

博 士 論 文

タンパク質膜挿入に必須の糖脂質酵素 MPIase の
生合成酵素の同定とその機能解析

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 熱生命システム学講座

佐藤 諒

目次

序論	3 ページ
1. 生体膜の機能	3 ページ
2. 膜を介したタンパク質の局在化、膜輸送	5 ページ
3. タンパク質膜透過機構	6 ページ
4. タンパク質膜挿入機構	9 ページ
5. 自発的膜挿入とその抑制因子	12 ページ
6. 新規タンパク質膜挿入因子 MPIase (<u>M</u> embrane <u>P</u> rotein <u>I</u> ntegrase) の同定	13 ページ
7. MPIase の構造	14 ページ
第 1 章 MPIase の生合成酵素の同定	18 ページ
序論	18 ページ
方法	21 ページ
結果	27 ページ
1. MPIase 生合成第一段階の反応系の構築	27 ページ
2. MPIase 生合成第一段階の反応を触媒する酵素の同定	28 ページ
3. YnbB および CdsA 過剰発現株における MPIase 生合成活性の測定	31 ページ
4. MPIase 生合成第一段階の反応における基質特異性	32 ページ
5. MPIase 生合成第一段階の反応の再解析	34 ページ
考察	37 ページ
第 2 章 YnbB/CdsA の機能解析	41 ページ
序論	41 ページ
方法	43 ページ
結果	49 ページ
1. <i>ynbB/cdsA</i> 二重欠損株における YnbB および Tam41p の過剰発現による生育への影響	49 ページ
2. YnbB による MPIase および CDP-DAG 生合成活性の測定	50 ページ
3. YnbB により生合成された MPIase のタンパク質膜挿入活性の測定	52 ページ
4. <i>ynbB/cdsA</i> 二重欠損株におけるキメラタンパク質および Tam41p の過剰発現による生育への影響	53 ページ
5. キメラタンパク質による MPIase および CDP-DAG 生合成活性測定	55 ページ
6. キメラタンパク質により生合成された MPIase のタンパク質の膜挿入活性	57 ページ
7. <i>In vitro</i> における YnbB、CdsA およびキメラタンパク質の CDP-DAG 生合成活性測定	58 ページ

8. CdsA 変異株における YnbB の機能	59 ページ
考察	63 ページ
総合考察	66 ページ
謝辞	69 ページ
引用文献	70 ページ

序論

生体膜の機能

全ての細胞は生体膜に覆われている。生体膜は細胞内と細胞外とを隔てる障壁であるだけでなく、細胞の構造の維持、情報伝達、エネルギー物質の生産といった代謝反応の場としても機能する。真核生物においては、細胞内小器官も生体膜に覆われていて、細胞内で明確に区分けされている。生体膜を構成する成分は生物種や細胞内小器官によって異なるが、主要な成分は脂質とタンパク質である点で共通している。生体膜を構成する脂質は主にグリセロリン脂質であるが、スフィンゴリン脂質やコレステロールも重要な構成要素である[1-3]。グリセロリン脂質は、親水性頭部と疎水性尾部をその構造に持つ。疎水性尾部は親水的環境で会合し、親水性頭部を外側、疎水性尾部を内側に向けた脂質二重層を構成する。生体膜においては、脂質二重層を貫通して、あるいはその表面にタンパク質が局在している。脂質二重層は構成する脂質分子同士が非共有結合で会合した集合体である。膜垂直方向の移動は制限されているが、平面方向には比較的自由に移動することができ、これに伴って、膜に埋め込まれたタンパク質も流動的に動くことができる[4]。真核生物は膜に覆われた細胞内小器官をもち、細胞内が複雑に区分けされている。これに対して、細胞内小器官をもたない原核生物の細胞内の区分けは、比較的単純である。真正細菌の細胞は、大まかに細胞質と細胞表層構造に分けられる。細胞表層の機能として、細胞の防御、補強、情報伝達が

挙げられる。細胞表層の構造より、真正細菌はグラム陽性菌とグラム陰性菌の2種類に分けられる[5]。グラム陽性菌の細胞表層は、細胞質膜およびペプチドグリカンと呼ばれる糖鎖とペプチドの複合体より構成されている[6]。これに対し、グラム陰性菌の細胞表層は、細胞質膜（内膜）、ペリプラズム、ペプチドグリカン、外膜に分けられる[6]。細胞質を内膜が覆い、その外側に親水的環境であるペリプラズム領域が存在する。ペリプラズムの外側にペプチドグリカンが存在するが、その厚さはグラム陽性細菌のもの10分の1程度である。ペリプラズムの外側は外膜に覆われている。グラム陰性細菌の持つ構造のうち、生体膜として機能するのは内膜と外膜である。内膜はリン脂質二重層によって構成される対称的な構造を持つのに対し、外膜は細胞の内側の層がリン脂質、外側の層がリポ多糖で構成された非対称的な二重層構造を持つ[7]。細胞表層には多くのタンパク質が存在する。グラム陽性細菌においては細胞質膜に局在するタンパク質を膜タンパク質、細胞質膜を透過するタンパク質を分泌タンパク質と呼ぶ。グラム陰性細菌においても同様に内膜に局在するタンパク質を膜タンパク質、内膜を透過するタンパク質を分泌タンパク質と呼ぶ。外膜タンパク質も内膜タンパク質同様に生体膜中に局在するが、内膜を透過した後に外膜に組み込まれることより分泌タンパク質に分類される。膜タンパク質は、膜内在性タンパク質と膜表在性タンパク質に分けられる。このうち、膜内在性タンパク質は、脂質二重層からなる膜を貫通する膜貫通領域と呼ばれる疎水性の高い領域を持つ。この膜貫通領域は α -ヘリックス

構造を形成する。膜表在性タンパク質は、膜内在性タンパク質や膜脂質と相互作用している。大腸菌においては、全てのゲノムのうち、約4分の1が膜タンパク質をコードする。膜貫通領域の数や分子量、ペリプラズム領域や細胞質領域の性質といった膜タンパク質の性質は多岐にわたる[8-10]。膜タンパク質の多くは、他のタンパク質や補酵素及び脂質と相互作用し、複合体を形成して機能する[11]。生体膜は多くの重要な生命現象を担っている。生体膜で行われる反応の多くは膜タンパク質が触媒している。

膜を介したタンパク質の局在化、膜輸送

タンパク質が機能するためには、細胞内において正しく局在する必要がある。タンパク質輸送の分子機構は長らく不明であったが、その分子機構を解明するための大きな転機となるシグナル仮説が提唱された[12, 13]。小胞体膜を透過する分泌タンパク質をコードする mRNA を翻訳すると、N末端に20~40アミノ酸からなる疎水性の高い延長配列を持つ前駆体タンパク質が合成される[14]。この延長配列はシグナル配列と呼ばれ、分泌タンパク質を小胞体膜へ導く機能がある。シグナル配列は、小胞体膜を透過する過程で膜中に存在するシグナルペプチダーゼによって切断され、それ以降の配列が成熟体として小胞体膜を透過する。シグナル仮説の提唱以降、タンパク質の膜透過機構の詳細な解析を目的とした研究が著しく発展した。

タンパク質膜透過機構

生体膜は物質の移動を制限する物理障壁として機能し、低分子量の化合物の移動すら厳密に制限する。それにもかかわらず分子量が数千から数十万に及ぶ巨大分子であるタンパク質が生体膜を透過するという現象は、生体内にタンパク質膜透過に特化した装置が存在することを示唆するものであった。小胞体におけるタンパク質膜透過反応は分泌タンパク質の合成と同時に進行することはシグナル仮説の提唱以前より明らかとなっていたものの、その詳細な分子機構は不明であった[15]。シグナル仮説の提唱以降、タンパク質膜透過反応に関与する因子の探索が行われた。その結果、分泌タンパク質のシグナル配列を認識する因子が小胞体を用いた実験において同定され、シグナル認識粒子 (SRP) と命名された[16-18]。哺乳類の SRP は SRP9, 14, 19, 54, 68, 72 の 6 種類のタンパク質と 7S RNA より構成される RNA-タンパク質複合体である[19, 20]。分泌タンパク質のシグナル配列がリボソームより露出すると、SRP がこれを認識して結合し、SRP/RNC (ribosome-associated nascent chain) 複合体が形成される[21]。このとき、SRP54 とシグナル配列が結合することが明らかとなっている[22, 23]。SRP/RNC 複合体が小胞体膜上に存在する SRP 受容体 (SR) と結合して分泌タンパク質が膜にターゲティングされる[21]。哺乳類の SR は膜表在性の SR α および膜内在性の SR β の 2 つのサブユニットより構成される[24]。哺乳類のものと比較すると単純な構造ではあるが、SRP, SR は真正細菌や古細菌においても保存さ

れている[25]。分泌タンパク質の新生鎖はタンパク質膜透過チャネル Sec61 複合体に受け渡され、リボソームにおける翻訳と共役して膜透過反応が進行する[21]。Sec61 複合体は、 α 、 β 、 γ の3つのサブユニットより構成される[21]。その機能は、大腸菌内膜に存在する SecYEG 複合体のものと類似している。このうち、孔を形成し膜透過チャネルの核として機能する α サブユニットが大腸菌の SecY に、チャネルの安定化を担う γ サブユニットが SecE に、 β サブユニットが SecG に相当する[26, 27]。膜を介したタンパク質輸送に関する研究は、真核生物の小胞体だけではなく、真正細菌の内膜を用いても盛んに行われてきた。特に、遺伝学的知見や生化学的知見が多く蓄積されている大腸菌を用いた研究により、膜を介したタンパク質輸送に関する研究は著しく発展した。真核生物の小胞体の膜透過反応においては Sec61 膜透過チャネルが機能すると述べたが、大腸菌においても、分泌タンパク質は SecYEG 膜透過チャネルを介して内膜を透過することが明らかとなっている[28]。しかし、大腸菌においては翻訳が終了した後も膜透過反応が進行し得る点が小胞体の場合とは異なる。大腸菌の産生する分泌タンパク質の多くは、SRP に依存せず膜透過する。この場合、SecA と SecB に依存して膜透過が進行する。SecA は膜表面および細胞質に存在する ATPase、SecB は細胞質に存在する分子シャペロンである[29, 30]。翻訳が終了した分泌タンパク質前駆体の成熟体部分に SecB が結合する[31]。このとき SecB が認識する領域は芳香族アミノ酸および塩基性アミノ酸にとんでおり、高次構造を形成した

成熟体においてはその内側に埋もれている領域である[32, 33]。SecBが分泌タンパク質前駆体と可溶性の複合体を形成して、凝集することなく膜へのターゲティングが行われる。しかし、アルカリホスファターゼ、リボース結合タンパク質、 β -ラクタマーゼのように、SecBに依存せず膜透過が進行するものも存在する[34]。この場合、細胞質に存在する熱ショックタンパク質であるDnaK/DnaJ/GrpEやGroEL/GroESが機能すると考えられている[35-37]。これらの因子も分子シャペロンとして機能し、分泌タンパク質前駆体の凝集を妨げる[37, 38]。SecB依存のタンパク質膜透過反応は、SecB欠損株においても完全には阻害されないが、SecBとともにDnaKおよびDnaJを欠損させると、その活性は著しく低下する[35]。さらに、DnaK/DnaJを過剰発現させると、SecB依存の膜透過反応の阻害が部分的に抑制されることが報告されている[35, 39]。このことより、SecBとDnaK/DnaJ/GrpEは、その機能が一部重複している可能性が示唆されている。細胞質中の分子シャペロンによって可溶性の複合体を形成した分泌タンパク質前駆体は、膜上のSecAに受け渡される。分泌タンパク質前駆体は、内膜細胞質側表面でSecYと相互作用しているSecAに受け渡され、SecYEGチャンネル上で膜透過反応が開始する[28, 40-42]。SecAはATPと結合して分泌タンパク質前駆体を伴って膜挿入し、ATPの加水分解に伴って脱離する[43]。このサイクルを繰り返すことで、段階的に膜透過反応が進行する[44, 45]。これらの因子のうち、SecA, SecY, SecEが膜透過反応に必須である[46]。

タンパク質膜挿入機構

膜内在性タンパク質はリン脂質により構成される生体膜中に存在するため、その疎水性は極めて高い。これに対し、タンパク質が合成される細胞質は親水的環境である。したがって、膜内在性タンパク質が細胞質中にとどまることは、不可逆的な凝集を引き起こす。そのため、膜内在性タンパク質を正しく生体膜に組み込む因子の存在が示唆されている。その分子機構の詳細に迫る多くの研究は、哺乳類や酵母を用いた研究が先駆けてきた。近年では、遺伝学および生化学的知見の蓄積した大腸菌を用いた研究も数多く行われている。これまでに、タンパク質膜挿入の分子機構は大まかではあるが解明されつつあり、2種類の経路の存在が明らかとなっている[47](図1)。1つ目は、Sec/SRPに依存する経路である[48, 49]。この経路における反応は、リボソーム

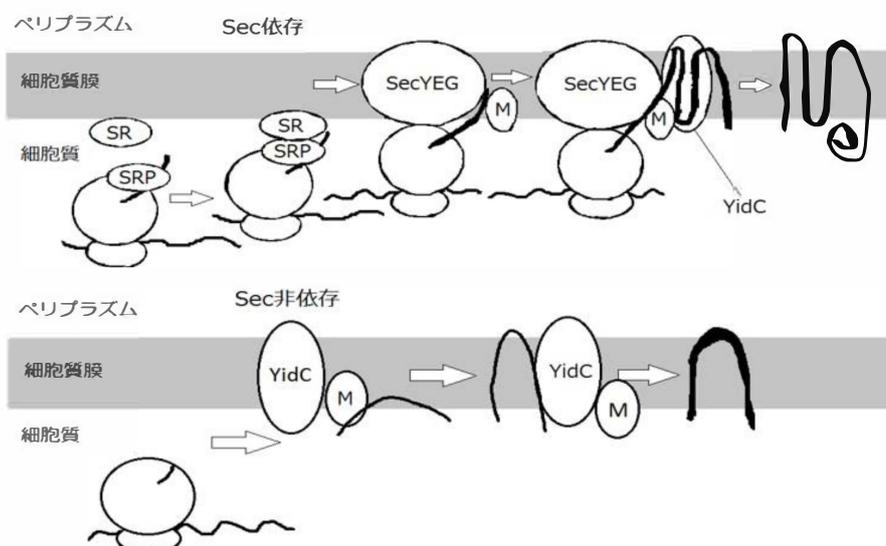


図1 大腸菌におけるタンパク質膜挿入経路。上段はSec/SRP依存の膜挿入経路を示す。リボソームで膜タンパク質が合成され始めると、SRPが疎水的な膜貫通領域を認識して結合する。その後、膜上のSRを介して膜へ輸送され、翻訳と同時にSecYEG上で膜挿入反応が進行する。下段はSec/SRP非依存の膜挿入機構を示す。Mで示された糖脂質酵素Mplaseはいずれの経路においても必須の因子である。YidCは膜挿入後の高次構造形成及び膜挿入反応のサイクルを早める効果がある。

における翻訳と同時に進行する。その分子機構は、SRP/SR を介して膜タンパク質が膜へターゲティングされる点と、SecYEG 膜透過チャネル上で膜挿入反応が進行する点で小胞体における膜透過反応と類似している。しかし、大腸菌の膜タンパク質は小胞体分泌タンパク質でみられるようなシグナル配列はもたない。このとき SRP が結合するのは、疎水性に富んだ膜貫通領域である[47]。翻訳途中の膜タンパク質の膜貫通領域がリボソームから露出すると、SRP がこれを認識して結合し、SRP/RNC 複合体を形成する[49, 50]。大腸菌の SRP は 4.5S RNA と Ffh というタンパク質からなる複合体であり、Ffh は真核生物の SRP54 とアミノ酸配列の相同性が高い[49]。4.5S RNA と Ffh が形成する疎水性の溝が膜タンパク質の膜貫通領域を包み込むことにより、親水的環境である細胞質において膜タンパク質の凝集を防いでいる。SRP/RNC 複合体は膜上に存在する SR との相互作用を介して膜へターゲティングされる。大腸菌においては、FtsY が SR として機能する[51]。FtsY は、膜上で SecY と相互作用している[52]。SecY は、SecE および SecG と共に SecYEG タンパク質膜透過チャネルを形成している[53]。したがって、膜タンパク質の新生鎖は SRP/SR を介してタンパク質膜透過チャネル近傍にターゲティングされることになる。その後、SecYEG 複合体に膜タンパク質新生鎖が受け渡され、リボソームにおける翻訳と同時に膜挿入反応が進行する[47, 54]。膜挿入反応の後期においては、内膜に存在する YidC が機能する。基質膜タンパク質と化学架橋が効率よく形成されることと、YidC の欠損によ

り膜タンパク質の高次構造形成が阻害されることより、膜挿入反応後期においてシャペロンとして機能すると考えられている[55-57]。ペリプラズム側に大きな領域を持つ膜タンパク質の場合、これらの因子に加えて SecA が必要になる[58]。SecA は、ATP 加水分解に伴って膜タンパク質のペリプラズム領域を分泌タンパク質同様に膜透過させる[47]。

