

試験管内実験系を用いた
タンパク質膜挿入機構の解析

In vitro analysis of membrane protein integration

2020年3月

岩手大学大学院 連合農学研究

寒冷圏生命システム学専攻

佐々木 優

SASAKI Masaru

論文構成

序論

p. 2

1. タンパク質膜挿入とシグナル仮説
2. 大腸菌におけるタンパク質膜挿入
3. Sec 非依存の膜挿入の解析について
4. YidC の発見
5. タンパク質膜挿入の *in vitro* 解析
6. MPIase の構造と機能
7. MPIase の *in vivo* 解析
8. 本論文の主題：タンパク質膜挿入における MPIase と YidC の役割について

材料と方法

p. 16

結果

p. 19

1. MPIase は INV への Sec 依存/非依存膜挿入のどちらにも関与する。
2. 無秩序な自発的膜挿入を排除した再構成系の構築
3. MPIase 依存の膜挿入反応は YidC により促進される。
4. YidC 変異が MPIase 依存の膜挿入反応に及ぼす影響

考察

p. 39

謝辞

p. 44

引用文献

p.45

序論

1. タンパク質膜挿入とシグナル仮説

タンパク質は細胞の内外で様々な役割を果たしている。細胞や細胞内小器官は生体膜により内外が区画されている。タンパク質は通常細胞質で合成されるため、細胞外や細胞内小器官内部で機能するタンパク質は、生体膜を透過して目的地に輸送される。さらに、生体膜内部に局在するタンパク質も存在する。生体膜はリン脂質二重層で形成され、低分子イオンや糖、水分子ですら自由に横断することが制限されている。そのため、タンパク質が生体膜を透過したり膜挿入したりするためには特別な仕組みが必要となる。生体膜を貫通する膜内在性タンパク質（以下、膜タンパク質）は疎水的なアミノ酸が 20 残基程度連続した膜貫通領域（TM 領域：transmembrane）をもつ。膜タンパク質は、呼吸や光合成といったエネルギー代謝や生体膜を介した物質や情報の伝達等、生命活動に必須の機能を果たしている。膜タンパク質は親水的环境である細胞質で合成されるため、疎水的な TM 領域の凝集を防ぎながら生体膜に挿入させる工夫が求められる。膜タンパク質が生体膜へと挿入する反応“タンパク質膜挿入反応”の分子機構解明は、細胞生物学上の最も重要な課題の一つとして、今日までに様々な解析が精力的になされている。

タンパク質膜挿入反応は、1970 年代に提唱された“シグナル仮説”(1, 2)の延長として理解されてきた。シグナル仮説は細胞外で機能する分泌タンパク質が生体膜を透過する機構を説明するもので、分泌タンパク質は N 末端にシグナル配列が付加した前駆体として合成され、シグナル配列に導かれて膜透過が進行するという仮説である。シグナル配列は分泌タンパク質前駆体が膜を透過する際に切断される。膜透過には、シグナル配列に特異的に結合する因子であるシグナル認識粒子 SRP (signal recognition particle)、膜上で SRP を受容する因子 SR (SRP receptor) およびタンパク質透過チャネルといった因子が関与する。これらの因子は分泌タンパク質の膜透過のみならずタンパク質膜挿入反応にも関与している。

SRP やタンパク質膜透過チャネルに依存する膜挿入反応（Sec 依存の膜挿入反応）の大まか

なモデルを図 1 に示す。この反応では、合成途中の膜タンパク質新生鎖の TM 領域がリボソームから出現すると SRP が認識し、SRP-リボソーム-膜タンパク質新生鎖複合体が形成される (3, 4) (5)。この複合体は膜上に存在する SR を介して小胞体膜へと運ばれ、その後に膜透過チャネル上で翻訳に共役して膜挿入が進行する (6, 7)。SRP、SR および膜透過チャネルのホモログは真核細胞のみならず原核細胞にも保存されている。真核生物における膜透過チャネルは、動植物では Sec61- α 、Sec61- β 、Sec61- γ からなる Sec61 複合体として小胞体膜に存在し (8)、細菌類では SecY、SecE、SecG からなる SecYEG 複合体として細胞質膜に存在している (9, 10)。真核生物の SRP は 6 つのタンパク質と 1 つの RNA からなる (11, 12)。中でも 54 kDa のサブユニットは GTPase 活性をもち、シグナル配列や膜貫通領域と直接相互作用するため、特に重要である (8, 13)。細菌類の SRP はタンパク質性の Ffh (Fifty four homolog) と 4.5 S RNA の複合体であり、Ffh は真核生物の SRP54 kDa サブユニットのホモログである (3)。真核生物の SR は SR- α と SR- β からなる (14)。細菌の FtsY は SR- α のホモログである (15)。

上記のように、真核細胞の小胞体膜と原核細胞の細胞質膜で観察される Sec 依存の膜挿入反応は、それぞれの膜挿入因子に高い相同性が確認されており、膜挿入反応の分子機構は基本的にすべての生物で同様であると考えられている。

2. 大腸菌におけるタンパク質膜挿入

原核細胞における Sec 依存の膜挿入は、モデル生物である大腸菌を用いて広く解析が行われている。大腸菌において現在判明しているタンパク質膜挿入反応を図 2 に示す。一般的な膜タンパク質は、図 2A の Sec 依存経路に従って膜挿入する。この経路は上述したシグナル仮説の延長と考えられる。細菌類の SRP は分泌タンパク質のシグナル配列を認識しない (16) 代わりに、膜タンパク質の疎水的な TM 領域を認識する (5, 17)。そのため、タンパク質膜挿入に特化した因子であると考えられる。また、SecYEG 上で膜挿入途中のタンパク質新生鎖は YidC と相互作用する (5, 18, 19) (図 2A)。Sec 依存で膜挿入するタンパク質の中でもペリプラズム側に

親水的な領域をもつ場合は、さらに SecA タンパク質を必要とする (SecA を必要とする Sec 依存膜挿入) (図 2B)。SecA は細胞質や細胞質膜上に局在し、ATP 加水分解によるエネルギーを用いて分泌タンパク質を膜透過させるモータータンパク質である(20) (図 2B)。SecA を必要とする Sec 依存膜挿入では、分泌タンパク質の膜透過と同様に、膜タンパク質の親水的なペリプラズム領域の膜透過に SecA が必要となる(7)。上記 2 つの膜挿入とは異なり、TM 領域が 1~2 個の小さな膜タンパク質や、TM 領域が C 末端領域にのみ存在するタンパク質は、TM 領域がリボソームから出現する前に翻訳が終了する。これらの膜タンパク質は SRP や SR、SecYEG に依存しないで膜挿入する (Sec 非依存膜挿入) (21-23) (図 2C)。Sec 非依存膜挿入には YidC や糖脂質 MPIase (Membrane Protein Integrase) が関与する。YidC や MPIase は Sec 依存/非依存両方の膜挿入に関与する (後述)。

3. Sec 非依存のタンパク質膜挿入

タンパク質膜挿入は、遺伝学的な解析 (*in vivo* 解析) と生化学的な解析 (*in vitro* 解析) がそれぞれ相補し合うことで理解が進んできた。膜挿入因子の変異株を用いて、パルスチェイス実験により膜挿入反応を追跡する方法や、細胞分画で得られた膜小胞に対してタンパク質を膜挿入させて解析する方法 (図 5 参照) は、膜挿入因子の機能を直接的に解析する方法として頻繁に用いられてきた。大腸菌の膜挿入は、初期の研究で、基質膜タンパク質として M13 フェージのコートタンパク質の前駆体 M13 procoat (図 3 左参照) を用いて精力的に研究された。M13 procoat はシグナル配列に続く TM 領域をもつ小さな膜タンパク質であり、膜挿入に伴いリーダーペプチダーゼによってシグナル配列が切断され、成熟体(M13 coat) となる(24, 25)。*in vivo* 解析では、膜電位を消失させることにより M13 procoat の膜挿入が阻害されることが判明している(26)。一方、SRP のサブユニットである 4.5S RNA や SecE を枯渇させた大腸株(27)、SecY の温度感受性変異株(28)において M13 procoat の挿入が影響を受けないことが明らかとなっている。*in vitro* 解析では、大腸菌より調製されたリン脂質のみで形成したリポソ

ームに対して、M13 procoat は効率よく膜挿入することが明らかとなっている(21)。類似の報告は Pf3 ファージのコートタンパク質 (Pf3 coat) (22) (図 3 中央)、F₀F₁ ATPase の c サブユニット (F₀c) (29) 等の分子量の小さな膜タンパク質でも報告されている。これらの結果により、M13 procoat のような小さい膜タンパク質は、膜電位により促進される場合があるものの、Sec 因子や SRP に依存せず、TM 領域とリン脂質との疎水的相互作用により、自発的に膜挿入すると考えられてきた。

4. YidC の発見

自発的に膜挿入すると考えられてきた Sec 非依存の膜挿入には、後の解析により、YidC が関与することが明らかとなった(30)。YidC は SecYEG と共精製される因子として発見された因子であり(31)、ミトコンドリアや葉緑体における膜挿入に重要である Oxa1p、Alb3p と相同的な膜タンパク質である(32)。YidC を枯渇させた大腸菌株では M13 procoat(30)や Pf3 coat(33)の膜挿入が阻害されたことから、YidC が直接的に Sec 非依存の膜挿入を触媒する因子であると考えられた。しかしながら、YidC の枯渇により、F₀c や CyoA といったプロトン駆動力形成に関与する一部のタンパク質の膜挿入が影響を受けるため、膜電位形成に欠陥が生じることが判明した(34)。そのため、YidC 枯渇による膜挿入の阻害が、YidC 枯渇によるものなのか、膜電位の形成不全によるものなのかが不明であった。一方、膜電位に依存しない M13 procoat の変異体の膜挿入も YidC 枯渇株では強く阻害された(35)ことから、Sec 非依存の膜挿入に YidC が重要であることが再確認された。ただし、報告(35)では YidC を枯渇しても膜電位非依存 M13 procoat が一定量膜挿入し、M13 coat が観察されている。さらに、M13 procoat を発現させた YidC 枯渇株の膜画分をアルカリ抽出しても、M13 procoat は膜画分に分画されている(35)。これらの報告は、YidC 非存在下でも基質膜タンパク質の膜へのターゲッティングおよび膜挿入反応の一部が進行することを示唆している。これらの報告より、YidC は Sec 非依存膜挿入に重要であることが示されたが、自発的膜挿入が完全に否定されたわけではな

い。

近年、高熱細菌 (*Bacillus halodurans*) の YidC (36) および大腸菌の YidC (37, 38) の結晶構造が明らかとなった。これらの構造データによると、YidC の膜貫通領域内部に親水的な溝が構成されており、親水的溝の中央に生物間で保存されたアルギニン残基があることが判明している (36, 37)。大腸菌の生育相補実験および *in vivo* の膜挿入解析ではこのアルギニン残基の重要性が示されている (36, 37)。これらの解析より、膜内部に存在する YidC のアルギニン残基の正電荷と膜タンパク質の負電荷が静電的に相互作用し、膜挿入が進行するというモデルが提唱されている (36)。

5. タンパク質膜挿入の *in vitro* 解析

上記のように、*in vivo* 解析では、Sec 非依存膜挿入に YidC が重要であることが明らかとなった。一方、*in vitro* 解析では YidC の重要性は明確には示されていない。その理由の一つに、リン脂質のみで形成されたリポソームを用いた解析では、細胞内の反応を反映していない無秩序な自発的膜挿入が起こることが挙げられる。

マンニトールパーミアーゼ (Mannitol permease: MtlA) は 6 つの TM 領域をもつ膜タンパク質であり (39, 40) (図 3 右参照) Sec 依存の経路で膜挿入すると考えられている。変異株から調製した膜小胞を用いた *in vitro* 膜挿入解析によって SecYEG (41) および SRP、SR (42) に依存して膜挿入する。しかし、MtlA はリン脂質のみでできたリポソームに自発的に膜挿入することが判明した (43)。このことは、リポソームへの自発的膜挿入は細胞内の反応を反映していないことを示している。すなわち、生体膜内には無秩序な膜挿入をブロックする因子が存在する可能性が示された。MtlA の自発的膜挿入をブロックする因子として発見されたのがジアシルグリセロール (diacylglycerol: DAG) である (43)。DAG は大腸菌の細胞質膜に 1% 前後含まれる因子である (44)。リポソームに対して DAG を重量比で 1% 程度加えると MtlA の自発的膜挿入がブロックされ、5% 程度加えると MtlA の自発的膜挿入が完全にブロックされる (43)。さ

らに、M13 procoat (43, 44)や自発的膜挿入すると考えられてきた 3L-Pf3 coat (44)でさえも、DAG を含むリポソームでは自発的膜挿入がブロックされた。以上の報告より、大腸菌の細胞質膜では、DAG によって自発的な膜挿入はブロックされているが、リポソームを用いた既存の解析では膜成分 DAG が除去されているために、無秩序な自発的膜挿入が起こることが示された。

DAG を含むリポソームには自発的膜挿入は起こらないが、SecYEG や YidC を再構成しても MtlA の膜挿入は観察されなかった (43)。このことは、Sec 依存の膜挿入には、SecYEG や YidC の他に、未知の因子が必要であることを示唆している。膜挿入反応に必要な因子として発見されたのが MPIase である (43, 45)。MPIase は大腸菌細胞質膜から同定された因子であり、構造解析により糖脂質であることが判明している (46)。DAG 存在下では、MtlA の膜挿入は MPIase と SecYEG の両者を含むプロテオリポソームでのみ観察された (43)。また、MPIase と SecYEG の両者を含むプロテオリポソームに YidC を共存させても MtlA の膜挿入は影響を受けなかった (43)。これらの解析の結果より、Sec 依存膜挿入に MPIase が必須の役割を果たしていることが強く示唆された。また DAG によって自発的膜挿入がブロックされたリポソームでは、M13 procoat (43)や 3L-Pf3 coat (44, 45)が MPIase に依存して膜挿入することが判明した。これらの結果より、これまで自発的に膜挿入すると考えられていた Sec 非依存膜挿入も MPIase に依存することが示された。

F₀c を基質膜タンパク質として用いた解析では、YidC プロテオリポソームに F₀c が膜挿入するため、F₀c は YidC に依存して膜挿入するという報告 (29)がある。しかし、F₀c は酸性リン脂質と相互作用するとプロテアーゼ耐性の構造を獲得する (47)ため、F₀c の膜挿入を正しく解析できていない恐れがある。F₀c は DAG を含むリポソームにも自発的膜挿入するという報告 (48)もあるが、これは F₀c のプロテアーゼ耐性の構造を反映している可能性が強い (47)。一方、DAG を含む MPIase リポソームでは、F₀c はプロテアーゼ耐性の構造を獲得することなく膜挿入することが明らかとなっている (47)。MPIase に依存する F₀c の膜挿入は YidC により促進

される(47)。

リポソームを巨大化させると、膜の曲率が低下して自発的膜挿入が部分的にブロックされる(49)。このとき、Pf3 coat は YidC に依存して膜挿入するため、YidC は membrane protein insertase であると主張されている(49)。しかし、Pf3 coat の TM 領域に 3 つのロイシン残基を挿入した変異体、3L-Pf3 coat (23)は、YidC 非存在下でも膜挿入する。そのため 3L-Pf3 coat は自発的に膜挿入すると考えられた。一方、リポソームに DAG を加えると 3L-Pf3 coat は膜挿入しない(44)ため、(49)の報告では細胞内の膜挿入反応を正しく解析できていない可能性が強い。

