

博士論文

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

岩手大学大学院連合農学研究科

生物資源科学専攻 生物分子機能学連合講座

西川華子

目次

序論

- (1) シグナル仮説とタンパク質膜挿入・膜透過因子の普遍性 p.4
- (2) タンパク質の膜挿入経路 p.5
- (3) タンパク質の自発的膜挿入と YidC p.6
- (4) ジアシルグリセロール (DAG) による自発的膜挿入の抑制 p.7
- (5) 「糖脂質酵素」 MPIase p.7
- (6) 膜挿入反応における MPIase と YidC の関係 p.10
- (7) SecYEG 依存性タンパク質膜輸送 p.11
- (8) TatABC 依存性タンパク質膜輸送 p.12

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

- 1-1. 序論 p.19
- 1-2. 材料と方法 p.22
- 1-3. 結果
 - (1) 自発的膜挿入を抑制する DAG を含むリポソームを用いた
Ec- F_0c の膜挿入解析 p.26
 - (2) Ec- F_0c の発現量を変化させると、膜挿入因子に対する依存性が
変化する p.28
 - (3) DAG 存在下では、Ec- F_0c はプロテアーゼ耐性構造に変化する p.33
 - (4) 酸性リン脂質 PG と CL は、Ec- F_0c のプロテアーゼ耐性構造を
誘発する p.36

(5) Ec-F ₀ c の膜挿入は MPIase に依存し、YidC により促進される	p.38
1-4. 考察	p.41

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

2-1. 序論	p.45
2-2. 材料と方法	p.47
2-3. 結果	
(1) プロテアーゼ・プロテクションアッセイによる Pm-F ₀ c の膜挿入の解析	p.50
(2) Pm-F ₀ c の c リング形成には Pm-UncI および一定量の Pm-F ₀ c が必要である	p.52
(3) Pm-F ₀ c の c リング形成には Pm-UncI だけではなく YidC も必要となる	p.54
(4) Pm-F ₀ c の膜挿入には MPIase が必須であり、YidC/Pm-UncI により c リングが形成される	p.56
2-4. 考察	p.58

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

3-1. 序論	p.62
3-2. 材料と方法	p.64
3-3. 結果	
(1) MPIase は TAT 膜透過反応に関与する : <i>in vivo</i> 実験系における検証	p.74
(2) MPIase は TAT 膜透過反応に関与する : <i>in vitro</i> 実験系における検証	p.82

(3) TAT 膜透過反応の試験管内再構成系の構築	p.87
3-4. 考察	p.94
総合考察	p.98
参考文献	p.101
謝辞	p.109

序論

(1) シグナル仮説とタンパク質膜挿入・膜透過因子の普遍性

生物を構成する基本単位である細胞は、生体膜に包まれている。細胞質と外界とを隔てる生体膜は約 10 nm の厚みをもち、主にリン脂質による脂質二重層とタンパク質からなる。タンパク質は膜横断的な物質輸送やシグナル伝達、代謝反応など生命活動のプログラムに重要な役割を担っている。脂質二重層に埋め込まれるように局在している膜タンパク質や、真核細胞の細胞小器官に局在するタンパク質、さらに細胞外など生体膜を越えて局在する分泌タンパク質は細胞質で合成された後に、それぞれ機能する場所へと局在する必要がある。また、タンパク質が機能を発現するためには自身が機能するべき場所に正しく輸送された後、折り畳まれて三次構造を獲得し、時に別のタンパク質と相互作用してより大きな複合体となる必要もある。生体膜ではイオン等の低分子の出入りすらも厳密に制御されているため、膜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。こうしたタンパク質膜挿入・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きた。

タンパク質膜挿入に関する研究に先立ち、分泌タンパク質の膜透過に関する研究が多く進められた。分泌タンパク質が細胞外のあるべき場所に局在するためには、新たに合成されたタンパク質が分泌タンパク質かそうでないかを細胞が判別する必要がある。1975 年、分泌タンパク質の輸送を説明する「シグナル仮説」が Blobel らによって提唱された¹。この仮説は、分泌タンパク質は N 末端に 20~40 アミノ酸からなる延長配列（シグナル配列）が付加された前駆体タンパク質として合成され、この配列が前駆体タンパク質の目的地への輸送の荷札となるというものである。分泌タンパク質の合成が開始され、シグナル配列がリボソームから露出すると、シグナル配列の疎水性領域が RNA-タンパク質複合体 SRP（Signal Recognition Particle）に認識され、膜上の SRP 受容体（SR）を介して小胞体膜

上へと導かれる²⁻⁴。その後、膜透過チャンネル Sec トランスロコン上で翻訳と共役して膜透過が進行し、膜上に存在するシグナルペプチダーゼによってシグナル配列が切断されて成熟体となる⁵。SRP や SR、Sec トランスロコン（原核生物では SecYEG、真核生物では Sec61 複合体）は真核生物・原核生物問わずすべての生物に存在している^{6,7}。さらにタンパク質の膜挿入についても、SRP/SR が合成途中の膜タンパク質の新生鎖を認識して膜に導き、膜透過チャンネルにおいて膜挿入が進行することが判明している⁸。膜挿入反応においては、タンパク質性因子 YidC も関与している⁹。大腸菌の生育に必須である YidC も細菌から高等生物に至るまで広い範囲で保存されており、バクテリア由来のオルガネラと考えられているミトコンドリアや葉緑体の Oxa1 や Alb3 は、それぞれ YidC のホモログである¹⁰。これらのことから、タンパク質の膜透過・膜挿入反応があらゆる生物に保存されている重要な機構であることがわかる。

(2) タンパク質の膜挿入経路

グラム陰性細菌の大腸菌はモデル生物として様々な研究に用いられてきており、タンパク質の膜挿入機構の研究においても古くから用いられてきた。大腸菌の細胞表層には内膜と外膜の二つの生体膜があり、内膜と外膜の間には親水的なペリプラズム領域が存在する。細胞質で合成された膜タンパク質の内膜への輸送には SRP/SR が関与する⁶。膜タンパク質は疎水性の高い膜貫通領域をもっており、合成されてすぐにこの部分と SRP が相互作用できないと細胞質内で凝集してしまう。この凝集を防ぐため、膜タンパク質は翻訳と共役して膜挿入する¹¹。SRP と結合した合成途中の膜タンパク質新生鎖は SR を介して内膜上に輸送される。その後、膜タンパク質の新生鎖は SecYEG トランスロコン上で膜挿入反応が進行する（Sec 依存膜挿入経路：図 I-1 A）^{5,11,12}。またペリプラズム側に親水性領域をもつ膜タンパク質の場合は、親水性領域の膜透過に ATPase 活性を持つモータータンパク質 SecA が必要となる（SecYEG/SecA 依存膜挿入経路：図 I-1 B）^{13,14}。一方で分子量の

小さい膜タンパク質や膜貫通領域を C 末端のみにもつ膜タンパク質の場合は、SRP と膜貫通領域とが相互作用する前に合成が終了してしまう。そのため、このような膜タンパク質の膜挿入は SRP/SR や SecYEG には依存しない (Sec 非依存膜挿入経路：図 I-1 C)。Sec 非依存経路で膜挿入する膜タンパク質は他の因子を必要とせず、自発的に膜挿入すると考えられてきた¹⁵⁻¹⁷。

(3) タンパク質の自発的膜挿入と YidC

大腸菌における Sec 非依存の膜挿入反応は、C 末端のみに膜貫通領域をもつ Pf3 ファージのコートタンパク質である Pf3 coat や、M13 ファージの主要コートタンパク質の前駆体である M13 procoat を用いて解析が行われた。Pf3 coat や M13 procoat は大腸菌のリン脂質のみで調製したリポソームに膜挿入することから、膜貫通領域とリン脂質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¹⁵⁻¹⁷。しかし YidC を枯渇させた株で、Pf3 coat や M13 procoat の膜挿入反応が阻害されたことから、Sec 非依存経路において YidC が膜挿入反応を触媒している可能性が示唆された (図 I-1 C)⁹。ファージ由来の膜タンパク質だけでなく、F₀F₁-ATPase の c サブユニット (F₀c) や、シトクロームオキシダーゼのサブユニットの 1 つである CyoA などの膜タンパク質も YidC により膜挿入することが明らかとなった。YidC のミトコンドリアホモログである Oxa1 も、F₀F₁-ATPase やシトクローム c オキシダーゼの複数のサブユニットの膜挿入に必要である¹⁸。さらにリポソームに YidC を組み込むことで Pf3 coat や M13 procoat の膜挿入反応が進行するという結果も確認され、YidC は Sec 非依存の膜挿入反応を触媒する酵素 “insertase” であると提唱された¹⁹。また YidC は、Sec 依存で膜挿入するタンパク質を膜内で適切にフォールディングさせる分子シャペロンとしても機能する (図 I-1 A,B)²⁰⁻²²。一方で、YidC 欠損株においても膜挿入が進行する膜タンパク質も報告されており¹⁹、Sec 非依存経路における膜挿入の分子機構については不明な点が多く残っていた。

(4) ジアシルグリセロール (DAG) による自発的膜挿入の抑制

タンパク質膜挿入反応を試験管内で再構築する *in vitro* 再構成実験は、膜挿入反応の分子機構を詳細に解析する有効な手段として用いられてきた。SecYEG および SRP/SR に依存して膜挿入するマンニトールパーミアーゼ (MtlA) は、SecYEG を含まないリポソームに自発的に膜挿入することが確認された²³。細胞内ではこのような無秩序な自発的膜挿入は起こりえないため、膜タンパク質が本来どの因子に依存して膜挿入するのかを調べるためには、自発的膜挿入を排除した条件で解析を進める必要がある。生体膜には、自発的膜挿入反応を抑制する仕組みが備わっていると考えられ、自発的膜挿入の抑制に関わる因子の検索が進められた。その結果、生体膜の構成成分の一つである DAG を生理的濃度 (リン脂質の重量比~5%程度) で加えると MtlA の自発的膜挿入が完全に抑制されることが判明した^{23,24}。さらに、Sec 非依存的に膜挿入する Pf3 coat や M13 procoat のみならず、膜挿入に膜電位を必要とせず YidC にも依存しない Pf3 coat の変異体 3L-Pf3 coat (Pf3 coat の膜貫通部位にロイシン残基が3つ挿入されたタンパク質) の自発的膜挿入も DAG により完全に抑制された²⁴。最近の研究では、DAG はリン脂質間の隙間に入り込むことで、脂質二重層のパッキングを密にし、膜脂質が横方向に拡散するのが抑えられることも判明している²⁵。こうした DAG の特性により膜タンパク質の自発的膜挿入が阻止されていると考えられる。DAG の発見により、自発的膜挿入を完全に抑制した、細胞内により近い条件下でタンパク質の膜挿入反応が解析できるようになった。

(5) 「糖脂質酵素」 MPlase

(5-1) MPlase の発見と機能

DAG により自発的膜挿入を完全に抑制した条件下では、MtlA だけでなく M13 procoat も膜挿入しなかったため、従来自発的に膜挿入すると考えられてきたタンパク質も膜挿入因子に依存して膜挿入することが強く示唆された²⁴。SecYEG や YidC 等の既知の因子を

再構成したプロテオリポソームでも膜挿入活性は検出されなかったため、新たな膜挿入因子が存在することが明らかとなった²³。この因子の探索が進められ、SDS-PAGE 上で分子量約 7 kDa の因子が同定された。この因子と DAG をリポソームに組み込んで行った *in vitro* 再構成実験では、Sec 依存で膜挿入する MtlA だけではなく、Sec 非依存性の M13 procat の膜挿入も観察された。これらのことから、この因子は Sec 依存性/非依存性に関わらずタンパク質の膜挿入全般に必須の因子であることが示された²³。膜挿入反応液中の基質タンパク質量を増加させた条件下では、膜挿入した基質タンパク質量は因子量よりも多かったため、この膜挿入因子は複数回の膜挿入サイクルを進行させ得ることが示された²⁶。すなわちこの因子は酵素様の作用によりタンパク質膜挿入反応を触媒すると言える。そのため、この因子は MPIase (Membrane Protein Integrase) と名付けられた^{23,26,27}。

(5-2) MPIase の構造と機能解析

MPIase をプロテアーゼ消化すると膜挿入活性を喪失したことから、当初 MPIase はタンパク質性であると予想された。構造解析の結果、予想に反して MPIase が複合糖脂質であることが判明した²⁷。さらに、NMR 分析、MS 分析、部分化学合成標品を用いた解析から、MPIase は 4-acetamido-4-deoxyfucose (Fuc4NAc)、2-acetamido-2-deoxymannuronic acid (ManNAcA)、N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) からなる三糖ユニットが約 10 回繰り返された糖鎖がピロリン酸を介して DAG に結合する構造 (図 I-2) をとることが示された。MPIase をピロリン酸の中央で切断し、可溶性の糖鎖の状態にした MPIase 誘導体 (PP-MPIase) を用いたゲル濾過解析から、MPIase はオリゴマーを形成していることが明らかになった。MPIase の構造はグラム陰性細菌の外膜構成因子 ECA (Enterobacterial Common Antigen)²⁸ に類似している²⁷。MPIase の三糖ユニットが 9~11 回の繰り返しであるのに対し、ECA の三糖ユニットは 18~55 と非常に長く不均一である²⁷。また MPIase の糖鎖はピロリン酸を介して DAG に結合しているのに対し、ECA の糖鎖はモノ

リン酸を介して DAG に結合している。ECA には膜挿入活性が無かったことから、MPIase の糖鎖の長さが活性に重要である²⁷。膜挿入反応における MPIase の機能と構造との関係を解明するため、MPIase 誘導体や化学合成した mini-MPIase (三糖ユニットを一つだけ有する) を用いて構造活性相関が調べられている。MPIase の三糖ユニットを構成する糖はすべて *N*-アセチル基を有している上、GlcNAc の約 30% の 6-OH はアセチル化されており、MPIase 上には多量のアセチル基が存在する。MPIase のアセチル基が基質タンパク質の疎水的領域と相互作用して、基質タンパク質が可溶化される^{27,29}。すなわち、MPIase の糖鎖には基質タンパク質の凝集を防ぐ分子シャペロン様の作用がある。*O*-アセチル基を除去すると、MPIase は失活するため、この残基は MPIase の機能に必須である²⁹。さらに、プロテアーゼ消化で *N*-アセチル基が切断された可能性が高く、この残基も機能に必須であると考えられる。一方、糖鎖長が短くなると膜挿入活性の低下が観察され、ある程度の糖鎖の長さが基質タンパク質の凝集防止に必須であることが示された²⁹。これらの解析の結果、Sec 非依存経路において MPIase が膜挿入反応を触媒する機構のモデル予想図が提唱された (図 I-3)。膜上で MPIase はオリゴマーを形成し、その糖鎖部分により基質膜タンパク質と直接相互作用して基質を可溶化して膜挿入可能な構造を維持する。この MPIase-基質タンパク質の構造変化により基質タンパク質を脂質二重層の中に挿入させる。その後タンパク質の膜挿入が完了するが、このときに YidC が関与しているかもしれない。膜挿入後に基質から解離した MPIase は次の基質の膜挿入反応に取りかかる。このように、MPIase は糖脂質でありながらタンパク質の膜挿入反応を触媒する酵素様の性質を示すことから「糖脂質酵素 (glycolipozyme)」という概念が提唱されている²⁷。

(5-3) MPIase の生合成遺伝子の同定

抗 MPIase 抗体を用いたイムノブロットイングにより MPIase の細胞内局在を調べたところ、MPIase は内膜に局在することが示された。ECA 欠損株の内膜画分でも MPIase が

検出されたことから、MPIase の生合成経路は ECA とは異なるものと想定された²⁷。実際、ECA 生合成に関与する因子群のどれを欠損させても MPIase 発現量に影響はなく、MPIase が ECA とは独立した経路で生合成されることが示された³⁰。MPIase 生合成酵素の探索の結果、MPIase 生合成の第一段階を触媒する酵素として CdsA およびそのホモログ YnbB が同定されている³¹。CdsA はリン脂質生合成中間体である CDP-DAG の生合成酵素として知られており菌の生育に必須である³²。CdsA 過剰発現株では MPIase 発現量の増加が観察されたことに加え、CdsA 枯渇株では MPIase 量の大幅な減少が観察された。このことから、CdsA が MPIase 生合成反応における律速段階であることが明らかとなった³¹。CdsA/YnbB 枯渇株を用いた *in vivo* 解析では M13 procoat の膜挿入が完全に阻害されることが観察されたことから、MPIase は *in vivo* においてもタンパク質膜挿入反応に必須の因子であることが証明された³¹。

(6) 膜挿入反応における MPIase と YidC の関係

YidC は Sec 非依存性のタンパク質膜挿入を触媒する “insertase” であると考えられていた^{9,33}。しかし自発的膜挿入を抑制した *in vitro* 再構成系では、YidC に依存して膜挿入するとされてきた M13 procoat や Pf3 coat は YidC 単独では膜挿入せず、MPIase が必須であった²⁶。これらのことから Sec 非依存性膜挿入経路では、YidC ではなく MPIase が膜挿入酵素として働いている可能性が示唆された。しかしこのような Sec 非依存性膜挿入反応の解析では報告により異なる結果が多く示されており、MPIase と YidC との関係やそれぞれの機能等についての統一的な理解には至っていなかった。例として、第 1 章で基質として用いている大腸菌 F₀C (Ec-F₀C) は Sec 非依存性であり、YidC に依存して膜挿入すると考えられてきた^{34,35}。その報告をもとに YidC 欠損株から調製した大腸菌内膜の反転膜小胞 (INV)を用いた解析では、野生株の INV と比較して Ec-F₀C の膜挿入活性の低下が観察された³⁵。同様に MPIase 枯渇株の INV でも解析を行うと、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。第 1 章では、*in vitro* 再構成系を用いて Sec 非依存性膜挿入反応におけるこのような矛盾点を解決し、MPIase および YidC それぞれの機能や両因子の機能的相互作用についての検証を行った。また第 2 章では、膜挿入反応からその後の高次構造形成にかけてまでの過程における YidC の関与についての解析を行った。

(7) SecYEG 依存性タンパク質膜透過

MPIase は Sec 依存性の分泌タンパク質 pOmpA の膜透過も促進することが判明している²³。大腸菌のペリプラズム領域や外膜で働く分泌タンパク質の多くは、細胞質で合成後に内膜上の SecYEG トランスロコンを介して膜透過する。SecYEG 上での膜透過反応は ATPase 活性をもつ SecA の ATP 加水分解エネルギーより駆動される (図 I-B)⁵。生化学的な解析により、SecA は以下に示す作用機序により膜透過反応を駆動すると考えられている。SecA は SecYEG 上で基質タンパク質と結合すると構造変化を起こし、基質タンパク質と共に SecYEG 内部に深く挿入する。その後、ATP 加水分解により構造が変化し、基質タンパク質を内部に残したまま SecA だけが離脱する。この繰り返しにより、膜透過反応を駆動すると考えられている^{36,37}。また SecYEG の構成因子 SecG は膜透過反応に伴い膜内配向性が反転するという性質をもつことが明らかになっており、この反転により SecA サイクルが円滑に作動し、その結果膜透過活性が促進され则认为られている³⁶。*in vitro* 実験系により、膜透過反応における MPIase の機能が解析された結果、SecYEG のみを含むリポソームと比較して、MPIase 存在下では膜透過効率が約 10 倍上昇することが判明している³⁸。これらのことから、MPIase がタンパク質の膜透過にも関与しており、SecYEG と何らかの接点を持つことが予想された。さらに解析が進められ、SecG の反転は MPIase が存在している場合でのみ起きることが解明されている³⁸。このことから MPIase による

膜透過反応の促進の理由は、MPIase が SecYEG と相互作用すると SecG の反転が可能になるためであることが示された。実際に MPIase 存在下では、SecYEG の 2 量体は SecE を接触面とした “back-to-back” 構造ではなく、SecG を接触面近傍に配置した “side-by-side” 構造を取ることも分かっており (図 I-4 右図)³⁸、MPIase が SecYEG の構造変化に影響を及ぼし、膜透過反応を促進させることが証明されている。

(8) TatABC 依存性タンパク質膜透過

1998 年、Long-Fei-Wu らにより SecYEG トランスロコンに依存しない膜透過反応が報告された³⁹。その後の遺伝学的な解析により、この膜透過反応は TatA、TatB、TatC から構成される TatABC トランスロコン上で進行することが明らかとなった³⁹。この機構で膜透過が進行する基質タンパク質は、Sec 依存の膜透過と同様に N 末端にシグナル配列を有する前駆体として合成される。TAT 経路におけるシグナル配列は Sec 経路のものと比べて、長く、疎水度が低い⁴⁰⁻⁴²。また、シグナル配列の N 末端側には、TAT 経路のシグナル配列に特徴的なコンセンサス配列である “S-R-R-x-F-L-K” が保存されている⁴¹。コンセンサス配列内の連続したアルギニン残基 (RR 残基) をリジン残基に置換すると膜透過反応は全く進行しなくなる^{43,44}。このように、シグナル配列に特徴的な連続したアルギニン残基をもつことからこの膜透過経路は TAT (Twin-Arginine Translocation) 膜透過と命名されている。TAT 膜透過反応はプロトン駆動力をエネルギー源として進行する⁴⁵。また、TAT 膜透過反応では Sec 膜透過反応とは異なり、分泌タンパク質前駆体が細胞質内で合成後、折り畳まれ、その構造を維持したまま膜透過する³⁹。その後膜上のシグナルペプチダーゼによりシグナル配列が切断され、成熟体タンパク質となり、ペリプラズム空間へと放出される。TAT 経路によって膜透過される基質タンパク質の多くは、活性の発現に必要な補酵素と細胞質内で結合した後³⁹、あるいは、複合体を形成した後⁴⁶に膜透過される。TAT 基質の中には一部補酵素との結合を必要としないものや単量体で機能を発揮するタン

パク質もあるが、その多くは合成後の折りたたみの速度が早いものが多い^{47,48}。また、膜透過完了後は、Sec 基質と同様にシグナルペプチダーゼによりシグナル配列が切断され、成熟体タンパク質となってその機能を発揮する。このような詳細な反応機構や必須因子の機能解析がなされているにもかかわらず、TAT 膜透過反応の試験管内再構成が成功したという報告は未だにない。このことは TAT 膜透過反応におけるさらなる必須因子の存在を示唆している。本論文第 3 章では、TAT 膜透過反応の再構成系の構築を目的とし、糖脂質 MPIase の TAT 膜透過反応への関与についての検証を行った。

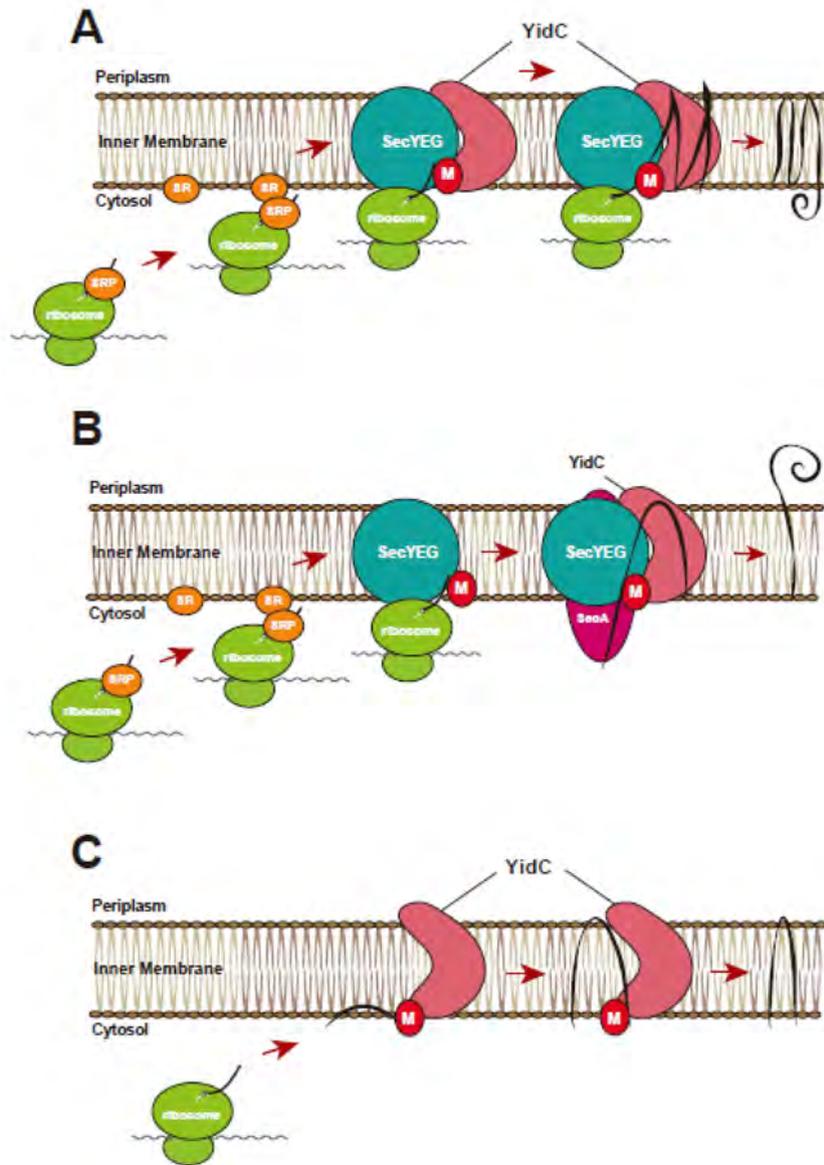


図 I-1 タンパク質の膜挿入経路。

(A) Sec 依存膜挿入経路。(B) SecYEG/SecA 依存膜挿入経路。(C) Sec 非依存膜挿入経路。黒い線は基質タンパク質を表す。

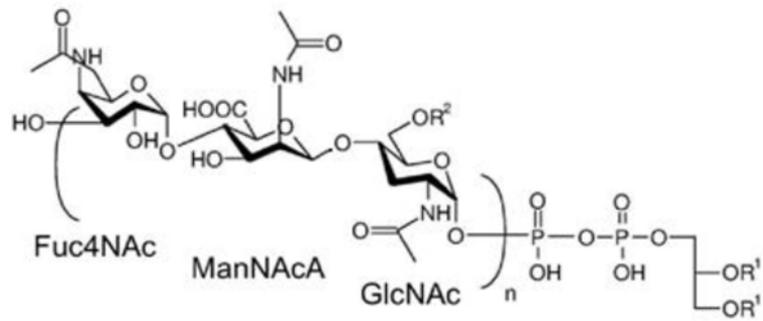


図 I-2 MPlase の構造。

n は 9~11 の整数。 R^1 は C_{16} あるいは C_{18} の脂肪酸を表す。 R^2 は水素原子またはアセチル基を表す。“Fuc4NAc” は 4-アセトアミド 4 デオキシフコース、“ManNAcA” は *N*-アセチルマンノサミンウロン酸、“GlcNAc” は *N*-アセチルグルコサミンを示す。

