

氏名	佐々木 優
本籍（国籍）	宮城県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 770 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 寒冷圏生命システム学専攻
学位論文題目	試験管内実験系を用いたタンパク質膜挿入機構の解析（<i>In vitro</i> analysis of membrane protein integration）
学位審査委員	主査 岩手大学教授 西山 賢一 副査 伊藤 菊一(岩手 教授), 姫野 俵太(弘前 教授), 豊増 知伸 (山形 教授)

論文の内容の要旨

細胞やその小器官は膜で隔てられており、膜内では、膜内在性タンパク質（膜タンパク質）が生命に必須の様々な役割を果たしている。タンパク質は通常、親水的な細胞質内で合成されるため、膜タンパク質が膜へと挿入されるには特別な仕組みが必要となる。真核生物の小胞体と、膜原核生物の細胞質膜におけるタンパク質の膜挿入には高い共通性がある。そのため、それらの膜挿入反応の解明は、細胞生物学的に最も重要な課題の一つとして精力的に研究されてきた。

膜挿入反応は、実験的に扱いやすい大腸菌を用いて盛んに研究が行われている。大腸菌を用いたこれまでの研究では、細胞質膜の膜挿入は膜透過チャネル SecYEG で進行する反応（Sec 依存の膜挿入）と SecYEG が関与しない反応（Sec 非依存膜挿入）に分かれることが判明している。SecYEG は SecY、SecE、SecG からなる複合体タンパク質である。SecYEG のホモログは真核生物にも保存されており、Sec 依存膜挿入はすべての生物に類似の反応が保存されている。Sec 非依存膜挿入は比較的小さな膜タンパク質が膜挿入される反応である。その膜挿入には、膜タンパク質 YidC や糖脂質 MPIase が関与することが判明している。YidC は真核生物のミトコンドリアやクロロプラストにホモログが確認されている因子である。また MPIase は糖脂質でありながら膜挿入反応を触媒するため、新たな枠組みの酵素因子として近年注目されている。YidC や MPIase は、Sec 依存だけでなく Sec 依存膜挿入にも関与している。

上記のように、これまでの解析では、Sec 依存/非依存膜挿入に関わる因子が発見されてきた。一方で、膜挿入に関わる因子の具体的な機能については不明確な部分が多い。中でも Sec 非依存膜挿入の解析では、報告によって異なる結果が示されていたため、MPIase と YidC の必要性や機能については議論が続いている状態である。本論文では、Sec 依存/非依存の膜挿入の分子機構解明を目的とし、試験管内実験系を中心に、Sec 依存/非依存の膜挿入を解析した。

はじめに、大腸菌から細胞質膜画分（INV）を調製し、INV 存在下で基質膜タンパク質を

試験管内合成することで、INV への膜挿入反応を進行させ、その膜挿入効率を評価した。まず、抗 MPIase 抗体、抗 YidC 抗体、抗 SecY 抗体を INV に反応させ、各抗体が膜挿入反応に影響を及ぼすかどうかを解析した。Sec 非依存性を示す基質膜タンパク質 3L-Pf3 coat を試験管内で合成し、解析を行ったところ、抗 MPIase 抗体を反応させた場合のみ INV への 3L-Pf3 coat の膜挿入が阻害された。また、Sec 依存性を示す基質膜タンパク質 MtlA を用いて解析を行ったところ、抗 MPIase 抗体、抗 YidC 抗体、抗 SecY 抗体のすべてで膜挿入が阻害された。次に、MPIase、SecE、YidC をそれぞれ枯渇させた大腸菌株から、INV を調製し、膜挿入解析を行った。その結果、3L-Pf3 coat の膜挿入は MPIase 枯渇 INV でのみ低下していた。MtlA の膜挿入は、MPIase や SecE、YidC 枯渇すべての場合で低下していた。これらの解析により、Sec 非依存の膜挿入には MPIase が重要であり、Sec 依存の膜挿入には MPIase、SecYEG と YidC すべてが重要であることが示された。