DAG を加え自発的膜挿入をブロックしたリポソームに YidC を再構成させると、M13 procoat が膜挿入されるという報告(50)もある。しかし、この報告では適切なコントロールが設定されておらず、界面活性剤により二次的な影響が誘発されている可能性が排除されていない。また、同報告では SecYEG 存在下でも M13 procoat の膜挿入が観察されている。これらの結果は Sec 非依存の膜挿入に MPIase は必須ではなく、YidC あるいは SecYEG のいずれかが存在すれば膜挿入が進行することを示している。Sec 依存膜挿入に関しても同様の報告(51)がある。

以上のように、*in vivo* 解析では YidC の膜挿入反応への関与が明確に示されているのに対し、*in vitro* 解析では YidC の役割が正しく解析されておらず、膜挿入反応における YidC の機能は未だ正しい理解には至っていない。YidC 枯渇株から調製した INV を用いた解析でも、上述の一連の膜タンパク質の膜挿入は完全には阻害されないことが報告されている(44)。

6. MPIase の構造と機能

MPIase は 3 種のアミノ糖から成る糖鎖 (GlcNAc、ManNAcA、Fuc4NAc) が 9~11 回程度繰り返した構造に、ピロリン酸、ジアシルグルセロールの順番に結合している構造をもつ(46) (図 4)。GlcNAc の一部は *O*-アセチル化されている。MPIase と構造が類似した因子として糖

脂質 ECA (enterobacterial common antigen) が挙げられる (52-54)。ECA は大腸菌の外膜細胞外側に局在し、その構造は MPIase と異なり、3 糖ユニットの糖鎖が 18~55 個と MPIase と比べて非常に長く、ヘテロである。さらに、糖鎖と脂質のリンカーがピロリン酸ではなくモノリン酸である。ECA は MPIase と異なり膜挿入活性をもたない (46)。また、糖鎖ユニットが一つである MPIase の化学合成標品 (mini-MPIase) を用いた解析では、mini-MPIase をリポソームに再構成すると MPIase と比べて弱いながらも 3L-Pf3 coat の膜挿入活性が検出される (55)。これらのことから、膜挿入反応における MPIase の機能には適度な糖鎖の長さが重要であると考えられる。また、GlcNAc 部分の *O*-アセチル基 (図 4 R 部分) 部分をヒドロキシ基に置換した mini-MPIase では、膜挿入活性が大幅に低下する (55) ことから、MPIase の GlcNAc 部分の *O*-アセチル基は膜挿入に重要であると考えられている。MPIase をピロリン酸フォスファターゼで処理することにより得られる誘導体 (polysac-P) は、MPIase の糖鎖部分とモノリン酸からなる。polysac-P をゲルろ過で分離すると、約八量体程度の画分に溶出される (46)。そのため、MPIase はオリゴマーを形成していると考えられる。polysac-P は 3L-Pf3 coat と直接相互作用して膜挿入可能な複合体を形成できる (46, 55) が、MPIase の糖鎖のみからなる誘導体 (polysac) は 3L-Pf3 coat と複合体を形成できない (55)。また mini-MPIase を含むリポソームを用いて 3L-Pf3 coat の膜挿入を解析する反応液に polysac-P を加えると膜挿入活性が上昇する (55)。一方、polysac-P の代わりに、polysac を加えた場合では膜挿入活性の上昇は観察されない (55)。これらの結果より、MPIase のリン酸が基質膜タンパク質との相互作用に重要であることが示されている。また NMR を用いた解析では、MPIase 周辺のリン脂質の極性頭部の動きが活発になり、アシル鎖のパッキングが弱まることが明らかとなっている (56)。これらの報告より、Sec 非依存の膜挿入において、複数の MPIase によってリン脂質の構造が変化することで膜挿入が進行すると考えられている。

MPIase はタンパク質膜透過反応にも関与することが示されている (57, 58)。MPIase は SecYEG と相互作用し、MPIase 存在下と非存在下では SecYEG の二量体構造が変化すること

が判明している (57)。2 回膜を貫通する SecG は、膜内配向性を反転させながらタンパク質膜透過反応を著しく促進する (59, 60)。MPIase が SecYEG の構造を変化させることにより SecG の反転が可能となり、その結果タンパク質膜透過反応が 10 倍程度促進される (57, 58)。

7. MPIase の *in vivo* 解析

再構成系によって同定された MPIase は、最近、遺伝学的解析においてもその重要性が明らかとなった (58)。糖脂質である MPIase が遺伝学的に解析できるようになったのは、MPIase の生合成酵素の 1 つとしてリン脂質生合成酵素 CdsA が同定されたためである (58)。CdsA は生育に必須の酵素であり、細胞質膜に局在し、ホスファチジン酸 (PA) と CTP から CDP-DAG を合成する (61, 62)。大腸菌では CDP-DAG はすべてのリン脂質の前駆体であり、CDP-DAG は、その後、ホスファチジルグリセロール (PG) やホスファチジルエタノールアミン (PE) に変換される (63)。CdsA は MPIase の生合成中間体 GlcNAc-PP-DAG を合成すること明らかとなった (58)。CdsA 枯渇株では MPIase 量が著しく低下し、M13 procoat が蓄積することが明らかとなった (58)。しかしながら、CdsA 枯渇株ではリン脂質合成が阻害され、PA が蓄積することから、CdsA の枯渇によって観察される膜挿入の阻害が、MPIase 枯渇によるものなのか、リン脂質生合成の異常が原因なのかは不明確であった。CdsA の枯渇による膜挿入の阻害が MPIase の枯渇が原因なのか確認するために、酵母ミトコンドリアの CDP-DAG 合成酵素である Tam41 が大腸菌に導入された。Tam41 は酵母ミトコンドリア内で PA と CTP から CDP-DAG を合成する酵素である (64)。一方、Tam41 は CdsA との相同性が検出できない (64) ため、MPIase 合成能がない可能性が考えられた。CdsA 枯渇条件で Tam41 を発現した大腸菌株では、PA の蓄積が解消し、リン脂質生合成は回復したが、MPIase 生合成は回復しなかった。また菌の生育も回復しなかった。このとき、M13 procoat の膜挿入は完全に阻害されていた (58)。これらの結果より、MPIase は *in vivo* でもタンパク質膜挿入に必須であり、そのため菌の生育にも必須であることが明らかとなった (58)。MPIase 枯渇による M13 procoat の蓄積

の様子は YidC を枯渇したときと同様であった (30, 58)。

8. 本論文の主題：タンパク質膜挿入における MPIase と YidC の役割について

In vivo 解析により MPIase (58) も YidC (30) も Sec 非依存膜挿入において必須の役割を果たしていることが明らかとなっていることから、これらの因子が Sec 非膜挿入経路で協調して機能している可能性が考えられる。さらに両因子は機能的に関連していることを示す結果も報告されている (47)。一方で、MPIase と YidC が Sec 非依存膜挿入でどのような役割を果たしているのか、2つの因子同士が直接相互作用するかどうかについて詳細は不明である。また、MPIase および YidC は生育に必須の因子であるため、各因子の枯渇により二次的影響が引き起こされ、その結果 Sec 非依存膜挿入に影響している可能性も否定できない。

上述のように、精製因子を用いた *in vitro* 解析では、Sec 非依存膜挿入における YidC 機能が明らかになっていない。また、MPIase を含むリポソームに YidC を加えた場合にどのような影響が出るかについては不明な点が多い。さらに、SecYEG が Sec 非依存の膜挿入に関与するかどうかについても結論が出ていない。

本研究では、Sec 非依存膜挿入の分子機構を解析するために、大腸菌の細胞質膜由来の反転膜小胞 (inverted inner membrane vesicles: INV) や精製した因子を再構成したプロテオリポソームを用いて膜挿入解析を行い、MPIase、YidC、SecYEG の必須性および機能を詳細に検討した。本研究により、Sec 非依存膜挿入反応においては MPIase と YidC の二つの因子が協調して機能し、MPIase が膜挿入の前半を、YidC が膜挿入の後半を担っていることを明らかにした。

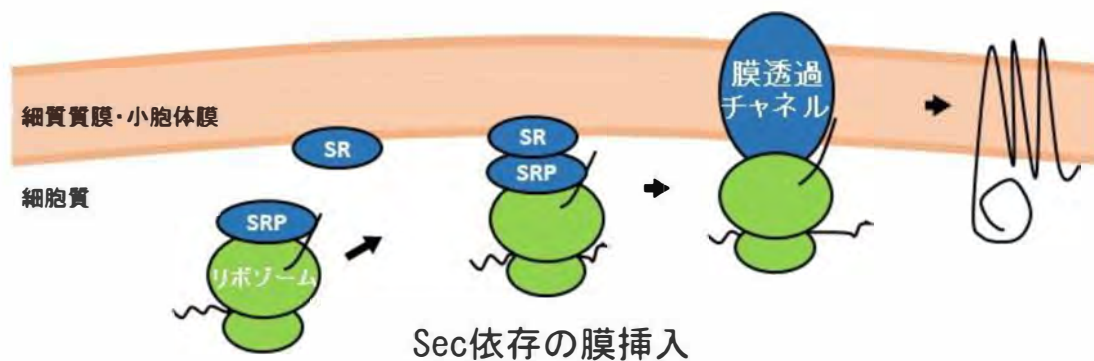


図1. タンパク質膜挿入モデル。細胞質内に存在するリボゾームによって膜タンパク質の翻訳が開始する。SRPが翻訳途中のシグナル配列を認識し、SRP-リボゾーム-新生鎖複合体を形成する。SRP-リボゾーム-新生鎖複合体は生体膜上のSRP受容体であるSRを介して膜上へと輸送される。その後、膜透過チャンネル上で翻訳に共役して膜挿入が進行する。

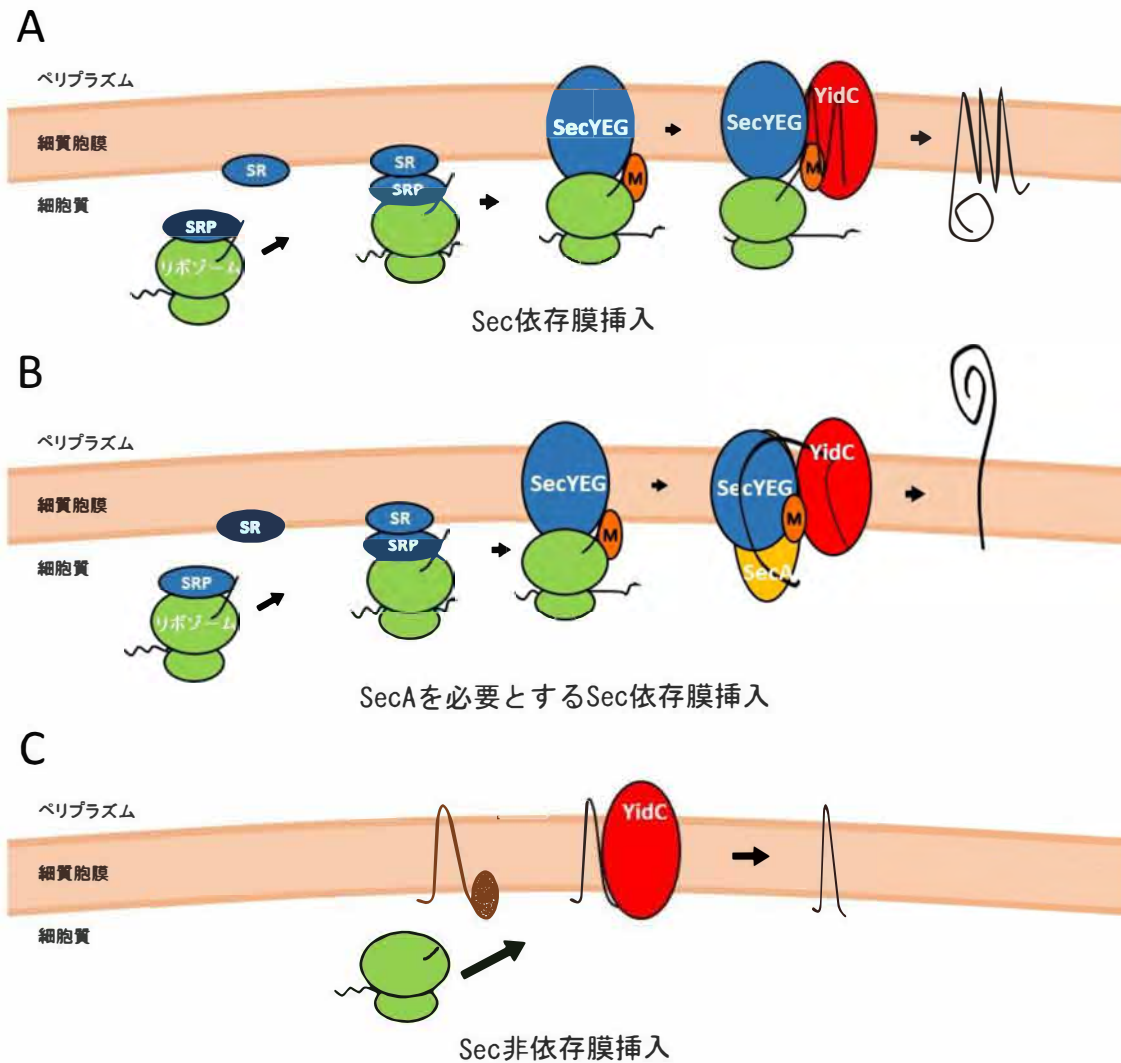


図 2. 大腸菌におけるタンパク質膜挿入機構に関するモデル。A. Sec 依存の膜挿入：図 1 と同様の膜挿入である。SRP が翻訳途中の TM 領域を認識し、膜上の SRP 受容体である SR を介して、リボソーム-新生鎖複合体を膜上へと輸送する。その後、SecYEG 上で翻訳に共役して膜挿入が進行する。膜挿入した膜タンパク質は、YidC に受け渡され、膜挿入が完了する。B. SecA を必要とする Sec 依存の膜挿入：ペリプラズム側に親水的な領域をもつ膜タンパク質の膜挿入は (A) で必要な因子に加えて ATPase 活性をもつ SecA も必要である。SecA によって親水性部分の膜透過が行われる。C. Sec 非依存の膜挿入：SRP や SR、SecYEG を必要としない経路である。YidC や MPIase が関与する。M で示される MPIase は 3 つの膜挿入経路すべてに関与している。

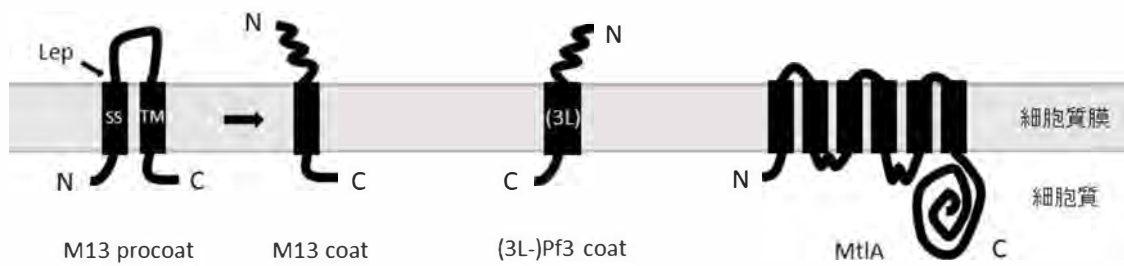


図3. 内膜における M13 procoat (左)、(3L-)Pf3 coat (中央) と MtIA (右) の配向性。

M13 procoat (左) は膜挿入するとリーダーペプチダーゼによってシグナル配列 (SS) が切断され、成熟体 (M13 coat) となる。リーダーペプチダーゼ (Lep) によって切断される部分を示す。