2 つ目の経路は、Sec/SRP に依存しない経路である[59-61]。全ての生物において 50 アミノ酸以下の比較的小型のタンパク質が発現している。大腸菌においては、このような分子量の小さいタンパク質が少なくとも 60 種類は発現していて、このうち 65% が膜タンパク質であることが明らかとなっている[62]。これらのタンパク質の膜挿入反応は、Sec/SRP に依存せず進行する[63, 64]。その理由は、SRP と膜タンパク質の膜貫通領域との相互作用機構にある。SRP はリボソームとの相互作用を介して膜タンパク質の膜貫通領域と結合するため、SRP は翻訳途中の膜タンパク質にしか結合できない[50]。したがって、分子量の小さい膜タンパク質や、膜貫通領域が C 末端側のみにある膜タンパク質の場合、SRP が結合する前に翻訳が終了する[61, 65]。この場合、SRP や SecYEG を介さずに膜挿入反応が進行する。この経路における反応は、膜タンパク質の膜貫通領域とリン脂質との疎水的相互作用によって自発的に進行すると考えられていた[63, 64, 66]。YidC の欠損によりこの経路の膜挿入反応が阻害されることより、この経路においては YidC が膜挿入反応を触媒している可能性が示唆

された[67]。しかし、YidC 欠損株においても膜挿入への影響がないタンパク質も報告されていることから、この経路における膜挿入反応の詳細な分子機構の解析が求められていた[48, 59, 64]。

自発的膜挿入とその抑制因子

タンパク質膜挿入反応に関与する因子群は、変異体を用いた *in vivo* における解析や、再構成系を用いた *in vitro* における解析により同定されてきた経緯がある。再構成系を用いた解析では、リン脂質より構成された人工膜小胞（リポソーム）や、これにタンパク質を組み込んだプロテオリポソームが用いられてきた。変異体を用いた実験の場合、その致死性による菌の生育阻害や、変異による間接的な影響を排除することができない。再構成系を用いて実験を行う場合、これらの問題を考慮する必要がない。しかし、細胞内での反応を再現できている保証はなく、得られる結果は生体内の反応を反映していない可能性がある。*In vitro* での解析の一つに、SecYEG, SRP, SR をリポソームへ組み込み、Sec/SRP 依存の膜挿入経路の再構成を試みたものがある[68]。その過程で、リン脂質のみから構成されたリポソームに、Sec/SRP 依存で膜挿入するマンニトールパーミアーゼ (MtlA) が自発的に膜挿入する様子が観察された[68]。大腸菌より調製した反転内膜小胞 (Inverted and inner membrane vesicles : INV) に対しては、MtlA は自発的膜挿入せず、SecYEG 依存で膜挿入される[68]。したがって、

リン脂質のみで構成されたリポソームにおいて観察された自発的膜挿入は生体内での反応を再現していない人為的なものであることが明らかとなった[68]。この結果より、自発的膜挿入を抑制する因子の存在が示唆され、その同定および、再構成系における膜挿入反応への影響が解析された。その結果、自発的膜挿入を抑制する因子としてジアシルグリセロール (DAG)が同定された[68]。大腸菌の生体膜には DAG が 1% 程度含まれている[69, 70]。DAG を生理的濃度でリポソームに加えると、SecYEG、SRP、SR、YidC を再構成した場合も MtlA は全く膜挿入しない[68]。MtlA に加えて、Sec/SRP 非依存の経路で膜挿入する M13 プロコートタンパク質の自発的膜挿入も DAG によって完全に抑制される[68]。これらの結果より、新規膜挿入因子の存在が示唆され、その同定が行われた。

新規タンパク質膜挿入因子 MPIase (Membrane Protein Integrase)の同定

DAG を含むリポソームへの膜挿入活性を指標として新規膜挿入因子の精製が進められた[68, 71, 72]。その結果、大腸菌内膜に存在する因子が膜挿入反応に必須であることが明らかとなり、その機能より、Membrane Protein Integraseを略して MPIase と命名された[72]。Sec/SRP 非依存で膜挿入するタンパク質は、DAG により自発的膜挿入が抑制された条件では MPIase に依存して膜挿入される[68, 71, 72]。これに加えて、DAG を含むリポソームに、SecYEG、SRP、SR と MPIase を共に再構成する

と、Sec/SRP 依存の膜挿入反応も MPIase に依存して進行することが明らかとなった [68]。MPIase を DAG と共にリポソームに再構成した場合、MPIase の分子数を上回る量の基質膜タンパク質の膜挿入が観察されるため、MPIase は酵素のように膜挿入反応を触媒していると考えられている [72]。また、MPIase は、タンパク質膜挿入反応を触媒するだけでなく、膜透過反応を著しく促進することも明らかとなっている [68, 73]。

MPIase の構造

MPIase の構造解析が行われた。酵素のようにタンパク質膜挿入反応を触媒することと、プロテアーゼ処理で失活することより、MPIase はタンパク質であると予想された [68]。しかし、エドマン分解でペプチドが検出されないこと、TLC 上で脂質の染色試薬で検出されることと、糖の検出試薬で検出されることより、MPIase は脂質と糖鎖をその構造の一部に持つ可能性が示唆された [68]。質量分析 (MS) や核磁気共鳴分光法 (NMR) を用いた構造解析により MPIase の構造が決定され、MPIase は糖脂質であることが明らかとなった (図 2) [74]。その糖鎖は、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、*N*-アセチルマンヌロン酸 (ManNAcA)、4-デオキシ-4-アセトアミドフコース (Fuc4NAc) がそれぞれ 1-4 グリコシド結合した三糖ユニットより構成される [74]。三糖ユニットは、1 分子あたり約 10 回繰り返されている。この構造はグラム陰性細

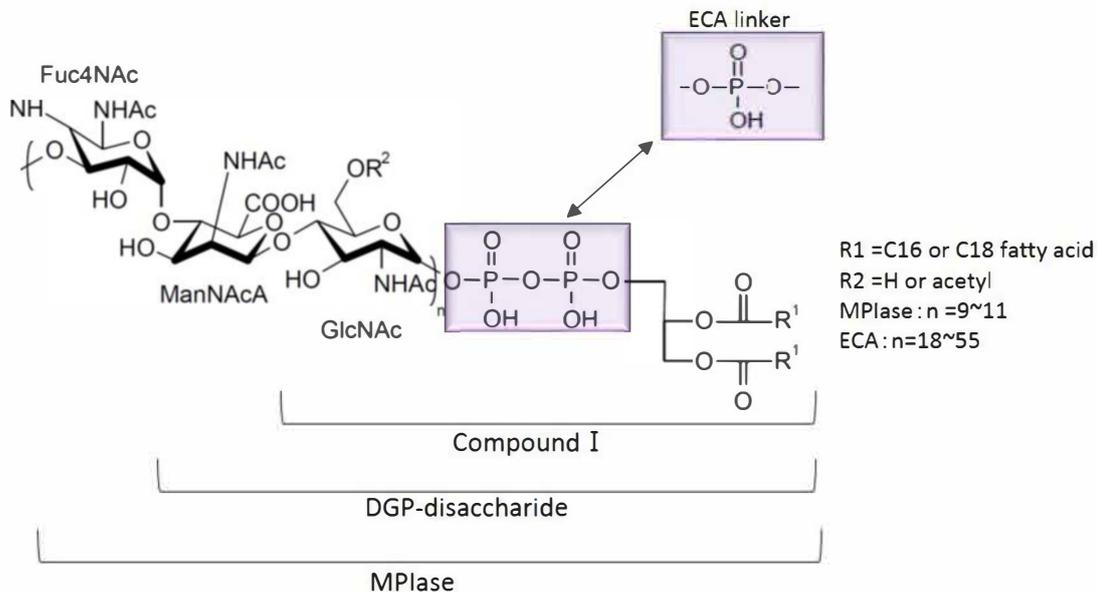


図2 MPIaseとその中間体およびECAの構造。R¹は大腸菌リン脂質一般にみられる脂肪酸によるアシル基、R²は水素またはアセチル基を示している。MPIaseにおいては、分子全体で約3分の1のR²がアセチル基になっている。nは三糖ユニットの数を示しており、MPIaseにおいては分子全体で約10、ECAにおいては18~55となっている。糖鎖とDAGのリンカーは、MPIaseおよびその中間体においてはピロリン酸、ECAにおいてはモノリン酸となっている。DGP-disaccharideは、ECA生合成変異株より同定された因子である。MPIase生合成反応は、リン脂質にGlcNAcが付加される反応より始まると予想し、この反応における中間体をCompound Iと命名した。

菌の産生する外膜因子 Enterobacterial common antigen (ECA)のものと類似している (図 2)[74-77]。ECA も MPIase と同じ三糖ユニットより構成された糖鎖と DAG をその構造の一部に持つ。しかし、三糖ユニットの数が 18~55 個と分子によって不均一である点と、糖鎖と DAG のリンカーがモノリン酸であるという点で MPIase と異なる[75-77]。MPIase の脂質部分は内膜との相互作用、糖鎖は合成された膜タンパク質との相互作用に関与していると考えられている。しかし、MPIase と同じ三糖ユニットを持つ ECA はタンパク質膜挿入活性をまったくもたない[74]。したがって、糖鎖がもたらす親水性だけではなく、その長さも膜挿入活性に重要な要素であると予想

されている。また、糖鎖のアセチル基の切断によって活性を失うことが明らかとなっている[74]。糖脂質でありながらタンパク質膜挿入反応を触媒するため、糖脂質酵素 (Glycolipozyme) という概念が提唱されている[74]。

MPIase がタンパク質膜挿入反応に必須であることは、*in vitro* での再構成系を用いた実験で証明された[68, 71, 72, 74]。しかし、上述した通り、再構成系を用いた実験系は生体内での反応を完全に再現できている保証はない。したがって、これまでに得られた知見のみから MPIase が生体内においてもタンパク質膜挿入因子として機能しているかを結論することはできない。生体内における MPIase の役割を明らかにするためには、MPIase 欠損株を構築し、この株におけるタンパク質膜挿入反応への影響を調べる必要があった。生体内での膜挿入反応における MPIase の機能を解析することによりタンパク質膜挿入反応機構の詳細を明らかにできると考えた。糖脂質である MPIase を欠損させるためには、その生合成遺伝子を破壊する必要がある。しかし、MPIase が同定された当時、その生合成に関する知見は全くなかったため、その生合成遺伝子の同定が望まれていた。構造が類似していることより、その生合成経路は ECA と一部重複していることが予想されたが、ECA 生合成遺伝子変異株においても MPIase 生合成に影響はほとんどないため、MPIase と ECA の生合成経路は独立して存在していると考えられている[74]。そこで、MPIase 生合成経路の解明を目的とし、その生合成因子の同定を目的として研究を行った。MPIase の生合成経路を予

想し、その反応を触媒する因子を同定するという逆遺伝学的手法で研究を進めた。その結果、MPIase 生合成酵素の一部として内膜タンパク質 YnbB および CdsA を同定し、これらのタンパク質の機能解析を行った。YnbB/CdsA の同定に至るまでの経緯を第 1 章、その機能解析を行った結果を第 2 章に記載する。

第1章 MPIaseの生合成酵素の同定

序論

*In vivo*でのタンパク質膜挿入反応におけるMPIaseの必須性を明らかにするため、その生合成遺伝子の同定が求められていた。構造が類似していることより、MPIaseの生合成経路はECAのものとは一部重複していると予想された。ECAの生合成経路は一連の *wec* 遺伝子にコードされている (図3)[78]。ECAの生合成反応は内膜上で進

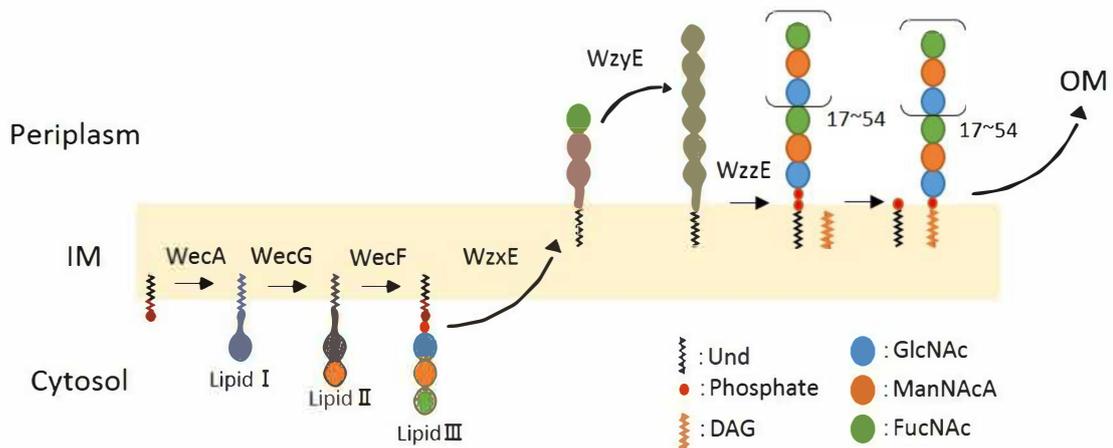


図3 ECA生合成経路。ECA生合成反応は、内膜上で進行し、一連の *wec* 遺伝子にコードされている。細胞質側で三糖ユニットの生合成が進行し、中間体Lipid IIIがペリプラズム側へ転移する。その後、三糖ユニット単位で糖鎖が伸長し、成熟体ECAとなったのち、外膜へ輸送される。

行し、脂質運搬体であるウンデカプレノール (Und)上で糖鎖の合成、伸長が行われる。

この反応は、内膜細胞質側において Und に GlcNAc が付加される反応より始まる [79]。

その後 ManNAcA、Fuc4NAc が付加され、三糖ユニットが完成する [79, 80]。三糖ユ

ニットが完成するとペリプラズム側に反転し、三糖ユニット単位で糖鎖の伸長が起こ

る [81-83]。十分に伸長した糖鎖はリン脂質に転移し、成熟体 ECA になったのち、外

膜へ輸送される[78]。ECAの生合成変異体 *wecA* 欠損株および *wecF* 欠損株で ECA は全く検出されないが、MPIaseの合成量にはほとんど影響がないことが明らかとなっている[74]。したがって、MPIaseの生合成経路はECAのものとは独立して存在していると考えられる。また、ECAの生合成に関する研究過程において、ECA中間体とは考えられない化合物が同定されている(図2)[84]。この化合物は、GlcNAcとManNAcAが1-4グリコシド結合した糖鎖とDAGを構造の一部に持ち、糖鎖とDAGがピロリン酸を介して結合している[84]。この化合物が同定された当時は、ECA生合成とは関係がないことは明らかであるものの、その生体内における意義は不明であったが、MPIaseの構造が明らかとなった今では、この化合物はMPIase生合成中間体である可能性が高いと考えられる。以上のことより、MPIaseの生合成経路においてはUndを介さず、リン脂質上で糖鎖の合成が行われ、その生合成第一段階の反応はCompound Iと命名した中間体が合成される反応であると予想した(図2、4)。この反応を触媒する酵素を探索した結果、機能不明の内膜タンパク質YnbBおよびそのホモログCdsAを同定した。YnbB/CdsAの発現とMPIaseの発現が一致することより、これらのタンパク質がMPIase生合成酵素であると結論した。

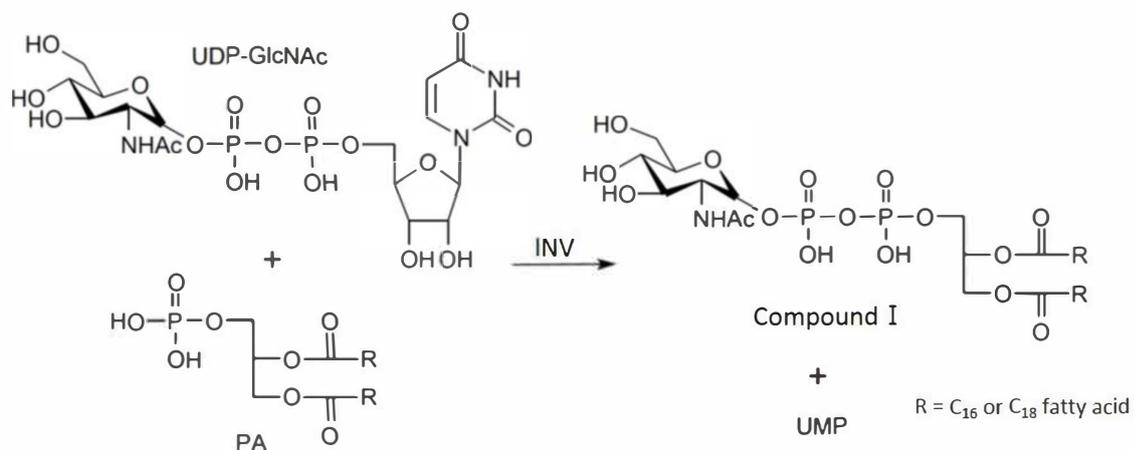


図4 MPIase生合成第一段階の反応の予想。UDP-GlcNAcよりGlcNAc-PがPAに転移し、中間体Compound Iが合成されると予想した。Rは大腸菌リン脂質一般にみられる脂肪酸アシル基を示している。この反応を触媒する酵素は内膜に存在すると予想し、その精製および同定を行った。

方法

1. 材料

INV は報告[85]に記載されている方法で調製した。1, 2-Dioleoyl-*sn*-glycerol 3-phosphate (PA)、Uridine 5'-diphospho-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc)、Uridine 5'-diphospho-glucosamine (UDP-GlcN)、*N*-acetyl- α -D-glucosamine 1-phosphate (GlcNAc-P)は SIGMA より購入した。1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-cytidine diphosphate (CDP-DAG)は、Avanti より購入した。トリプシンは Promega より購入した。PCR 用オリゴ DNA は Integrated DNA technologies より購入した。制限酵素は TaKaRa より購入した。Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) は CARBOSYNTH より購入した。化学合成標品の Compound I および Cytidine 5'-diphospho-*N*-acetylglucosamine (CDP-GlcNAc)は、サントリー生命科学財団の島本啓子先生および藤川紘樹先生に合成していただいたものを用いた[86]。抗 MPIase 抗体は報告[74]に記載されているものを用いた。抗 CdsA 抗体は CdsA の 75~92 番目のアミノ酸に相当する EYHRNIHQPLVEISLWAS という 18 アミノ酸からなるペプチドを認識するものの調製をユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼し購入した。抗 SecG 抗体は報告[87]に記載されているものを用いた。

