

博 士 論 文

タンパク質膜挿入・膜透過反応に関与する
糖脂質酵素 MPIase (Membrane Protein
Integrase) の *in vivo* における機能解析

岩手大学大学院連合農学研究科

寒冷圏生命システム学専攻 熱・生命システム学連合講座

沢里克宏

目次

序論

(1) タンパク質の局在化とシグナル仮説	p.3
(2) タンパク質の膜挿入反応	p.4
(3) Sec 非依存の膜挿入反応に関与する因子 YidC の発見	p.6
(4) 自発的膜挿入反応とジアシルグリセロール	p.6
(5) MPIase の発見とその機能解析	p.7
(6) MPIase と YidC との関係	p.9
(7) MPIase のタンパク質膜透過反応における役割	p.12

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

1-1. 導入	p.16
1-2. 結果	
(1) MPIase 生合成遺伝子の同定	p.16
(2) MPIase 生合成遺伝子欠損株の構築	p.24
(3) MPIase の欠損が大腸菌の生育および膜挿入反応に及ぼす影響	p.30
(4) MPIase の欠損がタンパク質膜透過反応に及ぼす影響	p.37
(5) MPIase 様物質が生物種間に保存されている可能性の検証	p.41
1-3. 考察	p.46
1-4. 材料と方法	p.48

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 膜透過反応に必要である

2-1. 導入	p.61
2-2. 結果	
(1) 培養温度による MPIase 発現量の変化	p.62
(2) 低温下における MPIase 発現量の増加と CdsA、YnbB 発現量との関係	p.66
(3) 低温下での MPIase の増加がタンパク質膜透過反応に及ぼす影響	p.69
(4) MPIase 発現量の低下が低温下でのタンパク質膜透過反応に及ぼす影響	p.72
(5) MPIase 発現量の低下が低温下でのタンパク質膜挿入反応に及ぼす影響	p.80
(6) 低温下における MPIase の増加の生育における役割	p.82
2-3. 考察	p.83
2-4. 材料と方法	p.85

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

3-1. 導入	p.88
3-2. 結果	
(1) 低温下における <i>cdsA</i> mRNA 量の変化	p.88
(2) 低温下の <i>cdsA</i> mRNA の増加に関与するプロモーター領域の検索	p.93
(3) プロモーターP3 が低温下における <i>cdsA</i> mRNA、および MPIase の 増加に及ぼす影響	p.96
(4) 低温下での <i>cdsA</i> mRNA の増加と mRNA の安定性との関連	p.105
3-3. 考察	p.110
3-4. 材料と方法	p.111
総合討論	p.116
参考文献	p.120
謝辞	p.133.

序論

(1) タンパク質の局在化とシグナル仮説

細胞内で合成されたタンパク質は、自身の機能する場に局在し、三次元構造を形成して初めてその機能を正しく発揮することができる。タンパク質が機能する場は、その生合成の場である細胞質だけではなく、生体膜表面や内部、真核細胞の細胞小器官、細胞外など様々である。すべての細胞は細胞の内外を生体膜により区画されている。また、真核細胞では細胞小器官が発達しており、各細胞小器官は生体膜により区画されている。そのため、生体膜内部や細胞小器官内腔、あるいは細胞外で働くタンパク質は、生体膜に挿入、あるいは、生体膜を越えて膜透過しなければならない。生体膜を介した物質の出入りは、イオンや糖質といった低分子であっても厳密に制御されている。そのため、細胞はタンパク質を生体膜に挿入する、あるいは、生体膜を越えて膜透過するための専用の装置を備えている。

初期の研究では、分泌タンパク質がどのようにして生体膜を透過するのかについて分子機構が精力的に解析された。これらに研究に革新的な進展をもたらしたのは、Blobel らによって提唱された「シグナル仮説」である (1)。シグナル仮説とは、分泌タンパク質の N 末端にはシグナル配列と呼ばれる 20~40 アミノ酸からなる延長配列が付加されており、これが、その行き先を示すシグナルとして機能するというものである。分泌タンパク質が合成され始めると、リボソームから露出したシグナル配列をシグナル認識粒子 (SRP) が認識、結合する。SRP は合成途中のポリペプチドを、小胞体膜上に存在する SRP 受容体 (SR) を介して膜上へと導く (2-4)。膜上へ導かれた分泌タンパク質は Sec トランスロコンと呼ばれる膜透過チャネルを通して膜透過する (5)。膜透過反応の過程でシグナル配列は切断される。その後の研究により、膜タンパク質の膜挿入反応もシグナル仮説により説明されることが示された (5, 6)。SRP/SR や、Sec トランスロコン (原核細胞では SecYEG、真核細胞では Sec61 複合体) はすべての細胞に発現していることから、タンパク質膜挿入反応・膜透過反応の分子機構は、基本的なレベルではすべての生物種に保存されていると考えられている

(7, 8)。

(2) タンパク質の膜挿入反応

生体膜内部に挿入され、その機能を発揮する膜タンパク質は、疎水性のアミノ酸が連続した膜貫通部位をもつ。そのため、細胞質のような親水的な環境では凝集体が生じてしまう。このような凝集を防ぐために、膜タンパク質の膜挿入反応は翻訳に共役して進行する。タンパク質膜挿入反応の分子機構は、モデル生物大腸菌を用いて盛んに研究され、多くの遺伝学的、生化学的知見が蓄積されてきた。大腸菌におけるタンパク質膜挿入反応の分子機構はシグナル仮説の延長として説明されている。このとき、SRP は膜タンパク質の疎水的な膜貫通部位を膜への輸送シグナルとして認識する。膜タンパク質の疎水的な膜貫通部位がリボソームから露出すると、SRP はこれに結合し、SR を介して内膜上へと輸送する。その後、SecYEG 上で翻訳に共役して膜挿入反応が進行する (Sec 依存の膜挿入反応) (図 1A) (9-13)。分子量の小さい膜タンパク質や、C 末端側にのみ膜貫通部位をもつ膜タンパク質は SecYEG や SRP/SR に依存せずに膜挿入することが知られている (Sec 非依存の膜挿入反応) (図 1B) (14)。これらの膜タンパク質は、翻訳が終了するまで膜貫通部位が細胞質に露出しないため、SRP はこれらを認識することができない。Sec 非依存の膜挿入反応は、温度感受性の Sec 変異株や Sec 因子の欠損変異株においても膜挿入反応が進行すること、リン脂質のみから形成されたリボソームに自発的に膜挿入することから、長年、膜貫通部位と膜脂質の疎水的相互作用により自発的に進行すると考えられてきた (15)。

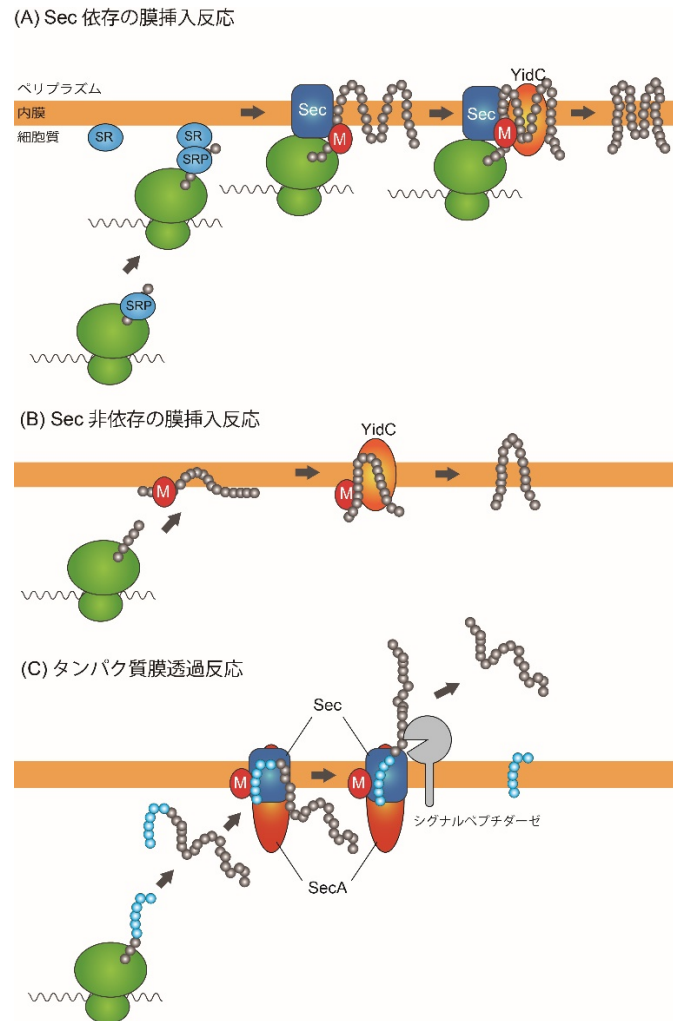


図 1. 大腸菌におけるタンパク質膜挿入・膜透過反応のモデル図。

(A) Sec 依存の膜挿入反応。新生鎖膜タンパク質/リボソーム複合体は SRP/SR により膜上に輸送される。その後、SecYEG (Sec) 上で翻訳と共役して膜挿入反応が進行する。YidC は膜挿入された膜タンパク質の折り畳みを補助する。“M” は Mplase を示す。Mplase は Sec 依存の膜挿入反応に必須である。

(B) Sec 非依存の膜挿入反応。図の“M”は Mplase を示す。細胞質で合成された膜タンパク質は Mplase により膜挿入される。Mplase による膜挿入反応は YidC により促進される。

(C) タンパク質膜透過反応。内膜を透過するタンパク質は N 末端にシグナル配列をもった前駆体として合成される。膜透過反応は SecYEG 上で進行する。タンパク質膜透過反応は ATPase 活性をもつ SecA の加水分解エネルギーにより駆動される。Mplase は SecYEG と相互作用し、膜透過反応を約 10 倍促進する。膜透過反応中にシグナル配列はシグナルペプチダーゼにより切断され、成熟体となる。

(3) Sec 非依存の膜挿入反応に関与する因子 YidC の発見

Sec 非依存の膜挿入反応の分子機構は、モデル膜タンパク質である M13 ファージのコートタンパク質である M13 プロコートや Pf3 ファージのコートタンパク質である Pf3 コートを用いて精力的に研究された。Dalbey らのグループは、これまで自発的に膜挿入すると考えられていた M13 プロコートや Pf3 コートなどの膜挿入反応が、YidC を欠損した大腸菌変異株において著しく阻害されることを報告した (16)。このことから、YidC は Sec 非依存の膜挿入反応に関与する因子であることが示された。その後、ファージ由来の膜タンパク質だけでなく、F₀F₁ ATPase の c サブユニットである F₀c や、シトクローム酸化酵素のサブユニットである CytoA などの大腸菌の染色体にコードされる膜タンパク質も YidC により膜挿入することが明らかとなった (17-19)。YidC は Sec 依存の膜挿入反応には必須ではないが、YidC 欠損株において SecYEG により膜挿入されるラクトースパーミターゼの折り畳みが阻害されることから、YidC は Sec 依存の膜挿入反応においては膜タンパク質の 3 次元構造を整えるシャペロンの役割を果たすと考えられている (図 1A) (20)。Kuhn、Dalbey らのグループにより、Sec 非依存の膜挿入反応の *in vitro* 再構成が試みられた。その結果、大腸菌リン脂質に YidC を組込んだプロテオリポソームにおいて、M13 プロコートや Pf3 コートなどの膜挿入反応が進行することが報告された (21, 22)。YidC は複数回の膜挿入サイクルを繰り返し、膜挿入反応を触媒することから、YidC は膜組込み酵素を意味する "insertase" であると提唱された (21)。しかしながら、Pf3 コートの膜貫通部位に 3 つのロイシン残基を加えた変異体である 3L-Pf3 コートタンパク質は、YidC を欠損した大腸菌変異株においても、膜挿入が進行すること、大腸菌リン脂質からなるリポソームに自発的に膜挿入することから、一部の膜タンパク質は自発的に膜挿入されることが考えられてきた (21)。

(4) 自発的膜挿入反応とジアシルグリセロール

西山らは、大腸菌のタンパク質膜挿入反応を試験管内で再構成する試みの過程において、

SecYEG に依存して膜挿入するとされてきたマンニトールパーミアーゼ (MtlA) が、リン脂質のみから形成されたリボソームにも自発的に膜挿入することを見出した (23)。生体内では、無秩序な自発的膜挿入反応は起こらないと考えられたため、MtlA の自発的膜挿入反応を抑制する因子が検索された。その結果、ジアシルグリセロール (DAG) を生理的濃度 (2~3%) でリボソームに加えることにより、自発的膜挿入反応は完全に抑制されることが見出された (23, 24)。DAG はリン脂質間の隙間に入り込み、その隙間を埋めることで、膜タンパク質の無秩序な自発的膜挿入反応を防いでいると考えられている (25)。DAG を生理的濃度で加えたリボソームでは、MtlA の自発的膜挿入が抑制されるだけでなく、これまで自発的に膜挿入されると考えられてきた 3L-Pf3 コートの膜挿入反応も進行しなかった (24)。さらには、DAG 存在下では SecYEG や YidC を再構成したリボソームにおいても MtlA や M13 プロコートは膜挿入しなかった (23)。これらのことから、タンパク質膜挿入反応に必須な未知の因子が存在する可能性が示唆された。

(5) MPIase の発見とその機能解析

タンパク質膜挿入反応に必須の因子の探索が行われた結果、SDS-PAGE 上で分子量 7 kDa の因子が同定された。この因子はタンパク質膜挿入反応に必須であり、膜挿入反応を複数回繰り返すことから、膜挿入酵素を意味する MPIase (Membrane Protein Integrase) と名付けられた (26)。構造解析の結果、MPIase はタンパク質性の因子ではなく、糖脂質であることが明らかになった。その構造は、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、2-アセトアミド-2-デオキシマンヌロン酸 (ManNAcA)、4-アセトアミド-4-デオキシフコース (Fuc4NAc) の 3 種類のアミノ糖が 9~11 回繰返した糖鎖とジアシルグリセロールがピロリン酸を介して結合した新規のものであった (図 2) (27)。MPIase の糖鎖を構成する GlcNAc の約 30% の 6-OH はアセチル化されており、MPIase の機能に必須であった (27, 28)。MPIase は図 3 に示すような分子機構により膜挿入反応を触媒することが明らかとなっている (27)。MPIase

の糖鎖部分は膜タンパク質の膜貫通部位と相互作用し、凝集を防ぐシャペロン様の機能を果たす (27)。合成された基質膜タンパク質は膜上で MPIase の糖鎖部分と相互作用し、膜挿入可能な状態となる (図 3 Step1)。MPIase はリン脂質二重層の膜表面の流動性を上昇させ、膜挿入するために隙間を開けると考えられている (図 3 Step2) (29)。MPIase と相互作用した基質膜タンパク質は、この隙間に膜挿入する (図 3 Step3)。膜挿入反応を終了した MPIase は基質膜タンパク質解離し (図 3 Step4)、次の膜挿入サイクルへと移る (図 3 Step5)、このサイクルを繰り返すことにより、MPIase は膜挿入反応を触媒する。このように MPIase は糖脂質でありながら、酵素様の機能を果たすことから、「糖脂質酵素 (Glycolipozyme)」という概念が提唱されている (27)。

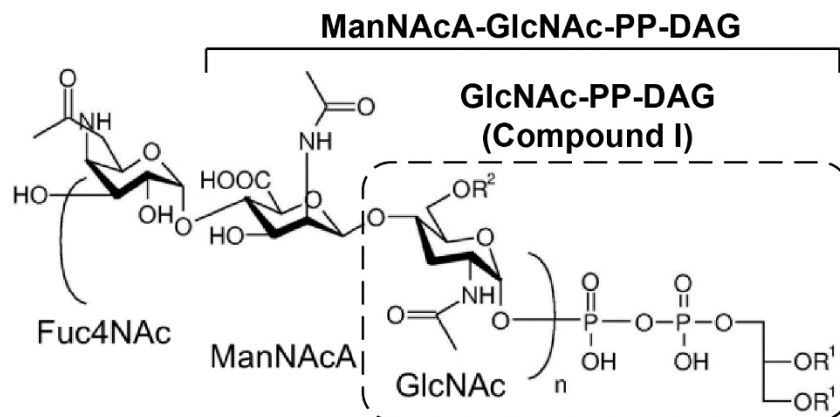


図 2. MPIase の構造。

MPIase は *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、2-アセトアミド-2-デオキシマンヌロン酸 (ManNAcA)、4-アセトアミド-4-デオキシフコース (Fuc4NAc) の 3 糖の繰返し ($n=9\sim 11$) とジアシルグリセロールがピロリン酸を介して結合した糖脂質である。R¹ は炭素鎖 16~20 の飽和/不飽和脂肪酸を示す。R² は水素原子あるいはアセチル基を示す。CdsA は Compound I (点線) の生合成反応を触媒する。

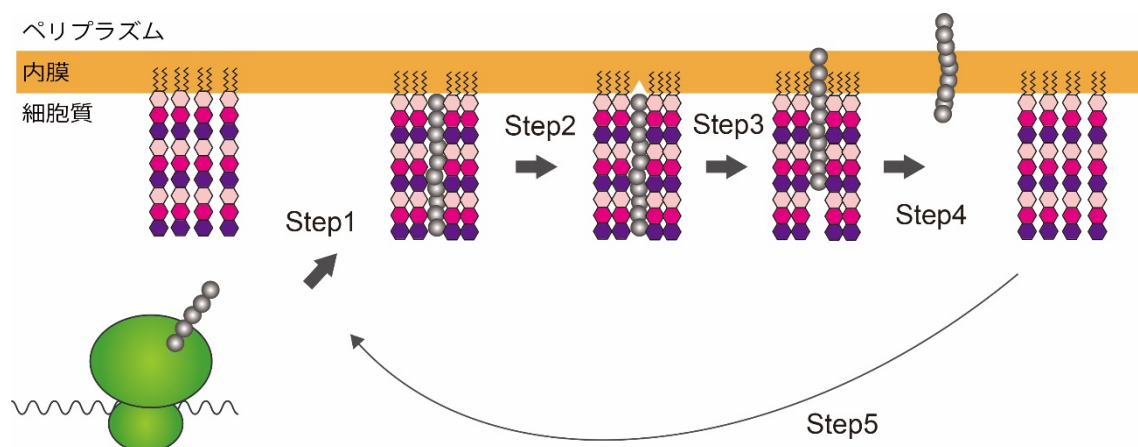


図3. Sec 非依存の膜挿入反応における MPIase の作用機構。

MPIase は膜上で基質膜タンパク質と直接相互作用する (Step1)。MPIase は膜表面の流動性を上げ、膜挿入のための間隙を作る (Step2)。MPIase の膜表面の間隙に基質膜タンパク質が挿入される (Step3)。膜挿入終了後、MPIase は基質膜タンパク質と解離し (Step4)、次の膜挿入サイクルに移る (Step5)。

(6) MPIase と YidC との関係

YidC は Sec 非依存の膜挿入反応を触媒する "insertase" であると提唱されていた (21)。しかしながら、西山らの *in vitro* 再構成系を用いた解析によると、自発的膜挿入反応を抑制した条件下においては、YidC 単独では膜挿入反応は進行せず、膜挿入反応には MPIase が必須であった (23, 26, 27)。Dalbey らの解析によると、YidC を欠損した条件下であっても、内膜に局在する M13 プロコートはアルカリ抽出に対して耐性であることが示された (30)。この結果は、YidC を欠損した場合でも、膜挿入反応の初期段階は進行していることを示しており、YidC は膜挿入反応の後期段階に関与することが強く示唆された。当研究室、西川・佐々木らによって、一部の膜タンパク質の膜挿入反応における YidC の機能が明らかにされている。F₀F₁ ATPase の c サブユニットである F₀c は SecYEG に依存せずに膜挿入反応する (17)。YidC 欠損株では F₀c の膜挿入反応が阻害されることから、F₀c の膜挿入反応には YidC が関与することが示されている (31)。しかしながら、*in vitro* 再構成系における解析では

様々な結果が報告されている。F₀c の膜挿入は YidC により触媒されるとの報告 (17) や、F₀c は自発的に膜挿入し、この自発的膜挿入反応は DAG により抑制されない (32) など、それらの結果は様々であり、F₀c の膜挿入反応における YidC の機能は不明であった。タンパク質の膜挿入反応の *in vitro* 実験系では、無細胞タンパク質合成システムを用いて試験管内で基質膜タンパク質を合成し、反応系に加えられた膜小胞への膜挿入反応を解析する。膜小胞に挿入した基質膜タンパク質は、外側から加えられたプロテアーゼの消化を免れるため、プロテアーゼ耐性の断片として検出される。これを指標にして膜挿入を評価する。膜挿入した F₀c は膜の外側に露出する部分がないため、F₀c の場合は分子全体が膜挿入断片として検出される。また、膜挿入の検出を容易にするため、基質膜タンパク質を放射性アミノ酸でラベルする。反応系に加える放射性アミノ酸の濃度は非放射性のアミノ酸の濃度に比べて低濃度であるため、放射性アミノ酸の濃度がタンパク質合成の律速となる。そのため、*in vitro* 系において合成される膜タンパク質の量は、反応系の MPase や YidC の量に比べて非常に少ない。放射性アミノ酸に加えて非放射性のアミノ酸を添加し、基質膜タンパク質の合成量を増やした条件において、F₀c の膜挿入反応が解析された。西川・佐々木らは、膜挿入反応されなかった F₀c がプロテアーゼ耐性の凝集体を形成することを見出した。F₀c がプロテアーゼ耐性の凝集体を形成した場合であっても、分子全体がプロテアーゼ耐性の断片として検出されるため、膜挿入反応を正しく評価することができない。これまでの報告では、プロテアーゼ耐性の凝集体 F₀c を膜挿入断片としていたことが、F₀c の膜挿入反応を正しく解析できていなかった原因であると考えられる。F₀c の凝集体は界面活性剤オクチルグルコシドによっても可溶化されず、プロテアーゼ耐性のままであった。一方、膜小胞に挿入された F₀c はオクチルグルコシド存在下ではプロテアーゼにより消化される。オクチルグルコシド存在下でのプロテアーゼによる消化を指標に F₀c の膜挿入反応における MPase、YidC の機能が解析された結果、膜挿入反応は YidC のみでは進行せず、MPase が必須であること、さらに、MPase による膜挿入反応は YidC により著しく促進される様子が観察された (33)。

MPIase により膜挿入された F_0c は YidC へ受け渡され、YidC が膜挿入反応を完了させるというように、MPIase と YidC は協調的に働くことで、 F_0c 膜挿入反応を触媒していると考えられる (図 4)。しかしながら、 F_0c はクロロホルム/メタノール混合溶液に可溶であるなど、膜タンパク質の中でも特殊な性質を示す (34)。図 4 に示すような分子機構により他の基質膜タンパク質が膜挿入されるかどうかについては不明である。

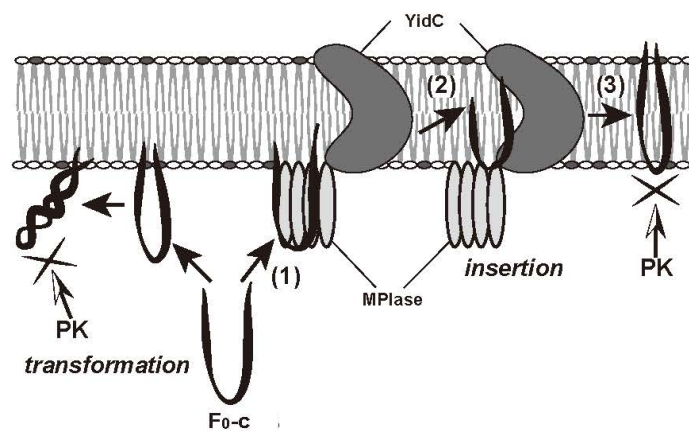


図 4. MPIase と YidC の協調的な作用による F_0c の膜挿入反応。

MPIase は膜表面で F_0c と相互作用し、膜挿入反応が開始される (Step1)。YidC は MPIase から膜挿入反応中に基質膜タンパク質を受け取り (Step2)、膜挿入反応を完了させる (Step3)。膜挿入できなかった F_0c はプロテアーゼ耐性の凝集体を形成する。図は文献 (33) より引用した。

(7) MPIase のタンパク質膜透過反応における役割

大腸菌の外膜やペリプラズムで働くタンパク質は内膜を透過する必要がある。膜透過されるタンパク質は N 末端にシグナル配列をもった前駆体として合成される (図 1C)。ただし、一部のタンパク質を除いては、SecYEG への輸送に SRP/SR は必須ではない (35)。そのため、大腸菌におけるタンパク質膜透過反応では、ポリペプチドの合成終了後に膜透過することができる (図 1C) (9, 10)。SecYEG 上での膜透過反応は ATPase 活性をもつ SecA の ATP 加水分解エネルギーより駆動される (図 1C) (9, 10)。生化学的な解析をもとに、SecA は以下のような作用機序により膜透過反応を駆動すると考えられている。SecA は SecYEG 上で基質タンパク質と ATP を結合すると構造変化を起こし、基質タンパク質を引き連れて SecYEG 内部に深く挿入する。その後、ATP 加水分解により構造を変え、基質タンパク質を手放して SecA だけが脱挿入する。この挿入・脱挿入を繰り返すことにより、膜透過反応を段階的に駆動すると考えられている (36–38)。SecG は 2 回膜貫通タンパク質であり、その N 末端・C 末端はペリプラズム側に露出している (39) (図 5)。SecG は SecYE・SecA による膜透過反応を著しく促進する (40)。SecG の配向性は膜透過反応に共役して反転することが知られている (39)。SecA の膜への挿入に共役して配向性が反転し、SecA の脱挿入と共役して元の配向性に戻る (39) (図 5)。この SecA-SecG のダイナミックな構造変化により膜透過反応サイクルが促進される (39, 41)。前駆体タンパク質のシグナル配列は膜透過反応中にシグナルペプチダーゼにより切断され、成熟体となる。*in vitro* 実験系を用いて、膜透過反応における MPIase の機能が解析された。その結果、MPIase は SecYEG による膜透過反応を約 10 倍促進することが明らかとなった (23, 42)。化学架橋剤を用いた解析の結果、MPIase 非存在下では SecYEG は SecE を接触面とした二量体構造 (back-to-back) であるのに対し、MPIase 存在下では SecG が接触面近傍に位置する二量体構造 (side-by-side) となることが明らかとなった (図 6) (42)。SecG の膜反転サイクルは side-by-side 構造のときのみ可能となり、膜透過活性が著しく促進される (42)。

このように、*in vitro*再構成系を用いた解析により、MPIase は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明らかとされてきた。しかしながら、MPIase の構造は新規のものであったことから、MPIase の生合成経路の全容は不明であった。そのため、MPIase を欠損した変異株を構築することができず、MPIase が *in vivo* においてタンパク質膜挿入反応・膜透過反応に関与しているのかどうかについては不明であった。第 1 章では、MPIase の生合成遺伝子として CdsA、YnbB を同定した。これらの遺伝子破壊株を構築し、MPIase の枯渇が、タンパク質膜挿入反応・膜透過反応、さらには菌の生育に及ぼす影響について調べ、MPIase の *in vivo* における機能解析を行った。第 2 章では、MPIase の発現量が低温下で著しく増加することを見出した。低温下における MPIase の増加には、*cdsA* 遺伝子、*ynbB* 遺伝子が関与することを明らかにした。さらに、MPIase の増加の低温下でのタンパク質膜挿入・膜透過反応における役割を解析した。第 3 章では、低温下における *cdsA* 遺伝子の発現誘導機構を解析した。

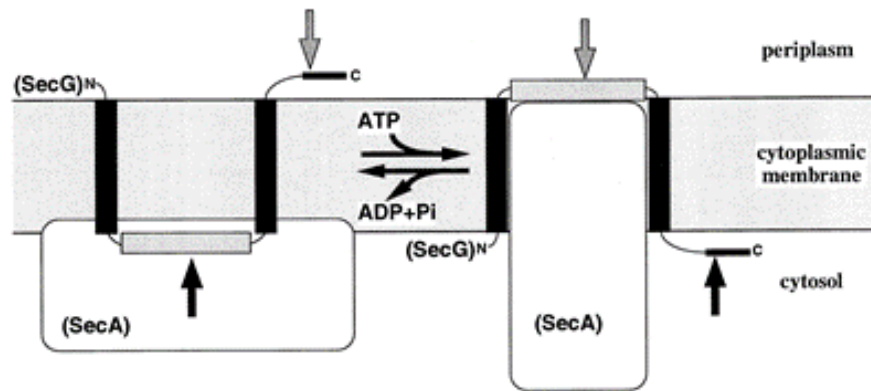


図 5. SecA の膜挿入・脱膜挿入に共役した SecG の配向性の反転。

SecA は SecYEG 上で基質タンパク質と ATP を結合すると構造変化を起こし、基質タンパク質を引き連れて SecYEG 内部に深く挿入する。その後、ATP 加水分解により構造を変え、基質タンパク質を手放して SecA だけが脱挿入する。この挿入・脱挿入を繰り返すことにより、膜透過反応は段階的に駆動される。SecG は SecA の挿入・脱挿入反応に共役して自身の配向性を反転させる。この配向性の変化により膜透過反応は促進される。図は文献 (39) より引用した。

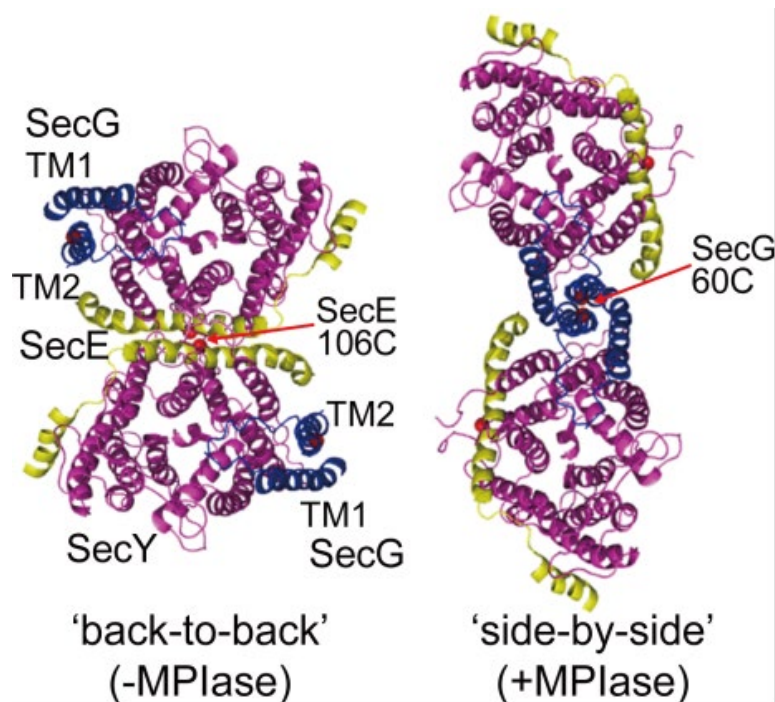


図 6. MPIase による SecYEG の二量体構造の変化。

(左) SecYEG の結晶構造に基づく SecYEG 二量体構造。(右) 化学架橋実験により明らかにされた MPIase 存在下での SecYEG 二量体構造モデル。図は細胞内（細胞質）から膜（SecYEG）を見た図を示す。SecY、SecE、SecG をそれぞれ紫、黄色、青で示した。”TM”は膜貫通領域で、SecG の TM1 と TM2 を示している。SecE（SecE 106C、左）や SecG（SecG 60C、右）に導入したシステイン残基（赤い点）は、近接していればそれぞれ酸化反応によりジスルフィド結合を形成する。MPIase 非存在下では SecE 106C 同士が化学架橋される一方、MPIase 存在下では SecG 60C 同士が化学架橋される。図は文献 (42) より引用した。

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

1-1. 導入

大腸菌の外膜には ECA (Enterobacterial common antigen) と呼ばれる糖脂質が存在する (43)。ECA の構造は MPIase とよく似ているが、いくつかの点で異なっている。ECA の糖鎖ユニットは MPIase と同様であるが、その繰り返しの回数が MPIase は 9~11 回であるのに対して ECA は 18~55 回と長く、分子によってばらつきがある。また、糖鎖と脂質部分をつなぐリンカーが MPIase はピロリン酸であるのに対して ECA はモノリン酸である。ECA には膜挿入反応を触媒する機能はない (27)。ECA 生合成反応に関与する遺伝子のほとんどは同定されている (44, 45)。ECA 生合成遺伝子欠損株における MPIase 発現量に変化はないことから、MPIase は ECA とは異なる生合成遺伝子により合成される、あるいは、一部重複はあるものの、その反応には機能の重複した複数の遺伝子が関与していると考えられる (27)。約 20 年前、ECA の生合成における研究の過程において、糖脂質 ManNAc-GlcNAc-PP-DAG が同定されていた (図 2) (46)。当時はこの物質が何であるのかは全く不明であったが、MPIase の構造が明らかとなった今では、この物質は MPIase 生合成中間体であると考えられる。このことから、MPIase はホスファチジン酸上で糖鎖が伸長して生合成が進むと考えられる。そのため、MPIase 生合成反応の第一段階は GlcNAc-PP-DAG (Compound I) (図 2) が生合成される反応であると予想した。第 1 章では、Compound I を生合成する因子を探索し、その生合成遺伝子欠損株を構築することで、MPIase の枯渇がタンパク質膜挿入・膜透過反応、および菌の生育に及ぼす影響について調べた。

1-2. 結果

(1) MPIase 生合成遺伝子の同定

Compound I 生合成酵素の探索の過程で、CTP 生合成遺伝子 *pyrG* 遺伝子の変異株

(JF618) において MPIase 発現量が大幅に低下することを見出した。JF618 株の生育はシチジン要求性となる (47)。この株をシチジン枯渇条件で培養したとき、MPIase 発現量の大幅な低下が観察された (図 7)。また、MPIase 発現量の低下に伴って、M13 プロコート of 膜挿入反応の著しい阻害が観察された (図 7)。これらの結果から、Compound I はシチジン誘導体を前駆体として生合成させることが示唆された。

