

氏名	サワト カツヒロ 沢里 克宏
本籍（国籍）	岩手県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 753 号
学位授与年月日	令和元年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 寒冷圏生命システム学
学位論文題目	タンパク質膜挿入・膜透過透過反応に関与する糖脂質酵素 MPIase (Membrane Protein Integrase) の <i>in vivo</i> における機能解析 (Functional analysis of glycolipozyme MPIase involved in membrane protein integration and protein translocation <i>in vivo</i>)
学位審査委員	主査 西山 賢一（岩手） 副査 宮崎 雅雄（岩手 准教授）, 豊増 知伸（山形 教授）, 姫野 倭太（弘前 教授）, 伊藤 菊一（岩手 教授）

論文の内容の要旨

タンパク質膜挿入反応・膜透過反応の分子機構は生物種間で広く保存されている。モデル生物大腸菌では、タンパク質膜挿入反応・膜透過反応は SecYEG トランスロコン上で進行する。MPIase (Membrane Protein Integrase) はタンパク質膜挿入反応の *in vitro* 再構成系を用いて、膜挿入反応に必須の因子として同定された糖脂質である。MPIase はタンパク質膜挿入反応に必須であるだけでなく、膜透過反応も著しく促進する。MPIase の構造は新規のものであったため、その生合成経路は未知であった。そのため、MPIase を枯渇した大腸菌変異株を構築することができず、MPIase が *in vivo* においても膜挿入反応・膜透過反応に関与しているかどうかは不明であった。本研究では糖脂質酵素 MPIase の生合成遺伝子を同定し、MPIase の *in vivo* における機能を解析することを目的とした。

第 1 章. 糖脂質 MPIase は *in vivo* においてもタンパク質膜挿入に必須であり、タンパク質膜透過反応を促進する

MPIase 生合成反応に関与する因子を探索した結果、CdsA を同定した。CdsA はリン脂質生合成中間体 CDP-ジアシルグリセロール (CDP-DAG) 生合成酵素として知られる因子である。CdsA は CDP-DAG の生合成反応に加えて、MPIase 生合成中間体 GlcNAc-PP-DAG も生合成することが判明した。CdsA を過剰発現すると、CdsA の増加量に応じた MPIase の増加が観察された。CdsA は菌の生育に必須であるため、*cdsA* 遺伝子破壊株ではプラスミドのアラビノース・プロモーターから CdsA を発現させた。この株をアラビノースを含まない培地で培養し、CdsA を枯渇した。CdsA の枯渇により MPIase 発現量は大幅に減少した。これらのことから、CdsA は MPIase 生合成反応における律速酵素であることが示された。YnbB は CdsA のパラログである。YnbB は菌の生育に必須ではない。YnbB 欠損株では MPIase 発現量に大幅な変化は認められなかったが、YnbB の過剰発現により MPIase が増加した。したがって、YnbB も MPIase 生合成に関与することが示された。CdsA 枯渇株では、MPIase 生合

成反応に加えて、リン脂質生合成反応も阻害される。Tam41p は真核生物のミトコンドリアに局在する CDP-DAG 生合成酵素である。Tam41p は CdsA とのアミノ酸配列の相同性をもたない。CdsA 枯渇株に Tam41p を発現させると、リン脂質生合成反応を回復したが、MPIase は枯渇したままだった。CdsA 枯渇株で Tam41p を発現させることにより、MPIase 単独の枯渇の影響を調べるのが可能となった。CdsA 枯渇株で Tam41p を発現させたところ、MPIase 枯渇条件下では、タンパク質膜挿入反応は完全に阻害され、膜透過反応の効率は野生株の 1/10 まで低下していた。これらの結果から、MPIase は *in vivo* においてもタンパク質膜挿入反応に必須であり、膜透過反応を著しく促進することが示された。さらに、CdsA 枯渇株で Tam41p を発現させても、菌の生育は回復しなかったため、MPIase は菌の生育に必須であることが示された。また、酵母やヒトの CdsA ホモログである Cds1p にも MPIase 生合成能が備わっていることを明らかにした。この結果から、MPIase 様物質が他の生物種にも保存されている可能性が示唆された。