2. Compound I 生合成活性測定

50 mM HEPES-KOH (pH7.5)、1.5% オクチルグルコシド (OG)、5 mM 硫酸マグネシウム、1.5 または 2.5 mg/mL INV を 20 μ L 調製した。INV のタンパク質濃度は BSA を基準としてローリー法により定量した[88]。これに脂質部分の供与体として PA、DAG または CDP-DAG を、糖部分の供与体として UDP-GlcNAc、UDP-GlcN、CDP-GlcNAc、GlcNAc-P または GlcNAc をそれぞれ 6 または 2 mM になるよう加えた。調製直後または 37°C で 20 時間保温後、アセトンを 200 μ L 加えた。7,200 $\times g$ 、20 分間遠心分離をし、上清を分取した。凍結乾燥機を用いて上清を乾燥し、溶媒 A (クロロホルム : メタノール : 水=9 : 5 : 1) 20 μ L に懸濁した。TLC プレートに 5 μ L を滴下し、溶媒 A で TLC 展開した。アニスアルデヒド・硫酸試薬 (p-アニスアルデヒド 9.23 mL, 酢酸 3.76 mL, エタノール 337.6 mL, 硫酸 12.5 mL) に浸した後、200°C で 10 分間加熱した。

3. Compound I 合成酵素の同定

50 mM HEPES-KOH (pH7.5)、4 M 尿素、1 mM dithiothreitol に INV を 2 mg/mL になるよう懸濁し、30 分間氷上においた。11,000 $\times g$ 、1 時間遠心分離を行い、沈殿を分取した。これを 50 mM Bistris-HCl (pH6.5)、1.5% OG に懸濁し、11,000 $\times g$ 、1 時間遠心分離して上清 (可溶化膜) を分取した。可溶化膜中の成分を、陰イオン交換

カラムを用いて分画した。カラムの平衡化は、50 mM HEPES-KOH (pH6.5)、1.5% OG を用いて行った。可溶化膜をカラムに添加後、0~500 mM の範囲で塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出した。

各画分の Compound I 合成活性を調べた。最も強い活性を示した画分を 20 μ L 分取し、トリクロロ酢酸 (TCA) を 10% になるように加え、11,000 $\times g$ 、10 分間遠心分離して沈殿を分取した。アセトン 200 μ L に懸濁し、11,000 $\times g$ 、20 分間遠心分離して沈殿を洗浄した。洗浄後、SDS-PAGE[89]を行った。タンパク質が濃縮ゲルから分離ゲルに移行した直後に電気泳動を終了し、CBB 染色液 (0.5% CBB R-250、30% メタノール、10% 酢酸) で染色した。10% 酢酸で脱色し、報告[90]に記載されている方法でタンパク質を同定した。ゲル上で濃縮されたバンド部分を全て切り取り、トリプシンを用いたゲル内消化を行った。2% アセトニトリル、0.1% トリフルオロ酢酸を 30 μ L 加え、トリプシン消化断片を抽出した。抽出したペプチド断片を 4% アセトニトリル、0.5% トリフルオロ酢酸 15 μ L に溶解し、LC-MS を用いて構造解析を行った。得られたシグナルに対して MASCOT SEARCH を用いてデータベース検索を行い、タンパク質を同定した。

4. YnbB および CdsA 過剰発現株の構築

YnbB および CdsA の過剰発現ベクター pTac-YnbB および pTac-CdsA をそれぞれ

構築した。プラスミドベクター pUSI2[91]の *tac* プロモーターおよび *lac* オペレーター支配下に *ynbB* および *cdsA* の読み枠を含む DNA 配列をそれぞれ連結した。JM109 株[92]より調製した染色体 DNA を鋳型にし、それぞれ次に示すプライマーを用いて PCR を行った。pTac-YnbB は、フォワードプライマー : 5'-TTT TGG ATC CTAGGA GGT TTA AAT TTA TGC ATC ACC ACC ATC ACC ACC TGG AAA AAT CTC TGG CAA CAC TTT TCG CG-3' およびリバースプライマー : 5'-AAA AGT CGA CTT AGT AAC AGC AGT AGC GTA TAA AAT AAA AAA-3' を、pTac-CdsA はフォワードプライマー : 5'-TTT TGG ATC CTA GGA GGT TTA AAT TTA TGC ATC ACC ACC ATC ACC ACC TGA AGT ATC GCC TGA TAT CTG CTT TTG TG-3' およびリバースプライマー : 5'-AAA AGT CGA CTT AAA GCG TCC TGA ATA CCA GTA ACA AC-3' を用いた。PCR 産物および pUSI2[91] を BamH I / Sal I 処理し、ライゲーションした。これを JM109 株[92]に導入し、IPTG を 1 mM になるよう加えて発現を誘導した。

別の YnbB および CdsA 過剰発現ベクター pET-15b-YnbB および pET-15b-CdsA をそれぞれ以下の様に構築した。プラスミドベクター pET-15b (Novagen) の *T7* プロモーターおよび *lac* オペレーター支配下に *ynbB* および *cdsA* の読み枠を含む DNA 配列をそれぞれ連結した。JM109 株[92]より調製した染色体 DNA を鋳型にし、それぞれ次に示すプライマーを用いて PCR を行った。pET-15b-YnbB は、フォワードプライマー : 5'-CTA GTA TGC ATA TGC TGG AAA AAT CTC TGG C-3' およびリバー

スプライマー : 5'-AAA AGT CGA CTT AGT AAC AGC AGT AGC GTA TAA AAT
AAA AAA -3'を、pET-15b-CdsA はフォワードプライマー : 5'-CTA GTA TGC ATA
TGC TGA AGT ATC GCC TGA T-3'およびリバースプライマー : 5'-AAA AGT CGA
CTT AAA GCG TCC TGA ATA CCA GTA ACA AC-3'を用いた。PCR 産物およびプラ
ズミドベクター pIVEX 2.4b Nde (Roche)を Nde I /Sal I で処理後にライゲーション
し、pIVEX 2.4b Nde-YnbB および pIVEX 2.4b Nde-CdsA を構築した。これらのプ
ラスミドを pET-15b と共に Nde I /Xho I 処理後にライゲーションして pET-15b-
YnbB および pET-15b-CdsA を構築した。その後、BL21 (DE3)/pLysS 株[93]に導入
し、IPTG を 1 mM になるよう加えて発現を誘導した。

5. YnbB および CdsA 過剰発現株の MPIase 合成量の測定

BL21 (DE3)/pLysS/pET-15b 株、BL21 (DE3)/pLysS/pET-15b-YnbB 株および BL21
(DE3)/pLysS/pET-15b-CdsA 株を LB 培地で対数増殖期まで培養した。1 mM IPTG
でプラスミド上の YnbB あるいは CdsA の発現を誘導し、2 時間後に培養を終えた。
報告[85]に記載されている方法で INV を調製し、SDS-PAGE[89]を行った。PVDF 膜
に転写し、報告[74]に記載されている方法で抗 MPIase 抗体を用いてイムノブロッテ
ィングを行った。CS Analyzer4 (ATTO)でバンドの濃さを定量し、その輝度値を算出
した。野生株における MPIase の輝度値を 1.0 として YnbB および CdsA 過剰発現株

のものと比較した。

6. シチジン枯渇条件における MPIase 合成量の測定

最小培地 (M9 培地)に 2 mM 硫酸マグネシウム、2 % グリセロール、0.1 mM 塩化カルシウム、0.1 mM 各種アミノ酸、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ チアミン塩酸塩、0.5 mg/mL シチジンになるよう添加し、JF618 株[94]を対数増殖期まで培養した。1,800 $\times g$ 、10 分間遠心分離して集菌し、M9 培地に 2 mM 硫酸マグネシウム、2 % グリセロール、0.1 mM 塩化カルシウムになるよう添加したもので 3 回洗浄した。これを前培養で用いたものと同じ培地またはシチジンを抜いたものでそれぞれ 1 時間培養した。1,800 $\times g$ 、10 分間遠心分離して集菌し、報告[74]に記載されている方法で、TCA 沈殿後に抗 MPIase 抗体を用いたイムノブロッティングを行った。

結果

1. MPIase 生合成第一段階の反応系の構築

MPIase 生合成第一段階の反応を触媒する酵素を同定するため、その反応条件と酵素の局在を調べた。Compound I 生合成反応の基質を想定し、大腸菌画分と混合した際に反応が進行するかを調べた。この反応における基質は、糖供与体として UDP-GlcNAc または UDP-GlcN を、脂質部分の供与体として PA を想定した。大腸菌画分は、内膜、外膜および細胞質画分を用いた。基質として想定した物質と大腸菌画分を混合し、37°C で保温後に TLC で特異的反応生成物を検出した。その結果、糖供与体として UDP-GlcNAc を、脂質部分の供与体として PA を、大腸菌画分として反転内膜小胞 (INV) を用いた場合のみ特異的な反応生成物が検出された (図 5)。

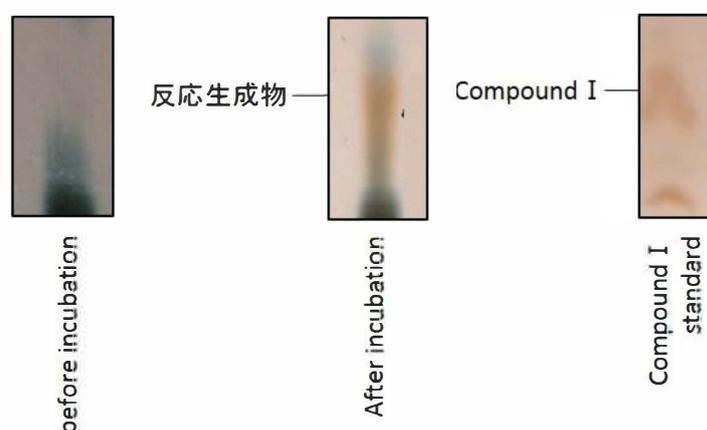


図5 TLCで検出された反応生成物のスポット。左の2枚のプレートは反応液のアセトン抽出物をTLC展開した結果を示している。このうち左側は基質とINVを混合した直後、中央は37°Cで20時間保温した後の結果を示している。右のプレートは化学合成標品のCompound I によるスポットを示している。反応後の溶液および合成標品をTLC展開した時のみ茶色のスポットが検出され、そのRf値はほとんど一致していた。

この生成物の TLC におけるスポットの色と Rf 値は、化学合成標品の Compound I

のものとはほとんど一致した。

2. MPIase 生合成第一段階の反応を触媒する酵素の同定

TLC で検出された特異的反応生成物の出現を活性の指標とし、反応を触媒する酵素の同定を行った。INV を尿素で洗浄し、OG で可溶化した。可溶化膜中の成分を、陰イオン交換カラムを用いて分画し、各画分の Compound I 生合成活性を TLC で調べた (図 6)。最も強い活性を示した 13 番の画分に含まれる全タンパク質を SDS-

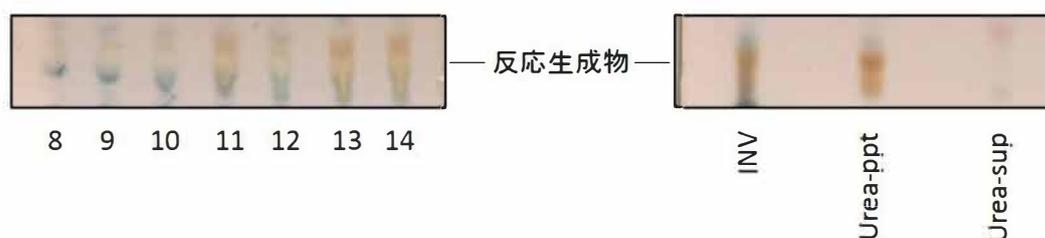


図6 精製画分のCompound I 生合成活性。INVを可溶化し、陰イオン交換クロマトグラフィを用いて分画した。各画分と、PAおよびUDP-GlcNAcを混合し、37°Cで保温後にTLC展開した。左側のプレートは精製画分の活性を示している。プレートの下に数字はクロマトグラフィにおける溶出画分の番号を示している。このうち最も強い活性を示した13番目の画分に対してLC-MSを用いた構造解析を行った。右側のプレートは精製画分の代わりにINV、尿素洗浄膜、尿素洗浄後の上清を用いた際の結果を示している。

PAGE 後にトリプシンを用いてゲル内消化を行った。トリプシン消化断片をゲルより抽出し、LC-MS を用いて構造解析を行った。データベース上でホモロジー検索を行い、同定されたタンパク質をリストアップした (表 1)。

表 1 LC-MS で検出された大腸菌由来のタンパク質

タンパク質名	機能	局在
GlpD	グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ	細胞質
OmpA	外膜ポリン	外膜
MdtE	薬剤排出トランスポーター	内膜
AspG2	L-アスパラギナーゼ	ペリプラズム
DcrB	ファージ吸着タンパク質	ペリプラズム
MetQ	D-メチオニントランスポーター	ペリプラズム
Agp	グルコース-1-リン酸ホスファターゼ	ペリプラズム
UshA	UDP-グルコースヒドロラーゼ	ペリプラズム
AcrB	薬剤排出ポンプ	内膜
GadC	グルタミン酸ジカルボキシラーゼ	内膜
DedD	細胞分裂に関与	ペリプラズム
TatB	タンパク質トランスロケース	内膜
MalE	マルトーストランスポーター	ペリプラズム
YdgA	運動に関与	細胞質
YjiY	トランスポーター	内膜
WzzB	LPS 糖鎖長調節因子	内膜
LpoB	MrcB のトランスペプチダーゼ	外膜
RlpA	細胞膜合成	ペリプラズム
SdhD	コハク酸デヒドロゲナーゼ	内膜
ElaB	リボソーム結合タンパク質	内膜
YggE	抗酸化ストレス因子	内膜

BamD	β -バレルタンパク質外膜挿入因子	外膜
Pal	ペプチドグリカンメンテナンス因子	外膜
YdjY	フェレドキシン	ペリプラズム
YggG	プロテアーゼ	ペリプラズム
YhiI	排出ポンプ	内膜
HemY	プロトヘム合成酵素	内膜
RidA	エナミン/イミンデアミナーゼ	細胞質
OsmY	抗高浸透圧因子	ペリプラズム
Lnt	アポリポタンパク質 N-アシルトランスフェラーゼ	内膜
YnbB	CDP-DAG ホモログ	内膜
DacC	D-アラニル-D-アラニンカルボキシペプチダーゼ	ペリプラズム
CydA	シトクロム d ユビキノールオキシダーゼ	内膜
WzzE	LPS 糖鎖長調節因子	内膜
CstA	APC ペプチドトランスポーター	内膜
NikA	ニッケル/ヘム ABC トランスポーター	ペリプラズム

このうち、細胞内での局在や、すでに同定されている機能を考慮して Compound I 生合成に参与する可能性の低いものを除外した。その結果、Compound I 生合成酵素の候補として考えられるものは、機能不明の内膜タンパク質 YnbB のみであった。BLAST Search を用いて YnbB のアミノ酸配列に対してホモロジー検索を行うと、

CDP-DAG 生合成酵素である CdsA のものと相同性が高いことが分かった (図 7)。

CdsA も YnbB 同様に内膜タンパク質である。CdsA は、CTP と PA より CDP-DAG を合成する反応を触媒する[95, 96] (図 8)。YnbB は生育に必須の因子ではないのに対し、CdsA は生育に必須で、CdsA 欠損株では PA の蓄積と生育阻害が観察される。

YnbB とのアミノ酸配列の相同性が高いことに加え、CDP-DAG 合成反応においてピリミジン塩基と PA を基質として認識することより、CdsA も Compound I 合成反応を触媒する可能性が高いと考え、YnbB および CdsA 過剰発現株を構築した。

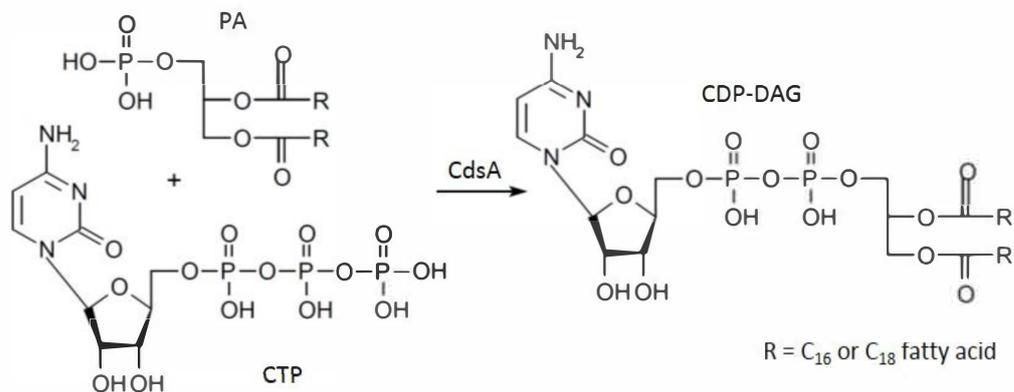


図8 CDP-DAG合成反応。CTPよりCMP部分がPAに転移し、CDP-DAGが合成される。CdsAがこの反応を触媒することが知られていたが、そのホモログであるYnbBもこの反応を触媒することを本研究で明らかとした。Rは大腸菌リン脂質一般にみられる脂肪酸アシル基を示している。