大腸菌においてすべてのリン脂質はシチジン誘導体 CDP-ジアシルグリセロール (CDP-DAG) を前駆体として生合成される (48)。Compound I もグリセロリン脂質の一種であるため CDP-DAG を前駆体として生合成される可能性が考えられた。CDP-DAG は、CdsA により、CTP とホスファチジン酸 (PA) から生合成される (図 8) (49, 50)。当研究室、佐藤らが CdsA を過剰発現し、MPIase 量に及ぼす影響を調べた。その結果、CdsA の発現量の増加に対応して MPIase の増加が観察された (図 9)。YnbB はアミノ酸配列から CdsA のパラログとされているが、その機能は不明である。YnbB の過剰発現によっても MPIase の増加が観察された (図 9)。これらの結果から、CdsA と YnbB は MPIase 生合成反応に関与することが示された。当研究室、亀本が Compound I 生合成に必要な基質を検索したところ、CTP とホスファチジン酸、GlcNAc-P を CdsA 過剰発現株から調製した内膜画分を混ぜ合わせたとき、TLC 上で Compound I の標品と Rf 値が一致する物質が合成されている様子が観察された。サントリー生命科学研究所・藤川研究員、島本主幹研究員による LC-MS/MS 解析により、合成された物質が Compound I であることが確かめられた。これらの結果から、CdsA は CDP-DAG 生合成に加えて、Compound I 生合成反応も触媒することが示された。

GN80 (CdsA8 変異株) は pH8.0 以上のアルカリ条件においてリン脂質生合成反応が阻害される *cdsA* 遺伝子変異株である (51)。CdsA8 変異株を pH8.5 で培養し、リン脂質生合成反応、MPIase 生合成反応に及ぼす影響を調べた。その結果、リン脂質生合成反応は著しく阻害されていたが、MPIase 発現量は約 3 倍増加していた (図 10)。これらの結果から、

CdsA8 変異株はアルカリ条件下においてリン脂質生合成反応が阻害されるが、MPIase 生合成反応が亢進される変異株であることが示された。粗精製した CdsA8 を用いて、CDP-DAG、Compound I それぞれの合成を経時的に観察した。*in vitro* で合成された CDP-DAG は CDP-DAG 加水分解酵素 Cdh (52) により速やかに分解されるため、CdsA8 変異株の *cdh* を破壊した株を構築した (RS80)。その結果、CDP-DAG は反応開始直後速やかに合成され、その合成量は反応開始から 5 分で頭打ちになったが、Compound I は CDP-DAG に遅れて合成され、その合成量は反応時間の経過と共に増加する様子が観察された (図 11)。CdsA8 変異株の変異部位を調べたところ、207 番目のチロシン残基がヒスチジン残基に置換される変異であった。この変異部位を CdsA の結晶構造 (53) に照らし合わせると、PA の結合部位の近傍に位置していた。アルカリ条件下では、ヒスチジン残基の脱プロトン化によって CDP-DAG の解離が阻害され、その結果、CDP-DAG 生合成およびリン脂質生合成反応が阻害されたと考えられる。一方、CDP-DAG が CdsA 分子内部に保持されたことにより、Compound I 生合成反応が亢進され、MPIase 発現量が増加したと考えられる。これらの結果から、Compound I は CdsA 分子内部に CDP-DAG が保持された状態で GlcNAc-P が取り込まれることにより生合成されるという作業モデルを提唱した (図 12)。

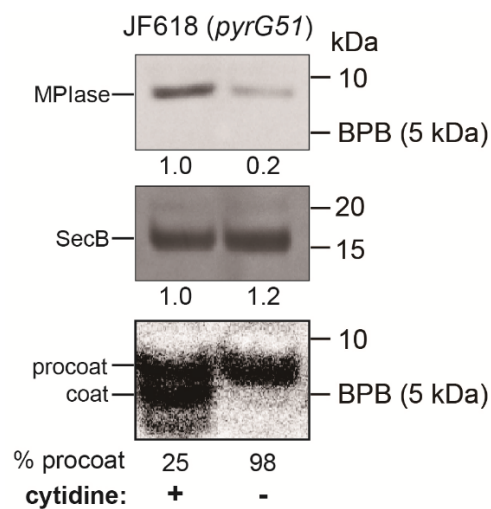


図 7. シチジン要求性変異株のシチジン枯渇条件下における MPIase 発現量の低下、および膜挿入反応の阻害。

シチジン添加培地で一晚培養した JF618 (*pyrG51*) を M9 最少培地で 3 回洗浄後、シチジン添加・非添加 M9 最少培地に 1:100 希釈で植菌した。シチジン非添加培地において生育阻害が観察されてから、さらに 3 時間培養した。TCA 沈殿後、ウエスタン・ブロッティングにより MPIase、SecB を検出した。各バンドの強度は ATTO CS analyzer により定量した。M13 (プロ) コートの場合は、JF618/pMS119-PC を上述のように培養後、1 mM IPTG を添加し M13 プロコートの発現を誘導した。 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン-システインで 60 秒標識後、TCA 沈殿によりタンパク質を回収した。抗 M13 コート抗体により免疫沈降後、SDS-PAGE により分離、オートラジオグラフィーにより M13 (プロ) コートを検出した。

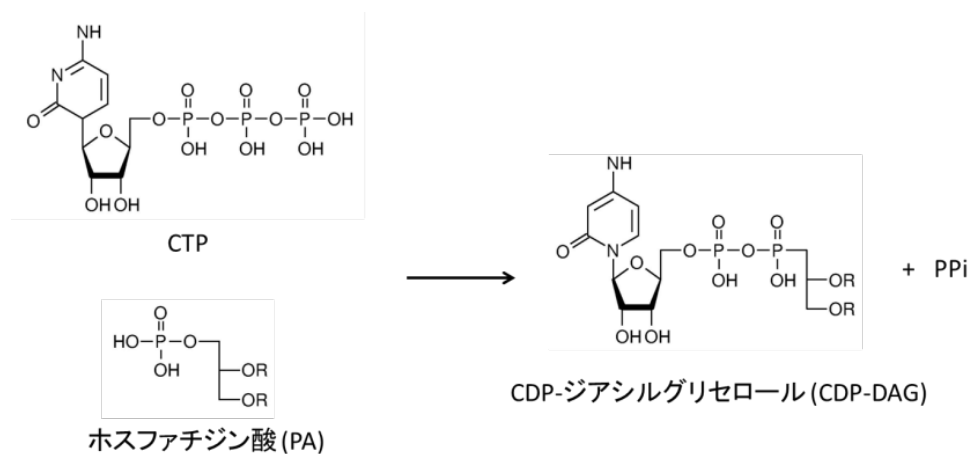


図 8. CdsA による CDP-DAG 生合成反応。

CdsA は CTP の CMP 部分を PA に転移し、CDP-DAG を生合成する。副産物としてピロリン酸 (PPi) が生成する。R は炭素数 16~18 の飽和/不飽和脂肪酸を示す。

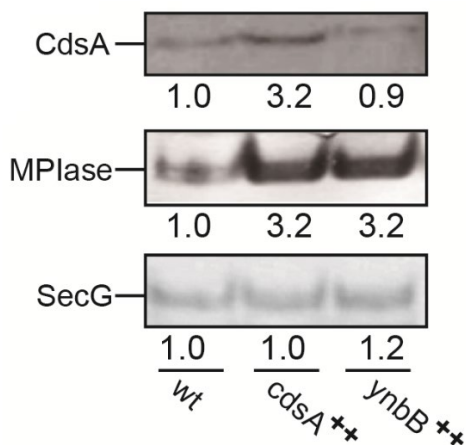


図 9. CdsA、YnbB の過剰発現による MPlase 発現量の増加。

BL21 (DE3)、BL21 (DE3)/pT7-CdsA、および BL21 (DE3)/pT7-YnbB を LB 培地で対数増殖期まで培養後、1 mM IPTG を添加して CdsA、YnbB の発現を誘導した。IPTG 添加後、2 時間培養を続けた後、反転内膜小胞 (INV) を調製し、CdsA、MPlase、および SecG をウエスタン・ブロッティングにより検出した。各バンドの強度 CS analyzer (ATTO) により定量した。

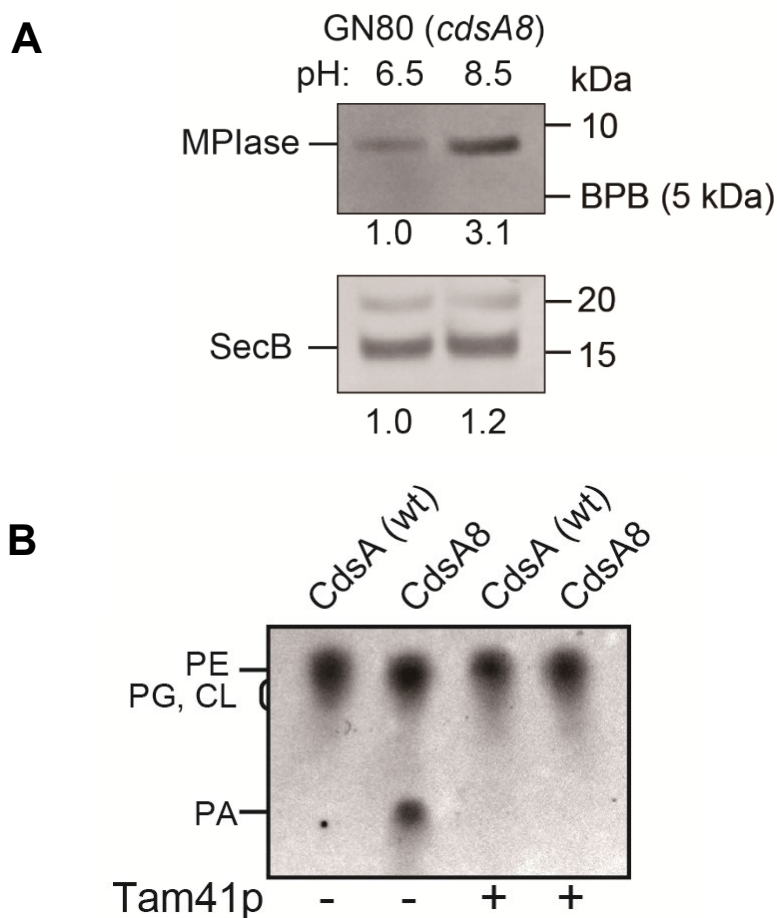


図 10. 高 pH 感受性 *CdsA8* 変異株におけるリン脂質生合成反応の阻害と MPIase 生合成反応の亢進。

(A) GN80 を pH6.5、pH 8.5 の LB 培地で培養後、TCA 沈殿により全タンパク質画分を調製した。MPIase、SecB は抗 MPIase 抗体、抗 SecB 抗体を用いてウエスタン・ブロッティングにより検出した。各バンドの強度は ATTO CS Analyzer により定量した。

(B) 各株を pH 8.5 の LB 培地で培養後、材料と方法に示す手順でリン脂質を抽出した。調製した試料を TLC プレート上でクロロホルム/メタノール/水 = 9/5/1 の展開溶媒で展開した。リン脂質はアニスアルデヒド/硫酸により検出した。PE はホスファチジルエタノールアミン、PG はホスファチジルグリセロール、CL はカルジオリピン、PA はホスファチジン酸を示す。

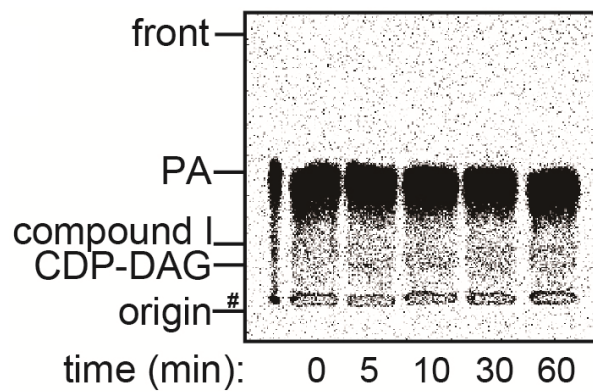


図 11. CdsA8 による Compound I、および CDP-DAG 生合成。

RS80 (*cdsA8*Δ*cdh*) を pH 6.5 の LB 培地で培養後、INV を調製した。pH 8.5 条件下で材料と方法に示す手順で Compound I、CDP-DAG を試験管内で合成した。各時間における反応溶液を TLC にスポットし、反応を終了させた。クロロホルム/アセトン/80%アセトニトリル= 1/6/6 の展開溶媒で展開し、オートラジオグラフィーにより検出した。

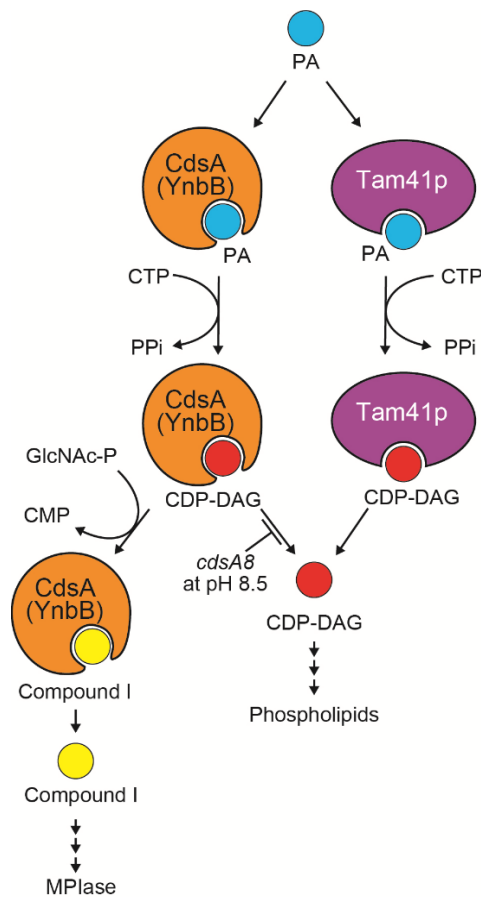


図 12. CdsA および Tam41p の作業モデル。

CdsA に取り込まれた PA は CTP と反応し CDP-DAG に変換される。その後、CdsA から遊離した CDP-DAG はリン脂質へと変換される。一方、CDP-DAG が CdsA 分子内部に保持された状態で GlcNAc-P と反応すると、Compound I へと変換される。CdsA8 変異株ではアルカリ条件下において CDP-DAG の CdsA からの遊離が阻害されるため、Compound I 生合成反応は亢進する。Tam41p は CDP-DAG を生合成するが、Compound I は生合成しない。

(2) MPIase 生合成遺伝子欠損株の構築

ynbB 遺伝子欠損株 (KS21)、*cdsA* 遺伝子欠損株 (KS22) および *cdsA/ynbB* 遺伝子二重欠損株 (KS23) を構築し、MPIase 発現量に及ぼす影響について調べた。CdsA は菌の生育に必須であるため、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 (pAra-CdsA) させた状態で染色体上の *cdsA* 遺伝子を破壊した。*cdsA* 遺伝子は *ispU-cdsA-rseP-bamA* オペロンの 2 番目に位置している (図 13)。これらの遺伝子はすべて生育に必須である (54)。*cdsA* 遺伝子の破壊によって、オペロンを構築している他の遺伝子の発現が阻害されないように、*cdsA* 遺伝子の ORF をそのまま、*cat* 遺伝子の ORF に置換した (図 13)。YnbB は菌の生育に必須でない (54)。KS21 は野生株 (EK413) と同様に生育した (図 14A)。KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA はアラビノース添加培地 (YnbB⁺/CdsA⁺, ΔYnbB/CdsA⁺) では野生株と同様に生育するが、アラビノース非添加培地 (YnbB⁺/ΔCdsA, ΔYnbB/ΔCdsA) では致死であった (図 14A)。これらの株の MPIase 発現量を調べた。KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA はアラビノース添加培地で前培養後、アラビノース添加・非添加培地にそれぞれ植菌した。液体培地においても CdsA 枯渇株は生育しなかった (図 14B)。KS21 の MPIase 発現量は野生株とほぼ変わらなかった (図 16)。一方、KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA ではアラビノース非添加培地で培養し、CdsA を枯渇した条件下において MPIase 発現量の著しい低下が観察された (図 16)。これらの結果から、CdsA は MPIase の生合成反応に関与することが示された。

MPIase の枯渇がタンパク質膜挿入反応に及ぼす影響について、モデル膜タンパク質である M13 プロコート の膜挿入反応を調べた。M13 プロコート は N 末端にシグナル配列をもった前駆体として合成され、膜挿入後、シグナルペプチダーゼによりシグナル配列が切断され成熟体となる (図 15)。シグナル配列の切断による分子量の減少を膜挿入の指標として解析した。その結果、MPIase を枯渇した条件において M13 プロコートの蓄積が観察された (図 16)。MPIase の枯渇が膜挿入反応に及ぼす影響についてパルス・チェイス実験により詳

細に調べた。MPIase が発現している条件 ($CdsA^+/YnbB^+$ 、 $CdsA^+/\Delta YnbB$) では膜挿入反応は速やかに進行した一方、MPIase が枯渇した条件下 ($\Delta CdsA/YnbB^+$ 、 $\Delta CdsA/\Delta YnbB$) では、膜挿入反応は完全に阻害され、膜挿入しなかった M13 プロコートが時間経過と共に分解されている様子が観察された (図 17A、B)。以上の結果から、MPIase は *in vivo* においてもタンパク質膜挿入反応に関与することが示された。

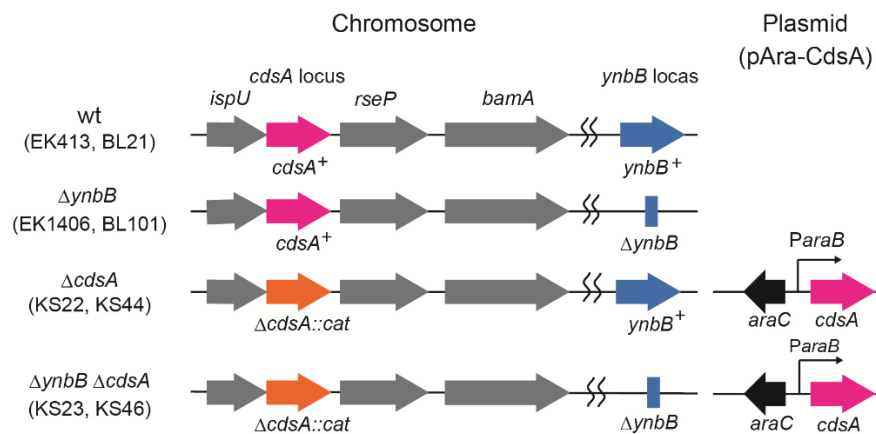
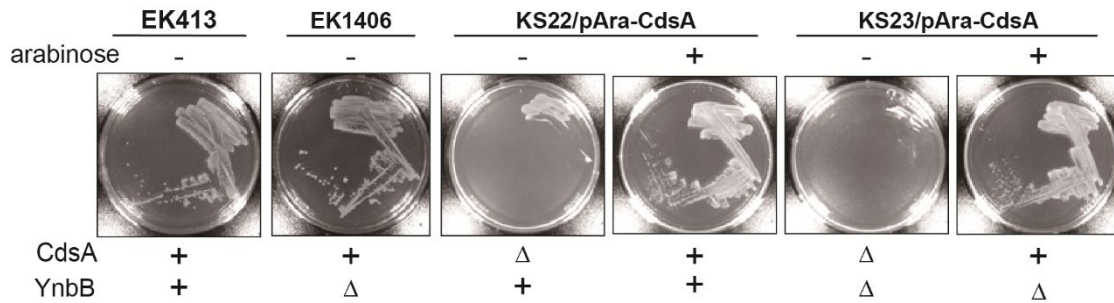


図 13. $\Delta ynbB$ 株、 $\Delta cdsA$ 株、および $\Delta ynbB \Delta cdsA$ 二重欠損株の遺伝型。

cdsA 遺伝子の開始コドンから終始コドンまでをクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) の ORF と置換した。 *ynbB* 遺伝子は Keio コレクションの $\Delta ynbB::kan$ を EK413、BL21 に導入し、*kan* カセットを FRT システム (54, 55) により削除した。CdsA は菌の生育に必須であるため、 $\Delta cdsA$ 株、 $\Delta ynbB \Delta cdsA$ 株では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。

A



B

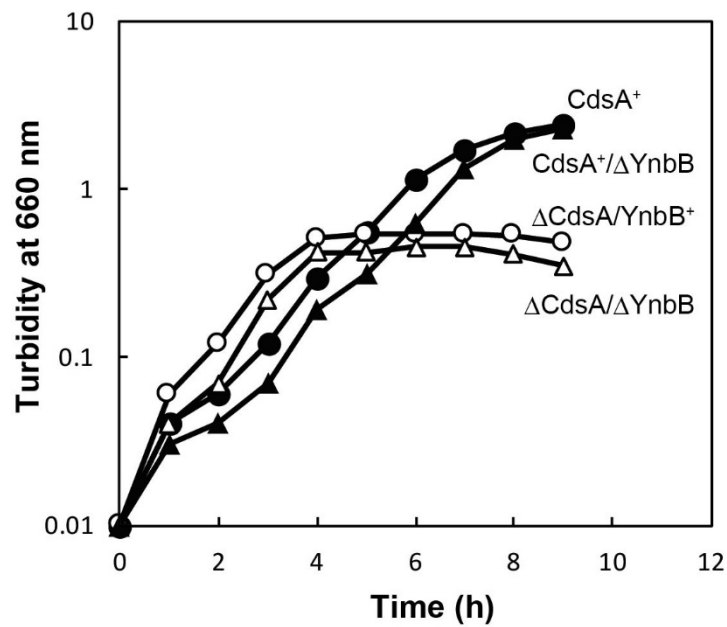


図 14. $\Delta ynbB$ 株、 $\Delta cdsA$ 株、および $\Delta ynbB \Delta cdsA$ 二重欠損株の生育。

(A) 各株を 0.2 % アラビノース添加・非添加の LB プレートに植菌し、37°C で 16 時間培養した。

(B) 一晚培養した KS22 ($\Delta cdsA$)/pAra-CdsA、KS23 ($\Delta ynbB \Delta cdsA$)/pAra-CdsA を LB 培地で 3 回洗浄後、アラビノース添加・非添加培地に 1:1000 希釈で植菌し、37°C で培養した。660 nm における濁度を経時的に測定した。

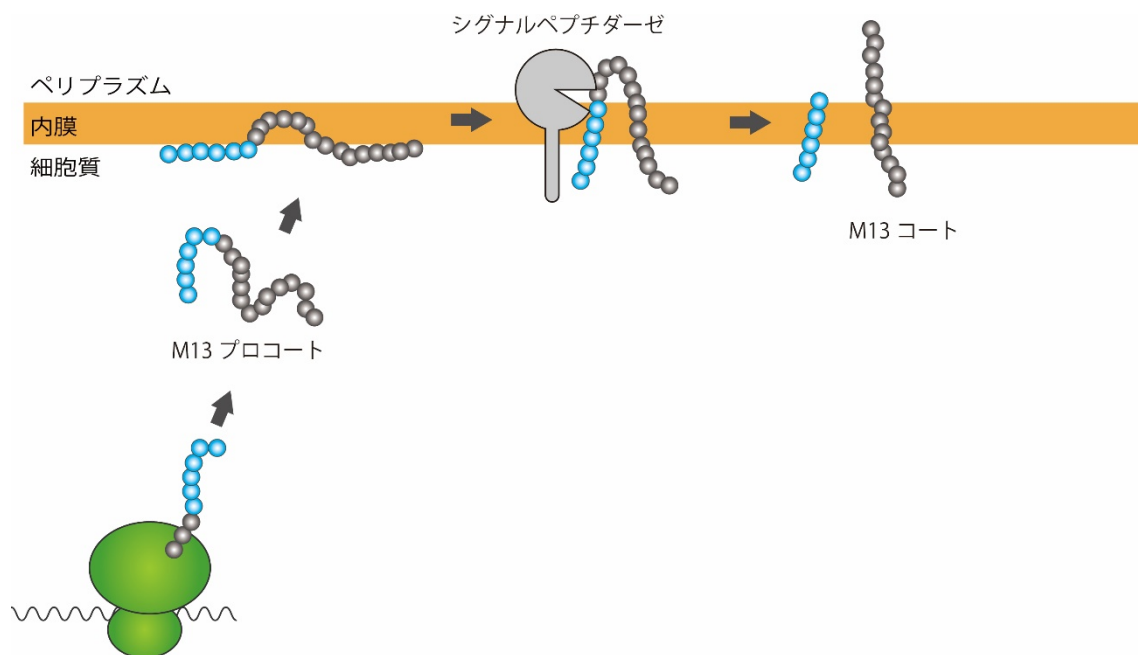


図 15. M13 プロコートの膜挿入反応。

M13 プロコートは N 末端にシグナル配列をもった前駆体として合成される。シグナル配列を青丸で示す。膜挿入後、シグナルペプチダーゼによりシグナル配列が切断され、成熟体 (M13 コート) となる。

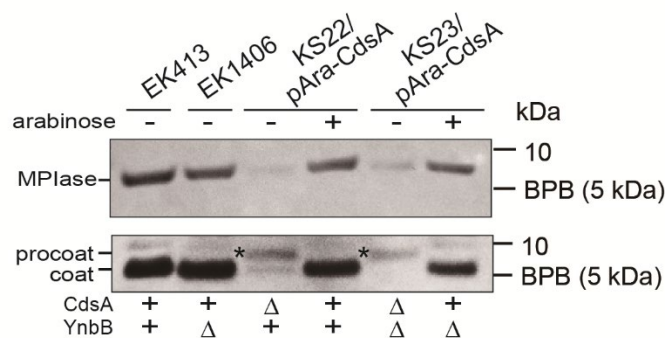


図 16. CdsA、YnbB の枯渇が MPIase 発現量や M13 プロコートの膜挿入に及ぼす影響。

一晩培養した各株を LB 培地に 1:1000 希釈で植菌し、37°C で培養した。KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA は、菌を LB 培地で 3 回洗浄後、アラビノース添加・非添加培地にそれぞれ植菌した。アラビノース非添加培地において生育の阻害が観察された時点で、1 mM IPTG を加えて 1 時間、M13 プロコートを誘導した。培養液を TCA 処理後、MPIase、M13 (プロ) コートをウエスタン・ブロッティングにより検出した。procoat は M13 プロコート、coat は M13 コートを示す。"★" は M13 プロコートのバンドを示す。

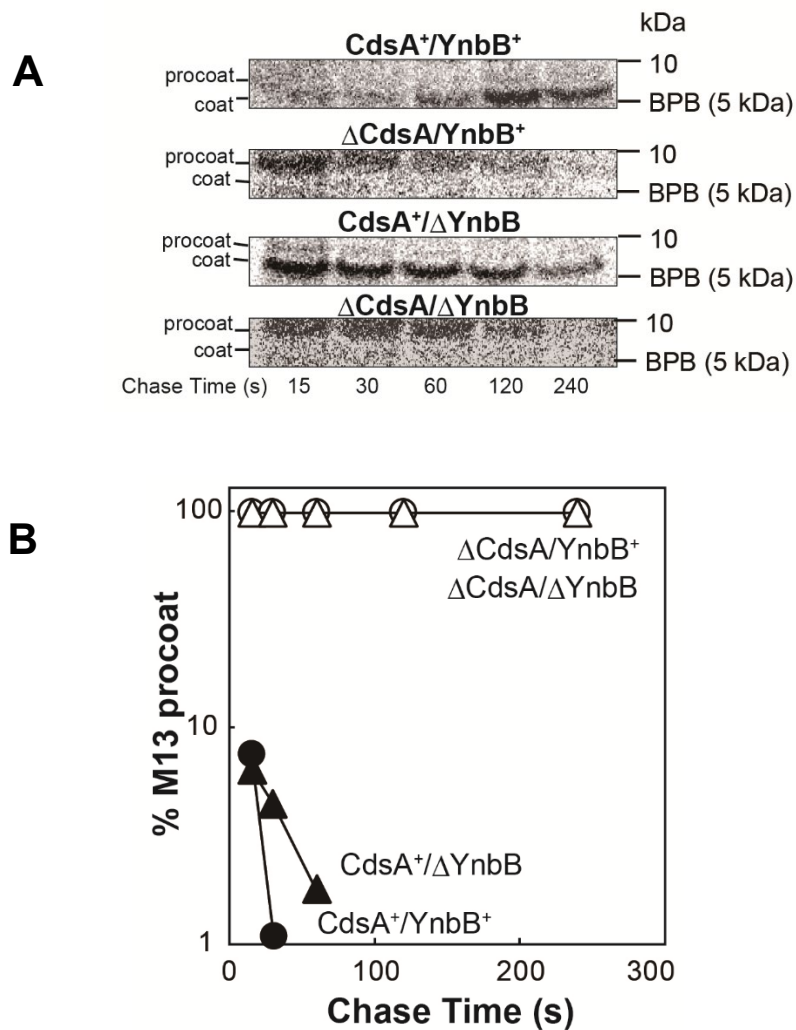


図 17. MPIase の枯渇が M13 プロコートの膜挿入反応に及ぼす影響。

(A) アラビノース添加培地で一晚培養した KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA を M9 最少培地で 3 回洗浄後、アラビノース添加・非添加培地に植菌し、37°C で培養した。M13 プロコートは 1 mM IPTG で 5 分間誘導した。パルス・チェイス実験、免疫沈降は、材料と方法に示す手順で行った。M13 プロコート、M13 コートのバンドはオートラジオグラフィーで検出し、Image Quant (GE Healthcare) により定量した。

(B) M13 プロコートと M13 コートの総和に対する M13 プロコートの割合（縦軸）をチェイス時間（横軸）に対してプロットした。

(3) MPIase の欠損が大腸菌の生育および膜挿入反応に及ぼす影響

CdsA 欠損株では、MPIase の枯渇と共にリン脂質生合成も阻害される。リン脂質の生合成反応は菌の生育に必須であるため、この株では MPIase の枯渇が生育に及ぼす影響について調べることができなかった。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 (56)。小胞体に局在する Cds1p は大腸菌の CdsA とアミノ酸配列の相同性をもつ一方、Tam41p は全く相同性をもたない (56)。そこで、Tam41p は大腸菌内において CDP-DAG 生合成のみを行うのではないかと予想し、酵母の Tam41p を CdsA 欠損株に発現させた。BL21 を親株として、*cdsA* 遺伝子欠損株 (KS44) および *cdsA/ynbB* 遺伝子二重欠損株 (KS46) を構築した (図 14)。TAM41 はプラスミド上の T7 プロモーター支配下に配置した (RKP153)。CdsA 枯渇株では基質である PA が蓄積するため、PA の蓄積量を指標としてリン脂質生合成能を評価した。CdsA 枯渇株では PA が全リン脂質の 30~40% 程度まで蓄積する様子が観察された (図 18)。CdsA 枯渇条件下において Tam41p を発現させた場合、PA の蓄積量が大幅に低下した (図 18)。また、pH 8.5 で培養した CdsA8 変異株に Tam41p を発現させると、PA 蓄積量が大幅に低下した (図 10B)。これらの結果から、Tam41p は大腸菌内で CDP-DAG 生合成酵素として機能することが示された。続いて、Tam41p が MPIase 生合成反応に関与するかどうかを調べた。CdsA 枯渇株に Tam41p を発現させても、MPIase の発現量は回復しないばかりか、さらに完全に枯渇される様子が観察された (図 19)。Tam41p が CdsA、YnbB と PA を競合するため、MPIase 発現量が減少していると考えられる。これらの結果から、Tam41p は大腸菌内で CDP-DAG を生合成するが、MPIase 生合成反応には関与しないことが判明した (図 12)。そのため、CdsA 枯渇株に Tam41p を発現させると、リン脂質生合成は正常で MPIase のみを枯渇した株が得られる。この株を用いて、MPIase の枯渇が菌の生育に及ぼす影響について調べた。その結果、固体培地、液体培地の両方において、Tam41p を発現した条件であっても CdsA 枯渇株は生育しなかった (図 20A、B)。以上のことから MPIase は大腸菌の生育に必須であることが示され

た。

リン脂質生合成反応が阻害された条件下では、膜構造が破壊されたことにより、M13 プロコートが膜挿入できず、前駆体が蓄積していた可能性も考えられる。Tam41p を発現させ、リン脂質生合成反応が回復している条件下における M13 プロコートの膜挿入反応を調べた。ウエスタン・ブロッティング、パルス・チェイス実験において MPIase の枯渇により M13 プロコートの膜挿入反応は完全に阻害されている様子が観察された (図 21A、B)。MPIase 枯渇条件下においても YidC 発現量には大幅な変化は観察されなかった (図 24)。これらの結果から、MPIase は *in vivo* においてタンパク質膜挿入反応に必須であることが示された。

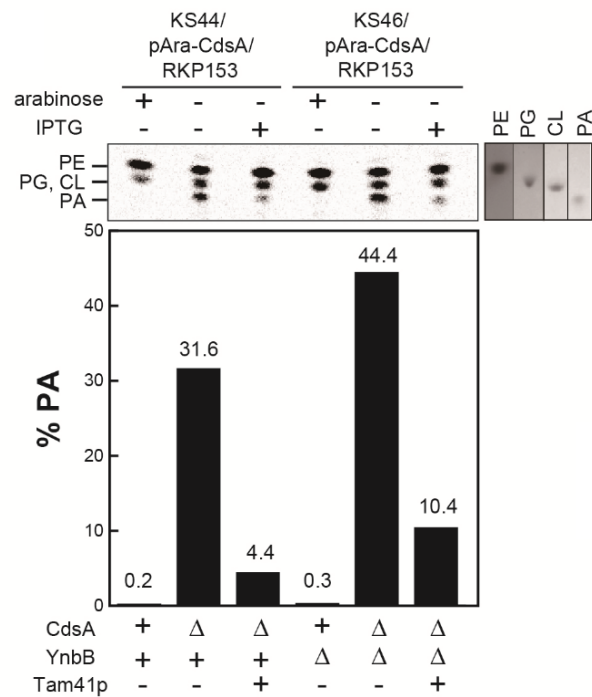


図 18. CdsA 枯渇株における Tam41p の発現がリン脂質生合成に及ぼす影響。

(上) アラビノース添加培地で一晚培養した KS44/pAra-CdsA/RKP153、KS46/pAra-CdsA/RKP153 を、LB 培地で 3 回洗浄後、1:1000 希釈で LB 培地に植菌した。OD₆₆₀ 0.2~0.3 で 0.1 mM IPTG を添加し、Tam41p の発現を誘導した。同時に [¹⁴C]-パルミチン酸で標識した。37°C で 3 時間培養後、材料と方法に示す手順でリン脂質を抽出した。調製した試料は、TLC で展開し、オートラジオグラフィーで検出し、Image Quant (GE Healthcare) により定量した。(下) 全リン脂質に対する PA の割合を示した。