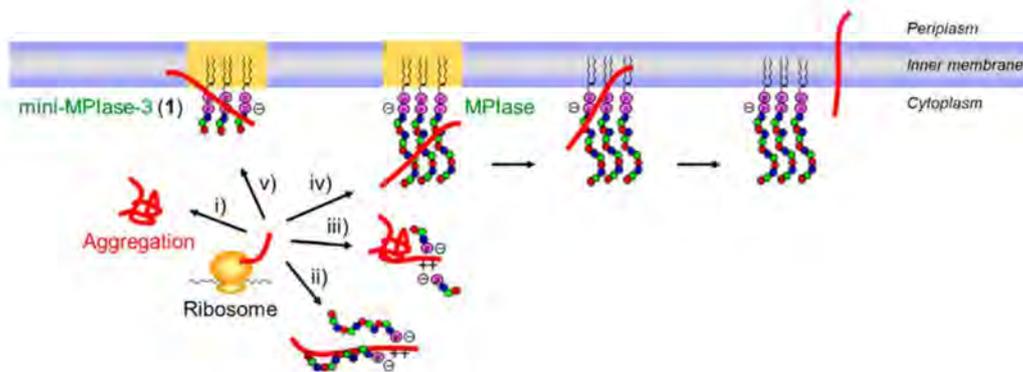


図 I-3 Sec 非依存型膜挿入反応における MPIase の作用モデル。

基質タンパク質は、膜上で複合体を形成した MPIase の糖鎖部分と相互作用して膜挿入される。MPIase 非存在下では基質タンパク質は凝集するため (i)、MPIase は基質タンパク質の凝集を防ぐ分子シャペロン様の性質を示す (ii)。MPIase のこの性質は、糖鎖部分が短い場合 (mini-MPIase-3) では十分に発揮されない (iii)。

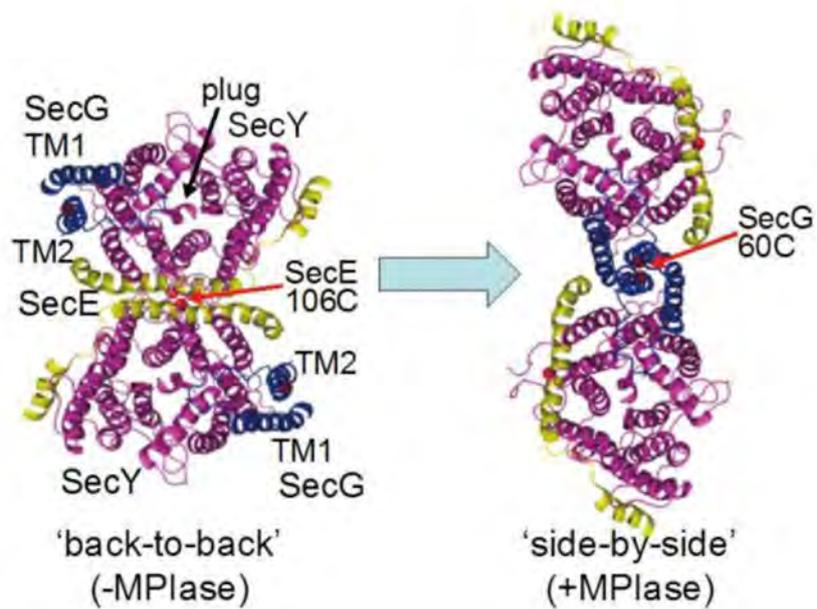


図 1-4 MPIase により、SecYEG 2 量体の構造は変化する。

(左図) MPIase 非存在下においては、SecYEG 2 量体は SecE を接触面とした “back-to-back” 構造を形成する。(右図) MPIase 存在下では、SecG を接触面近傍に配置した “side-by-side” 構造に変化する。

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

1-1. 序論

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、生体膜の内側と外側のプロトン濃度勾配と膜電位から成るプロトン駆動力を用いて ADP とリン酸から ATP を合成する。 F_0F_1 -ATPase は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 (図 1-1)。バクテリアの F_1 部位は 5 種類のサブユニット (α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ)、 F_0 部位は 3 種類のサブユニット (a、b、c) からなる。大腸菌 F_0 部位には、 F_0a や F_0b が 1~2 個であるのに対し F_0c は 9~12 個存在し、リング構造を形成する⁴⁹。プロトン駆動力をエネルギーとした F_0 部位の回転に連動して F_1 部位が回転することで ATP が合成される^{49,50}。 F_0 部位は膜内在性であるため、 F_1 部位と比較して研究があまり進んでいない。

大腸菌 F_0c (Ec- F_0c) は、図 1-2 のような N 末端側と C 末端側がペリプラズム側に露出した二回膜貫通型の構造を取る⁵¹。Ec- F_0c は約 10 kDa の小さいタンパク質であり、Sec 非依存経路で膜挿入する^{34,35}。YidC 欠損株から調製した反転膜小胞 (Δ YidC INV) に対して Ec- F_0c は膜挿入しないことから、Ec- F_0c の膜挿入は YidC に依存すると考えられてきた³⁵。しかしながら、膜挿入因子を一切含まないリポソームに対しても Ec- F_0c が自発的に膜挿入するという報告⁵²や、この自発的膜挿入は DAG では抑制されないという報告⁵²もある。このように、Ec- F_0c の膜挿入の再構成実験では *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- F_0c の膜挿入の分子機構は不明のままであった。本研究では、生体内での膜挿入反応を忠実に再現した *in vitro* 再構成系を構築し、この系を用いて Ec- F_0c の膜挿入機構を詳細に解明することを目的とした。

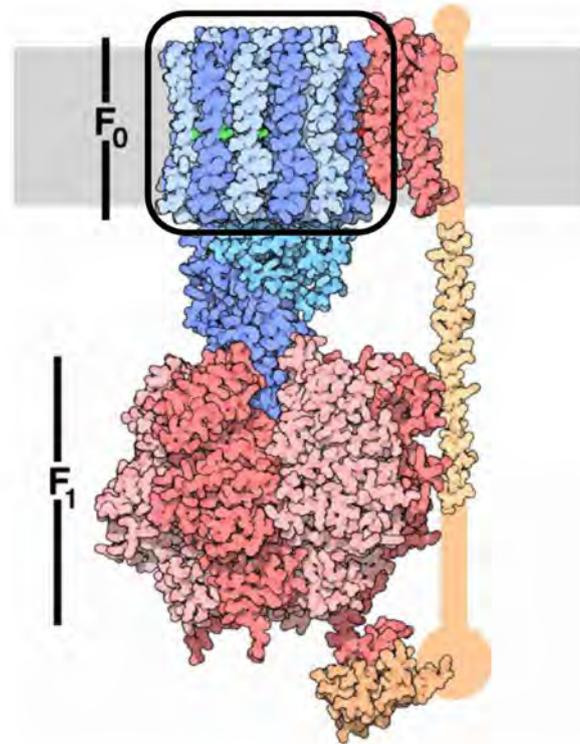


図 1-1 ATP 合成酵素 F₀F₁-ATPase の構図。

F₀ 部位は膜挿入されており、F₁ 部位は細胞質側に露出している。黒い線で囲んだ部分が、F_{0c} の 9~12 量体が形成するリング構造である。PDB “Molecule of the Month” より抜粋・改変した。

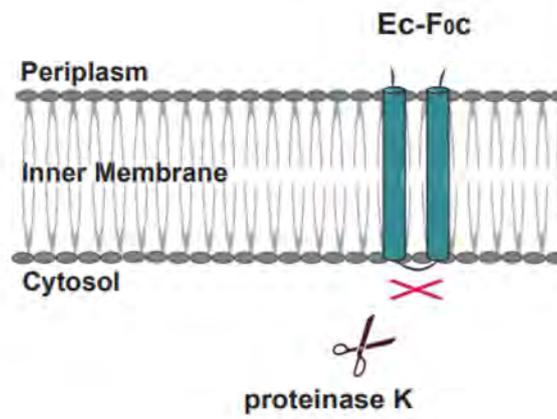


図 1-2 Ec-F_{0c} 単量体の構造。

N 末端と C 末端はペリプラズム側に露出している。Ec-F_{0c} の膜貫通領域間がほとんど膜に埋もれており、プロテイナーゼ K (PK) による消化を受けない。

1-2. 材料と方法

① 材料

INV (大腸菌内膜の反転膜小胞) は野生株大腸菌 MC4100 株⁵³、YidC 欠損株 JS7131 株⁹、MPIase 枯濁株 KS23/pAra-CdsA 株³¹ から報告されている方法^{24,54} に倣って調製した。Ec-F₀C の *in vitro* 合成用のプラスミドは、T7 プロモーター支配下に *uncE* 遺伝子を繋げて発現プラスミドを作製した。オリゴヌクレオチド (5' - AAATTTAAACATATGGAAAACCTGAATATGGATC-3' および 5' - TTAATTCCCGGGTTACGCGACAGCGAACATCA-3') は、Integrated DNA Technologies より購入した。PCR で *uncE* 遺伝子を増幅し、この PCR 産物を pIVEX2.3-MCS ベクター (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) の NdeI/SmaI サイトにクローニングした。3L-Pf3 coat の *in vitro* 合成用のプラスミドは Andreas Kuhn 先生 (Hohenheim 大学) より供与された。MPIase²⁶、YidC⁵⁵ の精製は、報告されている方法に倣って行った。PA (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphate)、PE (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine)、PG (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho- (1'-*rac*-glycerol))、DAG (1-2-dioleoyl-*sn*-glycerol)、LPG (1-oleoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phospho- (1'-*rac*-glycerol)) は Avanti Polar Lipids, Inc. より購入した。CL と G3P は Sigma より購入した。 [³⁵S] メチオニンと [³⁵S] システインの混合液 (43.5 TBq/mmol) 「EXPRES³⁵S Protein Labeling Mix」は株式会社パーキンエルマー・ジャパンより購入し、基質タンパク質の RI 標識に使用した。プロテイナーゼ K (PK) はロシュ・ダイアグノスティックス株式会社より購入した。*in vitro* タンパク質合成は、東京大学大学院新領域創成科学研究科の上田卓也先生から供与された無細胞タンパク質合成キット Pure system⁵⁶ を用いて行った。

② リン脂質の抽出

リン脂質抽出は、報告されている方法⁵⁷に倣って以下のように行った。大腸菌 MC4100 株を野生株として大量培養・集菌後、菌をビーカーに入れて酸化しないよう N₂ ガスで満たし、3 : 2 (v/v) のヘキサン/2-プロパノールで 1.5 時間抽出し、3,000 x g で 5 分間遠心分離後に上清のみを回収した。エバポレーターで溶媒を揮発させた後、残留物をクロロホルムで洗い、1,500 x g で 10 分間遠心して上清のみを回収した後、エバポレーターで再び溶媒を揮発させた。残留物を 9 : 1 のクロロホルム/メタノールで溶解させ、2 mM 2-メルカプトエタノール含有アセトンで 3 時間抽出した。1,500 x g で 15 分間遠心して沈殿のみ回収後、2 mM 2-メルカプトエタノール含有アセトンで洗浄した。さらに 1,500 x g で 15 分間遠心して沈殿を回収し、2 mM 2-メルカプトエタノール含有ジエチルエーテルに溶解させた。1,500 x g で 15 分間遠心して上清を回収し、エバポレーターでジエチルエーテルを揮発させ、最後に Buffer A (50 mM HEPES-KOH, pH 7.6, 1 mM DTT) に懸濁してリポソーム調製に用いた⁵⁷。

③ リポソームの調製

リン脂質はそれぞれ溶媒に溶けているため、N₂ ガスで溶媒をある程度揮発させた後、真空状態で遠心して溶媒を完全に揮発させた。乾燥後、10 mg/ml になるように Buffer A に懸濁し、超音波処理してリポソームを調製した。DAG 含有リポソームを調製するときには、溶媒中で DAG を 5% 加えた後、同様に調製した。MPIase は Sol. C 溶媒 (クロロホルム : エタノール : 水 = 3 : 7 : 4) に溶けているため、リン脂質や DAG を同じく Sol. C 溶媒に懸濁した後、2 つの溶液を混合して MPIase 含有リポソームを調製した。YidC 含有プロテオリポソームは報告されている方法に従って調製した⁵⁸。このとき、YidC 含有プロテオリポソームを DAG および MPIase 含有リポソームと混合し、5 回の凍結融解および超音波処理を行って融合させた。

④ MPIase 枯濁 INV の調製

MPIase 枯濁 INV は *cdsA/ynbB* 遺伝子欠損株 (KS23/pAra-CdsA 株)³¹ から調製した。0.2% アラビノース添加培地で培養した株 (+MPIase 株) とアラビノース非添加培地で培養した株 (Δ MPIase 株) それぞれから報告されている方法に倣って INV を調製した⁵⁴。

⑤ タンパク質膜挿入活性測定

in vitro タンパク質膜挿入活性測定は、報告されている方法⁵⁸ に倣って以下のように行った。Ec-F₀c および 3L-Pf3 coat タンパク質の合成は、INV または (プロテオ) リポソーム存在下で Pure system を用いて行った^{26,27}。反応溶液 20 μ l 中に [³⁵S] メチオニン、プラスミド DNA、リポソームまたは INV を混合し、37°C で 30 分間保温して基質タンパク質の RI ラベル合成と膜挿入反応を行った。ただしリポソームは反応開始時に、INV は反応開始 5 分後に反応系に加えた。反応終了後、溶液の一部 (-PK 用: 3 μ l) にはすぐに 10% (w/v) トリクロロ酢酸 (TCA) を 3 μ l 添加し、5 分以上氷上に放置、基質タンパク質を沈殿させた。溶液の残り (+PK 用: 15 μ l) は、等量の 1 mg/ml プロテイナーゼ K (PK) を加え、25°C で 20 分間保温した。終濃度 5% となるように TCA を添加後、PK を完全に失活させるために 56°C で 5 分間保温した。その後 5 分以上氷上に放置し、基質タンパク質を沈殿させた。PK 処理サンプル/未処理サンプル共に 15,000 x g で 5 分間遠心分離を行い、沈殿を回収した後アセトンで洗浄した。さらに 15,000 x g で 5 分間遠心分離して沈殿を回収した。必要に応じて、Pure system による合成反応の開始前または PK 処理前に 1.5% の OG を添加した。乾燥した沈殿をローディング緩衝液 (2.5% (w/v) SDS、25% (v/v) グリセロール、25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.2、2.5% (v/v) 2-メルカプトエタノール、0.0125% (w/v) ブロモフェノールブルー) に溶解させ、95°C で 5 分間加熱した後 SDS-PAGE で分離した。SDS-ゲルは 6 M 尿素を含む 12.5% アクリルアミド/0.27% *N,N*-ビスメチレンアクリルアミドを用いて作製した⁵⁹。電気泳動後、ゲルを 10% (w/v) 酢酸

で固定し、乾燥させ、RI 標識した基質タンパク質のバンドを Phosphorimager (GE Healthcare) で検出し、Image Quant (GE Healthcare) で定量した。PK 未処理時の基質量に対する PK で消化されなかった基質量の割合を計算し、膜挿入活性とした。

⑥ その他

INV 調製後のタンパク質定量は、ウシ血清アルブミンを標準サンプルとして報告されている Lowry 法⁶⁰ に倣って行った。リン脂質の分析は TLC により報告されている方法²⁶ に倣って以下のように行った。Sol. C (クロロホルム：エタノール：水=3：7：4) を移動相として、アニスアルデヒド-硫酸で染色した。また、イムノブロットイングによる MPIase の検出は報告されている方法²⁷ に倣って行った。

1-3. 結果

(1) 自発的膜挿入を抑制する DAG を含むリポソームを用いた Ec-F₀c の膜挿入解析

タンパク質の自発的膜挿入を抑制することが知られている DAG 存在下でも Ec-F₀c の膜挿入反応が抑制されないとする過去の報告⁵²を確認するため、様々な DAG 含有量のリポソームを調製した。これらのリポソーム存在下で無細胞タンパク質合成系 Pure system により [³⁵S] メチオニンで標識した Ec-F₀c を合成したところ、確かに DAG が存在しているにも関わらずプロテアーゼ処理で消化されない Ec-F₀c が出現した (図 1-3)。DAG は生理的含有量 (約 5%) がリポソーム内に存在するだけでタンパク質の自発的な膜挿入が完全に抑制されることが分かっている²⁴。しかし今回の結果では、DAG を 5%加えても Ec-F₀c の自発的膜挿入活性は DAG 非存在リポソームと比較して数%しか減少しなかった。DAG の含有量を 7.5%、10%と上昇させると、多少活性は減少したものの、完全に抑制することはできなかった。これらの結果は、報告通り DAG 存在下でも Ec-F₀c の膜挿入が進行している可能性を示している。

DAG in liposomes	-		0%		5%		7.5%		10%	
PK	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Foc / MPF ?										
% insertion	1.4		30.7		26.0		11.6		12.9	

図 1-3 DAG を用いた Ec-F₀c の膜挿入解析

DAG の含有量を変えてそれぞれ調製したリポソーム存在下および非存在下 (-) で、Pure system により Ec-F₀c を [³⁵S] メチオニンでラベル合成した。膜挿入活性測定は、「1-2. 材料と方法 ⑤」で示した通りに行った。Ec-F₀c やその MPF である可能性のあるバンドの位置は左に示した。

(2) Ec-F_{0c} の発現量を変化させると、膜挿入因子に対する依存性が変化する

Ec-F_{0c} の膜挿入が YidC に依存するかどうかを確認するため、YidC 枯渇株から反転膜小胞 (INV) を調製し、Ec-F_{0c} の膜挿入実験を行った。これまでの報告³⁴通り、YidC 枯渇膜では Ec-F_{0c} の膜挿入が抑制されていた (図 1-4 上図)。しかし、Pure system に非放射性メチオニンを添加して F_{0c} 発現量を増加させると、YidC 枯渇膜に対しても Ec-F_{0c} は効率よく膜挿入するという、矛盾した結果が得られた (図 1-4 下図)。続いて、Ec-F_{0c} と同様に Sec 非依存経路の膜挿入反応に必須な糖脂質 MPIase の枯渇が Ec-F_{0c} の膜挿入に及ぼす影響を解析した。MPIase 生合成反応の第一段階の反応は CdsA/YnbB により触媒される。KS23 株では、染色体上の *cdsA/ynbB* 両遺伝子が破壊されている。CdsA は菌の生育に必須であるので、*cdsA* 遺伝子をプラスミド上のアラビノース・プロモーターに連結して CdsA を発現させた (pAra-CdsA)。この菌をアラビノース非存在下で培養すると CdsA を枯渇することができる。KS23/pAra-CdsA 株を CdsA 発現条件または枯渇条件で培養して各株の INV を調製し、Ec-F_{0c} の膜挿入実験を行った。その結果、Ec-F_{0c} の発現量が少ないときは MPIase 枯渇膜に対する Ec-F_{0c} の膜挿入は大幅に抑制された。一方 Ec-F_{0c} の発現量が増加すると MPIase 枯渇膜に対しても Ec-F_{0c} は膜挿入するという、YidC 枯渇膜の場合と同様の結果が得られた (図 1-5 A)。Ec-F_{0c} と同じく Sec 非依存経路で膜挿入する 3L-Pf3 coat タンパク質を基質とした場合は、基質の発現量に関わらず MPIase 枯渇膜に対する 3L-Pf3 coat の膜挿入活性は MPIase 存在下と比べて減少していた (図 1-5 B)。DAG で Ec-F_{0c} の自発的膜挿入を抑制できないという (1) の結果も含めたこれらの多くの矛盾点は、従来の実験系では Ec-F_{0c} の膜挿入を正しく解析できていないという可能性を示唆している。

タンパク質膜挿入の *in vitro* 実験系では、膜小胞やリポソームに挿入された部分が外部から加えたプロテアーゼによる消化を免れた膜挿入断片 (MPF: Membrane Protected Fragment) の出現を指標として、膜挿入活性が評価される⁶¹ (図 1-6 A)。しかし Ec-F_{0c} の

場合は2個の膜貫通領域のほとんどが膜に埋もれているためにプロテアーゼによる切断を受けず、分子全体がMPFとして検出される³⁴(図1-6B)。以上の結果は、Ec-F₀cが膜挿入してMPFが検出されているのか、膜挿入せずに膜上で高次構造を形成してプロテアーゼ耐性構造を獲得しているのか、厳密に区別できていないことを強く示唆している。

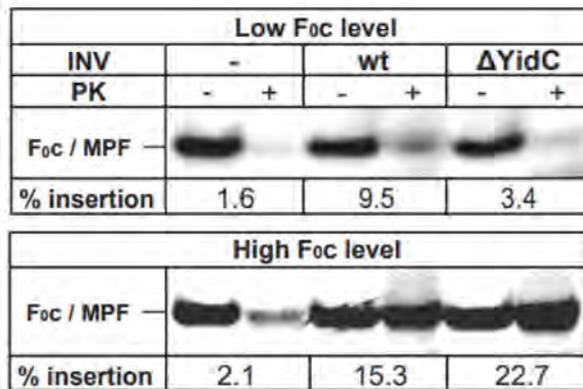


図 1-4 F_{0c} の発現量を変化させると、YidC に対する依存性が変化する。

(A・B) 野生株 (wt) および YidC 欠損株 (ΔYidC) から調製した INV 存在下および非存在下 (-) で、Pure system により Ec-F_{0c} を [³⁵S] メチオニンでラベル合成した。膜挿入活性測定は「1-2. 材料と方法 ⑤」で示した通りに行った。下図では 0.3 mM 非放射性メチオニン存在下で膜挿入反応を行った。Ec-F_{0c} やその MPF のバンドの位置は左に示した。

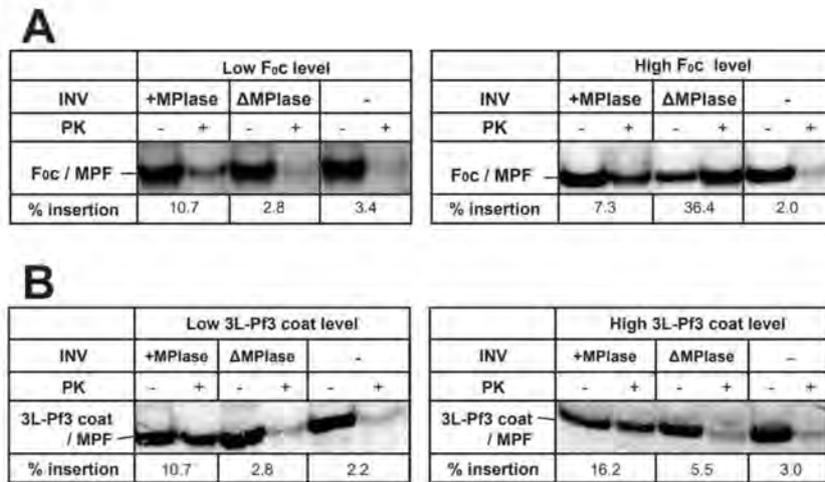


図 1-5 Ec-F_{0c} の発現量を増加させると、MPlase に対する依存性も変化する。

(A) 野生株と MPlase 枯渇株から調製した INV 存在下および非存在下 (-) で Pure system により Ec-F_{0c} を [³⁵S] メチオニンでラベル合成した。膜挿入活性測定は「1-2. 材料と方法 ⑤」で示した通りに行った。(A 右図) では 0.3 mM 非放射性メチオニン存在下で膜挿入反応を行った。(B) 野生株と MPlase 枯渇株から調製した INV 存在下で Pure system により 3L-Pf3 coat タンパク質を [³⁵S] メチオニンでラベル合成した。膜挿入活性測定は「1-2. 材料と方法 ⑤」で示した通りに行った。(B 右図) では 0.3 mM 非放射性メチオニン存在下で膜挿入反応を行った。Ec-F_{0c} および 3L-Pf3 coat タンパク質やそれらの MPF のバンドの位置はそれぞれ左に示した。