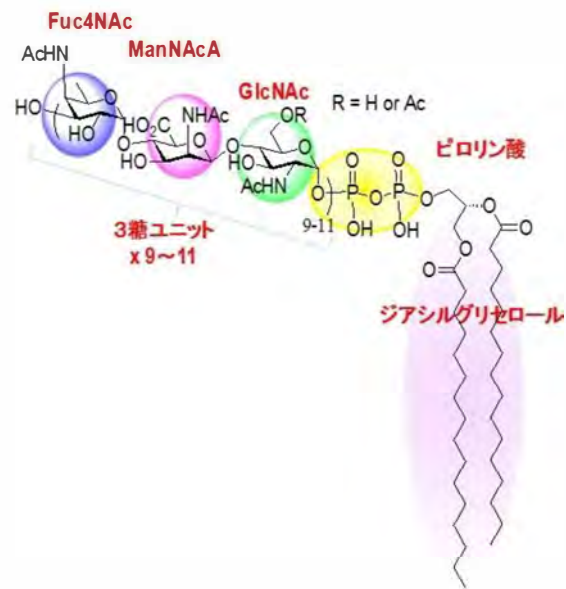


図 4. MPIase の分子構造。MPIase は 3 種のアミノ糖から成る糖鎖 (GlcNAc、ManNAcA、Fuc4NAc) が 9~11 回程度繰り返した構造に、ピロリン酸、ジアシルグリセロールの順番に結合している。GlcNAc は一部が *O*-アセチル化されている。ジアシルグリセロールの脂肪酸組成は、リン脂質同様、生育環境に依存する。

材料と方法

材料

大腸菌野生株として MC4100 ($F^- \Delta[argF-lac]U168 \text{ araD139 rpsL150 relA1 thi deoC7 ptsF25 flbB5301}$) (65)、YidC を枯渇するために JS7131 ($\Delta[codB-lac]3 \text{ galK16 galE15} \lambda^- \text{ relA1 rpsL150 spoT1 hsdR2 ara}^+ \text{ attB::R6Kori ParaB-yidC}^+ \text{ spc}^+ \Delta yidC$) (30)、SecE を枯渇するためにプラスミド pAE9 (Para-secE) を保持する PS273 ($secE\Delta 19-111 \text{ pcnB80 zadL::Tn10 phoA}\Delta PvuII \text{ lac} \Delta X74 \text{ galE galK rpsL}$) (66)、MPIase を枯渇するためにプラスミド pAra-CdsA を保持する KS23 (MC4100 $ara^+ \Delta ynbB::kan \Delta cdsA::cat$) (58) を使用して INV を調製した (67)。SecE、YidC、MPIase を枯渇するために、上記大腸菌株を、アラビノース存在下で一晩培養したものを複数回洗浄し、0.2% グルコース存在下で培養した。Ffh (68)、FtsY (42)、*E. coli* YidC (69)、*B. halodurans* YidC (36)、SecYEG (57) は、各タンパク質を大量発現させた株から精製した。MPIase は (45) に記された方法に従って精製した。*In vitro* タンパク質合成実験では、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンと $[^{35}\text{S}]$ システインを含む (43.5 TBq/mmol) EXPRESS $[^{35}\text{S}]$ Protein Labeling Mix (Perkin Elmer) を用いてタンパク質を標識した。抗 SecY 抗体は SecY の Ser426~Arg443 残基 (70) に、抗 YidC 抗体は YidC の Gln527~Ser548 残基 (58) に、抗 MPIase 抗体は精製した MPIase 標品 (46) に対して調製されたものを用いた。IgG は protein A IgG 精製キット (Thermo Fisher Scientific) を用いて精製した。プラスミド pET-MtlA (71) 及び pT7-7-3L-Pf3 (49)、pT7-7-Pf3 (49) はそれぞれ MtlA、3L-Pf3 coat と Pf3 coat の *in vitro* 合成に使用した。プロテイナーゼ K (PK) は Roche Diagnostics より購入した。Octyl- β -D-glucopyranoside (OG) 及び *n*-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM) は Dojindo Laboratories より購入した。タンパク質合成には *in vitro* 膜挿入活性測定に最適化された PURE system (42 (45, 72)) を使用した。このタンパク質合成系では、(プロテオ) リポソームを保護するためにマグネシウム濃度を 9 mM 以下に維持し、ポリエチレングリコール、ポリアミン、界面活性剤を加えていない。大腸菌のリン脂質は Avanti Polar Lipids より購入した。DAG

(dioleoylglycerol)と *n*-dodecylphosphocholine (DPC)は Sigma より購入した。

(プロテオ) リポソームの調製

DAG を含むリポソームは以下のように調製した。クロロホルムに溶解した大腸菌リン脂質 (1 mg) および DAG (0.05 mg)を混合後、気体窒素および真空条件下で乾燥した。乾燥後 buffer A (50 mM HEPES-KOH, pH7.5, 1mM dithiothreitol) を加え、10 mg/mL とした。その後音波処理によってリポソーム化した。

MPIase を含むリポソームは以下の操作で調製した。SolC (chloroform/ethanol/water = 3/7/4)で可溶化した MPIase を、SolC で可溶化したリン脂質および DAG に混合し、乾燥後、リポソーム調製方法と同様の操作でリポソーム化した。YidC および SecYEG プロテオリポソームは以下の操作により調製した。DAG を含まないリポソーム (200 µg) を 1.5% OG を含む 50 µL の buffer A で可溶化し、さらに、OG で可溶化した精製 YidC および SecYEG を混合した。サンプル容量を 100–150 µL 、OG 濃度を 1.5%に保ち、氷上で 20 分保温後、透析によって OG を除去した。透析は 500 mL の buffer A に対して 3 時間以上、4°C で行い、プロテオリポソームを形成させた。プロテオリポソーム懸濁液に 0.9 ml の buffer A を加えた後、遠心分離 (170,000×g、1 時間 4 °C) して沈殿を回収し、50 µL となるよう buffer A で懸濁した。プロテオリポソームは凍結、融解、音波処理によって単一層化した (73)。MPIase と DAG をプロテオリポソームに加えるため、MPIase と DAG を含むリポソームを YidC/SecYEG プロテオリポソームに融合させた。凍結、融解、音波処理を 3 回繰り返してプロテオリポソームを融合した (図 12 参照)。

タンパク質膜挿入活性測定

PURE system で構成された反応液に対し、³⁵S]メチオニン (2.5~10 MBq/mL; 50~200 nM), プラスミド DNA、および (プロテオ) リポソームまたは INV (0.4 mg/mL)を加え、全体を 20

μLとした。非放射性メチオニンを加える場合は、MtlAの場合 30 μM、その他の基質膜タンパク質の場合 0.3 mM となるよう加えた。MtlA 合成時は、反応液に Ffh (50 μg/mL) と FtsY (17 μg/mL) を加えた。タンパク質の翻訳および膜挿入反応は 37°C で 30 分間行った。反応は氷上に移して停止させた。反応液は二分し、片方にトリクロロ酢酸を 5% 加え、タンパク質含量定量に用いた。もう一方の反応液は同量の PK 溶液 (1 mg/mL) と混合し 20 分で 25 °C 保温した。PK サンプルは 5% のトリクロロ酢酸を、56 °C で 5 分間保温して PK を失活させたのちに、氷上で冷却後、遠心分離によってタンパク質を分離した。放射活性のあるタンパク質を SDS-PAGE により分離後、PhosphorImager (GE Healthcare) によって可視化した。膜挿入断片 (Membrane protected fragments : MPF) は ImageQuant software (GE Healthcare) により定量した。

その他

SDS-PAGE によって Pf3 coat と 3L-Pf3 coat を分離する場合、6M 尿素、12.5% acrylamide-0.27% *N,N*-bismethyleneacrylamide を含むゲルを使用した(43)。MPIase 解析する場合、尿素を加えなかった(46)。その他のタンパク質を解析する場合、13.5% acrylamide-0.36% *N,N*-bismethyleneacrylamide を含むゲル(74)を使用した。タンパク質はウシ血清アルブミンアルブミンを標準物質として定量した(75)。イムノブロットィングは(76) () に示す方法で行った。イムノブロットィングで検出されたバンドは ATTO CS5 analyzer によって定量した。

結果

1. MPIase は INV への Sec 依存/非依存膜挿入のどちらにも関与する。

MPIase が大腸菌におけるタンパク質膜挿入に関与することを確認するために、大腸菌野生株から調製した INV に抗 MPIase 抗体を反応させ、タンパク質膜挿入活性が阻害されるかどうか調べた。膜挿入活性は、膜挿入反応後、膜小胞外部から加えたプロテイナーゼ K (PK) による消化を免れた膜挿入断片 (Membrane protected fragment : MPF) の出現として検出できる (42) (図 5 参照)。膜挿入効率は PK 未消化サンプルのバンドに対する PK 消化サンプルのバンドの割合から算出した。典型的な膜挿入活性測定の結果を図 6 に示した。はじめに Sec 非依存の経路で膜挿入すると考えられている 3L-Pf3 coat を基質として解析を行った。3L-Pf3 coat は、Pf3 coat の TM 領域中央に 3 つのロイシンを挿入した変異体である (23) (図 7A)。3L-Pf3 coat は、Pf3 coat と異なり、膜電位にも (23) YidC にも (49) 依存しないで膜挿入することが報告されている。3L-Pf3 coat の膜挿入活性は、抗 MPIase 抗体の濃度上昇に伴って低下した (図 8B、D)。一方、非免疫抗体や抗 SecY 抗体、抗 YidC 抗体では、3L-Pf3 coat の膜挿入は影響を受けなかった (図 8B、E)。以上の結果より、MPIase は 3L-Pf3 coat の膜挿入に関与するが、SecYEG や YidC は関与しないことが示唆された。また基質として MtlA を用いた場合でも抗 MPIase 抗体によって膜挿入の著しい阻害が観察された (図 8C、E) ことから、MtlA の膜挿入にも MPIase が関与することが示唆された。本実験では反応液に放射活性をもつメチオニンのみを添加しているため、3L-Pf3 coat の合成量は低い (合成量約 $1\sim 5 \times 10^{-11}$ mol/mL)。非放射性メチオニンを加えることによって 3L-Pf3 coat 合成量を増加させた条件 ($2\sim 4 \times 10^{-9}$ mol/mL) でも膜挿入活性を調べた。その結果、抗 MPIase 抗体を添加すると 3L-Pf3 coat の膜挿入が著しく阻害されたが、非免疫抗体や抗 SecY 抗体、抗 YidC 抗体では 3L-Pf3 coat の膜挿入に影響は見られなかった (図 8F 左)。また、YidC に依存して膜挿入すると報告されている Pf3 coat (33) を用いて同様の解析を行ったところ、3L-Pf3 coat の場合と同様、抗 MPIase 抗体を用いた場合のみ Pf3 coat の膜挿入活性が阻害された (図 8F 右)。以上の結果よ

り、MPIase がタンパク質膜挿入反応に関与することが強く示唆された。

SecYEG と MPIase (57)、SecYEG と YidC (31) はそれぞれ細胞質膜で相互作用していることが判明しているため、MtlA の膜挿入がこれらの抗体で阻害された原因は二次的な影響である可能性が考えられる。例えば、抗 YidC 抗体が YidC に結合することによって SecYEG とリボゾームの相互作用が阻害された可能性がある。各因子の膜挿入における必要性をより詳細に検討するために、各因子を枯渇させた大腸菌株から INV を調製し、膜挿入活性を測定した (図 9)。MPIase 枯渇株、SecE 枯渇株、YidC 枯渇株についてそれぞれの因子の枯渇をイムノブロットティングで確認したところ、各因子の枯渇が確認できた (図 9A)。MPIase 枯渇膜では、3L-Pf3 coat や MtlA の膜挿入活性が著しく低下していた (図 9B)。これらの結果は MPIase が Sec 依存/非依存どちらの膜挿入にも関与することを強く示している。それに対し、SecE および YidC 枯渇膜では、MtlA の膜挿入活性は低下したが、3L-Pf3 coat の膜挿入活性は低下しなかった (図 9C)。MtlA の膜挿入活性低下の割合 (Δ SecE INV で ~15%/WT INV で ~39%) は SecE の枯渇の割合 (WT INV に対して 0.24 ; 図 9A 中央) と同程度であった。YidC はほぼ完全に枯渇されていた (WT INV に対して <0.01 ; 図 9A 右) が、MtlA の膜挿入活性は完全には阻害されていなかった。これらの結果は、この実験条件において YidC が MtlA の膜挿入を促進していることを示唆している。

図 8B、F において YidC の重要性が観察されなかったため、YidC を枯渇した株の MPIase 量を調べた (図 9D)。その結果、YidC を枯渇すると MPIase 量が四倍近く増加することが明らかとなった。また、SecE 枯渇条件では、分子量の大きい MPIase が観察されたが、MPIase 量は増加していなかった (図 9D)。分子量の大きい MPIase が出現した理由については不明である。これらの結果は、MPIase と YidC が機能的に関連していることを強く示唆している。このことに関する考察は後述する。

2. 無秩序な自発的膜挿入を排除した再構成系の構築

図 9D で見られたように、枯渇株では予期しない、多面的な影響が引き起こされる。膜挿入における因子の依存性を決定するには、細胞における膜挿入過程を忠実に反映した再構成系が必要となる。本研究では、膜タンパク質の精製に用いられる界面活性剤ドデシルマルトシド (dodecyl maltoside : DDM) やドデシルホスホコリン (dodecylphosphocholine : DPC) には DAG による自発的膜挿入のブロックを解除する効果があることを発見した。これらの界面活性剤は SecYEG (57) や YidC (69) の精製によく用いられ、特に SecYEG を複合体として精製するために頻繁に使用されるが、臨界ミセル濃度が低く、再構成プロテオリポソームから完全に除去するのが困難である。DDM (77) と DPC は DAG を可溶化しにくく、さらにワックス状の複合体を形成することを見出した (図 10)。少量の DDM および DPC を反応液に加えると、DAG による自発的膜挿入のブロックが解除され、DAG を含まないリポソームへの自発的膜挿入と同様に、MtlA や 3L-Pf3 coat が自発的に膜挿入した (図 11)。これらの結果は、DAG と複合体を形成する界面活性剤を再構成系から完全に除去する必要があることを示している。DDM/DPC を除去した (プロテオ) リポソームを得るために、SecYEG や YidC をオクチルグルコシド (octylglucoside : OG) によって可溶化、精製してリポソームに再構成した。DDM を使用する必要がある場合は、DAG を含まないリポソームに SecYEG や YidC を再構成し、のちに DAG を含むリポソームと融合させた。これらの条件では (プロテオ) リポソームへの自発的膜挿入は観察されなかった (図 13B、D)。

リポソームを融合する際、凍結、融解、音波処理による負荷が膜挿入活性に影響するかどうか、3L-Pf3 coat の膜挿入活性を測定することにより確認したところ、5 回までの凍結融解、超音波処理では膜挿入活性の有意な低下がみられなかった (図 12)。そこで、以降の実験で (プロテオ) リポソームを融合するときは凍結融解、音波処理を 3 回行った。