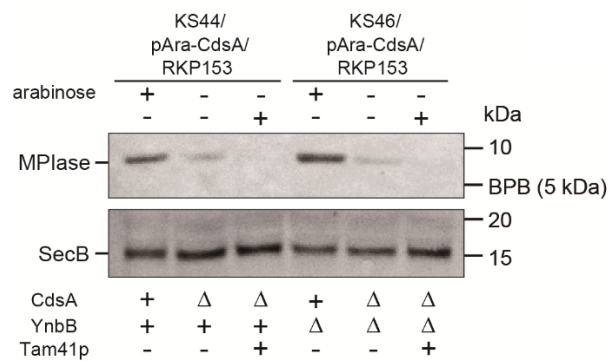


図 19. Tam41p の発現が MPIase 発現量に及ぼす影響。

アラビノース添加培地で一晚培養した KS44/pAra-CdsA/RKP153、KS46/pAra-CdsA/RKP153 を LB 培地で 3 回洗浄後、1:1000 希釈で LB 培地に植菌した。OD₆₆₀ 0.2~0.3 で 0.1 mM IPTG を添加し、Tam41p の発現を誘導した。MPIase、SecB をウェスタン・ブロッティングにより検出した。

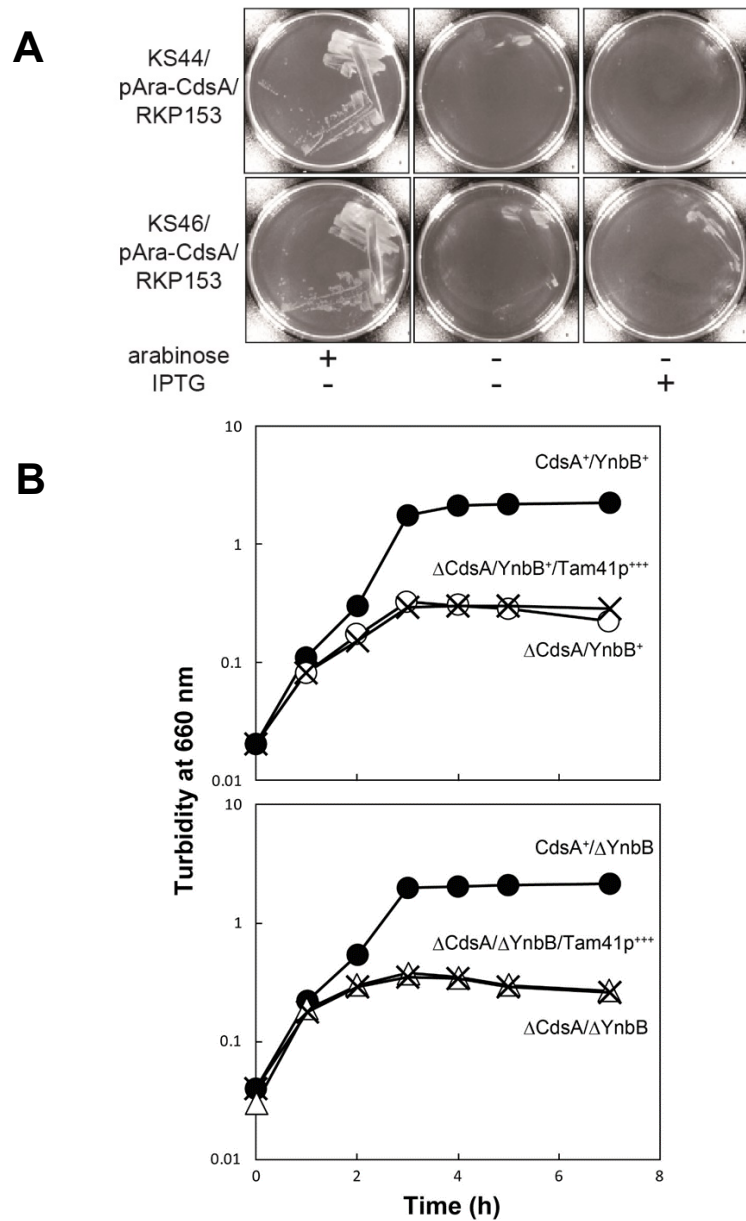


図 20. CdsA 枯渇株における Tam41p の発現が菌の生育に及ぼす影響。

(A) 各株を 0.2 %アラビノース添加・非添加、もしくは、0.1 mM IPTG 添加・非添加の LB プレートに植菌し、37°Cで 16 時間培養した。IPTG の添加により Tam41p が発現する。

(B) アラビノース添加培地で一晩培養した KS44/pAra-CdsA/RKP153、KS46/pAra-CdsA/RKP153 を LB 培地で 3 回洗浄後、アラビノース添加・非添加培地に 1:1000 希釈で植菌し、37°Cで培養した。OD₆₆₀ 0.2~0.3 で 0.1 mM IPTG を添加し、Tam41p の発現を誘導した。660 nm における濁度を経時的に測定した。

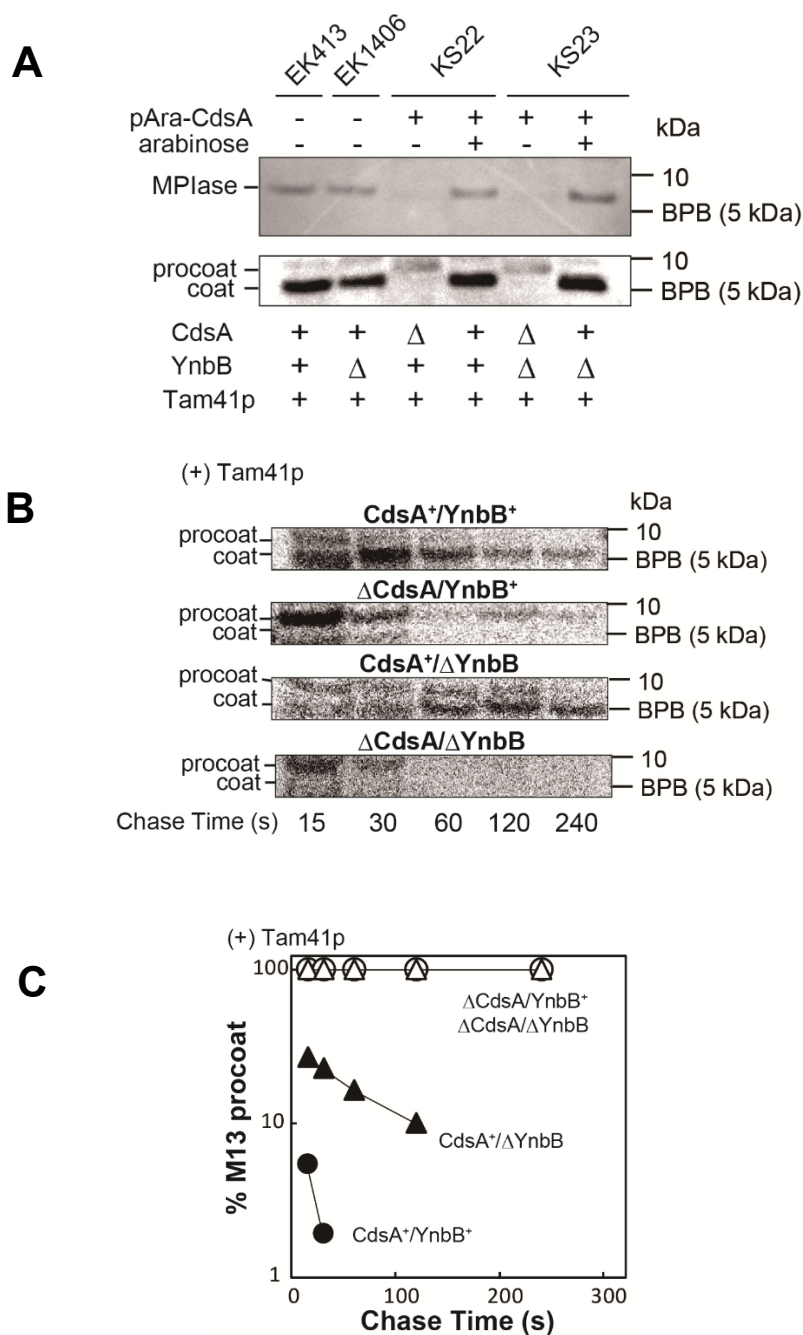


図 21. MPIase の枯渇がタンパク質膜挿入反応に及ぼす影響。

(A) 一晚培養した各株を LB 培地に 1:1000 希釈で植菌し、37°Cで培養した。KS22/pAra-CdsA/pTet-Tam41p、KS23/pAra-CdsA/pTet-Tam41p は、LB 培地で 3 回洗浄後、0.2% アラビノース添加・非添加培地にそれぞれ植菌した。アラビノース非添加培地において生育の阻害が観察された時点で、1 mM IPTG で 1 時間、M13 プロコートを誘導した。MPIase、M13 (プロ) コートをウェスタン・ブロッティングにより検出した。procoat は M13 プロコート、coat は M13 コートを示す。

(B) アラビノース添加培地で一晩培養した KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA を M9 最少培地で 3 回洗浄後、アラビノース添加・非添加培地に植菌し、37°C で培養した。M13 プロコートは 1 mM IPTG で 5 分間誘導した。パルス・チェイス実験、免疫沈降を材料と方法に示した手順で行った。M13 プロコート、M13 コートのバンドはオートラジオグラフィーで検出し、Image Quant (GE Healthcare) により定量した。procoat は M13 プロコート、coat は M13 コートを示す。

(C) M13 プロコートと M13 コートの総和に対する M13 プロコートの割合（縦軸）をチェイス時間（横軸）に対してプロットした。

(4) MPIase の欠損がタンパク質膜透過反応に及ぼす影響

MPIase は SecYEG と相互作用し、膜透過反応を約 10 倍促進する (23, 42)。MPIase の枯渇がタンパク質膜透過反応に及ぼす影響について調べた。外膜タンパク質 OmpA は N 末端にシグナル配列をもった前駆体 (pOmpA) として合成され、膜透過反応中にシグナル配列が切断され、成熟体 (OmpA) となる。MPIase の枯渇が pOmpA の膜透過反応に及ぼす影響について、シグナル配列の切断を指標にパルス・チェイス実験により評価した。MPIase が発現している条件 (CdsA⁺/YnbB⁺、CdsA⁺/ΔYnbB) では、pOmpA は速やかに OmpA に変換されるのに対し、MPIase 枯渇条件下 (ΔCdsA/YnbB⁺、ΔCdsA/ΔYnbB) では、pOmpA がチェイス時間 4 分まで蓄積する様子が観察された (図 22A、B)。Tam41p を発現させ、リン脂質合成反応が回復している条件下においても同様に MPIase 枯渇条件下において著しい膜透過反応の阻害が観察された (図 23A、B)。Tam41p を発現させた場合、培地にアラビノースを加え CdsA を発現させているにも関わらず、pOmpA の蓄積が観察された (図 23A、B)。これは、Tam41p の発現により MPIase 発現量が減少しているためであると考えられる (図 19)。本研究の MPIase 枯渇条件下においても SecY 発現量に大幅な変化は観察されなかった (図 24)。pOmpA の半減期を比較すると MPIase の枯渇により膜透過反応の速度は最大 10 倍阻害されていた (図 23)。これらの結果から、MPIase は *in vivo* においても膜透過反応を促進することが示された。

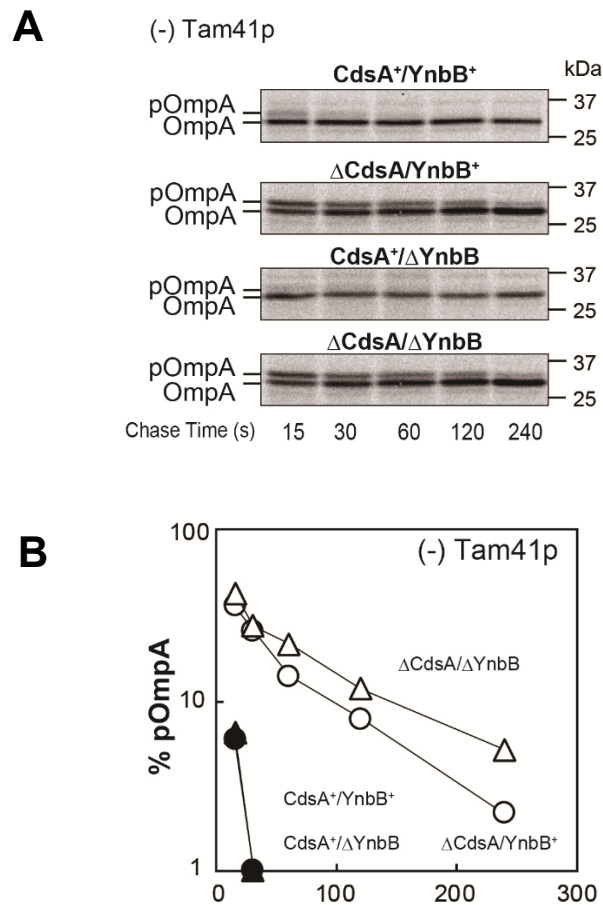
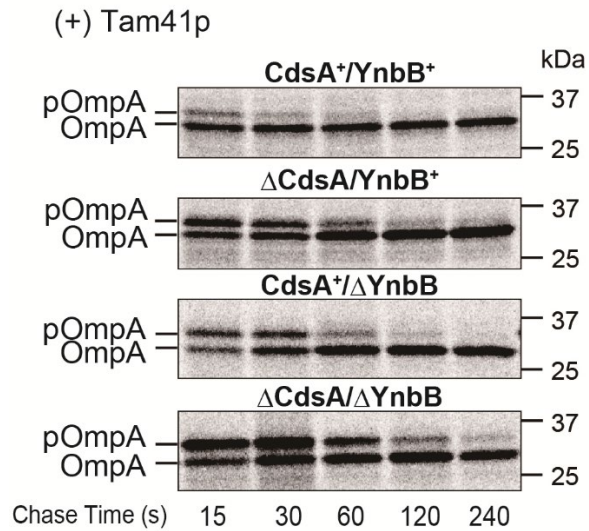
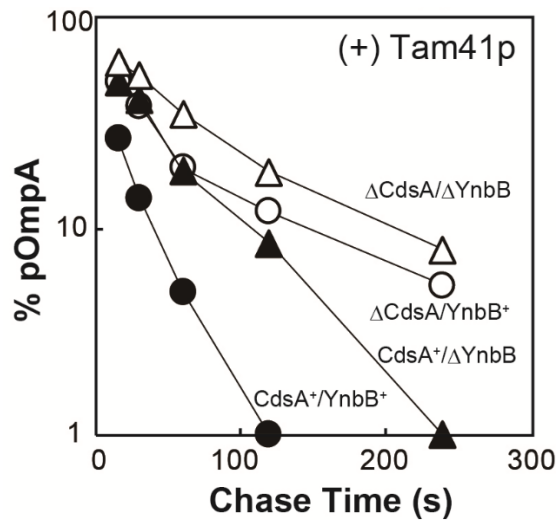


図 22. CdsA、YnbB の枯渇がタンパク質膜透過反応に及ぼす影響。

(A) アラビノース添加培地で一晚培養した KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA を M9 最少培地で 3 回洗浄後、アラビノース添加・非添加培地に植菌し、37°C で培養した。パルス・チェイス実験、免疫沈降は材料と方法に示す手順で行った。pOmpA、OmpA のバンドはオートラジオグラフィーで検出し、Image Quant (GE Healthcare) により定量した。

(B) pOmpA と OmpA の総和に対する pOmpA の割合 (縦軸) をチェイス時間 (横軸) に対してプロットした。

A**B****C**

	Half life of pOmpA (s)			
CdsA	+	Δ	+	Δ
YnbB	+	+	Δ	Δ
-Tam41p	5.9	32.9	5.5	45.5
+Tam41p	16.8	55.3	30.9	52.9

図 23. MPIase の枯渇が膜透過反応に及ぼす影響。

(A) アラビノース添加培地で培養した KS22/pAra-CdsA/pTet-Tam41p、KS23/pAra-CdsA/pTet-Tam41p を M9 最少培地で 3 回洗浄後、アラビノース添加・非添加培地に植菌し、37°C で培養した。パルス・チェイス実験、免疫沈降は材料と方法に示す手順で行った。pOmpA、OmpA のバンドはオートラジオグラフィーで検出し、Image Quant (GE

Healthcare) により定量した。

(B) pOmpA と OmpA の総和に対する pOmpA の割合 (縦軸) をチェイス時間 (横軸) に対してプロットした。

(C) 図 22A、B、および図 23A、B より pOmpA の半減期を算出した。

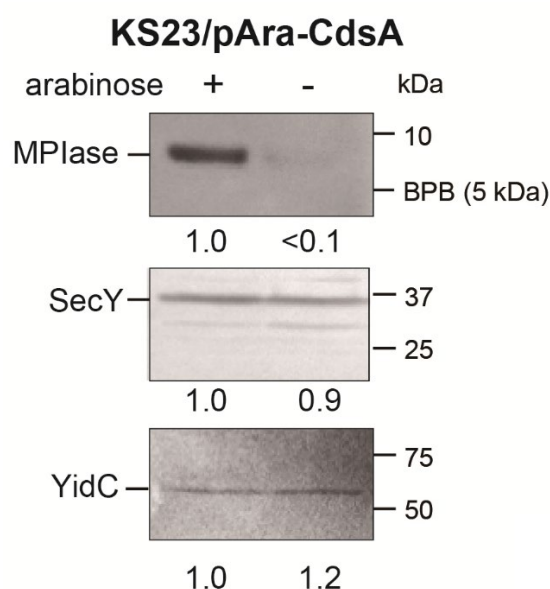


図 24. MPIase 枯渇条件下での SecY、YidC の発現量。

一晚培養した KS23/pAra-CdsA/pTet-Tam41p を LB 培地で 3 回洗浄後、0.2%アラビノース添加・非添加培地に 1:1000 希釈で植菌し、培養した。アラビノース非添加培地で生育の阻害が観察されてから 2 時間後、菌を集菌し、内膜画分を調製した。MPIase、SecY、YidC をウエスタン・ブロッティングにより検出した。各バンドの強度は CS analyzer (ATTO) により定量した

(5) MPIase 様物質が生物種間に保存されている可能性の検証

CdsA のホモログは動植物を含むすべての生物種に広く保存されている。Cds1p は真核生物の小胞体に局在する CdsA ホモログである (図 25)。Cds1p が CdsA 枯渇株の生育を回復できるかどうかを調べるため、酵母 Cds1p (Sc-Cds1p) を *cdsA* 遺伝子欠損株に導入した。*Sc-CDS1* はプラスミド上のテトラサイクリン・プロモーター支配下に配置し、恒常的に発現させた (pTet-Cds1p-Sc)。Sc-Cds1p を発現させても CdsA 枯渇株の生育は回復しなかったが、Tam41p を共発現させることにより生育が回復する様子が観察された (図 26)。これらの結果から、Sc-Cds1p は生育に十分な量の Compound I は生合成できるが、リン脂質生合成に十分な量の CDP-DAG を生合成できていない可能性が示唆された。Sc-Cds1p の発現が MPIase 発現量に及ぼす影響について調べた。その結果、Sc-Cds1p の発現により MPIase 発現量が増加する様子が観察された (図 27)。CdsA 枯渇条件に Sc-Cds1p を発現させたときの MPIase は、CdsA 枯渇条件下と比較するとわずかに増加していたが、CdsA を発現させた場合よりは少なかった (図 27)。Tam41p を共発現させると、MPIase 量が CdsA 発現時と同程度まで回復する様子が観察された (図 27)。パルス・チェイス実験により、pOmpA の膜透過反応を調べた。その結果、EK413 では pOmpA の蓄積は全く観察されなかったのに対し、KS22/pAra-CdsA/pTac-Tam41 をアラビノース添加培地で生育した条件 (CdsA⁺) では、チェイス時間 60 秒まで pOmpA の蓄積が観察された (図 28A、B)。これは、プラスミド pTac-Tam41p から Tam41p がわずかに発現し、そのため、MPIase 発現量が低下したためであると考えられる。実際に、CdsA⁺ の MPIase 発現量は EK413 よりも少なかった (図 28C)。Cds1p/Tam41p を共発現した場合、膜透過反応が CdsA⁺ と同程度まで回復する様子が観察された (図 28A、B)。ヒトの Cds1p (Hs-Cds1p) も Compound I を生合成するのかどうかについて調べた。pTet-Cds1p-Hs を CdsA 欠損株に導入し、CdsA 枯渇株の生育が回復するかどうか調べた。その結果、Hs-Cds1p 単独では、CdsA 枯渇株の生育を回復することができなかったが、Tam41p を共発現させると CdsA 枯渇株の生育が回復する様子が観察

された (図 26)。また、MPIase 発現量を調べた結果、Hs-Cds1p を単独で発現させた場合、MPIase 発現量は CdsA 欠損条件下と比較するとわずかに増加し、Tam41p を共発現させると、MPIase 量は CdsA 発現時と同程度まで回復する様子が観察された (図 27) パルス・チェイス実験により、pOmpA の膜透過反応を調べた結果、Hs-Cds1p/Tam41p を共発現した場合、膜透過反応が回復する様子が観察された (図 28 A、B)。これらの結果から、酵母、ヒトの Cds1p にも Compound I 生合成能が備わっていることが示された。

CdsA	0	-----	0
Sc-Cds1p	1	-----MSDNPEMKPHGTSKEIVESVTDATSKAIDKLEEL	35
Hs-Cds1p	1	MLELRHRGSCPGPREAVSPPHREGAAGGDHETESTSDKETDIDDRYGDLDSDRTSDIPE	60
CdsA	1	-----MLKYRLISAFVLIPVVIAALFLLPPVGFA	29
Sc-Cds1p	36	HKDASESVTPVTKESTAAATKESRKYNFFIRTVVTFVMISGFITLASGHAWCIVLILGCG	95
Hs-Cds1p	61	IPPSSDRTPEILKKALSGLSSRWK-NWWIRGILTLMISLFLIIMGSFMLMLLVLCIQ	119
CdsA	30	IVTLVVCMCLAAWEWCQLSGFTTRSQRVWLAVLCGLLLALMLFLLPEYHRNIHQPLVEISL	89
Sc-Cds1p	96	IATFKECIAVTSASGREKNLPLTKTLNYYLLFTTIYY-LDGKSLFKFQATFYEYPVLNF	154
Hs-Cds1p	120	VKCFHEIITIGYRVYHSYDLPWFRLLSNYFLLCVNYF-FYGETVADYFATFVOREEQLOF	178
CdsA	90	WASLGWWHVALLLVLFYPGSAAIWRNSKTLRLIFGVLTIVPFFWGMLALRAWHYDENHYS	149
Sc-Cds1p	155	IVTNHKEICCYCLYLMGFVLFVCSLRK-GFLKFCFGSLCVTHMVLLVVFQAHLLIKNVLN	213
Hs-Cds1p	179	LIRYHREISFALYLAGFCMFVLSLVK-KHYRLQFYMFAWTHVTLITVTQSHLVICNLFE	237
CdsA	150	GAIWLLVVMILVWGADSGAYMFGKLFQKHKLAPKVSPKKTWQGFHGGATAAVISWGYG-	208
Sc-Cds1p	214	GLFWELLPCGLVIVNDIISAYLCGITFGKTKLI-EISPKKTLBGFLGAWFFALASIIILTR	272
Hs-Cds1p	238	GMIWELVFISSVICNDITAYLFGFFFGRTPLI-KLSPKKTWBGFFHGGFFSTVVFGFIAAY	296
CdsA	209	-----MWANLDVAP-----VT	219
Sc-Cds1p	273	ILSPYTYLTCPEV-DLHTNFFSNLTCELNPVFLPQVYRLPPIFFDKVQINSITVKPIYFH	331
Hs-Cds1p	297	VLSKYQYFVCPVEYRSDVNSFVT-ECEPSELFQLQTYSLPPFLKAVLRQERVSLEYFQIH	355
CdsA	220	LLICSIVAALASVIGDLTESMFKREAGTKDSGHLIPGHGGILDRHDSLTAAVPVFACLLL	279
Sc-Cds1p	332	ALNLATASLFAPIGGFFASGLKRTFKVKDFGHSIPGHGGILDRVDCQFIMGSEANLYYE	391
Hs-Cds1p	356	SIALSTASLIGPIGGFFASGFKRAFKKIDFANTIPGHGGILDRDLCOYLMATFVHVYIT	415
CdsA	280	LVFRTL-----	285
Sc-Cds1p	392	TFISEHRITVDTVLSTILMNLNDKQIIELIDILIRFLSKKGIISAKNFEEKLADIFNVTKK	451
Hs-Cds1p	416	SFI---RGNPNSKVLQQLLVLQPEQQLNIYKTLKTHLIEKGILQPTLKV-----	461
CdsA	285	-----	285
Sc-Cds1p	452	SLTNHS	457
Hs-Cds1p	461	-----	461

	CdsA	Sc-Cds1p	Hs-Cds1p
CdsA	*		
Sc-Cds1p	23.5	*	
Hs-Cds1p	23.5	33.6	*

図 25. CdsA、Sc-Cds1p、および Hs-Cds1p のアミノ酸配列の相同性。

(A) CdsA、Sc-Cds1p、Hs-Cds1p のアミノ酸配列をもとに、GENETYX Global alignment によりアライメントを作製した。黒の背景は 3 つのタンパク質すべてで一致したアミノ酸を示す。灰色の背景は 3 つのタンパク質のうち 2 つで一致したアミノ酸を示す。"-“はギャップを示す。

(B) 各タンパク質の配列のうち一致したアミノ酸の割合 (%) を示す。

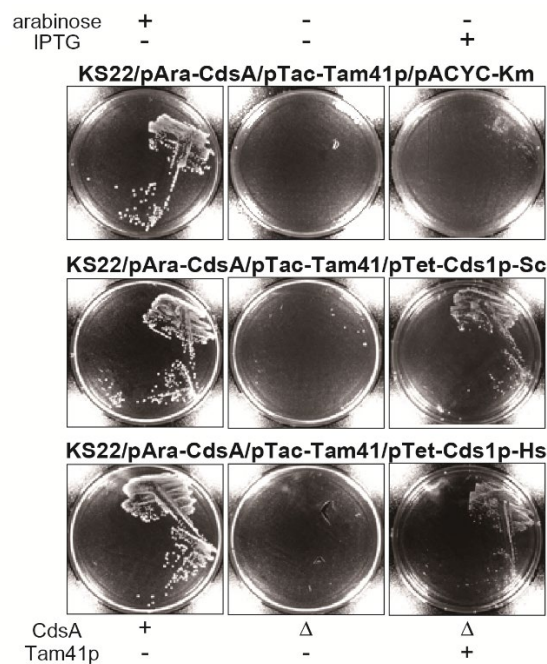


図 26. Cds1p/Tam41p の共発現による CdsA 枯渇株の生育の回復。

各株を 0.2 % アラビノース添加・非添加、もしくは 1 mM IPTG 添加・非添加培地に植菌し、37°Cで 24 時間培養した。

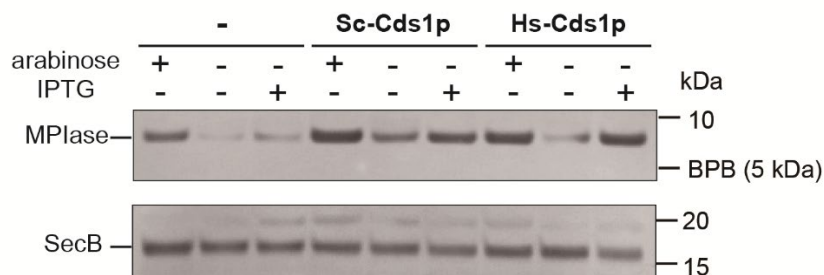


図 27. Cds1p、Tam41p の発現が MPIase 発現量に及ぼす影響。

アラビノース添加培地で一晚培養した KS22/pAra-CdsA/pTac-Tam41p、KS22/pAra-CdsA/pTac-Tam41p/pTet-Sc-Cds1p、および KS22/pAra-CdsA/pTac-Tam41p/pTet-Hs-Cds1p を LB 培地で 3 回洗浄後、0.2% アラビノース添加・非添加の LB 培地に 1:1000 希釈で植菌した。アラビノース非添加培地において生育の阻害が観察された時点で 1 mM IPTG により Tam41p の発現を誘導し、さらに 2 時間培養した。MPIase、SecB の発現をウエスタン・ブロッティングにより検出した。

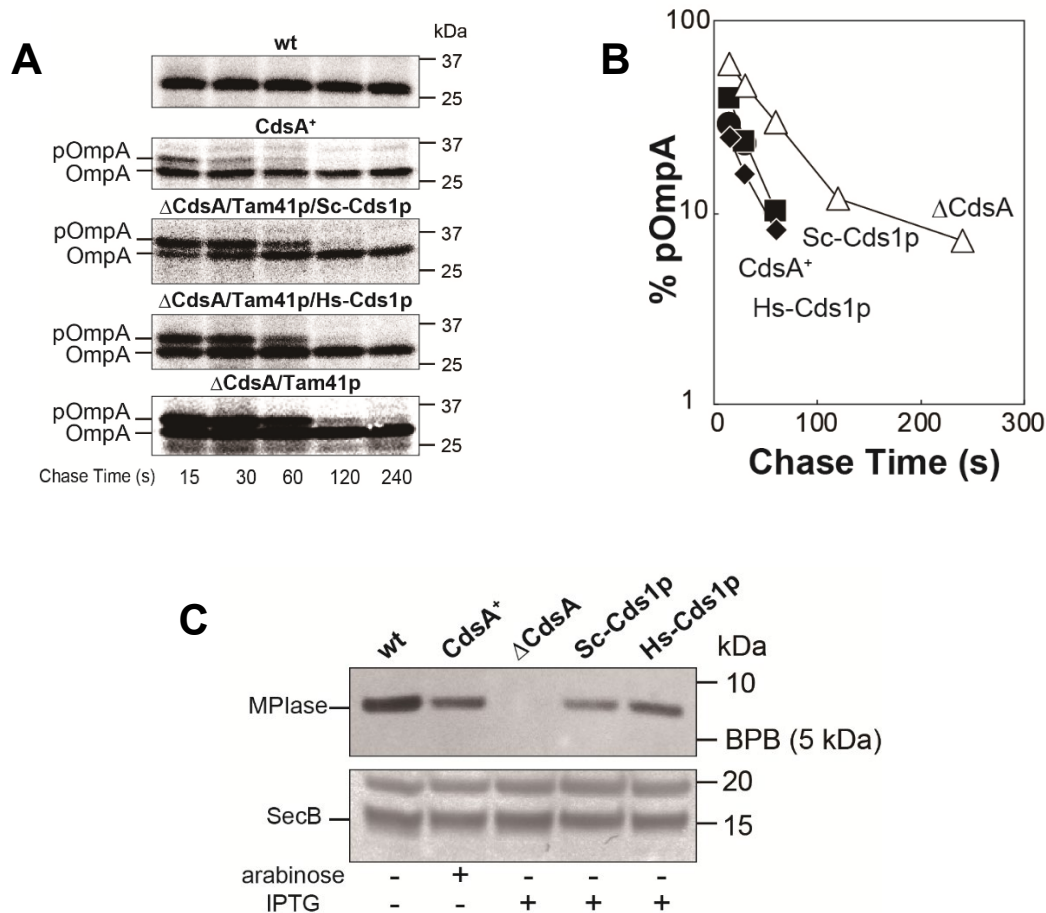


図 28. Cds1p/Tam41p の共発現による CdsA 枯渇株における膜透過反応の回復。

(A) 一晚培養した各株は M9 培地で 3 回洗浄後、0.2% アラビノース添加・非添加の M9 最少培地に 1:1000 希釈で植菌した。KS22/pAra-CdsA/pTac-Tam41p、KS22/pAra-CdsA/pTac-Tam41p/pTet-Sc-Cds1p、および KS22/pAra-CdsA/pTac-Tam41p/pTet-Hs-Cds1p では、アラビノース非添加培地で生育の阻害が観察された時点で、0.25 mM の IPTG を添加し Tam41p の発現を誘導した。さらに、2 時間培養後、材料と方法に示す手順でパルス・チェイス実験を行った。pOmpA、OmpA のバンドはオートラジオグラフィーにより検出し、Image Quant (GE Healthcare) により定量した。wt は EK413 を示す。CdsA⁺ は KS22/pAra-CdsA/pTac-Tam41p の (+) arabinose 条件を示す。

(B) pOmpA と OmpA の総和に対する pOmpA の割合 (縦軸) をチェイス時間 (横軸) に対してプロットした。

(C) 各株を (A) のように培養し、培養液を TCA 処理後、MPIase、SecB をウエスタン・ブロッティングにより検出した。

1-3. 考察

本研究により、糖脂質 MPIase が *in vivo* においてもタンパク質膜挿入反応や菌の生育に必須であり、膜透過反応を著しく促進することが示された。MPIase 生合成酵素として同定された CdsA は、CDP-DAG 生合成酵素として古くから知られていた (49, 50)。本研究では、CdsA がこの機能に加えて、MPIase 生合成中間体である Compound I の生合成反応を触媒することを明らかにした。CdsA の過剰発現により MPIase 発現量は増加し、CdsA の枯渇により MPIase 発現量は大幅に低下した。したがって、CdsA による Compound I 生合成反応は MPIase 生合成反応における律速段階であることが示された。CdsA の枯渇により MPIase 生合成反応のみならず、リン脂質生合成反応も阻害される。そのため、膜構造の破壊による二次的な影響で、膜挿入・膜透過反応が阻害されている可能性も考えられた。Tam41p の発現により、CdsA 枯渇株のリン脂質生合成反応が回復しても、膜挿入や膜透過、菌の生育は回復しなかった。また、Tam41p を発現させない場合でも、CdsA 枯渇株で pOmpA の膜透過反応が進行する様子が観察された。したがって、CdsA が枯渇していても、本研究における実験条件では細胞の膜構造は保持されていると考えられる。さらに、MPIase を枯渇した条件下においても、SecY や YidC の発現量に大幅な変化は観察されなかった。以上のことから、MPIase は生育に必須であり、*in vivo* におけるタンパク質膜挿入や膜透過に重要な役割を果たしていると結論した。

YnbB はアミノ酸配列の相同性から CdsA のホモログであるとされてきたが、その詳細な機能は不明であった。YnbB のホモログはバクテリアにおいて広く保存されている。CdsA は 9 回膜貫通タンパク質であり、YnbB は 10 回膜貫通タンパク質である。CdsA の 5～9 回目の膜貫通部位と YnbB の 6～10 回目の C 末端側の相同性が高いが、N 末端側の相同性は低い。YnbB の過剰発現により CdsA の欠損を相補することはできないが、MPIase の発現量は増加した。筆者は YnbB と Tam41p を共発現することにより、CdsA 欠損株の生育が回復することを明らかにしている (57)。したがって、YnbB は CdsA と同様に Compound