次に、精製した MPIase や SecYEG、YidC をリン脂質膜に再構成させ、人工膜小胞”リポソーム”を形成し、膜挿入反応を解析した。3L-Pf3 coat の膜挿入は MPIase リポソームでのみ観察されたが、SecYEG や YidC リポソームでは 3L-Pf3 coat の膜挿入は観察されなかった。一方、3L-Pf3 coat の合成レベルを上昇させた場合では、MPIase/YidC リポソームが MPIase リポソームよりも高い膜挿入活性を示した。また MtlA の膜挿入を解析したところ、MPIase/SecYEG 存在下でのみ膜挿入が観察された。さらに、MPIase/SecYEG/YidC リポソームは MPIase/SecYEG リポソームよりも高い膜挿入活性を示した。以上の結果より、Sec 依存/非依存の膜挿入では、MPIase が必須の役割を果たし、YidC が膜挿入を促進することが明らかとなった。さらに、3L-Pf3 coat の合成量を定量したところ、3L-Pf3 coat 合成レベルを上昇させた場合では、リポソーム内で機能する MPIase よりも 3L-Pf3 coat が多く合成されていることが判明した。この結果より、YidC が MPIase から基質膜タンパク質を受けとることで、MPIase が複数回膜挿入を触媒できるようになることが示された。さらに、細胞生育実験において致死性や低温感受性を示す YidC 変異体をリポソームに再構成して、膜挿入活性を測定した。その結果、致死性変異 YidC では膜挿入の促進は観察されず、低温感受性 YidC では膜挿入促進効果は低下していた。これらの結果より、試験管内実験系で判明した YidC による促進効果は、細胞質膜の膜挿入反応を反映しているものであることが強く示唆された。

これらの結果により MPIase に依存した膜挿入を、YidC が促進することが明らかとなり、Sec 非依存膜挿入では MPIase が膜挿入の前半を、YidC が膜挿入の後半を触媒する因子であることが示された。この結果は、Sec 依存/非依存膜挿入において不明確であった YidC の機能を明確にするものである。また、詳細は省くが、本論文では、試験管内実験系を改良することで、報告された論文によって解析結果が異なる原因を解決することができた。本研究の解析結果および本研究で改良された試験管内実験系は、タンパク質膜挿入機構の解明に大きく貢献できるものであると考えている。

論文審査の結果の要旨

細胞やオルガネラは生体膜で隔てられており、膜内では膜内在性タンパク質（膜タンパク質）が生命活動に必須の様々な役割を果たしている。膜タンパク質は親水的な細胞質で合成され、膜内や膜表面、細胞質に局在する酵素により膜へと挿入され（タンパク質膜挿入）、機能

を獲得する。タンパク質膜挿入の分子機構は、基本的なレベルでは、すべての生物で共通であると考えられている。そのため、タンパク質膜挿入機構の解明は、細胞生物学上の最も重要な課題の一つとして精力的に研究されてきた。

モデル生物大腸菌の細胞質膜におけるタンパク質膜挿入は、タンパク質膜透過チャネル SecYEG 上で進行する反応 (Sec 依存の膜挿入) と SecYEG が関与しない反応 (Sec 非依存の膜挿入) に分かれている。これらの膜挿入には膜タンパク質である SecYEG、YidC や、糖脂質 MPIase が関与することが明らかとなっている。一方で、これら因子の必須性や具体的な役割については不明確な部分が多い。本論文では、タンパク質膜挿入機構の詳細な解明のために、試験管内実験系を主とした解析を行った。

その結果、Sec 非依存の膜挿入には MPIase が必須であること、Sec 依存の膜挿入には MPIase と SecYEG が必須であることが確認された。また、Sec 依存/非依存いずれの場合でも YidC が膜挿入を促進することが判明した。YidC による膜挿入の促進は、MPIase が複数回の膜挿入反応を触媒する必要がある場合に観察された。さらにその反応には YidC の膜内部の親水的な領域、および親水的領域内部の正電荷アミノ酸が重要であることが判明した。

以上の結果により、MPIase がタンパク質膜挿入の初期過程を、YidC が膜挿入の後期過程を触媒することが明らかとなった。YidC は MPIase から膜挿入途中の基質膜タンパク質を、正電荷を介して受け取ることで、MPIase が速やかに次の膜挿入サイクルに関与できるようになるため、膜挿入が促進されると考えられる。

以上のように、本論文は MPIase と YidC 機能を中心としたタンパク質膜挿入機構の解明に寄与している。本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士 (農学) の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

Masaru Sasaki, Hanako Nishikawa, Sonomi Suzuki, Michael Moser, Maria Huber, Katsuhiko Sawasato, Hideaki Matsubayashi, Kaoru Kumazaki, Tomoya Tsukazaki, Yutetsu Kuruma, Osamu Nureki, Takuya Ueda and Ken-ichi Nishiyama (2019)
The bacterial protein YidC accelerates MPIase-dependent integration of membrane proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 294(49):18898-18908.

参考論文

Hanako Nishikawa, **Masaru Sasaki** and Ken-ichi Nishiyama (2017)
Membrane insertion of F₀c subunit of F₀F₁ ATPase depends on glycolipoyzyme MPIase and is stimulated by YidC. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 487(2):477-482.