3. MPIase 依存の膜挿入反応は YidC により促進される。

次に、自発的膜挿入が十分排除された条件で 3L-Pf3 coat の膜挿入活性を測定した (図

13A)。3L-Pf3 coat の膜挿入は MPIase 存在下でのみ観察され、YidC のみを含むプロテオリポソームの膜挿入活性は、YidC を含まないリポソームと同様の低い値を示した。MPIase と YidC の両者を含むプロテオリポソームでは、MPIase のみを含むリポソームと同様の活性が観察された (図 13A. Low 3L-Pf3 coat level)。以上の結果は、YidC プロテオリポソームには 3L-Pf3 coat が膜挿入しないことを示している。一方で、タンパク質合成系に非放射性メチオニンを加えることにより 3L-Pf3 coat 合成量を増加させると、MPIase リポソームに比べて MPIase/YidC プロテオリポソームでは 3L-Pf3 coat の膜挿入活性は上昇しており、YidC による膜挿入の促進が観察された (図 13A. High 3L-Pf3 coat level)。この条件では 3L-Pf3 coat の合成量が $\sim 3.0 \times 10^{-9}$ mol/mL 程度であったのに対し、リポソーム内で機能しうる MPIase 量は 1.8×10^{-10} mol/mL、YidC 量は 1.6×10^{-10} mol/mL であるため、3L-Pf3 coat の膜挿入は複数回進行していることが判明した。それに対し、非放射性メチオニンを加えていない条件では合成された 3L-Pf3 coat 量が $\sim 1.4 \times 10^{-11}$ mol/mL 程度であり、プロテオリポソーム内の膜挿入装置と比べて 1/10 以下であることが判明した。また、SecYEG をプロテオリポソームに共存させても、MPIase に依存する膜挿入および YidC による膜挿入の促進のどちらも影響を受けなかった (図 13B)。また、SecYEG 単独の場合でも 3L-Pf3 coat の膜挿入は観察されなかった (図 13B)。さらに結晶構造が初めて明らかとなった *Bacillus halodurans* の YidC (Bh-YidC) (36) を用いて同様の解析を行ったところ、非放射性メチオニンを加えていない場合は、MPIase と YidC を含むプロテオリポソーム、MPIase のみを含むリポソームで 3L-Pf3 coat の膜挿入活性はほとんど変化がなかった (図 14. Low 3L-Pf3 coat level)。それに対して、非放射性メチオニンを加えた場合では YidC による 3 倍程度の促進効果が見られた (図 14. High 3L-Pf3 coat level)。これらは図 13. A と同様の結果であると考えられる。3L-Pf3 coat は YidC に依存しないで膜挿入すると考えられてきた膜タンパク質である (23, 49)。しかし、図 9D に示されたように、YidC が枯渇した条件では、YidC の枯渇による影響を相補するために MPIase 量が増加している。YidC による膜挿入の促進効果は、Pf3 coat (図 13C) や MtlA (図 13D) を基質とし

て用いたときも観察された。Pf3coatの膜挿入もMPIaseに依存し、YidCによって促進された(図13C)。MtlAの膜挿入はMPIaseやSecYEG単独の場合には観察されなかったが、MPIaseとSecYEGを含むプロテオリポソームでは観察された。さらに、YidCが存在すると膜挿入活性は二倍以上に促進された(図13D)。以上の結果より、YidCはSec依存/非依存を問わず、MPIaseに依存する膜挿入を促進すると結論とした。

4. YidC変異がMPIase依存の膜挿入反応に及ぼす影響

YidCのTM領域内部には親水的な溝が存在し、膜挿入反応に重要であることが判明している(36-38)。次に、MPIaseに依存する膜挿入におけるYidCの親水的な溝の変異体の効果を検証した(図15)。致死性の変異株であるT362A(37)をMPIaseと共に再構成した場合、膜挿入活性はYidCを含まないものと変化がなかった(図15A)。この結果は、この変異体がMPIaseに依存する膜挿入の促進能を失っていることを示している。低温感受性変異であるR366AとR366M(37)の場合は、膜挿入の促進効果は野生型YidCと比べて低下していた(図15A)。これらの結果はYidCの親水的溝内部の正電荷およびその周辺の領域がMPIaseに依存する膜挿入の促進に重要であることを示している。YidC依存の基質膜タンパク質Pf3coatを用いた場合、各変異体の膜挿入活性はMPIase単独の場合と変化がなかった(図15B)。これらの結果は、すべてのYidC変異株が膜挿入促進能をもたないことを示している。また3L-Pf3coatとPf3coatでは膜電位の要求性が異なる(23)ため、変異体の影響に差が出た可能性がある。Bh-YidCもPf3coatの膜挿入を促進することが判明した(図15C)。大腸菌YidCのT362Aと同様に致死性を示すBh-YidCのR72Q変異体(36)をMPIaseと共に再構成させた場合、Pf3coatの膜挿入におけるYidCによる促進効果は観察されなかった(図15C)。以上の結果もYidCの親水的溝内部の正電荷(R72)が重要であることを示している。上記の結果はYidCの結晶構造より推定されたYidC作用モデルと矛盾しないと考えられる(36-38)。

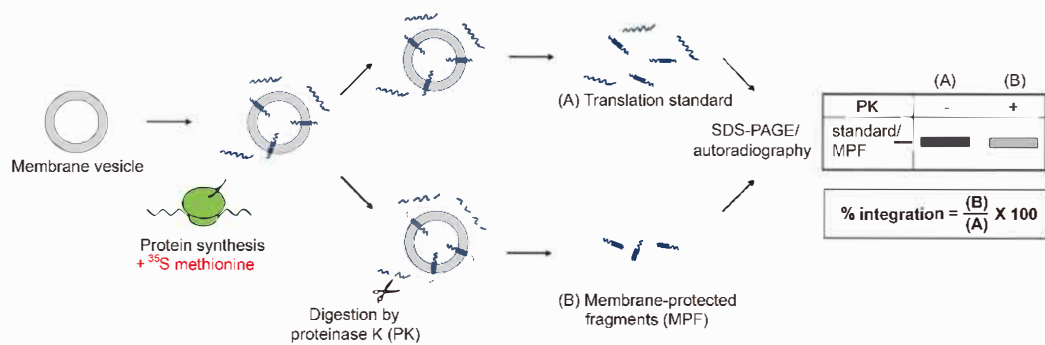
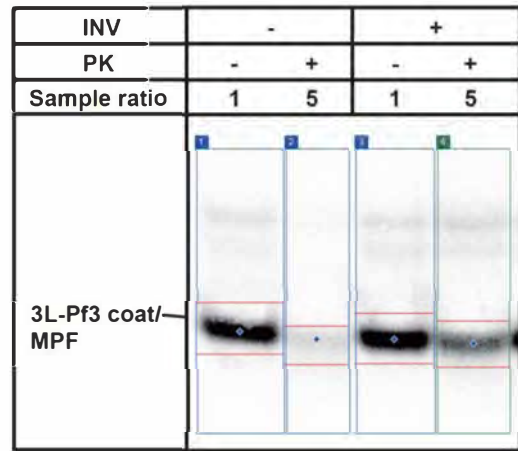
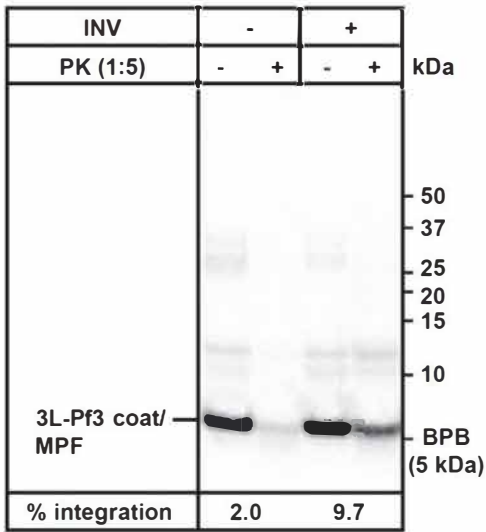


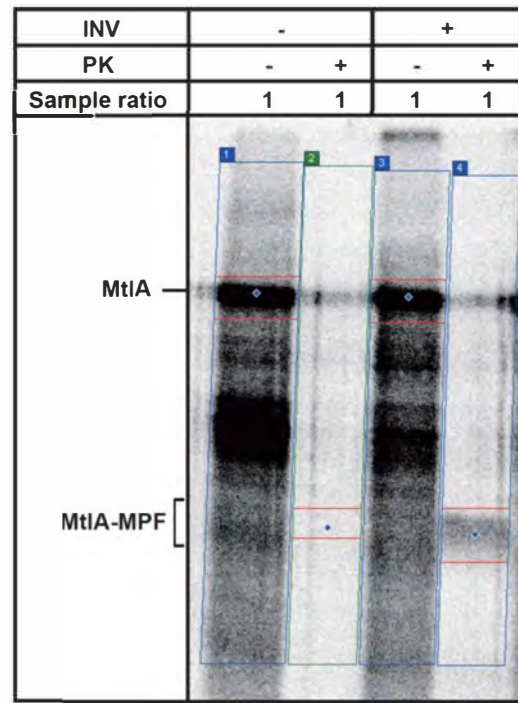
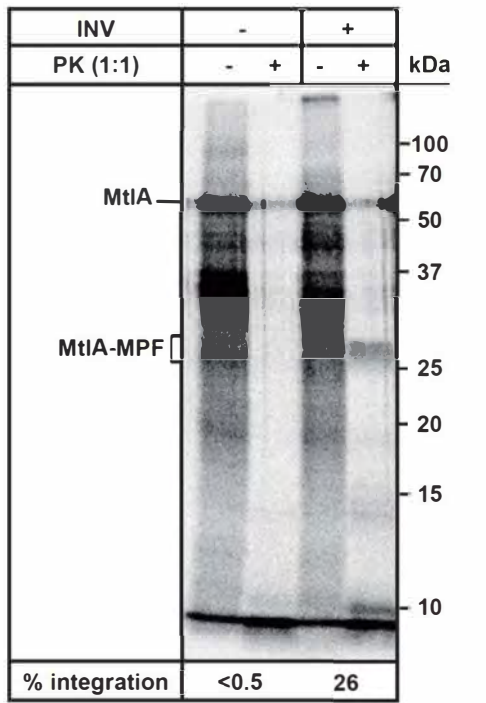
図 5. タンパク質膜挿入活性の測定方法。SDS-PAGE/オートラジオグラフィの後、膜挿入効率を、合成量に対する MPF 量のパーセンテージとして算出した。

A



$$\% \text{ integration} = \text{Sample ratio} \left(\frac{1}{5} \right) \times \frac{\text{Radioactivity (+PK)}}{\text{Radioactivity (-PK)}} \times 100$$

B



$$\% \text{ integration} = \text{Sample ratio} \left(\frac{1}{1} \right) \times \frac{\text{Radioactivity (+PK)}}{\text{Radioactivity (-PK)}} \times \text{Methionine number} \left(\frac{25}{18} \right) \times 100$$

図 6. タンパク質膜挿入活性測定の実例。A. 3L-Pf3 coat の INV への膜挿入。 翻訳量の基準 (-PK) として反応液の 20%相当量の PK 未処理サンプルを泳動した。その後、オートラジオグラフィにより放射活性のあるバンドを検出した。3L-Pf3 coat とその MPF の位置を示している。

B. MtlA の INV への膜挿入。 反応液を等量に分け、一方を翻訳量の基準 (-PK) として、もう一方に PK 消化を行った後に泳動した。MtlA とその MPF の位置を示した。MtlA より小さいバンドはメチオニン濃度が低いため途中で翻訳が停止したものと考えられ、この小さなバンドからは MPF を生じない(42, 43)。各図の右には、それぞれのバンドの定量エリアを赤枠で示している。膜挿入活性の計算式を図の下に記した。(A)には図 8B、(B)には図 8C を例として用いた。

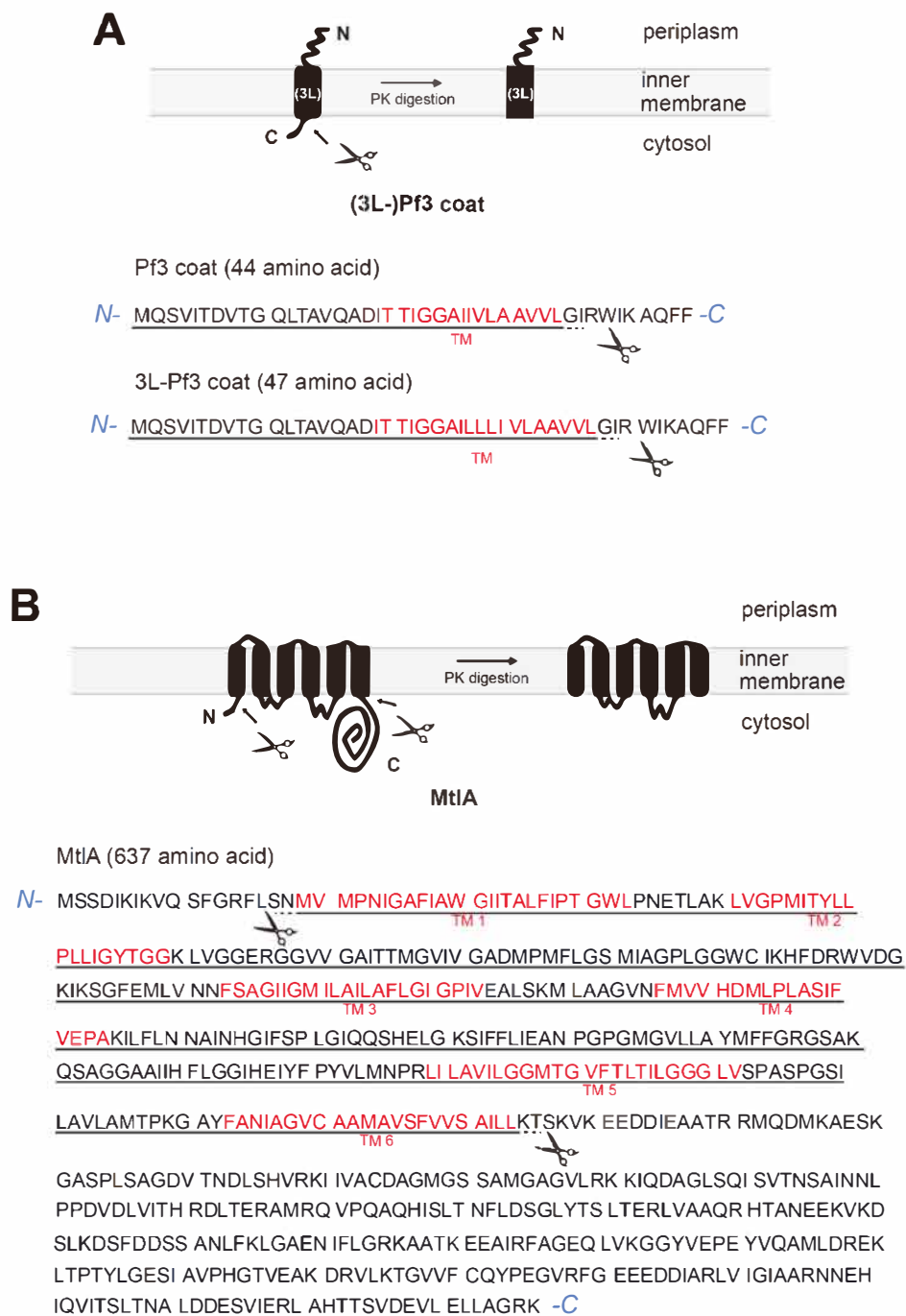


図 7. 本研究で使用した基質膜タンパク質の配向性とアミノ酸配列。A. Pf3 coat と 3L-Pf3

coat。B. MtlA。TM 領域を長方形で示した。PK 消化前と消化後の配向性を示した。アミノ酸配列中の TM 領域を赤で記した。外部から加えた PK によって切断される部位をハサミで示した。MPF の配列を下線で記した。