3. YnbB および CdsA 過剰発現株における MPIase 生合成活性の測定

YnbB および CdsA 過剰発現株を構築し、MPIase 生合成活性を調べた。野生株と共に対数増殖期まで培養し、IPTG を加えてプラスミド上の YnbB あるいは CdsA の発現を誘導した。それぞれの株より INV を調製し、抗 MPIase 抗体を用いたイムノブロッティングを行った。MPIase のバンドの濃さを定量し、野生株のものと比較した。その結果、YnbB、CdsA いずれの過剰発現株においても、MPIase の合成量は野生株の 3 倍以上増加していることが明らかとなった (図 9)。同様に抗 CdsA 抗体を用いてイムノブロッティングを行い、バンドの濃さを定量し、野生株のものと比較した。その結果、YnbB 過剰発現株では野生株のものと同程度 CdsA の発現量が増加していることが明らかとなった。また、当研究室の別プロジェクトにお

いて、*ynbB/cdsA* 二重欠損株が構築された。この株においては、MPIase が完全に枯渇することが明らかとなっている[86]。以上の結果より、YnbB および CdsA が MPIase 生合成酵素であると結論した。

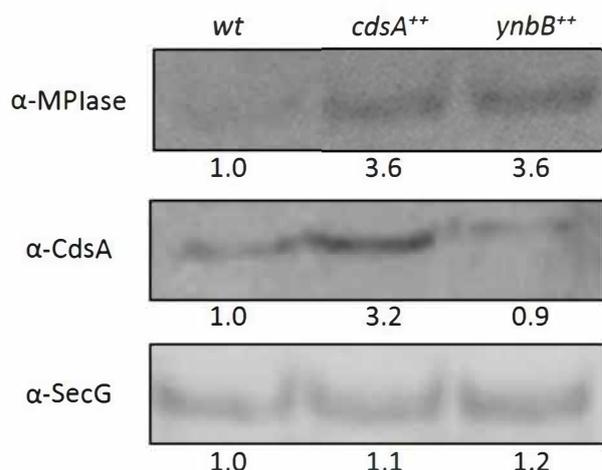


図9 野生株、YnbB過剰発現株およびCdsA過剰発現株のMPIase生合成活性。INVを調製し、上からそれぞれ抗MPIase抗体、抗CdsA抗体および抗SecG抗体を用いてイムノブロットングを行った。バンドの濃さを定量し、野生株のものを1.0とした。SecGの定量値をローディングコントロールとして用いた。

4. MPIase 生合成第一段階の反応における基質特異性

TLC で観察された反応生成物が予想した通り Compound I であるかどうかを調べた。反応溶液を TLC 展開後、反応生成物によるスポット周辺のシリカゲルをかきとった。これに展開溶媒を加えて反応生成物を抽出した。抽出物に対して LC-MS を用いた構造解析をした結果、Compound I によるピークは全く検出されず、代わりに GlcNAc によるピークが検出された (データ省略)。YnbB/ CdsA の発現と MPIase の発現が一致していることより、これらの因子が MPIase 生合成に関与していることは

明らかである。そこで、予想した反応条件に誤りがあると考えて反応条件を再検討した。CdsAはCDP-DAG生合成反応において、CTPおよびデオキシCTPに対する基質特異性が極めて高いという報告がある[95]。このことより、Compound I生合成反応においてもシチジン誘導体が基質として利用される可能性が高いと考え、シチジン枯渇条件下におけるMPIase生合成活性を調べた。大腸菌においては、CTP生合成酵素であるPyrGの変異体においては、全てのシチジン誘導体が枯渇する[97] (図10)。

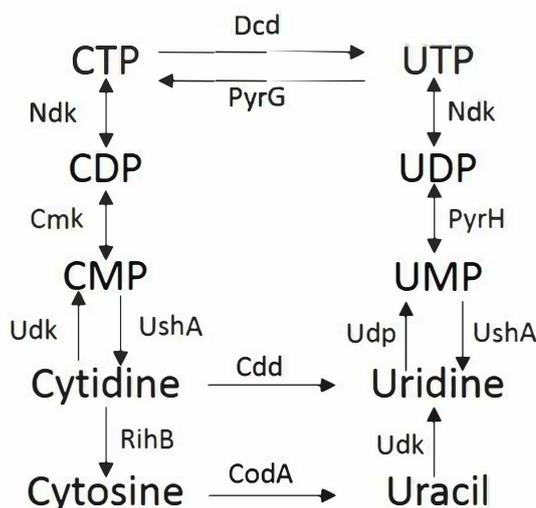


図10 大腸菌におけるピリミジン塩基の代謝経路。CTP合成酵素であるPyrGを欠損させると全てのシチジン誘導体が枯渇する。

PyrG変異株であるJF618株[94]はシチジン要求性を示す。JF618株を最小培地で培養し、シチジンの添加の有無でMPIaseの生合成量に影響が出るかを調べた。その結果、シチジンを添加しなかった場合のみ、MPIaseの枯渇が観察された(図11)。この結果より、MPIase生合成反応においてもシチジン誘導体が基質として利用されることが明らかとなった。この結果と、CdsAがCDP-DAG生合成酵素であることを考慮

して、CDP-DAG が Compound I 生合成反応の基質として利用されるのではないかと考えた。

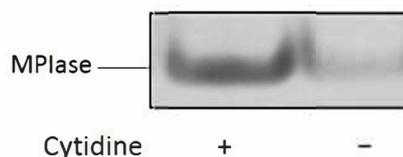


図11 PyrG欠損株 (JF618株)のMPIase生合成活性。左のレーンはシチジンを含む培地で培養した際の結果を、右のレーンはシチジンを枯渇させた際の結果をそれぞれ示している。

5. MPIase 生合成第一段階の反応の再解析

CDP-DAG を脂質部分の供与体と想定し、これに GlcNAc 供与体を加えることで Compound I 生合成反応が進行するかを調べた。CDP-DAG と GlcNAc-P に CdsA 過剰発現株より調製した INV を加え、37°Cで保温後に反応溶液を TLC 展開した。その結果、Compound I によるものと考えられるスポットは検出されなかった (図 12)。また、当研究室の別プロジェクトにおいて、酵母ミトコンドリアの CDP-DAG 生合成酵素 Tam41p を用いた解析が行われた。Tam41p は CdsA 同様に CTP と PA より CDP-DAG を生合成する反応を触媒する酵素である [98]。y**nbB**/cdA 二重欠損株に Tam41p を過剰発現させた場合、二重欠損株で観察された CDP-DAG 生合成阻害は解消されるが、MPIase 生合成は回復しないことが明らかとなっている [86]。した

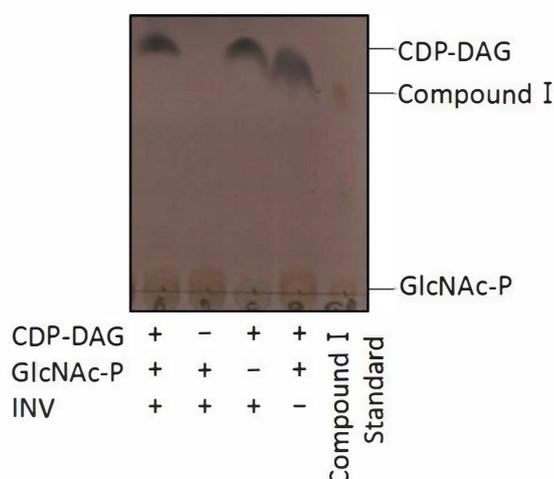


図12 CDP-DAG、GlcNAc-PおよびINVを混合した際にTLCで検出されたスポット。右のレーンには化学合成標品のCompound Iのスポットを示している。いずれの条件においても、Compound I 生合成反応の進行は観察されなかった。

がって、MPIase 生合成反応においては CDP-DAG が利用される可能性はあるものの、CDP-DAG が反応系中に存在するだけでは不十分であることが明らかとなった。

また、糖部分の供与体としてシチジン誘導体が利用される可能性を考えた。大腸菌においては、GlmU というタンパク質が UTP、GlcN-P およびアセチル-CoA より UDP-GlcNAc を生合成する[99]。In vitro での実験において、GlmU の活性部位に変異を導入すると、UTP の代わりに CTP を用いて CDP-GlcNAc を生合成するという報告がある[100]。生体内における CDP-GlcNAc の存在は証明されていないが、CDP-GlcNAc を糖供与体として Compound I 生合成反応が進行するかを調べた。INV を PA と CDP-GlcNAc と共に混合し、反応溶液を TLC 展開した。TLC 上で特異的反応生成物が観察されたが、その Rf 値は Compound I ではなく、GlcNAc のものと一致

していた (図 13)。

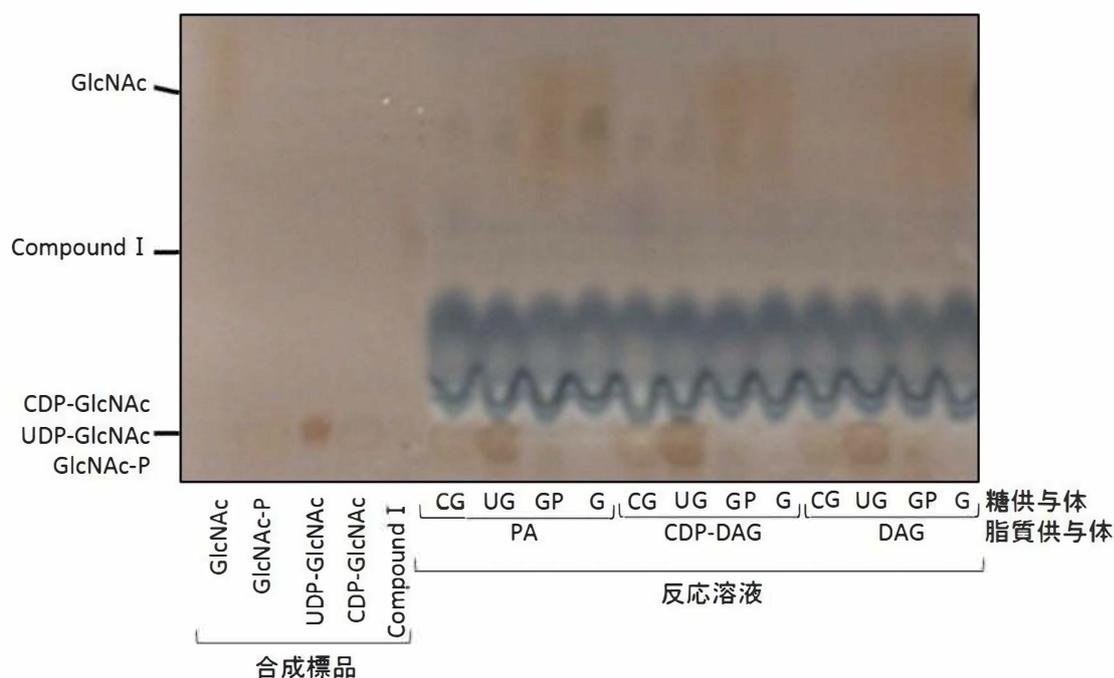


図13 様々な糖および脂質部分の供与体を用いた際のCompound I 生合成活性。糖供与体としてCDP-GlcNAc、UDP-GlcNAc、GlcNAc-PおよびGlcNAcを、脂質部分の供与体としてPA、CDP-DAGおよびDAGを用いた。基質と想定した物質とINVを混合し、37°C、3時間保温した。保温後、反応溶液の一部をTLC展開し、アニスアルデヒド/硫酸試薬で染色した。CGIはCDP-GlcNAc、UGIはUDP-GlcNAc、GPIはGlcNAc-P、GはGlcNAcをそれぞれ示す。左側のレーンは、合成標品によるスポットを示す。

考察

MPIase 生合成第一段階の反応は Compound I を生合成する反応であると予想し、これを触媒する酵素の同定を行った。その結果、内膜タンパク質 YnbB およびそのホモログ CdsA を同定した (表 1)。YnbB/ CdsA の変異株を構築し、MPIase 生合成への影響を調べた結果、YnbB/ CdsA の発現と MPIase の発現が一致していた。このことより、YnbB/ CdsA の両タンパク質が MPIase 生合成酵素であると結論した(図 9) [86]。

しかし、Compound I 生合成活性の指標とした反応生成物の構造解析を行った結果、Compound I によるピークは検出されなかった。このことより、当初予想した Compound I 生合成反応モデルに誤りがあると考え、反応モデルを再検討した。CdsA の基質特異性に着目し、Compound I 生合成反応においてもシチジンの誘導体が基質として利用される可能性を考えた。シチジン枯渇株において MPIase の枯渇が観察されたことと、CdsA が CDP-DAG 生合成酵素であることを考慮して、CDP-DAG が Compound I 生合成反応の基質として利用される可能性を考えた (図 11)。当研究室の別プロジェクトにおいて行われた Tam41p を用いた解析より、反応溶液中に CDP-DAG が存在するだけでは Compound I 生合成には不十分であることが明らかとなっている[86]。このプロジェクトにおいて、CDP-DAG 生合成反応と同時に GlcNAc 供与体を加えることで Compound I 生合成反応が進行するかが調べられた。その結果、

CdsA の高 pH 感受性変異株である GN80 株[101]より調製した INV を、pH8.5 で CTP、PA および GlcNAc-P と混合した場合のみ、Compound I と Rf 値が一致する生成物が TLC 上で検出された[86]。この生成物に対して LC-MS を用いて構造解析を行った結果、カラムからの溶出時間および分子量のいずれも化学合成標品の Compound I のものと一致するピークが検出された[86]。本研究の結果と以上の結果を総合して、Compound I 生合成反応は以下のようなモデルで進行することが判明している（図 14）。まず、CTP と PA より CDP-DAG が生合成される。その後、GlcNAc-P が CDP-DAG の CMP と置換されることで、Compound I が生合成される。これらの一連の反応は、YnbB/ CdsA 上で行われる。GlcNAc-P が取り込まれる前に CDP-DAG と酵素が解離した場合、CDP-DAG がリン脂質合成の前駆体として利用される。

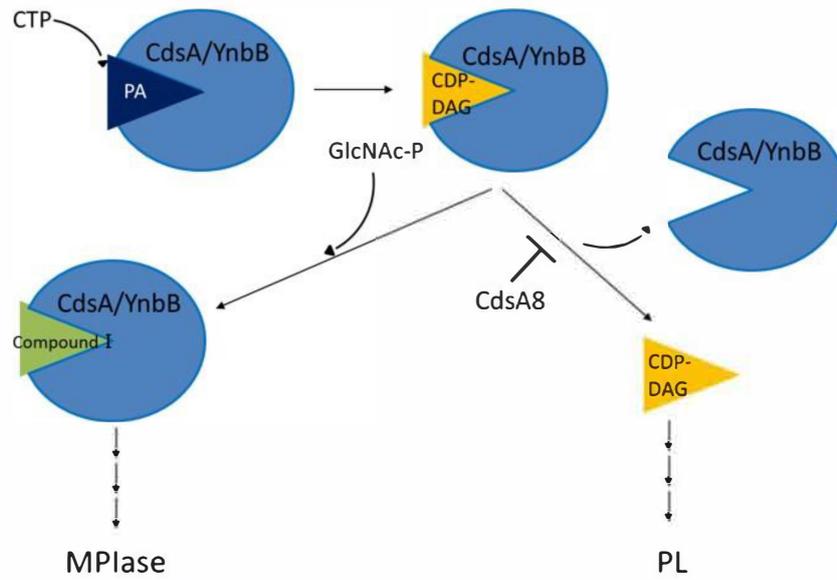


図14 Compound I 生合成反応のモデル。CTPとPAより、CDP-DAGが合成される。CMPとGlcNAc-Pが置換されることでCompound I が合成される。これらの一連の反応はYnbB/CdsA上で進行する。GlcNAcが付加される前にCDP-DAGが解離した場合、CDP-DAGはリン脂質合成の基質として利用される。CdsA8は高pH感受性のCdsA変異体であり、CDP-DAGとの解離を抑制する。

第2章 YnbB/CdsA の機能解析

序論

これまでに、MPIase 生合成に関与する因子として内膜タンパク質 YnbB およびそのホモログ CdsA を同定した。いずれのタンパク質も CDP-DAG 生合成反応および Compound I 生合成反応を触媒することが明らかとなっている[86]。CTP と PA より CDP-DAG が生合成され、続いて GlcNAc-P が CDP-DAG の CMP 部分と置換されることで Compound I が生合成されることを明らかとした (図 14)。これらの一連の反応は YnbB/ CdsA 上でのみ進行する。これらの反応を触媒する因子のうち、必須遺伝子である *cdsA* 欠損株においては、生育阻害、リン脂質生合成阻害および MPIase 生合成阻害が観察される[86, 101]。これに対し、*ynbB* 欠損株においてはそのいずれも観察されない。YnbB 過剰発現株において MPIase 生合成活性の上昇が観察されたが、染色体上の *ynbB* 遺伝子の発現は *cdsA* 欠損株における MPIase 生合成阻害を相補することはできない。*ynbB* 遺伝子は *ynbA-D* オペロン上に位置する。このオペロンの発現は転写因子である BglJ-RcsB により活性化されるという報告があるが、通常の培養条件における *ynbB* 遺伝子の発現制御機構は不明である[102, 103]。同じ反応を触媒するにも関わらず、CdsA が生育に必須である一方、YnbB は必須でない理由として、両者の酵素としての性質に着目した。好熱菌 *Thermotoga maritima* の産生する CdsA (TmCdsA)の結晶構造を明らかにした報告によると、CDP-DAG 生合成反応