第 2 章. 糖脂質 MPIase の発現量の上昇は、低温下での効率の良いタンパク質膜透過反応に必要なものである

タンパク質膜挿入反応・膜透過反応は低温感受性を示す反応であるが、詳細な分子機構は不明である。Sec 因子の発現量は低温下においても変化しないことが知られている。一方、糖脂質 MPIase の発現量は低温下において著しく増加することを見出した。*ynbB* 遺伝子欠損株や、プラスミド上のアラビノース・プロモーターから CdsA を発現させた *cdsA* 遺伝子欠損株では、低温下で MPIase 発現量は増加した。一方、*cdsA/ynbB* 遺伝子二重欠損株では、低温下における MPIase 量の増加は観察されなかった。したがって、低温下での MPIase の増加には *cdsA* 遺伝子、*ynbB* 遺伝子の両方が関与することが示された。MPIase が低温下で増加しないとき、タンパク質膜透過反応は低温感受性を示した。一方、タンパク質膜挿入反応は問題なく進行した。これらのことから、低温下ではタンパク質膜透過反応に必要な MPIase 量が著しく増加するのに対し、膜挿入反応に必要な MPIase 量は変わらないことが示された。これらの結果により、MPIase が膜挿入反応を触媒する分子機構と、膜透過反応を促進する分子機構は異なっており、両反応で低温感受性となるステップが異なることが示された。

第 3 章. *cdsA* 遺伝子の異なるプロモーターの 2 段階誘導により低温下での MPIase 発現量は増加する

低温下での MPIase の増加には CdsA が関与することが明らかとなった。しかしながら、CdsA の発現誘導機構は不明であった。低温下における *cdsA* mRNA 量の変化を調べたところ、菌が低温に曝露されてから 10 分以内に最大量に達し、その量は長時間維持されたままであった。*cdsA* 遺伝子は *ispU-cdsA-rseP-bamA* オペロンの 2 番目に位置するとされている。*cdsA* 遺伝子上流の mRNA の長さを調べたところ、低温下では、*ispU* 遺伝子よりさらに上流の *dxx* 遺伝子上流のプロモーターから転写が開始されていた。このプロモーターからの転写産物は、低温下で一過的な増加を示した。一方、*ispU* 遺伝子上流のプロモーターからの転写産物は低温下で長時間増加し続けた。*cdsA* 遺伝子上流までを含む DNA 領域をプラスミドに連結し、低温下での MPIase の増加に関与する領域を調べた。その結果、*dxx* 遺伝子上流のプロモーターまでを連結したプラスミドでは、低温シフト後、10 分で MPIase 量が最大量に達し、その後、増加した量が維持された。一方、*ispU* 遺伝子上流のプロモーターまでを連結したプラス

ミドでは、低温シフト後、30~60 分で MPIase が経時的に増加する様子が観察された。以上の結果から、低温下では、*cdsA* 上流の異なる二種のプロモーターが作動して、*cdsA* mRNA が増加することが明らかとなった。菌が低温を感知するとすぐさま、*dxr* 遺伝子上流のプロモーターからの転写物が一過的に増加する。続いて、*ispU* 遺伝子上流のプロモーターからの転写物が増加する。このような分子機構により、低温下において MPIase 発現量は迅速に増加し、その量が長時間維持されることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