I を生合成するが、生育に十分な量の CDP-DAG を生合成できないと考えられる。これらのことから、CdsA の N 末端は CDP-DAG 生合成反応を促進する機能を果たすと考えられる。当研究室、佐藤により CdsA の N 末端と YnbB の C 末端を連結したキメラタンパク質が構築された。このキメラタンパク質は単独でリン脂質生合成、MPIase 生合成反応を進行させ、CdsA 欠損株の生育を回復した (57)。これらのことから、YnbB は MPIase 生合成反応を補う役割を果たすこと示された。

YidC は Sec/SRP 非依存の膜挿入反応を触媒する "insertase" であると考えられてきた (21)。YidC 欠損株では M13 プロコートや Pf3 コートの膜挿入反応が著しく阻害されること、YidC を組込んだリポソームにおいて膜挿入反応が進行することからこの結論が導かれていた (16, 21, 22)。これに対して、西山らは DAG により自発的膜挿入反応が抑制された条件下においては MPIase が膜挿入反応に必須であることを報告した (23, 26, 27)。これまでに、いくつかの YidC による膜挿入反応の *in vitro* 再構成の成功例が報告されている (17, 21, 22)。Kuhn らのグループでは、DAG により自発的膜挿入反応を抑制した条件下においても M13 プロコートが YidC により膜挿入すると報告した (22)。当研究室、佐々木により界面活性剤ドデシルマルトシドやドデシルホスホコリンは DAG と不溶性の複合体を形成することが明らかにされている (論文投稿中)。これらの界面活性剤は膜タンパク質の可溶化によく使われており、Kuhn らのグループでも YidC の可溶化にドデシルホスホコリンを使用している (22)。YidC をリポソームに再構成する際に DAG とドデシルホスホコリンが不溶性の複合体合成体を形成し、DAG がリポソームに組み込まれていないために自発的膜挿入反応が抑制されていなかったことが、YidC による膜挿入反応が観察された原因であると考えられる。自発的な膜挿入反応を完全に抑制した条件では、F₀c の膜挿入反応には MPIase が必須であり、MPIase による膜挿入反応は YidC により促進される (33)。*in vivo* においてもこのような YidC の機能が膜挿入反応に重要であるため、YidC 欠損株ではタンパク質膜挿入反応の阻害が著しく阻害されると考えられる。これらの *in vitro* 系による解析の結果と一

致して、MPIase を枯渇した条件では M13 プロコートの膜挿入反応は全く進行しなかった。

したがって、*in vivo* においても MPIase が膜挿入反応を開始させ、その後、基質膜タンパク質は YidC へ受け渡され、YidC が膜挿入反応を完了させるというように、MPIase と YidC は協調的に働くことにより、膜挿入反応を触媒していると考えられる。

CdsA のホモログは生物種を超えて広く保存されている。酵母・ヒトの CdsA ホモログである Cds1p が Compound I を生合成することから、真核生物においても Compound I が生合成されと考えられる。Compound I が真核生物におけるタンパク質膜挿入反応に関与する糖脂質の中間体だとすると、MPIase 様物質が真核生物においても保存されている可能性は十分に考えられる。

1-4. 材料と方法

(1) 材料

制限酵素、DNA Ligation Kit <Mighty Mix>、T4 DNA polymerase、PrimeSTAR® HS DNA Polymerase はタカラバイオ株式会社より購入した。オリゴ DNA は Integrate DNA Technologies より購入した。QIAprep Spin Miniprep Kit は QIAGEN より購入した。Wizard® SV Gel PCR Clean-Up System は Promega より購入した。pIVEX2.4b-Nde は Roche より購入した。pET-15b は Novagen より購入した。^[35S]メチオニン-システイン混合溶液、^[14C]パルミチン酸はパーキンエルマージャパンより購入した。Protein A Sepharose CL-4 は GE Healthcare より購入した。TLC プレート (Silica gel 60 F₂₅₄) は EMD Millipore より購入した。GlcNAc-P (*N*-アセチル-D-グルコサミン-1-リン酸) は Sigma より購入した。抗 MPIase 抗体 (27)、抗 SecB 抗体 (58)、抗 SecG 抗体 (39) はウサギを免疫して得られた抗体である。抗 CdsA 抗体 (Glu75~Ser92) (59)、抗 M13 コート抗体 (Ala24~Tyr44) (59)、抗 SecY 抗体 (Ser426~Arg443) (60)、抗 YidC 抗体 (Lys382~Gln402) (59) は合成ペプチドを抗原として、eurofin にて作成された。アルカリフォスファターゼ標識ウサギ抗体 (Reserve AP™

Phosphate Labeled Goat anti-Rabbit IgG (H+L))は Vector Laboratories より購入した。ウェスタン・ブロッティング発色試薬 NBT/BCIP はプロメガより購入した。アラビノースは Sigma より購入した。IPTG (イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド) は Wako より購入した。PMSF (フッ化フェニルメチルスルホニル) はナカライテスク株式会社より購入した。1 章で使用した大腸菌株を Table 1、プラスミドを Table 2、プライマーを Table 3 に示した。

Table 1. 大腸菌株

Strains	Relevant genotype	Ref.
JF618	F ⁻ <i>thr-1 araC14 leuB6</i> (Am) Δ (<i>gpt-proA</i>)62 <i>lacY1 glnX44</i> (AS) <i>galK2</i> (Oc) λ - <i>hisG4</i> (Oc) <i>cdd-6 pyrG51 rpsL31</i> (strR) <i>xylA5 mtl-1 pyrE60 argE3</i> (Oc) <i>thiE1</i>	(47), CGSC
GN80	F ⁻ <i>thr-1 araC14 cdsA8 lacY1 tsx-78</i> Δ (<i>galK-attLAM</i>) 99 <i>eda-50 hisG4</i> (Oc) <i>rfbC1 rpsL136</i> (strR) <i>xylA5 mtl-1 thiE1</i>	(51), CGSC
RS80	GN80 Δ <i>cdh</i>	This study
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺), e14 ⁻ (<i>mcrA</i>), <i>supE44, relA1, \Delta(<i>lac-proAB</i>)/F['] [<i>traD36, proAB</i>⁺, <i>lacA</i>⁺, <i>lacZ</i> Δ M15]</i>	(61)
FS1576	C600 <i>recD1009</i>	(62)
EK413	MC4100 <i>ara</i> ⁺	(39)
JW1406	BW25113 Δ <i>ynbB::kan</i>	(54), Keio collection
EK1406	EK413 Δ <i>ynbB::kan</i>	This study
KS21	EK413 Δ <i>ynbB</i>	This study
KS22	EK413 Δ <i>cdsA::cat</i>	This study
KS23	EK413 Δ <i>cdsA::cat \Delta</i> <i>ynbB</i>	This study
BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>lon-11, \Delta(<i>ompT-nfrA</i>)885, Δ(<i>galM-ybhJ</i>)884, λ DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>] D46 [<i>mal</i>⁺]K- 12(λ S) <i>hsdS10</i></i>	(63)
BL101	BL21 (DE3) Δ <i>ynbB::kan</i>	This study
KS42	BL21 (DE3) Δ <i>ynbB</i>	This study
KS44	BL21 (DE3) Δ <i>cdsA::cat</i>	This study
KS46	BL21 (DE3) Δ <i>cdsA::cat, \Delta</i> <i>ynbB::kan</i>	This study

Table 2. プラスミド

Plasmid	Relevant description	Ref.
pMS119-PC	Gene for M13 procoat is cloned under the control of the <i>tac</i> promoter, ampicillin resistant	(64)
pIVEX2.4b-Nde	Cloning vector containing the T7 promoter, ampicillin resistant	Roche
pET-15b	Cloning vector containing the T7 promoter, ampicillin resistant	Novagen
pT7-CdsA	<i>cdsA</i> was cloned into pET-15b under the control of the T7 promoter	This study
pT7-YnbB	<i>ynbB</i> was cloned into pET-15b under the control of the T7 promoter	This study
pTac-CdsA8	<i>cdsA8</i> was cloned into pUSI2 under the control of <i>tac</i> promoter	This study
pCP20	<i>flp</i> used to remove the <i>kan</i> cassette in the Keio clones, temperature-sensitive replicon	(55)
pUC19	Cloning vector, ampicillin resistant	(61)
pUC19 (Δ NdeI-EcoRI)	Derivative of pUC19 with deletion between NdeI and EcoRI sites	This study
pCD1	<i>cdsA</i> flanked by 2.5 kbp upstream and 2.2 kbp downstream region was cloned into pUC19 (Δ NdeI-EcoRI)	This study
pCD2	Open reading frame of <i>cdsA</i> in pCD1 was replaced with that of <i>cat</i>	This study
pUSI2	Cloning vector containing <i>tac</i> promoter, ampicillin resistant	(65)
pTac-CdsA	<i>cdsA</i> was cloned into pUSI2 under the control of <i>tac</i> promoter	This study
pKQ2	Cloning vector containing arabinose regulon, ampicillin resistant	(66)
pKQ2-CdsA	<i>cdsA</i> was cloned into pKQ2 under the control of arabinose promoter	This study
pHP45 Ω	Cloning vector, spectinomycin resistant	(67)
pAra-CdsA	<i>bla</i> on pKQ2-CdsA was replaced with <i>spc</i>	This study
RKP153	<i>TAM41</i> without mitochondrial targeting signal is cloned under the control of the T7 promoter,	(56)

pACYC184	ampicillin resistant Cloning vector, chloramphenicol resistant, tetracycline resistant	(68)
pUC4K	Cloning vector, kanamycin resistant	(69)
pACYC-Km	<i>cat</i> on pACYC184 was replaced with <i>kan</i>	This study
pTet-Tam41p	<i>TAM41</i> without mitochondrial targeting signal was cloned into pACYC-Km under the control of the <i>tet</i> promoter	This study
pTet-CdsA	<i>cdsA</i> was cloned into pACYC-Km under the control of the <i>tet</i> promoter	This study
pTac-Tam41p	<i>TAM41</i> without mitochondrial targeting signal was cloned into pUSI2 under the control of <i>tac</i> promoter	This study
pTac-Cds1p-Sc	<i>Sc-CDS1</i> was cloned into pUSI2 under the <i>tac</i> promoter	This study
pTet-Cds1p-Sc	<i>Sc-CDS1</i> was cloned into pUSI2 under the <i>tet</i> promoter	This study
pUC118	Cloning vector, ampicillin resistant	(70)
pUC118-CDS1 (1-945)	DNA fragment corresponding to 1-945 bp of <i>Hs-</i> <i>CDS1</i> was cloned into pUC118	This study
pUC118-CDS1 (946-1386)	DNA fragment corresponding to 946-1386 bp of <i>Hs-CDS1</i> was cloned into pUC118	This study
pUC118-CDS1-Hs	<i>Hs-CDS1</i> was cloned into pUC118	This study
pTac-Cds1p-Hs	<i>Hs-CDS1</i> was cloned into pUSI2 under the control of the <i>tac</i> promoter	This study
pTet-Cds1p-Hs	<i>Hs-CDS1</i> was cloned into pUSI2 under the control of the <i>tet</i> promoter	This study

Table 3. プライマー

Name	Sequence (5'→3')	Purpose
cdsA-5' Nde	ctagtatgcatatgctgaagtatcgctgat	Construction of pT7-CdsA
cdsA-3' Sal	aaaagtcgacttaaagcgtcctgaataccagtaacaac	Construction of pT7-CdsA
ynbB-5' Nde	ctagtatgcatatgctggaaaaatctctggc	Construction of pT7-YnbB

ynbB-3´ Sal	aaaagtcgacttagtaacagcagtagcgataaaataaaaaa	Construction of pT7-YnbB
pKQ2 up comp	aaaaaagcttatacctacagcgtgagctatgagaaagcgc	Construction of pAra-CdsA
pKQ2 down	aaaagtcgactaggcgtatcacgagccctttcgtcttca	Construction of pAra-CdsA
spc-5´	aaaagtcgacgcttgtaaaccgttttgtaaaaaattttt	Construction of pAra-CdsA
spc-3´ comp	tgattgagcaagctttatgcttgtaaaccgttttgtaaa	Construction of pAra-CdsA
cdsA-5´	ttttgatcctaggaggtttaatttatgctgaagtatcgctgat atctgcttttg	Construction of pKQ2-CdsA
cdsA-3´ comp	aaaagtcgacttaaagcgtcctgaataccagtaacaac	Construction of pKQ2-CdsA
5.4 kbp-5´	gccgccgctgacggaagaac	Construction of pCD1
5.4 kbp-3´ comp	tgccccggcaaggttgccgct	Construction of pCD1
pCD1 up	aaaagcagatatcaggcgatacttcagcatatgcgacccccatc aggctg	Construction of pCD2
pCD1 down	gttggttactagtattcaggggcgcctaacggaaggtaatatgctg agttt	Construction of pCD2
cat-5´	acttaagggttttctacatatggagaaaaaatcactgg	Construction of pCD2
cat-3´ comp	tgaagcttacgttggttcattaggcgccgcctgccactcatcgc agta	Construction of pCD2
pACYC up comp	aaaaagatctgaaaatctcgataactc	Construction of pACYC-Km
pACYC down	aaaagaattcttttaaggcagttattggtgccc	Construction of pACYC-Km
kan-5´	aaaagatctaggaggtttaatttatgagccatattcaacgggaa ac	Construction of pACYC-Km
kan-3´ comp	ggggaattcaaattagaaaaactcatcgagcatca	Construction of pACYC-Km
TAM41-5´	aaaggatcctaggaggtttaatttatgagaagttccatagatga tgctggcatta	Construction of pTac-Tam41p

TAM41-3	comp	aaaaagtcgacttttagcttctcctcatcgatttagtttttggcc caag	Construction of pTac-Tam41p
Sc-CDS1-5		aaaaggatcctaggaggtttaatttatgtctgacaaccctgaga tgaaaccacatgg	Construction of pTet-Cds1p
Sc-CDS1-3	comp	aaaaagatctggtaccttttcaagagtgttggtcaatgatttctt ggtcaca	Construction of pTet-Cds1p

(2) 大腸菌変株の構築破壊株の構築

cdsA 遺伝子欠損株を以下の手順により構築した (図 29)。pUS19 を NdeI、EcoRI 処理後、T4 DNA ポリメラーゼにより平滑末端化し、自己環状化した (Δ NdeI-EcoRI pUC119)。*cdsA* 遺伝子の開始コドン上流 2.5 kb から終始コドン下流 2.2 kb までの 5.8 kb の DNA 断片を 5.4 kbp-5'/5.4 kbp-3'comp プライマーを用いて PCR により増幅した。増幅した DNA 断片を Δ NdeI-EcoRI pUC119 の BglII/HindIII 部位に連結した (pCD1)。pCD1 の *cdsA* 遺伝子の ORF を除いた領域を pCD1 up/pCD1 down プライマーを用いて PCR で増幅した。このとき、5'末端に NdeI 部位、3'末端に BbeI 部位を付加した。この PCR 産物を NdeI/BbeI 制限酵素処理後、NdeI/BbeI 部位に cat-5'/cat-3'comp プライマーを用いて PCR により増幅した *cat* 遺伝子を連結した (pCD2)。pCD2 を SacI/HindIII 処理して得られた、*cdsA* 上流 2.5kb-cat-*cdsA* 下流 2.2kb を含む約 5.4kb の DNA 断片を pAra-CdsA を保持する FS1576 株に導入し、相同組換えにより *cdsA* 遺伝子の ORF を *cat* 遺伝子の ORF に置換した。クロラムフェニコール耐性のコロニーを選抜し、*cdsA* 遺伝子の欠損を PCR により確認した。 Δ *cdsA::cat* 部位は P1 トランスダクションにより EK413、BL21 (DE3) 株に導入した (KS22、KS44)。 Δ *ynbB::kan* 株は Keio コレクション (17) から P1 トランスダクションにより EK413 株、BL21 (DE3) 株に導入した (EK1406、BL101)。KS21、BL101 の *kan* 遺伝子カセットは FRT システム (54, 55) により削除した (KS21、KS42)。 Δ *cdsA::cat* を KS21、KS44 に P1 トランスダクションにより導入し、KS23、KS46 を構築した。

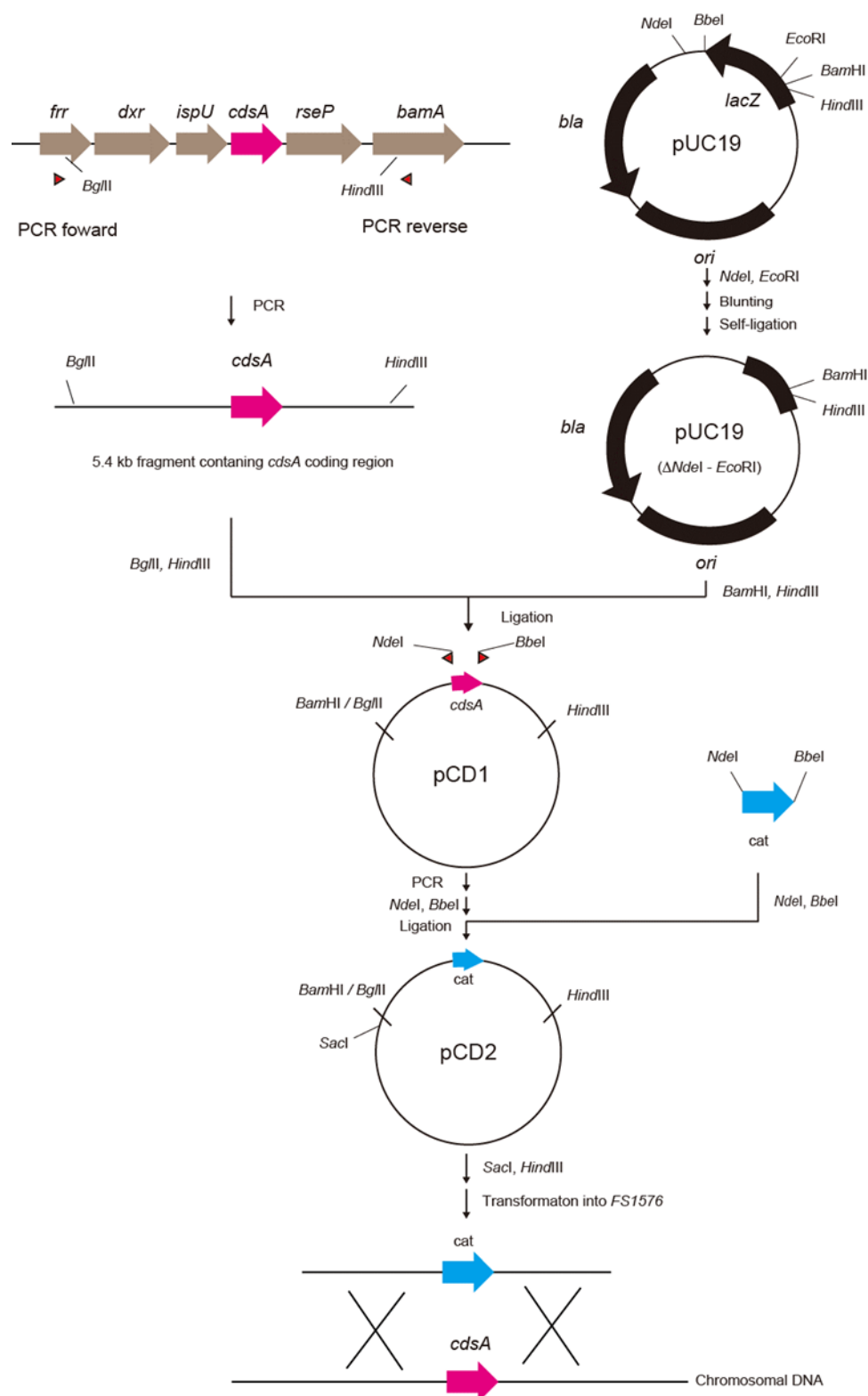


図 29. *cdsA* 遺伝子欠損株の構築。

cdsA 遺伝子欠損株 (*cdsA::cat*) の構築のスキームを示した。詳細は材料と方法に示した。

(3) プラスミドの構築

pT7-CdsA、pT7-YnbB は以下の手順で構築した。JM109 の染色体 DNA を鋳型として *cdsA* 遺伝子、*ynbB* 遺伝子を *cdsA*-5'Nde/*cdsA*-3'Sal プライマー、*ynbB*-5'Nde/*ynbB*-3'Sal プライマーを用いて PCR により増幅した。PCR で増幅した DNA 断片を NdeI/SalI により制限酵素処理後、pIVEX2.4b-Nde の NdeI/SalI 部位に連結した。*cdsA*、*ynbB* を NdeI/XhoI 処理により切り出し、pET-15b の NdeI/XhoI 部位に連結した (pT7-CdsA、pT7-YnbB)。

pTac-CdsA8 は以下の手順により構築した。GN80 の染色体 DNA を鋳型として *cdsA* 遺伝子を *cdsA*-5'/*cdsA*-3'comp プライマーを用いて PCR により増幅した。BamHI/SalI により制限酵素処理後、pUSI2 の BamHI/SalI 部位に連結した (pTac-CdsA8)。

pAra-CdsA は以下の手順で構築した。*cdsA* 遺伝子を *cdsA*-5'/*cdsA*-3'comp プライマーを用いて PCR により増幅した。BamHI/SalI により制限酵素処理後、pUSI2 の BamHI/SalI 部位に連結した (pTac-CdsA)。pTac-CdsA から *cdsA* 遺伝子を BamHI/BglII で切り出し、pKQ2 の BglII 部位に連結した (pKQ2-CdsA)。pKQ2-CdsA を鋳型として、pKQ2 up comp/pKQ2 down プライマーにより *bla* 遺伝子以外の領域を PCR により増幅した。pHP45Ωを鋳型として *spc*-5'/*spc*-3' comp プライマーを用いて PCR により *spc* 遺伝子を増幅した。各 PCR 断片を連結し、pAra-CdsA を構築した。

pTac-Tam41p、pTet-Tam41p は以下の手順により構築した。*TAM41* 遺伝子を RKP153 を鋳型として、*TAM41*-5'/*TAM41*-3' comp プライマー用いて PCR により増幅した。増幅した PCR 断片を BamHI/SalI 制限酵素処理後、pUSI2 の BamHI/SalI 部位に連結した (pTac-Tam41p)。pACYC-Km は pACYC184 の *cat* 遺伝子を *kan* 遺伝子に置換して構築した。*kan* 遺伝子は pUC4K を鋳型として *kan*-5'/*kan*-3' comp プライマーを用いて PCR により増幅した。pACYC184 を鋳型として *cat* 遺伝子を除いた領域を pACYC up comp/pACYC down プライマーを用いて増幅した。各 PCR 断片を BglII/EcoRI 制限酵素処理後、連結し、pACYC-Km を構築した。pTac-Tam41p から *TAM41* 遺伝子を BamHI/SalI 処理により切

り出し、pACYC-Km の BamHI/SalI 部位に連結した (pTet-Tam41p)。

pTet-CdsA、pTet-CdsA8 は以下の手順により構築した。*cdsA* 遺伝子、*cdsA8* 遺伝子を BamHI/SalI 制限酵素処理により切り出し、pACYC-Km の BamHI/SalI 部位に連結した。

pTet-Cds1p-Sc は以下の手順で構築した。*S. cerevisiae* の *CDS1* 遺伝子 (*Sc-CDS1*) は Sc-CDS1-5'/Sc-CDS1-3' comp プライマーを用いて PCR により増幅した。増幅した DNA 断片を BamHI/SmaI 制限酵素処理後、pUSI2 の BamHI/SmaI 部位に連結した (pTac-Cds1p-Sc)。pTac-Cds1p-Sc から *Sc-CDS1* DNA 断片を BamHI/SalI 制限酵素処理により切り出し、pACYC-Km の BamHI/SalI 部位に連結した (pTet-Cds1p-Sc)。

pTet-Cds1p-Hs は以下の手順で構築した。5'末端に BamHI 部位、3'末端に HpaI-KpnI 部位を付加し、化学合成された *Hs-CDS1* DNA 断片 (1-945bp) (図 30 上) を BamHI/KpnI 制限酵素処理後、pUC118 の BamHI/KpnI 部位に連結した (pUC118-CDS1 (1-945))。5'末端に BamHI-HpaI 部位、3'末端に KpnI-BamHI 部位を付加し、化学合成した *Hs-CDS1* DNA 断片 (946-1386 bp) (図 30 下) は BamHI/KpnI 制限酵素処理後、pUC118 の BamHI/KpnI 部位に連結した (pUC118-CDS1 (946-1386))。pUC118-CDS1 (946-1386) から HpaI/KpnI 処理により *Hs-CDS1* DNA 断片 (946-1386 bp) を切り出し、pUC118-CDS1 (1-945) の HpaI/KpnI 部位に連結し、2 つの *Hs-CDS1* DNA 断片を連結した (pUC118-CDS1-Hs)。BamHI/KpnI 制限酵素処理により pUC118-CDS1-Hs から Hs-CDS1 DNA 断片を切り出し、pUSI2 の BamHI/KpnI 部位に連結した (pTac-Cds1p-Hs)。BamHI/SalI 制限酵素処理により pTac-Cds1p-Hs から切り出した Hs-CDS1 DNA 断片を pACYC-Km の BamHI/SalI 部位に連結した (pTet-Cds1p-Hs)。

Hs-CDS1 (1-945 bp)

aaaaggatcc aggaggttta aattt**ATG**tt ggagctgcgc caccgtggca gctgcccggg
cccgcgcgaa gcggtgtcgc cgccgcaccg cgagggcgag gcggccggcg gcgaccacga
aaccgagagc accagcgaca aagaaaccga tattgatgac cgctatggcg atttggaatag
ccgtaccgat agcgatatctc cggaatttcc gccgagctca gatcgacccc gtgagattct
caaaaaagct ctgagcggtt taagctcacg ttggaaaaac tgggtggattc gtggcattct
caccctgacc atgatctcgt tgtttttcct gatcatctat atgggcagct tcatgctgat
gcttcttggt ctgggcattcc aagtgaatg cttccatgaa attatcacca ttggttatag
agtctatcat agctatgatc tgccgtgggt tcgcaccctg agttgggtact ttctgttggtg
tgtaaaactac tttttctatg gcgagaccgt agctgattat tttgctacct ttgttcaacg
cgaagaacaa cttcagttcc tcattcgcta ccatcgtttt atatcatttg ccctctatct
ggcaggtttc tgcatgtttg tactgagttt ggtgaagaaa cattatcgtc tgcagtttta
tatgttcgca tggacccatg tcaccttact gattaccgtc acccagtcac acctgtcat
ccaaaatctg tttgaaggca tgatttggtt ccttgttccg atttcaagtg ttatctgcaa
tgacattacc gcttaccttt ttggcttttt ttttgccgc actccgttaa ttaagttgag
cccgaaaaag acctgggaag gcttcattgg tggtttcttt agcaccgttg tgtttggctt
cattgctgcc tatgtgttaa gcaaatacca gtactttgtc tgcccgggtg aataccgtag
tgatgttaac ggtaccaaaa

Hs-CDS1 (946 - 1386 bp)

aaaaggatcc gttaacagct tcgtgaccga atgtgagccg tcagaacttt tccagcttca
gacctactca cttccgccgt ttctgaaggc agtcttgccg caggaacgtg tgagcttgta
cccgttccag atccacagca ttgcaactgc aacctttgca agcttaattg gcccgtttgg
cggcttcttt gctagtggct tcaaacgcgc cttcaaaatc aaggattttg caaataccat
tccgggcat ggtgggatta tggaccgttt tgattgtcag tatttgatgg caacctttgt
acatgtgtac atcaccagtt ttattcgcgg ccggaatccg agcaaagtgc tacagcagtt
gttggtgctt caaccggaac agcagttaaa tatatataaa accctgaaga cccatctcat
tgagaaagga atcctacaac cgaccttgaa ggta**TAA**aga tctggtacca aa

図 30. 化学合成した *Hs-CDS1* の配列。

Hs-CDS1 (1-945 bp) (上)、*Hs-CDS1* (946-1386) (下)の DNA 配列を示す。下線は制限酵素認識部位を示す。開始コドン、終始コドンは大文字で示した。

(4) CdsA の枯渇

KS22 株、KS23 株、BL44 株、BL46 株は 0.002%アラビノースを含む LB 培地で一晩培養した。培養液を LB 培地で 3 回洗浄後、0.2%アラビノース添加培地、非添加培地にそれぞれ 1/1000 希釈で植菌し、37°Cで培養した。アラビノース非添加培地において生育の阻害が観察されてから 2 時間後に、各試料を調製した。

(5) パルス・チェイス実験、免疫沈降

KS22、KS23 は 0.1 mM のメチオニン、システインを除く 18 種類のアミノ酸、0.1% Yeast extract、0.002%アラビノースを含む M9 最少培地で一晩培養した。菌を集菌後、M9 最少培地で 3 回洗浄した。その後、0.2%アラビノース添加・非添加の M9 最少培地に 1/1000 希釈で植菌し、37°Cで培養した。アラビノース非添加培地で菌の生育の阻害が観察されてから 2 時間後、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン-システインで 30 秒標識した。標識は 12 mM の非放射性メチオニン、システインを加えて終了した。各チェイス時間で 500 μL の培養液を分取し、終濃度 10%になるように TCA を加えた。氷上で 30 分静置後、16,000 $\times g$ で 5 分間遠心した。遠心して得られた沈殿をアセトン、ジエチルエーテルで洗浄した。沈殿を乾燥後、50 μL の 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% SDS, 1 mM EDTA に懸濁し、95°Cで 3 分間加熱した。1 mL の 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF を加えた後、16,000 $\times g$ で 5 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清に 2 μL の抗 M13 コート抗体、もしくは抗 OmpA 抗体を加え、4°Cで一晩静置した。20 μL の 50% (w/v) Protein A sepharose を加え、4°Cで 1 時間攪拌した。3,000 $\times g$ で 30 秒遠心し、樹脂を回収後、500 μL の 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 により樹脂を洗浄した。遠心により、樹脂を回収後、500 μL の 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100 で樹脂を洗浄した。3,000 $\times g$ で 5 分間遠心し樹脂を回収後、20 μL の SDS-PAGE サンプルバッファーを加え、M13 (プロ) コートあるいは(p)OmpA を溶出した。放射活性のあるバンドは、

Phosphoimager (GE Healthcare) を用いて検出し、Image Quant (GE Healthcare) により定量した。パルス・チェイス実験は 2~3 回繰り返す、その中の 1 つを図に掲載した。

(6) リン脂質の抽出

500 μ L の培養液を 8,000 x g で 5 分の遠心により集菌後、菌を 50 μ L の滅菌水で懸濁した。細胞懸濁液に 60 μ L のクロロホルム、120 μ L のエタノールを加えた。氷上で 10 分間静置した後、さらに 60 μ L のクロロホルム、120 μ L の水を加え、16,000 x g で 5 分間遠心した。有機層を回収し、リン脂質の試料とした。抽出したリン脂質は TLC でクロロホルム : メタノール : 水 (9 : 5 : 1) の展開溶媒で展開した。放射性ラベルされたリン脂質は、Phosphoimager (GE Healthcare) を用いて検出し、Image Quant (GE Healthcare) により定量した。非放射性のリン脂質はアニスアルデヒド/硫酸により検出し、CS analyzer (ATTO) により定量した。

(7) Compound I の試験管内生合成

2 mg/mL INV、 $[^{14}\text{C}]$ PA (4 μ M; ~23 kBq/mL)、2 mM CTP、5 mM MgSO_4 、90 mM KCl、1.5% octyl glucoside、30 mM リン酸カリウム (pH 8.5)、2 mM GlcNAc-P を混合し、37°C で保温した。反応溶液 20 μ L から 5 μ L を TLC プレート上にスポットし、反応を終了した。

(10) その他

M13 (プロ) コートは 6 M 尿素を含む 12.5% acrylamide-0.27% *N,N'*-bismethyleneacrylamide ゲルを用いて SDS-PAGE により解析した (23)。MPIase、SecG、SecB は 12.5% acrylamide-0.27% *N,N'*-bismethyleneacrylamide ゲルを用いて SDS-PAGE により解析した (71)。CdsA は 13.5% acrylamide-0.33% *N,N'*-bismethyleneacrylamide ゲルを用いて SDS-PAGE により解析した (71)。

ルを用いて SDS-PAGE により解析した (72)。SecY は 15% acrylamide-0.33% *N,N'*-bismethyleneacrylamide ゲルを用いて SDS-PAGE により解析した (72)。(p)OmpA は 10% acrylamide-0.13% *N,N'*-bismethyleneacrylamide ゲルを用いて SDS-PAGE により解析した (72)。ウエスタン・ブロットのバンドは CS analyzer (ATTO) により定量した。タンパク質濃度は BSA (ウシ血清アルブミン) を標準としてローリー法により定量した (73)。

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である

2-1. 導入

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 (74)。これまでに多くの Sec 遺伝子変異株や YidC 遺伝子変異株が単離されているが、その多くは低温感受性を示す。特に、タンパク質膜透過反応は野生株であっても低温下において膜透過反応の阻害が観察される。低温下では膜の流動性が低下するため、タンパク質膜挿入・膜透過反応の効率が低下するためであると考えられているものの、膜挿入・膜透過反応のどのステップが低温感受性を示すのか、また、どのようにして低温下における膜挿入・膜透過反応の阻害を克服すべく対処しているのかについては全く不明である。

第1章において、糖脂質 MPIase が *in vivo* においてもタンパク質膜挿入反応に必須であることを明らかにした。MPIase 枯渇株では膜透過反応の著しい阻害が観察されたため、*in vivo* においても膜透過反応は MPIase により著しく促進されることが示された。この理由は、MPIase により SecYEG の二量体構造が変化するためである (42)。MPIase と相互作用した SecYEG の二量体構造は、SecE を接触面とした”back-to-back”構造から、SecG が接触面近傍に位置する”side-by-side”構造となる (42) (図5)。”side-by-side”構造の SecYEG 膜透過活性は、”back-to-back”構造の膜透過活性よりも約 10 倍高い (42)。”side-by-side”構造の SecYEG でのみ、SecA の膜挿入－脱膜挿入に共役した SecG 膜反転サイクル (図6) が可能となる (42)。そのため、MPIase は SecG の膜反転に必須である。 $\Delta secG$ 株の膜透過反応は低温感受性を示すことから、SecG の機能は低温下における膜透過反応に重要である (66)。

低温下において SecYEG や YidC の発現量は変化しないことが知られている (66)。一方、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。第2章では、低温下での MPIase の増加がタンパク質膜挿入・膜透過反応に及ぼす影響を解析した。

