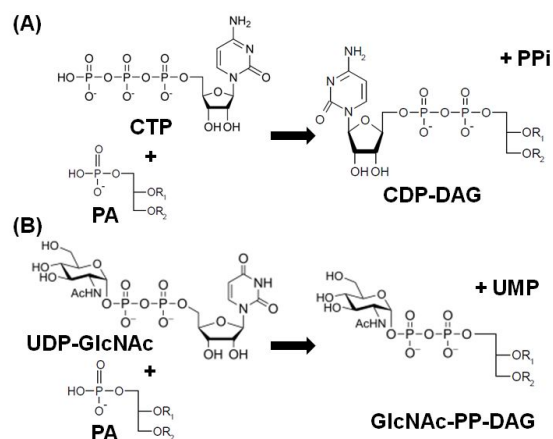


図3 CdsA により触媒される反応。(A) PA と CTP から CDP-DAG を生成する反応。(B) MPIase 生合成の第一段階の反応。PA と UDP-GlcNAc から GlcNAc-PP-DAG が生成する。

当初、MPIase 生合成は UDP-GlcNAc から GlcNAc リン酸部分がフォスファチジン酸に転移する反応であると予測したが、糖供与体として CDP-GlcNAc が利用されていることが判明した。CDP-GlcNAc を利用する反応は大腸菌ではこれまでに知られていなかったものであり、今後も研究を続ける。

(2) MPIase の作用機構の解明について

再構成系においては、MPlase が YidC と機能的相互作用するという結果が得られた。F0F1-ATPase の c サブユニット (F0-c) は、YidC に依存して膜挿入すると報告されている一方、自発的膜挿入が抑制されているリポソームにも膜挿入するという報告もある。F0-c は酸性リン脂質と相互作用するとプロテアーゼ耐性の構造を獲得し、この性質が膜挿入活性の評価を複雑で困難にしていることを明らかにした。この構造は界面活性剤存在下でも安定であることを突き止め、膜挿入活性と構造変化の区別を付けられるように工夫した。その結果、F0-c の膜挿入反応は MPlase に依存し、YidC により促進されることが明らかとなった。

MPlase 依存の膜挿入反応が YidC により促進されるという結果は、他の膜タンパク質を基質に用いたときにも観察された。3L-Pf3 coat は Pf3 ファージのコートタンパク質の変異体で、膜挿入には膜電位が必要なく、MPlase のみに依存して膜挿入する。膜挿入反応液における 3L-Pf3 coat の合成量が少ないとき、YidC の有無により MPlase 依存の膜挿入活性は変化しなかったが、メチオニン濃度を増やして 3L-Pf3 coat 合成量を MPlase や YidC 量より増加させたとき、YidC により活性が3倍程度上昇した。すなわち、膜挿入反応が複数回進行するとき YidC により反応が加速することが判明した。これらの結果は、MPlase と YidC は機能的に相互作用することを示すものであり、MPlase が膜挿入初期に機能し、その後基質膜タンパク質が YidC に受け渡されて膜挿入が完了する (図1中段、「Sec 非依存」) ことを強く示唆している。

MPlase は Sec 依存の膜挿入反応にも必須であることを再構成系で実証した。MtIA (マンニトール・パーミアーゼ) は SRP により膜にターゲットされ SecYEG や YidC の作用で膜挿入すると考えられてきた (図1上段、「Sec 依存」)。我々は、以前 MPlase が MtIA の膜挿入に必須であると報告した (Nishiyama et al, *J. Biol. Chem.*, 2006)。ところが、MtIA の膜挿入には SecYEG あるいは YidC のどちらかで十分であるという報告がなされている。SecYEG や YidC のプロテオリポソームへの再構成条件を詳細に見直したところ、SecYEG や YidC の可溶化に用いている界面活性剤ドデシルマルトシド (DDM) がリポソーム内にわずかでも残存していると、自発的膜挿入を抑制する DAG と不溶性の複合体を形成し、自発的膜挿入が誘発されることが判明した。すなわち、DDM が完全に除かれたプロテオリポソームでは、SecYEG のみ、あるいは YidC のみでは MtIA の膜挿入は全く進行しないことが判明した。DDM を完全に除去した系では、MtIA の膜挿入は SecYEG と MPlase の両方に依存することが判明した。さらに、MtIA の膜挿入は YidC により数倍促進されることが判明した。

以上の結果から、MPlase に関する研究結果と YidC に関する研究結果で相矛盾する点がすべて解決した。Sec 依存、非依存にかかわらず MPlase は膜挿入初期過程で機能し、基質タンパク質は YidC に受け渡され YidC の作用により膜挿入が完了すると考えられる (図1)。

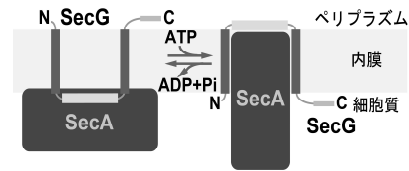


図4 膜透過反応に共役した SecA-SecE サイクル。ATP の結合、加水分解を伴い SecA が膜挿入-脱挿入サイクルを繰り返す。SecA サイクルに共役して SecE は配向性反転・回復サイクルを繰り返す。分泌タンパク質前駆体や SecYEG は省略している。