における基質との結合部位は TmCdsA の C 末端側に集中している[104]。これに加えて、YnbB と CdsA の C 末端側の相同性が特に高いことと、YnbB および CdsA 過剰発現株の MPIase 生合成活性の上昇の程度が同程度であること[86]より、YnbB/CdsA の C 末端側が CDP-DAG 生合成および Compound I 生合成を行い、CdsA の N 末端側が CDP-DAG 生合成活性を著しく促進している可能性を考えた。すなわち、YnbB は MPIase 生合成に特化した因子であるという可能性である。本研究では、この可能性について検証した。

方法

1. 材料

Cytidine triphosphate (CTP)は Roche Diagnostics より購入した。L-(+)-arabinose はSIGMA より購入した。抗M13抗体、過剰発現プラスミド pTet-CdsA、pTac-Tam41p および pTac-M13 は報告[86]に記載されているものを用いた。

2. YnbB、キメラタンパク質および CdsA8 過剰発現株の構築

YnbB、キメラタンパク質および CdsA8 の過剰発現プラスミドを構築した。キメラタンパク質は、YnbB の N 末端側 1-150 アミノ酸に CdsA の C 末端側 144-285 アミノ酸を連結したもの (YnbB-N-CdsA-C)と CdsA の N 末端側 1-143 アミノ酸に YnbB の C 末端側 151-298 アミノ酸を連結したもの (CdsA-N-YnbB-C)の 2 種類を構築した。プラスミドベクター pACYC-Km[86]の *tet* プロモーター支配下に *ynbB*、キメラタンパク質および *cdsA8* の読み枠を含む DNA をそれぞれ連結した (pTet-YnbB、pTet-YnbB-N-CdsA-C、pTet-CdsA-N-YnbB-C、pTet-CdsA8)。

pTet-YnbB は以下のようにして構築した。pTac-YnbB および pACYC-Km を BamHI/SalI 処理し、ライゲーションした。

pTet-YnbB-N-CdsA-C は以下のように構築した。pTac-YnbB を鋳型にし、それぞれ次に示すプライマーを用いて PCR を行い、YnbB の 1-150 アミノ酸に CdsA の

144-150 アミノ酸を連結したペプチドをコードする DNA を増幅した。フォワードプライマー：5'-GGA TCC TAG GAG GTT TAA ATT TAT GCT GGA AAA ATC TCT G-3'およびリバープライマー：5'-GCC ACT GTA ATG ATT CTC GTC ACT CAA GGC GAA AAC GGT CAT-3'を用いた。pTac-CdsA を鋳型にし、それぞれ次に示すプライマーを用いて pUSI2 ベクターに CdsA の 144-285 アミノ酸をコードする DNA を連結したものを増幅した。フォワードプライマー：5'-AAA TTT AAA CCT CCT AGG ATC C-3'およびリバープライマー：5'-GAC GAG AAT CAT TAC AGT GGC-3'を用いた。PCR 産物を ME9783 株 (NBRP) に導入した。ME9783 株細胞内において、末端の重複した~20 塩基対で組換えが起こり、pTet -YnbB-NCdsA-C を構築した。

pTet-CdsA-N-YnbB-C は以下のようにして構築した。pTac-CdsA を鋳型にし、それぞれ次に示すプライマーを用いて PCR を行い、CdsA の 1-143 アミノ酸に YnbB の 151-157 アミノ酸を連結したペプチドをコードする DNA を増幅した。フォワードプライマー：5'-GGA TCC TAG GAG GTT TAA ATT TTT GCT GAA GTA TCG CCT G-3'および、リバープライマー：5'-CAT TAA TAA CCA GGC GGC ATG ATA GTG CCA GGC CCG TAA CGC-3'を用いた。pTac-YnbB を鋳型にし、それぞれ次に示すプライマーを用いて pUSI2 ベクターに YnbB の 151-298 アミノ酸をコードする DNA を連結したものを増幅した。フォワードプライマー：5'-AAA TTT AAA CCT CCT AGG ATC C-3'およびリバープライマー：5'-CAT GCC GCC TGG TTA TTA ATG-

3'を用いた。PCR産物を ME9783 株 に導入し、重複した~20塩基対での組換えを利用して pTet-CdsA-N-YnbB-C を構築した。

pTet-CdsA8 は以下の様に構築した。pTac-CdsA8[86]および pACYC184-Km を BamHI/SalI 処理し、ライゲーションした。

上記のプラスミド DNA および、必要があれば pTac-Tam41p、pTac-M13 のいずれかを EK413/ $\Delta cdsA$ 株 (KS22 株[86]) および EK413/ $\Delta ynbB$ / $\Delta cdsA$ 株 (KS23 株[86]) に導入した。

3. YnbB およびキメラタンパク質の過剰発現による *ynbB/cdsA* 二重欠損株の生育相補実験

KS23 株、KS23/pTet-YnbB/pTac-Tam41p 株、KS23/pTet-YnbB-N-CdsA-C/pTac-Tam41p 株および KS23/pTet-CdsA-N-YnbB-C/pTac-Tam41p 株をそれぞれアガロースプレート培地に植菌した。培地は、LB 培地および 0.2% アラビノースまたは 1 mM IPTG になるよう加えたものを用いた。植菌後のプレートを 37 °C、17 時間保温した。

4. リン脂質の定量

EK413 株[87]、EK413/ $\Delta ynbB$ 株 (KS21 株[86])、KS22 株[86]、KS23 株、KS23/pTet-YnbB 株、KS23/pTac-Tam41 株、KS23/pTet-YnbB/pTac-Tam41 株、

KS23/pTet-YnbB-N-CdsA-C 株、KS23/pTet-YnbB-N-CdsA-C/pTac-Tam41p 株、
KS23/pTet-CdsA-N-YnbB-C 株、KS23/pTet-CdsA-N-YnbB-C/pTac-Tam41p 株、
KS22/pTet-CdsA8 株および KS23/pTet-CdsA8 株を 0.2 % アラビノースを添加した
培地で一晚培養した。集菌、洗浄後にアラビノースを含まない培地に植え次いで対
数増殖期まで培養した。1 mM IPTG になるよう加えて 2 時間培養し、Tam41p の発
現を誘導した。1,800×g、10 分間遠心分離して集菌し、クロロホルム/メタノール
(2 : 1)を加えてリン脂質を抽出した。これを TLC プレートに滴下し、溶媒 A を用い
て展開した。展開後のプレートを報告[105]に記載されているものを改良したリンモ
リブデン酸試薬 (2.3 % 12 molybdo (VI) phosphoric acid n-hydrate、1.2 % 無機リ
ン酸、4.7 % 硫酸)に浸し、180°Cに加熱した。

5. MPIase 生合成活性測定

EK413 株、KS21 株、KS22 株、KS23 株、KS23/pTet-YnbB 株、KS23/pTac-Tam41
株、KS23/pTet-YnbB/pTac-Tam41 株、KS23/pTet-YnbB-N-CdsA-C 株、KS23/pTet-
YnbB-N-CdsA-C/pTac-Tam41p 株、KS23/pTet-CdsA-N-YnbB-C 株、KS23/pTet-
CdsA-N-YnbB-C/pTac-Tam41p 株、KS22/pTet-CdsA8 株および KS23/pTet-CdsA8
株を 0.006 % アラビノースを添加した培地で一晚培養した。集菌、洗浄後にアラビ
ノースを含まない培地に植え次いで対数増殖期まで培養した。1 mM IPTG を加えて 2

時間培養し、Tam41p の発現を誘導した。1,800×g、10 分間遠心分離して集菌し、報告[74]に記載されている方法で抗 RpmJ 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。これをローディングコントロールとし、同様にして抗 MPIase 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。

6. M13 プロコートタンパク質の膜挿入活性測定

EK413/pTac-M13 株、KS21/pTac-M13 株、KS22/pTac-M13 株、KS23/pTac-M13 株、KS23/pTet-YnbBpTac-M13 株、KS23/pTet-YnbB-N-CdsA-C/pTac-M13、KS23/pTet-CdsA-N-YnbB-C/pTac-M13 株、KS22/pTet-CdsA8/pTac-M13 株および KS23/pTet-CdsA8/pTac-M13 株を 0.006% アラビノースを添加した培地で一晩培養した。集菌、洗浄後にアラビノースを含まない培地に植え次いで対数増殖期まで培養した。1 mM IPTG を加えて 2 時間培養し、M13 コートタンパク質の発現を誘導した。1,800×g、10 分間遠心分離して集菌し、報告[74]に記載されている方法で抗 M13 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。

7. *in vitro* における CDP-DAG 生合成活性測定

KS23/pTet-YnbB 株、KS23/pTet-CdsA 株、KS23/pTet-YnbB-N-CdsA-C 株および KS23/pTet-CdsA-N-YnbB-C 株より INV を調製した。2 mg/mL INV、1 mM CTP、

1 mM PA、1.5% OG、5 mM 硫酸マグネシウム、75 mM 塩化カリウム、50 mM Tris-HCl pH (7.0)になるよう調製し、37°Cで保温した。2 時間後および5 時間後に反応溶液の一部を TLC プレートに滴下し、溶媒 A を用いて TLC 展開した。紫外線を照射し、その吸収より CDP-DAG を検出した。

結果

1. *ynbB/cdsA* 二重欠損株における YnbB および Tam41p の過剰発現による生育への影響

cdsA を欠損させると生育が阻害されることが知られている[101]。その理由は、CDP-DAG 生合成反応が阻害されることに加えて、MPIase 生合成反応が阻害されるためであることをこれまでに明らかにした[86, 96]。また、CdsA ホモログである YnbB も CDP-DAG および MPIase 生合成反応という、生育に必須の 2 つの反応に関与していることを明らかとした[86]。*cdsA* 欠損株において観察される生育の阻害は、YnbB を過剰発現させるだけでは抑制されない[86]。これは YnbB の CDP-DAG 生合成活性は CdsA より著しく低いためであると仮定し、これを検証しようと考えた。YnbB 過剰発現プラスミドおよび酵母ミトコンドリア CDP-DAG 生合成酵素 Tam41p 過剰発現プラスミドを KS23 株に導入し、生育相補実験を行った。YnbB は恒常的に発現する pACYC-Km に、Tam41p は IPTG により発現が誘導される pUSI2 に連結した。LB 寒天培地に植菌し、アラビノースあるいは IPTG の添加による生育への影響を調べた。その結果、IPTG を添加して YnbB と Tam41p の両方を過剰発現させた場合のみ、生育の回復が観察された (図 15)。Tam41p を大腸菌に発現させた場合、CDP-DAG 生合成活性は示すものの、MPIase 生合成活性は全く示さないことが明らかとなっている[86]。したがって、YnbB は生育に十分な量の MPIase を生合成する一方、

CDP-DAG 生合成活性は不十分である可能性が示唆された。

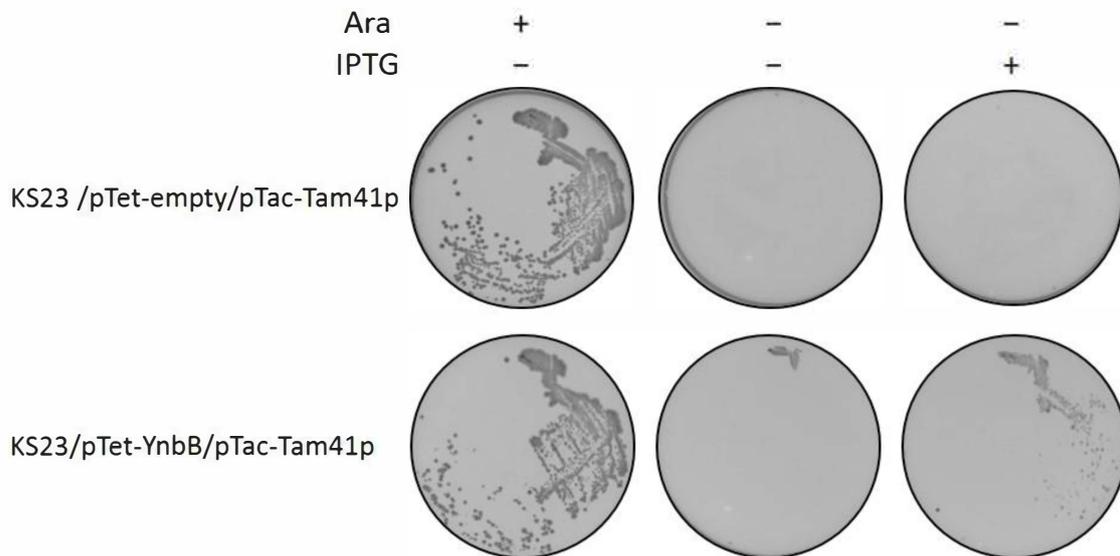


図15 *ynbB/cdsA*二重欠損株においてYnbBの過剰発現が生育に及ぼす影響。寒天培地にKS23/pTet-empty/pTac-Tam41p株およびKS23/pTet-YnbB/pTac-Tam41p株を植菌し、37℃、一晚培養した。培地は、0.02%アラビノースまたは1 mM IPTGを添加したものを用いた。

2. YnbB による MPIase および CDP-DAG 生合成活性の測定

YnbB による MPIase 生合成活性を調べた。KS23/pTet-YnbB 株を、アラビノースを含まない培地で培養し、抗 MPIase 抗体を用いて免疫ブロッティングを行った。*ynbB/cdsA* 二重欠損株においては MPIase の枯渇が観察される [86] (図 16)。*ynbB/cdsA* 二重欠損株に YnbB を過剰発現させた場合、MPIase 生合成量は野生株と同程度まで回復する様子が観察された (図 16)。この結果より、YnbB の過剰発現によって *cdsA* 欠損株の生育阻害を抑制できないのは、MPIase 生合成活性が低いためではないことが明らかとなった。

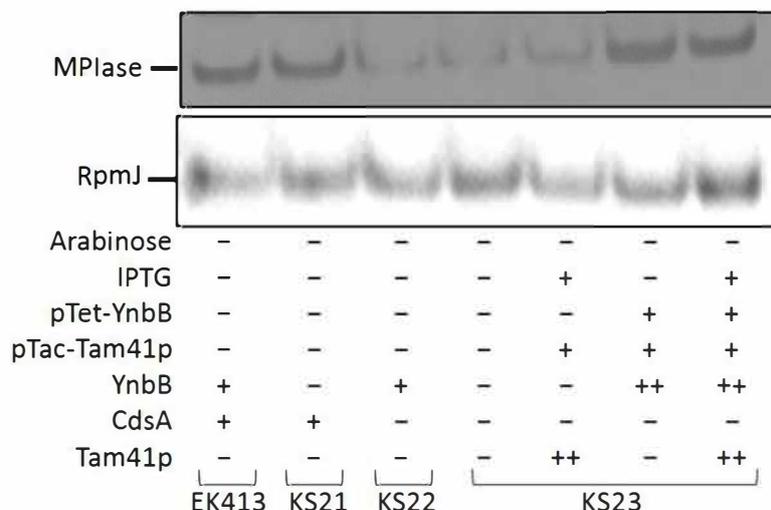


図16 YnbBのMPlase生合成活性。EK413株、KS21株、KS22株、KS23株、KS23/pTac-Tam41p株およびKS23/pTet-YnbB/pTac-Tam41p株をそれぞれ0.006%アラビノース存在下で培養し、洗浄後にアラビノースを含まない培地で対数増殖期まで培養した。IPTGを1 mMになるよう加え、Tam41pの発現を誘導した。集菌後にTCA沈殿を行い、イムノブロッティングを行った。上の段は抗MPlase抗体を、下の段は抗RpmJ抗体を用いた結果を示す。リボソームタンパク質RpmJをローディングコントロールとした。

続いて、YnbBのCDP-DAG生合成活性を調べた。CDP-DAG生合成反応が阻害されると、前駆体であるPAが蓄積することが知られている[96, 101]。KS23/pTet-YnbB株を、アラビノースを含まない培地で培養し、リン脂質を抽出した。これをTLC展開し、リンモリブデン酸試薬で染色してPAが蓄積しているかを調べた。その結果、KS23株で観察されたPAの蓄積はYnbBを過剰発現させても抑制されなかった(図17)。この株にTam41pを同時に過剰発現させた場合のみPAの蓄積が観察された。この結果とYnbBがMPlase生合成活性を示したことより、YnbBはMPlase生合成に特化した因子であり、CDP-DAG生合成活性はCdsAのものと比較すると著しく低いことが明らかとなった。