タンパク質膜挿入反応・膜透過反応の分子機構は生物種間で広く保存されている。モデル生物大腸菌では、タンパク質膜挿入反応・膜透過反応は SecYEG トランスロコン上で進行する。MPIase (Membrane Protein Integrase) は *in vitro* 再構成系を用いて、タンパク質膜挿入反応に必須の因子として同定された糖脂質である。MPIase はタンパク質膜挿入反応に必須であるだけでなく、膜透過反応も著しく促進する。MPIase の構造は新規のものであり、その生合成経路は未知であった。そのため、MPIase を枯渇した大腸菌変異株を構築することができず、MPIase が *in vivo* においても膜挿入反応・膜透過反応に関与しているかどうかは不明であった。MPIase 生合成反応に関与する因子を探索した、CdsA を同定した。CdsA はリン脂質生合成中間体 CDP-ジアシルグリセロール (CDP-DAG) 生合成酵素として知られた因子である。CdsA は CDP-DAG の生合成反応に加えて、MPIase 生合成中間体も生合成することが判明した。CdsA のパラログである YnbB も MPIase 生合成に関与することが示された。*cdsA/ynbB* 遺伝子欠損株では MPIase が枯渇し、それに伴いタンパク質膜挿入は完全に阻害され、膜透過反応も著しく阻害された。この株に酵母ミトコンドリアの CDP-DAG 生合成酵素である Tam41p を発現させたところ、リン脂質生合成反応は回復したが、菌の生育や膜挿入反応・膜透過反応は回復しなかった。以上のことから、MPIase は *in vivo* において菌の生育やタンパク質膜挿入反応に必須であり、膜透過反応を著しく促進することが示された。

タンパク質膜挿入反応・膜透過反応は低温感受性であることが知られているが、詳細な分子機構は不明である。低温下において SecYEG の発現量は変化しないが、糖脂質 MPIase の発現量は著しく増加した。低温下での MPIase の増加には *cdsA* 遺伝子、*ynbB* 遺伝子の両方が関与していた。MPIase が低温下で増加しないとき、タンパク質膜透過反応は低温感受性を示した。一方、タンパク質膜挿入反応は問題なく進行した。これらのことから、低温下ではタンパク質膜透過反応に必要な MPIase 量が著しく増加するのに対し、膜挿入反応に必要な MPIase 量は変わらないことが示された。

低温下での MPIase の増加には CdsA が関与することが明らかとなった。しかしながら、CdsA の低温下での発現誘導機構は不明であった。低温下では *cdsA* 遺伝子の mRNA 量や MPIase 発現量は菌が低温に曝露された直後に最大量に達し、その量は長時間維持された。*cdsA* 遺伝子の mRNA の増加は *cdsA* 遺伝子上流の 2 つの異なるプロモーターによって 2 段階で誘導されることが判明した。菌が低温を感知すると、低温で一過的に誘導されるプロモーターからの転写物が増加する。このプロモーターの減衰にともなって 2 つ目のプロモーターからの転写物が増加し、このプロモーターは長時間誘導され続ける。その結果、低温下において MPIase 発現量は迅速に増加し、その量が長時間維持されることを明らかにした。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. **Sawasato, K.**, Sato, R., Nishikawa, H., Iimura, N., Kamemoto, Y., Fujikawa, K., Yamaguchi, T., Kuruma, Y., Tamura, Y., Endo, T., Ueda, T., Shimamoto, K. and Nishiyama, K. (2019)
CdsA is involved in biosynthesis of glycolipid MPIase essential for membrane protein integration *in vivo*.
Scientific Reports, **9**, No.1372.
2. **Sawasato, K.**, Suzuki, S. and Nishiyama, K. (2019)
Increased expression of the bacterial glycolipid MPIase is required for efficient protein translocation across membranes in cold conditions.
Journal of Biological Chemistry, **294**, 8403–8411.
3. **Sawasato, K.**, Sekiya, Y. and Nishiyama, K. (2019)
Two-step induction of *cdsA* promoters leads to upregulation of the glycolipid MPIase at cold temperature.
FEBS Letters, 593, 1711–1723

参考論文

1. Sato, R., **Sawasato, K.** and Nishiyama, K. (2019)
YnbB is a CdsA paralogue dedicated to biosynthesis of glycolipid MPIase involved in membrane protein integration.
Biochemical and Biophysical Research Communications, **510**, 636–642.
2. Kamemoto, Y., Funaba, N., Kawakami, M., **Sawasato, K.**, Kanno, K., Suzuki, S., Nishikawa, H., Sato, R. and Nishiyama, K. (2019)
Biosynthesis of glycolipid MPIase (membrane protein integrase) is independent of the genes for ECA (enterobacterial common antigen).
The Journal of General and Applied Microbiology, in press.