MPlase は分泌タンパク質の膜透過反応も著しく促進する。実際、MPlase と SecYEG を再構成したプロテオリポソームでは、SecYEG のみを再構成したプロテオリポソームの10倍の膜透過活性が観察された。SecYEG を構成する SecE は、その膜内配向性の反転サイクルを繰り返すことにより膜透過反応を促進する (図4)。SecYEG のみを再構成したプロテオリポソームでは、SecE の反転は観察されなかった。一方、MPlase と SecYEG の両方を再構成したプロテオリポソームでは、SecE の反転が観察された。すなわち、SecE の反転サイクルが作動するためには、SecYEG と MPlase が直接相互作用する必要があることが判明した。MPlase と SecYEG の相互作用で起きる変化について解析したところ、MPlase は SecYEG の2量体構造に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。SecYEG 単独のときは SecE を接触面とした二量体 (図5、「back-to-back 構造」) を形成することが知られている。SecYEG に MPlase を混合して再構成すると、SecE を接触面近傍に配置した二量体 (「side-by-side 構造」) に変化していくことが明らかになった。したがって、SecYEG は MPlase と相互作用することにより活性化型二量体 (side-by-side 構造) に変化し、この二量体では SecE の反転サイクルの作動が可能となり、その結果膜透過反応が著しく促進されることが判明した。

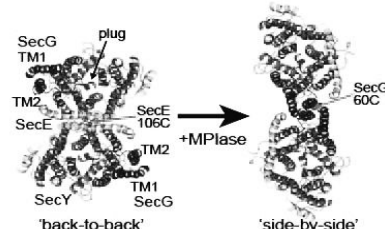


図5 MPlase による SecYEG 二量体構造の変化。細胞質側から見た SecYEG の二量体構造を示す。「back-to-back」構造 (左) の SecYEG に MPlase を混合すると「side-by-side」構造に変化する。SecE、SecG にシステインを導入した位置も示した。

## 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 11 件)

Nishikawa, H., Sasaki, M., Nishiyama, K., Membrane insertion of F0 c subunit of FOF1 ATPase depends on glycolipozyme MPLase 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. and Tokuda, H., Novel translocation intermediate allows re-evaluation of roles of ATP, proton motive force and SecE at the late stage of preprotein translocation, *Gene Cells*, 査読有, 21,1353-1364 (2016)

doi: 10.1111/gtc.12447

Endo, Y. and Nishiyama, K., Relationship between glycolipozyme MPLase and components comprising the protein transport machinery, *Med. Res. Arch.*, 査読有, 2, No 11, 1-24 (2015)  
<http://journals.ke-i.org/index.php/mra/article/view/403/260>

Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K., Sugano, Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y., Maturana, A.D., Tanaka, Y., Mori, H., Sugita, Y., Arisaka, F., Ito, K., Ishitani, R., Tsukazaki, T. and Nureki, O., Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC, *Nature*, 査読有, 509, 516-520 (2014)  
doi:10.1038/nature13167

Nishiyama, K. and Shimamoto, K., Glycolipozyme Membrane Protein Integrase (MPLase): Recent Data, *Biomol. Concepts*, 査読有, 5, 429-438 (2014)

doi: 10.1515/bmc-2014-0030

Moser, M., Nagamori, S., Huber, M., Tokuda, H. and Nishiyama, K., Glycolipozyme MPLase is essential for topology inversion of SecE during preprotein translocation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 110, 9734-9739 (2013)

doi: 10.1073/pnas.1303160110

西山賢一、島本啓子、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*、査読有、63, 30-34 (2013)

<https://www.kagakudojin.co.jp/book/b110756.html>

## 他 4 報

〔学会発表〕(計 61 件)

Katsuhiro Sawasato, Ryo Sato, Michael Moser, Yasushi Tamura, Toshiya Endo, and Ken-ichi Nishiyama, (2016) In vivo analysis of MPLase (Membrane Protein Integrase) involved in protein integration and translocation, Conference on Protein Secretion in Bacteria, Zing Conferences, 2016年11月9-12日, Florida (USA)

西山賢一、タンパク質膜透挿入・膜透過に関与する糖脂質酵素 MPLase の構造と機能、第一回デザイン生命工学研究会、招待講演、2016年3月9日、東京工業大学(神奈川県・横浜市)

西山賢一、タンパク質膜挿入に関わる糖脂質酵素 MPLase の作用原理の解明とその応用、第16回酵素応用シンポジウム研究奨励賞受賞講演(天野エンザイム)、招待講演、2015年6月12日、天野エンザイム 慈善堂ホール(愛知県・北名古屋市)

西山賢一、前田 将秀、Moser Michael、楠本 正一、徳田 元、島本啓子、タンパク質膜挿入・膜透過に関与する糖脂質酵素(Glycolipozyme)MPLase の構造と機能、日本農芸化学会大会 2015 大会、招待講演、2015年3月26日~29日、岡山大学(岡山県・岡山市)

Ken-ichi Nishiyama, Reconstitution of preprotein translocation across and membrane protein integration into the cytoplasmic membrane of E. coli, 「細胞を創る」研究会 7.0、招待講演、2014年11月13日~14日東京大学弥生講堂(東京都・文京区)

Nishiyama, K., Kusumoto, S., Tokuda, H. and Shimamoto, K., MPLase (Membrane Protein Integrase), a glycolipozyme involved in protein integration into and preprotein translocation across membranes, The 2nd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity, 招待講演、2013年10月28-29日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

## 他 55 件

〔その他〕

ホームページ等

<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：80291334

### (2) 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：70235638

徳田 元 (TOKUDA, Hajime)  
盛岡大学・栄養科学部・教授  
研究者番号：40125943

### (3) 研究協力者

Michael Moser (MOSEER, Michael)

Maria Huber (HUBER, Maria)

佐々木 優 (SASAKI, Masaru)

佐藤 諒 (SATO, Ryo)

遠藤 佑太 (ENDO, Yuta)

沢里 克宏 (SAWASATO, Katsuhiko)

西川 華子 (NISHIKAWA, Hanako)

志水 優子 (SHIMIZU, Yuko)

中村 匠汰 (NAKAMURA, Shota)

細工藤 真理 (SAIKUDO, Mari)