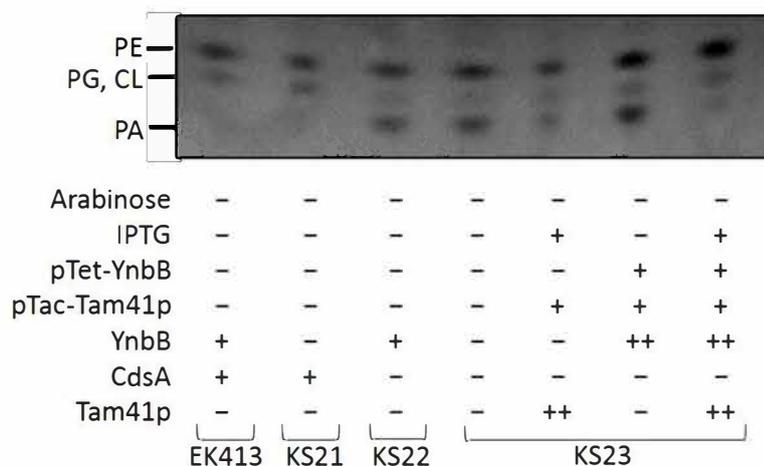


図17 YnbBのCDP-DAG生合成活性。CDP-DAGの前駆体であるPAの蓄積をCDP-DAG生合成阻害の指標とした。EK413株、KS21株、KS22株、KS23株、KS23/pTac-Tam41株およびKS23/pTet-YnbB/pTac-Tam41株をそれぞれ0.006%アラビノース存在下で培養し、洗浄後にアラビノースを含まない培地で対数増殖期まで培養した。IPTGを1 mMになるよう加え、Tam41pの発現を誘導した。集菌後にクロロホルム/メタノール (2:1)でリン脂質を抽出し、一部をTLC展開して改良リンモリブデン酸試薬で染色した。660 nmにおける濁度より菌数を定量し、等量になるよう試料を添加した。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それぞれ示す。

3. YnbB により生合成された MPIase のタンパク質膜挿入活性の測定

YnbB により生合成された MPIase がタンパク質膜挿入因子として機能しているかを調べた。基質膜タンパク質として、M13 ファージ由来の M13 コートタンパク質を用いた。M13 コートタンパク質は、シグナル配列を持つ前駆体 (M13 procoat) として合成され、膜挿入後にシグナル配列が切断されて成熟体 (M13 coat) となる [106]。その膜挿入反応は、Sec/SRP 非依存の経路で進行し、MPIase に依存して膜挿入される [68, 86]。膜挿入後にシグナル配列が切断されるため、ポリアクリルアミドゲル上での成熟体と前駆体の分子量の違いよりその膜挿入活性を調べることができる。c*dsA* 欠損株においては、MPIase が枯渇するために前駆体の蓄積が観察され

る[86]。KS23 株に YnbB を過剰発現させ、M13 前駆体の蓄積が抑制されるかを調べた。その結果、*cdsA* 欠損株で観察された M13 の膜挿入阻害は、YnbB の過剰発現によって部分的に抑制されることが明らかとなった (図 18)。この結果より、YnbB によって生合成された MPIase は生体内においてタンパク質膜挿入因子として機能していることが明らかとなった。

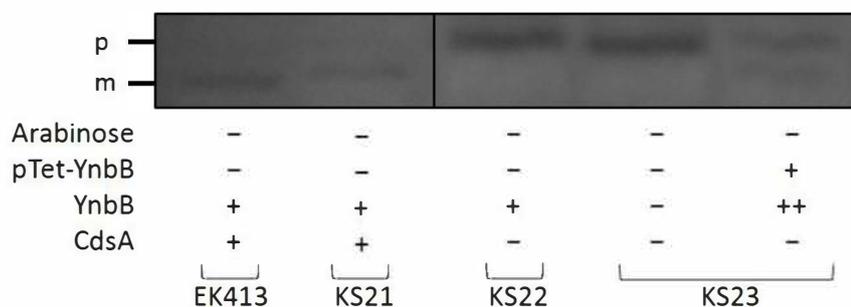


図18 YnbBの生合成したMPIaseによるM13コートタンパク質の膜挿入活性。EK413/pTac-M13株、KS21/pTac-M13株、KS22/pTac-M13株、KS23/pTac-M13株およびKS23/pTet-YnbB/pTac-M13株をそれぞれ0.006%アラビノース存在下で培養し、洗浄後、アラビノースを含まない培地で対数増殖期まで培養した。IPTGを1 mMになるよう加え、M13コートタンパク質の発現を誘導した。集菌後、TCA沈殿を行い、SDS-PAGE後に抗M13抗体を用いてイムノブロットングを行った。シグナル配列の切断による分子量の減少を膜挿入活性の指標とした。“p”は前駆体、“m”は成熟体を示す。

4. *ynbB/cdsA* 二重欠損株におけるキメラタンパク質および Tam41p の過剰発現による生育への影響

これまでに、YnbB の MPIase 生合成活性は CdsA と同程度であるが、CDP-DAG 生合成活性は著しく低いことを示した (図 9、17)。YnbB と CdsA の CDP-DAG 生合成活性の違いは、両者のアミノ酸配列の違いに起因するのではないかと予想した。

YnbB と CdsA のアミノ酸配列は C 末端側で相同性が特に高く、N 末端側の相同性は

低い (図 7)。このことより、YnbB および CdsA の N 末端側の領域が CDP-DAG 生合成活性の調節に関与していると考え、両者の N 末端側と C 末端側を入れ替えたキメラタンパク質を用いてこれを検証した。キメラタンパク質は、YnbB の 1-150 アミノ酸に CdsA の 144-285 アミノ酸を連結したもの (YnbB-N-CdsA-C) と、CdsA の 1-143 アミノ酸に YnbB の 151-298 アミノ酸を連結したもの (CdsA-N-YnbB-C) の 2 種類を構築した (図 19)。これらのキメラタンパク質をコードする読み枠 DNA を

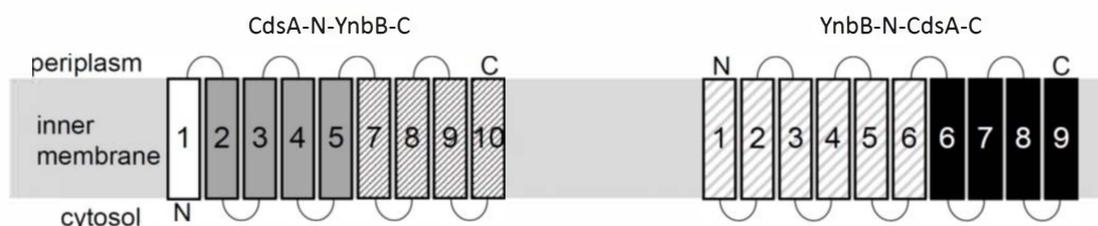


図19 キメラタンパク質の構造。YnbBおよびCdsA両者のN-末端側とC末端側を入れ替えたキメラタンパク質を構築した。CdsAのN末端側 (1-143アミノ酸、TM1-5)にYnbBのC末端側 (151-298アミノ酸、TM7-10)を連結したもの (CdsA-N-YnbB-C)および、YnbBのN末端側 (1-150アミノ酸、TM1-6)にCdsAのC末端側 (144-285アミノ酸、TM6-9)を連結したものを (YnbB-N-CdsA-C)をそれぞれ構築した。膜貫通領域および配向性は、図7に示したYnbBおよびCdsAのものを参考にした。

pACYC-Km の *tet* プロモーター支配下に連結し、pTac-Tam41p と共に KS23 株に導入した。これらの株を LB 寒天培地に植菌し、アラビノースおよび IPTG の有無による生育への影響を調べた。その結果、CdsA-N-YnbB-C を発現させた場合、Tam41p の発現の有無にかかわらず *ynbB/cdsA* 二重欠損株の生育阻害の抑制が観察された (図 20)。一方、YnbB-N-CdsA-C を発現させた場合、Tam41p と共に発現させた場合のみ生育阻害の抑制が観察された。この結果より、YnbB/CdsA いずれの C 末端側も生育に十分な量の MPIase 生合成活性を有する可能性が示唆された。また、生育に十

分な量の CDP-DAG を生合成するためには、CdsA の C 末端側が必要である可能性が示唆された。これを検証するため、キメラタンパク質の MPIase 生合成活性及び CDP-DAG 生合成活性を調べた。

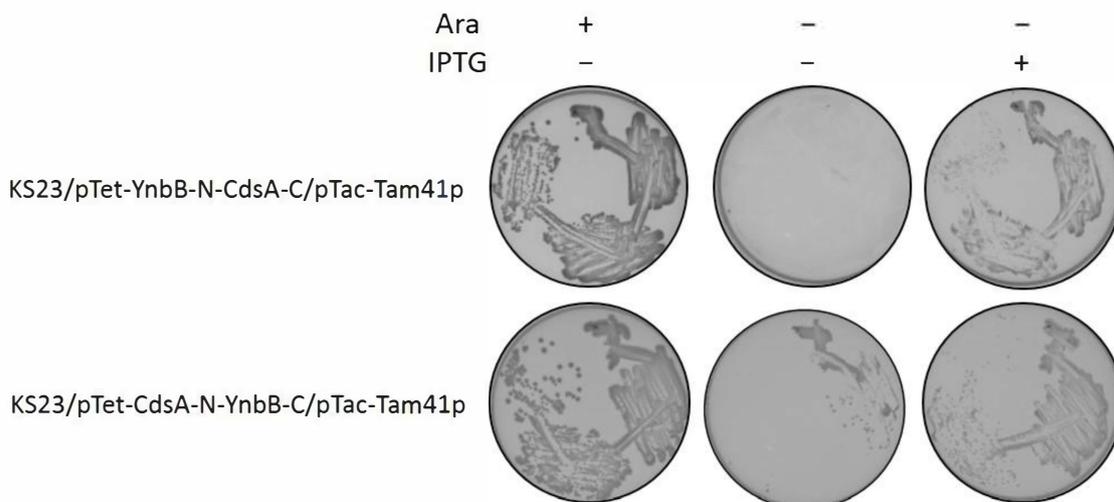


図20 *ynbB/cdsA*二重欠損株においてキメラタンパク質の過剰発現が生育に及ぼす影響。寒天培地にKS23/pTet-YnbB-N-CdsA-C/pTac-Tam41p株およびKS23/pTet-CdsA-N-YnbB-C/pTac-Tam41p株を植菌し、37°C、一晩培養した。培地は、0.02%アラビノースまたは1 mM IPTGを添加したものを用いた。

5. キメラタンパク質による MPIase および CDP-DAG 生合成活性測定

キメラタンパク質による MPIase 生合成活性を調べた。KS23/pTet-YnbB-N-CdsA-C 株および KS23/pTet-CdsA-N-YnbB-C 株を、アラビノースを含まない培地で培養し、抗 MPIase 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。その結果、いずれのキメラタンパク質も、MPIase 生合成活性を有していることが明らかとなった (図 21)。

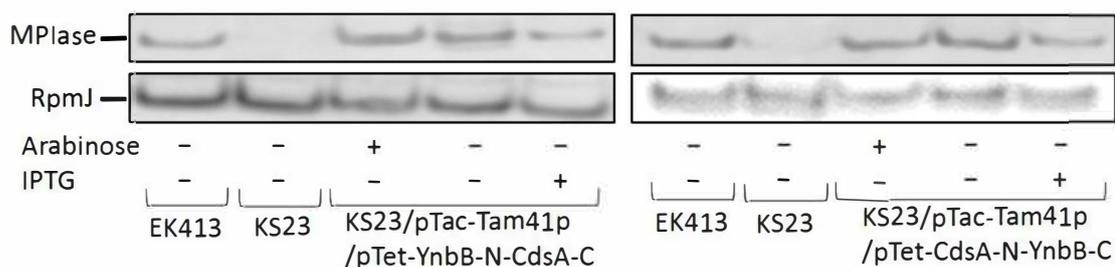


図21 キメラタンパク質のMPlase生合成活性。EK413株、KS23株、KS23/pTet-YnbB-N-CdsA-C/pTet-Tam41p株およびKS23/pTet-CdsA-N-YnbB-C/pTet-Tam41p株をそれぞれ0.006%アラビノース存在下で培養し、洗浄後にアラビノースを含まない培地で対数増殖期まで培養した。IPTGを1 mMになるよう加え、Tam41pの発現を誘導した。集菌後にTCA沈殿を行い、SDS-PAGE後にイムブロットングを行った。上の段は抗MPlase抗体を、下の段は抗RpmJ抗体を用いた結果を示す。リボソームタンパク質RpmJをローディングコントロールとした。

続いて、キメラタンパク質過剰発現株の CDP-DAG 生合成活性を調べた。YnbB 過剰発現株の時と同様に、KS23 株で観察される PA の蓄積の抑制を活性の指標とした。KS23/p-Tet-YnbB-N-CdsA-C 株および KS23/pTet-CddsA-N-YnbB-C 株を、アラビノースを含まない培地で培養し、リン脂質を抽出して TLC 展開した。その結果、YnbB-N-CdsA-C 過剰発現株においては、KS23 株で観察された PA の蓄積は全く抑制されず、Tam41p を共に過剰発現させた場合のみ抑制された (図 22)。これに対し、CdsA-N-YnbB-C を過剰発現させた場合、Tam41p を過剰発現させなくても PA の蓄積は抑制された。この結果より、生育に十分な量の CDP-DAG を生合成するためには、CdsA の N 末端側の領域が必要であることが明らかとなった。

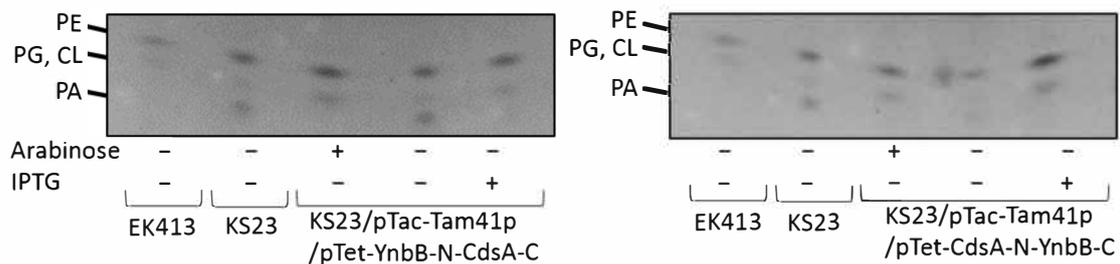


図22 キメラタンパク質のCDP-DAG生合成活性。CDP-DAGの前駆体であるPAの蓄積をCDP-DAG生合成阻害の指標とした。EK413株、KS23株、KS23/pTet-YnbB-N-CdsA-C/pTet-Tam41p株およびKS23/pTet-CdsA-N-YnbB-C/pTet-Tam41p株をそれぞれ0.006%アラビノース存在下で培養し、洗浄後にアラビノースを含まない培地で対数増殖期まで培養した。IPTGを1 mMになるよう加え、Tam41pの発現を誘導した。集菌後にクロロホルム/メタノール (2:1) でリン脂質を抽出し、一部をTLC展開して改良リンモリブデン酸試薬で染色した。660 nmにおける濁度より菌数を定量し、等量になるよう試料を添加した。PEはホスファチジルエタノールアミン、PGI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それぞれ示す。

6. キメラタンパク質により生合成された MPIase のタンパク質膜挿入活性

キメラタンパク質により生合成された MPIase が、生体内においてタンパク質膜挿入因子として機能しているかを調べた。基質膜タンパク質として M13 コートタンパク質を用い、シグナル配列の切断による分子量の変化を膜挿入活性の指標とした。KS23/pTet-YnbB-N-CdsA-C/pTet-M13 株および KS23/pTet-CdsA-N-YnbB-C/pTet-M13 株を、アラビノースを含まない培地で培養し、IPTG を加えて M13 の発現を誘導した。集菌後に TCA 沈殿を行い、抗 M13 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。その結果、*cdsA* 欠損株で観察されたタンパク質膜挿入阻害は、YnbB-N-CdsA-C を過剰発現させた場合部分的に、CdsA-N-YnbB-C を過剰発現させた場合ほぼ完全に抑制された (図 23)。

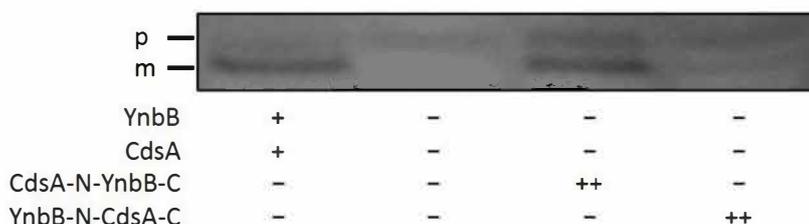


図23 キメラタンパク質が発現した株におけるM13コートタンパク質の膜挿入活性。
EK413/pTac-M13株、KS23/pTac-M13株、KS23/pTet-CdsA-N-YnbB-C/pTacc-M13および
KS23/pTet-YnbB-N-CdsA-C/pTac-M13株をそれぞれ0.006%アラビノース存在下で培養し、
洗浄後、アラビノースを含まない培地で対数増殖期まで培養した。IPTGを1 mMになるよ
う加え、M13コートタンパク質の発現を誘導した。集菌後、TCA沈殿を行い、抗M13抗体
を用いてイムブロットングを行った。“p”は前駆体、“m”は成熟体を示す。

7. *in vitro* における YnbB、CdsA およびキメラタンパク質の CDP-DAG 生合成活性 測定

試験管内における YnbB およびキメラタンパク質の CDP-DAG 生合成活性を調べた。KS23/pTet-YnbB 株、KS23/pTet-YnbB-N-CdsA-C 株および KS23/pTet-CdsA-N-YnbB-C 株より調製した INV を、CTP と PA と共に混合した。これを 37°C で保温し、反応溶液の一部を TLC 展開した。反応開始から 2 時間後および 5 時間後に反応溶液の一部を分取し、TLC 展開した。その結果、CdsA および CdsA-N-YnbB-C 過剰発現株より調製した INV を用いた場合、反応開始から 2 時間後には CDP-DAG 生合成活性は飽和していた (図 24)。これに対し、YnbB および YnbB-N-CdsA-C を過剰発現させた場合は、反応開始から 2 時間後では CDP-DAG 生合成活性はほとんど検出されず、5 時間後で CdsA および CdsA-N-YnbB-C と同程度の活性が検出された。この結果と生体内での PA の蓄積を観察した結果より、CDP-DAG 生合成活性を著しく促