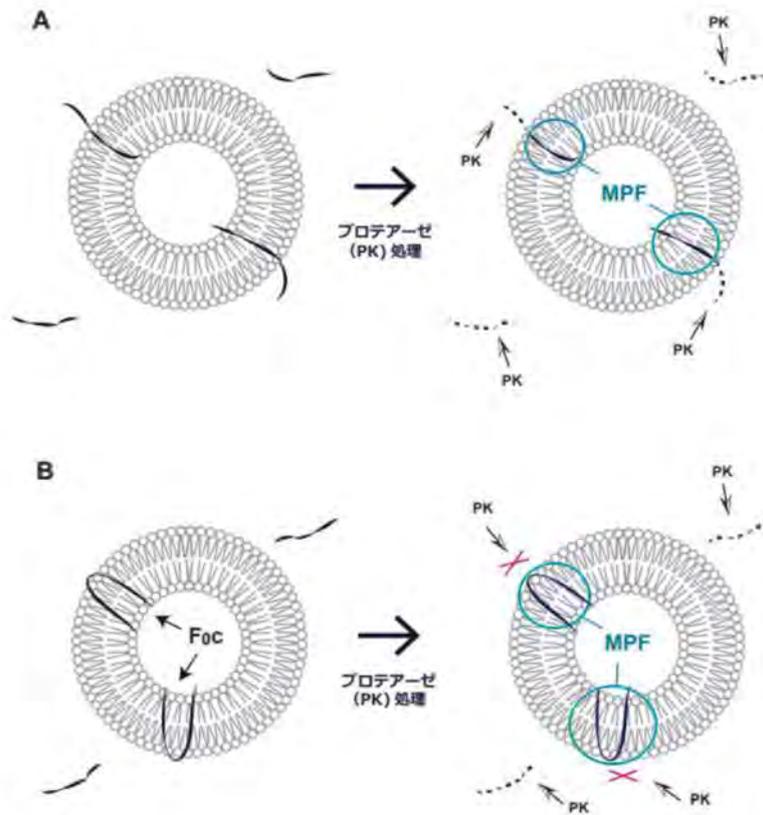


図 1-6 Ec-F₀c が膜挿入した場合、分子全体が MPF として検出される。

(A) 膜小胞やリポソームに挿入された部分はプロテアーゼによる消化を受けず、MPF として検出される。(B) Ec-F₀c は 2 個の膜貫通領域間がほとんど膜に埋もれているため、膜挿入後もプロテアーゼによる消化を受けない。

(3) DAG 存在下では、Ec-F_{0c} はプロテアーゼ耐性構造に変化する

Ec-F_{0c} が膜挿入をしているのか、膜挿入せずに膜上でプロテアーゼ耐性構造を獲得しているのかを調べるため、大腸菌から抽出したリン脂質 (PL) および DAG でリポソームを調製し、翻訳反応開始時またはプロテアーゼ処理前に界面活性剤オクチルグルコシド (OG) を添加してリポソームを可溶化した。翻訳反応開始時に OG を添加したときは、DAG の有無にかかわらずすべての Ec-F_{0c} が PK により消化された (図 1-7 A “+OG at translation”)。これらの結果は、OG で可溶化された Ec-F_{0c} はプロテアーゼ感受性であることを示している。膜挿入反応を 30 分間行った後、PK 処理を行う前に OG を添加した場合では、DAG を含まないリポソームに膜挿入された Ec-F_{0c} はほとんどが PK で消化された (図 1-7 A “+OG on PK digestion”)。このことは、DAG を含まないリポソームに対して Ec-F_{0c} は自発的に膜挿入するということを示している。対して DAG 含有リポソームを用いた場合は、多くの Ec-F_{0c} が OG で可溶化しても PK によって消化を受けなかった。このことは DAG 存在下では Ec-F_{0c} はリポソームに膜挿入されず、プロテアーゼ耐性構造を獲得していることを示している。

今回の実験で用いた PL は大腸菌から抽出してきたものであり、有機溶媒に可溶性のタンパク質 (Ec-F_{0c} 自体⁶²など) が混入している。これらの膜タンパク質が Ec-F_{0c} の膜挿入に関与している可能性を排除するため、合成リン脂質で調製したリポソームを用いて同様の実験を行った (図 1-7 B)。リポソームは大腸菌内膜を模倣して、ホスファチジルグリセロール (PG) が 30%、ホスファチジルエタノールアミン (PE) が 70%となるように調製した⁶³。本来は細胞膜の構成成分としてカルジオリピン (CL) も含まれているが、約 5%程度と微量であり、また通常は生育に必須ではない⁶⁴ため今回は除外した。PG/PE の合成リポソームを用いた場合と抽出した PL を用いた場合で同様の結果が得られた。OG を加えていないときは、DAG の有無にかかわらず PK で分解されない Ec-F_{0c} のバンドが現れ、翻訳開始時に OG を入れて可溶化すると、ほとんどすべての Ec-F_{0c} が PK で消化され

た（図 1-7 B “+OG at translation”）。一方膜挿入反応後 PK 処理前に OG を加えた場合、DAG 含有リボソームではプロテアーゼ耐性の Ec-F_{0c} が確認され、DAG 非含有リボソームでは Ec-F_{0c} のほとんどが PK で消化された（図 1-7 B “+OG on PK digestion”）。一連の結果から、DAG 非存在下では Ec-F_{0c} はリボソームに自発的に膜挿入する一方、DAG 存在下では Ec-F_{0c} は膜挿入できず、膜上でプロテアーゼ耐性構造に構造変化していることが判明した。したがって、Ec-F_{0c} も他の膜タンパク質と同様に DAG で自発的膜挿入が抑制されることが示された。また、膜内に含まれている Ec-F_{0c} 自体は、新しく合成された Ec-F_{0c} のプロテアーゼ耐性構造形成には関与しないことも判明した。

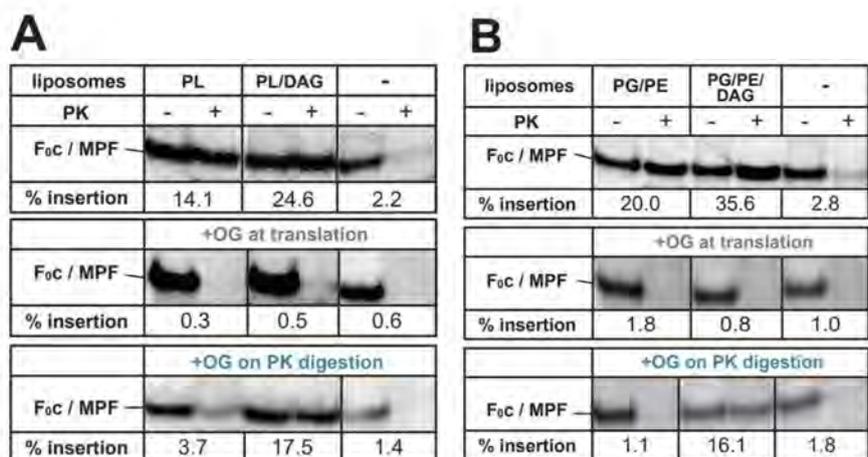


図 1-7 DAG 存在時、Ec-F_{0c} は膜の構成成分と相互作用してプロテアーゼ耐性構造をとる。

(A) PL リポソームおよび PL/DAG リポソームは、「1-2. 材料と方法 ③」で示した通りに行った。調製したリポソーム存在下および非存在下 (-) で、Pure system により Ec-F_{0c} を [³⁵S] メチオニンでラベル合成した。膜挿入活性測定は「1-2. 材料と方法 ⑤」で示した通りに行った。翻訳開始時 (+OG at translation) および Ec-F_{0c} 合成後の PK 処理前 (+OG on PK digestion) に 1.5% の OG を添加した。(B) 合成リポソームは PG : PE = 3 : 7 となるように調製した。各リポソーム存在下および非存在下 (-) で、Pure system により Ec-F_{0c} を [³⁵S] メチオニンでラベル合成した。Ec-F_{0c} の膜挿入活性測定および OG 処理は (A) と同様に行った。Ec-F_{0c} やその MPF のバンドの位置は左に示した。

(4) 酸性リン脂質 PG と CL は、Ec-F₀c のプロテアーゼ耐性構造を誘発する

Ec-F₀c の高次構造形成を誘発する物質を特定するため、種々の脂質存在下で Ec-F₀c を RI ラベル合成し、OG 処理・PK 消化を行った。反応系に INV やリボソームがないときに合成された Ec-F₀c は PK で消化される (図 1-8 (-)) ため、膜の構成成分が Ec-F₀c の高次構造形成の鋳型になるのではないかと推測した。内膜の主要構成成分であるリン脂質 (PE、PG、CL、ホスファチジン酸 (PA)) や脂質 (DAG) 存在下で Ec-F₀c を RI ラベル合成した (図 1-8 A)。しかし PG や CL は単体でもリボソームを形成してしまうため、そのままでは他の脂質と比較できない。そこで全ての脂質を超音波処理して懸濁後、凍結融解を 5 回繰り返して小胞構造を破壊してから反応系に添加した。PA や PE、DAG の存在下では、ほとんどの Ec-F₀c が PK で消化された。一方、PG および CL 存在下で Ec-F₀c を合成すると、図 1-7 A でも見られた PK で消化されない Ec-F₀c が観察された。翻訳開始時に OG を添加すると全ての Ec-F₀c が消化されたが (図 1-8 A “+OG at translation”)、PG および CL 存在下で現れたプロテアーゼ耐性の Ec-F₀c は、PK 処理前に OG を添加した場合でも観察された (図 1-8 A “+OG on PK digestion”)。これらの結果から、酸性リン脂質である PG と CL が Ec-F₀c のプロテアーゼ耐性構造形成の鋳型となる物質であることが示された。また CL 存在下では本来の Ec-F₀c を示すバンドより少し大きい分子量のバンドが見られた。これは Ec-F₀c が CL と強く相互作用して形成された、SDS 耐性かつプロテアーゼ耐性の複合体であると考えられる。

さらに、PG と CL の構造のどの部分が Ec-F₀c のプロテアーゼ耐性構造形成に必要なのかを調べるため、アシル基が 1 本のリゾホスファチジルグリセロール (LPG) やアシル基のないグリセロール 3-リン酸 (G3P) を反応系に加えて Ec-F₀c を RI ラベル合成した (図 1-8 B)。OG を反応系に添加していないにもかかわらず、どちらの場合でも Ec-F₀c は PK で完全に消化された。これらの結果から、Ec-F₀c のプロテアーゼ耐性構造形成には 2 本のアシル基を持つリン脂質構造が必要であることが示された。

A

lipids	CL		PA		PG		PE		DAG		-	
PK	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Foc / MPF												
% insertion	50.7		4.1		9.5		2.5		2.2		2.3	
+OG at translation												
Foc / MPF												
% insertion	2.7		2.2		3.8		1.5		2.3		1.4	
+OG on PK digestion												
Foc / MPF												
% insertion	15.9		2.6		10.1		2.2		2.8		1.7	

B

lipids	LPG		LPG/DAG		G3P		-	
PK	-	+	-	+	-	+	-	+
Foc / MPF								
% insertion	0.7		0.8		2.8		3.6	

図 1-8 PG や CL は、F_{0c} をプロテアーゼ耐性構造に変化させる。

(A) 各脂質を Buffer A に懸濁し、凍結融解を 5 回行った。その後、各脂質の存在下および非存在下 (-) で、Pure system により Ec-F_{0c} を [³⁵S] メチオニンでラベル合成した。膜挿入活性測定は「1-2. 材料と方法 ⑤」で示した通りに行った。翻訳開始時 (+OG at translation) および Ec-F_{0c} 合成後の PK 処理前 (+OG on PK digestion) に 1.5% の OG を添加した。(B) リゾホスファチジルグリセロール (LPG)、5% DAG をくわえた LPG (LPG/DAG) およびグリセロール 3-リン酸 (G3P) を Buffer A に溶解し、各物質の存在下および非存在下 (-) で、Pure system により Ec-F_{0c} を [³⁵S] メチオニンでラベル合成して PK 処理を行った。Ec-F_{0c} やその MPF のバンドの位置は左に示した。

(5) Ec-F_{0c} の膜挿入は MPIase に依存し、YidC により促進される

Ec-F_{0c} が膜挿入するために必要な因子を特定するため、YidC や MPIase を DAG 含有リポソームに再構成し、Ec-F_{0c} の膜挿入実験を行った (図 1-9)。(3) の実験で Ec-F_{0c} が膜挿入せずにプロテアーゼ耐性構造を獲得すると判明した PL/DAG リポソームに MPIase を再構成して Ec-F_{0c} を RI ラベル合成したところ、PK 処理前に OG を加えた場合に Ec-F_{0c} がプロテアーゼ感受性に変化した (図 1-9 A “+OG on PK digestion”)。この結果から、Ec-F_{0c} は MPIase に依存して膜挿入することが強く示唆された。このリポソームには DAG が含まれているにも関わらずプロテアーゼ耐性の Ec-F_{0c} は全く検出されなかったことから、Ec-F_{0c} と MPIase のとの相互作用は、リン脂質との相互作用による高次構造形成よりも優位に働くと考えられる。これらの結果は、MPIase が膜挿入する基質タンパク質と直接相互作用し、基質の凝集を妨げるという過去の報告²⁷とも一致する。一方で、PL/DAG リポソームに YidC を再構成したプロテオリポソームでは、OG を添加した後もプロテアーゼ耐性の Ec-F_{0c} が確認された (図 1-9 B “PL/DAG/YidC”)。これらの結果から、YidC のみの条件では Ec-F_{0c} はリポソームにほとんど膜挿入されないことが示された。PL/DAG/MPIase リポソームを用いた実験は図 1-9 A と図 1-9 B いずれの実験でも Ec-F_{0c} の膜挿入が確認されたが、図 1-9 B の方が低い活性を示した。これは、図 1-9 B で用いたリポソームの濃度が図 1-9 A のリポソーム濃度よりも低いためである。さらに、MPIase と YidC の両方を含むプロテオリポソーム存在下で Ec-F_{0c} の膜挿入を観察したところ、やはり OG による可溶化により Ec-F_{0c} はプロテアーゼ感受性となり、このプロテオリポソームに対して Ec-F_{0c} が膜挿入することが示された (図 1-9 B “PL/DAG/MPIase/YidC”)。また PL/DAG/MPIase/YidC プロテオリポソームにおける膜挿入活性は、PL/DAG/MPIase リポソームと比較して 2 倍以上上昇していた。これら一連の結果により、Ec-F_{0c} の膜挿入には MPIase が必須であり、YidC は膜挿入を促進する役割をもつことが明らかとなった。

A

liposomes	PL/DAG		PL/DAG/ MPlase		-	
PK	-	+	-	+	-	+
F _{0c} / MPF						
% insertion	70.7		13.5		1.9	
+OG on PK digestion						
F _{0c} / MPF						
% insertion	17.7		0.9		0.7	

B

proteo-liposomes	PL/DAG/ YidC		PL/DAG/ MPlase		PL/DAG/ MPlase/ YidC		-	
PK	-	+	-	+	-	+	-	+
F _{0c} / MPF								
% insertion	23.4		5.2		11.7		1.3	
+OG on PK digestion								
F _{0c} / MPF								
% insertion	6.6		0.4		0.8		0.3	

図 1-9 Ec-F_{0c} の膜挿入は MPlase に依存し、YidC により促進される。

(A) 野生株から抽出した PL に 5% の DAG を添加したリポソーム (PL/DAG) およびそのリポソームに 5% MPlase を組み込んだリポソーム (PL/DAG/MPlase) を調製した。PL が反応溶液内で 1 mg/ml となるように加えた各リポソーム存在下/非存在下 (-) で、Pure system により Ec-F_{0c} を [³⁵S] メチオニンでラベル合成した。膜挿入活性測定は「1-2. 材料と方法 ⑤」で示した通りに行った。Ec-F_{0c} 合成後の PK 処理前 (+OG on PK digestion) に 1.5% の OG を添加した。(B) (A) で用いた PL/DAG リポソームに YidC を再構成したプロテオリポソーム (PL/DAG/YidC) を調製した。また、このプロテオリポソームと MPlase/DAG リポソームを混合して調製したプロテオリポソーム (PL/DAG/MPlase/YidC) および PL/DAG リポソームと MPlase/DAG リポソームを混合

して調製したリボソーム (PL/DAG/MPIase) を、リボソームを融合させるために 5 回凍結融解し、超音波処理を行って調製した。PL に対し、MPIase は約 5%、YidC は約 9% (プロテオ) リボソームに含まれる。反応溶液に PL が 0.26 mg/ml となるように加えた各 (プロテオ) リボソームの存在下および非存在下 (-) で、Pure system により Ec-F_{0c} を [³⁵S] メチオニンでラベル合成した。Ec-F_{0c} の膜挿入活性測定および OG 処理は (A) と同様に行った。Ec-F_{0c} やその MPF のバンドの位置は左に示した。

1-4. 考察

本研究により、Ec-F_{0c}の膜挿入は糖脂質酵素 MPIase に依存して進行し、内膜タンパク質 YidC により促進されることが判明した (図 1-9)。Ec-F_{0c}に関する研究はこれまでも多くなされてきており、Ec-F_{0c}の膜挿入は YidC に依存すると報告されていた³⁴。一方で、タンパク質の自発的膜挿入を抑制する DAG を含むリポソームに対しても Ec-F_{0c}は自発的に膜挿入するという矛盾した結果も報告されていた⁵²。一般的にタンパク質膜挿入の *in vitro* 実験系では、膜小胞やリポソームにタンパク質が膜挿入した結果現れる MPF を指標として評価している⁶¹が、Ec-F_{0c}の場合は分子全体が MPF として検出される³⁴。そのため、従来の実験系では Ec-F_{0c}の膜挿入を正確に評価できていなかったことが判明した。タンパク質がリポソーム等に膜挿入されると、外部から加えた PK は膜内部に挿入された部分を消化できないため、膜構造に保護された部分が MPF として検出される。それゆえタンパク質が膜挿入されている場合、膜構造が界面活性剤で可溶化されたとき MPF はプロテアーゼ感受性でなければならない。DAG を含むリポソームの場合、PK で消化されなかった Ec-F_{0c}は、膜挿入した結果できた MPF ではなく、膜挿入せずに膜上でプロテアーゼ耐性構造を獲得した結果出現したものだった。リン脂質のみで調製したリポソームでは、界面活性剤で膜を可溶化することでプロテアーゼ感受性の Ec-F_{0c}の MPF が確認され、Ec-F_{0c}が自発的膜挿入をしていると考えられる。対して DAG を含むリポソームでは、膜を可溶化すると PK で消化されない Ec-F_{0c}が出現した。このことから、リン脂質のみのリポソームで引き起こされていた Ec-F_{0c}の自発的膜挿入は DAG が添加されることにより抑制され、そのうえで Ec-F_{0c}のプロテアーゼ耐性構造形成が行われたと考えられる。これらの結果から、他の膜タンパク質^{23,24}と同様に Ec-F_{0c}の自発的膜挿入も DAG で抑制されることが明らかとなった。また、図 1-3、図 1-4、図 1-5 A で得られた矛盾した結果は、Ec-F_{0c}の MPF ではなくプロテアーゼ耐性構造を観察していたために生じたことが明らかとなった。

本研究により、Ec-F₀C は酸性リン脂質 PG および CL と相互作用してプロテアーゼ耐性構造を獲得することが判明した (図 1-8 A)。この Ec-F₀C の構造変化には PG や CL の親水性の頭部部分だけでなく 2 本のアシル基も必要となる (図 1-8 B)。この酸性リン脂質により引き起こされる Ec-F₀C の構造変化は、例えば疎水性膜タンパク質 UncI を必要とする F₀C の 10 量体からなるリング構造形成^{65,66} などとは異なると考えられる。リポソームや INV が無い状態で Ec-F₀C を合成した場合には Ec-F₀C は PK で消化されるため (図 1-10 “aggregation”)、Ec-F₀C のプロテアーゼ耐性構造形成は単なる凝集体の形成ではない。その代わりに、合成された Ec-F₀C と酸性リン脂質との相互作用自体が Ec-F₀C のプロテアーゼ構造形成にきわめて重要となる (図 1-10 “transformation”)。この相互作用の結果、反応溶液内における Ec-F₀C 合成量 (図 1-4、図 1-5 A) やリポソームの濃度が増加すると Ec-F₀C のプロテアーゼ耐性構造の形成量も増加するといった現象^{34,52} が起こると考えられる。

MPIase 枯濁膜を用いた条件下 (図 1-5) や自発的膜挿入が DAG により抑制された条件下 (図 1-9) における Ec-F₀C の膜挿入実験から、タンパク質の膜挿入に関与する糖脂質酵素 MPIase が必要となることが明らかとなった (図 1-9 A)。この結果自体は、M13 procoat タンパク質や Pf3 coat タンパク質を基質とした解析における結果^{23,24,27} と基本的には同じである。さらに本研究では、MPIase が Ec-F₀C と相互作用することでプロテアーゼ耐性構造形成を抑制する役割も果たすことが証明された (図 1-9 B)。この機能は、MPIase が膜タンパク質と相互作用して膜挿入可能な状態のままに維持しておく分子シャペロン様の役割を果たすという以前の報告²⁷ と一致する。このステップ (図 1-10 “insertion” ①) の後、Ec-F₀C は MPIase の作用により膜挿入が進行し、次に YidC へと受け渡される (図 1-10 “insertion” ①)。その後、YidC は Ec-F₀C の膜挿入を完了させる (図 1-10 “insertion” ③)。このように、MPIase は主に膜挿入の初期段階に機能して膜タンパク質を膜挿入させるが、YidC は単独では膜挿入反応を触媒せず、後期段階で作用して膜タンパク質の膜挿入を促進・完了させる働きをもつと考えられる。それゆえ、基質である膜タンパク質を受け

渡す段階において MPIase と YidC とが機能的に相互作用する必要があると考えられる。

この MPIase から YidC への基質タンパク質の受け渡しが行われることにより、MPIase はすみやかに次の基質タンパク質を膜挿入させることができるため、膜挿入が促進される。

図 1-4 A の YidC 枯渇膜を用いた実験において観察された膜挿入活性の低下は、MPIase による膜挿入が行われた後の膜挿入後期段階における反応効率が、YidC の枯渇により低下したためであると考えられる。

精製因子を再構成したプロテオリポソームにおける結果 (図 1-9 B) は、INV を用いた結果 (図 1-5 A 左図) とほぼ一致しているため、本研究により Ec-F_{0c} の膜挿入の再構成に成功したと言える。Ec-F_{0c} の膜挿入は YidC に依存することが報告されてきた^{34,52}が、これらの研究ではタンパク質の自発的膜挿入を抑制する DAG を用いていないため、Ec-F_{0c} の自発的膜挿入が YidC により促進されていると考えられる。

以上により、Ec-F_{0c} の膜挿入に関するこれまでの矛盾点がすべて解決し、Ec-F_{0c} の膜挿入も従来の Sec 非依存経路と同様であることが証明された。さらに本研究で得られたタンパク質膜挿入機構は、Ec-F_{0c} に限らず広く Sec 非依存性タンパク質の膜挿入全般に適用できる可能性が強い。すなわち、膜挿入の初期段階で MPIase は基質膜タンパク質と相互作用して膜挿入させ、YidC に基質を受け渡し、YidC が膜挿入を完了させるというシステムが、これまで YidC にのみ依存するとされてきた他の Sec 非依存性膜タンパク質にも当てはまると考えられる。MPIase や YidC に依存して膜挿入したタンパク質が膜内で高次構造を獲得する分子機構については次章で述べる。

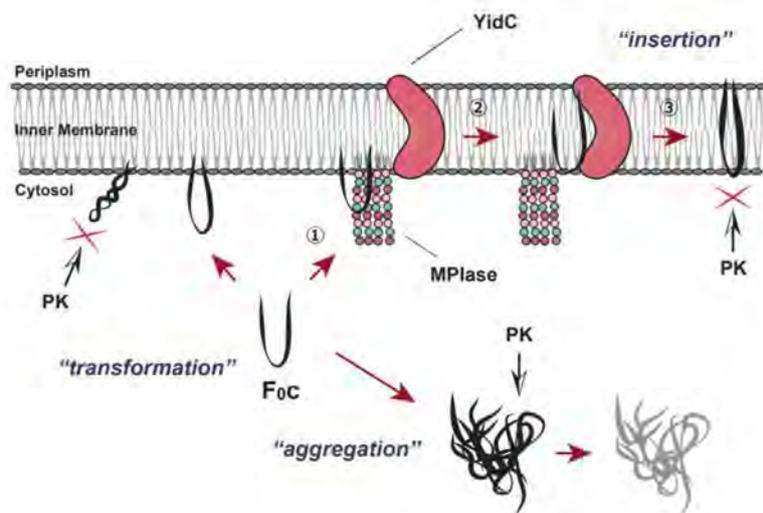


図 1-10 Ec-F₀c の膜挿入とプロテアーゼ耐性構造形成のモデル図。

MPIase は Ec-F₀c と直接相互作用して Ec-F₀c を膜挿入させ (“insertion” ①)、その後膜挿入した Ec-F₀c が YidC に受け渡され (“insertion” ②)、YidC が Ec-F₀c の膜挿入を促進・完了させる (“insertion” ③)。