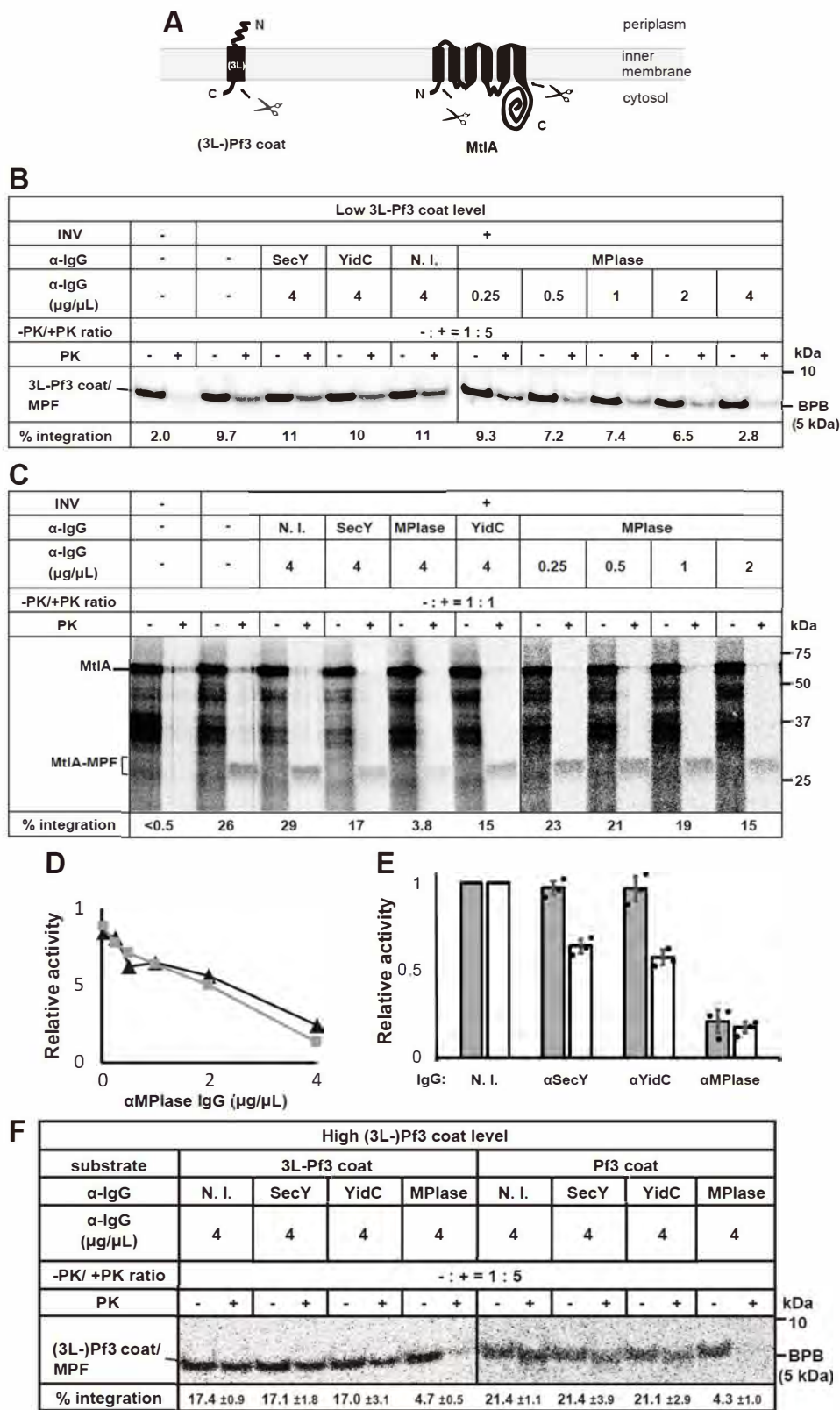


図 8. 抗 MPlase 抗体は INV へのタンパク質膜挿入を阻害する。A. 細胞質膜における Pf3

coat/3L-Pf3 coat (左) と MtlA (右) の配向性。 INV の外部から PK を加えたときに消化される部分をハサミで示した。 **B. 3L-Pf3 coat の INV への膜挿入は抗 MPIase 抗体により阻害されるが、抗 SecY 抗体、抗 YidC 抗体では阻害されない。** 野生株 MC4100 から INV を調製し (4 μ g)、記載した濃度の抗 MPIase 抗体、抗 SecY 抗体、抗 YidC 抗体を混合し、30 分間氷上で保温した。コントロールとして非免疫抗体 (N. I) を用いた。次に、非放射性メチオニンを加えずに 3L-Pf3 coat を合成した。PK 消化由来の MPF を SDS-PAGE およびオートラジオグラフィで解析した。タンパク質合成レベルを測定するために PK を加えていないサンプル (20% 分) についても解析した。各サンプルの膜挿入効率を計算し、図の下に記した (% integration)。活性を計算する際に、5 倍量の “+PK” サンプルを泳動したことを考慮した。

C. MtlA の INV への膜挿入は抗 MPIase 抗体、抗 SecY 抗体、抗 YidC 抗体により阻害される。 INV と各抗体を (B) に記すように混合し、30 μ M の非放射性メチオニンを加えて MtlA を合成し、PK により消化した。PK 消化により生じる MPF を SDS-PAGE およびオートラジオグラフィで解析した。PK を加えていないサンプル (100%分) についても解析した。MtlA と MtlA-MPF の位置を図の左に示した。各サンプルの膜挿入効率を図の下に記した (% integration)。

D. 抗 MPIase 抗体による 3L-Pf3 coat 膜挿入阻害 (三角) と MtlA 膜挿入阻害 (四角) の濃度依存性。 非免疫抗体存在下の膜挿入活性に対する抗 MPIase 抗体存在下の膜挿入活性の相対比を、抗 MPIase 抗体の濃度に対してプロットした。

E. 3L-Pf3 coat (灰色) と MtlA (白色) の膜挿入における各抗体の効果のまとめ。 非免疫抗体の膜挿入活性に対する相対的な活性を示した。エラーバーは 3 回の独立した実験より算出した。全ての比活性の値を点で示した。

F. 各抗体が非放射性メチオニン (0.3 mM) 存在下における 3L-Pf3 coat (左) と Pf3 coat (右) の膜挿入に及ぼす効果。 3L-Pf3 coat と Pf3 coat を (B) に記す条件で、INV と各抗体の存在下で合成した。3L-Pf3 coat と Pf3 coat の合成量を上昇させるために、0.3 mM の非放射性メチオニンを加えた。膜挿入活性とその標準偏差は、3 回の独立した実験より算出し、図の下に記した (%integration)。

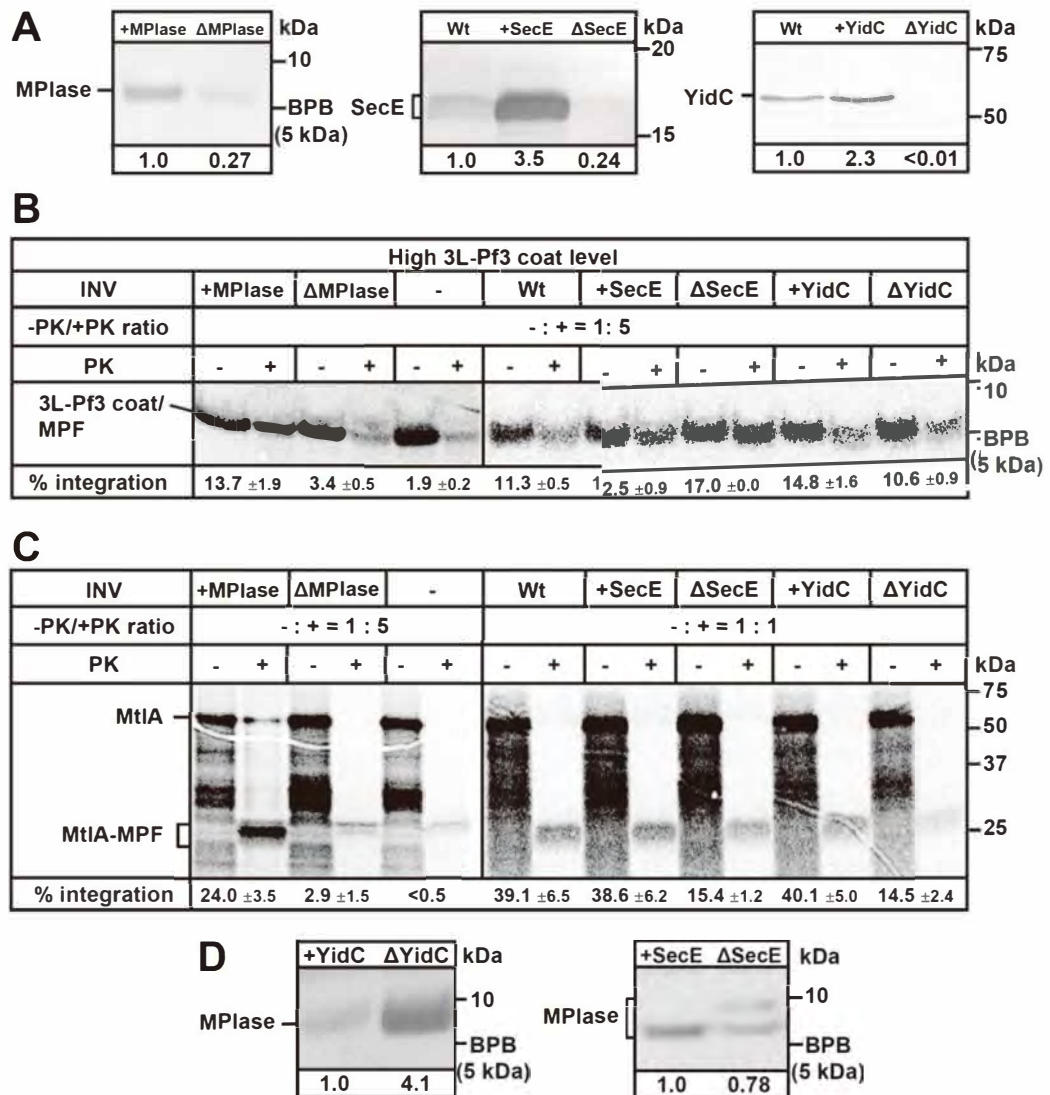


図9. INV から MPIase を枯渇させると膜挿入活性が低下する。A. それぞれの因子の枯渇具合の確認。MPIase (左)、SecE (中央)、YidC (右) の枯渇における各因子の量を免疫ブロッティングにより調べた。MPIase サンプルは INV 調製前の全細胞抽出物を、SecE と YidC サンプルは INV を用いた。各因子の相対量を図の下に示した。B. 3L-Pf3 coat の INV への膜挿入は MPIase の枯渇により低下する。KS23/pAra-CdsA 株を 0.2% のアラビノース存在下 (+MPIase) およびアラビノース非存在下 (ΔMPIase) で培養し、INV を調製したのちに、図 8F 左と同様に膜挿入活性を調べた。3L-Pf3 coat の合成量を上昇させるために、0.3 mM の非放射性メチオニンを加えた。コントロールとして MC4100 (WT)、PS273/pAE9 株を 0.2% のア

ラビノース存在下 (+SecE) およびアラビノース非存在下 (Δ SecE)、JS7131 株を 0.2%のアラビノース存在下 (+YidC) およびアラビノース非存在下 (Δ YidC) で培養して INV を調製し、膜挿入活性を測定した。膜挿入活性とその標準偏差は 3 回の独立した実験より算出し、図の下に示した。C. MtlA の INV への膜挿入活性は MPIase の枯渇により低下する。それぞれのサンプルについて MtlA を図 8B に示す条件で合成した。合成系には 30 μ M の非放射性メチオニンを加えた。合成された MtlA (-PK) を図左が 20%、図右が 100%となるように解析している。膜挿入活性とその標準偏差は 3 回の独立した実験より算出し、図の下に示した。D. YidC (左) および SecE (右) 枯渇条件における MPIase 発現量の測定。YidC (左)、SecE (右) 枯渇株における MPIase 発現量をイムノブロッティングにより調べた。MPIase の相対量を図の下に示した。

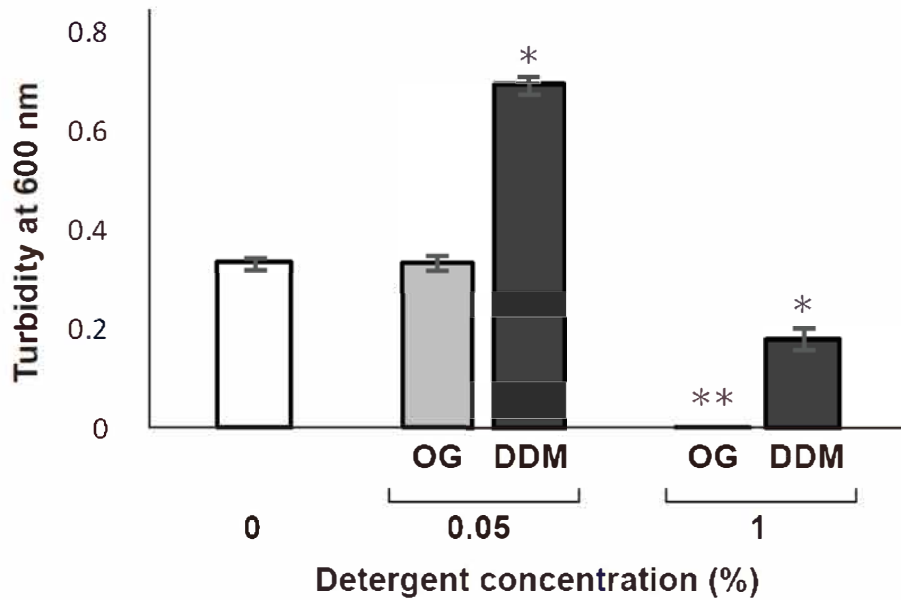


図 10. DDM と DAG によるワックス状の複合体の形成。DAG (0.3 mg/mL) を 20 mM の HEPES-KOH (pH 7.5) に懸濁し、図に示す濃度の OG または DDM と混合した。混合物は音波処理後に 5 分間、室温で保温し、600 nm における濁度を測定した。3 回の独立した実験の平均値より算出した標準偏差をエラーバーで示した。それぞれの p 値は界面活性剤を加えていないサンプルと比較して算出した。* は $p < 0.01$ 、** は $p < 0.001$ を示す。