進するためには、CdsA の N 末端側の領域が必要であることが *in vitro* と *in vivo* の両方の実験系で明らかにされた。

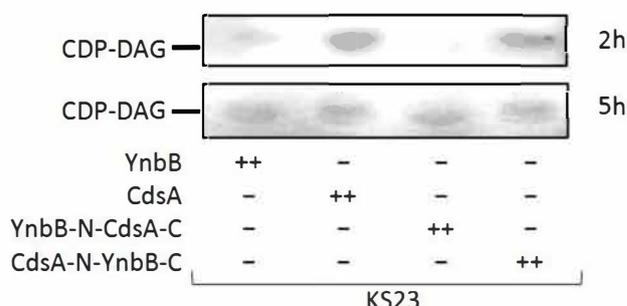


図24 *in vitro*におけるYnbB、CdsAおよびキメラタンパク質のCDP-DAG生合成活性。KS23/pTet-YnbB株、KS23/pTet-CdsA株、KS23/pTet-YnbB-N-CdsA-C株およびKS23/pTet-CdsA-N-YnbB-C株をそれぞれ0.006%アラビノースを含む培地で培養した。洗浄後、アラビノースを含まない培地で対数増殖期まで培養し、INVを調製した。INVをCTPおよびPAと共に混合し、37°Cで保温した。2時間後、5時間後に反応溶液の一部をTLC展開した。紫外線を照射し、その吸収よりCDP-DAGを検出した。

8. CdsA 変異株における YnbB の機能

プラスミドより発現した YnbB は MPIase 生合成活性を示した。しかし、*cdsA* 欠損株において MPIase 生合成阻害が観察されたことより、通常の培養条件において、染色体上の *ynbB* 遺伝子が発現しているかどうか不明である[86] (図 16)。そこで、CdsA の機能が一部阻害された変異株における *ynbB* 遺伝子破壊の影響を調べた。CdsA の 207 番目のチロシンがヒスチジンに置換された変異株 (CdsA8)は、pH8.5 以上で生育が阻害される[101]。KS22 株および KS23 株に pTet-CdsA8 を導入し、その生育、MPIase 生合成活性および CDP-DAG 生合成活性を調べた。その結果、KS22/pTet-CdsA8 株の生育は阻害されなかったが、KS23/pTet-CdsA8 株の生育は阻

害された (図 25)。この結果より、CdsA 機能が一部阻害された場合、*ynbB* 遺伝子が生育に必須になることが示された。

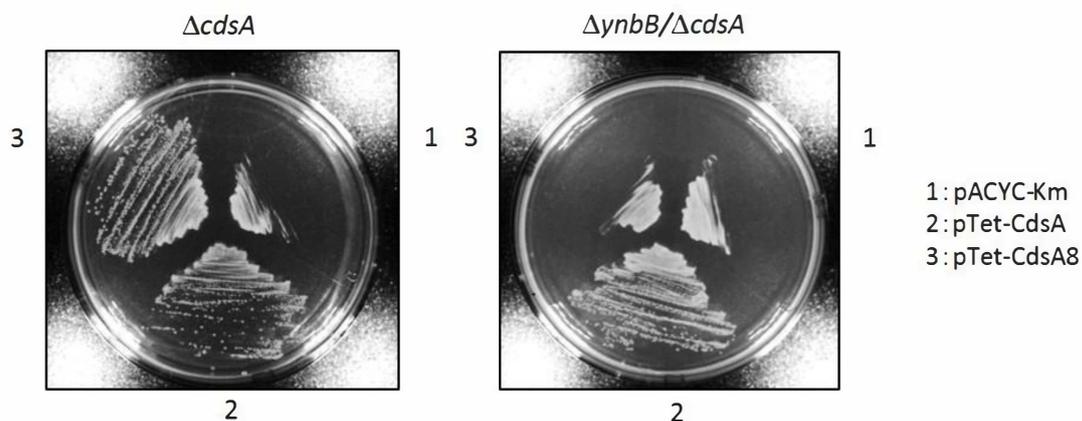


図25 CdsA変異株においてYnbBが生育に及ぼす影響。KS22株およびKS23株にpACYC-Km、pTet-CdsAおよびpTet-CdsA8を導入した。LB寒天培地に植菌し、37°C、一晩保温した。

続いて、これらの株の CDP-DAG 生合成活性を調べた。アラビノースを含まない培地で培養し、集菌後にリン脂質を抽出した。これを TLC 展開し、アニスアルデヒド/硫酸試薬で染色した。その結果、KS22/pTet-CdsA8 株では PA の蓄積は観察されなかった一方、KS23/pTet-CdsA8 株では PA の蓄積が観察された (図 26)。

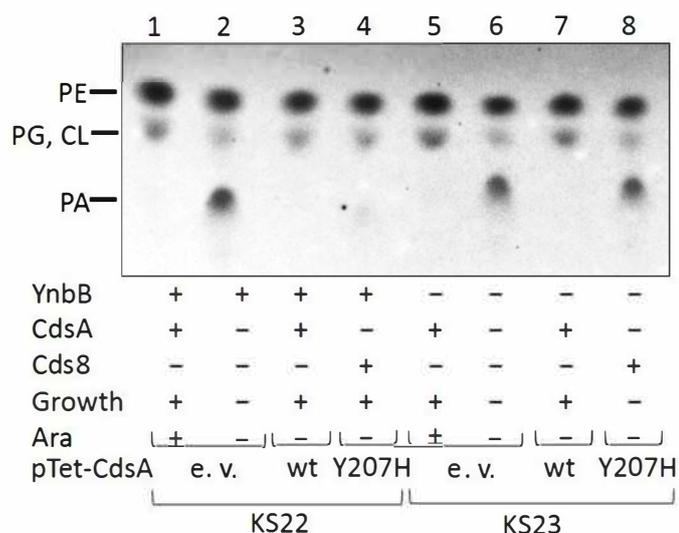


図26 CdsA変異株におけるYnbBのCDP-DAG生合成活性。KS22株およびKS23株にpACYA、pTet-CdsAおよびpTet-CdsA8を導入した。それぞれ0.006%アラビノース存在下で培養し、洗浄後にアラビノースを含まない培地で対数増殖期まで培養した。集菌後にクロロホルム/メタノール (2:1)でリン脂質を抽出し、一部をTLC展開してアニスアルデヒド/硫酸試薬で染色した。660 nmにおける濁度より菌数を定量し、等量になるよう試料を添加した。PEはホスホエタノールアミン、PGはホスファチジルグリセロール、CLはカルジオリピン、PAはホスファチジン酸をそれぞれ示す。

これらの株のMPIase生合成活性を調べた。アラビノースを含まない培地で培養し、抗 MPIase 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。その結果、KS22/pTet-CdsA8 株は MPIase 生合成活性を示した一方、KS23/pTet-CdsA8 株は MPIase 生合成活性を示さなかった (図 27)。これらの株における M13 コートタンパク質の膜挿入活性を調べた。pTac-M13 を導入し、抗 M13 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。その結果、KS22/pTet-CdsA8 株においては成熟体 M13 コートタンパク質のみ検出されたが、KS23/pTet-CdsA8 株においては前駆体の蓄積が観察された (図 28)。

以上の結果より、染色体上の *ynbB* 遺伝子は、CdsA の機能が一部阻害されたときに必須となることが明らかとなった。

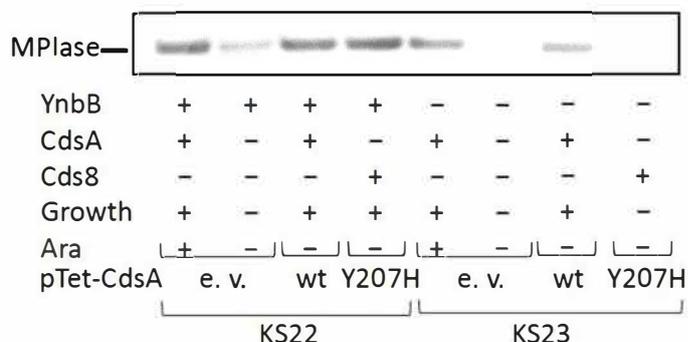


図27 CdsA変異株におけるYnbBのMPlase生合成活性。KS22株およびKS23株にpACYC184-Km、pTet-CdsAおよびpTet-CdsA8を導入した。それぞれ0.006%アラビノース存在下で培養し、洗浄後にアラビノースを含まない培地で対数増殖期まで培養した。集菌後にTCA沈殿を行い、抗MPlase抗体を用いてイムノブロットングを行った。e. v. はpACYC184-Kmを、wtはpTet-CdsAを、Y207HはpTet-CdsA8を示す。

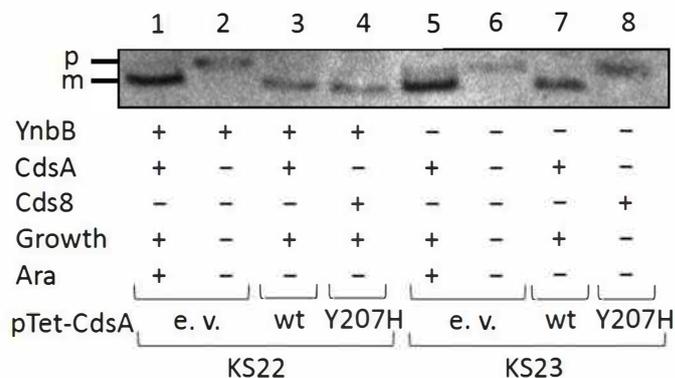


図28 CdsA変異株におけるタンパク質膜挿入活性。KS22株およびKS23株にpACYC-Km、pTet-CdsAおよびpTet-CdsA8をそれぞれ導入した。pTac-M13を導入し、それぞれ0.006%アラビノース存在下で培養し、洗浄後にアラビノースを含まない培地で対数増殖期まで培養した。IPTGを1 mM加え、M13コートタンパク質の発現を誘導した。集菌後にTCA沈殿を行い、抗M13抗体を用いてイムノブロットングを行った。e. v. はpACYC184-Kmを、wtはpTet-CdsAを、Y207HはpTet-CdsA8を示す。

考察

第2章においては、YnbBの機能解析を行った。*ynbB*は必須遺伝子ではない。さらに、YnbBを過剰発現させても、そのホモログである*cdsA*欠損株で観察される生育阻害を抑制することはできない[86]。しかし、YnbBをTam41pと共に過剰発現させた場合、*cdsA*欠損株の生育が回復することが明らかとなった。Tam41pはCDP-DAG生合成活性は持つ一方、MPIase生合成活性は全くもたない[86]。したがって、YnbBはMPIase生合成に特化した因子である可能性が示唆された。実際に、*ynbB/cdsA*二重欠損株にYnbBを過剰発現させた場合、リン脂質生合成が阻害されているにもかかわらず、M13コートタンパク質の膜挿入反応の進行が部分的に観察された。この株においてMPIaseが生合成される様子が観察されたことも踏まえて、YnbBはMPIase生合成に特化した因子であると結論した。YnbBは真正細菌において広く保存されていることと、MPIaseがタンパク質膜挿入に必須の因子であることより、YnbBは、MPIase生合成に不備が生じた際、これを補完するために存在している可能性が強く示唆された。

MPIase生合成第一段階の反応は、Compound I生合成反応である(図4)。第1章において、YnbBおよびCdsAがこの反応を触媒することを明らかにした。この反応は、CDP-DAGのCMP部分がGlcNAc-Pと置換される反応である。Tam41pを発現させても*ynbB/cdsA*二重欠損株において観察されるMPIase生合成反応の阻害は抑

制されない。したがって、CDP-DAG が存在するだけでは不十分であり、GlcNAc-P の取り込みが YnbB/CdsA 上で進行すると考えられる。キメラタンパク質を用いた実験より、YnbB/CdsA の C 末端側の領域が CDP-DAG 生合成および MPIase 生合成を触媒しているのに対し、N 末端側の領域が CDP-DAG 生合成活性を調節していることを明らかとした。好熱菌 *Thermotoga maritima* の CdsA の結晶構造より、CdsA は、1 番目の膜貫通領域からなる N ドメイン、2-5 番目の膜貫通領域からなる M ドメイン、6-9 番目の膜貫通領域からなる C ドメインの 3 つのドメインに分けられることが明らかとなっている[104] (図 7)。M ドメインは二量体の境界面に位置し、C ドメインは活性部位を含む。N ドメインは C ドメイン近傍に位置し、CDP-DAG を脂質二重層に放出するゲートを形成している。このことより、N ドメインは、生合成後の CDP-DAG の放出に関与していることが予想される。今回構築したキメラタンパク質は、CdsA の N 末端を持つもののみ高い CDP-DAG 生合成活性を示した。したがって、YnbB と CdsA の N 末端側のアミノ酸配列の違いによって CDP-DAG の放出速度が変化し、CDP-DAG 生合成速度に影響を与えていると考えられる。

プラスミドより発現した YnbB は、*ynbB/cdsA* 二重欠損株においても MPIase 生合成反応を触媒した。しかし、*cdsA* 欠損株においても MPIase は完全に枯渇していたことより、染色体上の *ynbB* 遺伝子が発現しているかどうか不明であった[86] (図 16)。しかし、KS23 株に CdsA の変異体である CdsA8 を発現させた場合、生育阻害、

MPIase 生合成阻害、CDP-DAG 生合成阻害およびタンパク質膜挿入阻害が観察され、この条件では染色体上の *ynbB* 遺伝子が必須であることが明らかとなった (図 25-28)。染色体上の *ynbB* 遺伝子の詳細な発現制御機構は不明であるが、染色体上の *ynbB* 遺伝子は通常の培養条件でも発現していることが判明した。

総合考察

本研究において、タンパク質膜挿入に必須の糖脂質酵素 MPIase の生合成因子の同定およびその機能解析を行った。その結果、機能不明の内膜タンパク質 YnbB およびそのホモログ CdsA を同定した。CdsA は内膜に存在する CDP-DAG 生合成酵素であり、大腸菌においては全てのリン脂質の前駆体として利用される CDP-DAG の生合成反応を触媒する[95, 96]。CdsA に加えて YnbB も CDP-DAG 生合成反応を触媒することを明らかにした。MPIase と CDP-DAG はともに生育に必須の因子である[86, 101]。したがって、YnbB および CdsA は MPIase 生合成とリン脂質生合成という 2 つの重要な生命現象に関与していることが明らかとなった。CdsA は全ての生物に保存されている。これに加えて、タンパク質膜挿入機構が全ての生物において保存されていることより、MPIase 様物質が生物種を超えて普遍的に存在している可能性が示唆された。一方、YnbB は真正細菌のみに保存されている。真核生物や古細菌における YnbB に相当する因子は進化の過程で失われ、真正細菌においてのみ CdsA 機能が一部阻害された場合のバックアップ因子として保存されている可能性が示唆された。

YnbB および CdsA が生合成した CDP-DAG が MPIase 生合成に利用されるのか、リン脂質生合成に利用されるのかを切り替える機構に関する知見は、当研究では得られなかった。しかし、当研究室の別プロジェクトにおいて、CDP-DAG へ GlcNAc-P を取り込む反応を促進する因子の存在が示唆されている。GN80 株より調製した INV

に EK413 株の内膜より調製した粗精製画分を加えると、Compound I 生合成量が増加することが明らかとなっている。この因子を同定し、変異株を構築して MPIase 生合成への影響を調べることにより、MPIase 生合成反応の詳細な分子機構を明らかにすることができるかと期待されている。

膜タンパク質はすべての細胞において発現し、生命現象において重要な機能を担うものが多い。ヒト・ゲノムプロジェクトにおいて膜タンパク質であることは分かっているものの、その機能が解明されていないものも多く、新規薬剤開発のターゲットとしても注目されている。このような理由で、膜タンパク質を対象とした研究が多く行われている。しかし、その取扱いは容易ではなく、大量生産や精製が困難である場合が多い。したがって、膜タンパク質を大量生産するための汎用的なシステムの開発が望まれている。これまでに、SecYEG や SRP/SR の過剰発現株を用いた膜タンパク質の大量生産システムの構築を目的とした研究が数多く行われてきたが、いずれも膜タンパク質の大量生産には至っていない。その原因は、従来のシステムには MPIase が欠如していたためであると考えられる。SecYEG、SRP、SR、YidC に加え、MPIase を同時に過剰発現させることにより膜タンパク質を大量生産するための汎用的なシステムを構築できると期待されている。糖脂質である MPIase を過剰発現させるためには、その生合成遺伝子の同定が必要である。当研究において MPIase 生合成酵素として YnbB および CdsA を同定し、その過剰発現株において MPIase 生合成量が増加

することを明らかとした[86] (図 9)。タンパク質性の膜挿入因子群に加え、MPIase を同時に過剰発現させることにより、膜タンパク質大量生産システムを構築できると期待されている。

謝辞

研究全般のご指導、ご協力を頂きました岩手大学農学部の西山賢一先生に心よりお礼を申し上げます。

Compound I および CDP-GlcNAc の化学合成、反応生成物の構造解析およびご指導を頂きました公益社団法人サントリー生命科学財団生物有機科学研究所の島本啓子先生、藤川紘樹博士、山口敏行博士に大変感謝いたします。

岩手大学農学部の山下哲郎先生より LC-MS による解析およびご指導を頂き、YnbB を同定することができました。誠にありがとうございました。

弘前大学農学部の姫野俵太先生より多大な助言をいただきました。心より感謝申し上げます。

最終審査会の副査をつとめていただきました山形大学の豊増知伸先生には研究に関するご指摘およびアドバイスをいただきました。今後の研究の糧にいたします、ありがとうございました。