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

2-1. 序論

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。これらの過程では、一連の反応に関与する因子群の連続的かつ協調的な機能が必要となる。第1章では、Ec-F₀c の膜挿入反応には MPlase 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⁶⁶。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。また、これまでに行われてきたプロテアーゼ・プロテクションアッセイによる *in vitro* 再構成系における膜挿入反応の解析では、膜挿入した膜タンパク質の複合体形成の過程については追跡することができない。

Propionigenium modestum の ATP 合成酵素 F₀F₁-ATPase の c サブユニット (Pm-F₀c) は、Ec-F₀c と同様に膜内で 11 量体のリング構造を形成する。この c リング構造の形成には、14 kDa の疎水性タンパク質 UncI (Pm-UncI) が必須である^{66,67}。*uncI* 遺伝子は F₀F₁-ATPase の各サブユニットをコードする遺伝子群と同じオペロン上に存在する^{68,69}。Pm-F₀c を大腸菌で発現させた場合、c リング構造形成には Pm-UncI の共発現が必要となる。大腸菌を含む他の細菌の F₀c とは異なり、Pm-F₀c の c リングは SDS 溶液中でも安定であるため^{66,67,70,71}、膜内部でのアセンブリ解析に適した基質である。先行研究において、無細胞タンパク質合成系で合成した Pm-F₀c は大豆由来のホスファチジルコリン (PC) で調製したリポソーム (PC リポソーム) の膜内で、Pm-UncI に依存して c リングを形成することが報告されている⁶⁶。しかし、この報告では合成した Pm-F₀c がリポソームに自発的に膜挿入していると考え

えられるため、Pm-F₀c がどのように膜挿入し、折り畳まれ、複合体形成に至るのかについては不明であった。第 1 章で構築した膜挿入機構の再構成系は Ec-F₀c の膜挿入に関するこれまでの矛盾を全て解消したことから、この再構成系が生体内の反応を忠実に反映していることが示された。よって本研究では、この *in vitro* 再構成系を用いて Pm-F₀c の合成・膜挿入から c リング構造形成までの過程を詳細に解析した。

2-2. 材料と方法

① 材料

Pm-*uncI* 遺伝子は、報告されている配列⁶⁷の化学合成品を Integrated DNA Technologies より購入した。この合成 DNA を pIVEX2.3-MCS ベクター（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）の NdeI/SmaI サイトにクローニングし、プラスミド pIVEX-UncI を得た。大腸菌 BL21 (DE3) 株 (F⁻, *lon-11*, Δ (*ompT-nfrA*)885, Δ (*galM-ybhJ*)884, λ DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*] D46 [*mal⁺*]K-12(λ S) *hsdS10*) に pIVEX-UncI を導入し、Pm-UncI の発現を誘導した。Pm-UncI を含む INV を報告されている方法^{24,54}に倣って調製し、OG で可溶化後、TALON® (Cobalt) カラム (Clontech 社) を用いて Pm-UncI を精製した。Pm-F_{0c} の *in vitro* 合成用のプラスミドは車兪徹先生 (JAMSTEC) より供与された。MPIase²⁶、YidC⁵⁵の精製は、報告されている方法に倣って行った。PL (*E. coli* Polar Lipid Extract)、DAG (1-2-dioleoyl-*sn*-glycerol) は Avanti Polar Lipids, Inc.より購入した。OG は同仁化学研究所より購入した。 [³⁵S] メチオニンと [³⁵S] システインの混合液 (43.5 TBq/mmol) 「EXPRES³⁵S³⁵S Protein Labeling Mix」は株式会社パーキンエルマー・ジャパンより購入し、基質タンパク質の RI 標識に使用した。プロテイナーゼ K (PK) はロシュ・ダイアグノスティックス株式会社より購入した。無細胞タンパク質合成キット Pure system⁵⁶ はジーンフロンティア株式会社より購入した。

② (プロテオ) リポソームの調製

リン脂質はそれぞれ溶媒に溶けているため、N₂ ガスで溶媒をある程度揮発させた後、真空状態で遠心して溶媒を完全に揮発させた。乾燥後、10 mg/ml になるように Buffer A (50 mM HEPES-KOH, pH 7.6, 1 mM DTT) に懸濁し、超音波処理してリポソームを調製した。DAG 含有リポソームを調製するときは、溶媒中で DAG を 5% 加えた後、同様に調製した。YidC プロテオリポソーム、Pm-UncI プロテオリポソーム、MPIase/DAG リポソーム

ムは報告されている方法に従って調製した⁵⁸。YidC または Pm-UncI 含有プロテオリソームと MPIase/DAG リポソームとの融合は報告されている方法⁵⁸に従って行った。

③ タンパク質膜挿入活性測定

in vitro タンパク質膜挿入活性測定は、報告されている方法⁵⁸に倣って以下のように行った。Pm-F_{0c} の合成は、INV または (プロテオ) リポソーム存在下で Pure system を用いて行った^{26,27}。反応溶液 25 μ l 中に [³⁵S] メチオニン、プラスミド DNA、INV または (プロテオ) リポソームを混合し、37°C で 30 分間保温して基質タンパク質の RI ラベル合成と膜挿入反応を行った。ただしリポソームは反応開始時に、INV は反応開始 5 分後に反応系に加えた。反応終了後、溶液の一部 (-PK 用: 2 μ l) にはすぐに 10% TCA を 2 μ l 添加し、5 分以上氷上に放置し、基質タンパク質を沈殿させた。溶液の残りのうち半分 (+PK 用: 10 μ l) は、等量の 1 mg/ml プロテイナーゼ K (PK) を加え、25°C で 20 分間保温した。終濃度 5% となるように TCA を添加後、PK を完全に失活させるために 56°C で 5 分間保温した。その後 5 分以上氷上に放置し、基質タンパク質を沈殿させた。溶液の残り (+OG +PK 用: 10 μ l) は、1.5% OG 存在下で (+PK 用) と同様の方法で PK 処理を行った。全サンプルを 15,000 x g で 5 分間遠心分離を行い、沈殿を回収したのちアセトンで洗浄した。さらに 15,000 x g で 5 分間遠心分離して沈殿を回収した。乾燥した沈殿をローディング緩衝液 (2.5% (w/v) SDS、25% (v/v) グリセロール、25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.2、2.5% (v/v) 2-メルカプトエタノール、0.0125% (w/v) ブロモフェノールブルー) に溶解させ、95°C で 5 分間加熱した後 SDS-PAGE で分離した。SDS-ゲルは 12.5% アクリルアミド/0.27% *N,N*-ビスメチレンアクリルアミドを用いて作製した⁵⁹。電気泳動後、ゲルを 10% (w/v) 酢酸で固定し、乾燥させ、RI 標識した基質タンパク質のバンドを Phosphorimager (GE Healthcare) で検出した。

④ Pm-F₀c の c リング形成確認

Pm-F₀c の合成は、INV または (プロテオ) リポソーム存在下で Pure system を用いて行った^{26,27}。反応溶液 20 μl 中に [³⁵S] メチオニン、プラスミド DNA、INV または (プロテオ) リポソームを混合し、37°C で 30 分間保温して基質タンパク質の RI ラベル合成と膜挿入反応を行った。ただしリポソームは反応開始時に、INV は反応開始 5 分後に反応系に加えた。反応終了後、溶液の一部 (+TCA 用: 3 μl) にはすぐに 10% TCA を 3 μl 添加し、5 分以上氷上に放置し、基質タンパク質を沈殿させた。15,000 x g で 5 分間遠心分離を行い、沈殿を回収したのちアセトンで洗浄した。リポソームを用いた場合、溶液の残り (-TCA 用: 17 μl) は、等量の 100 mM MgCl₂ を加え、10 分間常温に放置して沈殿させた。15,000 x g で 5 分間遠心分離を行い、沈殿を回収した。INV を用いた場合、溶液の残り (-TCA 用: 17 μl) に Buffer A を加えて 500 μl にした後、160,000 x g で 1 時間遠心分離して沈殿を回収した。沈殿をローディング緩衝液 (2.5% (w/v) SDS、25% (v/v) グリセロール、25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.2、2.5% (v/v) 2-メルカプトエタノール、0.0125% (w/v) ブロモフェノールブルー) に溶解させ、SDS-PAGE で分離した。SDS-ゲルは 10% アクリルアミド/0.22% *N,N*-ビスメチレンアクリルアミドを用いて作製した⁵⁹。電気泳動後、ゲルを 10% (w/v) 酢酸で固定し、乾燥させ、RI 標識した基質タンパク質のバンドを Phosphorimager (GE Healthcare) で検出した。

⑤ その他

INV 調製後のタンパク質定量は、ウシ血清アルブミンを標準サンプルとして報告されている方法⁶⁰に倣って行った。リン脂質の分析は TLC により報告されている方法²⁶に倣って以下のように行った。Sol. C (クロロホルム: エタノール: 水=3:7:4) を移動相として、アニスアルデヒド-硫酸で染色した。

2-3. 結果

(1) プロテアーゼ・プロテクションアッセイによる Pm-F_{0c} の膜挿入の解析

第1章の大腸菌 F_{0c} (Ec-F_{0c}) の膜挿入解析と同様に、Pm-F_{0c} においても一般的なプロテアーゼ・プロテクションアッセイを用いて膜挿入が解析できるかを調べた。大腸菌から抽出した PL のみ、またはタンパク質の自発的膜挿入を抑制する DAG を加えてリポソームを調製し、^[35S]メチオニンで RI 標識した Pm-F_{0c} の膜挿入を観察した。このとき Ec-F_{0c} と同様に Pm-F_{0c} が膜上でプロテアーゼ耐性構造を取り、膜挿入した状態と区別がつかない可能性を想定し、第1章(3)の実験でも用いた界面活性剤 OG を膜挿入反応後に PK とともに添加した。その結果、PL リポソームおよび PL/DAG リポソームのどちらにおいても、ほとんどの Pm-F_{0c} は PK 処理により消化された。PK による消化を免れた Pm-F_{0c} は PK 処理時に OG を添加した場合でも同様に観察された (図 2-1 B “PL” および “PL/DAG”)。またリポソーム非存在下でも同様の結果であった。

第1章でも記述した通り、Ec-F_{0c} は分子全体が膜に埋もれているため、膜挿入後は PK による消化を免れる。一方で Pm-F_{0c} の細胞質側領域は Ec-F_{0c} よりも長く、膜の外側に露出していると考えられる。そのため、合成された Pm-F_{0c} の大部分が膜小胞の外側から添加した PK により消化され、消化を免れた N 末端側の膜貫通領域が図 2-1 B、“*” の約 3~4 kDa の位置に検出されたと考えられる (図 2-1 A)。また、リポソーム非存在下では Pm-F_{0c} の膜貫通領域が凝集したことによる PK 耐性構造のバンドが観察された (図 2-1 B “*”)。これらのバンドはサイズ上区別がつかないため、この手法では Pm-F_{0c} の膜挿入が解析できないことが判明した。

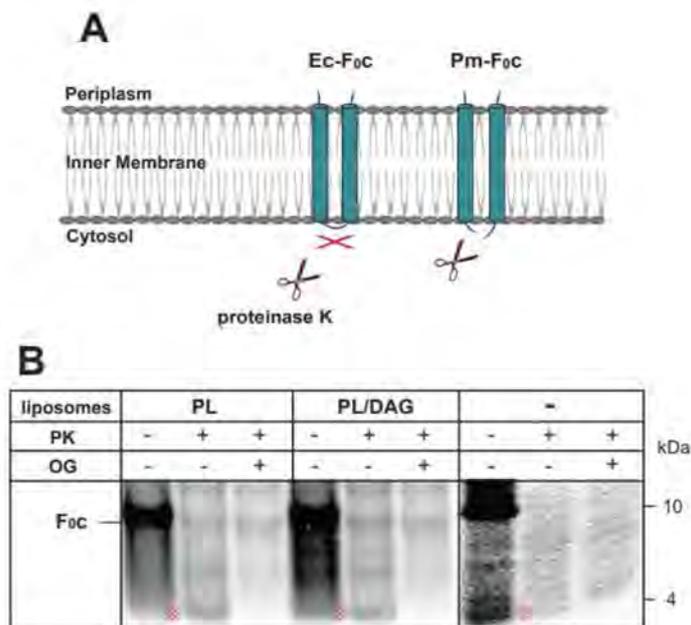


図 2-1 プロテアーゼ・プロテクションアッセイによる Pm-F_{0c} の膜挿入の解析。

(A) Ec-F_{0c} および Pm-F_{0c} の膜内配向性と PK のアクセシビリティを示したもの。(B) PL リポソームおよび PL/DAG リポソーム存在下で Pure system により Pm-F_{0c} を [³⁵S] メチオニンでラベル合成した。膜挿入活性測定は「2-2. 材料と方法 ③」に示した方法で行った。

PK 未処理画分 (-PK)、PK 処理画分 (+PK)、1.5% OG 存在下での PK 処理画分 (+OG +PK) を 1:5:5 の割合で SDS-PAGE に供した。Pm-F_{0c} はオートラジオグラフィーで検出した。“*”は PK による消化を免れた Pm-F_{0c} の N 末端側の膜貫通領域、または PK 耐性能をもつ Pm-F_{0c} の凝集体であると考えられる。なお、Pm-F_{0c} の細胞質領域以降にはメチオニンは存在しない。

(2) Pm-F_{0c} の c リング形成には Pm-UncI および一定量の Pm-F_{0c} が必要である

Pm-F_{0c} は、細胞膜上で Pm-UncI の作用により 11 量体の c リングを形成することが分かっている^{66,67}。大腸菌内膜においても Pm-F_{0c} が c リングを形成するかどうか検証した。Pm-UncI をプラスミド上の T7 プロモーターから発現させた株から INV を調製した。この INV 存在下で Pure system により Pm-F_{0c} を *in vitro* 合成したが、c リングの形成は認められなかった (図 2-2 左図)。これは反応液中の放射性メチオニンが他のアミノ酸に比べて低濃度である (メチオニン以外のアミノ酸が 0.3 mM に対して [³⁵S] メチオニンは約 0.3 μM) ために c リング形成に十分量の Pm-F_{0c} が発現できなかったためであると考えた。そこで Pm-F_{0c} 発現量を増加させるために、反応液中に非放射性メチオニンを添加した。その結果、Pm-UncI 過剰発現株の INV において Pm-F_{0c} 11 量体の分子量約 90 kDa と一致するバンドが観察された (図 2-2 右図)。過去の報告では、c リング構造が TCA 処理により破壊されることが報告されている⁷²。この結果と一致して、Pm-UncI 過剰発現株の INV で観察された Pm-F_{0c} 11 量体の分子量と一致するバンドは TCA 処理により消失した。したがってこのバンドは c リングを示すものであると結論した。Pm-UncI を発現していない株から調製した INV および PL のみで調製したリポソームでは c リングは検出されなかった (図 2-2 右図)。これらの結果から、Pm-F_{0c} の 11 量体リング構造の形成には Pm-UncI が必須であることが確認されたと同時に、一定量の Pm-F_{0c} も必要となることが判明した。

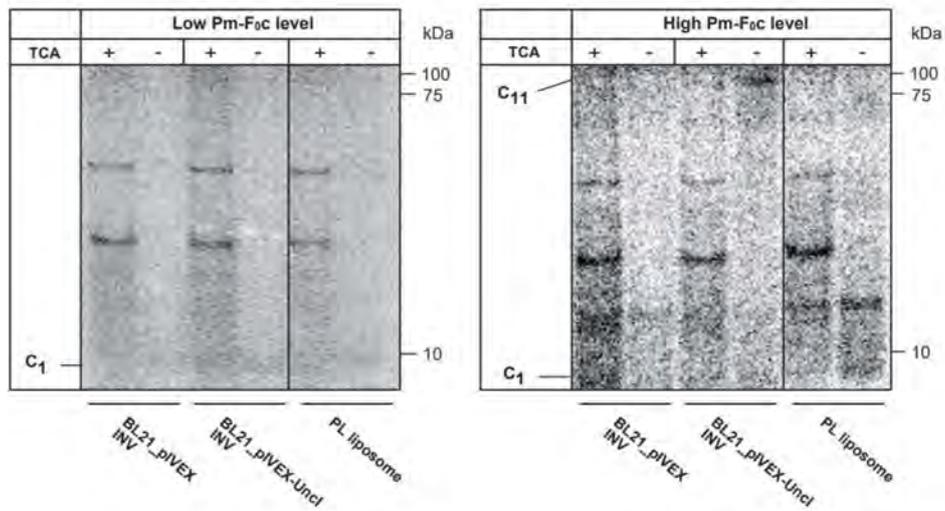


図 2-2 Pm-UncI および一定量の F_{0c} 存在下で 11 量体 c リングが形成される。

大腸菌 BL21 株に空ベクター (pIVEX) および Pm-UncI 発現プラスミド (pIVEX-UncI) を導入した株から「2-2. 材料と方法 ①②」で示した通りに調製した INV または PL のみで調製したリボソーム存在下で、Pure system により Pm-F_{0c} をラベル合成した。c リングの確認は「2-2. 材料と方法 ④」に示した方法で行った。各反応液を 37 度で 30 分間保温後、20 μl 中 3 μl を TCA 沈殿した。残りの反応液は 60,000 rpm で 1 時間超遠心し、膜小胞を回収した。各試料を SDS-PAGE に供した後、オートラジオグラフィーで Pm-F_{0c} を検出した。右図は 0.3 mM の非放射性メチオニン添加条件の結果を示す。

(3) Pm-F_{0c} の c リング形成には Pm-UncI だけではなく YidC も必要となる

Pm-UncI が Pm-F_{0c} の c リング形成に必須であるという INV での結果を踏まえて、精製因子のみによる Pm-F_{0c} の c リング形成の試験管内再構成を試みた。C 末端に 6×His タグを付加した Pm-UncI および YidC を TALON カラムでアフィニティ精製し (図 2-3 A)、各因子を PL リポソームに再構成した。これらのプロテオリポソームには DAG が含まれていないため、試験管内で合成した Pm-F_{0c} はプロテオリポソームに自発的に膜挿入すると考えられる。非放射性メチオニンを反応液に添加してリング形成が可能な量の Pm-F_{0c} を合成しても、Pm-UncI のみを組み込んだプロテオリポソーム存在下では Pm-F_{0c} の 11 量体は形成されなかった (図 2-3 B “Pm-UncI”)。一方、Pm-UncI に加えて YidC を組み込んだ場合では、TCA 処理により消失する c リングの形成が観察された (図 2-3 B “YidC/Pm-UncI”)。これらのことから Pm-F_{0c} の c リング形成は Pm-UncI と YidC 両方に依存することが判明した。さらに Pm-F_{0c} の膜挿入はプロテアーゼ・プロテクションアッセイでは解析できなかったが、DAG を含まない PL (プロテオ) リポソームでは Pm-UncI と YidC に依存した c リングが形成されることから、PL (プロテオ) リポソームに対し自発的に膜挿入することが示された。

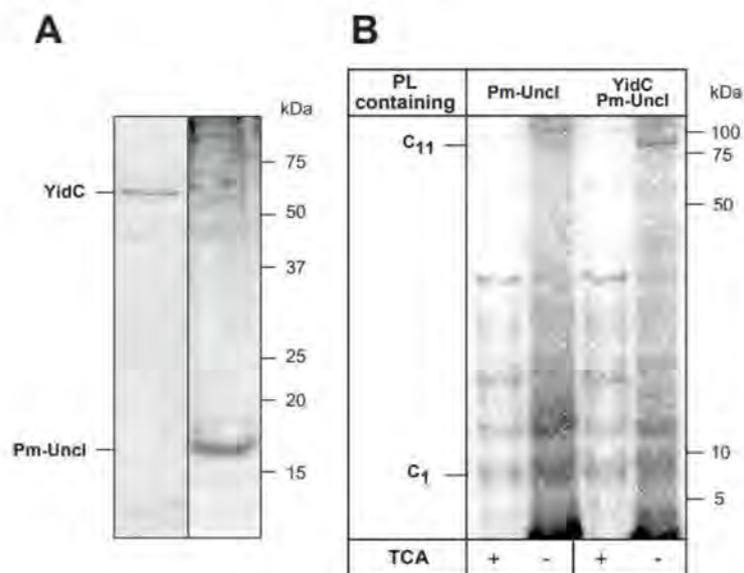


図 2-3 Pm-F_{0c} の 11 量体 c リング形成には Pm-UncI のみならず YidC も必要となる。

(A) TALON® (Cobalt) カラムでアフィニティ精製した YidC-His または Pm-UncI-His を CBB 染色した。(B) PL のみで調製したリボソームに精製した Pm-UncI 単体または Pm-UncI と YidC を同時に組み込んだプロテオリボソーム存在下で、Pure system により Pm-F_{0c} をラベル合成した。0.3 mM の非放射線メチオニンも添加した。c リング形成確認は「2-2. 材料と方法 ④」に示した方法で行った。各反応液を 37°C で 30 分間保温後、20 μl 中 3 μl を TCA 沈殿した。終濃度が 50 mM となるように残りの反応液に硫酸マグネシウムを添加して膜小胞を沈殿させた。各試料を SDS-PAGE に供した後、オートラジオグラフィーで Pm-F_{0c} を検出した。

(4) Pm-F_{0c} の膜挿入には MPIase が必須であり、YidC/Pm-UncI により c リングが形成される

我々は、Ec-F_{0c} の膜挿入には MPIase が必須であることを明らかにしている⁷³。Pm-F_{0c} の膜挿入においても MPIase が必須であるかどうかを調べた。自発的膜挿入を抑制するため、DAG を生理的濃度 (5%) 組み込んだ。MPIase 非存在条件では、YidC あるいは Pm-UncI のみを組み込んだプロテオリポソームだけではなく、(3) で c リングの形成が認められた YidC と Pm-UncI の両方を組み込んだ場合でも Pm-F_{0c} の c リングは観察されなかった (図 2-4)。また MPIase のみや、MPIase と YidC あるいは MPIase と Pm-UncI を同時に組み込んだ (プロテオ) リポソームでも、Pm-F_{0c} の c リングは観察されなかった (図 2-4) が、MPIase、YidC、Pm-UncI の全ての因子が揃ってはじめて、c リングの形成が観察された (図 2-4)。これらの結果から、Pm-F_{0c} の膜挿入には MPIase が必須であり、MPIase の作用により膜挿入した Pm-F_{0c} は YidC/Pm-UncI の作用により c リングとなることが示された。

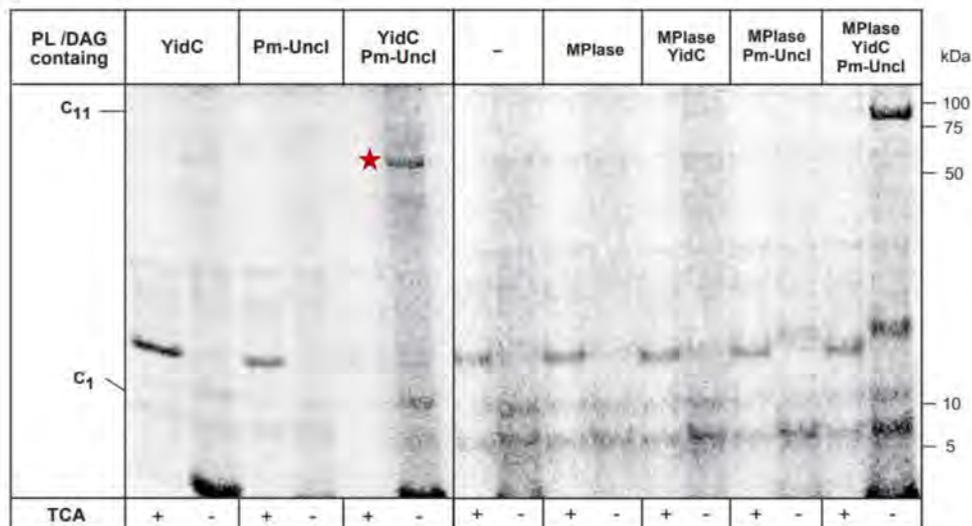


図 2-4 Pm-F_{0c} の c リング形成には MPlase/YidC/Pm-Uncl 全ての因子が必要である。

PL/DAG リポソームに、図に示した各因子を組み込んだ。各（プロテオ）リポソーム存在下で、Pure system により Pm-F_{0c} をラベル合成した。0.3 mM の非放射線メチオニンも添加した。c リング形成確認は「2-2. 材料と方法 ④」に示した方法で行った。各反応液を 37°C で 30 分間保温後、20 μl 中 3 μl を TCA 沈殿した。終濃度が 50 mM となるように残りの反応液に硫酸マグネシウムを添加して膜小胞を沈殿させた。各試料を SDS-PAGE に供した後、オートラジオグラフィーで Pm-F_{0c} を検出した。★で示したバンドは約 60 kDa の大きさであり、他の条件でも検出されているため、c リング形成とは無関係なバンドである。

