

	ニシガキ ハナコ
氏 名	西川 華子
本籍（国籍）	青森県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研 790 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 23 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 生物資源科学
学位論文題目	糖脂質 MPIase を用いた再構成系によるタンパク質膜挿入・膜透過反応の分子機構の解明（Molecular mechanisms underlying integration and translocation by means of the reconstitution system involving glycolipid MPIase）
学位審査委員	主査 岩手大学教授 西山 賢一 副査 山田 美和(岩手 准教授), 柏木 明子(弘前 准教授), 豊増 知伸(山形 教授)

論文の内容の要旨

タンパク質は生体膜を介した物質輸送やシグナル伝達など、生命活動のプログラムに重要な役割を担っている。生体膜ではイオン等の低分子の出入りすらも厳しく制御されているため、細胞質で合成されたタンパク質を生体膜まで輸送し、膜に組み込む「タンパク質膜挿入システム」や生体膜を越えて分泌タンパク質を輸送する「タンパク質膜透過システム」が必須となる。このようなタンパク質膜挿入・膜透過の分子機構の解明は細胞生物学上の最も重要な課題の一つと位置付けられ、これまで多く研究されている。MPIase (Membrane Protein Integrase) はタンパク質膜挿入・膜透過反応に関与する因子として同定されたが、各反応における機能や、膜挿入・膜透過因子として既知の因子との相互関係などについては不明な部分も多く存在する。本研究では、膜挿入・膜透過因子と MPIase を精製し、生体内の反応を忠実に再現した *in vitro* 再構成を構築することにより、それぞれの反応の分子機構や MPIase の機能を解明することを目的とした。

第 1 章 大腸菌 F_0F_1 -ATPase の c サブユニット (Ec- F_0c) の膜挿入機構の解明

ATP 合成酵素 F_0F_1 -ATPase はほとんど全ての生物が ATP 合成に用いている酵素であり、細胞質側に露出した F_1 触媒ドメインと、膜内在性の F_0 部位の 2 つの回転分子モーターからなる。大腸菌 F_0F_1 -ATPase F_0 部位の c サブユニット (Ec- F_0c) は SecYEG トランスロコン非依存で膜挿入する膜タンパク質である。内膜に存在する膜挿入因子の一つである YidC 欠損株の反転膜小胞 (INV) を調製して Ec- F_0c の膜挿入を観察すると、野生株の INV と比較して膜挿入活性の低下が確認された。このことから、Ec- F_0c は YidC に依存して膜挿入すると考え

られてきた。同様に MPIase 枯渇株の INV でも Ec-F₀c の膜挿入解析を行うと、この場合でも野生株の INV と比較して膜挿入活性は大幅に低下した。これらの結果は、Ec-F₀c の膜挿入反応には MPIase と YidC の両方が関与していることを示している。一方で *in vitro* 再構成系において、膜挿入因子を一切含まないリポソームに対しても Ec-F₀c が自発的に膜挿入するという報告もあるなど、*in vivo* 実験系や INV を用いた解析とは矛盾する結果が多く報告されている。そのため、Ec-F₀c の膜挿入の分子機構は不明のままであった。本研究により、従来の膜挿入解析では Ec-F₀c が膜挿入できた状態なのか、膜挿入できず膜上で高次構造を形成した状態なのかが区別できず、そのためにこれまで多くの矛盾が生じていたことが判明した。膜挿入反応後に界面活性剤で膜を可溶化することにより、この問題点を解決することに成功した。界面活性剤を用いた新たな膜挿入解析により、Ec-F₀c の膜挿入は MPIase に依存したものであり、反応の後期段階で MPIase から Ec-F₀c を受け取った YidC が膜挿入を促進・完了させることを明らかにした。この MPIase と YidC の膜挿入反応における機能的相互作用は、他の SecYEG 非依存型タンパク質の膜挿入機構とも一致する。

第 2 章 *Propionigenium modestum* F₀F₁-ATPase の c サブユニット (Pm-F₀c) の膜挿入および c リング形成の分子機構の解明

膜タンパク質は翻訳に共役して細胞質膜に膜挿入した後、折り畳まれて三次構造を獲得し、時に大きな複合体となってその機能を発揮する。第 1 章では、Ec-F₀c の膜挿入反応には MPIase が必須であり、YidC によって促進されることを明らかにした。YidC は膜挿入だけでなく、膜シャペロンとして膜タンパク質の折り畳みにも関与していることが分かっている。しかし折り畳まれた膜タンパク質群のサブユニットがどのようにして膜内部で会合し複雑な複合体が形成されるのかについてはほとんど知られていない。この章では、Pm-F₀c の膜挿入と、それに続く 11 量体 c リング構造の形成に至る反応の *in vitro* 完全再構成を行った。Ec-F₀c の膜挿入解析の結果と併せると、Pm-F₀c は MPIase に依存して膜挿入した後、YidC とタンパク質性因子 Pm-UncI の作用により三次構造を形成し、その後 c リング構造となることが明らかとなった。YidC は Pm-F₀c の膜挿入を最後まで完了させた後、Pm-UncI との協調的作用により 11 量体のリング構造に変化させることが判明した。

第 3 章 TAT (Twin-Arginine Translocation) 膜透過機構の解析

TAT 膜透過反応は、細胞質で合成された基質タンパク質が高次構造を形成した後に TatABC トランスロコン上で進行する。一般的な膜透過反応とは異なり、この反応により膜透過する基質タンパク質は、細胞質で合成されてすぐに高次構造を形成し、その構造を維持したまま膜透過する。この反応が発見されてから 20 年以上が経過するが、TAT 膜透過反応の試験管内での完全再構成に成功した例は未だ報告されていない。このことは、必須因子である TatA、TatB、TatC 以外にも TAT 膜透過反応に必要な因子が存在し、この因子が TAT 膜透過反応に