2-2. 結果

(1) 培養温度による MPIase 発現量の変化

SecYEG や YidC の発現量は、菌の生育温度によって変化しないことが知られている (66)。

MPIase の発現量が菌の培養温度によって変化するかどうかを調べた。野生株 (EK413) を 20°C (低温)、37°C (至適温度)、42°C (高温) で培養し、各培養温度における MPIase 発現量を調べた。その結果、20°C で培養した菌の MPIase 発現量が著しく増加する様子が観察された。また、42°C で培養した菌の MPIase 量は 37°C と比較してわずかに減少していた (図 31)。各培養温度での SecY 発現量には変化が見られなかった (図 31)。SecA の発現量は膜透過反応の阻害を感知して増加することが知られている (75)。この報告と合致して、膜透過反応がわずかに阻害される 20°C では、SecA の発現量はわずかに増加していた (図 31)。

続いて、菌を 20°C から 48°C までの各温度で培養し、MPIase 発現量を調べた。その結果、培養温度の低下に伴って MPIase 量が増加する様子が観察された (図 32A、B)。MPIase の増加は 25°C で飽和した (図 32A、B)。15°C における MPIase 発現量は 48°C と比較して約 7 倍程度増加していた (図 32B)。これらの結果から、MPIase 発現量は低温下において特異的に増加することが示された。高温下では MPIase 発現量が低下する様子が観察された (図 31、32)。高温下では、過剰な MPIase は不要であり、これを分解することにより高温環境に適応していると予想された。15°C で培養した菌を 42°C に移し、MPIase 発現量の変化を経時的に調べた。その結果、高温シフト後、時間の経過に伴って、MPIase 発現量が減少する様子が観察された (図 33A、B)。菌の生育は高温シフト後、30 分までは生育せず、60 分において生育し始めた。そのため、高温下では MPIase は分解され、発現量が低下していると考えられる。これらの結果から、外部環境の温度に対応して、MPIase 発現量は厳密に制御されていることが示された。

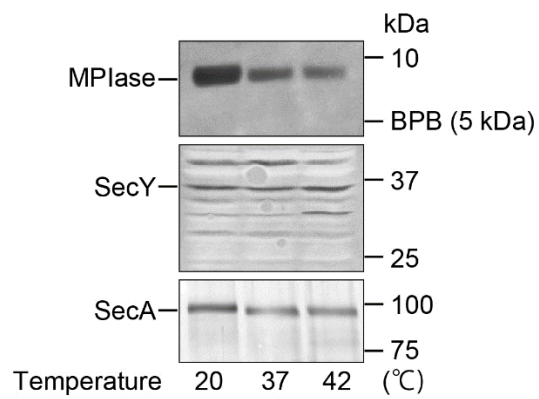


図 31. 低温下における MPIase 発現量の増加。

一晚培養した EK413 を 1:100 希釈で LB 培地に植菌した。37°C で OD₆₆₀ ~0.4 まで培養後、培養液を 20°C、42°C に移し、さらに 3 時間培養した。MPIase、SecY、SecA をウエスタン・ブロッティングにより検出した。

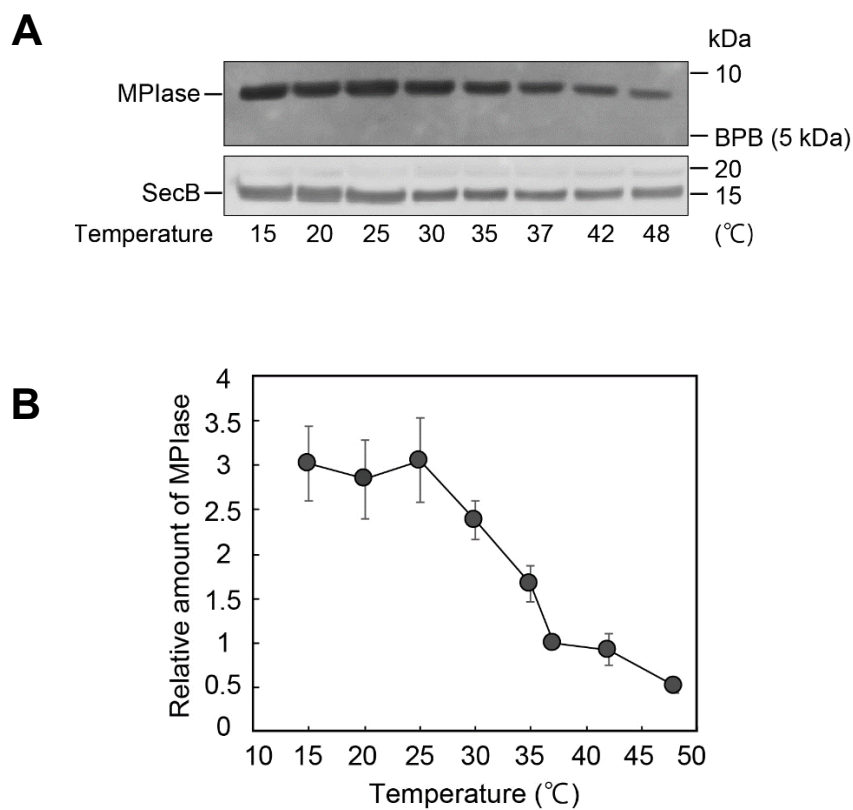


図 32. 培養温度の変化による MPIase 発現量の変化。

(A) 一晚培養した EK413 を 1:100 希釈で LB 培地に植菌した。37°C で OD₆₆₀ ~0.4 まで培養後、培養液を図に示す各温度に移し、さらに 3 時間培養した。MPIase、SecB をウエスタン・ブロッティングにより検出した。

(B) 各温度における MPIase のバンドの強度を CS analyzer (ATTO) により定量した。37°C にの MPIase 量を "1.0" として、各温度における MPIase 量の相対値を求めた。独立した 3 回の実験より SD を求め、エラーバーで示した。

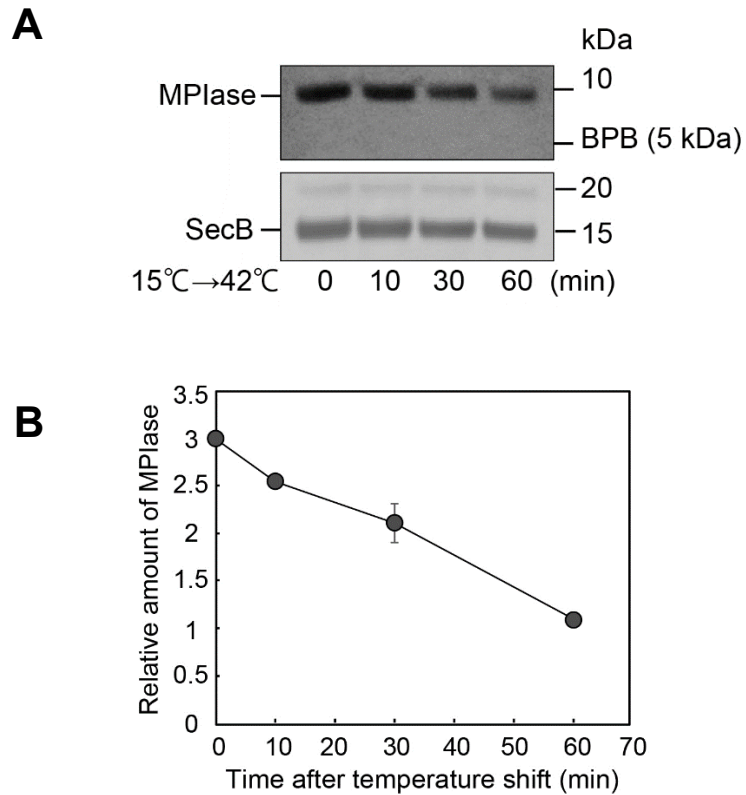


図 33. 低温下で培養した後、高温下に移行したときの MPIase 発現量の低下。

(A) 一晚培養した EK413 を 1:100 希釈で LB 培地に植菌した。37°C で OD₆₆₀ ~0.4 まで培養後、培養液を 15°C に移し、さらに 3 時間培養した。その後、菌を 42°C に移した。高温シフト後、各時間における MPIase、SecB をウエスタン・ブロッティングにより検出した。

(B) (A) の MPIase のバンドの強度を CS analyzer (ATTO) により定量した。0 分における MPIase を "3.0" とし、高温シフト後の各時間における MPIase の相対量を示した。独立した 3 回の実験より SD を求め、エラーバーで示した。

(2) 低温下における MPIase 発現量の増加と CdsA、YnbB 発現量との関係

CdsA は MPIase 生合成反応における律速酵素である。CdsA とそのホモログである YnbB が低温下における MPIase 発現量の増加に関与している可能性が考えられた。CdsA、YnbB が低温下での MPIase の増加に関与するかどうかを調べるために、KS21 ($\Delta ynbB$)、KS22 ($\Delta cdsA$)/pAra-CdsA、および、KS23 ($\Delta ynbB \Delta cdsA$)/pAra-CdsA を用いて、低温下で MPIase 発現量が増加するかどうかを調べた。CdsA は菌の生育に必須であるので、KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA では、培地にアラビノースを加え、プラスミド上のアラビノース・プロモーターから CdsA を十分に発現誘導した条件 (0.2%アラビノース添加) で培養した。各株を 37°C、20°C で培養し、各温度での MPIase 発現量を調べた。その結果、KS21、KS22/pAra-CdsA では野生株と同様に低温下での MPIase 量の増加が観察された (図 34A、B)。一方、KS23/pAra-CdsA では低温下での MPIase 量の増加が著しく抑制される様子が観察された (図 34A、B)。これらの結果から、染色体上の *cdsA* 遺伝子および *ynbB* 遺伝子が低温下での MPIase 増加に関与することが示された。Icho らの報告によると、染色体上の *cdsA* 遺伝子周辺の約 5.8 kb の DNA 断片をクローニングしたプラスミドを導入した大腸菌では、低温下において CdsA の発現量が増加する (49)。EK413 を 37°C、20°C で培養し、低温下で CdsA の発現量が増加するかどうかを調べた。その結果、20°C において CdsA の発現量の増加が観察された (図 35)。一方、SecY の発現量に変化は見られなかった (図 35)。これらの結果から、低温下における MPIase の増加は CdsA、あるいは YnbB の増加によってもたらされることが示された。

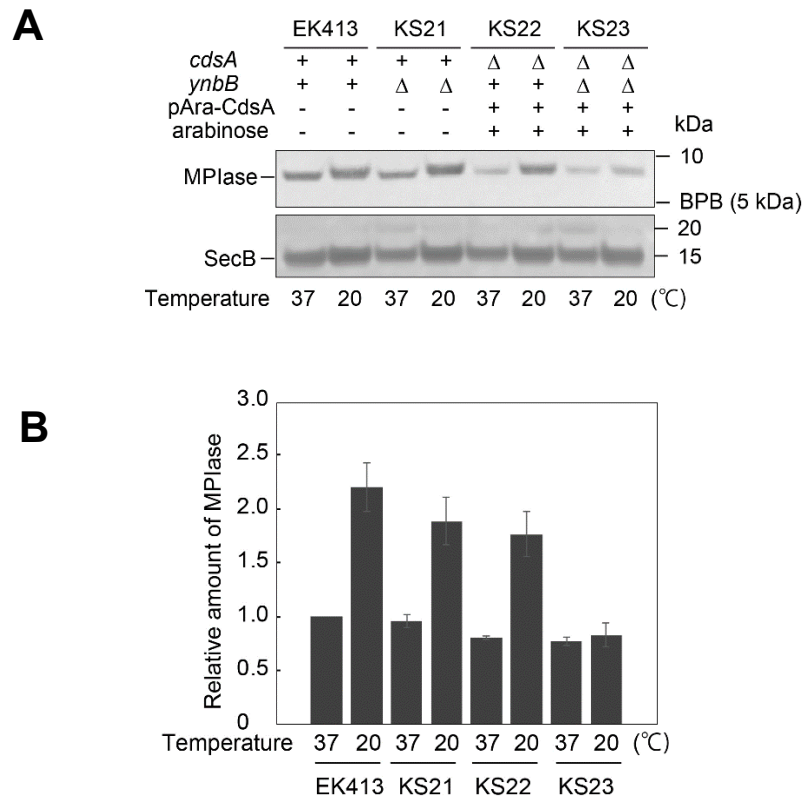


図 34. 染色体上の *cdsA*、*ynbB* の欠損が低温下における MPIase の増加に及ぼす影響。

(A) 一晚培養した各株を 1:100 希釈で LB 培地に植菌し、37°C で培養した。KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA では培地にアラビノースを加えて培養した。"20°C" では菌が OD₆₆₀ ~0.4 まで達した時点で、培養液を 20°C に移し、さらに 3 時間培養した。MPIase、SecB をウエスタン・ブロッティングにより検出した。

(B) (A) の MPIase のバンドの強度を CS analyzer (ATTO) により定量した。EK413 の 37°C における MPIase 量を "1.0" とし、各株の 37°C、20°C における MPIase 量の相対値を示した。独立した 3 回の実験より SD を求め、エラーバーで示した。

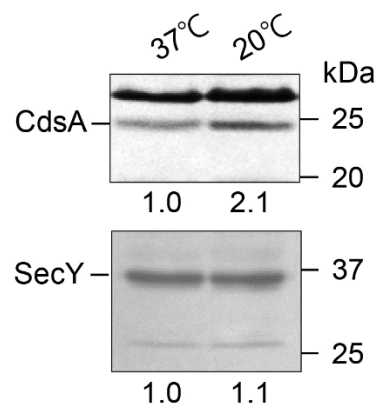


図 35. 低温下における CdsA の発現量の増加。

一晚培養した EK413 を 1:100 希釈で LB 培地に植菌し、37°C で培養した。"20°C" では OD₆₆₀ ~0.4 に達した時点で培養液を 20°C に移し、さらに 3 時間培養した。菌を集菌後、INV を調製した。CdsA、SecY をウエスタン・ブロッティングにより検出した。バンドの強度は CS analyzer (ATTO) により定量した。

(3) MPIase の増加がタンパク質膜透過反応に及ぼす影響

MPIase は SecYEG と相互作用し、タンパク質膜透過反応を著しく促進する (23, 42)。低温下での MPIase 量の増加の抑制が低温下での膜透過反応に及ぼす影響について調べた。第 1 章において、KS21、KS22/pAra-CdsA、および KS23/pAra-CdsA では、37°Cにおいて pOmpA の蓄積は観察されなかった (図 22)。このことから、これらの株では 37°Cにおける膜透過反応を促進するために十分な量の MPIase が発現していると考えられる。各株を 20°C で培養し、pOmpA の膜透過反応をパルス・チェイス実験により解析した。その結果、野生株では pOmpA の蓄積は観察されなかったが、KS21、KS22/pAra-CdsA においてはチェイス時間 60 秒まで pOmpA が蓄積し、わずかに膜透過反応が阻害される様子が観察された (図 36A、B)。一方、KS23/pAra-CdsA では、MPIase 枯渇条件 ($\Delta YnbB/\Delta CdsA$) 程著しい阻害 (図 36A、B) ではなかったものの、チェイス時間 240 秒まで pOmpA が蓄積する様子が観察された (図 36A、B)。これらの株における SecYEG、SecD の発現量に変化は見られなかった (図 36)。したがって、KS23/pAra-CdsA では、低温下における MPIase 発現量の増加が抑制された結果、低温下での膜透過反応が著しく阻害されたと考えられる。これらの結果から、MPIase の増加は低温下での効率的な膜透過反応に重要であることが示された。

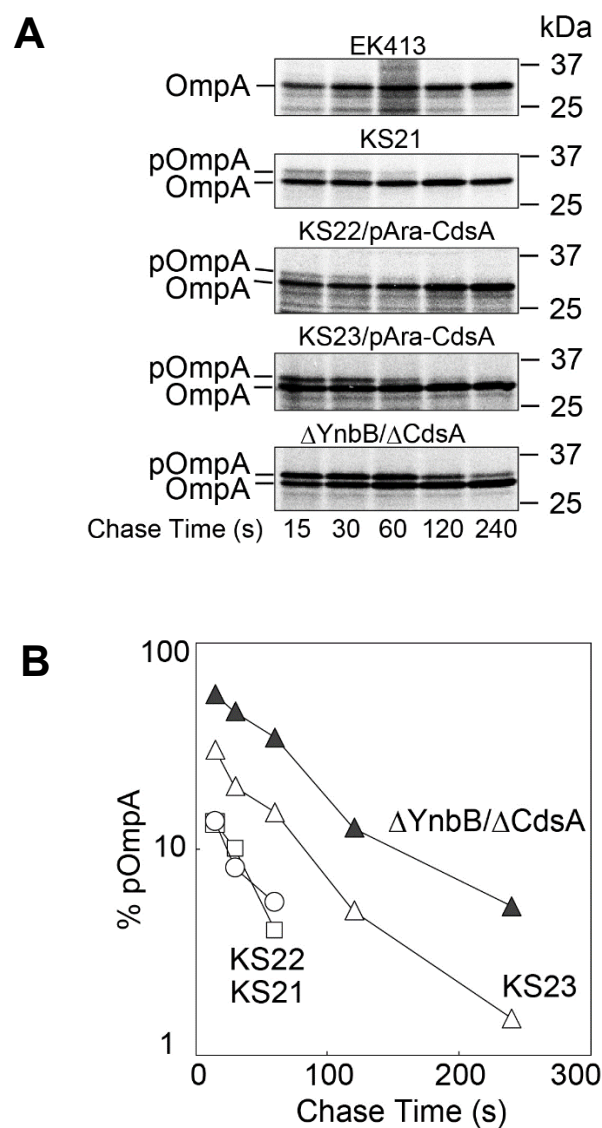


図 35. MPIase の増加の抑制が低温下における膜透過反応に及ぼす影響。

(A) 一晚培養した各株を M9 培地に 1:100 希釈で植菌し、37°Cで培養した。20°C では OD₆₆₀ ~0.4 に達した時点で培養液を 20°Cに移し、さらに3時間培養した。KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA の場合は、培地にアラビノースを加えて培養した。CdsA の枯渇は、材料と方法に示す手順で行った。パルス・チェイス実験は材料と方法に示す手順で行った。pOmpA、OmpA のバンドはオートラジオグラフィーで検出し、Image Quant (GE Healthcare) により定量した。ΔCdsA/ΔYnbB は KS23/pAra-CdsA のアラビノース非添加培地での培養を示す。

(B) pOmpA と OmpA の総和に対する pOmpA の割合 (縦軸) をチェイス時間 (横軸) に対してプロットした。

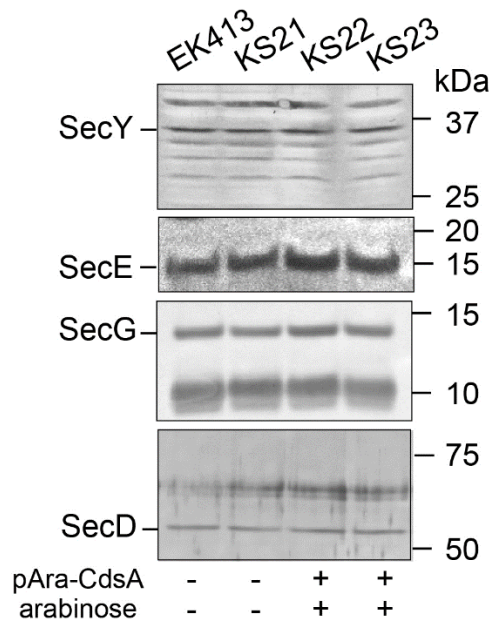


図 36. 染色体の *cdsA*、*ynbB* の欠損が Sec 因子の発現量に及ぼす影響。

一晚培養した各株を 1:100 希釈で LB 培地に植菌し、37°C で培養した。KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA では培地にアラビノースを加えて培養した。菌が OD₆₆₀ ~0.4 ま

で達した時点で、培養液を 20°C に移し、さらに 3 時間培養した。SecY、SecE、SecG、SecD をウエスタン・ブロッティングにより検出した。

(4) MPIase 発現量の低下が低温下でのタンパク質膜透過反応に及ぼす影響

Tam41p を発現させると、MPIase 発現量が低下する (図 19)。Tam41p が CdsA や YnbB と競合して PA を奪い合うため、低温下における MPIase の増加は Tam41p の発現により抑制されるのではないかと考えた。まずは、野生株に Tam41p を発現させ、MPIase 発現量に及ぼす影響について詳細に調べた。Tam41p を低コピープラスミドのテトラサイクリン・プロモーター (pTet-Tam41p) から恒常的に発現させた場合、MPIase 発現量がわずかに低下する様子が観察された (図 37)。さらに、Tam41p を高コピープラスミドの *tac* プロモーター (pTac-Tam41p) から過剰発現させた場合、MPIase 発現量は大幅に低下する様子が観察された。パルス・チェイス実験により膜透過反応を調べた結果、EK413/pTet-Tam41p では pOmpA がチェイス時間 30 秒まで蓄積する様子が観察された (図 37)。さらに、EK413/pTac-Tam41p において Tam41p を過剰発現させた場合、pOmpA はチェイス時間 240 秒まで蓄積する様子が観察された。この株では、pOmpA の膜透過反応は MPIase 枯渇条件と同じ程度阻害されていた (図 38)。続いて、Tam41p の発現が低温下での MPIase の増加に及ぼす影響について調べた。Tam41p は pTet-Tam41p から恒常的に発現させた。Tam41p を発現した場合、低温下での MPIase の増加量は Tam41p を発現していない場合の半分程度であった (図 39A、B、C)。これらの結果から、Tam41p の発現は低温下での MPIase 量の増加を抑制することが示された。KS21、KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA において Tam41p を発現させた場合でも、低温下での MPIase 量の増加は抑制された (図 39B、C)。Tam41p の発現による MPIase 量の増加の抑制が、低温下での膜透過反応に及ぼす影響についてパルス・チェイス実験により調べた。EK413/pTet-Tam41p は、37°C における pOmpA の蓄積はわずかであった (図 38A) が、20°C では pOmpA の膜透過反応が著しく阻害される様子が観察された (図 40A)。KS21、KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA においても、pOmpA の膜透過反応が著しく阻害される様子が観察された (図 40A、B)。なかでも、KS22/pAra-CdsA と KS23/pAra-CdsA では培地にアラビノースを加え、CdsA を十分

に発現しているにも関わらず、MPIase 枯渇条件と同程度の膜透過反応の阻害が観察された (図 40)。したがって、これらの株の MPIase 発現量は、20°Cでの膜透過反応を促進するためには不十分であることが示された。Tam41p の発現により SecYEG や SecD の発現量に大幅な変化は見られなかった (図 41)。したがって、Tma41p の発現による低温下での膜透過反応の阻害は、MPIase 量の低下によるものであることが示された。以上の結果から、低温下では膜透過反応を促進するために必要な MPIase が増加することが示された。

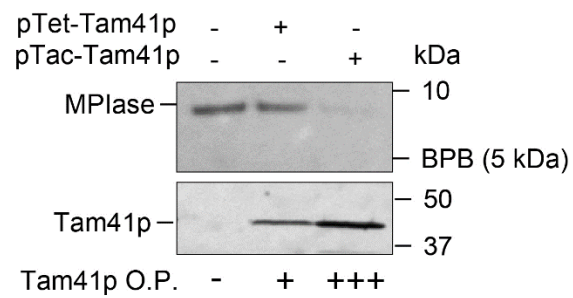


図 37. Tam41p の発現が MPIase の発現量に及ぼす影響。

一晩培養した各株を 1:100 希釈で M9 培地に植菌し、37°C で培養した。EK413/pTac-Tam41p では、1 mM IPTG を加え、Tam41p の発現を誘導し、さらに、1 時間培養した。MPIase、Tam41p をウェスタン・ブロッティングにより検出した。

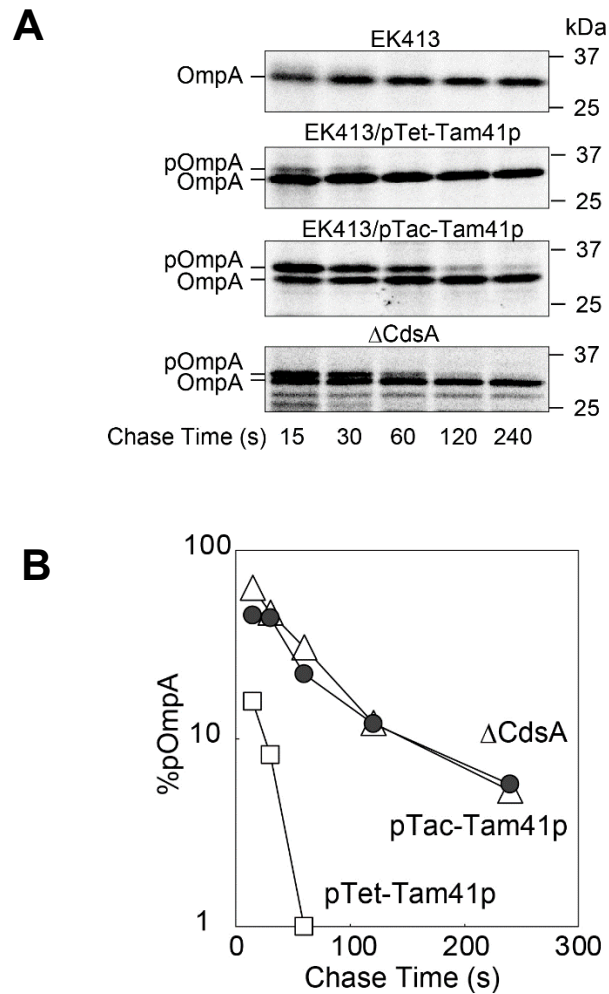


図 38. Tam41p の発現が膜透過反応に及ぼす影響。

(A) 一晚培養した各株を 1:100 希釈で M9 培地に植菌し、37°Cで培養した。EK413/pTac-Tam41p では、1 mM IPTG を加え、Tam41p の発現を誘導し、さらに、1 時間培養した。CdsA の枯渇は、材料と方法に示す手順で行った。パルス・チェイス実験は材料と方法に示したように行った。pOmpA、OmpA のバンドはオートラジオグラフィーで検出し、Image Quant (GE Healthcare) により定量した。ΔCdsA は KS22/pAra-CdsA のアラビノース非添加培地での培養を示す。

(B) pOmpA と OmpA の総和に対する pOmpA の割合（縦軸）をチェイス時間（横軸）に対してプロットした。

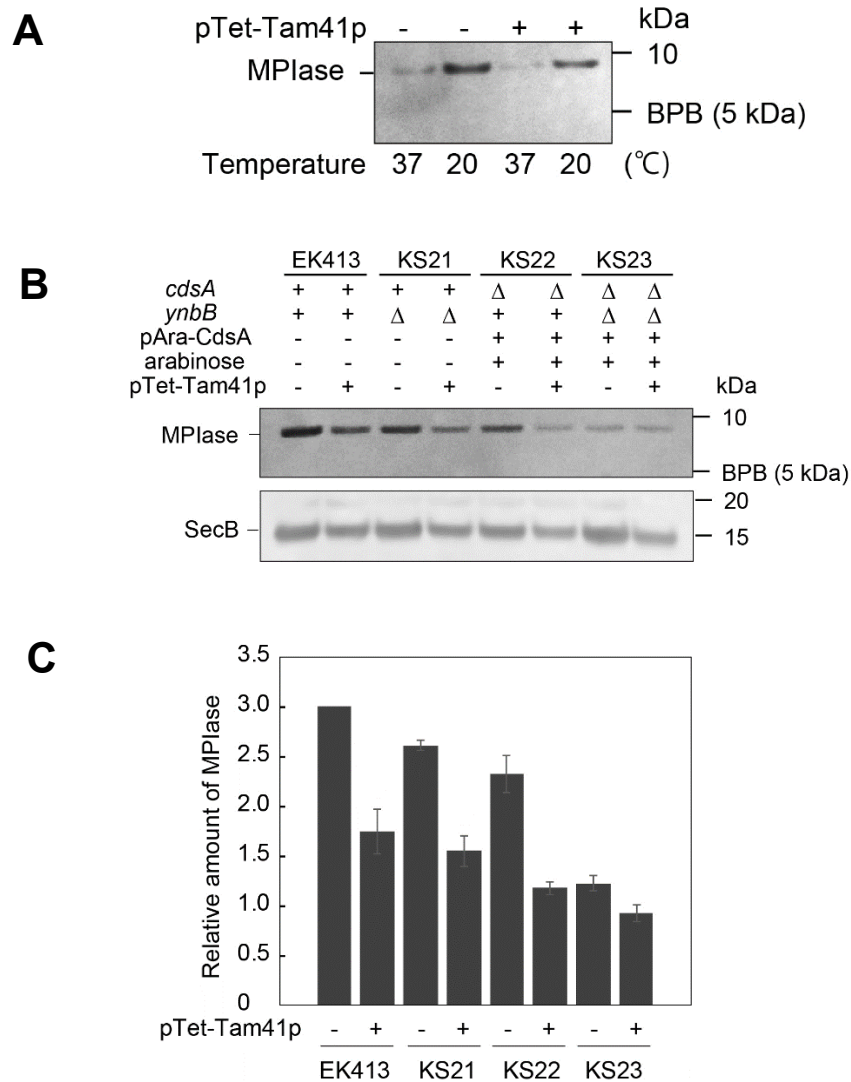


図 39. Tam41p の発現が低温下における MPIase の増加に及ぼす影響。

(A) 一晚培養した EK413、EK413/pTet-Tam41p を 1:100 希釈で LB 培地に植菌し、37°C で培養した。“20°C” では菌が OD₆₆₀ ~0.4 まで達した時点で、培養液を 20°C に移し、さらに 3 時間培養した。MPIase をウエスタン・ブロッティングにより検出した。

(B) 各株を (A) のように培養した。KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA は、培地にアラビノースを加えて培養した。MPIase、SecB をウエスタン・ブロッティングにより検出した。

(C) (B) の MPIase のバンドの強度を CS analyzer (ATTO) により定量した。EK413 の 20°C における MPIase 量を“3.0”とし、MPIase 量の相対値を示した。独立した 3 回の実験より SD を求め、エラーバーで示した。

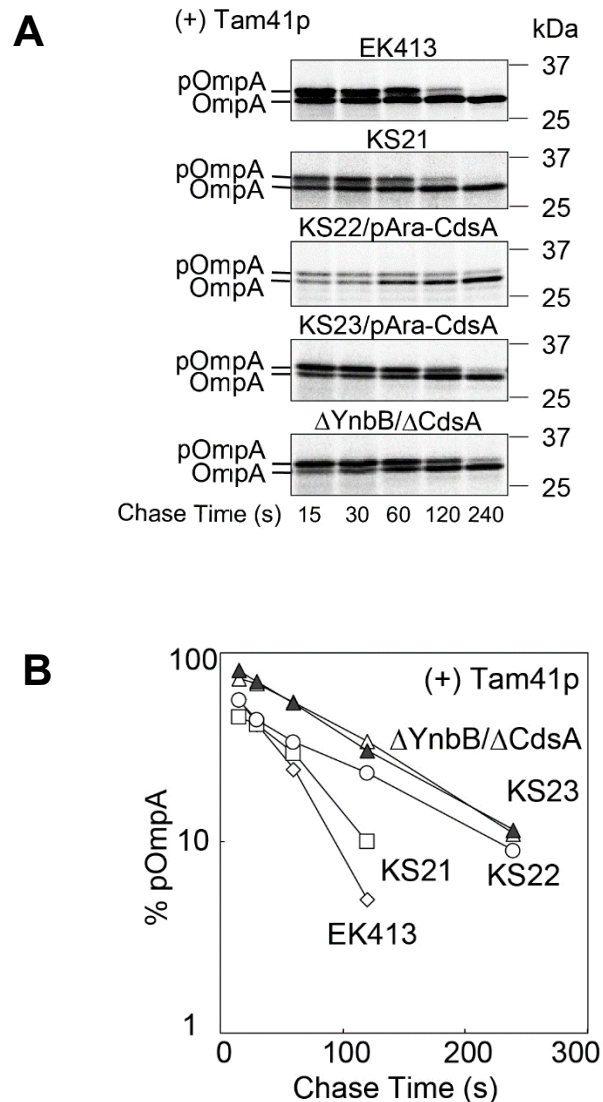


図 40. Tam41p の発現が低温下における膜透過反応に及ぼす影響。

(A) 一晚培養した各株を M9 培地に 1:100 希釈で植菌し、37°C で培養した。20°C では OD₆₆₀ ~0.4 に達した時点で培養液を 20°C に移し、さらに 3 時間培養した。KS22/pAra-CdsA/pTet-Tam41p、KS23/pAra-CdsA/pTet-Tam41p の場合は、培地にアラビノースを加えて培養した。CdsA の枯渇は、材料と方法に示した手順で行った。パルス・チェイス実験は材料と方法に示したように行った。pOmpA、OmpA のバンドはオートラジオグラフィーで検出し、Image Quant (GE Healthcare) により定量した。 Δ CdsA/ Δ YnbB は KS23/pAra-CdsA/pTet-Tam41p のアラビノース非添加培地での培養を示す。

(B) pOmpA と OmpA の総和に対する pOmpA の割合 (縦軸) をチェイス時間 (横軸) に対してプロットした。

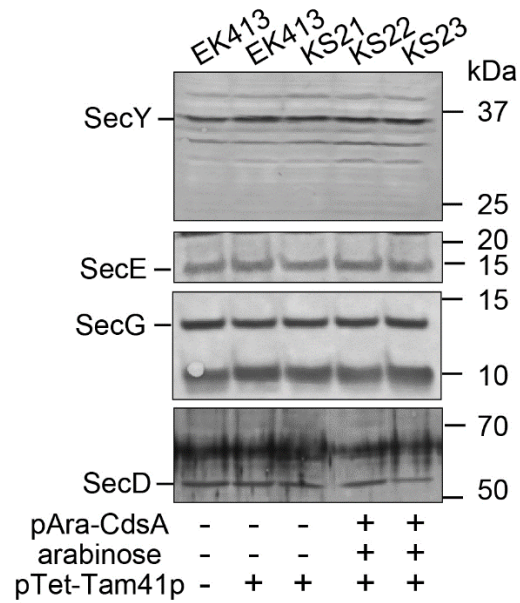


図 41. Tam41p の発現が低温下における Sec 因子の発現量に及ぼす影響。

一晩培養した各株を 1:100 希釈で LB 培地に植菌し、37°C で培養した。KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA では培地にアラビノースを加えて培養した。菌が OD₆₆₀ ~0.4 ま