2-4. 考察

第2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。本研究では、大腸菌リン脂質で調製したリポソームに生理的濃度のDAGを加えることにより膜タンパク質の無秩序な自発的膜挿入を抑制している。よって本実験で観察された一連の反応は生体内での反応を忠実に再現したものである。この条件下では、Pm-F₀cの膜挿入反応にはMPIaseが必須であり、そのcリング形成にはMPIaseに加えて、YidCおよびPm-UncIが必須であった。本研究および第1章におけるEc-F₀cの膜挿入解析の結果を踏まえると、MPIaseにより膜挿入されたPm-F₀c(図2-5 ①)はYidCに受け渡され、膜挿入反応が完了した後(図2-5 ②)、YidCとPm-UncI両方の作用によってフォールディング(図2-5 ③)、および11量体のcリング構造が形成される(図2-5 ④)という、MPIase、YidC、Pm-UncIの連続的な作用によるPm-F₀cの膜挿入から機能発現に至るまでの新たな作用モデルが提唱できる。

Pm-F₀cの膜挿入は、一般的な膜挿入解析法であるプロテアーゼ・プロテクションアッセイ⁶¹では正しく解析できなかった。しかしながら、DAG非存在下におけるPm-UncIとYidCに依存したPm-F₀cのcリング形成は、プロテオリポソームにDAGを加えると観察されなくなること、また自発的膜挿入を抑制した条件でのcリング形成にはPm-UncIとYidCのみでは不十分でありMPIaseが必須であったことから、本研究で観察したPm-F₀cのcリングの形成は細胞内における膜挿入反応を反映したものであり、その膜挿入にはMPIaseが必須であることが示された。

第1章におけるEc-F₀cの解析⁷³や当研究室における他の基質タンパク質の膜挿入解析⁵⁵から、MPIaseは直接相互作用した基質タンパク質を膜挿入させ、MPIaseにより膜挿入された基質タンパク質はYidCに受け渡された後、YidCにより膜挿入の後期段階が進行することが判明している。Pm-F₀cのcリング形成はMPIaseとYidCの両方が存在する場合のみ観察されたことから、Pm-F₀cの膜挿入もまたMPIaseとYidCの協調作用により進行

すると考えられる。また、YidCのみでは Pm-F_{0c} の c リングは形成されなかったことから、YidC 単独では基質タンパク質を膜挿入させることはできないと結論できる。YidC を欠損した大腸菌変異株では、Sec 非依存の膜挿入反応が阻害されるだけでなく、ポリトピック型膜タンパク質の高次構造の形成も阻害されることが知られている²¹。YidC は Pm-F_{0c} の c リング形成に必須であったことから、YidC は Pm-F_{0c} のプロトマーを c リング形成可能な三次構造に変化させる役割をもっていると考えられる。Ec-F_{0c} の c リング形成には Ec-Uncl は必須ではない⁷⁴ ことも、YidC は Ec-F_{0c} および Pm-F_{0c} どちらにおいても、膜挿入後期から高次構造形成にかけての段階で作用するという考えを支持している。一方、Pm-F_{0c} の c リング形成には MPIase に加え、YidC と Pm-Uncl の両方が必須であったことから、Pm-F_{0c} の三次構造の形成および c リング形成にはこれら 2 つの因子の協調作用が必須であることが示された。

大豆由来の PC から調製したリポソームを用いた研究では、Pm-F_{0c} の膜挿入および c リング形成は Pm-Uncl のみに依存した反応であると報告されている⁶⁶。一方、大腸菌リン脂質で調製したリポソームを用いた今回の研究では、Pm-Uncl のみでは Pm-F_{0c} の c リングは形成されず、MPIase や YidC が必須であった。この結論に至った論文で用いている PC リポソームは、大腸菌リン脂質で調製したリポソームと比較してより高い自発的膜挿入活性を保持していることが分かっている⁷⁵。これは、大腸菌の主要なリン脂質である PG や PE と比べて PC は脂質の親水的な頭部が大きいため、リン脂質間に大きな空間が生じてしまうためである⁷⁵⁻⁷⁷。PL リポソームを用いた本研究では膜挿入された Pm-F_{0c} は PK による消化を受けていた⁶⁶ のに対し、PC リポソームに膜挿入した Pm-F_{0c} は PK で消化されなかった。これは PC の親水的な頭部の大きさによるものであると推測できる。さらに、先の PC リポソームを用いた実験で使用した PC 標品の PC 含有量は 14~29% 程度であり、多くの脂質成分が混在している。これらの混在した膜成分に、Pm-F_{0c} の膜挿入やフォールディング、c リング形成を促進させる物質が含まれている可能性も考えられ

る。

本研究では生体内の膜挿入反応を忠実に再現した *in vitro* 再構成系を用いて、Pm-F₀C の合成から膜挿入反応だけでなく、複合体形成過程までの完全再構成に成功した。今後この再構成系により、より複雑かつ多数のサブユニットからなる巨大な膜タンパク質複合体の形成の分子機構がより詳細に解析できると期待される。

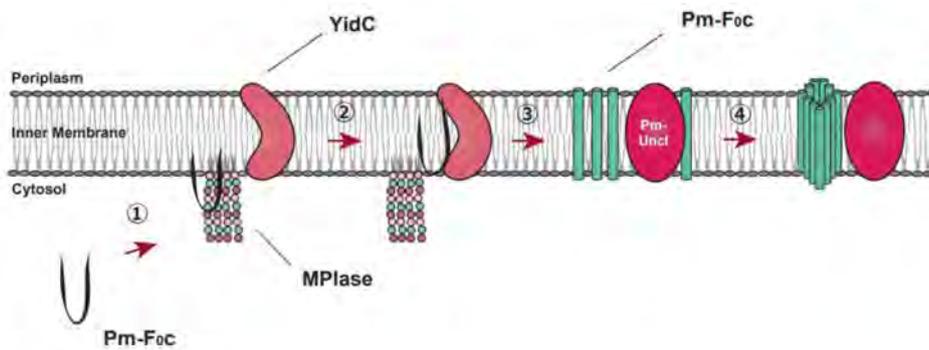


図 2-5 Pm-F₀c の膜挿入から 11 量体 c リング形成までを表したモデル図。

Pm-F₀c は MPIase の作用により膜挿入する (①)。YidC は膜挿入の後期段階から三次構造形成に関与する (②③)。三次構造となった Pm-F₀c は、Pm-UncI により 11 量体となり、c リングを形成する (④)。

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

3-1. 序論

TAT (Twin-Arginine Translocation) 膜透過反応は、細胞質で生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³⁹。大腸菌における TAT 膜透過反応の発見から 20 年以上が経過し、その分子機構は遺伝学的・生化学的に広く解析されてきた。TAT 膜透過反応はプロトン駆動力をエネルギー源とし、TatA、TatB、TatC によって形成されるトランスロコン (TatABC) を介して進行する³⁹。具体的には、TAT 基質は Sec 膜透過基質と同様に N 末端にシグナル配列を付加された前駆体として合成される^{41,42}。細胞質で生合成された TAT 基質は、TatBC 複合体によってシグナル配列が受容され⁷⁸、TatBC による TAT 基質の受容をきっかけとして TatBC-TAT 基質複合体に TatA が集合する。この TatA の集合は、プロトン駆動力を必要とする^{79,80}。環状のオリゴマー構造を形成した TatA は、TatBC-TAT 基質複合体と相互作用する^{81,82}。大腸菌に様々な分子量の TAT 基質タンパク質を発現させた条件での TatA のオリゴマー構造が解析された結果、その大きさは発現する基質タンパク質の分子量に応じて変化することが判明した⁸²。TatA は分子量 9.6 kDa の一回膜貫通タンパク質である。TatA の C 末端側には両親媒性の α ヘリックス構造が存在し、TAT 基質の成熟体部分と相互作用する⁸³。さらに、TAT 膜透過反応中に TatA はオリゴマー化して膜透過の孔を形成することも知られている^{79,84}。TatB は、分子量 18.5 kDa の一回膜貫通タンパク質であり、そのアミノ酸配列の約 50% は TatA の相同的である⁸⁵。TatB は TatC と 1:1 の複合体を形成し、TatC を安定化させる役割を果たす⁸⁶。TatC は分子量 28.9 kDa の六回膜貫通型タンパク質である。化学架橋実験から、TatC は TAT 基質のシグナル配列と直接相互作用することが知られている⁷⁸。TAT シグナル配列の RR 残基を KK 残基に置換した変異体は TatC と化学架橋されなかったことから、TatC は TAT シグナル配列の RR 残基を認識して TAT 基質の

シグナル配列と相互作用すると考えられる⁷⁸。TatA のパラログである TatE は TAT 膜透過反応に必須ではないが、TatA と機能的に互換性があると考えられている⁸⁷。TatE の生体内での存在量も、TatA と比較すると極めて少ない⁸⁷。しかし、いくつかの TAT 基質は TatE 欠損株において著しい膜透過阻害を示す⁸⁸。

上述のように各因子の詳細な機能が数多く判明しているにもかかわらず、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、TatABC 以外にも TAT 膜透過反応に必要な因子が存在し、その因子が TAT 膜透過反応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。本論文でこれまで述べてきたように、MPIase はタンパク質の膜挿入反応や膜透過反応全般に広く関与する。MPIase は膜タンパク質の膜貫通領域と相互作用して膜挿入反応を触媒するだけでなく、SecYEG とも相互作用してその 2 量体構造を変化させて SecYEG を活性化する³⁸。そのため本研究では、MPIase が TAT 膜透過反応において TAT 基質のシグナル配列の膜挿入や、TatABC 複合体の構造変化に関与する可能性を予想した。

本研究では、*in vivo* 実験系、*in vitro* 実験系の両面から MPIase が TAT 膜透過反応に関与しているかどうかを検証し、得られた知見を基に TAT 膜透過反応の再構成系の構築を行った。

3-2. 材料と方法

① 材料

第3章で使用した菌株を表3-1に、プラスミドを表3-2に、オリゴヌクレオチドを表3-3に示した。好熱性細菌の精製 F₀F₁-ATPase は車兪徹先生 (JAMSTEC) より供与された。pSTV28-TatABC プラスミドは山田美和先生 (岩手大学) より供与された。PL (*E. coli* Polar Lipid Extract)、DAG (1-2-dioloeyl-*sn*-glycerol)、Mini-Extruder は Avanti Polar Lipids, Inc.より購入した。OG は同仁化学研究所より購入した。Bio Beads SM-2 は Bio-Rad より購入した。[³⁵S] メチオニンと [³⁵S] システインの混合液 (43.5 TBq/mmol) 「EXPRES³⁵S Protein Labeling Mix」は株式会社パーキンエルマー・ジャパンより購入し、基質タンパク質の RI 標識に使用した。プロテイナーゼ K (PK) はロシュ・ダイアグノスティックス株式会社より購入した。無細胞タンパク質合成キット「*E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA」はプロメガ株式会社より購入した。MPIase²⁶、TatA、TatB、TatC⁵²の精製は、報告されている方法に倣って行った。INV は報告されている方法^{24,54}に倣って調製した。

表 3-1. 第3章で使用した大腸菌株

Strains	Relevant genotype and description	Reference
EK413	MC4100 <i>ara</i> ⁺	36
BL21 (DE3)	F ⁺ , <i>lon-11</i> , Δ(<i>ompT-nfrA</i>)885, Δ(<i>galM-ybhJ</i>)884, λ DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>] D46 [<i>mal⁺</i>]K-12(λ S) <i>hsdS10</i>	89
KS22	EK413 Δ <i>cdsA::cat</i>	31
KS23	EK413 Δ <i>ynbB</i> Δ <i>cdsA::cat</i>	31
KS46	BL21 (DE3) Δ <i>cdsA::cat</i> Δ <i>ynbB::kan</i>	31
IVEC3	MG1655 Δ <i>hsdR</i> Δ <i>endA</i> Δ <i>recA</i>	90
BW25113	Δ(<i>araD-araB</i>)567 Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568 Δ <i>lacZ4787</i> (:: <i>rrmB</i> - 3) <i>hsdR514 rph-1</i>	91
Δ TatA	BW25113 Δ <i>tatA::kan</i>	92

Δ TatB	BW25113 Δ <i>tatB::kan</i>	92
Δ TatC	BW25113 Δ <i>tatC::kan</i>	92
Δ TatE	BW25113 Δ <i>tatE::kan</i>	92

表 3-2. 第 3 章で使用したプラスミド

Plasmid	Relevant description	Ref.
pUSI2	Cloning vector containing <i>tac</i> promoter, ampicillin resistant	⁹³
pIVEX-2.3MCS	Cloning vector containing the T7 promoter, ampicillin resistant	Roche
pACYC184-Km	The <i>cat</i> gene on pACYC184 was replaced with the <i>kan</i> gene.	³¹
pTac-SufI-His	<i>his₆-sufI</i> was cloned into pUSI2 under the control of <i>tac</i> promoter	This study
pTac-TorA-His	<i>his₆-torA</i> was cloned into pUSI2 under the control of <i>tac</i> promoter	This study
pTac-TorA-GFP-His	<i>his₆-gfp</i> with TorA signal sequence was cloned into pUSI2 under the control of <i>tac</i> promoter	This study
pTac-SufI (KK) -His	<i>his₆-sufI (kk)</i> was cloned into pUSI2 under the control of <i>tac</i> promoter	This study
pTac-TorA (KK) -His	<i>his₆-torA (kk)</i> was cloned into pUSI2 under the control of <i>tac</i> promoter	This study
pTac-TorA-GFP (KK) -His	<i>his₆-gfp</i> with TorA (KK) signal sequence was cloned into pUSI2 under the control of <i>tac</i> promoter	This study
pTac-TatABC	<i>tatABC</i> was cloned into pUSI2 under the control of <i>tac</i> promoter	This study
pTet-SufI-His	<i>sufI</i> was cloned into pACYC184-Km under the control of <i>tet</i> promoter	This study
pTac-TatA-His	<i>his₆-tatA</i> was cloned into pUSI2 under the control of <i>tac</i> promoter	This study
pTac-TatB-His	<i>his₆-tatB</i> was cloned into pUSI2 under the control of <i>tac</i> promoter	This study
pTac-TatC-His	<i>his₆-tatC</i> was cloned into pUSI2 under the control of <i>tac</i> promoter	This study
pTac-TatE-His	<i>his₆-tatE</i> was cloned into pUSI2 under the control of <i>tac</i> promoter	This study

pT7-TatABC	promoter <i>tatABC</i> was cloned into pIVEX-2.3MCS under the control of T7 promoter	This study
pT7-SufI	<i>sufI</i> was cloned into pIVEX-2.3MCS under the control of T7 promoter	This study
pT7-SufI (KK)	<i>sufI</i> (KK) was cloned into pIVEX-2.3MCS under the control of T7 promoter	This study
pAra-CdsA	<i>bla</i> on pKQ2-CdsA was replaced with <i>spc</i>	31

表 3-3. 第 3 章で使用したオリゴヌクレオチド

Name	Sequence (5'→3')	Purpose
tac-TorA-His 5' in	TTTTGGATCCTAGGAGGTTTAAATTTATGAA CAATAACGATCTCT	Construction of pTac-TorA-His
tac-TorA-His 3' in	TTTTGGTACCTTTTCAGTGATGGTGGTGATG GTGTGATTTACCTGCGACGCGGG	Construction of pTac-TorA-His
tac-SufI-His 5' in	TTTTGGATCCTAGGAGGTTTAAATTTATGTC ACTCAGTCGGCGTCAG	Construction of pTac-SufI-His
tac-SufI-His 3' in	AAAGGTACCAAATTAGTGATGGTGGTGA TGCGGTACCGGATTGACCAACAGTTGCC	Construction of pTac-SufI-His
tac-TG-His 3' in	TTTTGGTACCTTTTTAATGGTGATGGTGATG GTGTTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTG	Construction of pTac-TorAGFP-His
tac-T/S/G 5' ve	TCATACATAAAATTTAAACCTCCTAGGATCC	Construction of pTac-TorA-His/pTac-SufI-His/pTac-TorAGFP-His
tac-TorA-His 3' ve	CCCGCGTCGCAGGTGAAATCACACCATCACC ACCATCACTGAAAAGGTACCAAAA	Construction of pTac-TorA-His
tac-SufI-His 3' ve	GGGCAACTGTTGGTCAATCCGGTACCGCATC ACCATCACCATCACTAATTTGGTACCTTT	Construction of pTac-SufI-His
tac-TG-His 3' ve	CATCACCATCACCATCACTAAAAAGGTACCAC CAGCGATATCCCGAACTAAAAAGGTACC	Construction of pTac-TorAGFP-His
tac-TatA-His 5' in	TTTTGGATCCTAGGAGGTTTAAATTTATGGG TGGTATCAGTATTTGGCAGTTATTGATTA	Construction of pTac-TatA-His
tac-TatA-His 3' in	TTTTGGTACCTTTTTAGTGATGGTGGTGGTG ATGCACCTGCTCTTTATCGTGGCGCTTCG	Construction of pTac-TatA-His
tac-TatB-His 5' in	TTTTGGATCCTAGGAGGTTTAAATTTGTGTT	Construction of pTac-TatB-His

	TGATATCGGTTTTAGCGAACTGCTATTGG	His
tac-TatB-His 3' in	TTTTGGTACCTTTTTAGTGATGGTGATGGTG ATGCGGTTTATCACTCGACGAAGGGGAAG	Construction of pTac-TatB- His
tac-TatC-His 5' in	TTTTGGATCCTAGGAGGTTTAAATTTATGTC TGTAGAAGATACTCAACCGCTTATCACGC	Construction of pTac-TatC- His
tac-TatC-His 3' in	TTTTGGTACCTTTTTAGTGATGGTGATGGTG ATGTTCTTCAGTTTTTTCGCTTTCTGCTT	Construction of pTac-TatC- His
tac-TatE-His 5' in	TTTTGGATCCTAGGAGGTTTAAATTTATGGG TGAGATTAGTATTACCAAAGCTGGTAG	Construction of pTac-TatE- His
tac-TatE-His 3' in	TTTTGGTACCTTTTCAGTGATGGTGATGGTG ATGCTCTTTATGAGAGAGCTTTTCAGCCT	Construction of pTac-TatE- His
tac-TatABC 5' in	GGATCCTAGGAGGTTTAAATTTATGGGTGGT ATCAGTATTTGGCAGTTATTGATTATTGC	Construction of pTac- TatABC
tac-TatABC 3' in	GGTACCTTTTTATTCTTCAGTTTTTTCGCTT TCTGCTTCAGCGTCGTTTTCTCTTCCCG	Construction of pTac- TatABC
tac-TatABC 5' ve	AATACTGATACCACCATAAAATTTAAACCTCC TAGGATCC	Construction of pTac- TatABC
tac-TatABC 3' ve	AGCGAAAAAACTGAAGAATAAAAAGGTACCA CCAGCGATATCCCGAACTAAAAAGGTACC	Construction of pTac- TatABC
TorA (KK) 5'	TCAGGCATCA AAAAAGCGTT TTCTGGCACA ACTCGGCGGC	Construction of pTat-TorA (KK) -His
TorA (KK) 3'	AACGCTTTTTTGATGCCTGAAAGAGATCGTT ATTGTTTCAT	Construction of pTat-TorA (KK) -His
SufI (KK) 5'	ATGTCACTCA GTAAAAAGCA GTTCATTTCAG GCATCGGGGA TTG	Construction of pTat-SufI (KK) -His
SufI (KK) 3'	CTGCTTTTTACTGAGTGACATATGTATATCT CCTTCTTAAAGT	Construction of pTat-SufI (KK)-His and pT7-SufI (KK)
T7-SufI 5' in	TTTTAAAACATATGTCACTCAGTTCGGCG TCAGTTCATTTCAGGCAT	Construction of pT7-SufI
T7-SufI 3' in	TTTCTCGAGAAATTACGGTACCGGATT GACCAACAGTTGCCCAAT	Construction of pT7-SufI
T7-SufI 5' ve	AATGAACTGACGCCGACTGAGTGACATATGT ATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATT	Construction of pT7-SufI
T7-SufI 3' ve	TTGGTCAATCCGGTACCGTAATTTCTCGAGC GAGCTCCCGGGGGGGTTCTCAT	Construction of pT7-SufI
pT7-SufI (KK) 3'	CTGCTTTTTACTGAGTGACATATGTATATCT	Construction of pT7-SufI

	CCTTCTTAAAGT	(KK)
T7-TatABC 5' in	TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATA TGGGTGGTATCAGTATTTGGCAGTTATTG	Construction of pT7-TatABC
T7-TatABC 3' in	CCCCCGGGGAGCTCGCTCGAGTCGACTTTTT ATTCTTCAGTTTTTTTCGCT TTCTGCTTCA	Construction of pT7-TatABC
T7-TatABC 5' ve	CAATAACTGCCAAATACTGATACCACCCATAT GTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAA	Construction of pT7-TatABC
T7-TatABC 3' ve	AATAACTGCCAAATACTGATACCACCCATAAA TTAAAGCGTCCTGAATAC CAGTAACAAC	Construction of pT7-TatABC

② プラスミドの構築

第3章で使用したプラスミドは、IVEC3株を用いた *in vivo* クローニング⁹⁰により構築した。PCR用の合成プライマーの配列に20~40 bp程度のベクター側と相同的な配列を付加し、各プライマーで増幅したDNA断片をIVEC株に導入すると、菌株内での相同的な配列の組み換えにより目的の配列をベクターにクローニングすることができる。pTac-TorA-His、pTac-SufI-His、pTac-TorA-GFP-His、pTac-TatA-His、pTac-TatB-His、pTac-TatC-His、pTac-TatE-His、pTac-TatABCは以下の手順で構築した。*torA* 遺伝子、*sufI* 遺伝子、*tatA/B/C/E*の各遺伝子、および *tatABC* オペロンの遺伝子はEK413株の染色体遺伝子を鋳型として、*torA-gfp* 遺伝子はPcspB-TorAss-GFP⁹⁴を鋳型としてPCRで増幅した。*torA* 遺伝子の増幅には tac-TorA-His 5' in/ tac-TorA-His 3' in をプライマーとして用いた。*sufI* 遺伝子の増幅には tac-TorA-His 5' in/ tac-TorA-His 3' in をプライマーとして用いた。*torA-gfp* 遺伝子の増幅には tac-TorA-His 5' in/ tac-TG-His 3' in をプライマーとして用いた。*tatA* 遺伝子 tac-TatA-His 5' in/ tac-TatA-His 3' in をプライマーとして用いた。*tatB* 遺伝子 tac-TatB-His 5' in/ tac-TatB-His 3' in をプライマーとして用いた。*tatC* 遺伝子 tac-TatC-His 5' in/ tac-TatC-His 3' in をプライマーとして用いた。*tatABC* 遺伝子 tac-TatABC-His 5' in/ tac-TatABC-His 3' in をプライマーとして用いた。*torA* 遺伝子を導

入するベクターは pUSI2 を鋳型として tac-T/S/G 5' ve/ tac-TorA-His 3' ve をプライマーとして増幅した。 *sufI* 遺伝子を導入するベクターは pUSI2 を鋳型として tac-T/S/G 5' ve/ tac-SufI-His 3' ve をプライマーとして増幅した。 *torA-gfp* 遺伝子を導入するベクターは pUSI2 を鋳型として tac-T/S/G 5' ve/ tac-TG-His 3' ve をプライマーとして増幅した。 *tatA/B/C/E* の各遺伝子、および *tatABC* 遺伝子を導入するベクターは pUSI2 を鋳型として tac-TatABC 5' ve/ tac-TatABC 3' ve をプライマーとして増幅した。各 PCR 産物を IVEC3 株に導入後、アンピシリン耐性を獲得した菌からプラスミドを選別した。 pTac-TorA (KK) -His は pTac-TorA-His を鋳型として、TorA (KK) 5'/TorA (KK) 3' プライマーを用いて PCR により増幅した遺伝子を IVEC3 株に導入することで構築した。 pTac-SufI (KK) -His は pTac-SufI-His を鋳型として、SufI (KK) 5'/SufI (KK) 3' プライマーを用いて PCR により増幅した遺伝子を IVEC3 株に導入することで構築した。 pTac-TorA-GFP-(KK) -His は pTac-TorA-GFP-His を鋳型として、TorA (KK) 5'/TorA (KK) 3' プライマーを用いて PCR により増幅した遺伝子を IVEC3 株に導入することで構築した。 pTet-SufI-His、 pTet-SufI (KK) -His は、pTac-SufI-His および pTac-SufI (KK) -His から SufI-His・SufI-His (KK) をコードする遺伝子領域を BamHI/SalI 処理によって切り出し、 pACYC-Km の BamHI/SalI 部位に連結することで構築した。

pT7-SufI は以下に示す方法で構築した。 *sufI* 遺伝子は EK413 株の染色体遺伝子を鋳型として T7-SufI 5' in/T7-SufI 3' in プライマーを用いて PCR により増幅した。 *sufI* 遺伝子を導入するベクターは pIVEX2.3-MCS を鋳型として T7-SufI 5' ve/T7-SufI 3' ve プライマーを用いて PCR により増幅した。各 PCR 産物を IVEC3 株に導入後、アンピシリン耐性を獲得した菌からプラスミドを抽出した。各遺伝子の導入は、抽出したプラスミドを NdeI/XhoI で制限酵素処理し、導入した目的の遺伝子と同じ長さの DNA 断片が切り出されるかどうかで判断した。 pT7-SufI (KK) -His は pT7-SufI-His を鋳型として、SufI (KK) 5'/ pT7-SufI (KK) 3' を用いて PCR により増幅した遺伝子を IVEC3 株に導入することで構