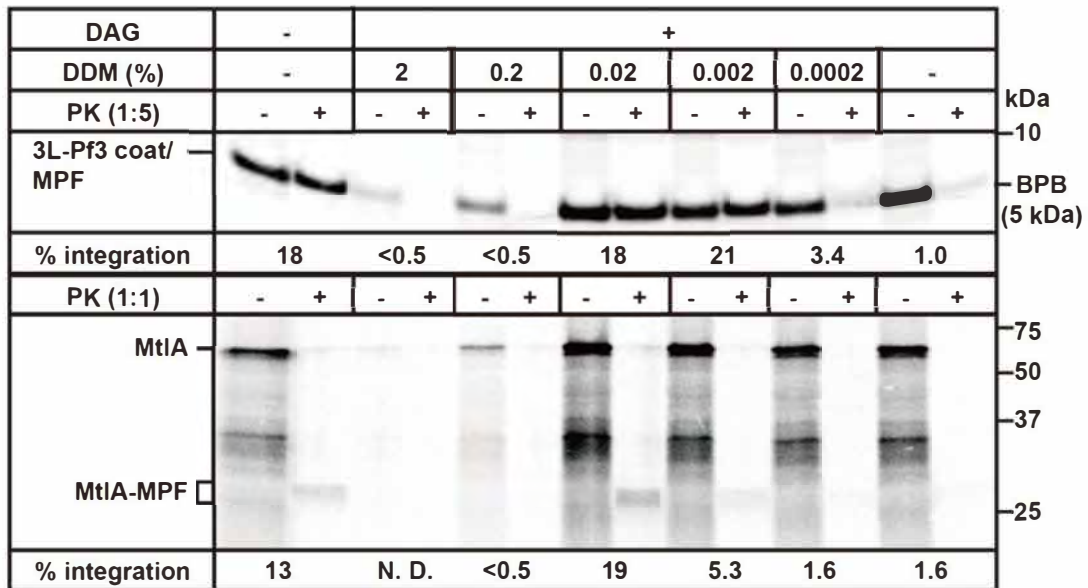
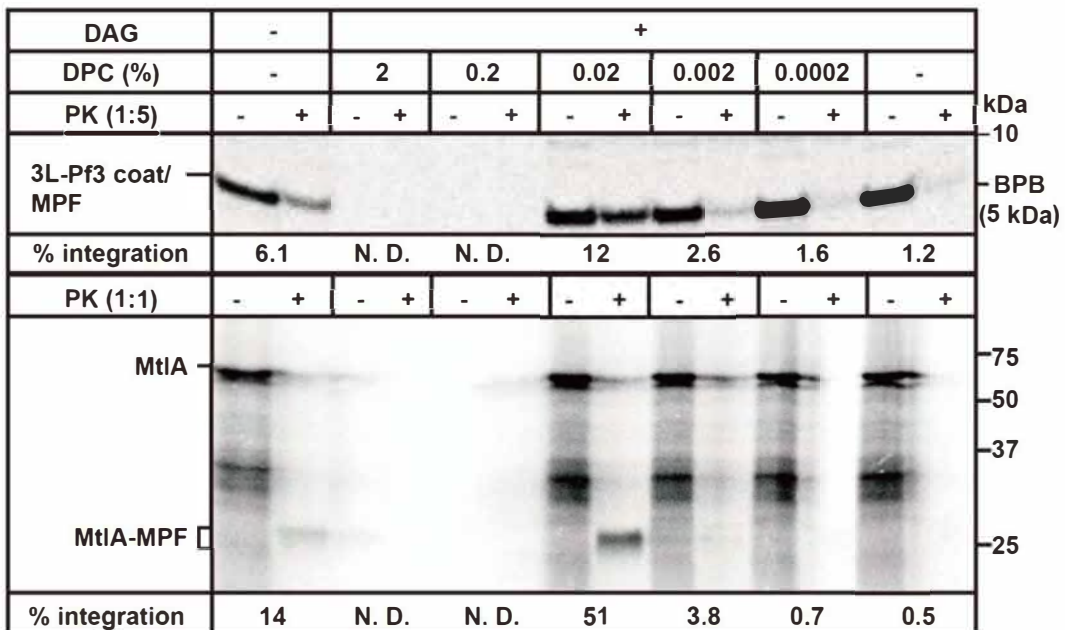
A**B**

図 11. DDM と DPC により DAG による自発的膜挿入のブロックが解除される。DAG を含まないリポソーム (-DAG)、5%の DAG を含むリポソーム (+DAG) 存在下で、3L-Pf3 coat (図の上部) と MtIA (図の下部) を *in vitro* で合成した。反応液には図で示す濃度の DDM (A) と DPC (B) を加えた。膜挿入活性は各図の下に記した。N. D. は検出不可を示す。

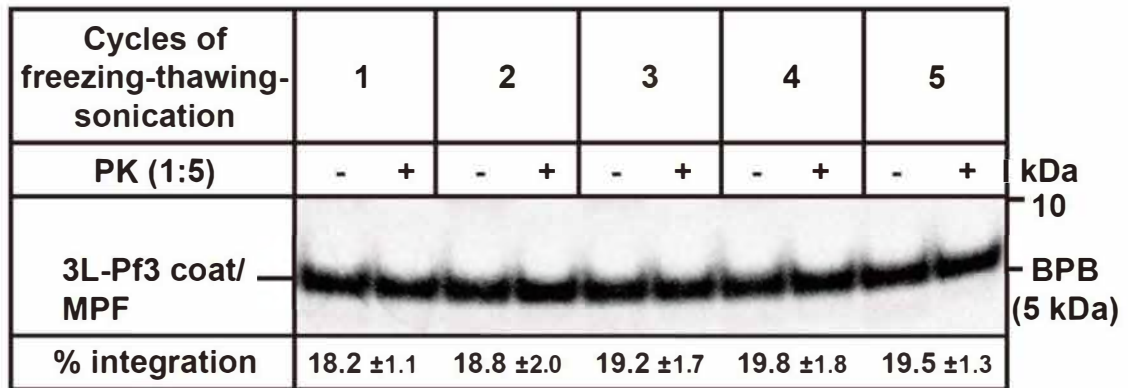


図 12. 凍結融解、音波処理がプロテオリポソームへの 3L-Pf3 coat の膜挿入に及ぼす影響。

MPIase と YidC を含むプロテオリポソームについて図に記した回数の凍結融解、音波処理を行い、3L-Pf3 coat の膜挿入活性を測定した。3 L-Pf3 coat 合成量を増加させるために、反応液に 0.3 mM の非放射性メチオニンを加えて行った。膜挿入活性とその標準偏差は 3 回の独立した実験をもとに算出し、図の下に記した。

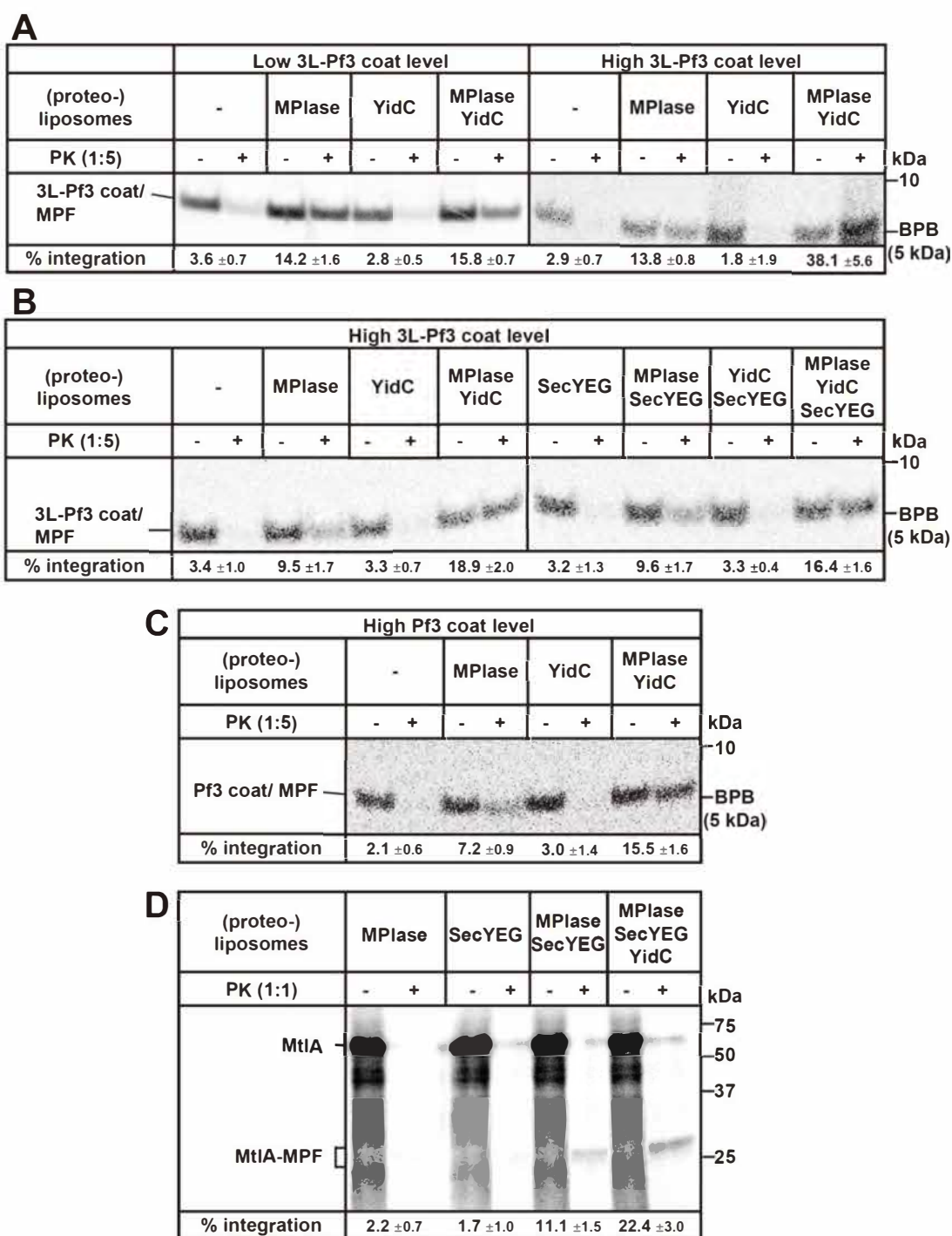


図 13. 再構成プロテオリポソームにおける MPlase 依存的な膜挿入は YidC により促進される。

A. 基質合成量が多いときに 3L-Pf3 coat の膜挿入は YidC により促進される。3L-Pf3 coat を基質とし、MPlase や YidC を含む (プロテオ) リポソームを用いて 3L-Pf3 coat の膜挿入活性を図 8B に示す方法で測定した。図右 (high 3L-Pf3 coat level) に非放射性メチオニン (0.3

mM) を加えたのに対し、図左 (low 3L-Pf3 coat level) には加えていない。膜挿入活性を図の下に示した。B. SecYEG は 3L-Pf3 coat の膜挿入に関与しない。MPIase や SecYEG、YidC を含む (プロテオ) リボソーム存在下で 3L-Pf3 coat を *in vitro* 条件で合成した。3L-Pf3 coat の合成量を上昇させるために、0.3 mM の非放射性メチオニンを加えて合成した。膜挿入活性を図の下に示した。C. Pf3 coat の膜挿入は YidC により促進される。MPIase や YidC を含む (プロテオ) リボソーム存在下で Pf3 coat を合成した。Pf3 coat の合成量を上昇させるために、0.3 mM の非放射性メチオニンを加えて合成した。膜挿入活性を図の下に示した。D. MtlA の膜挿入は MPIase と SecYEG の両方に依存し、YidC により促進される。MPIase や SecYEG、YidC を含む (プロテオ) リボソーム存在下で MtlA を合成した。合成時には 30 μ M の非放射性メチオニンを加えた。膜挿入活性を図の下に示した。全ての膜挿入活性は 3 回測定し、標準偏差とともに記した。

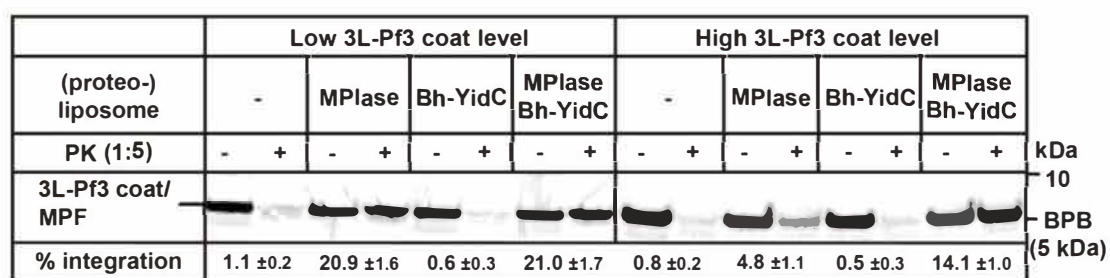


図 14. 膜タンパク質の合成レベルが高い場合、Bh-YidC も 3L-Pf3 coat の膜挿入を促進する。

MPIase や Bh-YidC を含む (プロテオ) リポソームを用いて、3L-Pf3 coat の膜挿入活性を

図 8B に記す条件で調べた。右半分 (High 3L-Pf3 coat level) には非放射性メチオニン

(0.3mM) を加えた。膜挿入活性は 3 回測定し、標準偏差とともに記した。

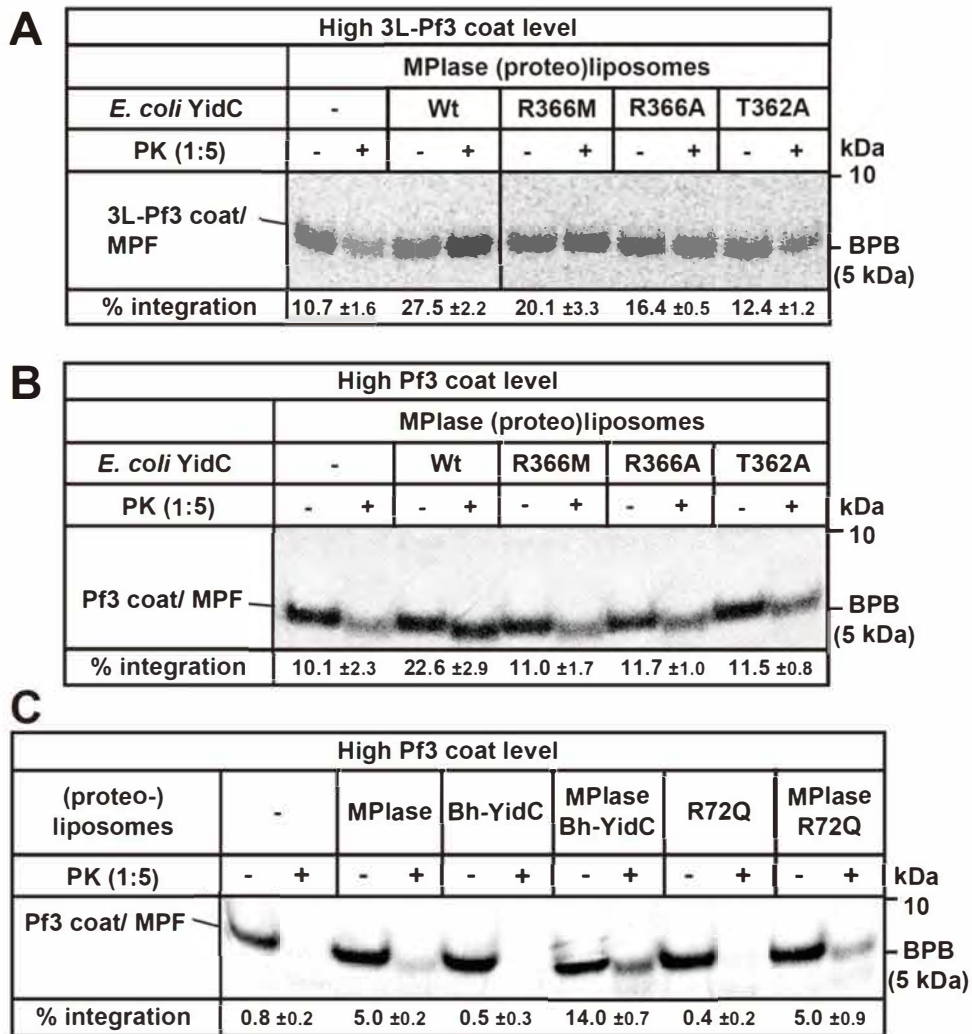


図 15. YidC 変異体が MPlase に依存する膜挿入に及ぼす影響。A. 3L-Pf3 coat の膜挿入における YidC 変異体の効果。MPlase や YidC とその変異体を含む (プロテオ) リポソーム存在下で 3L-Pf3 coat を合成した。3L-Pf3 coat の合成量を上昇させるために、0.3 mM の非放射性メチオニンを加えた。膜挿入活性を図の下に示した。B. Pf3 coat の膜挿入における YidC 変異体の効果。(A) の (プロテオ) リポソーム存在下で Pf3 coat を合成した。Pf3 coat の合成量を上昇させるために、0.3 mM の非放射性メチオニンを加えた。膜挿入活性を図の下に示した。C. Pf3 coat の膜挿入における Bh-YidC およびその変異体の効果。MPlase や Bh-YidC もしくは R72Q を含む (プロテオ) リポソーム存在下で Pf3 coat を合成した。膜挿入活性を図の下に示した。全ての膜挿入活性は 3 回測定し、標準偏差とともに記した。