で達した時点で、培養液を 20°C に移し、さらに 3 時間培養した。SecY、SecE、SecG、SecD をウエスタン・ブロッティングにより検出した。

(5) MPIase 発現量の低下が低温下でのタンパク質膜挿入反応に及ぼす影響

MPIase 発現量の低下が低温下での膜挿入反応に及ぼす影響を調べた。KS23/pAra-CdsA/pTet-Tam41p を 20°C で培養し、M13 プロコートの膜挿入反応をシグナル配列の切断を指標として、ウエスタン・ブロッティング、およびパルス・チェイス実験により解析した。この株では、培地にアラビノースを添加し、CdsA を発現させているにも関わらず、20°C における pOmpA の膜透過反応は MPIase 枯渇条件と同程度阻害されていた (図 40)。ウエスタン・ブロッティングによる解析の結果、培地にアラビノースを加え、CdsA を発現させている条件下では、20°C においても M13 プロコートの蓄積は観察されなかった (図 42A)。MPIase を枯渇した条件では、M13 プロコートの膜挿入は完全に阻害されていた (図 42A)。パルス・チェイス実験によりさらに詳細に解析した結果、20°C においても M13 プロコートの蓄積は観察されなかった (図 42B)。したがって、KS23/pAra-CdsA/pTet-Tam41p における MPIase 発現量は、低温下における膜透過反応を促進するためには不十分であるが、膜挿入反応を進行させるためには十分であることが示された。したがって、MPIase の増加は低温下における膜挿入反応には必須ではないことが示された。

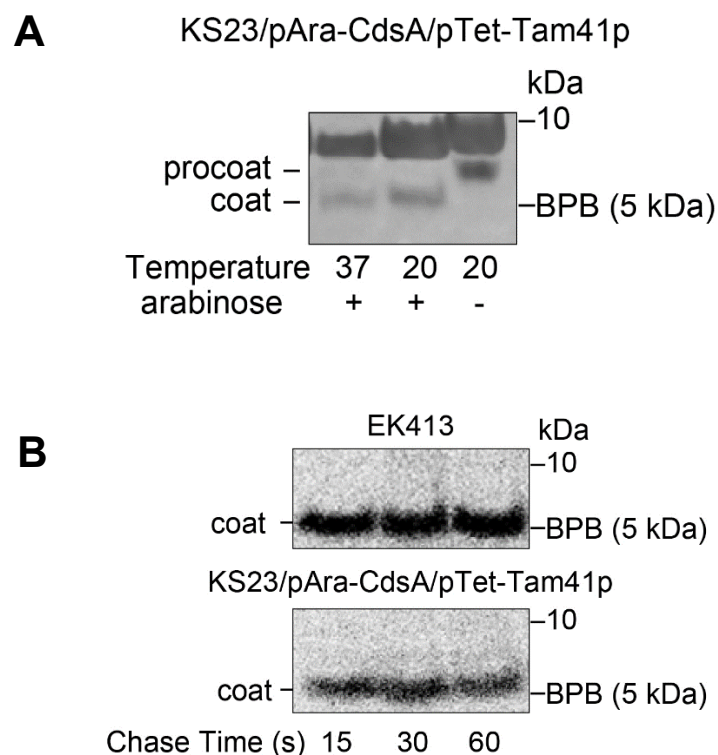


図 42. 低温下での MPIase 量の増加の抑制が膜挿入反応に及ぼす影響。

(A) 一晚培養した KS23/pAra-CdsA/pTet-Tam41p/pMS119-PC を LB 培地で 3 回洗浄後、アラビノース添加・非添加の LB 培地に 1:1000 希釈で植菌した。“20℃”では $OD_{660} \sim 0.4$ まで達した時点で、培養液を 20℃に移した。20℃で 2 時間培養後、1 mM IPTG を加え M13 プロコートの発現を誘導し、さらに 1 時間培養した。M13(プロ)コートをウェスタン・ブロッティングにより検出した。procoat は M13 プロコート、coat は M13 コートを示す。

(B) 一晚培養した EK413/pMS119-PC、KS23/pAra-CdsA/pTet-Tam41p/pMS119-PC を M9 培地に 1:100 希釈で植菌した。KS23/pAra-CdsA/pTet-Tam41p/pMS119-PC では、培地に 0.2% アラビノースを加えて培養した。M13 プロコートは 1 mM IPTG で 5 分間誘導した。パルス・チェイス実験を材料と方法に記載のように行った。M13 プロコート、M13 コートのバンドはオートラジオグラフィーで検出した。coat は M13 コートを示す。

(6) 低温下における MPIase の増加の生育における役割

MPIase は菌の生育に必須である。KS23/pAra-CdsA における低温下での MPIase 量の増加の抑制が菌の低温下での生育に及ぼす影響について調べた。その結果を Table 4 に示した。KS23/pAra-CdsA は、LB 培地上では野生株と同様に生育した。一方、M9 最少寒天培地ではコロニーのサイズが野生株よりもわずかに小さかった。Tam41p の発現は低温下での MPIase 量の増加を阻害した。Tam41p を発現させた場合の菌の低温下での生育を調べた。LB 培地において野生株では、Tam41p の発現により生育の阻害は観察されなかったが、KS21、KS22/pAra-CdsA、KS23/pAra-CdsA ではコロニーのサイズが野生株よりも多少小さかった。また、Tam41p の発現による生育の阻害は M9 培地において顕著であった。これらの結果から、低温下での MPIase の増加は低温下での菌の生育には必ずしも必須ではないことが示された。

Table 4. 20°Cにおける菌の生育*

		EK413	KS21	KS22	KS23
	<i>cdsA</i>	+	+	Δ	Δ
	<i>ynbB</i>	+	Δ	+	Δ
	pAra-CdsA	-	-	+	+
	Arabinose	-	-	+	-
LB	(-) Tam41p	L	L	L	L
	(+) Tam41p	L	M	M	M
M9	(-) Tam41p	L	L	L	M
	(+) Tam41p	M	M	S	S

*各菌を LB 培地、M9 最少培地に植菌後、20°Cで 48 時間培養した。KS22、KS23 では 0.2% アラビノース存在下で培養した。"L"は large、"M"は medium、"S"は small サイズのコロニーを示す。

2-3. 考察

第2章では、低温下において MPIase の発現量が著しく増加することを明らかにした。低温下ではタンパク質膜透過反応の効率が低下することから、この反応には低温感受性の段階が存在すると考えられてきた (74)。膜透過反応の低温感受性は低温下における膜脂質の流動性が低下するためであると説明されている。しかしながら、なぜ、低温下において膜透過反応が阻害されるのか、膜透過反応のどの段階が低温で阻害されるのか、さらには、どのようにして膜透過反応の低温感受性を克服しようとしているのか、これらの詳細な分子機構は不明であった。低温下では膜脂質の不飽和脂肪酸の割合が大幅に上昇する (76) が、これだけですべてを説明することはできない。さらに、低温下において SecYEG や SecDF、YidC の発現量は変化しない (66)。MPIase のみが低温下において著しく増加した。MPIase の増加が抑制された株では、膜透過反応の著しい阻害が観察された。これらのことから、低温下では膜透過反応に必要な MPIase の量が増加することが示された。その一方、MPIase の増加は低温下における膜挿入反応や菌の生育にはあまり重要ではなかった。

MPIase の増加には MPIase 生合成酵素 CdsA と YnbB が関与していた。CdsA、YnbB による Compound I 生合成反応は MPIase 生合成における律速段階である (第1章)。低温下では CdsA の発現量が増加した (図 33)。したがって、低温下では CdsA、あるいは YnbB の発現量が増加することにより、MPIase 量が増加することが示された。CdsA の発現量が低温下において増加する分子機構は第3章で述べる。

なぜ、低温下では膜透過反応が効率的に進行するために必要な MPIase 量が増えるのだろうか？ MPIase により SecYEG の二量体構造が変化し、膜透過反応が促進される (42)。MPIase が存在しない場合、SecYEG の二量体構造は SecE を接触面とした "back-to-back" 構造となる。MPIase は SecYEG の二量体構造を "back-to-back" から SecG が接触面近傍に位置する "side-by-side" へと変化させる。"side-by-side" の膜透過活性は "back-to-back" のものより 10 倍高い (42)。SecA の膜挿入－脱挿入と共役した SecG の膜内配向性反転サイクルは、

SecYEG が”side-by-side”の場合のみ可能である (42)。このように、SecYEG は膜透過反応に伴って、ダイナミックにその構造を変化させる。この構造変化には MPIase が必須である。低温下において膜脂質の流動性が低下した状況下では、ダイナミックな構造変化を伴う膜透過反応は進行しづらくなる。そのため、低温下では SecYEG や SecA の構造変化に必要な MPIase の量が増加するのかもしれない。この予想と合致して、 $\Delta secG$ 株や SecG の膜反転が低温下で阻害される *secAR11* 変異株では、膜透過反応が低温感受性を示し、これらの株の低温下における膜透過反応の阻害は MPIase 枯渇株と同程度である (41, 66)。一方、Sec 非依存の膜挿入反応では MPIase は基質膜タンパク質と直接相互作用し、膜挿入反応を触媒する。この反応に必要な MPIase の量は、低温下においても増加しないと考えられる。

低温下において MPIase の発現量が増加しなかった場合、コロニーのサイズは多少、小さくなるものの、著しい生育の阻害は観察されなかった。タンパク質膜透過反応は、翻訳終了後に SecYEG 上で進行する。MPIase 量が低下し、前駆体タンパク質が細胞質に蓄積したとしても、これらは時間の経過と共に膜透過する。そのため、菌の生育に必要な分泌タンパク質は、いずれ膜透過する。このような場合、生育速度は遅くなるものの、菌は生育することができる。また、これまでに多くの *sec* 遺伝子の低温感受性変異株が単離されているが、著しい膜透過反応の阻害が観察された場合であっても、必ずしも著しい生育の阻害が観察されるわけではない (77)。 $\Delta secG$ 株は低温下において膜透過反応は著しく阻害されるが、生育は弱い低温感受性を示す (66)。一方、タンパク質膜挿入反応は翻訳に共役して進行する。したがって、タンパク質挿入反応が阻害される変異株は致死性を示す。低温下における MPIase の増加が菌の生育に必須ではないことは、SecYEG の構造変化はタンパク質膜挿入反応には必須ではないと考えられる。

本研究では、低温下において MPIase の分解速度が遅くなっているため、MPIase 量が増加しているように見える可能性を排除することができなかった。しかしながら、以下の理由から、MPIase の分解速度の低下が、MPIase の増加に寄与するところは少ないと考える。

(i) 低温下では CdsA の発現量が増加する様子が観察された。CdsA は MPIase 生合成反応における律速酵素であるため、MPIase 生合成量を増やすために CdsA 発現量が増加していると考えられる。(ii) $\Delta ynbB/\Delta cdsA$ 二重欠損株では、低温下での MPIase の増加は著しく抑制された。また、MPIase の増加は Tam41p の発現により阻害された。もし、低温下において MPIase の分解速度の低下が、MPIase 量の増加に寄与しているならば、これらの株においても MPIase の増加は観察されるはずである。(iii) MPIase の増加が抑制された条件では、タンパク質膜透過反応は低温下において著しく阻害された。MPIase 量を増やすことで膜透過反応を促進していると考えられる。

2-4. 材料と方法

(1) 材料

第 2 章で使用した菌株、プラスミドを Table 5 に示した。[³⁵S]メチオニン-システインはパーキンエルマージャパンより購入した。Protein A Sepharose CL-4 は GE Healthcare より購入した。抗 MPIase 抗体 (27)、抗 SecB 抗体 (58)、抗 SecE 抗体 (39)、抗 SecD 抗体 (78)、抗 OmpA 抗体 (79) はウサギを免疫して得られた抗体である。抗 CdsA 抗体 (Glu75~Ser92) (59)、抗 M13 コート抗体 (Ala24~Tyr44) (59)、抗 SecY 抗体 (Ser426~Arg443) (60)、抗 YidC 抗体 (Lys382~Gln402) (59) は合成ペプチドを抗原として、eurofin にて作成された。アルカリフォスファターゼ標識ウサギ抗体 (Reserve AP™ Phosphate Labeled Goat anti-Rabbit IgG (H+L)) は Vector Laboratories より購入した。ウエスタン・ブロットイング発色試薬 NBT/BCIP はプロメガより購入した。アラビノースは Sigma より購入した。IPTG (イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド) は Wako より購入した。PMSF (フッ化フェニルメチルスルホニル) はナカライテスク株式会社より購入した。

Table 5. 第2章で使した菌株、およびプラスミド.

Strain and plasmid	Relevant genotype and description	Reference
EK413	MC4100 <i>ara</i> ⁺	(39)
KS21	EK413 $\Delta ynbB$	第1章
KS22	EK413 $\Delta cdsA::cat$	第1章
KS23	EK413 $\Delta ynbB \Delta cdsA::cat$	第1章
pAra-CdsA	The <i>cdsA</i> gene was cloned into pKQ2 under the control of the arabinose promoter, spectinomycin resistant.	第1章
pACYC184-Km	The <i>cat</i> gene on pACYC184 was replaced with the <i>kan</i> gene.	第1章
pTet-Tam41p	The <i>TAM41</i> gene without the mitochondrial targeting signal was cloned into pACYC-Km under the control of the <i>tet</i> promoter.	第1章
pTac-Tam41p	The <i>TAM41</i> gene without the mitochondrial targeting signal was cloned into pUSI2 under the control of <i>tac</i> promoter.	第1章
pMS119-PC	The gene for M13 procoat is cloned under the control of the <i>tac</i> promoter, ampicillin resistant.	(64)

(2) パルス・チェイス実験、免疫沈降

パルス・チェイス実験、免疫沈降は第1章の材料と方法に示すように行った。

(3) その他

M13 (プロ)コートは 6 M 尿素を含む 12.5% acrylamide-0.27% *N,N'*-bismethyleneacrylamide ゲルを用いて SDS-PAGE により解析した (23)。MPIase、SecE、SecG、SecB は 12.5% acrylamide-0.27% *N,N'*-bismethyleneacrylamide ゲルを用いて SDS-PAGE により解析した (71)。CdsA は 13.5% acrylamide-0.33% *N,N'*-bismethyleneacrylamide ゲルを用いて SDS-PAGE により解析した (72)。SecY は 15% acrylamide-0.33% *N,N'*-bismethyleneacrylamide ゲルを用いて SDS-PAGE により解析した

(72)。(p)OmpA、SecD、SecA は 10% acrylamide-0.13% *N,N'*-bismethyleneacrylamide ゲルを用いて SDS-PAGE により解析した (72)。ウエスタン・ブロットのバンドは CS analyzer (ATTO) により定量した。タンパク質濃度は BSA を標準としてローリー法により定量した (73)。

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

3-1. 導入

第 2 章において、低温下において糖脂質 MPIase の発現量が著しく増加することを明らかにした。低温下ではタンパク質膜透過反応に必要な MPIase 量が増加するため、MPIase の増加が抑制、あるいは MPIase 発現量が低下した株では膜透過反応は低温感受性を示した。低温下における MPIase の増加には MPIase 生合成反応における律速酵素である CdsA、YnbB が関与していた。低温下では CdsA の発現量が増加していたことから、低温下における MPIase 量の増加は CdsA の発現量により制御されることが示された。しかしながら、低温下における CdsA の発現誘導機構は全く不明であった。

cdsA 遺伝子は *ispU-cdsA-rseP-bamA* オペロンの 2 番目に位置すると考えられている。このオペロンを構成する遺伝子はすべて生育に必須である (54)。しかしながら、*ispU-cdsA-rseP-bamA* の発現に関与するプロモーターは明らかでない。さらに、*ispU* 遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子に置換した場合、*ispU* 遺伝子下流の *cdsA* 遺伝子の発現も阻害されることが報告されている (80)。このことから、*ispU* 遺伝子の ORF 内部には *cdsA* 遺伝子の発現に関与する領域が含まれていることが示唆される。このように *cdsA* 遺伝子の発現に関与する遺伝子領域は全く不明であった。また、CdsA の発現誘導が転写段階であるのか、翻訳段階であるのか、あるいは mRNA の安定性に関与するのかどうかについても全く不明であった。

第 3 章では、低温下における CdsA の発現誘導機構の解析を行った。

3-2. 結果

(1) 低温下における *cdsA* mRNA 量の変化

低温下における MPIase 発現量の増加を経時的に調べた。EK413、KS23/pAra-CdsA を

37°Cで培養し、その後、培養液を 20°Cに移した。KS23/pAra-CdsA では培地に 0.2%アラビノースを加え、プラスミドから CdsA を純分に発現させた条件で培養した。EK413 における MPIase 発現量の増加は、低温シフト後 10 分ですでに最大量に達し、その後、90 分まで増加したままであった (図 43)。KS23/pAra-CdsA では、MPIase 量の増加が著しく抑制される様子が観察された (図 43)。これらの結果から、MPIase 発現量は低温を感知後すぐに増加し、増加した量は長時間維持されることが示された。CdsA は MPIase 生合成反応における律速酵素である (第 1 章)。*cdsA* 遺伝子の mRNA が低温下において増加するかどうかを RT-PCR により調べた。EK413 を 37°Cで培養後、培養液を 20°Cに移した。20°Cで 3 時間培養後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により RNA 画分を調製した。フォワードプライマーとして F1 (図 44)、リバープライマーとして R1 (図 44) を用い、*cdsA* 遺伝子の mRNA を RT-PCR により増幅した。その結果、20°Cにおける *cdsA* mRNA の RT-PCR 産物のバンド強度は 37°Cに比べて約 3 倍に増加していた (図 45)。一方、低温下において発現量が変わらないことが知られている EF-Tu をコードする *tufA* 遺伝子 (81) では、20°Cにおける RT-PCR 産物のバンドの強度は 37°Cと変わらなかった (図 45)。続いて、低温下における *cdsA* mRNA 量の変化を経時的に調べた。その結果、*cdsA* mRNA の RT-PCR 産物のバンドの強度は低温シフト後 10 分で最大値に達し、その後、60 分まで増加したままであった (図 46)。これらの結果から、低温下における MPIase、*cdsA* mRNA 量の増加は迅速であり、長時間持続することが示された。

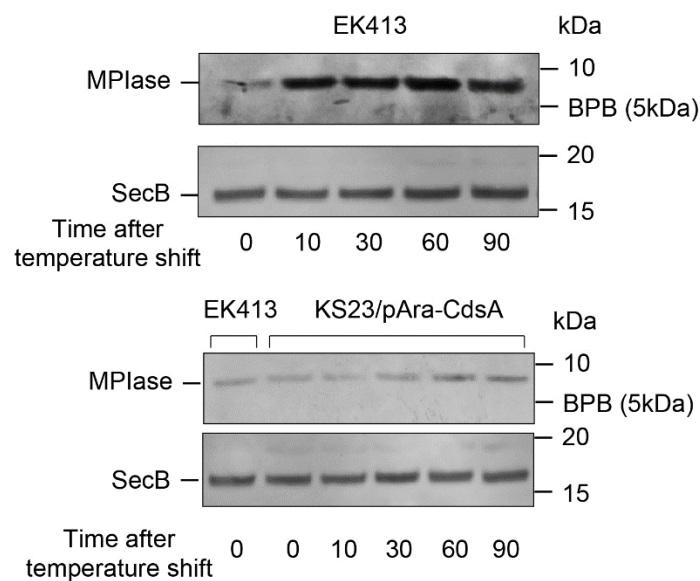


図 43. 低温下における MPIase 発現量の経時的な変化。

一晩培養した EK413、KS23/pAra-CdsA を LB 培地に 1:100 希釈で植菌し、37°C で培養した。KS23/pAra-CdsA では培地に 0.2% のアラビノースを加えて培養した。菌が OD₆₆₀ ~0.8 まで達した時点で、培養液を 20°C に移した。各時間における MPIase、SecB をウェスタン・ブロッティングにより検出した。

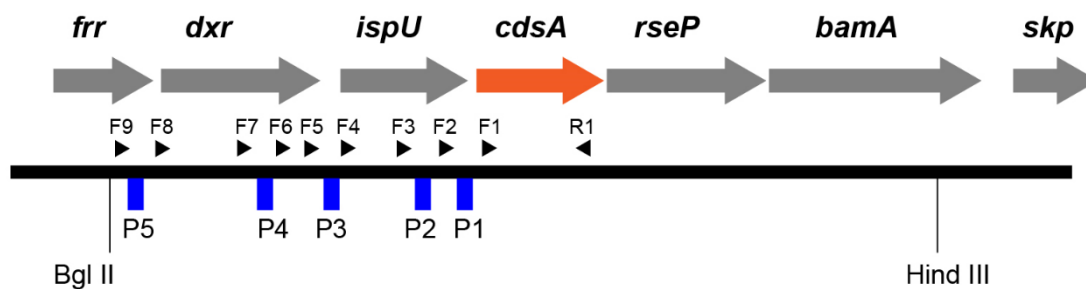


図 44. *cdsA* 遺伝子近傍の遺伝子配置。

青四角は σ^{70} の結合サイトを示す。三角は各プライマーの位置と方向を示す。

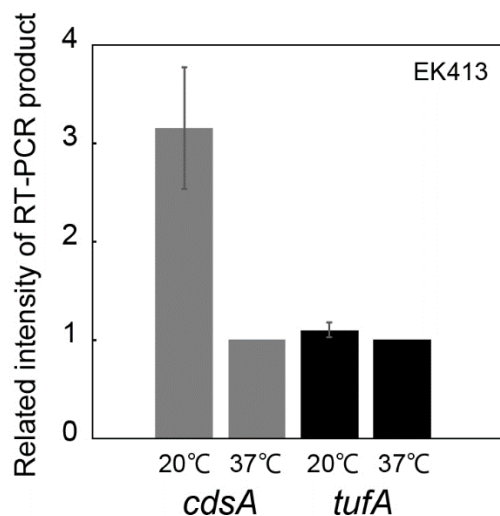


図 45. 低温下における *cdsA* mRNA 量の変化。

一晩培養した EK413 を LB 培地に 1:100 希釈で植菌し、37°C で培養した。"20°C" では、菌が OD₆₆₀ ~0.4 まで達した時点で、培養液を 20°C に移し、さらに 3 時間培養した。フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により RNA 画分を調製した。*cdsA* mRNA を F1/R1 プライマーを用いて RT-PCR により増幅した。*tufA* mRNA を *tufA*-5'/*tufA*-3'comp プライマーを用いて RT-PCR により増幅した。RT-PCR 産物のバンドの強度を CS analyzer (ATTO) により定量した。*cdsA* 遺伝子、*tufA* 遺伝子の 37°C における RT-PCR 産物の強度を"1.0"として、20°C での RT-PCR 産物のバンドの強度の相対値を示した。独立した 3 回の実験により SD を求め、エラーバーで示した。

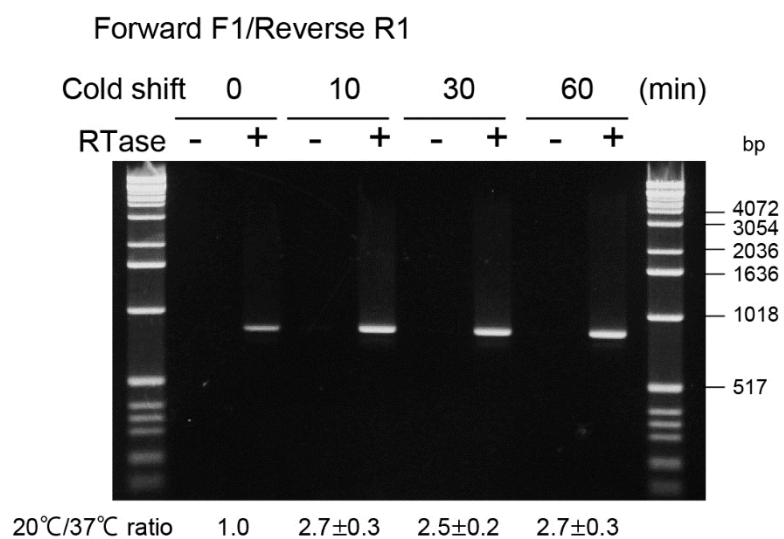


図 46. 低温下における *cdsA* mRNA 量の経時的な変化。

一晚培養した EK413 を LB 培地に 1:100 希釈で植菌し、37°C で培養した。菌が OD₆₆₀ ~0.8 まで達した時点で、培養液を 20°C に移した。図示す時間 20°C で培養し、*cdsA* mRNA を F1/R1 プライマーを用いて RT-PCR により増幅した。RT-PCR 産物のバンドの強度を CS analyzer (ATTO) により定量した。独立した 3 回の実験より SD を求めた。

(2) 低温下での *cdsA* mRNA の増加に関与するプロモーター領域の検索

cdsA 遺伝子は *ispU-cdsA-rseP-bamA* オペロンの 2 番目に位置すると考えられている (図 44)。しかしながら、*cdsA* 遺伝子のプロモーター領域は不明であった。*cdsA* 遺伝子上流のプロモーター領域を検索した結果、転写因子 σ^{70} の結合配列と相同性の高い配列が 5 つ存在した (図 44 P1~P5)。プロモーターと予想される各配列の上流、および下流に、フォワードプライマーとして F2~F9 を設計した (図 44)。リバースプライマーとして R1 を用い、RT-PCR により *cdsA* 遺伝子上流の mRNA の長さを調べた。その結果、37°C では F2/R1~F6/R1 の RT-PCR 産物が検出され、F7/R1、F8/R1、および F9/R1 の RT-PCR 産物は検出されなかった (図 47)。一方、20°C では、F2/R1~F6/R1 の RT-PCR 産物に加え、F7/R1 および F8/R1 の RT-PCR 産物が検出された (図 47)。F9/R1 は 20°C においても検出されなかった。これらの結果から、低温下では *dxr-ispU-cdsA* mRNA の転写が誘導されることが示された。続いて、低温シフト後の *dxr-ispU-cdsA* mRNA 量の経時的な変化を調べた。低温シフト前は F8/R1 の RT-PCR 産物は観察されなかった。低温シフト後 10 分で RT-PCR 産物のバンドの強度は最大値に達し、その後、時間の経過に伴って減少していく様子が観察された (図 46A)。これらの結果から、*dxr* 遺伝子上流の P5 は低温下で一過的に誘導されるプロモーターであることが示された。*dxr-ispU-cdsA* mRNA は時間の経過と共に減少する一方、*cdsA* mRNA は、低温シフト後 60 分まで増加したままである (図 44)。これらのことから、*cdsA* mRNA を低温下において長時間増加し続けるためのプロモーター領域が P5 下流に存在する可能性が示唆された。この可能性を検証するため、F2/R1、F4/R1、F6/R1 プライマーによる RT-PCR 産物の量の変化を経時的に調べた。F6/R1 の RT-PCR 産物は低温シフト後、10 分で増加し、その後、時間の経過に伴って減少した (図 46B)。一方、F2/R1、F4/R1 の RT-PCR 産物は低温シフト後 10 分で増加し、60 分まで増加し続けた (図 46C、D)。これらの結果から、P5 (P4) は低温下で一過的に誘導されるプロモーターであるのに対し、P3 は低温下で長時間誘導され続けるプロモーターであることが示された。これらの 2 つの

異なるプロモーターによって、*cdsA* 遺伝子の mRNA 量は低温を感知後すぐに増加し、長時間維持されることが示された。

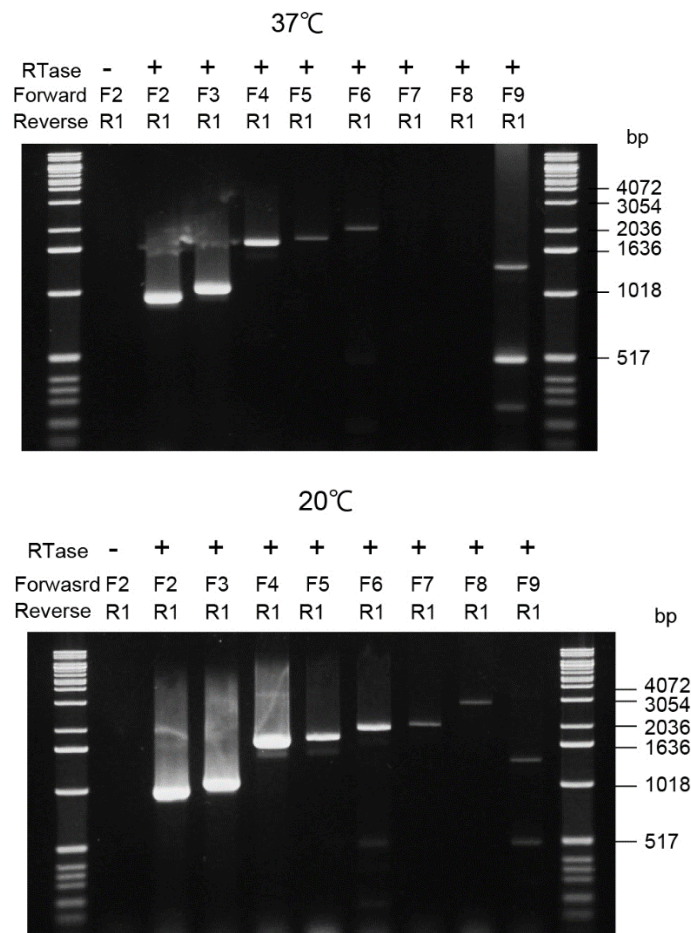


図 47. *cdsA* 遺伝子のプロモーター領域の検索。

一晩培養した EK413 を LB 培地に 1:100 希釈で植菌し、37°C で培養した。20°C では菌が OD₆₆₀ ~0.8 まで達した時点で、培養液を 20°C に移し、さらに 1 時間培養した。フェノール/クロロホルム、エタノール沈殿により RNA 画分を調製した。図に示す各プライマーを用いて mRNA を RT-PCR により増幅した。

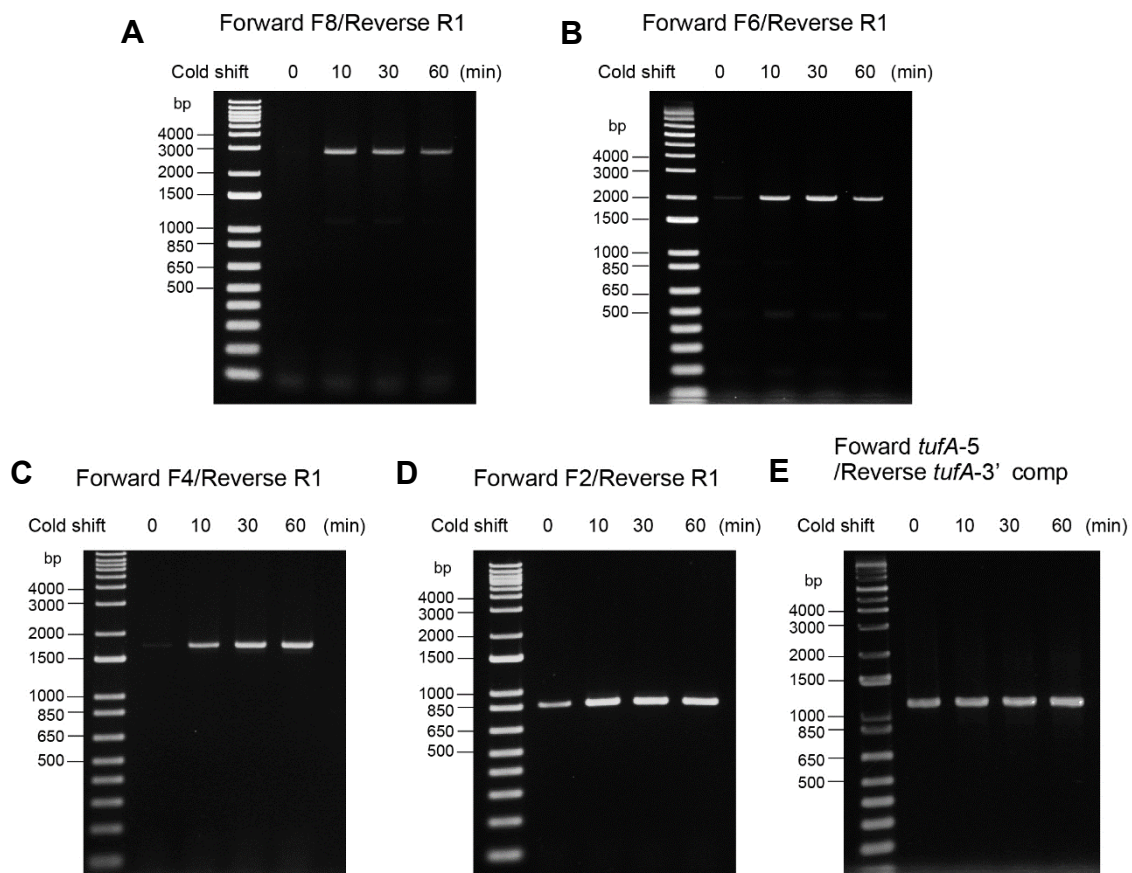


図 48. *cdsA* 上流を含む mRNA の低温下における経時的な変化。

一晩培養した EK413 を LB 培地に 1:100 希釈で植菌し、37°C で培養した。菌が $OD_{660} \sim 0.8$ まで達した時点で、培養液を 20°C に移した。*cdsA* mRNA を F8/R1 (A)、F6/R1 (B)、F4/R1 (C)、F2/R1 (D)、*tufA*-5'/*tufA*-3' comp (E) プライマーを用いて RT-PCR により増幅した。