築した。pT7-TatABC は以下に示す方法で構築した。*tatABC* 遺伝子は EK413 株の染色体遺伝子を鋳型として T7-TatABC 5' in/T7-TatABC 3' in プライマーを用いて PCR により増幅した。*tatABC* 遺伝子を導入するベクターは pIVEX2.3-MCS を鋳型として T7-TatABC 5' ve/T7-TatABC 3' ve プライマーを用いて PCR により増幅した。各 PCR 産物を IVEC3 株に導入後、アンピシリン耐性を獲得した菌からプラスミドを選別した。

③ CdsA の枯渇

KS22/pAra-CdsA 株、KS23/pAra-CdsA 株、KS46/pAra-CdsA 株は 0.002% アラビノースを含む LB 培地で一晚、37°C で培養した。培養液を LB 培地で 5 回洗浄後、0.2% アラビノース添加/非添加培地にそれぞれ 1/1000 希釈で植菌し、37°C で培養した。アラビノース非添加培地において生育の阻害が観察されてから 2 時間後に各試料を調製した。TAT 基質を過剰発現させる場合は、この後に 1 mM IPTG を添加しさらに 1 時間培養し、各試料を調製した。

④ パルス・チェイス実験

LB 培地で OD_{600 nm} ~ 0.5 まで培養した菌を集菌後、メチオニン、システインを除く 18 種類のアミノ酸 (各 0.1 mM)、0.1% Yeast extract を含む M9 最少培地に懸濁した。さらに 1 時間培養した後、^[35S]メチオニン-システインで 30 秒間 SufI-His を標識した。標識は終濃度が 12 mM となるように非放射性メチオニン、システインを加えて終了した。各チェイス時間で 500 µl の培養液を分取し、終濃度 10% になるように TCA を加えた。氷上で 30 分静置後、16,000 x g で 5 分間遠心した。遠心して得られた沈殿をアセトン、ジエチルエーテルで洗浄した。沈殿を乾燥後、50 µl の 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% SDS, 1 mM EDTA に懸濁し、95°C で 3 分間加熱した。1 ml の 50 mM Hepes-KOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF を加えた後、16,000 x g で 5 分間遠心

し、上清を回収した。回収した上清に 10 μ l の TALON レジンを加え、4°C で 1 時間攪拌した。3,000 x g で 30 秒遠心し、TALON レジンを回収後、500 μ l の 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 により TALON レジンを洗浄した。遠心により TALON レジンを回収後、500 μ l の 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100 で TALON レジンを洗浄した。3,000 x g で 5 分間遠心し樹脂を回収後、20 μ l の SDS-PAGE サンプルバッファーを加え、TALON レジンに結合した SufI-His の前駆体と成熟体を溶出した。放射活性のあるバンドは、Phosphorimager (GE Healthcare) を用いて検出し、Image Quant (GE Healthcare) により定量した。

⑤ スフェロプラストの調製と分画

LB 培地で OD_{600 nm} ~ 0.5 まで 37°C で培養後、1 mM IPTG を添加して TAT 基質の発現を誘導した。その後 2,400 x g で 5 分遠心し、全量集菌した。沈殿に 5ml の 0.75 M スクロース, 10 mM Tris-HCl pH 7.5 を添加して懸濁し、2,400 x g で 5 分遠心して沈殿を回収した。1 ml の 0.75 M スクロース, 10 mM Tris-HCl pH 7.5 および 2 mg/ml のリゾチーム溶液を添加し懸濁した。氷上で 5 分静置後、合計 2ml になるように 1.5 mM EDTA pH 8.0 を 10 分間等間隔で滴下した。その後溶液のうち 1 ml を 15,000 x g で 1 分遠心して沈殿と上清を分けて回収した。スフェロプラスト画分である沈殿は 500 μ l の水に懸濁し、10% TCA を加えて氷上に静置した。ペリプラズム画分である上清は 500 μ l 分注し、10% TCA を加えて氷上に静置した。全サンプルを 15,000 x g で 5 分間遠心分離を行い、沈殿を回収したのちアセトンで洗浄した。さらに 15,000 x g で 5 分間遠心分離して沈殿を回収した。乾燥した沈殿をローディング緩衝液 (2.5% (w/v) SDS、25% (v/v) グリセロール、25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.2、2.5% (v/v) 2-メルカプトエタノール、0.0125% (w/v) ブロモフェノールブルー) に溶解させ、95°C で 5 分間加熱した後 SDS-PAGE で分離した。SDS-ゲルは 12.5% アクリルアミド/0.27% *N,N*-ビスメチレンアクリルアミドを用いて作製

した。

⑥ (プロテオ) リポソームの調製

リン脂質は N₂ ガスで溶媒をある程度揮発させた後、真空状態で遠心して乾燥させた。乾燥後、20 mg/ml になるように Buffer A (50 mM Hepes-KOH, pH 7.6, 1 mM DTT) に懸濁し、超音波処理してリポソームを調製した。DAG 含有リポソーム、MPIase/DAG リポソームは報告されている方法に従って調製した⁵⁸。TatABC/F₀F₁-ATPase 含有リポソームは以下の手順で調製した。OG でリン脂質を可溶化し、氷上で 20 分静置した後 200 mg の Bio Beads-SM2 を添加し、4°C で 30 分間ゆっくり回転させた。この溶液中に精製 TatA、TatB、TatC を加えてさらに 30 分間 4°C で回転させ、300 mg の Bio Beads-SM2 を追加し、一晩 4°C で回転させた後に Bio-Beads-SM2 を除去した。TatABC/F₀F₁-ATPase 含有プロテオリポソームと MPIase/DAG リポソームとの融合は報告されている方法⁵⁸に従って行った。融合処理後、Mini-Extruder でリポソームの拡張を行った。Polycarbonate Membranes (ポアサイズ 0.8 μm) を Mini-Extruder 内に装着し、シリンジ内にリポソーム溶液を封入後、25 回左右にシリンジを動かして拡張した。調製した (プロテオ) リポソームは 4°C で保管した。

⑦ タンパク質膜透過活性測定

in vitro タンパク質膜透過測定は、報告されている方法⁵⁸に倣って以下のように行った。基質タンパク質の合成は、INV または (プロテオ) リポソーム存在下で *E. coli* T7 S30 Extract system を用いて行った。反応溶液 20 μl 中に [³⁵S] メチオニン、プラスミド DNA、INV または (プロテオ) リポソームを混合し、37°C で 30 分間保温して基質タンパク質の RI ラベル合成と膜透過反応を行った。ただしリポソームは反応開始時に、INV は反応開始 5 分後に反応系に加えた。反応終了後、溶液の一部 (-PK 用: 3 μl) にはすぐに

10% TCA を 3 μ l 添加し、5 分以上氷上に放置し、基質タンパク質を沈殿させた。溶液の残りのうち 15 μ l (+PK) は、等量の 1 mg/ml プロテイナーゼ K (PK) を加え、25°C で 20 分間保温した。終濃度 5% となるように TCA を添加後、PK を完全に失活させるために 56°C で 5 分間保温した。その後 5 分以上氷上に放置し、基質タンパク質を沈殿させた。全サンプルを 15,000 x g で 5 分間遠心分離を行い、沈殿を回収したのちアセトンで洗浄した。さらに 15,000 x g で 5 分間遠心分離して沈殿を回収した。乾燥した沈殿をローディング緩衝液 (2.5% (w/v) SDS、25% (v/v) グリセロール、25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.2、2.5% (v/v) 2-メルカプトエタノール、0.0125% (w/v) プロモフェノールブルー) に溶解させ、95°C で 5 分間加熱した後 SDS-PAGE で分離した。SDS-ゲルは 12.5% アクリルアミド/0.27% *N,N*-ビスメチレンアクリルアミドを用いて作製した⁵⁹。電気泳動後、ゲルを 10% (w/v) 酢酸で固定し、乾燥させ、RI 標識した基質タンパク質のバンドを Phosphorimager (GE Healthcare) で検出した。

⑧ その他

INV 調製後のタンパク質定量は、ウシ血清アルブミンを標準サンプルとして報告されている方法⁶⁰に倣って行った。リン脂質の分析は TLC により報告されている方法²⁶に倣って以下のように行った。Sol. C (クロロホルム：エタノール：水=3：7：4) を移動相として、アニスアルデヒド-硫酸で染色した。また、イムノブロットィングによる MPIase の検出は報告されている方法²⁷に倣って行った。

3-3. 結果

(1) MPIase は TAT 膜透過反応に関与する： *in vivo* 実験系における検証

TAT 膜透過反応に MPIase が関与するという仮説を検証するため、MPIase の枯渇が TAT 膜透過に及ぼす影響を調べた。野生株 (EK413) 株では、シグナル配列が切断された TAT 基質 SufI、TorA の成熟体が観察された (図 3-1 A) ことから、本実験系での膜透過の進行が示唆された。TAT 基質の膜透過にはシグナル配列中の 2 個の連続したアルギニン残基 (RR) が必須であり、これをリジン残基 (KK) に置換すると膜透過反応が進行しない^{42,43}。そこで、EK413 株に SufI (KK) または TorA (KK) 変異体を発現させると成熟体は観察されなかった (図 3-1 B)。これらのことから、成熟体の出現は TAT 膜透過反応の進行を示すと考えられる。プラスミドから TatABC を過剰発現させると、SufI 成熟体量は EK413 株と比較してある程度増加した (図 3-1 A “EK413/pTet-TatABC/pTac-SufI-His”) ことから、SufI の膜透過が TatABC 依存であることを支持している。IPTG の添加により SufI を過剰発現した場合では前駆体量の増加は見られたものの、SufI 成熟体量はほとんど変化しなかった (図 3-1 A)。これは膜透過活性が飽和していることを示している。また、過剰量発現した SufI が凝集してしまい膜透過できなくなった可能性も考えられる^{42,95,96}。MPIase 生合成反応の第一段階の反応は CdsA/YnbB により触媒される。KS23 株では、染色体上の *cdsA/ynbB* 両遺伝子が破壊されている。CdsA は菌の生育に必須であるので、*cdsA* 遺伝子をプラスミド上のアラビノース・プロモーターに連結して CdsA を発現させている (pAra-CdsA)。この菌をアラビノース非存在下で培養すると CdsA を枯渇することができる。KS23/pAra-CdsA 株を CdsA 発現条件または枯渇条件で培養して MPIase 発現量を調べたところ、CdsA 枯渇条件では MPIase 量が著しく減少していた (図 3-1 C)。MPIase 発現条件では EK413 株と同様に SufI 成熟体が観察された (図 3-1 A “+MPIase”)。一方、MPIase 枯渇条件下では SufI 成熟体が一切観察されず、SufI 前駆体のみが検出された (図 3-1 A “Δ MPIase”)。MPIase 枯渇による膜透過阻害は、TorA でも同

様に観察された (図 3-1 D)。さらにパルス・チェイス実験を行って SufI の膜透過を詳細に解析した結果、EK413 株では SufI が 10 分以内にすみやかに膜透過していた (図 3-2 左上図)。KS23/pAra-CdsA 株では、アラビノース存在下で培養して CdsA を発現させたにもかかわらず、EK413 株と比較して SufI の膜透過速度は遅くなった (図 3-2 左下図)。この理由については後述する。また KS23/pAra-CdsA 株をアラビノース非存在下で培養した場合、EK413 株に SufI (KK) を発現させた場合 (図 3-2 右上図) と同様に、膜透過は全く進行しなかった (図 3-2 右下図)。これらの結果から、MPIase が TAT 膜透過反応に関与することが示された。

続いて、MPIase 枯渇時の TAT 基質の局在を調べた。図 3-1 で用いたアラビノース存在/非存在下で培養した KS23/pAra-CdsA 株をスフェロプラスト化し、ペリプラズム画分を調製した。このとき膜透過した TAT 基質の成熟体はペリプラズム画分に回収され、膜透過しなかった前駆体はスフェロプラスト画分に回収される。ペリプラズムに局在する β -ラクタマーゼおよび細胞質に局在する SecB が、それぞれペリプラズム画分とスフェロプラスト画分に回収されているため、分画が正しく行われていることが示された。MPIase 存在下では、TorA、SufI とともに成熟体がペリプラズム画分に回収された一方、MPIase 非存在下ではスフェロプラスト画分に前駆体が観察された (図 3-3)。これらの結果から、MPIase 枯渇により TAT 膜透過が阻害されることが改めて示された。

TAT 膜透過反応を可視化するため、蛍光顕微鏡による観察を行った。これまでの実験で用いた KS23/pAra-CdsA 株に、TorA のシグナル配列を融合した緑色蛍光タンパク質 GFP (TorA-GFP) をプラスミドから発現させた。KS23/pAra-CdsA 株をアラビノース存在下で培養した場合では、細胞の輪郭に沿った TorA-GFP の蛍光が観察された (図 3-4 左図)。これは細胞質で合成され膜透過した TorA-GFP がペリプラズムに蓄積し、細胞輪郭が強い蛍光を示したためである。対してアラビノース非存在下で培養した MPIase 枯渇条件下では、EK413 株に TorA (KK) -GFP 変異体を発現させた場合 (図 3-4 右図) と同様に、細胞

輪郭に沿った蛍光は観察されず細胞質全体が発光していた (図 3-4 中央図)。これは MPIase が枯渇したために TorA-GFP の膜透過反応が進行せず細胞質内に蓄積したことを示している。さらに MPIase 枯渇条件下では、細長く伸びた状態の細胞が多く観察された。この表現型は TatA 等の Tat 必須因子欠損株でよく見られるものである⁹⁷。これらの結果から、蛍光顕微鏡観察においても MPIase 枯渇による TAT 膜透過反応の阻害が観察された。

MPIase 枯渇が TAT 膜透過反応に及ぼす影響を、シグナル配列の切断を指標とした膜透過反応の解析や細胞分画、蛍光顕微鏡による観察という 3 種類の異なる手法から検証した。すべての解析において、MPIase 枯渇条件では TAT 膜透過反応が全く進行しないことが判明した。したがって、MPIase は *in vivo* において TAT 膜透過反応に関与することが明らかになった。

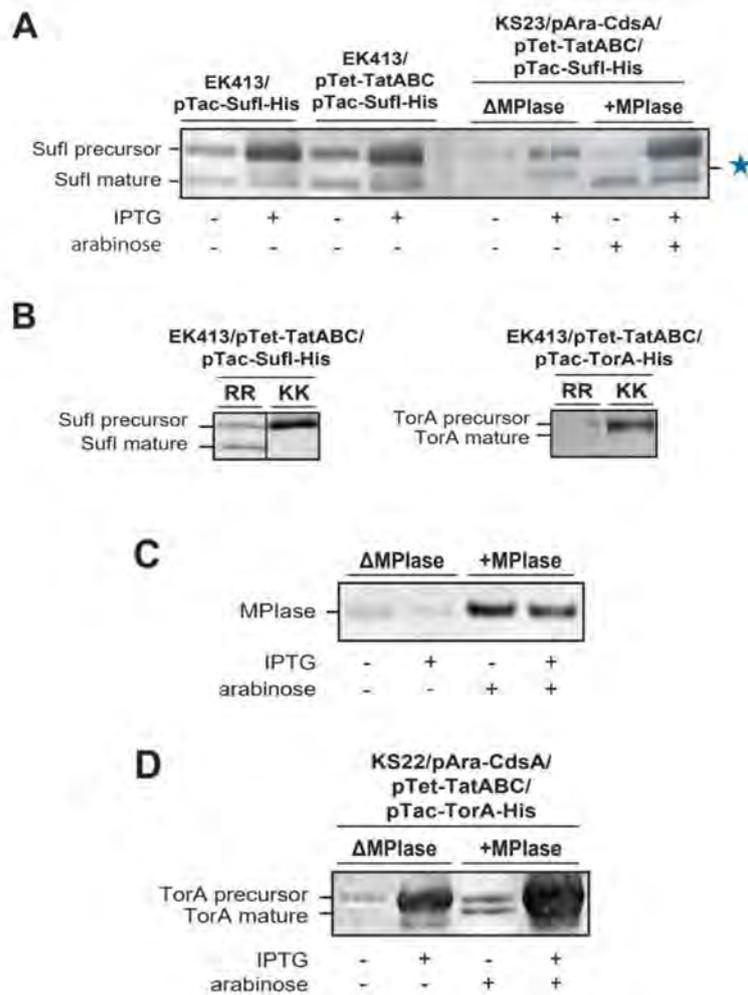


図 3-1 MPlase 枯渇が Tat 基質の膜透過に及ぼす影響。

(A) 各株を $OD_{600\text{ nm}} \sim 0.5$ まで培養後 1 mM IPTG を添加し Tat 基質の発現を誘導した。さらに 1 時間培養した後 TCA 処理し、イムノブロッティングにより各 Tat 基質を検出した。KS23/pAra-CdsA 株における CdsA の枯渇は「3-2. 材料と方法 ③」に示す通り行った。(B) 各株を 37°C で $OD_{600\text{ nm}} \sim 0.5$ まで培養後 TCA 処理し、イムノブロッティングにより各 Tat 基質を検出した。(C) KS23/pAra-CdsA 株を (A) に示すように培養後、イムノブロッティングにより MPlase を検出した。(D) KS22/pAra-CdsA 株を (B) に示すように培養後、イムノブロッティングにより TorA を検出した。★は、Sufl 前駆体が過剰量蓄

積したことによる分解物である。

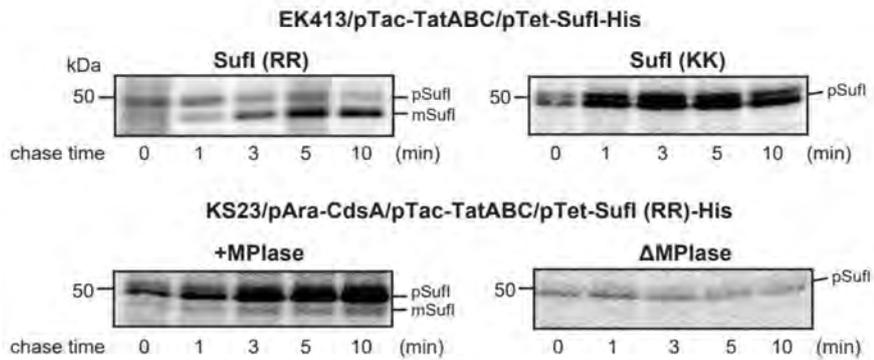


図 3-2 パルス・チェイス解析による SufI の膜透過反応の追跡。

各株を M9 最少培地で 37°C で培養後、「3-2. 材料と方法 ④」に示した手順でパルス・チェイス実験を行った。SufI は低コピープラスミドの *tet* プロモーターから恒常的に発現させた (pTet-SufI-His)。TatABC はプラスミドの *tac* プロモーターから発現させた (pTac-TatABC)。SufI はオートラジオグラフィで検出した。“pSufI” は SufI 前駆体、“mSufI” は SufI 成熟体を示す。

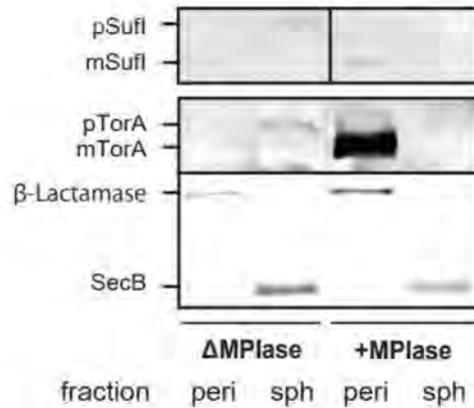


図 3-3 菌のスフェロプラスト化による分画実験。

KS23/pTet-TatABC/pTac-SufI-His 株および KS23/pTet-TatABC/pTac-TorA-His 株を 37°C で OD_{600 nm} ~ 0.5 まで培養後 1 mM IPTG を添加し、TAT 基質の発現を誘導した。さらに 1 時間培養後、「3-2. 材料と方法 ⑤」に示す方法によりスフェロプラスト画分 (sph) およびペリプラズム画分 (peri) に分画した。KS23/pAra-CdsA 株における CdsA の枯渇は「3-2. 材料と方法 ③」に示す通り行った。イムノブロッティングにより各 TAT 基質および β-ラクタマーゼ、SecB を検出した。“pSufI” は SufI 前駆体、“mSufI” は SufI 成熟体、“pTorA” は TorA 前駆体、“mTorA” は TorA 成熟体を示す。

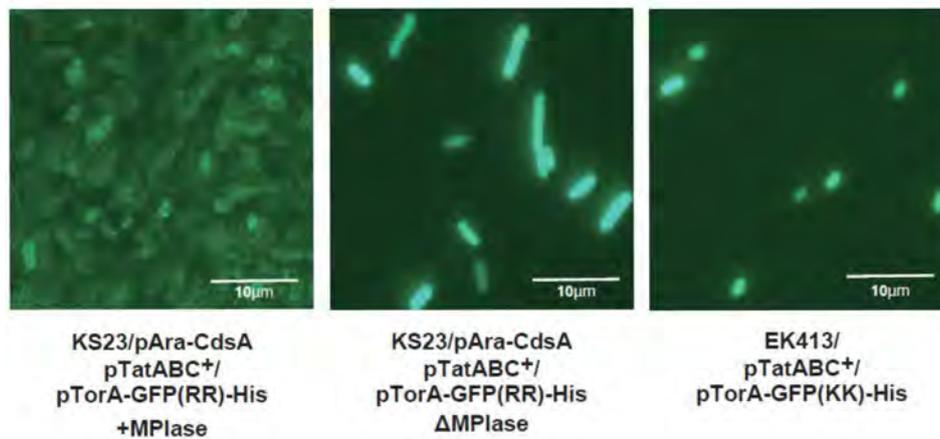


図 3-4 蛍光顕微鏡による TAT 膜透過反応の確認。

各株を 37°C で OD_{600 nm} ~ 0.5 まで培養後、蛍光顕微鏡で観察した。KS23/pAra-CdsA 株における CdsA の枯渇は「3-2. 材料と方法 ③」に示す通り行った。

(2) MPIase は TAT 膜透過反応に関与する： *in vitro* 実験系における検証

TAT 膜透過反応における MPIase の関与をより詳細に調べるため、INV を用いて TAT 膜透過反応を *in vitro* 実験系により解析した。INV への TAT 膜透過反応には、トランスロコン TatABC を過剰発現させる必要があることが報告されている⁴²。そのため、BL21 (DE3) 株にプラスミド上の T7 プロモーターから TatABC を過剰発現させた (BL21 (DE3) /pT7-TatABC 株)。またコントロールベクターを導入した株 (BL21 (DE3) /pIVEX) 株も構築した。それぞれの株から調製した INV 存在下で、^[35S] メチオニンで標識した SufI を合成した。膜透過反応はプロテアーゼ・プロテクションアッセイにより解析した。これまでの報告と一致して BL21 (DE3) /pT7-TatABC 株では、BL21 (DE3) /pIVEX 株では観察されなかった PK 消化を免れた SufI のバンドが確認された (図 3-5 A)。SufI (KK) の場合では、TatABC 過剰発現株から調製した INV に対しても一切膜透過しなかったことから (図 3-5 B)、PK 処理により現れる SufI 成熟体の出現は TAT 膜透過が正しく進行したことを示すものである。さらに TatABC 過剰発現株から調製した INV を用いた膜透過反応に抗 MPIase 抗体を添加したところ、膜透過活性の阻害が観察された (図 3-5 C)。また、各菌株の MPIase 量、TatA 量を確認したところ、TatABC の過剰発現に伴い MPIase 量の想定外の増加が観察された (図 3-5 D)。

TatABC 過剰発現による MPIase 量の増加は、*tac* プロモーターから TatABC を発現させた場合 (図 3-6 A “pUSI2-TatABC”) でも観察された。図 3-5 の実験と比較すると MPIase 増加率は若干少ないが、これはプロモーターの違いによる TatABC 発現量の低下によるものであると考えられる。また、TatA、TatB、TatC、TatE を単体でそれぞれ過剰発現させたとき、TatB および TatE の過剰発現株では TatABC 過剰発現株以上の MPIase 量の増加が見られた (図 3-6 A)。一方 T7 プロモーターから SecYEG を過剰発現させた場合には MPIase 量の増加は観察されなかった (図 3-6 B)。これらのことは、MPIase が Sec 膜透過反応よりも TAT 膜透過反応により強く関係していることを示唆している。