考察

本研究で得られた結果や既存の報告(36, 37, 47, 55, 56, 58)に基づき、タンパク質膜挿入の分子機構について考察する。特に、Sec 非依存で進行するタンパク質膜挿入については、図 16 に詳しく示した。プロテアーゼ保護断片 (MPF) の出現を指標として膜挿入活性を測定する場合、自発的膜挿入を厳密にブロックした条件ではタンパク質膜挿入は MPIase に完全に依存していた (図 13)。DAG をリポソームに再構成した場合でも、DDM(51)や DPC(50)が混入した場合は、図 11 に示すような無秩序な自発的膜挿入が引き起こされる。MPF は膜挿入の初期段階で検出されるため、MPIase はこの段階で作用していると考えられる。それに対し、YidC は後期段階で作用すると考えられる。これは自発的膜挿入が厳密にブロックされた条件では、YidC プロテオリポソームには膜挿入活性がないことと合致する(43, 47)。以前の報告(49, 50)では、自発的膜挿入のブロックが不完全であり、その自発的膜挿入が YidC によって促進されている恐れがある。MPIase の糖鎖部分は、直接基質膜タンパク質と相互作用し(46, 55)、膜挿入可能な構造を維持することから、MPIase は細胞質側の膜表面で膜タンパク質を受け取り(図 16a)、膜挿入可能な複合体を形成する(図 16b)と考えられる。このとき、基質膜タンパク質の正電荷と、MPIase のピロリン酸やリン脂質の負電荷が相互作用し、ポジティブインサイドルール(78)に従う配向性をとる手助けをされると考えられる。次に MPIase によって細胞質膜表面の構造が変化した(56)のちに、MPIase 上で膜挿入が進行する(図 16c)。もしこの状態で YidC が存在すると、YidC の親水的な溝内部の正電荷と基質膜タンパク質の負電荷が静電的相互作用することにより YidC が膜タンパク質を受け取る(36-38)と考えられる。このように膜内で MPIase から YidC へと側方に膜タンパク質が受け渡されるため、図 8B、F において抗 YidC 抗体により膜挿入が阻害されなかったと考えられる(図 16g)。この静電的相互作用は YidC 変異体を用いた解析でも重要性が示された(図 15)。YidC 存在下、非存在下のいずれの場合でも、膜挿入が完了していなくても、ある程度膜挿入が進行すると(図 16d、h)、基質膜タンパク質は PK による消化から保護されるために、膜挿入活性測定では膜挿入しているもの

として検出される。次に、基質膜タンパク質が MPIase から解離し (図 16d)、膜挿入が完了する (図 16e)。基質と解離した MPIase は次の膜挿入サイクルに移行する (図 16f)。MPIase は細胞質側の膜表面に存在するため、ステップ (d)は自発的に進行するものの、その速度は YidC がある場合に比べて遅いと考えられる。それに対し、もし YidC が MPIase から基質を受け取る (図 16h) ことができると、MPIase から基質が解離する速度はステップ(d) と比べてより早くなり、MPIase が次の膜挿入サイクルに速やかに移行できるようになる。膜挿入活性をもつ MPIase が速やかに次のサイクルに移行できれば、基質合成量が多く、複数回膜挿入を触媒する必要がある場合に、膜挿入が促進される。それに対し、基質合成量が低い場合は、膜挿入は一度しか行われぬ。このとき、(c、g)以降のサンプルはすべて膜挿入されたものと観察されるために、膜挿入活性に YidC の効果が反映されないと考えられる。YidC は膜挿入の最終段階に作用すると考えられる。(図 16i)。YidC の存在しない場合に(e)のステップが進行したとしても、その速度は非常に遅くなると予想される。そのため、菌の生育には YidC 機能が必須であると考えられる。このように MPIase が初期段階に機能し、基質が YidC に受け渡されて、膜挿入が完了すると考えられる。YidC による膜挿入の促進は Foc サブユニットの膜挿入反応においても観察されている(47)。図 16 の作用モデルは抗 MPIase 抗体、抗 YidC 抗体の作用とも合致している。例えば、抗 MPIase 抗体が Sec 非依存膜挿入を著しく阻害するのに対して、Sec 依存膜挿入を阻害する抗 YidC 抗体は、Sec 非依存膜挿入をまったく阻害しない (図 8B、F)。また、プロテオリポソームを用いた膜挿入解析では、MPIase や YidC とは異なり、SecYEG は Sec 非依存膜挿入に効果を示さなかった (図 13B)。このことは SecYEG が Sec 非依存膜挿入に関与しないことを強く示唆している。

MtlA の膜挿入については、抗 SecY 抗体だけでなく、抗 MPIase 抗体、抗 YidC 抗体のいずれの場合でも阻害が観察された (図 8C)。MPIase (57) と YidC (31) がそれぞれ SecYEG と相互作用することを考慮すると、この阻害については SecYEG と相互作用した MPIase や YidC に抗 MPIase 抗体、抗 YidC 抗体が作用することで間接的に SecYEG 機能を阻害した可能性も否定できない。しかしながら、図 9C で示すように、MPIase や YidC の枯渇により MtlA の膜挿入活性は著しく低下したことから、MtlA の膜挿入には SecYEG だけでなく MPIase および YidC が関与することが強く示唆される。抗 SecY 抗体および抗 YidC 抗体による MtlA 膜挿入の阻害効果が不完全な理由としては、両抗体が MtlA の新生鎖をもつリポソーム複合体と SecYEG 上で競合していることが挙げられる。なお、翻訳を終了させた後に進行させる Sec 依存の膜透過反応を、同じ SecY 抗体が完全に阻害することが報告されている (70)。INV における抗体による膜挿入阻害と膜挿入因子の枯渇実験の結果は、3 つの因子すべてが MtlA の膜挿入に関与することを強く示唆している。また、報告されている MPIase の枯渇条件 (58) では、SecYEG や YidC は野生株と同じ程度 INV に含まれていることが判明している。(79) に示された解析では SecYEG と YidC のどちらかをプロテオリポソームに再構成すれば MtlA が膜挿入すると報告されている。しかしながら、この解析では SecYEG および YidC の精製に DDM が用いられている (79) ことから、SecYEG や YidC を再構成する際、プロテオリポソームから界面活性剤 DDM が十分に取り除かれていない可能性が強く、図 11 のような自発的膜挿入が引き起こされている恐れがある。DDM を完全に排除したプロテオリポソームでは MPIase および SecYEG の両者が MtlA の膜挿入に必要不可欠であり、また YidC は Sec 非依存膜挿入と同様に MtlA の膜挿入を促進していた (図 13 D)。これらの結果は、図 8、9 の INV で得られた結果と一致する。

3L-Pf3 coat は膜電位にも YidC にも依存しないで膜挿入する変異体である (49)。一方、本研究の再構成系では、合成量が多い場合に、3L-Pf3 coat の膜挿入は YidC により著しく促進された。したがって、3L-Pf3 coat の発現量が多くなると、YidC に依存するようになる可能性があ

る。これは MtlA についても同様であると考えられる。既存の報告では MtlA の膜挿入活性に YidC 依存性は観察されていない(43)が、本研究では YidC による促進が観察された。本研究では、MtlA の合成に PURE System を用いている。この合成系では、MtlA を合成するために非放射性メチオニンを加える必要がある。したがって、非放射性メチオニンを加えたことにより MtlA 合成量が既存の報告(43)の場合と比べて高くなるため、YidC による促進効果が観察された可能性がある。

本研究により得られた結果は、MPIase が YidC と共に機能することを強く示唆している。すなわち、二つの因子はタンパク質膜挿入装置複合体として機能している可能性が考えられる。この考えは *in vivo* の解析において YidC(30)や MPIase の枯渇(5858)により M13 procoat の膜挿入が著しく阻害されることと一致する。MPIase が YidC/MPIase タンパク質膜挿入装置の糖鎖サブユニットである可能性も考えられる。YidC は必須因子であるため、YidC の枯渇は多面的な影響をおよぼす。しかしながら、細胞内の YidC を枯渇させることにより MPIase 合成量が上昇する制御が働くことは、膜挿入反応において両因子が同様の段階で作用することを示している。すなわち、YidC 非存在下で、MPIase のみで膜挿入が進行する場合は、膜挿入速度が大幅に遅くなるが、MPIase が過剰生産されると、部分的に膜挿入が相補されている可能性も考えられる。これは図 16 のモデルと一致する。

結論として、YidC は MPIase に依存する膜挿入反応を促進する機能をもつことが明らかとなった。2つの膜挿入因子 MPIase と YidC による相互作用を想定することによって、既存の報告の矛盾や論争が解決されると考えている。

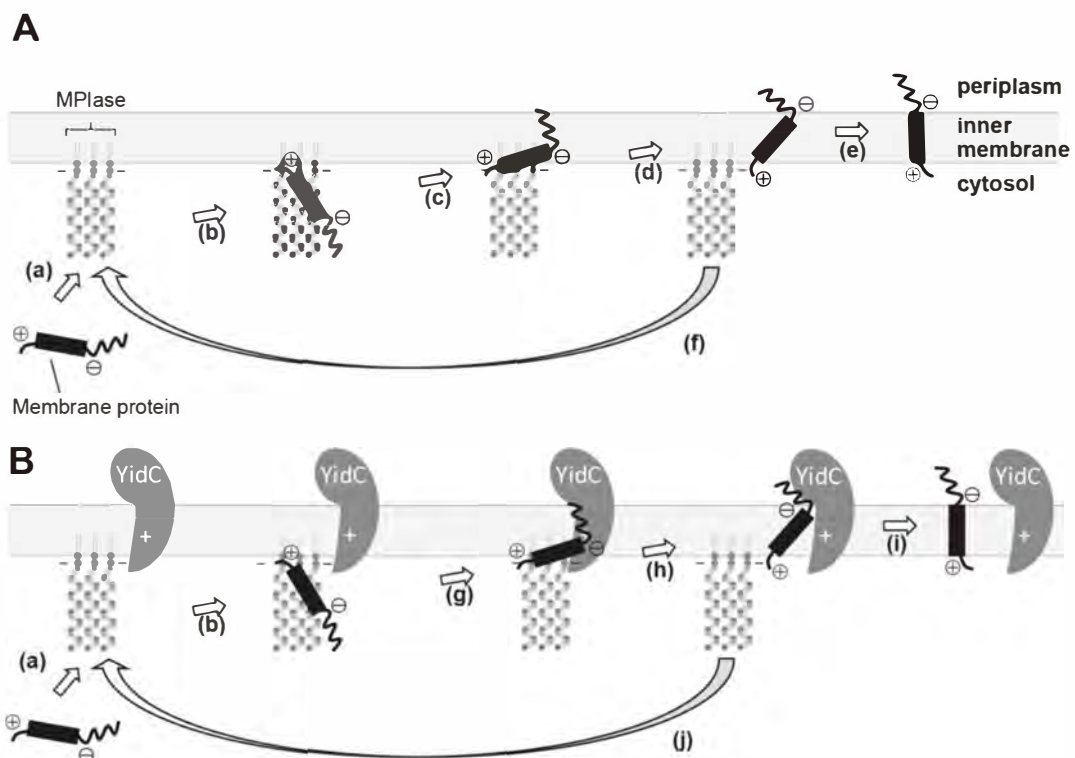


図 16. MPIase に依存する Sec 非依存の基質膜タンパク質の膜挿入モデル。A. YidC 非存在下における MPIase 依存膜挿入の分子機構。B. YidC 存在下における MPIase 依存膜挿入の分子機構。MPIase、YidC と基質膜タンパク質を図に記す。黒色の長方形は基質膜タンパク質の TM 領域を示す。基質膜タンパク質、MPIase (ビスリン酸) と YidC の親水的な溝内部の正電荷 (+) と負電荷 (-) を記している。詳細については本文に記す。

謝辞

本論文は本当に多くの方々の協力のもと執筆することができました。特に、主指導教官である岩手大学 西山賢一教授には、実験の場を提供していただいたとともに、研究の初段階から現在に至るまで、本当に熱心で丁寧なご指導をいただきました。この場をお借りして感謝の気持ちと御礼を申し上げます。

副指導教官をお引き受け下さった岩手大学 伊藤菊一教授、ならびに、弘前大学 姫野俵太教授には大変多くの指導、批評および提案をいただきました。誠にありがとうございました。

奈良先端科学技術大学 塚崎智也教授、東京大学 濡木理教授、熊崎薫博士には Yi dC変異株の提供ならびに研究アドバイスをいただきました。厚く感謝を申し上げます。

早稲田大学 上田卓也教授、ジョーンズホプキンス大学 松林英明博士、海洋研究開発機構 車ゆうてつ博士には PURE system をいただいただけでなく、有意な研究アドバイスをいただきました。ここに感謝の意を表します。

西山研究室の西川華子さんには MPIase 枯渇 INV を、沢里克広 博士および鈴木苑実さんには SecE 枯渇大腸菌および Yi dC 枯渇大腸菌を提供していただきました。Michael Moser 博士、Mari a Huber 博士には研究の基礎を教えてくださいました。技術補佐員の細工藤真理さん、澤口美樹さんには MPIase の精製に協力していただきました。この場をお借りして感謝の気持ちと御礼を申し上げます。

本論文のタンパク質膜挿入活性測定は、岩手大学 RI 総合実験センターで行いました。RI 総合実験センターの職員の皆様に、この場をお借りして御礼を申し上げます。岩手大学連合農学研究科の皆様には事務手続きなどで大変お世話になりました。ありがとうございました。

また、西山研究室の皆様、並びに旧岩手大学寒冷バイオフィロンティアセンターの皆様、岩手大学農学部応用生命化学科の皆様には本当にお世話いただきました。心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1 Blobel, G. & Dobberstein, B. 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* **67**, 835-851 (1975).
- 2 Walter, P., Gilmore, R. & Blobel, G. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* **38**, 5-8 (1984).
- 3 Lührink, J. & Sinning, I. SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 17-35 (2004).
- 4 Janda, C. Y., Li, J., Oubridge, C., Hernandez, H., Robinson, C. V. & Nagai, K. Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle. *Nature* **465**, 507-510 (2010).
- 5 Beck, K., Eisner, G., Trescher, D., Dalbey, R. E., Brunner, J. & Müller, M. YidC, an assembly site for polytopic Escherichia coli membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Rep* **2**, 709-714 (2001).
- 6 Rapoport, T. A., Goder, V., Heinrich, S. U. & Matlack, K. E. Membrane-protein integration and the role of the translocation channel. *Trends Cell Biol* **14**, 568-575 (2004).
- 7 Dalbey, R. E., Wang, P. & Kuhn, A. Assembly of bacterial inner membrane proteins. *Annu Rev Biochem* **80**, 161-187 (2011).
- 8 Nyathi, Y., Wilkinson, B. M. & Pool, M. R. Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 2392-2402 (2013).
- 9 Schatz, G. & Dobberstein, B. Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**, 1519-1526 (1996).
- 10 Rapoport, T. A. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **450**, 663-669 (2007).
- 11 Walter, P. & Blobel, G. Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* **299**, 691-698 (1982).
- 12 Walter, P. & Blobel, G. Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7112-7116 (1980).
- 13 Lutcke, H., High, S., Romisch, K., Ashford, A. J. & Dobberstein, B. The methionine-rich domain of the 54 kDa subunit of signal recognition particle