において重要な役割を果たしていることを強く示唆している。本研究では、MPIase が TAT 膜透過反応において必須の因子であることを *in vivo/in vitro* 両系から証明し、再構成系に MPIase を組み込むことで初めて TAT 膜透過反応を試験管内に再構成できることを見出した。第 1 章や第 2 章から、MPIase は基質タンパク質の膜挿入に必須であることが示されていることから、TAT 膜透過反応においても基質のシグナル配列の膜挿入を行っている可能性が高い。さらに MPIase は TatABC 複合体の構造を安定化させる役割もあると考えられる。

論文審査の結果の要旨

タンパク質膜挿入・膜透過反応はあらゆる生物に広く保存された機構で進行する。糖脂質 MPIase (Membrane Protein Integrase) はタンパク質膜挿入・膜透過反応に関与する因子である。本研究では、膜挿入・膜透過に関与する因子や MPIase を精製し、生体内の反応を忠実に再現した *in vitro* 再構成を構築することにより、それぞれの反応の分子機構や MPIase の機能を解明することを目的とした。

第 1 章では、大腸菌 F_0F_1 -ATPase の c サブユニット (Ec- F_0c) の膜挿入反応の解析を行った。本研究により、Ec- F_0c の膜挿入は MPIase に依存し、反応の後期段階で MPIase から Ec- F_0c を受け取った YidC が膜挿入を促進・完了させることが判明した。この MPIase と YidC の膜挿入反応における機能的相互作用は、他の SecYEG 非依存型タンパク質や、SecYEG 依存型タンパク質の膜挿入機構にも適用できることが明らかとなった。

第 2 章では、*Propionigenium modestum* F_0F_1 -ATPase の c サブユニット (Pm- F_0c) を用い、タンパク質の膜挿入だけではなく、その後機能を発現するための三次構造形成や複合体形成に至る一連の反応の *in vitro* 完全再構成系を構築した。第 1 章における Ec- F_0c の膜挿入解析の結果を踏まえると、Pm- F_0c は MPIase に依存して膜挿入した後、YidC と Pm-UncI の作用により三次構造を形成し、その後 11 量体 c リング構造となることが明らかとなった。YidC は、基質の膜挿入において MPIase と、複合体形成の過程では Pm-UncI との協調的作用により反応を進めていることを示した。

第 3 章では、TAT (Twin-Arginine Translocation) 膜透過機構の解析を行った。一般的な膜透過反応とは異なり、この反応では基質タンパク質が細胞質で合成後すぐに高次構造を形成し、その構造を維持したまま膜透過する。TAT 膜透過反応と MPIase との関連性はこれまで検証されてこなかったが、本研究では MPIase が TAT 膜透過反応において必須の因子であることを *in vivo/in vitro* 両系を用いて証明した。精製した膜透過因子のみで構築した再構成系ではこれまで TAT 膜透過活性は検出されていなかったが、再構成系に MPIase を組み込むことで初めて TAT 膜透過反応を試験管内で再現できることを見出した。第 1 章や第 2 章で、MPIase は基質タンパク質の膜挿入に必須であることが示されていることから、TAT 膜透過反応においても基質のシグナル配列の膜挿入を行っている可能性が高い。さらに MPIase は TatABC 複合体の構造を安定化させる役割もあると考えられる。

本論文では、膜輸送因子としては前例のない糖脂質である MPIase がタンパク質膜挿入・膜透過機構において幅広く関与することを明らかにした。MPIase は真核生物にも存在する可能性も示唆され、MPIase ホモログを用いたより幅広い応用研究が期待される。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

1. Nishikawa H., Sasaki M., Nishiyama K (2017)
Membrane insertion of F_0c subunit of F_0F_1 ATPase
depends on glycolipozyme MPIase and is stimulated by YidC
Biochem. Biophys. Res. Commun., 487: 477-482
2. Nishikawa H., Sasaki M., Nishiyama K. (2020)
In vitro assay for bacterial membrane protein
integration into proteoliposomes
Bio-protoc., 10: e3626
3. Nishikawa H., Kanno K., Endo Y., Nishiyama K.
Ring assembly of c subunits of F_0F_1 -ATP synthase in
Propionigenium modestum requires YidC and UncI following
MPIase-dependent membrane insertion
FEBS Lett., 595: *in press*. (掲載証明付)

参考論文

1. Sawasato K., Sato R., Nishikawa H., Iimura N., Kamemoto Y.,
Fujikawa K., Yamaguchi T., Kuruma Y., Tamura Y., Endo T.,
Ueda T., Shimamoto K., Nishiyama K. (2019)
CdsA is involved in biosynthesis of glycolipid MPIase
essential for membrane protein integration *in vivo*
Sci. Rep., 9: no. 1372
2. Sasaki M., Nishikawa H., Nishiyama K. (2019)
The bacterial protein YidC accelerates MPIase-dependent
integration of membrane proteins
J. Biol. Chem., 294: 18898-18908
3. Kamemoto Y., Funaba N., Kawakami M., Sawasato K.,
Kanno K., Suzuki S., Nishikawa H., Sato R., Nishiyama K. (2020)
Biosynthesis of glycolipid MPIase (membrane protein
integrator) is independent of the genes for ECA
(enterobacterial common antigen)
J. Gen. Appl. Microbiol., 66: 169-174