続いて、INV への TAT 膜透過反応における MPIase 枯渇の影響を解析した。BL21 株を親株とした *cdsA/ynbB* 二重欠損株 (KS46/pAra-CdsA) 株において、TatABC を過剰発現させた状態で CdsA を枯渇させた。この株から調製した INV を用いて SufI の膜透過反応を調べたところ、TatABC が過剰発現している (図 3-7 上図) にもかかわらず膜透過していなかった (図 3-7 中央図 “KS46/pAra-CdsA/pTatABC⁺⁺⁺ ΔMPIase”)。KS46/pAra-CdsA 株においてプラスミドから CdsA を発現させた株では、TatABC を過剰発現させても MPIase 量の増加は観察されなかった (図 3-7 下図)。この条件で培養した株から調製した INV では、MPIase 枯渇条件と比較するとわずかに SufI の膜透過活性が確認されたものの、野生株から調製した INV と比較するとその膜透過活性は大幅に低下していた (図 3-7 中央図 “KS46/pAra-CdsA/pTatABC⁺⁺⁺ +MPIase”)。

一連の結果から、*in vitro* 実験系においても TAT 膜透過反応には TatABC だけではなく MPIase も必須であることが示された。

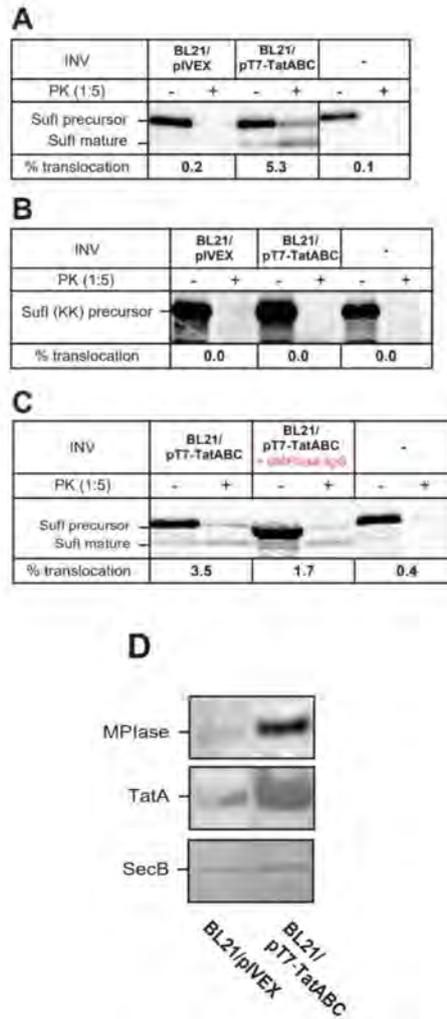


図 3-5 INV を用いた TAT 膜透過反応の *in vitro* 解析。

(A~C) 各株から調製した INV 存在下で *E. coli* T7 S30 Extract system により SufI および SufI (KK) を [³⁵S] メチオニンでラベル合成した。膜透過活性測定は「3-2. 材料と方法 ⑦」に示した通りに行った。PK 未処理画分 (-PK)、PK 処理画分 (+PK) を 1:5 の割合で SDS-PAGE に供した。SufI および SufI (KK) はオートラジオグラフィーで検出した。(C) では SufI を合成している途中で抗 MPIase 抗体を添加した。(D) 各株における MPIase、TatA、SecB 量をイムノブロッティングにより検出した。

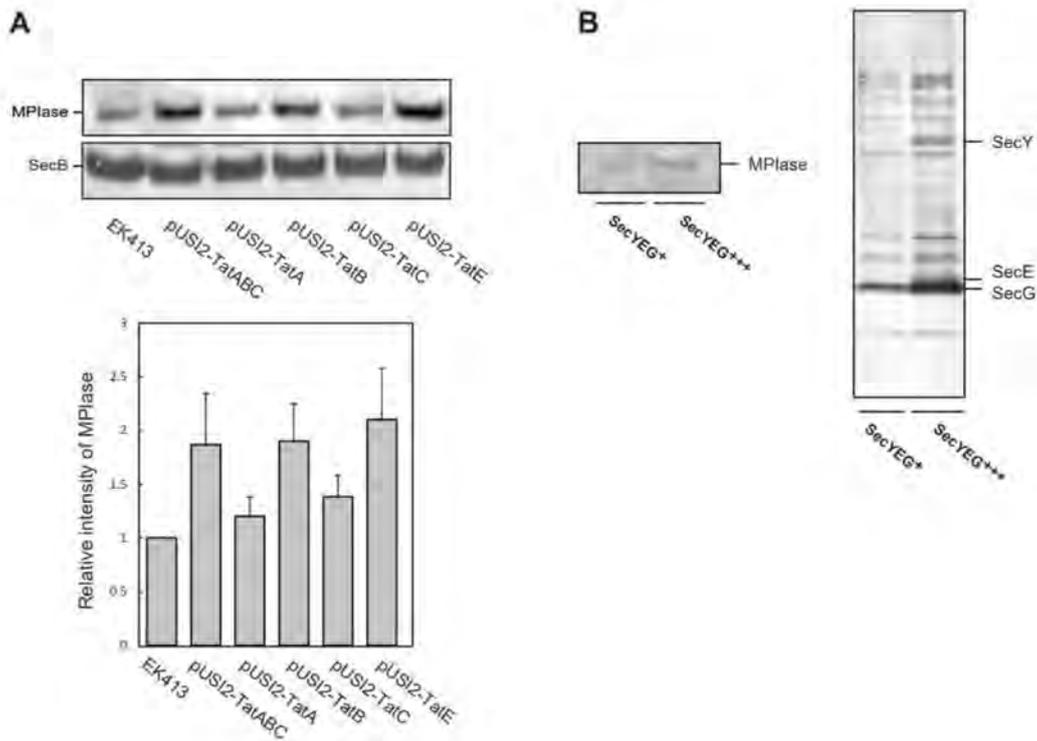


図 3-6 Tat 因子の過剰発現が MPIase 発現量に及ぼす影響。

(A) 各株を $OD_{600\text{ nm}} \sim 0.5$ まで培養後 1 mM IPTG を添加し Tat 因子の発現を誘導した。さらに 1 時間培養後 TCA 処理し、イムノブロットティングにより MPIase、SecB 量を検出した。MPIase のバンドの強度を CS analyzer (ATTO) により定量した。EK413 株における MPIase 量を “1.0” として、各株における MPIase 量の相対値を求めた。独立した 3 回の実験より標準偏差を求め、エラーバーで示した。(B) BL21 (DE3) /pT7-SecYEG 株を $OD_{600\text{ nm}} \sim 0.5$ まで培養後 1 mM IPTG を添加し SecYEG の発現を誘導した。さらに 1 時間培養した後 TCA 処理し、イムノブロットティングにより MPIase および SecY、SecE、SecG 量を検出した。“SecYEG+” は IPTG 非添加条件、“SecYEG+++” は IPTG 添加条件を示す。

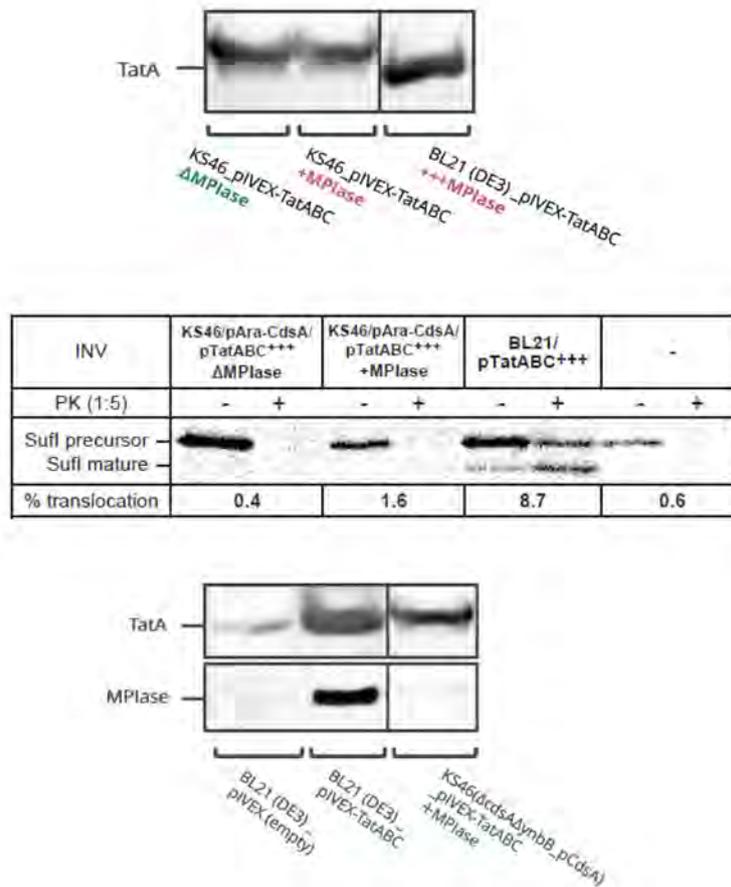


図 3-7 TatABC 過剰発現による MPlase 発現量の変化と膜透過活性との関係。

(上図) 各株を OD_{600 nm} ~ 0.5 まで培養後 1 mM IPTG を添加して TatABC の発現を誘導した。さらに 1 時間培養後、INV を調製した。KS46/pAra-CdsA 株における CdsA の枯渇は「3-2. 材料と方法 ③」に示す通り行った。各 INV における TatA 量はイムノブロッティングにより検出した。(中央図) 各株から調製した INV 存在下で *E. coli* T7 S30 Extract system により SufI を [³⁵S] メチオニンでラベル合成した。膜透過活性測定は「3-2. 材料と方法 ⑦」に示した通りに行った。PK 未処理画分 (-PK)、PK 処理画分 (+PK) を 1 : 5 の割合で SDS-PAGE に供した。SufI はオートラジオグラフィーで検出した。(下図) (上図) と同様の方法で培養後、各株から INV を調製し、TatA 量をイムノブロッティングにより検出した。MPlase は培養液を TCA 処理後、イムノブロッティングにより検出した。

(3) TAT 膜透過反応の試験管内再構成系の構築

in vivo/in vitro 両系における実験から、TAT 膜透過反応が進行するためには TatABC だけでなく MPIase も必要であることが示された。したがって、TatABC に加えて、MPIase を再構成系に加えることで TAT 膜透過反応の完全再構成系の構築が達成される可能性が強く示唆された。精製因子のみによる再構成に先立ち、*in vitro* 実験系で高い膜透過活性が認められた TatABC 過剰発現株 (BL21 (DE3) /pT7-TatABC) の INV を界面活性剤 OG により可溶化した後、OG を除去することでプロテオリポソームを調製した。TAT 膜透過反応はエネルギー源としてプロトン駆動力を利用している。安定したプロトン駆動力の形成のため、好熱性細菌由来の精製 F_0F_1 -ATPase (図 3-8) をプロテオリポソームに組み込んだ。DAG はリン脂質間のパッキングを密にして、脂質二重層を横断したプロトンの自由な移動を抑制することが知られている²⁵ことから、プロトン駆動力を安定に形成するため DAG もプロテオリポソームに組み込んだ。このようにして調製したプロテオリポソームを用いて SufI の膜透過反応を観察したが、膜透過反応は全く観察されなかった (図 3-9)。一方で、可溶化膜から調製したプロテオリポソームにさらに MPIase を組み込むと、SufI の膜透過が観察された (図 3-9)。MPIase の構造の大部分を占める親水的な糖鎖部位により、INV 調製や可溶化、プロテオリポソームの分画にかけての過程で MPIase が除かれたために、MPIase を組み込んでいないプロテオリポソーム中の MPIase 量が膜透過反応に十分量ではなかったと考えられる。これらの結果からも、MPIase が TAT 基質の膜透過に必須であることが示された。

次に精製因子のみによる再構成を行うため、C 末端に His タグを付加した TatA、TatB、TatC を TALON カラムでアフィニティ精製した (図 3-10)。各 *tat* 遺伝子欠損株における SDS 感受性^{98,99} は、プラスミドから発現した His タグを付加した Tat 因子の発現により抑制された (図 3-11) ことから、各 Tat 因子は His タグが付加されていても機能的に発現していることが示された。精製した各 Tat 因子および精製 F_0F_1 -ATPase を組み込んだ

プロテオリポソームへの SufI の膜透過反応を観察したところ、MPIase に依存した膜透過が確認された (図 3-12)。MPIase/F₀F₁-ATPase のみを組み込んだプロテオリポソームやプロトン駆動力を生じさせないプロテオリポソームに対して SufI は一切膜透過していなかったことから、TAT 膜透過反応にはタンパク質性因子 TatABC と糖脂質 MPIase、エネルギー源としてプロトン駆動力の 3 つの要素が不可欠であると結論した。

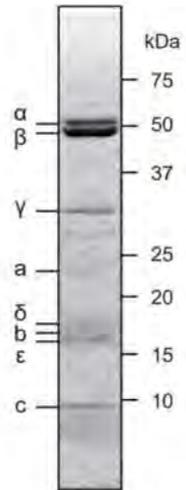


図 3-8 好熱性細菌の F_0F_1 -ATPase の精製。

精製 F_0F_1 -ATPase を CBB 染色で検出した。

TatABC+++ extract +F ₀ F ₁ -ATPase liposome	+PL/DAG		+PL/DAG/ MPlase		-	
PK	-	+	-	+	-	+
SufI						
% translocation	0.1		1.6		0.1	

図 3-9 可溶化膜から調製したプロテオリポソームでは、MPlase 添加時のみ SufI が膜透過する。

BL21 (DE3) /pT7-TatABC 株から調製した INV を可溶化した後、プロテオリポソームの調製は「3-2. 材料と方法 ⑥」に示した通りに行った。このプロテオリポソーム存在下で *E. coli* T7 S30 Extract system により SufI を [³⁵S] メチオニンでラベル合成した。膜透過活性測定は「3-2. 材料と方法 ⑦」に示した通りに行った。PK 未処理画分 (-PK)、PK 処理画分 (+PK) を 1 : 5 の割合で SDS-PAGE に供した。SufI はオートラジオグラフィーで検出した。

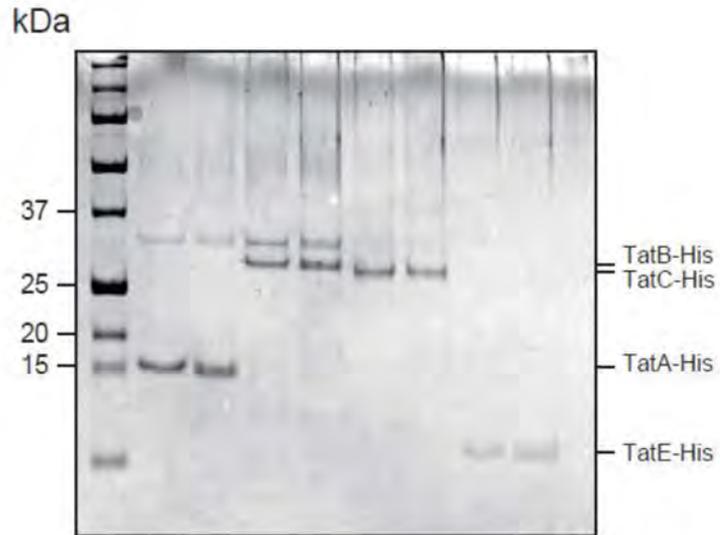


図 3-10 各 Tat 因子の精製。

各株の INV を調製し、可溶化後に TALON® (Cobalt) カラムでアフィニティ精製した TatA-His、TatB-His、TatC-His、TatE-His を CBB 染色で検出した。

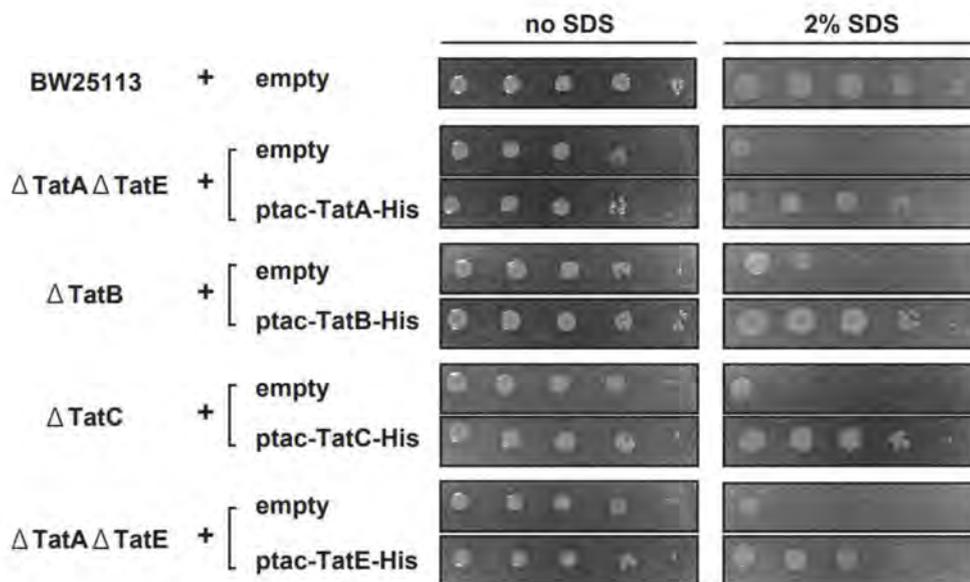


図 3-11 Tat 遺伝子欠損株の SDS 感受性はプラスミドから発現させた His タグを付加した Tat 因子により抑制される。

親株 BW25113 株およびその Tat 因子欠損株に、*tac* プロモーターから His タグを持つ各 Tat 因子を発現させるプラスミドおよびコントロールベクターを導入した株を構築した。この菌株を 37°C で OD_{600 nm} ~ 0.5 まで培養した後 1 mM IPTG を添加してさらに 1 時間培養した。培養液を 2% SDS 添加/非添加 LB プレート培地に左からそれぞれ 1/100、1/1000、1/10000、1/100000、1/1000000 に希釈したものを 2 μ l プロットして 37°C で一晩培養した。

purified TatA/B/C +F ₀ F ₁ -ATPase liposome	+PL/DAG		+PL/DAG/ MPlase		-	
	-	+	-	+	-	+
PK (1:5)	-	+	-	+	-	+
SufI						
% translocation	0.1		0.8		0.1	

図 3-12 精製 TatABC、MPlase およびプロトン駆動力に依存した SufI 膜透過の再構成
 精製した TatA : TatB : TatC を 1 : 1 : 1 の割合で「3-2. 材料と方法 ⑥」に示す通りにリポソームに組み込んだ。TatABC と F₀F₁-ATPase を再構成したプロテオリポソームを MPlase 含有/非含有リポソームと融合した。このプロテオリポソーム存在下で *E. coli* T7 S30 Extract system により SufI を [³⁵S] メチオニンでラベル合成した。膜透過活性測定は「3-2. 材料と方法 ⑦」に示した通りに行った。PK 未処理画分 (-PK)、PK 処理画分 (+PK) を 1 : 5 の割合で SDS-PAGE に供した。SufI はオートラジオグラフィーで検出した。

3-4. 考察

第3章では、TAT 膜透過反応における MPIase の役割を解析した。MPIase 枯渇株を用いて MPIase の枯渇が TAT 膜透過反応に及ぼす影響を調べたところ、MPIase 枯渇条件下では SufI および TorA の膜透過反応が全く進行しなかった。さらに INV や可溶性膜への TAT 膜透過反応にも MPIase が必須であった。精製因子による再構成系に MPIase を加えることで TAT 膜透過反応の再構成系の構築に世界に先駆けて成功した。これら、*in vivo* 実験系、*in vitro* 実験系、および再構成系の実験におけるすべての結果から TAT 膜透過反応に糖脂質 MPIase が必須であることが示された。TAT 膜透過の発見から 20 年以上の間この反応の再構成は報告されていないが、本研究で初めて TAT 再構成に成功した。

MPIase は TAT 膜透過反応においてどのような役割を果たしているのだろうか？

MPIase は膜タンパク質の膜挿入を触媒する因子として同定されていることから、MPIase が TAT 基質のシグナル配列を細胞質膜に膜挿入させ、基質の膜透過反応を開始させる最初の段階で作用する可能性がある (図 3-13)。細胞分画実験により、MPIase 枯渇条件下では SufI が内膜へ輸送されなくなり、細胞質に蓄積することが明らかになっている (菅野ら、未発表データ)。これまで、TAT 基質のシグナル配列は TatC により認識されると考えられてきた。しかしながら、TatC を欠損した大腸菌変異株においても TAT 基質は内膜へと輸送されることが知られている¹⁰⁰。本研究から、TAT 基質は膜上で MPIase に受容され、TAT シグナルが膜内部に組み込まれた後、TatC へと受け渡されると考えられる。さらに MPIase 存在下では膜透過反応が進行しないシグナル配列の変異体である SufI (KK) でも内膜への局在が観察された。このことから MPIase は細胞質膜上で TAT 基質前駆体を受容し、シグナル配列を膜挿入させるが、そのシグナル配列が機能的であるかどうかを識別することはできないと考えられる。TAT 基質の KK 変異体は、TatC と相互作用できないことが分かっている⁷⁸。MPIase によって膜挿入された TAT シグナル配列の RR 残基を TatC が認識することで、膜透過反応が開始すると考えられる (図 3-13 ①)。

もう一方の仮説として、MPIase が TatABC 複合体を活性型に構造変化させることで膜透過反応を進行させている可能性も挙げられる。MPIase は SecYEG 依存の膜透過反応には必須ではないが、MPIase 存在下では約 10 倍膜透過活性が上昇する。これは MPIase が SecYEG と相互作用することで、SecYEG の 2 量体構造が “back-to-back” 構造からより膜透過能の高い “side-by-side” 構造へと変化するためである³⁸。TAT 膜透過反応では、高次構造を形成したタンパク質が膜透過するため、膜透過時には TatABC 複合体の構造がダイナミックに変化することが示されている¹⁰¹。そのため、MPIase が TatABC と相互作用してその構造変化を補助している可能性も考えられる (図 3-13 ②)。タンパク質の自発的膜挿入を抑制する DAG の非存在下では、膜タンパク質のみならず基質のシグナル配列も自発的にリポソームに挿入される²⁴。TAT 膜透過反応の再構成が未だ報告されていないことも、MPIase が TAT 基質前駆体の受容体として機能するだけでなく、プロトン駆動力を利用した TatABC の構造変化にも関与していることを強く示唆している。

INV への TAT 基質の膜透過を観察するためには TatABC を過剰発現する必要があることが知られていた⁴²。本研究では TatABC 量の増加に伴い MPIase 量も増加することを見出した。一方、染色体上の *cdsA/ynbB* 遺伝子を欠損した株では、プラスミド上から CdsA を発現させた場合でも、TatABC の過剰発現に伴った MPIase 量の増加は観察されなかった。この株から調製した INV では微弱な膜透過活性しか検出されなかった。これらの結果から、INV を用いた TAT 膜透過反応解析では TatABC の過剰発現が必要であるのは、MPIase の増加も必要となるためであると考えられる。またパルス・チェイス解析において、同じく染色体上の *cdsA/ynbB* 遺伝子を欠損した株でプラスミドから CdsA を発現させた場合に膜透過速度が遅くなったのは、野生株を用いたときと比較して発現している MPIase 量が少ないためであると考えられる。

本研究で構築した精製因子のみによる再構成系では、大腸菌内膜から調製した INV における膜透過活性と比較してまだ活性は微弱であり、さらなる活性上昇を目指す必要がある

る。図 3-12 で報告した精製因子による再構成では、TatA : TatB : TatC を 1 : 1 : 1 の等量でプロテオリポソームに組み込んでいる。しかし生体内で Tat 基質存在下では TatA 量は TatB や TatC と比較して約 20 倍存在していることが判明しているため、現在の膜透過活性の低さは TatA 量の少なさに起因すると考えられる。また現在再構成系で TAT 基質として用いている SufI は過剰量合成されると基質が凝集し、膜透過が阻害されることが分かっている^{42,95,96}。実際、基質量を抑えて合成させた場合には膜透過活性の上昇が観察されている。今後このような TAT 基質量や Tat 因子の細かな調節を行うことで、INV における膜透過活性に匹敵する活性を保持する再構成系の構築が期待できる。