- is sufficient for the interaction with signal sequences. *EMBO J* **11**, 1543-1551 (1992).
- 14 Tajima, S., Lauffer, L., Rath, V. L. & Walter, P. The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains. *J Cell Biol* **103**, 1167-1178 (1986).
- 15 Luirink, J., ten Hagen-Jongman, C. M., van der Weijden, C. C., Oudega, B., High, S., Dobberstein, B. & Kusters, R. An alternative protein targeting pathway in *Escherichia coli*: studies on the role of FtsY. *EMBO J* **13**, 2289-2296 (1994).
- 16 Phillips, G. J. & Silhavy, T. J. The *E. coli* *ffh* gene is necessary for viability and efficient protein export. *Nature* **359**, 744-746 (1992).
- 17 de Gier, J. W., Mansournia, P., Valent, Q. A., Phillips, G. J., Luirink, J. & von Heijne, G. Assembly of a cytoplasmic membrane protein in *Escherichia coli* is dependent on the signal recognition particle. *FEBS Lett* **399**, 307-309 (1996).
- 18 Urbanus, M. L., Scotti, P. A., Froderberg, L., Saaf, A., de Gier, J. W., Brunner, J., Samuelson, J. C., Dalbey, R. E., Oudega, B. & Luirink, J. Sec-dependent membrane protein insertion: sequential interaction of nascent FtsQ with SecY and YidC. *EMBO Rep* **2**, 524-529 (2001).
- 19 van der Laan, M., Houben, E. N., Nouwen, N., Luirink, J. & Driessen, A. J. Reconstitution of Sec-dependent membrane protein insertion: nascent FtsQ interacts with YidC in a SecYEG-dependent manner. *EMBO Rep* **2**, 519-523 (2001).
- 20 Oliver, D. B. SecA protein: autoregulated ATPase catalysing preprotein insertion and translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. *Mol Microbiol* **7**, 159-165 (1993).
- 21 Geller, B. L. & Wickner, W. M13 procoat inserts into liposomes in the absence of other membrane proteins. *J Biol Chem* **260**, 13281-13285 (1985).
- 22 Rohrer, J. & Kuhn, A. The function of a leader peptide in translocating charged amino acyl residues across a membrane. *Science* **250**, 1418-1421 (1990).
- 23 Kiefer, D. & Kuhn, A. Hydrophobic forces drive spontaneous membrane insertion of the bacteriophage Pf3 coat protein without topological control. *EMBO J* **18**, 6299-6306 (1999).
- 24 Wickner, W. Asymmetric orientation of phage M13 coat protein in *Escherichia coli* cytoplasmic membranes and in synthetic lipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 1159-1163 (1976).
- 25 Kuhn, A. & Wickner, W. Conserved residues of the leader peptide are essential

- for cleavage by leader peptidase. *J Biol Chem* **260**, 15914–15918 (1985).
- 26 Date, T., Zwizinski, C., Ludmerer, S. & Wickner, W. Mechanisms of membrane assembly: effects of energy poisons on the conversion of soluble M13 coliphage procoat to membrane-bound coat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 827–831 (1980).
- 27 de Gier, J. W., Scotti, P. A., Saaf, A., Valent, Q. A., Kuhn, A., Luirink, J. & von Heijne, G. 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* **95**, 14646–14651 (1998).
- 28 Wolfe, P. B., Rice, M. & Wickner, W. Effects of two sec genes on protein assembly into the plasma membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **260**, 1836–1841 (1985).
- 29 van der Laan, M., Bechtluft, P., Kol, S., Nouwen, N. & Driessen, A. J. F1F0 ATP synthase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis. *J Cell Biol* **165**, 213–222 (2004).
- 30 Samuelson, J. C., Chen, M., Jiang, F., Moller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G. J. & Dalbey, R. E. YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* **406**, 637–641 (2000).
- 31 Scotti, P. A., Urbanus, M. L., Brunner, J., de Gier, J. W., von Heijne, G., van der Does, C., Driessen, A. J., Oudega, B. & Luirink, J. YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxalp, is a component of the Sec translocase. *EMBO J* **19**, 542–549 (2000).
- 32 Kuhn, A., Stuart, R., Henry, R. & Dalbey, R. E. The Alb3/Oxal/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol* **13**, 510–516 (2003).
- 33 Chen, M., Samuelson, J. C., Jiang, F., Muller, M., Kuhn, A. & Dalbey, R. E. Direct interaction of YidC with the Sec-independent Pf3 coat protein during its membrane protein insertion. *J Biol Chem* **277**, 7670–7675 (2002).
- 34 van der Laan, M., Urbanus, M. L., Ten Hagen-Jongman, C. M., Nouwen, N., Oudega, B., Harms, N., Driessen, A. J. & Luirink, J. A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5801–5806 (2003).
- 35 Samuelson, J. C., Jiang, F., Yi, L., Chen, M., de Gier, J. W., Kuhn, A. & Dalbey, R. E. 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 (2001).
- 36 Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K., Sugano, Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y., Maturana, A. D., Tanaka, Y., Mori, H., Sugita, Y., Arisaka, F., Ito, K., Ishitani, R., Tsukazaki, T. & Nureki, O. Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature* **509**, 516–520 (2014).
- 37 Kumazaki, K., Kishimoto, T., Furukawa, A., Mori, H., Tanaka, Y., Dohmae, N., Ishitani, R., Tsukazaki, T. & Nureki, O. Crystal structure of Escherichia coli YidC, a membrane protein chaperone and insertase. *Sci Rep* **4**, 7299 (2014).
- 38 Tanaka, Y., Izumioka, A., Abdul Hamid, A., Fujii, A., Haruyama, T., Furukawa, A. & Tsukazaki, T. 2.8-Å crystal structure of Escherichia coli YidC revealing all core regions, including flexible C2 loop. *Biochem Biophys Res Commun* **505**, 141–145 (2018).
- 39 Sugiyama, J. E., Mahmoodian, S. & Jacobson, G. R. Membrane topology analysis of Escherichia coli mannitol permease by using a nested-deletion method to create mtlA-phoA fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9603–9607 (1991).
- 40 Vervoort, E. B., Bultema, J. B., Schuurman-Wolters, G. K., Geertsma, E. R., Broos, J. & Poolman, B. The first cytoplasmic loop of the mannitol permease from Escherichia coli is accessible for sulfhydryl reagents from the periplasmic side of the membrane. *J Mol Biol* **346**, 733–743 (2005).
- 41 Koch, H. G. & Muller, M. Dissecting the translocase and integrase functions of the Escherichia coli SecYEG translocon. *J Cell Biol* **150**, 689–694 (2000).
- 42 Koch, H. G., Hengelage, T., Neumann-Haefelin, C., MacFarlane, J., Hoffschulte, H. K., Schimz, K. L., Mechler, B. & Muller, M. In vitro studies with purified components reveal signal recognition particle (SRP) and SecA/SecB as constituents of two independent protein-targeting pathways of Escherichia coli. *Mol Biol Cell* **10**, 2163–2173 (1999).
- 43 Nishiyama, K., Ikegami, A., Moser, M., Schiltz, E., Tokuda, H. & Muller, M. A derivative of lipid A is involved in signal recognition particle/SecYEG-dependent and -independent membrane integrations. *J Biol Chem* **281**, 35667–35676 (2006).
- 44 Kawashima, Y., Miyazaki, E., Muller, M., Tokuda, H. & Nishiyama, K. Diacylglycerol specifically blocks spontaneous integration of membrane proteins and allows detection of a factor-assisted integration. *J Biol Chem* **283**, 24489–24496 (2008).

- 45 Nishiyama, K., Maeda, M., Abe, M., Kanamori, T., Shimamoto, K., Kusumoto, S., Ueda, T. & Tokuda, H. A novel complete reconstitution system for membrane integration of the simplest membrane protein. *Biochem Biophys Res Commun* **394**, 733–736 (2010).
- 46 Nishiyama, K., Maeda, M., Yanagisawa, K., Nagase, R., Komura, H., Iwashita, T., Yamagaki, T., Kusumoto, S., Tokuda, H. & Shimamoto, K. MPIase is a glycolipozyme essential for membrane protein integration. *Nat Commun* **3**, 1260 (2012).
- 47 Nishikawa, H., Sasaki, M. & Nishiyama, K. I. Membrane insertion of F0 c subunit of FOF1 ATPase depends on glycolipozyme MPIase and is stimulated by YidC. *Biochem Biophys Res Commun* **487**, 477–482 (2017).
- 48 Robinson, P. J. & Woolhead, C. A. Post-translational membrane insertion of an endogenous YidC substrate. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 2781–2788 (2013).
- 49 Serek, J., Bauer-Manz, G., Struhalla, G., van den Berg, L., Kiefer, D., Dalbey, R. & Kuhn, A. Escherichia coli YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO J* **23**, 294–301 (2004).
- 50 Stiegler, N., Dalbey, R. E. & Kuhn, A. M13 procoat protein insertion into YidC and SecYEG proteoliposomes and liposomes. *J Mol Biol* **406**, 362–370 (2011).
- 51 Welte, T., Kudva, R., Kuhn, P., Sturm, L., Braig, D., Muller, M., Warscheid, B., Drepper, F. & Koch, H. G. Promiscuous targeting of polytopic membrane proteins to SecYEG or YidC by the Escherichia coli signal recognition particle. *Mol Biol Cell* **23**, 464–479 (2012).
- 52 Kuhn, H. M., Meier-Dieter, U. & Mayer, H. ECA, the enterobacterial common antigen. *FEMS Microbiol Rev* **4**, 195–222 (1988).
- 53 Basu, S., Kuhn, H. M., Neszmelyi, A., Himmelspach, K. & Mayer, H. Chemical characterization of enterobacterial common antigen isolated from Plesiomonas shigelloides ATCC 14029. *Eur J Biochem* **162**, 75–81 (1987).
- 54 Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Lacadena, J., Martinez del Pozo, A., Gavilanes, J. G. & Rico, M. NMR solution structure of the antifungal protein from Aspergillus giganteus: evidence for cysteine pairing isomerism. *Biochemistry* **34**, 3009–3021 (1995).
- 55 Fujikawa, K., Suzuki, S., Nagase, R., Ikeda, S., Mori, S., Nomura, K., Nishiyama, K. I. & Shimamoto, K. Syntheses and Activities of the Functional Structures of a Glycolipid Essential for Membrane Protein Integration. *ACS Chem Biol* **13**, 2719–2727 (2018).

- 56 Nomura, K., Yamaguchi, T., Mori, S., Fujikawa, K., Nishiyama, K. I., Shimanouchi, T., Tanimoto, Y., Morigaki, K. & Shimamoto, K. Alteration of Membrane Physicochemical Properties by Two Factors for Membrane Protein Integration. *Biophys J* **117**, 99–110 (2019).
- 57 Moser, M., Nagamori, S., Huber, M., Tokuda, H. & Nishiyama, K. Glycolipozyme MPIase is essential for topology inversion of SecE during preprotein translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 9734–9739 (2013).
- 58 Sawasato, K., Sato, R., Nishikawa, H., Iimura, N., Kamemoto, Y., Fujikawa, K., Yamaguchi, T., Kuruma, Y., Tamura, Y., Endo, T., Ueda, T., Shimamoto, K. & Nishiyama, K. I. CdsA is involved in biosynthesis of glycolipid MPIase essential for membrane protein integration in vivo. *Sci Rep* **9**, 1372 (2019).
- 59 Suzuki, H., Nishiyama, K. & Tokuda, H. Coupled structure changes of SecA and SecE revealed by the synthetic lethality of the secAcsR11 and delta secE::kan double mutant. *Mol Microbiol* **29**, 331–341 (1998).
- 60 Nishiyama, K., Suzuki, T. & Tokuda, H. Inversion of the membrane topology of SecE coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell* **85**, 71–81 (1996).
- 61 Sparrow, C. P. & Raetz, C. R. Purification and properties of the membrane-bound CDP-diglyceride synthetase from Escherichia coli. *J Biol Chem* **260**, 12084–12091 (1985).
- 62 Icho, T., Sparrow, C. P. & Raetz, C. R. Molecular cloning and sequencing of the gene for CDP-diglyceride synthetase of Escherichia coli. *J Biol Chem* **260**, 12078–12083 (1985).
- 63 Raetz, C. R. Molecular genetics of membrane phospholipid synthesis. *Annu Rev Genet* **20**, 253–295 (1986).
- 64 Tamura, Y., Harada, Y., Nishikawa, S., Yamano, K., Kamiya, M., Shiota, T., Kuroda, T., Kuge, O., Sesaki, H., Imai, K., Tomii, K. & Endo, T. Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria. *Cell Metab* **17**, 709–718 (2013).
- 65 Casadaban, M. J. Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in Escherichia coli using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**, 541–555 (1976).
- 66 Schatz, P. J., Bieker, K. L., Ottemann, K. M., Silhavy, T. J. & Beckwith, J. One of three transmembrane stretches is sufficient for the functioning of the SecE protein, a membrane component of the E. coli secretion machinery. *EMBO J* **10**, 1749–1757 (1991).

- 67 Alami, M., Trescher, D., Wu, L. F. & Muller, M. Separate analysis of twin-arginine translocation (Tat)-specific membrane binding and translocation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**, 20499-20503 (2002).
- 68 Eisner, G., Koch, H. G., Beck, K., Brunner, J. & Muller, M. Ligand crowding at a nascent signal sequence. *J Cell Biol* **163**, 35-44 (2003).
- 69 Koch, H. G., Moser, M., Schimz, K. L. & Muller, M. The integration of YidC into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* requires the signal recognition particle, SecA and SecYEG. *J Biol Chem* **277**, 5715-5718 (2002).
- 70 Nishiyama, K., Kabuyama, Y., Akimaru, J., Matsuyama, S., Tokuda, H. & Mizushima, S. SecY is an indispensable component of the protein secretory machinery of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1065**, 89-97 (1991).
- 71 Kuruma, Y., Nishiyama, K., Shimizu, Y., Muller, M. & Ueda, T. Development of a minimal cell-free translation system for the synthesis of presecretory and integral membrane proteins. *Biotechnol Prog* **21**, 1243-1251 (2005).
- 72 Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K. & Ueda, T. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol* **19**, 751-755 (2001).
- 73 Tokuda, H., Shiozuka, K. & Mizushima, S. Reconstitution of translocation activity for secretory proteins from solubilized components of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **192**, 583-589 (1990).
- 74 Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- 75 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275 (1951).
- 76 Nishiyama, K., Mizushima, S. & Tokuda, H. The carboxyl-terminal region of SecE interacts with SecY and is functional in the reconstitution of protein translocation activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**, 7170-7176 (1992).
- 77 Zhou, C. & Roberts, M. F. Diacylglycerol partitioning and mixing in detergent micelles: relevance to enzyme kinetics. *Biochim Biophys Acta* **1348**, 273-286 (1997).
- 78 Vonesh, E. F. & Rippe, B. Net fluid absorption under membrane transport models of peritoneal dialysis. *Blood Purif* **10**, 209-226 (1992).
- 79 Kudva, R., Denks, K., Kuhn, P., Vogt, A., Muller, M. & Koch, H. G. Protein translocation across the inner membrane of Gram-negative bacteria: the Sec and Tat dependent protein transport pathways. *Res Microbiol* **164**, 505-534

(2013).