岩手大学農学部の山田美和先生には、当研究室の微生物培養装置が故障した際、設備を使用させて頂きました。大変助かりました、ありがとうございます。

並びに、研究室に所属する皆様には、感謝の念にたえません。ありがとうございました。

引用文献

1. Spector, A.A. and M.A. Yorek, *Membrane lipid composition and cellular function*. J Lipid Res, 1985. **26**(9): p. 1015-35.
2. Fouillen, L., L. Maneta-Peyret, and P. Moreau, *ER Membrane Lipid Composition and Metabolism: Lipidomic Analysis*. Methods Mol Biol, 2018. **1691**: p. 125-137.
3. Sohlenkamp, C. and O. Geiger, *Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways*. FEMS Microbiol Rev, 2016. **40**(1): p. 133-59.
4. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**(4023): p. 720-31.
5. Coico, R., *Gram staining*. Curr Protoc Microbiol, 2005. **Appendix 3**: p. Appendix 3C.
6. Silhavy, T.J., D. Kahne, and S. Walker, *The bacterial cell envelope*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a000414.
7. Konovalova, A., D.E. Kahne, and T.J. Silhavy, *Outer Membrane Biogenesis*. Annu Rev Microbiol, 2017. **71**: p. 539-556.
8. Daley, D.O., et al., *Global topology analysis of the Escherichia coli inner membrane proteome*. Science, 2005. **308**(5726): p. 1321-3.
9. von Heijne, G., *Membrane-protein topology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(12): p. 909-18.
10. Vinothkumar, K.R. and R. Henderson, *Structures of membrane proteins*. Q Rev Biophys, 2010. **43**(1): p. 65-158.
11. Stenberg, F., et al., *Protein complexes of the Escherichia coli cell envelope*. J Biol Chem, 2005. **280**(41): p. 34409-19.
12. Blobel, G. and B. Dobberstein, *Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma*. J Cell Biol, 1975. **67**(3): p. 835-51.
13. Blobel, G. and B. Dobberstein, *Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components*. J Cell Biol, 1975. **67**(3): p. 852-62.
14. Milstein, C., et al., *A possible precursor of immunoglobulin light chains*. Nat New Biol, 1972. **239**(91): p. 117-20.
15. Sabatini, D.D. and G. Blobel, *Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. II. Location of the polypeptides in rough microsomes*. J Cell Biol, 1970. **45**(1): p. 146-57.
16. Walter, P., I. Ibrahimi, and G. Blobel, *Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes*

- synthesizing secretory protein*. J Cell Biol, 1981. **91**(2 Pt 1): p. 545-50.
17. Walter, P. and G. Blobel, *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, 1981. **91**(2 Pt 1): p. 551-6.
 18. Walter, P. and G. Blobel, *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, 1981. **91**(2 Pt 1): p. 557-61.
 19. Walter, P. and G. Blobel, *Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(12): p. 7112-6.
 20. Walter, P. and G. Blobel, *Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum*. Nature, 1982. **299**(5885): p. 691-8.
 21. Nyathi, Y., B.M. Wilkinson, and M.R. Pool, *Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(11): p. 2392-402.
 22. Lutcke, H., et al., *The methionine-rich domain of the 54 kDa subunit of signal recognition particle is sufficient for the interaction with signal sequences*. EMBO J, 1992. **11**(4): p. 1543-51.
 23. High, S. and B. Dobberstein, *The signal sequence interacts with the methionine-rich domain of the 54-kD protein of signal recognition particle*. J Cell Biol, 1991. **113**(2): p. 229-33.
 24. Tajima, S., et al., *The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains*. J Cell Biol, 1986. **103**(4): p. 1167-78.
 25. Koch, H.G., M. Moser, and M. Muller, *Signal recognition particle-dependent protein targeting, universal to all kingdoms of life*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2003. **146**: p. 55-94.
 26. Rapoport, T.A., *Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes*. Nature, 2007. **450**(7170): p. 663-9.
 27. Schatz, G. and B. Dobberstein, *Common principles of protein translocation across membranes*. Science, 1996. **271**(5255): p. 1519-26.
 28. Driessen, A.J. and N. Nouwen, *Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 643-67.
 29. Oliver, D.B., *SecA protein: autoregulated ATPase catalysing preprotein insertion and translocation across the Escherichia coli inner membrane*. Mol Microbiol, 1993. **7**(2): p. 159-65.

30. Kumamoto, C.A. and J. Beckwith, *Mutations in a new gene, secB, cause defective protein localization in Escherichia coli.* J Bacteriol, 1983. **154**(1): p. 253-60.
31. Lecker, S.H., A.J. Driessen, and W. Wickner, *ProOmpA contains secondary and tertiary structure prior to translocation and is shielded from aggregation by association with SecB protein.* EMBO J, 1990. **9**(7): p. 2309-14.
32. Knoblauch, N.T., et al., *Substrate specificity of the SecB chaperone.* J Biol Chem, 1999. **274**(48): p. 34219-25.
33. Randall, L.L., et al., *Calorimetric analyses of the interaction between SecB and its ligands.* Protein Sci, 1998. **7**(5): p. 1195-200.
34. Kumamoto, C.A., *SecB protein: a cytosolic export factor that associates with nascent exported proteins.* J Bioenerg Biomembr, 1990. **22**(3): p. 337-51.
35. Wild, J., et al., *DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in Escherichia coli.* Genes Dev, 1992. **6**(7): p. 1165-72.
36. Wild, J., et al., *Involvement of the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone team in protein secretion in Escherichia coli.* J Bacteriol, 1996. **178**(12): p. 3608-13.
37. Kusukawa, N., et al., *Effects of mutations in heat-shock genes groES and groEL on protein export in Escherichia coli.* EMBO J, 1989. **8**(11): p. 3517-21.
38. Hendrick, J.P., et al., *Control of folding and membrane translocation by binding of the chaperone DnaJ to nascent polypeptides.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10216-20.
39. Kumamoto, C.A. and J. Beckwith, *Evidence for specificity at an early step in protein export in Escherichia coli.* J Bacteriol, 1985. **163**(1): p. 267-74.
40. Manting, E.H., et al., *SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel.* EMBO J, 2000. **19**(5): p. 852-61.
41. Cunningham, K., et al., *SecA protein, a peripheral protein of the Escherichia coli plasma membrane, is essential for the functional binding and translocation of proOmpA.* EMBO J, 1989. **8**(3): p. 955-9.
42. Hartl, F.U., et al., *The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the E. coli plasma membrane.* Cell, 1990. **63**(2): p. 269-79.
43. Economou, A. and W. Wickner, *SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion.* Cell, 1994. **78**(5): p. 835-43.
44. Uchida, K., H. Mori, and S. Mizushima, *Stepwise movement of preproteins in the process of translocation across the cytoplasmic membrane of Escherichia coli.* J Biol Chem, 1995. **270**(52): p. 30862-8.
45. van der Wolk, J.P., J.G. de Wit, and A.J. Driessen, *The catalytic cycle of the escherichia coli SecAATPase comprises two distinct preprotein translocation events.* EMBO J, 1997. **16**(24):

- p. 7297-304.
46. Akimaru, J., et al., *Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(15): p. 6545-9.
 47. Dalbey, R.E., P. Wang, and A. Kuhn, *Assembly of bacterial inner membrane proteins*. Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 161-87.
 48. Luirink, J., et al., *Biogenesis of inner membrane proteins in Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1817**(6): p. 965-76.
 49. Luirink, J. and I. Sinning, *SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1694**(1-3): p. 17-35.
 50. Janda, C.Y., et al., *Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle*. Nature, 2010. **465**(7297): p. 507-10.
 51. Luirink, J., et al., *An alternative protein targeting pathway in Escherichia coli: studies on the role of FtsY*. EMBO J, 1994. **13**(10): p. 2289-96.
 52. Angelini, S., et al., *Membrane binding of the bacterial signal recognition particle receptor involves two distinct binding sites*. J Cell Biol, 2006. **174**(5): p. 715-24.
 53. Crane, J.M. and L.L. Randall, *The Sec System: Protein Export in Escherichia coli*. EcoSal Plus, 2017. **7**(2).
 54. Rapoport, T.A., et al., *Membrane-protein integration and the role of the translocation channel*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(10): p. 568-75.
 55. Zhu, L., H.R. Kaback, and R.E. Dalbey, *YidC protein, a molecular chaperone for LacY protein folding via the SecYEG protein machinery*. J Biol Chem, 2013. **288**(39): p. 28180-94.
 56. Nagamori, S., I.N. Smirnova, and H.R. Kaback, *Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins*. J Cell Biol, 2004. **165**(1): p. 53-62.
 57. Scotti, P.A., et al., *YidC, the Escherichia coli homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase*. EMBO J, 2000. **19**(4): p. 542-9.
 58. Koch, H.G., et al., *The integration of YidC into the cytoplasmic membrane of Escherichia coli requires the signal recognition particle, SecA and SecYEG*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 5715-8.
 59. Kuhn, A., *Major coat proteins of bacteriophage Pf3 and M13 as model systems for Sec-independent protein transport*. FEMS Microbiol Rev, 1995. **17**(1-2): p. 185-90.
 60. Stiegler, N., R.E. Dalbey, and A. Kuhn, *M13 procoat protein insertion into YidC and SecYEG proteoliposomes and liposomes*. J Mol Biol, 2011. **406**(3): p. 362-70.
 61. Fontaine, F., R.T. Fuchs, and G. Storz, *Membrane localization of small proteins in Escherichia coli*. J Biol Chem, 2011. **286**(37): p. 32464-74.
 62. Hemm, M.R., et al., *Small membrane proteins found by comparative genomics and ribosome*

- binding site models*. Mol Microbiol, 2008. **70**(6): p. 1487-501.
63. de Gier, J.W., et al., *Differential use of the signal recognition particle translocase targeting pathway for inner membrane protein assembly in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14646-51.
 64. Geller, B.L. and W. Wickner, *M13 procoat inserts into liposomes in the absence of other membrane proteins*. J Biol Chem, 1985. **260**(24): p. 13281-5.
 65. Kutay, U., E. Hartmann, and T.A. Rapoport, *A class of membrane proteins with a C-terminal anchor*. Trends Cell Biol, 1993. **3**(3): p. 72-5.
 66. Kiefer, D. and A. Kuhn, *Hydrophobic forces drive spontaneous membrane insertion of the bacteriophage Pf3 coat protein without topological control*. EMBO J, 1999. **18**(22): p. 6299-306.
 67. Yi, L., et al., *YidC is strictly required for membrane insertion of subunits a and c of the F(1)F(0)ATP synthase and SecE of the SecYEG translocase*. Biochemistry, 2003. **42**(35): p. 10537-44.
 68. Nishiyama, K., et al., *A derivative of lipid A is involved in signal recognition particle/SecYEG-dependent and -independent membrane integrations*. J Biol Chem, 2006. **281**(47): p. 35667-76.
 69. Raetz, C.R. and K.F. Newman, *Neutral lipid accumulation in the membranes of Escherichia coli mutants lacking diglyceride kinase*. J Biol Chem, 1978. **253**(11): p. 3882-7.
 70. Rotering, H. and C.R. Raetz, *Appearance of monoglyceride and triglyceride in the cell envelope of Escherichia coli mutants defective in diglyceride kinase*. J Biol Chem, 1983. **258**(13): p. 8068-73.
 71. Kawashima, Y., et al., *Diacylglycerol specifically blocks spontaneous integration of membrane proteins and allows detection of a factor-assisted integration*. J Biol Chem, 2008. **283**(36): p. 24489-96.
 72. Nishiyama, K., et al., *A novel complete reconstitution system for membrane integration of the simplest membrane protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **394**(3): p. 733-6.
 73. Moser, M., et al., *Glycolipozyme MPIase is essential for topology inversion of SecG during preprotein translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(24): p. 9734-9.
 74. Nishiyama, K., et al., *MPIase is a glycolipozyme essential for membrane protein integration*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 1260.
 75. Kuhn, H.M., U. Meier-Dieter, and H. Mayer, *ECA, the enterobacterial common antigen*. FEMS Microbiol Rev, 1988. **4**(3): p. 195-222.
 76. Basu, S., et al., *Chemical characterization of enterobacterial common antigen isolated from Plesiomonas shigelloides ATCC 14029*. Eur J Biochem, 1987. **162**(1): p. 75-81.
 77. D., R.P. and S.R. P., *Enterobacterial Common Antigen and Capsular Polysaccharides in*

- Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology, 1996. **2nd edn Vol. 1** (ed Neidhardt F. C. ASM Press): p. 104-122.
78. Erbel, P.J., et al., *Identification and biosynthesis of cyclic enterobacterial common antigen in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2003. **185**(6): p. 1995-2004.
 79. Rick, P.D., et al., *Biosynthesis of enterobacterial common antigen*. J Bacteriol, 1985. **162**(2): p. 494-503.
 80. Barr, K., P. Nunes-Edwards, and P.D. Rick, *In vitro synthesis of a lipid-linked trisaccharide involved in synthesis of enterobacterial common antigen*. J Bacteriol, 1989. **171**(3): p. 1326-32.
 81. Barr, K., J. Klena, and P.D. Rick, *The modality of enterobacterial common antigen polysaccharide chain lengths is regulated by o349 of the wec gene cluster of Escherichia coli K-12*. J Bacteriol, 1999. **181**(20): p. 6564-8.
 82. Macpherson, D.F., P.A. Manning, and R. Morona, *Genetic analysis of the rfbX gene of Shigella flexneri*. Gene, 1995. **155**(1): p. 9-17.
 83. Kajimura, J., A. Rahman, and P.D. Rick, *Assembly of cyclic enterobacterial common antigen in Escherichia coli K-12*. J Bacteriol, 2005. **187**(20): p. 6917-27.
 84. Rick, P.D., et al., *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, 1998. **8**(6): p. 557-67.
 85. Alami, M., et al., *Separate analysis of twin-arginine translocation (Tat)-specific membrane binding and translocation in Escherichia coli*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20499-503.
 86. Sawasato, K., et al., *CdsA is involved in biosynthesis of glycolipid MPIase essential for membrane protein integration in vivo*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 1372.
 87. Nishiyama, K., T. Suzuki, and H. Tokuda, *Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation*. Cell, 1996. **85**(1): p. 71-81.
 88. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
 89. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
 90. Takahashi, D., et al., *Shotgun proteomics of plant plasma membrane and microdomain proteins using nano-LC-MS/MS*. Methods Mol Biol, 2014. **1072**: p. 481-98.
 91. Shibui, T., M. Uchida, and Y. Teranishi, *A New Hybrid Promoter and Its Expression Vector in Escherichia coli*. Agri. Biol. Chem., 1988. **52**.
 92. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing, *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors*. Gene, 1985. **33**(1): p.

- 103-19.
93. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.* J Mol Biol, 1986. **189**(1): p. 113-30.
 94. Friesen, J.D., et al., *Isolation of a lambda transducing bacteriophage carrying the relA gene of Escherichia coli.* J Bacteriol, 1976. **127**(2): p. 917-22.
 95. Sparrow, C.P. and C.R. Raetz, *Purification and properties of the membrane-bound CDP-diglyceride synthetase from Escherichia coli.* J Biol Chem, 1985. **260**(22): p. 12084-91.
 96. Icho, T., C.P. Sparrow, and C.R. Raetz, *Molecular cloning and sequencing of the gene for CDP-diglyceride synthetase of Escherichia coli.* J Biol Chem, 1985. **260**(22): p. 12078-83.
 97. Maturin, L.J., Sr. and R. Curtiss, 3rd, *Role of ribonucleic acid synthesis in conjugational transfer of chromosomal and plasmid deoxyribonucleic acids.* J Bacteriol, 1981. **146**(2): p. 552-63.
 98. Tamura, Y., et al., *Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria.* Cell Metab, 2013. **17**(5): p. 709-18.
 99. Mengin-Lecreulx, D. and J. van Heijenoort, *Identification of the glmU gene encoding N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase in Escherichia coli.* J Bacteriol, 1993. **175**(19): p. 6150-7.
 100. Wang, S., et al., *Probing the roles of conserved residues in uridylyltransferase domain of Escherichia coli K12 GlmU by site-directed mutagenesis.* Carbohydr Res, 2015. **413**: p. 70-4.
 101. Ganong, B.R. and C.R. Raetz, *Massive accumulation of phosphatidic acid in conditionally lethal CDP-diglyceride synthetase mutants and cytidine auxotrophs of Escherichia coli.* J Biol Chem, 1982. **257**(1): p. 389-94.
 102. Salscheider, S.L., A. Jahn, and K. Schnetz, *Transcriptional regulation by BglJ-RcsB, a pleiotropic heteromeric activator in Escherichia coli.* Nucleic Acids Res, 2014. **42**(5): p. 2999-3008.
 103. Baba, T., et al., *Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection.* Mol Syst Biol, 2006. **2**: p. 2006 0008.
 104. Liu, X., et al., *Structure and mechanism of an intramembrane liponucleotide synthetase central for phospholipid biosynthesis.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 4244.
 105. Dittmer, J.C. and R.L. Lester, *A SIMPLE, SPECIFIC SPRAY FOR THE DETECTION OF PHOSPHOLIPIDS ON THIN-LAYER CHROMATOGRAMS.* J Lipid Res, 1964. **5**: p. 126-7.
 106. Wickner, W., *Assembly of proteins into membranes.* Science, 1980. **210**(4472): p. 861-8.