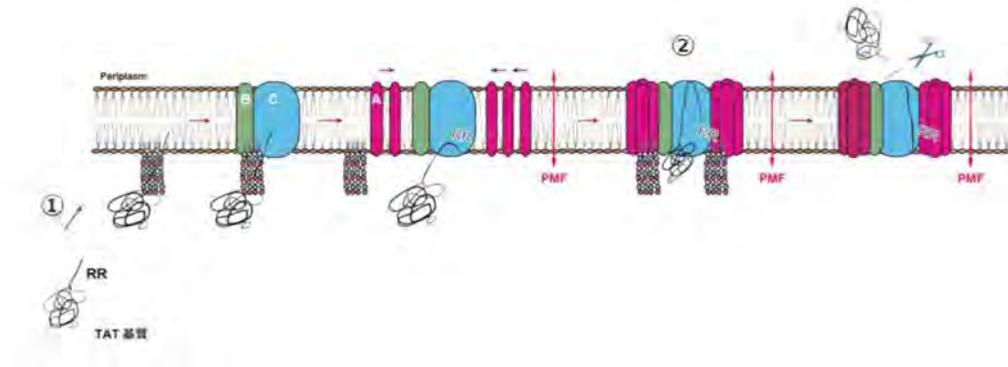


図 3-13 TAT 膜透過反応の予想モデル図。

MPIase は膜上で TAT 基質を受け取り、シグナル部分を膜挿入させると考えられる (①)。さらに、TatABC 複合体の形成や安定化にも関与する可能性がある (②)。“A” は TatA を、“B” は TatB、“C” は TatC を示す。

総合考察

本研究では、タンパク質膜挿入反応および TAT 膜透過反応において糖脂質 MPIase が必須であること、MPIase を組み込むことではじめて各反応の再構成系を構築できることを証明した。シグナル仮説の提唱以来、多くの研究者によりタンパク質膜挿入反応・膜透過反応の分子機構が解析されてきた。これらの反応に関与する因子はほとんどがタンパク質性因子であり、糖脂質の関与が示されたのは MPIase が初めてである。本研究による Ec-F₀C および Pm-F₀C の膜挿入解析から、Sec 非依存性の膜挿入経路において、MPIase がまず基質を膜挿入させ、その基質を YidC が受け取り、基質の膜挿入を促進・完了させる分子機構を明らかにした。この分子機構は F₀C だけではなく、他の Sec 非依存性膜タンパク質にも拡張できることが判明している^{55,73}。また Sec 依存性のタンパク質膜挿入についても、SRP/SR により膜に導かれた基質が SecYEG トランスロコン上にターゲティングした後、基質の膜挿入に MPIase が必須であり、YidC により促進されることが分かっている⁵⁵。これらの結果から、Sec 依存/非依存に関わらず、共通の分子機構で膜挿入反応が進行していると考えられる。

第 2 章の研究により、YidC は Pm-F₀C の膜挿入だけではなく、11 量体 c リング形成にも関与することが明らかになった。Pm-F₀C の c リング形成には Pm-UncI のみが必須であるとされてきたが、大腸菌リン脂質や DAG を用いた、より細胞に近い条件下での再構成では、Pm-UncI のみでは c リングは形成されず、YidC を組み込むことではじめて c リング形成が観察された。YidC はポリトピック型タンパク質ラクトース・パーミアーゼ (LacY) の三次構造形成に関与することが分かっている²⁰⁻²²。この YidC の分子シャペロン機能は、Pm-F₀C のフォールディング・c リング形成への関与と同様の機能であると考えられる。これらのことから、YidC は MPIase により膜挿入した基質を受け取り、膜挿入を完了させた後に基質の三次構造形成および複合体形成にまで広く関与していると考えられる。

第3章では、TAT膜透過反応にMPIaseが必須であることを明らかにし、発見以来未だ達成されていなかった再構成系の構築に成功した。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。一方、シグナル配列の自発的な膜挿入が可能であるDAG非存在下における再構成すら今まで報告されていなかったことは、MPIaseがシグナル配列の膜挿入だけでなく、TatABCのダイナミックな構造変化にも関与していることを強く示唆している。MPIase枯渇株のINVのプロテオーム解析の結果、野生株のINVと比較してTatB、TatC量の大幅な減少が観察されている（未発表データ）。これはMPIaseの枯渇によりTatABC複合体が形成できなくなり、分解してしまったためかもしれない。またこのINVのプロテオーム解析では、MPIaseの枯渇に伴ってF₀F₁-ATPase等の大きな複合体のサブユニットの発現量も減少していた（未発表データ）。これらのことは、MPIaseが複数のサブユニットからなる大きな複合体の形成または安定化に関与する可能性を示唆している。

TAT膜透過反応は葉緑体のチラコイド膜で初めて見つかった膜透過反応経路であり、現在ではバクテリアや古細菌、一部ミトコンドリアにも存在することが明らかとなっている。MPIaseが大腸菌のTAT膜透過反応に必須であるという本研究結果は、葉緑体等の他の生物種にもMPIaseホモログが広く存在することを強く示唆するものである。実際、MPIase生合成に関与する酵素CdsAホモログは葉緑体のチラコイド膜にも発現しており（Cds4p、Cds5p）、これらの酵素は大腸菌内でMPIase生合成反応を進行させ得ることが明らかになっている（関谷ら、論文投稿中）。チラコイド膜におけるタンパク質膜挿入・膜透過反応の分子機構は複数存在することが分かっているが、そのどれもが大腸菌の輸送機構と極めて類似している。膜挿入機構については、SRP/SR、SecAに依存し、YidCホモログであるAlb3やSecトランスロコンを介した膜挿入経路¹⁰²の他、トランスロコンやATPやGTP、 Δ pH等のエネルギーを必要とせず、自発的にチラコイド膜に膜挿入すると考え

られている経路¹⁰³が存在する。大腸菌では自発的膜挿入は適切に抑制されていることを考慮すると、後者の経路では MPIase ホモログの作用により膜挿入が進行している可能性が高い。また膜透過機構では、Sec トランスロコンを介した膜透過経路¹⁰⁴と TAT トランスロコンを介した膜透過経路¹⁰⁵が存在する。大腸菌においては、Sec 膜透過、TAT 膜透過の両方に MPIase が関与していたことから、チラコイド膜に MPIase 様物質が存在し、これらの膜透過反応に関与している可能性は極めて高いと言える。他にも酵母やヒトに存在する CdsA ホモログにも MPIase 生合成能があることが判明しており³¹、MPIase ホモログが真核生物にも広く存在している可能性が示されている。

第3章の予備実験により、低温下（20℃）で大腸菌を培養した場合に TAT 膜透過反応の阻害が観察された。低温下におけるタンパク質の膜挿入・膜透過の阻害は一般的によく知られており、これは低温下では生体膜脂質の流動性が低下することが原因であると考えられている^{106,107}。近年の研究により低温下で大腸菌を培養すると MPIase 発現量が増加することが判明しており、低温下においても効率の良いタンパク質輸送を可能にしていることが示されている^{31,108}。MPIase ホモログを同定・機能改変することで、低温耐性植物の開発をはじめとした幅広い分野に応用することができると期待される。また、TAT 膜透過反応は外来タンパク質を培地中に分泌させるキャリア系として産業利用されている^{94,109}。本研究により MPIase が TAT 膜透過反応にも関与することが判明したことで、MPIase の機能改変や発現調節により、さらに効率の良い外来タンパク質の分泌システムを開発できると考えられる。

参考文献

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., Ibrahimi, I. & Blobel, G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to *in-vitro*-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* **91**, 545–550 (1981).
3. Walter, P. & Blobel, G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of *in-vitro*-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* **91**, 551–556 (1981).
4. Walter, P. & Blobel, G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J. Cell Biol.* **91**, 557–561 (1981).
5. du Plessis, D. J. F., Nouwen, N. & Driessen, A. J. M. The Sec translocase. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 851–865 (2011).
6. Bernstein, H. D., Zopf, D., Freymann, D. M. & Walter, P. Functional substitution of the signal recognition particle 54-kDa subunit by its *Escherichia coli* homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 5229–5233 (1993).
7. Koch, H. G., Moser, M. & Müller, M. Signal recognition particle-dependent protein targeting, universal to all kingdoms of life. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **146**, 55–94 (2003).
8. 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.* **95**, 14646–14651 (1998).
9. Samuelson, J. C. *et al.* YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* **406**, 637–641 (2000).
10. Hennon, S. W., Soman, R., Zhu, L. & Dalbey, R. E. YidC/Alb3/Oxa1 Family of Insertases. *J. Biol. Chem.* **290**, 14866–14874 (2015).
11. Luirink, J., von Heijne, G., Houben, E. & de Gier, J. W. Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 329–355 (2005).
12. Rapoport, T. A., Goder, V., Heinrich, S. U. & Matlack, K. E. S. Membrane-protein integration and the role of the translocation channel. *Trends Cell Biol.* **14**, 568–575 (2004).
13. Andersson, H. & von Heijne, G. Sec dependent and Sec independent assembly of *E. coli* inner membrane proteins: the topological rules depend on chain length. *EMBO J.* **12**, 683–691 (1993).

14. Neumann-Haefelin, C., Schäfer, U., Müller, M. & Koch, H. G. SRP-dependent co-translational targeting and SecA-dependent translocation analyzed as individual steps in the export of a bacterial protein. *EMBO J.* **19**, 6419–6426 (2000).
15. Geller, B. L. & Wickner, W. M13 procoat inserts into liposomes in the absence of other membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **260**, 13281–13285 (1985).
16. Kuhn, A. Major coat proteins of bacteriophage Pf3 and M13 as model systems for Sec-independent protein transport. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**, 185–190 (1995).
17. 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).
18. Stuart, R. Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: the role of the Oxa1 complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 79–87 (2002).
19. Serek, J. *et al.* *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO J.* **23**, 294–301 (2004).
20. Nannenga, B. L. & Baneyx, F. Reprogramming chaperone pathways to improve membrane protein expression in *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **20**, 1411–1420 (2011).
21. Nagamori, S., Smirnova, I. N. & Kaback, H. R. Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins. *J. Cell Biol.* **165**, 53–62 (2004).
22. Zhu, L., Kaback, H. R. & Dalbey, R. E. YidC protein, a molecular chaperone for LacY protein folding via the SecYEG protein machinery. *J. Biol. Chem.* **288**, 28180–28194 (2013).
23. Nishiyama, K. I. *et al.* A derivative of lipid A is involved in signal recognition particle/secYEG-dependent and -independent membrane integrations. *J. Biol. Chem.* **281**, 35667–35676 (2006).
24. Kawashima, Y., Miyazaki, E., Müller, M., Tokuda, H. & Nishiyama, K. I. Diacylglycerol specifically blocks spontaneous integration of membrane proteins and allows detection of a factor-assisted integration. *J. Biol. Chem.* **283**, 24489–24496 (2008).
25. Nomura, K. *et al.* Alteration of Membrane Physicochemical Properties by Two Factors for Membrane Protein Integration. *Biophys. J.* **117**, 99–110 (2019).
26. Nishiyama, K. I. *et al.* A novel complete reconstitution system for membrane integration of the simplest membrane protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 733–736 (2010).
27. Nishiyama, K. I. *et al.* MPIase is a glycolipozyme essential for membrane protein integration. *Nat. Commun.* **3**, 1210–1260 (2012).
28. Kuhn, H. M., Meier-Dieter, U. & Mayer, H. ECA, the enterobacterial common antigen. *FEMS Microbiol. Rev.* **4**, 195–222 (1988).
29. Fujikawa, K. *et al.* Syntheses and Activities of the Functional Structures of a Glycolipid Essential for Membrane Protein Integration. *ACS Chem. Biol.* **13**, 2719–2727 (2018).

30. Kamemoto, Y. *et al.* Biosynthesis of glycolipid MPIase (membrane protein integrase) is independent of the genes for ECA (enterobacterial common antigen). *J. Gen. Appl. Microbiol.* **66**, 169–174 (2020).
31. Sawasato, K. *et al.* CdsA is involved in biosynthesis of glycolipid MPIase essential for membrane protein integration *in vivo*. *Sci. Rep.* **9**, 1–15 (2019).
32. Ganong, B. R. & Raetz, C. R. Massive accumulation of phosphatidic acid in conditionally lethal CDP-diglyceride synthetase mutants and cytidine auxotrophs of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **257**, 389–394 (1982).
33. 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).
34. Van Der Laan, M., Bechduft, P., Kol, S., Nouwen, N. & Driessen, A. J. M. F₁F₀ ATP synthase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis. *J. Cell Biol.* **165**, 213–222 (2004).
35. Kol, S. *et al.* YidC-mediated membrane insertion of assembly mutants of subunit c of the F₁F₀ ATPase. *J. Biol. Chem.* **281**, 29762–29768 (2006).
36. Nishiyama, K. I., Suzuki, T. & Tokuda, H. Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell* **85**, 71–81 (1996).
37. Suzuki, H., Nishiyama, K. I. & Tokuda, H. Coupled structure changes of SecA and SecG revealed by the synthetic lethality of the secAcsR11 and delta secG::kan double mutant. *Mol. Microbiol.* **29**, 331–341 (1998).
38. Moser, M., Nagamori, S., Huber, M., Tokuda, H. & Nishiyama, K. I. Glycolipozyme MPIase is essential for topology inversion of SecG during preprotein translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 9734–9739 (2013).
39. Santini, C. L. *et al.* A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **17**, 101–112 (1998).
40. Dalbey, R. E. & Wickner, W. Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **260**, 15925–15931 (1985).
41. Lüke, I., Handford, J. I., Palmer, T. & Sargent, F. Proteolytic processing of *Escherichia coli* twin-arginine signal peptides by LepB. *Arch. Microbiol.* **191**, 919–925 (2009).
42. Yahr, T. L. & Wickner, W. T. Functional reconstitution of bacterial Tat translocation *in vitro*. *EMBO J.* **20**, 2472–2479 (2001).
43. Stanley, N. R., Palmer, T. & Berks, B. C. The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**, 11591–11596 (2000).
44. DeLisa, M. P., Samuelson, P., Palmer, T. & Georgiou, G. Genetic analysis of the twin arginine translocator secretion pathway in bacteria. *J. Biol. Chem.* **277**, 29825–29831 (2002).

45. Bageshwar, U. K. & Musser, S. M. Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the *Escherichia coli* Tat machinery. *J. Cell Biol.* **179**, 87–99 (2007).
46. Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Müller, M. & Wu, L. F. Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 13223–13228 (1999).
47. Hutcheon, G. W. & Bolhuis, A. The archaeal twin-arginine translocation pathway. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 686–689 (2003).
48. Rose, R. W., Brüser, T., Kissinger, J. C. & Pohlschröder, M. Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol. Microbiol.* **45**, 943–950 (2002).
49. Feniouk, B. A. & Yoshida, M. Regulatory mechanisms of proton-translocating F₀F₁-ATP synthase. *Results Probl. Cell Differ.* **45**, 279–308 (2008).
50. Suzuki, T., Ueno, H., Mitome, N., Suzuki, J. & Yoshida, M. F₀ of ATP synthase is a rotary proton channel. Obligatory coupling of proton translocation with rotation of c-subunit ring. *J. Biol. Chem.* **277**, 13281–13285 (2002).
51. Fillingame, R. H., Jones, P. C., Jiang, W., Valiyaveetil, F. I. & Dmitriev, O. Y. Subunit organization and structure in the F₀ sector of *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 135–142 (1998).
52. Robinson, P. J. & Woolhead, C. A. Post-translational membrane insertion of an endogenous YidC substrate. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 2781–2788 (2013).
53. 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).
54. Alami, M., Trescher, D., Wu, L. F. & Müller, M. Separate analysis of twin-arginine translocation (Tat)-specific membrane binding and translocation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 20499–20503 (2002).
55. Sasaki, M. *et al.* The bacterial protein YidC accelerates MPIase-dependent integration of membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **294**, 18898–18908 (2019).
56. Shimizu, Y. *et al.* Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.* **19**, 751–755 (2001).
57. 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).
58. Nishikawa, H., Sasaki, M. & Nishiyama, K. *In vitro* Assay for Bacterial Membrane Protein Integration into Proteoliposomes. *Bio-Protocol* **10**, 1–11 (2020).
59. Hussain, M., Ichihara, S. & Mizushima, S. Accumulation of glyceride-containing precursor of the outer membrane lipoprotein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* treated with globomycin. *J. Biol. Chem.* **255**, 3707–3712 (1980).
60. 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).
61. Koch, H. G. *et al.* *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).
 62. Foster, D. L. & Fillingame, R. H. Stoichiometry of subunits in the H⁺-ATPase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **257**, 2009–2015 (1982).
 63. Raetz, C. R. Molecular genetics of membrane phospholipid synthesis. *Annu. Rev. Genet.* **20**, 253–295 (1986).
 64. Tropp, B. E. Cardiolipin synthase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1348**, 192–200 (1997).
 65. Schneppe, B., Deckers-Hebestreit, G. & Altendorf, K. Overproduction and purification of the uncI gene product of the ATP synthase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 389–395 (1990).
 66. Ozaki, Y., Suzuki, T., Kuruma, Y., Ueda, T. & Yoshida, M. UncI protein can mediate ring-assembly of c-subunits of F₀F₁-ATP synthase *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**, 663–666 (2008).
 67. Suzuki, T., Ozaki, Y., Sone, N., Feniouk, B. A. & Yoshida, M. The product of uncI gene in F₁F₀-ATP synthase operon plays a chaperone-like role to assist c-ring assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 20776–20781 (2007).
 68. Downie, J. A., Langman, L., Cox, G. B., Yanofsky, C. & Gibson, F. Subunits of the adenosine triphosphatase complex translated *in vitro* from the *Escherichia coli* unc operon. *J. Bacteriol.* **143**, 8–17 (1980).
 69. Hartmann, C. & Engel, A. Cloning, expression, purification, and characterization of the membrane protein UncI from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **79**, 187–190 (2011).
 70. Laubinger, W. & Dimroth, P. Characterization of the ATP synthase of *Propionigenium modestum* as a primary sodium pump. *Biochemistry* **27**, 7531–7537 (1988).
 71. Neumann, S., Matthey, U., Kaim, G. & Dimroth, P. Purification and properties of the F₁F₀ ATPase of *Ilyobacter tartaricus*, a sodium ion pump. *J. Bacteriol.* **180**, 3312–3316 (1998).
 72. Meier, T. *et al.* Evidence for structural integrity in the undecameric c-rings isolated from sodium ATP synthases. *J. Mol. Biol.* **325**, 389–397 (2003).
 73. Nishikawa, H., Sasaki, M. & Nishiyama, K. I. Membrane insertion of F₀ c subunit of F₀F₁ ATPase depends on glycolipozyme MPlase and is stimulated by YidC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **487**, 477–482 (2017).
 74. Gay, N. J. & Walker, J. E. The atp operon: nucleotide sequence of the promoter and the genes for the membrane proteins, and the delta subunit of *Escherichia coli*. ATP-synthase. *Nucleic Acids Res.* **9**, 3919–3926 (1981).
 75. Nakamura, S., Suzuki, S., Saito, H. & Nishiyama, K. I. Cholesterol blocks spontaneous

- insertion of membrane proteins into liposomes of phosphatidylcholine. *J. Biochem.* **163**, 313–319 (2018).
76. Saito, H. *et al.* Molecular dynamics study of binary POPC bilayers: molecular condensing effects on membrane structure and dynamics. *J. Phys. Conf. Ser.* **1136**, 012022 (2018).
 77. Saito, H. *et al.* Free energy profiles of lipid translocation across pure POPC and POPC/CHOL bilayer: all-atom molecular dynamics study. *J. Phys. Conf. Ser.* **1290**, 012020 (2019).
 78. Alami, M. *et al.* Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* **12**, 937–946 (2003).
 79. Mori, H. & Cline, K. A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid Δ pH/Tat translocase. *J. Cell Biol.* **157**, 205–210 (2002).
 80. Dabney-Smith, C., Mori, H. & Cline, K. Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport. *J. Biol. Chem.* **281**, 5476–5483 (2006).
 81. Barrett, C. M. L. & Robinson, C. Evidence for interactions between domains of TatA and TatB from mutagenesis of the TatABC subunits of the twin-arginine translocase. *FEBS J.* **272**, 2261–2275 (2005).
 82. Gohlke, U. *et al.* The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 10482–10486 (2005).
 83. Fröbel, J., Rose, P. & Müller, M. Early contacts between substrate proteins and TatA translocase component in twin-arginine translocation. *J. Biol. Chem.* **286**, 43679–43689 (2011).
 84. Dabney-Smith, C. & Cline, K. Clustering of C-terminal stromal domains of Tha4 homooligomers during translocation by the Tat protein transport system. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2060–2069 (2009).
 85. Barnett, J. P., Eijlander, R. T., Kuipers, O. P. & Robinson, C. A Minimal Tat System from a Gram-positive Organism. *J. Biol. Chem.* **283**, 2534–2542 (2008).
 86. Bolhuis, A., Mathers, J. E., Thomas, J. D., Barrett, C. M. & Robinson, C. TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**, 20213–20219 (2001).
 87. Sargent, F., Stanley, N. R., Berks, B. C. & Palmer, T. Sec-independent Protein Translocation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 36073–36082 (2002).
 88. Sargent, F. *et al.* Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.* **17**, 3640–3650 (1998).
 89. Studier, F. W. & Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130 (1986).
 90. Nozaki, S. & Niki, H. Exonuclease III (XthA) Enforces *In Vivo* DNA Cloning of *Escherichia coli* To Create Cohesive Ends. *J. Bacteriol.* **201**, (2019).

91. Grenier, F., Matteau, D., Baby, V. & Rodrigue, S. Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BW25113. *Genome Announc.* **2**, (2014).
92. Baba, T. *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008 (2006).
93. Shibui, T., Uchida, M. & Teranishi, Y. A new hybrid promoter and its expression vector in *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 983–988 (1988).
94. Kikuchi, Y., Date, M., Itaya, H., Matsui, K. & Wu, L. F. Functional analysis of the twin-arginine translocation pathway in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7183–7192 (2006).
95. Chanal, A., Santini, C. L. & Wu, L. F. Specific inhibition of the translocation of a subset of *Escherichia coli* TAT substrates by the TorA signal peptide. *J. Mol. Biol.* **327**, 563–570 (2003).
96. Ize, B. *et al.* Novel phenotypes of *Escherichia coli* tat mutants revealed by global gene expression and phenotypic analysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 47543–47554 (2004).
97. Rose, P., Fröbel, J., Graumann, P. L. & Müller, M. Substrate-Dependent Assembly of the Tat Translocase as Observed in Live *Escherichia coli* Cells. *PLoS One* **8**, 1–17 (2013).
98. Buchanan, G. *et al.* Functional complexity of the twin-arginine translocase TatC component revealed by site-directed mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **43**, 1457–1470 (2002).
99. Lee, P. A., Buchanan, G., Stanley, N. R., Berks, B. C. & Palmer, T. Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation. *J. Bacteriol.* **184**, 5871–5879 (2002).
100. Holzapfel, E. *et al.* The entire N-terminal half of TatC is involved in twin-arginine precursor binding. *Biochemistry* **46**, 2892–2898 (2007).
101. Cline, K. & McCaffery, M. Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery. *EMBO J.* **26**, 3039–3049 (2007).
102. Moore, M., Harrison, M. S., Peterson, E. C. & Henry, R. Chloroplast Oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. *J. Biol. Chem.* **275**, 1529–1532 (2000).
103. Jarvis, P. & Robinson, C. Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr. Biol.* **14**, R1064-77 (2004).
104. Keegstra, K. & Cline, K. Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* **11**, 557–570 (1999).
105. Robinson, C. & Bolhuis, A. Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 350–356 (2001).
106. Pogliano, K. J. & Beckwith, J. The Cs sec mutants of *Escherichia coli* reflect the cold sensitivity of protein export itself. *Genetics* **133**, 763–773 (1993).
107. Marr, A. G. & Ingraham, J. L. Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **84**, 1260–1267 (1962).

108. Sawasato, K., Sekiya, Y. & Nishiyama, K. I. Two-step induction of *cdsA* promoters leads to upregulation of the glycolipid MPase at cold temperature. *FEBS Lett.* **593**, 1711–1723 (2019).
109. Kikuchi, Y., Itaya, H., Date, M., Matsui, K. & Wu, L. F. TatABC overexpression improves *Corynebacterium glutamicum* Tat-dependent protein secretion. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 603–607 (2009).

謝辞

本論文は多くの方々のお力添えにより作成することができました。この場を借りて御礼申し上げます。主指導教員である西山賢一先生には終始熱心なご指導を頂きました。研究補助員の細工藤真理さん、澤口美樹さんには MPIase 精製等で大変お世話になりました。また、副指導教官を引き受けてくださいました弘前大学の柏木明子先生、岩手大学の山田美和先生には多大な助言・励ましの言葉を賜りました。深く感謝申し上げます。

そして、本研究に際しては多くの方々にご協力していただきました。TatABC 過剰発現プラスミドを提供していただいた山田美和先生、PURE system を提供していただいた東京大学大学院新領域創成科学研究科の上田卓也先生、3L-Pf3 coat の *in vitro* 合成用のプラスミドを提供していただいた Hohenheim 大学の Andreas Kuhn 先生、TorA-GFP プラスミドを提供していただいた味の素株式会社 バイオ・ファイン研究所の菊池慶実先生、Pm-F₀c の *in vitro* 合成用のプラスミドと精製 F₀F₁-ATPase の提供およびご指導していただいた JAMSTEC の車兪徹先生に心より御礼申し上げます。また、様々な場面で助言・応援等をいただきました研究室の先輩後輩のみなさまには感謝の念にたえません。本当にありがとうございました。