(3) プロモーターP3 が低温下における *cdsA* mRNA、および MPIase の増加に及ぼす影響

Icho らのグループにおいて、*cdsA* 遺伝子上流の 2.6 kb、および下流 2.2 kb を含む 5.8 kb の DNA 断片（図 44、49 に示す BglIII-HindIII までの領域）をクローニングしたプラスミドを導入した大腸菌を 30°C で培養した場合、CdsA が過剰発現されることが報告されている（49）。この菌を 42°C で培養した場合、CdsA の過剰発現は観察されなかった（49）。これらは、この 5.8 kb の DNA 断片には、CdsA が低温下で増加するために必要な領域が含まれていることを示している。第 1 章において、Icho らが報告した 5.8 kb の DNA 断片を pUC19 ベクターの BamHI/HindIII 部位に連結したプラスミド pCD1 を構築した（第 1 章、図 49）。pCD1 が低温下において MPIase 発現量を増加するかどうかを調べた。pCD1 を YS23 ($\Delta pcnB \Delta cdsA \Delta ynbB$)/pAra-CdsA 株に導入し、pCD1 が CdsA 枯渇条件の生育を相補できるかどうかを調べた。 $\Delta pcnB$ 株では、ColE1 型の複製オリジンをもつプラスミドが低コピーに保たれる（82）。pCD1 の複製オリジンは ColE1 であるため、YS23/pAra-CdsA では、pCD1 のコピー数が低コピーに保たれる。YS23/pAra-CdsA/pCD1 では 37°C、20°C の両方でアラビノース非存在下において用いた菌の生育が観察された（Table 6）。したがって、pCD1 は CdsA 欠損株の生育を相補できることが示された。続いて、pCD1 が低温下において MPIase 発現量を増加するかどうかについて調べた。YS23/pAra-CdsA/pCD1 をアラビノース非存在下で培養し、37°C、20°C における MPIase 発現量を調べた。その結果、20°C において EK413 と同様に MPIase 発現量の増加が観察された（図 50A）。したがって、pCD1 にクローニングされた *cdsA* 遺伝子を含む 5.8 kb の DNA 断片には、低温下における MPIase の増加に関与する領域が含まれていることが示された。続いて、*cdsA* 遺伝子下流の下流が MPIase の増加に関与するかどうかを調べるため、pCD1 から *cdsA* 遺伝子下流の 2.2 kb を除いた pCD1- $\Delta 3'$ を構築した（図 49）。YS23/pAra-CdsA/pCD1- $\Delta 3'$ はアラビノース非存在下においても生育し（Table 6）、20°C における MPIase 発現量の増加も観察された（図 50A）。したがって、*cdsA* 遺伝子下流の 2.2 kb は低温下における MPIase の増

加には必須ではないことが示された。

cdsA 遺伝子上流のプロモーター配列が低温下における MPIase 量の増加に関与するかどうかを調べるため、pCD1- $\Delta 3'$ をもとに *cdsA* 遺伝子上流のプロモーターを段階的に欠損したプラスミドを構築した (C1~C6-pCD1- $\Delta 3'$) (図 49)。これらのプラスミドを YS23/pAra-CdsA に導入し、CdsA 枯渇株の生育を相補できるかどうかを調べた。C4~C6-pCD1- $\Delta 3'$ を導入した株では、37°C、20°Cの両方でアラビノース非存在下での生育が観察された (Table 6)。一方、C2、および C3-pCD1- $\Delta 3'$ を導入した株は、37°Cでは生育するものの、20°Cでは著しい生育の阻害が観察された (Table 6)。C1-pCD1- $\Delta 3'$ を導入した株では、37°C、20°Cにおいて菌の生育しなかった (Table 6)。これらの結果から、プロモーターP3 は菌の低温下での生育に必須であることが示された。これらのプラスミドを導入した株の低温下における MPIase 発現量を調べた。その結果、C4~C6-pCD1- $\Delta 3'$ では、pCD1- $\Delta 3'$ と同様に低温下における MPIase 発現量の増加が観察された (図 50C)。一方、C2-、C3-pCD1- $\Delta 3'$ では低温下における MPIase 量の増加が著しく抑制されていた (図 50B)。これらの結果は、プロモーターP3 は低温下における MPIase の増加に必須であることが示された。低温下での MPIase の増加におけるプロモーターP3 の役割をさらに詳細に調べるため、低温下における MPIase 量の変化を経時的に調べた。YS23/pAra-CdsA/pCD1- $\Delta 3'$ では、EK413 と同様に低温に移してから 10 分で MPIase の増加が観察され、60 分まで増加し続ける様子が観察された (図 51)。一方、YS23/pAra-CdsA/C4-pCD1- $\Delta 3'$ では、低温に移してから 30 分まで MPIase の増加は観察されず、60 分で MPIase の増加が観察された (図 51)。これらの結果から、プロモーターP5 (P4) は低温を感知後すぐに作動し、MPIase を迅速に増加させる役割を果たし、プロモーターP3 はプロモーターP5 (P4) に遅れて作動し、MPIase を長時間増加し続ける役割を果たすことが示された。

プロモーターP3 が低温下における *cdsA* mRNA の増加に関与するかどうかを調べるためにクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (cat) レポーターアッセイを行った。

C4-pCD1- $\Delta 3'$ の *cdsA* 遺伝子の ORF を *cat* 遺伝子の ORF に置換した (C4- pCD2- $\Delta 3'$)。C4-pCD2- $\Delta 3'$ を PS259 ($\Delta pcnB$) 株に導入し、37°C、20°Cにおける *cat* 活性を測定した。20°Cにおける *cat* 活性 37°Cに比べて~1.5 倍増加した (図 52)。KS22 (*cdsA::cat*)/pAra-CdsA では染色体上の *cdsA* 遺伝子の ORF が *cat* 遺伝子の ORF に置換されている。KS22/pAra-CdsA をアラビノース存在下で培養し、*cat* 活性を測定した。その結果、KS22/pAra-CdsA においても *cat* 活性は低温下において~1.5 倍増加した (図 52)。C4- pCD2- $\Delta 3'$ における *cat* 活性は KS22 の約 2 倍であるが、これは、PS259 株は *recA*⁺であるため、細胞内でプラスミドが二量体化しているためであると考えられる。これらの結果は、C4-pCD2- $\Delta 3'$ は染色体上の応答を反映していることを示している。C4-pCD2- $\Delta 3'$ から P3 プロモーターを削除した場合 (C3-pCD2- $\Delta 3'$)、*cat* 活性の増加は観察されなかった (図 52)。これらの結果と一致して、KS22/pAra-CdsA、C4-pCD2- $\Delta 3'$ における *cat* mRNA の RT-PCR 産物のバンドの強度は 20°Cにおいて増加するのに対し、C3-pCD2- $\Delta 3'$ では、*cat*mRNA の低温下における RT-PCR 産物の強度の増加は観察されなかった (図 53)。以上の結果より、プロモーターP3 は低温下における *cdsA* mRNA、および MPIase の増加を長時間維持するために必要であることが示された。

Table 6. *cdsA* 上流のプロモーターの欠損が菌の生育に及ぼす影響

	Chromosome		Plasmid		Growth*			
	<i>cdsA</i>	<i>ynbB</i>	pAra-CdsA	pCD1 derivatives	(+) arabinose		(-) arabinose	
					37°C	20°C	37°C	20°C
EK413	+	+	-	-	++	++	++	++
KS23	Δ	Δ	+	-	++	++	-	-
YS23	Δ	Δ	+	-	++	++	-	-
YS23	Δ	Δ	+	pCD1	+	+	+	+
YS23	Δ	Δ	+	Δ3'	+	+	+	+
YS23	Δ	Δ	+	C1-Δ3'	++	++	-	-
YS23	Δ	Δ	+	C2-Δ3'	++	++	+	-
YS23	Δ	Δ	+	C3-Δ3'	++	++	+	-
YS23	Δ	Δ	+	C4-Δ3'	++	++	++	++
YS23	Δ	Δ	+	C5-Δ3'	++	++	++	++
YS23	Δ	Δ	+	C6-Δ3'	++	++	++	++

*各株を 0.2%アラビノース添加・非添加の LB 培地に植菌後、37°Cで 18 時間、もしくは 20°Cで 72 時間培養した。“++”は Large サイズのコロニー、“+”は Small サイズのコロニー、“-”は生育が観察されなかったことを示す。

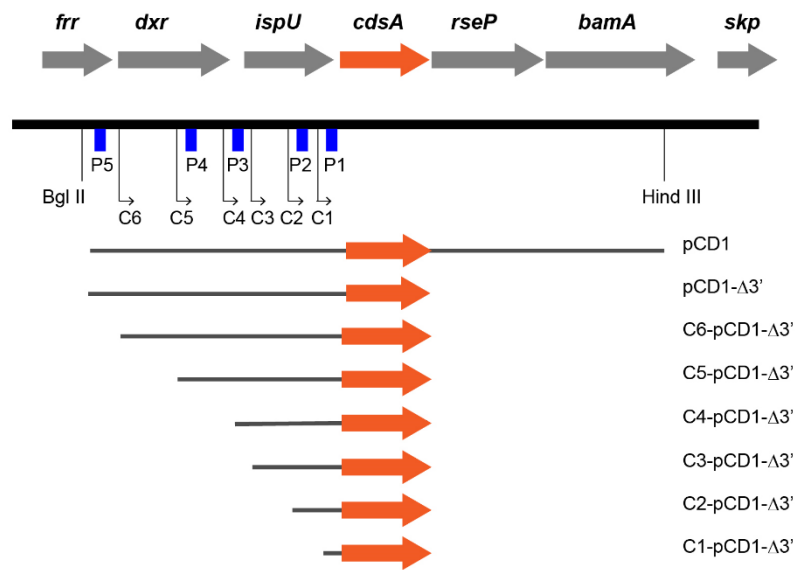


図 49. pCD1 とその誘導体の構造。

pCD1 は *cdsA* 遺伝子を含む 5.8 kbp の BglII ~ HindIII DNA 断片を pUC19 ベクターの BamHI/HindIII 部位に連結したものである。矢印は C1- ~ C6-pCD1-Δ3' における *cdsA* 遺伝子の上流の 5' 末端を示す。青四角は σ^{70} の結合サイトを示す。三角は各プライマーの位置と方向を示す。

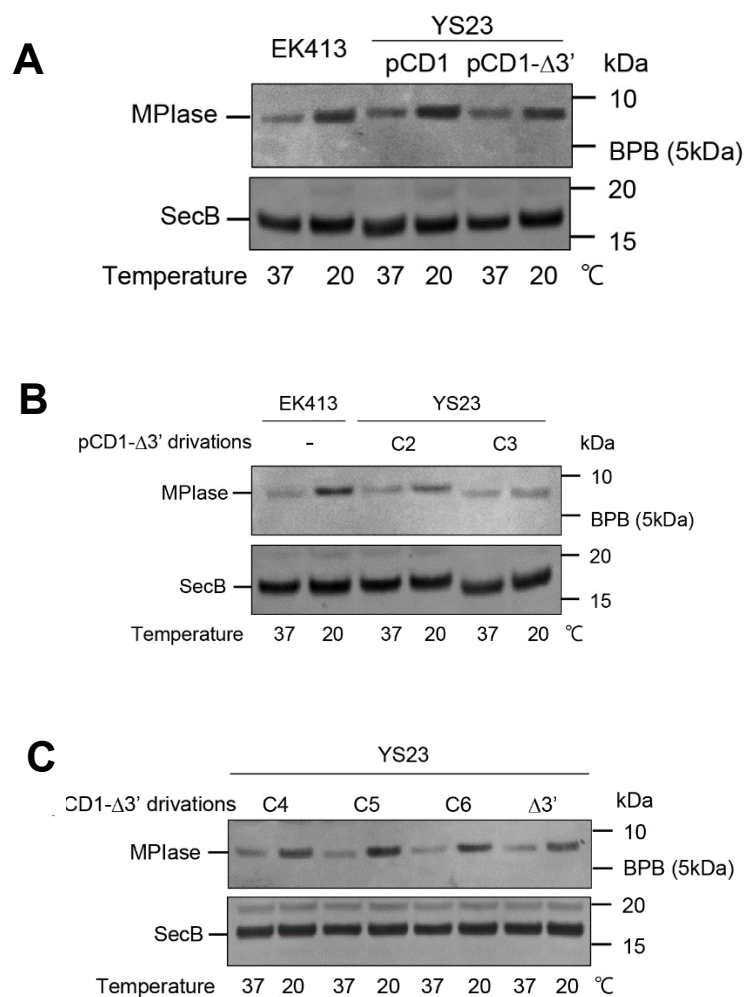


図 50. *cdsA* 遺伝子の上流、下流領域の欠損が低温下における MPIase の増加に及ぼす影響。

一晚培養した各株を 1:100 希釈で LB 培地に植菌し、37°C で培養した。"20°C" では、菌が OD₆₆₀ ~0.4 まで達した時点で、培養液を 20°C に移し、さらに 2 時間培養した。MPIase、SecB をウェスタン・ブロッティングにより検出した。

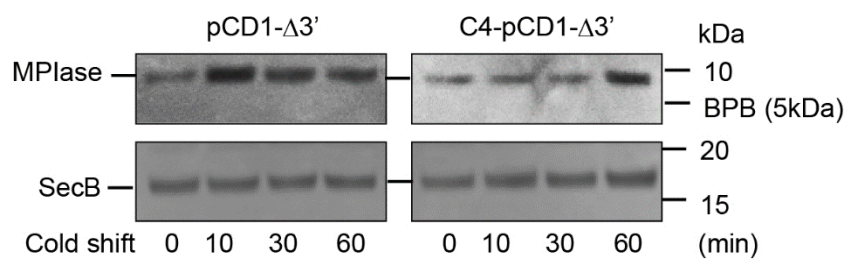


図 51. P5 (P4)、P3 が低温下での MPIase の増加に及ぼす影響。

一晚培養した YS23/pAra-CdsA/pCD1-Δ3'、YS23/pAra-CdsA/C4-pCD1-Δ3' を LB 培地に 1:100 希釈で植菌し、37°C で培養した。菌が OD₆₆₀ ~ 0.8 に達した時点で培養液を 20°C に移した。各時間における MPIase、SecB をウエスタン・ブロッティングにより検出した。

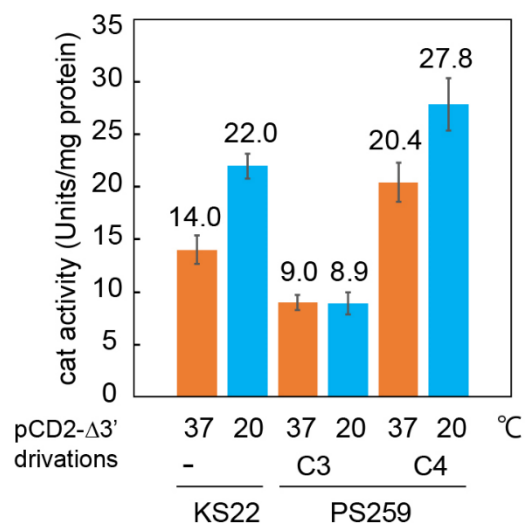


図 52. cat レポーターアッセイによる低温下における P3 プロモーターの活性の評価。

一晩培養した KS22/pAra-CdsA、PS259/C3-pCD2-Δ3'、 PS259/C3-pCD2-Δ3' を 1:100 希釈で LB 培地に植菌し、37°C で培養した。KS22/pAra-CdsA では培地に 0.2% アラビノースを加え培養した。"20°C" では、菌が OD₆₆₀ ~ 0.4 に達した時点で培養液を 20°C に移し、さらに 2 時間培養した。cat 活性は、材料と方法に示した方法で測定した。独立した 3 回の実験から SD を求め、エラーバーで示した。

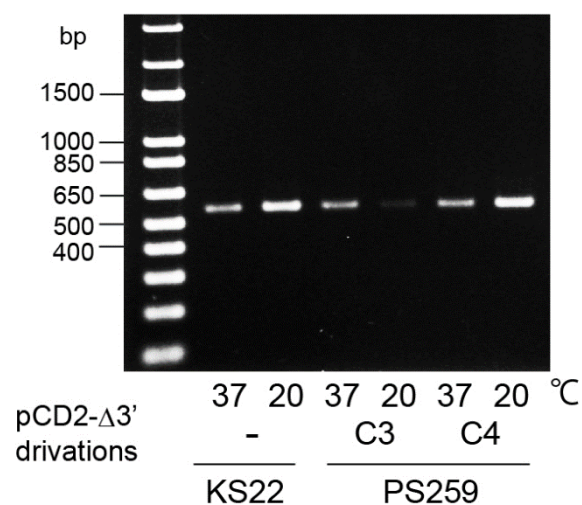


図 53. 低温下における *cat* mRNA 量の変化。

一晩培養した KS22/pAra-CdsA、PS259/C3-pCD2-Δ3'、 PS259/C4-pCD2-Δ3'を 1:100 希釈で LB 培地に植菌し、37°Cで培養した。KS22/pAra-CdsA では培地に 0.2%アラビノースを加え培養した。"20°C" では、菌が OD₆₆₀~0.4 に達した時点で培養液を 20°Cに移し、さらに 2 時間培養した。フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により RNA 画分を調製した。*cat* mRNA を cat-5'/cat-3'comp プライマーを用いて RT-PCR により増幅した。

(4) 低温下での *cdsA* mRNA の増加と mRNA の安定性との関連

大腸菌が低温に曝露された場合、低温ショックタンパク質と呼ばれるストレス応答タンパク質の発現が一過的に誘導される (83, 84)。低温では低温ショックタンパク質をコードする mRNA の安定性が著しく上昇することが知られている (85-87)。これらの mRNA の 5'末端にはステム・ループ構造が存在する。低温下ではステム・ループ構造が形成され、mRNA の分解が防がれるため、mRNA の安定性が著しく上昇する (87, 88)。*cdsA* 遺伝子開始コドンの上流にはステム・ループ構造を形成しうる配列が存在する (図 54)。このステム・ループ構造が低温下において *cdsA* mRNA の安定化し、低温下における *cdsA* mRNA が増加する可能性が考えられた。*cdsA* 遺伝子上流のステム・ループ構造が低温下での *cdsA* mRNA の増加に関与するかどうかを調べるため、プライマー F1/R1、および F2/R1 により増幅される mRNA の半減期をリファンピシン・チェイス法により調べた。プライマー F1/R1 により増幅される mRNA の半減期は 37°C では 2.5 分であるのに対して、20°C では 7.8 分と低温下で約 3 倍増加した (図 55)。プライマー F2/R1 により増幅される mRNA においても、37°C の 3.2 分に対して 20°C では 9.5 分と低温下で約 3 倍増加した (図 56)。低温下で mRNA 量が増加しない *tufA* mRNA の半減期も低温下で約 3.5 倍増加する様子が観察された (図 57)。これらの結果から、mRNA の安定化は低温下における *cdsA* mRNA の増加には関係ないことが示された。

TGAACAAGAC TTTGAAGGGG CGTTAAATGC CTTTGCTAAT CGAGAGCGTC
F2 primer
▼▼▼ ▼▼▼ ▼▼▼ ————— ▼▼▼ ▼▼▼ ▼▼▼
GTTTCGGCGG CACCGAGCCC GGTGATGAAA CAGCCTGATG GGGGTCGCTT
ispU
stop codon
TTGCTGAAAGT ATCGCCTGAT ATCTGCTTTT GTGTTAATAC CCGTCGTCAT
cdsA
start codon F1 primer

図 54. *cdsA* 遺伝子の開始コドン近傍の遺伝子配列。

プライマーF1、F2 の位置を下線で示す。ステム・ループを形成しうる配列を”▼”および、”-”で示した。

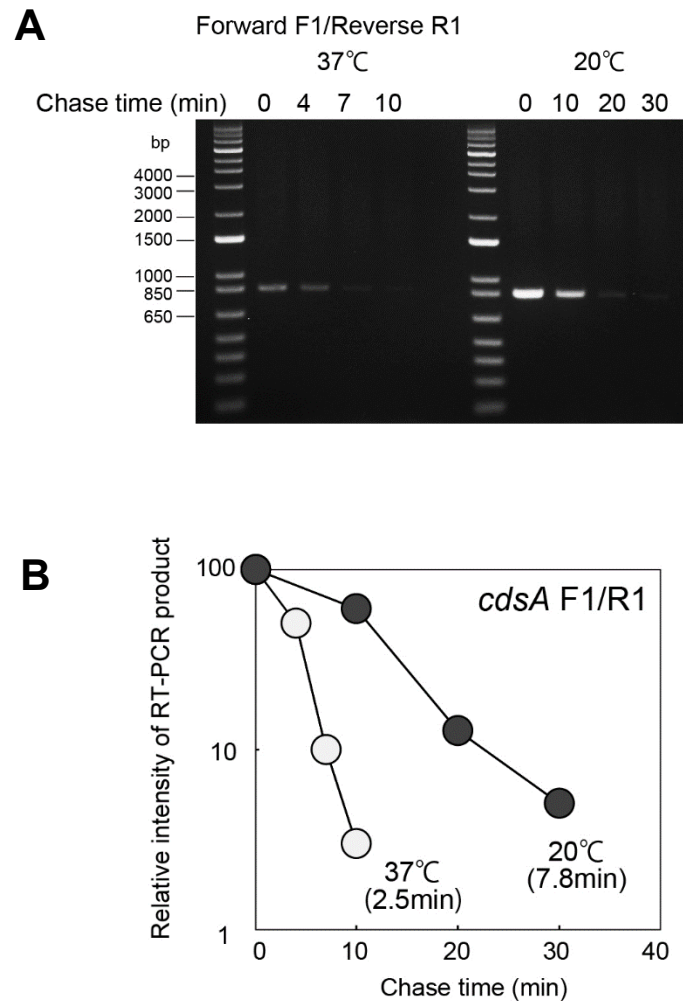


図 55. F1/R1 プライマーで増幅される *cdsA* mRNA のリファンピシン・チェイス実験による安定性の解析。

(A) 一晚培養した EK413 を LB 培地に 1:100 希釈で植菌し、37°C で培養した。"20°C" では、菌が OD₆₆₀ ~ 0.4 に達した時点で、リファンピシンを添加し、培養液を 20°C に移した。図に示す時間培養した後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により RNA 画分を調製した。F1/R1 プライマーを用いて mRNA を RT-PCR により増幅した。

(B) RT-PCR 産物のバンドの強度を CS analyzer (ATTO) により定量し、チェイス時間に対してプロットした。

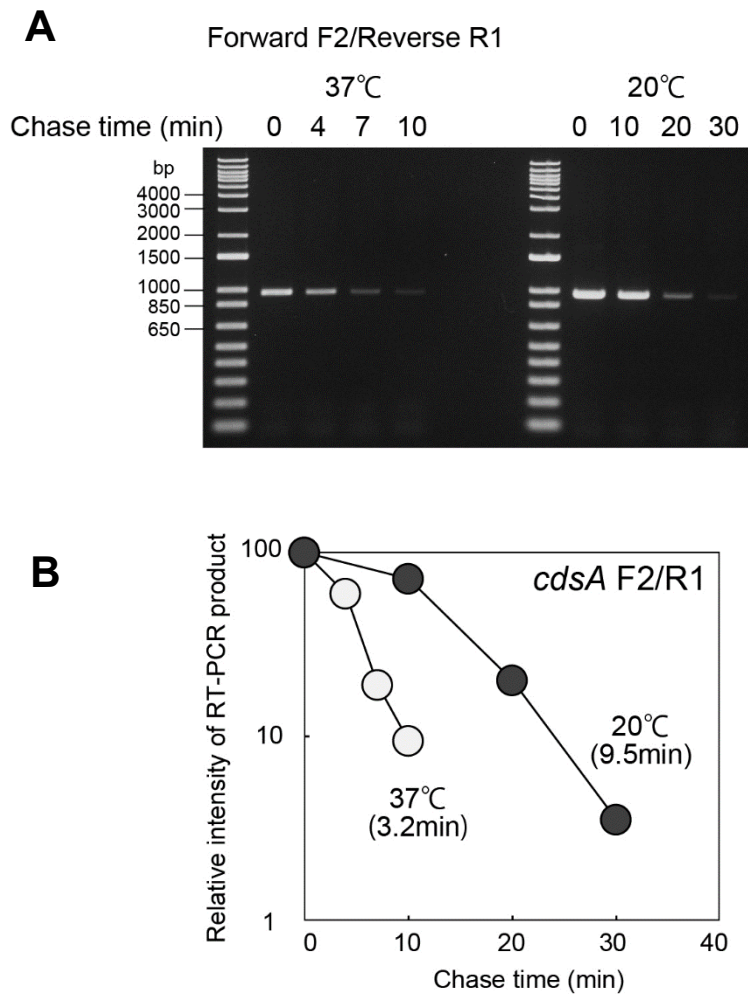


図 54. F2/R1 プライマーで増幅される *cdsA* mRNA のリファンピシン・チェイス実験による安定性の解析。

(A) 一晚培養した EK413 を LB 培地に 1:100 希釈で植菌し、37°C で培養した。"20°C" では、菌が OD₆₆₀ ~ 0.4 に達した時点で、リファンピシンを添加し、培養液を 20°C に移した。各時間培養した後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により RNA 画分を調製した。F2/R1 プライマーを用いて mRNA を RT-PCR により増幅した。

(B) RT-PCR 産物のバンドの強度を CS analyzer (ATTO) により定量し、チェイス時間に対してプロットした。

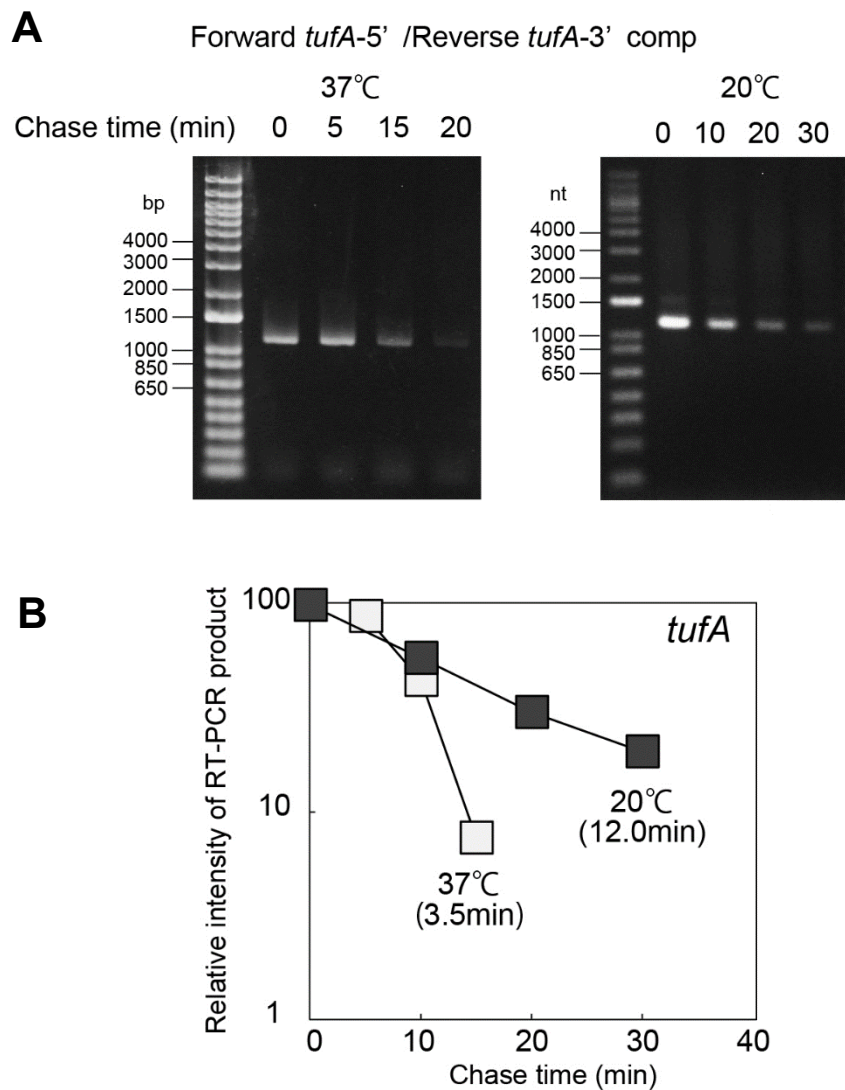


図 55. *tufA* mRNA のリファンピシン・チェイス実験による安定性の解析。

(A) 一晚培養した EK413 を LB 培地に 1:100 希釈で植菌し、37°C で培養した。"20°C" では、菌が OD₆₆₀ ~ 0.4 に達した時点で、リファンピシンを添加し、培養液を 20°C に移した。図に示す時間培養した後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により RNA 画分を調製した。*tufA*-5'/*tufA*-3' comp プライマーを用いて mRNA を RT-PCR により増幅した。

(B) RT-PCR 産物のバンドの強度を CS analyzer (ATTO) により定量し、チェイス時間に対してプロットした。

3-3. 考察

第3章では、低温下での MPIase 量の増加に関与する *cdsA* 遺伝子のプロモーター領域を明らかにした。これまで、*cdsA* 遺伝子は *ispU-cdsA-rseP-bamA* mRNA として転写されると考えられてきたが、実験的に実証されていなかった。また、*cdsA* 遺伝子上流にはプロモーターと予想される配列はいくつか見受けられるものの、低温下における CdsA の発現誘導に関与する領域は不明であった。本研究では、低温下における *cdsA* mRNA の増加には、*ispU* 上流のプロモーターP3、*dxr* 上流のプロモーターP5 の2つのプロモーター領域が関与することを明らかにした。プロモーターP5 は低温を感知後、ただちに活性化され、*dxr-ispU-cdsA* mRNA 量は著しく増加する。しかしながら、この mRNA の増加は一過的であり、その量は時間の経過と共に減衰した。一方、プロモーターP3 は P5 プロモーターに遅れて活性化され、*ispU-cdsA* mRNA は低温下において長時間増加し続けた。これらのことから、プロモーターP5 による初期段階の応答、これに続くプロモーターP3 による後期段階の応答の2段階の制御により、*cdsA* mRNA および MPIase は低温を感知後すぐに増加し、その量が長時間維持されることが示された。

菌が低温環境に直面すると、一連の低温ショックタンパク質が誘導される (83, 84)。低温ショックタンパク質の誘導は一過的であり、時間の経過に伴ってその量は減衰する (83, 84)。大腸菌における主要な低温ショックタンパク質である CspA の発現量は低温下で一過的に増加する (83, 84)。低温で誘導性の *cspA* 遺伝子のプロモーターを低温下で誘導されない別のプロモーターに置換した場合でも、CspA の低温下における一過的な増加は観察される (87)。*cdsA* mRNA の安定性は、低温下において著しく上昇する (85, 87)。*cspA* mRNA の開始コドン上流にはステム・ループ構造を形成する配列が存在する。低温下では、ステム・ループ構造の形成が RNase による分解を防ぎ、*cspA* mRNA の安定性は常温下の～60 倍となる (86, 88)。このような mRNA の2次構造の変化による安定化は、低温ショックタンパク質の発現誘導における主要な戦略の1つである。*cdsA* 遺伝子の開始コドン上流にもステ

ム・ループ構造を形成しうる配列が存在する。しかしながら、低温下での *cdsA* mRNA の半減期の増加は常温下の 3 倍程度であり、低温下で発現量が増加しないことが知られている *tufA* mRNA との違いが認められなかった。これらのことから、低温下における *cdsA* mRNA の増加は、転写段階での制御によるものであると結論した。

低温下では、*dxr-ispU-cdsA* mRNA と *ispU-cdsA* mRNA が増加するため、*cdsA* mRNA に加えて、*dxr* mRNA や *ispU* mRNA も増加する。Dxr は 1-deoxy-D-5-phosphate reductoisomerase であり (89)、IspU は undecaprenyl diphosphate synthase である (90, 91)。どちらも、ウンデカプレノールの生合成反応に関与する (43, 92)。ペプチドグリカンや外膜抗原 ECA の糖鎖部分はウンデカプレノール上で伸長する。これまでに、低温下でウンデカプレノールが増加するとの報告はない。なぜ、ウンデカプレノールが増加する必要があるのかについては全く不明である。低温下では、膜の流動性が低下するため、膜脂質の流動性を上昇させるために膜脂質中の不飽和脂肪酸が大幅に増加する (76)。ウンデカプレノールはイソプレンが重合して生合成されるため、多くの二重結合をもつ。低温下ではウンデカプレノールを増加させることで膜脂質の流動性を上昇させているのかもしれない。

3-4. 材料と方法

(1) 材料

制限酵素、DNA Ligation Kit <Mighty Mix>、PrimeSTAR® HS DNA Polymerase、BcaBEST RNA PCR system はタカラバイオ株式会社より購入した。オリゴ DNA は Integrate DNA Technologies より購入した。QIAprep Spin Miniprep Kit は QIAGEN より購入した。Wizard® SV Gel PCR Clean-Up System、RNase free DNase は Promega より購入した。抗 MPIase 抗体 (27)、抗 SecB 抗体 (58) はウサギを免疫して得られた抗体である。アルカリフォスファターゼ標識ウサギ抗体 (Reserve AP™ Phosphate Labeled Goat anti-Rabbit IgG (H+L)) は Vector Laboratories より購入した。ウェスタン・ブロッティング発色試薬

NBT/BCIP は Promega より購入した。アラビノース、リファンピシン、5,5'-ジチオビス 2-ニトロ安息香酸 (DNTB) は Sigma より購入した。アセチル CoA は Roche より購入した。第 3 章で使用した菌株、およびプラスミドを Table 7 に示した。第 3 章で使用したオリゴヌクレオチドを Table 8 に示した。

Table 7. 第 3 章で使用した大腸菌株、およびプラスミド

Strains and plasmids	Relevant genotype and description	Reference
EK413	MC4100 <i>ara</i> ⁺	(66)
PS259	<i>phoAΔPvuII lacΔX74 galE galK rpsL pcnB80 zad1::Tn10</i>	(60)
KS22	EK413 $\Delta cdsA::cat$	第 1 章
KS23	EK413 $\Delta ynbB \Delta cdsA::cat$	第 1 章
YS23	EK413 $\Delta ynbB \Delta cdsA::cat pcnB80 zad1::Tn10$	This study
pAra-CdsA	<i>cdsA</i> was cloned into pKQ2 under control of arabinose promoter, spectinomycin-resistant	第 1 章
pCD1	5.8 kb fragment containing 2.6 kb upstream and 2.2 kb downstream of <i>cdsA</i> was cloned into BamHI/HindIII site of pUC19 in opposite direction to <i>lac</i> promoter, ampicillin-resistant	第 1 章
pCD1- $\Delta 3'$	Derivative of pCD1 with 2.2 kb downstream of the <i>cdsA</i> gene deletion	This study
C1-pCD1- $\Delta 3'$	Derivative of pCD1- $\Delta 3'$ with upstream of P1 promoter deletion	This study
C2-pCD1- $\Delta 3'$	Derivative of pCD1- $\Delta 3'$ with upstream of P2 promoter deletion	This study
C3-pCD1- $\Delta 3'$	Derivative of pCD1- $\Delta 3'$ with promoter P3, P4, and P5 deletion	This study
C4-pCD1- $\Delta 3'$	Derivative of pCD1- $\Delta 3'$ with promoter P4 and P5 deletion	This study
C5-pCD1- $\Delta 3'$	Derivative of pCD1- $\Delta 3'$ with upstream of promoter P4 deletion'	This study
C6-pCD1- $\Delta 3'$	Derivative of pCD1- $\Delta 3'$ with promoter P5 deletion	This study
C3-pCD2- $\Delta 3'$	Open reading frame of <i>cdsA</i> in C3-pCD1- $\Delta 3'$ was replaced with that of <i>cat</i>	This study
C4-pCD2- $\Delta 3'$	Open reading frame of <i>cdsA</i> in C4-pCD1- $\Delta 3'$ was replaced with that of <i>cat</i>	This study

Table 8. 第3章で使したオリゴヌクレオチド

Name	Sequence (5'→3')	Purpose
F1	TTGCTGAAGTATCGCCTGAT	RT-PCR
F2	CAAGACTTTGAAGGGGCG	RT-PCR
F3	GGGGAGCATCGCATTAG	RT-PCR
F4	AGTTGGCTTTATAAGGTCAG	RT-PCR
F5	CCGGCTACAGAGAGTCG	RT-PCR
F6	GCGATGGAGGCGTTCG	RT-PCR
F7	GGCGTGAAGCCGCTCG	RT-PCR
F8	TCTGGGCTCGACCGGCTCGA	RT-PCR
F9	CAGTACGTAACGTGCGTCG	RT-PCR
R1	TTAAAGCGTCCTGAATACCA	RT-PCR
tufA-5'	ACGTACAAAACCGCACGTTA	RT-PCR
tufA-3'comp	TTAGCCCAGAACTTTAGCAA	RT-PCR
cdsA HindIII-5'	AAAAAAGCTTTTAAAGCGTCCTGAATAC C	Construction of pCD1-Δ3'
pUC19 HindIII-3'comp	AAAAAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATA G	Construction of pCD1-Δ3'
pUC19 BglII-5'	AAAAAGATCTCCGGGTACCGAGCTCGTG GTG	Construction of C1- ~C6- pCD1-Δ3'
C1-BglII-3'comp	AAAAAGATCTCAAGACTTTGAAGGGGCG TT	Construction of C1-pCD1- Δ3'
C2-BglII-3'comp	AAAAAGATCTGGGGAGCATCGCATTAGT AA	Construction of C2-pCD1- Δ3'
C3-BglII-3'comp	AAAA AGATCTAGTTGGCTTTATAAGGTCAG	Construction of C3-pCD1- Δ3'
C4-BglII-3'comp	AAAAAGATCTCCGGCTACAGAGAGTCGC GC	Construction of C4-pCD1- Δ3'
C5-BglII-3'comp	AAAAAGATCTGGCGTGAAGCCGCTCGAT TT	Construction of C5-pCD1- Δ3'
C6-BglII-3'comp	AAAAAGATCTTCTGGGCTCGACCGGCTC GA	Construction of C6-pCD1- Δ3'
pCD1 up	AAAAGCAGATATCAGGCGATACTTCAGC ATATGCGACCCCATCAGGCTG	Construction of C3- and C4- pCD2-Δ3'
cat-5' NdeI	ACTTAAGGGTTTTCTACATATGGAGAAA AAAATCACTGG	Construction of C3- and C4- pCD2-Δ3'

cat-3' comp HindIII	TGAAGCTTACGTTGGTTCATTAGGCGC	Construction of C3- and C4-
	CGCCCTGCCACTCATCGCAGTA	pCD2-Δ3'
cat-5'	ATCACTGGATATAACCACCGT	RT-PCR
cat-3' comp	CTGAATCGCCAGCGGCATCA	RT-PCR

(2) プラスミドの構築

C1- ~ C6-pCD1-Δ3'は以下の手順で構築した。pCD1 を鋳型として *cdsA* 遺伝子の下流 2.2 kb を除く領域を pUC19 HindIII-3'comp/*cdsA* HindIII-5'プライマーを用いて PCR により増幅した。PCR 産物を HindIII で制限酵素処理後、環状化した (pCD1-Δ3')。pCD1-Δ3'を鋳型として、pUC19 BglIII-5'/*cdsA* C1、C2、C3、C4、C5、C6 BglIII-3'comp プライマーを用いて増幅し *cdsA* 遺伝子上流のプロモーターと予想される配列を削除した。これらの PCR 産物を BglIII 制限酵素処理後、環状化した (C1- ~ C6-pCD1-Δ3')。

C3-、C4-pCD2-Δ3'は以下の手順で構築した。C3-、C4-pCD1-Δ3'を鋳型として pCD1 up/pUC19 HindIII-3'comp プライマーを用いて開始コドンに NdeI 部位、終始コドンの直後に HindIII 部位を付加し、*cdsA* 遺伝子の開始コドンから終始コドンまでを除いた領域を PCR により増幅した。この PCR 断片の NdeI/HindIII 部位に、cat-5'NdeI/cat-3'comp HindIII プライマーを用いて増幅した *cat* 遺伝子を連結した (C3-、C4-pCD2-Δ3')。

(2) RT-PCR

RNA 画分は大腸菌培養液とフェノール/クロロホルム混合溶液を 1:1 で混合後、水層をエタノール沈殿し調製した。RNA 画分を 1 u/μL の RNase free DNase で 37°C 30 分間処理した。65°C で 10 分加熱し DNase を失活させた後、RNA 画分 (50 ng) を BcaBEST RNA PCR system により RT-PCR を行った。R1 プライマー、*tufA*-3'comp プライマー、cat-3'comp プライマーを RNA にアニール後、BcaBEST polymerase を用いて cDNA を合成した。その後、Taq polymerase を加え、94°C-30 秒、50°C-30 秒、72°C-60 秒~300 秒の温度サイクルを 30 回繰り返して、cDNA を増幅した。*cdsA* を含む mRNA を増幅する際は、F1 ~ F9/R1 プラ

イマーを用いた。tufA mRNA を増幅する際は tufA-5'/tufA-3'comp プライマーを用いた。cat mRNA を増幅する際は cat-5'/cat-3'comp プライマーを用いた。

(3) cat レポーターアッセイ

大腸菌を 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)/10% glycerol に懸濁後、超音波破碎機により細胞を破壊した。16,000 x g, 5 分間の遠心により未破碎の細胞を除去後、上清を 4°C で 160,000 x g で 60 分間遠心し、膜画分を除いた。上清を細胞質画分として使用した。細胞質画分を 100 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.08 mM DTNB、0.2 mM アセチル CoA、0.005% (w/v) クロラムフェニコールに加え、25°C で 10 分保温した。保温後、412 nm の吸光度を測定した。

(4) リファンピシン・チェイス実験

大腸菌を 37°C で OD₆₆₀ ~ 0.8 まで培養後、培養液を 20°C に移した。20°C で 1 時間培養した後、150 µg/mL のリファンピシンを添加した。各時間における RNA 画分を調製し、材料と方法にあるように RT-PCR を行った。

(5) その他

MPIase、SecB は 12.5% acrylamide-0.27% *N,N'*-bismethyleneacrylamide ゲルを用いて SDS-PAGE により解析した (71)。ウエスタン・ブロットのバンドは CS analyzer (ATTO) により定量した。タンパク質濃度は BSA を標準としてローリー法により定量した (73)。

総合考察

Blobel らによる「シグナル仮説」が提唱されてから約 50 年が経過し、タンパク質膜挿入反応・膜透過反応の分子機構の理解は大きく進展した。Sec トランスロコンや SRP/SR などの膜挿入・膜透過反応に関与する因子が次々と発見され、それらの機能が詳細に解析されてきた。これらの因子はすべての生物種に存在することから、タンパク質膜挿入反応・膜透過反応の分子機構は基本的なレベルではすべての生物種間で保存されていると考えられている (8, 9, 14)。MPIase は大腸菌の細胞質膜から同定された。MPIase は糖脂質でありながら、タンパク質膜挿入反応を触媒する機能をもつことから、「糖脂質酵素 (Glycolipozyme)」という新たな概念が提唱されている (27)。本研究では MPIase 生合成反応における律速段階を触媒する酵素として CdsA、およびそのパラログである YnbB を同定した。CdsA のホモログは生物種間に広く保存されている。酵母やヒトの CdsA ホモログである Cds1p は、大腸菌内で MPIase を生合成することができた。すなわち、他の生物種の CdsA ホモログにも MPIase 生合成能が備わっていることが示された。これらのことから、真核細胞にも MPIase 様物質が存在する可能性が示唆される。当研究室、関谷らはシロイヌナズナの葉緑体に発現する Cds4p、Cds5p も大腸菌内で MPIase 生合成反応を行うことを明らかにした (論文準備中)。葉緑体のチラコイド膜のタンパク質膜挿入・膜透過反応の分子機構は、バクテリアの膜挿入・膜透過反応の分子機構と特に類似性が高い。チラコイド膜における膜挿入・膜透過反応は 4 つの経路により進行する (99, 100)。1 つ目は、Sec トランスロコンを介した膜透過反応である (101)。この反応は ATPase 活性をもつ SecA により駆動される (102)。真核細胞内で SecA が駆動する膜透過反応はチラコイド膜でのみ観察される。2 つ目は、TAT (Twin Arginine Translocation) 膜透過経路である。TAT 膜透過反応では、折り畳みが終了したタンパク質が TAT 膜透過装置を介して膜透過される (103)。TAT 膜透過経路で膜透過するタンパク質のシグナル配列には 2 つの連続したアルギニン残基が保存されていることが、この経路の名前の由来である。TAT 膜透過反応は葉緑体とバクテリアに保存されている。

3 つ目は SRP/SR に依存した膜挿入反応である。この膜挿入反応では、SRP/SR によりチラコイド膜上に輸送されたポリペプチドが、YidC ホモログである Alb3 を介して膜挿入される (104)。4 つ目は、タンパク質性因子を必要としない膜挿入反応である。この経路では、膜タンパク質は自発的に膜挿入されると考えられている (100)。細胞内において無秩序な膜挿入反応は起こりえないと考えられるため、チラコイド膜における自発的膜挿入反応も DAG のような膜脂質により抑制されているはずである。チラコイド膜における膜挿入・膜透過反応の分子機構がバクテリアものと類似していること、タンパク質性の因子に依存しない膜挿入経路が知られていること、また、シロイヌナズナの Cds4p や Cds5p は大腸菌内で MPIase 生合成活性をもっていたことより、チラコイド膜内には MPIase 様物質が存在する可能性が特に高いと考えられる。この場合、チラコイド膜における Sec トランスロコンを介した膜透過反応や、YidC ホモログである Alb3 による膜挿入反応にも MPIase 様物質が関与することが予想される。葉緑体のタンパク質膜挿入・膜透過反応も低温に感受性の反応である。大腸菌では、低温下での効率の良い膜透過反応には MPIase の増加が必要であった。葉緑体の MPIase 様物質の発現量を増加させれば、膜透過反応の低温感受性を抑制できるかもしれない。一方、MPIase の増加は低温下での効率的な膜挿入反応には必要ではなかった。葉緑体の膜挿入反応の低温感受性を抑制するためには、MPIase 様物質の量を増加させるだけでなく、化学構造を低温での膜挿入反応に適したものに変えるなどの工夫が必要なのかもしれない。植物のタンパク質膜挿入・膜透過反応の低温感受性を改善することができれば、低温耐性植物の作出が期待できる。MPIase の三糖ユニットを形成する GlcNAc は真核細胞にも豊富に存在するが、ManNAcA や FucNAc はバクテリア特有の糖である。そのため、真核細胞の MPIase 様物質は大腸菌 MPIase と同じような機能は果たすものの、構造は異なっている可能性が高い。また、真核細胞と原核細胞では膜脂質の組成も異なるため、真核細胞の MPIase 様物質は真核細胞の膜脂質に適応した構造をしているかもしれない。今後の研究の進展が待たれる。

MPIase 生合成中間体 Compound I は CDP-DAG が CdsA 内部に保持された状態で GlcNAc-P と反応することにより生合成される。しかしながら、CdsA が単独で Compound I 生合成反応を触媒するののかについては疑問が持たれる。実際に、試験管内無細胞タンパク質合成系で CdsA を合成した場合、CDP-DAG は生合成されるものの、Compound I 生合成反応は進行しなかった。当研究室、亀本により大腸菌内膜画分には CdsA の Compound I 生合成反応を促進する因子が含まれていることが明らかにされている（論文準備中）。この因子が GlcNAc-P のキャリアーとなり CdsA に直接 GlcNAc-P を取り込ませる、あるいは CdsA を GlcNAc-P が取り込みやすい構造に変化させることで Compound I の生合成反応を促進すると考えられる。低温下での MPIase の増加には、CdsA の増加に加え、Compound I 生合成促進因子も増加する可能性も考えられる。この因子の同定により、低温下での MPIase の増加や、CdsA の Compound I 生合成反応のさらに詳細な分子機構の解明が期待できる。

YidC の発見から約 20 年間、Sec 非依存の膜挿入反応は YidC により触媒され则认为されてきた。これに対して本研究では、MPIase が *in vivo* においても Sec 非依存の膜挿入反応に必須であることを示した。本研究の結果は、これまでの 20 年間の YidC の研究、さらには約 40 年間におよぶ Sec 非依存の膜挿入反応についての研究の結果と相いれないものであった。Dalbey らにより、YidC が枯渇した条件であっても、膜挿入反応の初期段階は進行していることが示された (29)。そのため、MPIase は膜挿入反応の初期段階を担うと考えられる。前述のように、F₀c の膜挿入反応には MPIase が必須であり、YidC により促進される。これらのことから、YidC は膜挿入反応の後期段階を担うと考えられる。したがって、MPIase、YidC のどちらかが“insertase”として機能するのではなく、MPIase/YidC が 1 つの“insertase”として機能すると考えられる。MPIase の糖鎖部分は膜タンパクと直接相互作用し、膜タンパク質の凝集を防ぐシャペロン様の機能を果たすことが知られている (27, 28)。すなわち、MPIase は膜表面で基質膜タンパク質を受け取り、膜挿入可能な状態を保持

する。その後、MPIase と YidC の協調作業により膜挿入反応が進行する。一方、MPIase が Sec 依存の膜挿入反応を触媒する分子機構については不明な点が多く残されている。MPIase は SecYEG と相互作用し、二量体構造を大きく変化させる。この SecYEG の二量体構造の変化は効率の良い膜透過反応に必要であるが、Sec 依存の膜挿入反応に必要であるかどうかは不明である。低温下での MPIase の増加が抑制された株では、タンパク質膜透過反応は著しく阻害されたのに対して、Sec 非依存の膜挿入反応や菌の生育の著しい阻害は観察されなかった。そのため、この株では Sec 依存の膜挿入反応は効率良く進行していると予想される。したがって、SecYEG の構造変化は Sec 依存の膜挿入反応には必ずしも必要ではないと考えられる。MPIase は SecYEG と相互作用するとされているが、SecY/E/G のどのサブユニットと、どのように相互作用するのかは不明である。また、SRP/SR によって膜上まで輸送された新生鎖膜タンパク質は SecYEG により膜挿入が触媒されるのか、それとも Sec 非依存の膜挿入反応のように MPIase により膜挿入されるのかは不明である。SecYEG/MPIase による膜挿入反応の分子機構の解明が待たれる。

參考論文

1. Blobel G, Dobberstein B. (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. **67**, 835–851
2. Walter, P., Ibrahimi, I., and Blobel, G. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* **91**, 545–550
3. Walter, P. (2004) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* **91**, 551–556
4. Walter, P., and Blobel, G. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J. Cell Biol.* **91**, 557–561
5. Gorlich, D., and Rapoport, T. A. (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell.* **75**, 615–630
6. Rothman, J. E., and Lenard, J. (1977) Membrane asymmetry. *Science.* **195**, 743–753
7. Jungnickel, B., Rapoport, T. A., and Hartmann, E. (1994) Protein translocation: common themes from bacteria to man. *FEBS Lett.* **346**, 73–77
8. Koch, H.-G., Moser, M., and Muller, M. (2003) Signal recognition particle-dependent protein targeting, universal to all kingdoms of life. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **146**, 55–94
9. Du Plessis, D. J. F., Nouwen, N., and Driessen, A. J. M. (2011) The Sec translocase.

Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. **1808**, 851–865

10. Beckwith, J. (2014) The Sec-depedent pathway. *Res. Microbiol.* **164**, 497–504
11. Facey, S. J., and Kuhn, A. (2004) Membrane integration of E. coli model membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1694**, 55–66
12. Xie, K., and Dalbey, R. E. (2008) Inserting proteins into the bacterial cytoplasmic membrane using the Sec and YidC translocase. *Nat Rev Microbiol.* **6**, 234–244
13. David Akopian, Kuang Shen, Xin Zhang, and Shu-ou Shan (2013) Signal Recognition Particle: An essential protein targeting machine. *Annu Rev Biochem.* **82**, 693–721
14. Kiefer, D., and Kuhn, A. (2018) YidC-mediated membrane insertion. *FEMS Microbiol. Lett.* **362**, 12
15. Kiefer, D., and Kuhn, A. (1999) Hydrophobic forces drive spontaneous membrane insertion of the bacteriophage Pf3 coat protein without topological control. *EMBO J.* **18**, 6299–6306
16. Samuelson, J. C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G. J., and Dalbey, R. E. (2000) YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature.* **406**, 637–641
17. Van Der Laan, M., Bechduft, P., Kol, S., Nouwen, N., and Driessen, A. J. M. (2004) F₁F₀ ATP synthase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis. *J. Cell Biol.* **165**, 213–222
18. Van Bloois, E., Jan Haan, G., De Gier, J. W., Oudega, B., and Luirink, J. (2004) F₁F₀ ATP synthase subunit c is targeted by the SRP to YidC in the E. coli inner membrane. *FEBS Lett.* **576**, 97–100
19. Celebi, N., Yi, L., Facey, S. J., Kuhn, A., and Dalbey, R. E. (2006) Membrane biogenesis of subunit II of cytochrome bo oxidase: Contrasting requirements for insertion of N-

- terminal and C-terminal domains. *J. Mol. Biol.* **357**, 1428–1436
20. Nagamori, S., Smirnova, I. N., and Kaback, H. R. (2004) Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins. *J. Cell Biol.* **165**, 53–62
 21. Serek, J., Bauer-Manz, G., Struhalla, G., Van Den Berg, L., Kiefer, D., Dalbey, R., and Kuhn, A. (2004) *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO J.* **23**, 294–301
 22. Stiegler, N., Dalbey, R. E., and Kuhn, A. (2011) M13 procoat protein insertion into YidC and SecYEG proteoliposomes and liposomes. *J. Mol. Biol.* **406**, 362–370
 23. Nishiyama, K., Ikegami, A., Moser, M., Schiltz, E., Tokuda, H., and Müller, M. (2006) A derivative of lipid A is involved in signal recognition particle/SecYEG-dependent and -independent membrane integrations. *J. Biol. Chem.* **281**, 35667–35676
 24. Kawashima, Y., Miyazaki, E., Müller, M., Tokuda, H., and Nishiyama, K. I. (2008) Diacylglycerol specifically blocks spontaneous integration of membrane proteins and allows detection of a factor-assisted integration. *J. Biol. Chem.* **283**, 24489–24496
 25. Alwarawrah, M., Dai, J., and Huang, J. (2012) Modification of lipid bilayer structure by diacylglycerol: a comparative study of diacylglycerol and cholesterol. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 749–758
 26. Nishiyama, K., Maeda, M., Abe, M., Kanamori, T., Shimamoto, K., Kusumoto, S., Ueda, T., and Tokuda, H. (2010) A novel complete reconstitution system for membrane integration of the simplest membrane protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 733–736
 27. Nishiyama, K., Maeda, M., Yanagisawa, K., Nagase, R., Komura, H., Iwashita, T., Yamagaki, T., Kusumoto, S., Tokuda, H., and Shimamoto, K. (2012) MPIase is a glycolipozyme essential for membrane protein integration. *Nat. Commun.* **3**, 1260

28. Fujikawa, K., Suzuki, S., Nagase, R., Ikeda, S., Mori, S., Nomura, K., Nishiyama, K. I., and Shimamoto, K. (2018) Syntheses and activities of the functional structures of a glycolipid essential for membrane protein integration. *ACS Chem. Biol.* **13**, 2719–2727
29. Nomura, K., Yamaguchi, T., Mori, S., Fujikawa, K., Nishiyama, K.-I., Shimanouchi, T., Tanimoto, Y., Morigaki, K., and Shimamoto, K. (2019) Alteration of membrane physicochemical properties by two factors for membrane protein integration. *Biophys. J.* **116**, 1-12
30. Samuelson, J. C., Jiang, F., Yi, L., Chen, M., De Gier, J. W., Kuhn, A., and Dalbey, R. E. (2001) Function of YidC for the insertion of M13 procoat protein in *Escherichia coli*: Translocation of mutants that show differences in their membrane potential dependence and Sec requirement. *J. Biol. Chem.* **276**, 34847–34852
31. van der Laan, M., Urbanus, M. L., ten Hagen-Jongman, C. M., Nouwen, N., Oudega, B., Harms, N., Driessen, A. J. M., and Lührink, J. (2003) A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 5801–5806
32. Robinson, P. J., and Woolhead, C. A. (2013) Post-translational membrane insertion of an endogenous YidC substrate. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1833**, 2781–2788
33. Nishikawa, H., Sasaki, M., and Nishiyama, K. (2017) Membrane insertion of F₀c subunit of F₀F₁-ATPase depends on glycolipozyme MPIase and is stimulated by YidC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **487**, 477–482
34. Fillingame, R. H. (1997) Coupling H⁺ transport and ATP synthesis in F₁F₀-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine. *J. Exp. Biol.* **200**, 217–24
35. Boyd, D., Boyd, D., Beckwith, J., and Beckwith, J. (2003) The DsbA signal sequence directs efficient, cotranslational export of passenger proteins to the *Escherichia coli*

- periplasm via signal recognition particle pathway. *J. Bacteriol.* **185**, 5706–5713
36. Kim, Y. J., Rajapandi, T., and Oliver, D. (1994) SecA protein is exposed to the periplasmic surface of the *E. coli* inner membrane in its active state. *Cell*. **78**, 845–853
 37. Economou, A., and Wickner, W. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell*. **78**, 835–843
 38. Economou, A., Pogliano, J. A., Beckwith, J., Oliver, D. B., and Wickner, W. (1995) SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell*. **83**, 1171–1181
 39. Nishiyama, K., Suzuki, T., and Tokuda, H. (1996) Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell*. **85**, 71–81
 40. Nishiyama, K.-I., Mizushima, S., and Tokuda, H. (1993) A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **12**, 3409–3415
 41. Suzuki, H., Nishiyama, K., and Tokuda, H. (1998) Coupled structure change of SecA and SecG revealed by the synthetic lethality of the *secAcsR11* and Δ *secG::kan* double mutant. *Mol. Microbiol.* **29**, 331–341
 42. Moser, M., Nagamori, S., Huber, M., Tokuda, H., and Nishiyama, K. (2013) Glycolipozyme MPIase is essential for topology inversion of SecG during preprotein translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 9734–9739
 43. Mayer, H. (1988) ECA , the enterobacterial common antigen. **54**, 195–222
 44. Rahman, A., Barr, K., and Rick, P. D. (2001) Identification of the structural gene for the TDP-Fuc4NAc: Lipid II Fuc4NAc transferase involved in synthesis of enterobacterial common antigen in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **183**, 6509–6516
 45. Kajimura, J., Rahman, A., and Rick, P. D. (2005) Assembly of cyclic enterobacterial

- common antigen in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **187**, 6917–6927
46. Rick, P. D., Hubbard, G. L., Kitaoka, M., Nagaki, H., Kinoshita, T., Dowd, S., Simplaceanu, V., and Ho, C. (1998) Characterization of the lipid-carrier involved in the synthesis of enterobacterial common antigen (ECA) and identification of a novel phosphoglyceride in a mutant of *Salmonella typhimurium* defective in ECA synthesis. *Glycobiology*. **8**, 557–567
 47. Friesen, J. D., Parker, J., Watson, R. J., Fill, N. P., Pedersen, S., and Pedersen, F. S. (1976) Isolation of a lambda transducing bacteriophage carrying the *relA* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **127**, 917–922
 48. Raetz, C. R. H. (1978) Enzymology, genetics, and regulation of membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* **42**, 614–659
 49. Icho, T., Sparrow, C. P., and Raetz, C. R. H. (1985) Molecular cloning and sequencing of the gene for CDP-diglyceride synthetase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**, 12078–12083
 50. Sparrow, C. P., and Raetz, C. R. H. (1985) Purification and properties of the membrane-bound CDP-diglyceride synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**, 12084–12091
 51. Ganong, B. R., and Raetz, C. R. H. (1982) Massive accumulation of phosphatidic acid in conditionally lethal CDP-diglyceride synthetase mutants and cytidine auxotrophs of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **257**, 389–394
 52. Icho, T., Bulawa, C. E., and Raetz, C. R. H. (1985) Molecular cloning and sequencing of the gene for CDP-diglyceride hydrolase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**, 12092–12098
 53. Liu, X., Yin, Y., Wu, J., and Liu, Z. (2014) Structure and mechanism of an

- intramembrane liponucleotide synthetase central for phospholipid biosynthesis. *Nat. Commun.* **5**, 4244
54. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006 0008
 55. Cherepanov, P. P., and Wackernagel, W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*. **158**, 9–14
 56. Tamura, Y., Harada, Y., Nishikawa, S. I., Yamano, K., Kamiya, M., Shiota, T., Kuroda, T., Kuge, O., Sesaki, H., Imai, K., Tomii, K., and Endo, T. (2013) Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria. *Cell Metab.* **17**, 709–718
 57. Sato, R., Sawasato, K., and Nishiyama, K. (2019) YnbB is a CdsA paralogue dedicated to biosynthesis of glycolipid MPIase involved in membrane protein integration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **510**, 636–642
 58. Shimizu, H., Nishiyama, K., and Tokuda, H. (1997) Expression of *gpsA* encoding biosynthetic sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase suppresses both the LB-phenotype of a *secB* null mutant and the cold-sensitive phenotype of a *secG* null mutant. *Mol. Microbiol.* **26**, 1013–1021
 59. 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*. *Sci. Rep.* **9**, 1372

60. Nishiyama, K., Kabuyama, Y., Akimaru, J., Matsuyama, S., Tokuda, H., and Mizushima, S. (1991) SecY is an indispensable component of the protein secretory machinery of *Escherichia coli*. *BBA - Biomembr.* **1065**, 89–97
61. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**, 103–119
62. Stahl, F. W., Kobayashi, I., Thaler, D., and Stahl, M. M. (1986) Direction of travel of RecBC recombinaise through bacteriophage lambda DNA. *Genetics.* **113**, 215–227
63. Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130
64. Chen, M., Xie, K., Nouwen, N., Driessen, A. J. M., and Dalbey, R. E. (2003) Conditional lethal mutations separate the M13 procoat and Pf3 coat functions of YidC. *J. Biol. Chem.* **278**, 23295–23300
65. Tathuro Shibui, M. U. and Y. T. (1988) A new hybrid promoter and its expression vector in *Escherichia coli*. *Agric. BioL Chem.* **52**, 983–988
66. Nishiyama, K., Hanada, M., and Tokuda, H. (1994) Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.* **13**, 3272–3277
67. Prentki, P., and Krisch, H. M. (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene.* **29**, 303–313
68. Chang, A. C. Y., and Cohen, S. N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**, 1141–1156
69. Vieira, J., and Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for

- insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*. **19**, 259–268
70. Vieira, J., and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**, 3–11
 71. Hussain, M., Ichihara, S., and Mizushima, S. (1980) Accumulation of glyceride-containing precursor of the outer membrane lipoprotein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* treated with globomycin. *J. Biol. Chem.* **255**, 3707–3712
 72. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685
 73. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275
 74. Pogliano, K. J., and Beckwith, J. (1993) The *Cs sec* mutants of *Escherichia coli* reflect the cold sensitivity of protein export itself. *Genetics*. **133**, 763–773
 75. Murakami, A., Nakatogawa, H., and Ito, K. (2004) Translation arrest of SecM is essential for the basal and regulated expression of SecA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 12330–12335
 76. Marr, A. G., and Ingraham, J. L. (1962) Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **84**, 1260–1267
 77. Taura, T., Akiyama, Y., and Ito, K. (1994) Genetic analysis of SecY: additional export-defective mutations and factors affecting their phenotypes. *MGG Mol. Gen. Genet.* **243**, 261–269
 78. Matsuyama, S., Fujita, Y., and Mizushima, S. (1993) SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **12**, 265–270

79. Tani, K., Tokuda, H., and Mizushima, S. (1990) Translocation of proOmpA possessing an intramolecular disulfide bridge into membrane vesicles of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 17341–17347
80. Kato, J. I., Fujisaki, S., Nakajima, K. I., Nishimura, Y., Sato, M., and Nakano, A. (1999) The *Escherichia coli* homologue of yeast Rer2, a key enzyme of dolichol synthesis, is essential for carrier lipid formation in bacterial cell wall synthesis. *J. Bacteriol.* **181**, 2733–2738
81. Phadtare, S., and Inouye, M. (2004) Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruple-*csp*-deletion strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 7007–7014
82. Masters, M., Colloms, M. D., Oliver, I. R., He, L., MacNaughton, E. J., and Charters, Y. (1993) The *pcnB* gene of *Escherichia coli*, which is required for ColE1 copy number maintenance, is dispensable. *J. Bacteriol.* **175**, 4405–4413
83. Phadtare, S., and Severinov, K. (2010) RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins. *RNA Biol.* **7**, 788–795
84. Yamanaka, K. (1999) Cold shock response in *Escherichia coli*. *J. Mol. microbiol. biotechnol. Journal Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 193–202
85. Goldenberg, D., Azar, I., and Oppenheim, A. B. (1996) Differential mRNA stability of the *cspA* gene in the cold-shock response of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **19**, 241–248
86. Brandi, A., Pietroni, P., Gualerzi, C. O., and Pon, C. L. (1996) Post-transcriptional regulation of CspA expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **19**, 231–240
87. Fang, L., Jiang, W., Bae, W., and Inouye, M. (1997) Promoter-independent cold-shock induction of *cspA* and its derepression at 37°C by mRNA stabilization. *Mol. Microbiol.* **23**, 355–364

88. Xia, B., Ke, H., Jiang, W., and Inouye, M. (2002) The Cold Box stem-loop proximal to the 5'-end of the *Escherichia coli* *cspA* gene stabilizes its mRNA at low temperature. *J. Biol. Chem.* **277**, 6005–6011
89. Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H., and Seto, H. (2002) A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 9879–9884
90. Shimizu, N., Koyama, T., and Ogura, K. (2002) Molecular cloning, expression, and purification of undecaprenyl diphosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **273**, 19476–19481
91. Apfel, C. M., Takacs, B., Fountoulakis, M., Stieger, M., and Keck, W. (1999) Use of genomics to identify bacterial undecaprenyl pyrophosphate synthetase: cloning, expression, and characterization of the essential *uppS* gene. *J. Bacteriol.* **181**, 483–492
92. Bouhss, A., Trunkfield, A. E., Bugg, T. D. H., and Mengin-Lecreulx, D. (2008) The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 208–233
93. Kennedy, E. P., and Weiss, S. B. (1956) The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem.* **222**, 193–214
94. Gibellini, F., and Smith, T. K. (2010) The Kennedy pathway-*de novo* synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life.* **62**, 414–428
95. Wada, H., and Murata, N. (2007) The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis. *Photosynth. Res.* **92**, 205–215
96. Inglis-Broadgate, S. L., Ocaka, L., Banerjee, R., Gaasenbeek, M., Chapple, J. P., Cheetham, M. E., Clark, B. J., Hunt, D. M., and Halford, S. (2005) Isolation and characterization of murine Cds (CDP-diacylglycerol synthase) 1 and 2. *Gene.* **356**, 19–31

97. Volta, M., Bulfone, A., Gattuso, C., Rossi, E., Mariani, M., Consalez, G. G., Zuffardi, O., Ballabio, A., Banfi, S., and Franco, B. (1999) Identification and characterization of *CDS2*, a mammalian homolog of the *Drosophila* CDP-diacylglycerol synthase gene. *Genomics*. **55**, 68–77
98. Saito, S., Goto, K., Tonosaki, A., and Kondo, H. (1997) Gene cloning and characterization of CDP-diacylglycerol synthase from rat brain. *J. Biol. Chem.* **272**, 9503–9509
99. Haselier, A., Akbari, H., Weth, A., Baumgartner, W., and Frentzen, M. (2010) Two closely related genes of *Arabidopsis* encode plastidial cytidinediphosphate diacylglycerol synthases essential for photoautotrophic growth. *Plant Physiol.* **153**, 1372–1384
100. Jarvis, P., and Robinson, C. (2004) Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr. Biol.* **14**, 1064–1077
101. Keegstra, K., and Cline, K. (1999) Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell*. **11**, 557–70
102. Laidler, V., Chaddock, A. M., Knott, T. G., Walker, D., and Robinson, C. (2002) A SecY homolog in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **270**, 17664–17667
103. Nakai, M., Goto, A., Nohara, T., Sugita, D., and Endo, T. (1994) Identification of the SecA protein homolog in pea chloroplasts and its possible involvement in thylakoidal protein transport. *J. Biol. Chem.* **269**, 31338–31341
104. Robinson, C., and Bolhuis, A. (2001) Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 350–356
105. Moore, M., Harrison, M. S., Peterson, E. C., and Henry, R. (2000) Chloroplast Oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. *J. Biol. Chem.* **275**, 1529–1532

106. Ito, K., Mandel, G., and Wickner, W. (1979) Soluble precursor of an integral membrane protein: synthesis of procoat protein in *Escherichia coli* infected with bacteriophage M13. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 1199–1203
107. Date, T., Goodman, J., and Wickner, W. (1980) Procoat, the precursor of M13 coat protein, requires an electrochemical potential for membrane insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 4669–4673
108. Kuhn, A., Wickner, W., and Kreil, G. (1986) The cytoplasmic carboxy terminus of M13 procoat is required for the membrane insertion of its central domain. *Nature.* **322**, 335–339

謝辞

本論文は多くの方々のお力添えにより作成することができました。この場をお借りして感謝申し上げます。主指導教員である西山賢一教授には研究の実施や論文の作成など、多岐に渡るご指導を賜りました。公益社団法人サントリー生命科学財団生物有機化学研究所の島本啓子博士、藤川鉦樹博士、山口敏幸博士には、Compound I の構造解析を実施して頂きました。また、研究を実施するにあたって、多大なご指導、助言を賜りました。京都産業大学の遠藤斗志也教授には第 1 章の論文を投稿する際にご指導を賜りました。山形大学 田村康准教授には Tam41 を用いた実験においてご指導を賜りました。東京大学の上田卓教授、東京工業大学の車ゆうてつ准教授には Compound I の生合成機能の解析についてご指導賜りました。立教大学の岡敏彦教授には CdsA の Compound I 生合成反応の分子機構の解析においてご指導賜りました。副指導教官である山形大学の豊増知伸教授、岩手大学の宮崎雅雄准教授には多大な助言を賜りました。並びに、西山研究室の皆様の支えに心より感謝申し上げます。