

	かみト ヲウキ
氏 名	亀本 有生
本籍（国籍）	青森県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 859 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 2 2 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
学位論文題目	タンパク質膜挿入および膜透過を触媒する糖脂質酵素 MPIase の生合成機構に関する研究 (Study on the biosynthetic mechanisms of the Glycolipozyme MPIase that catalyzes membrane protein integration and translocation)
学位審査委員	主査 岩手大学教授 西山 賢一 副査 岩手大学教授 西向 めぐみ 副査 山形大学教授 豊増 知伸 副査 弘前大学教授 吉田 孝

論 文 の 内 容 の 要 旨

すべての生物の細胞にはリン脂質からなる生体膜があり、その中には重要な機能を果たす膜タンパク質が多く埋め込まれている。大腸菌では、特に MPIase と呼ばれる糖脂質がタンパク質膜挿入に必須とされ、その独自の構造と触媒機能から「Glycolipozyme（糖脂質酵素）」としても知られている。MPIase は重要な生体反応であるタンパク質膜挿入・膜透過を酵素のように触媒することから、将来的には広い応用技術への展開が期待される。しかし、MPIase の生合成経路はほとんどが未知であり、その発現を制御することが難しい状況である。本研究では、MPIase の詳細な生合成メカニズムの解明に取り組んだ。

はじめに、MPIase の第 1 生合成中間体である compound I (GlcNAc-PP-DAG) の生成メカニズムに焦点を当てた。所属研究室の先行研究で、大腸菌内膜タンパク質 CdsA およびそのパラログ YnbB が MPIase の生合成に関与していることが明らかにされた。CdsA は CDP-ジアシルグリセロール (CDP-DAG) の生合成酵素であることは知られていたが、MPIase 生合成因子の探索の中で、MPIase 生合成能も保持していることが判明した。CdsA による MPIase 生合成メカニズムの詳細を、高 pH 感受性 CdsA 変異体やオートラジオグラフィなどを用いて調べたところ、フォスファチジン酸 (PA) と CTP から CDP-DAG を生成し、その後 GlcNAc-1P と反応して compound I を生成するという反応を CdsA がおこなっていることが明らかとなった。これにより、compound I 生合成が MPIase 生合成経路の第 1 段階であり、律速段階であることが解明された。

大腸菌の細胞表面には、ECA (enterobacterial common antigen) という糖脂質が大量に存在し、その生合成遺伝子群はすでに同定されている。ECA と MPIase の糖鎖部の構造は極めてよく似ているため、同定されている ECA 生合成遺伝子の中に、MPIase 生合成も重複して

おこなう遺伝子が含まれている可能性が考えられた。そこで、ECA 生合成遺伝子の単一遺伝子欠失株コレクションを用いて、その可能性を検証した。その結果、すべての ECA 生合成遺伝子欠失株において、MPIase の発現量はまったく影響を受けなかった。すなわち、MPIase と ECA の糖鎖構造は驚くほど酷似しているにもかかわらず、両者の生合成経路はまったく異なることが明らかとなった。MPIase は大腸菌の生育に必須である極めて重要な因子であるため、専用の生合成経路をもち、細胞内で厳密に制御されていると考えられる。

最後に、YnbB の重要性について調べた。これまで述べたように、CdsA/YnbB が MPIase の第 1 中間体の生合成に関与する酵素である。YnbB は CdsA のパラログであり、そのタンパク質構造は C 末端側で非常に類似しているが、N 末端側では類似性が低い。cgsA の欠損は致命的であり、YnbB を過剰発現しても相補されないことが示されている。一方で、cgsA 欠損株は、YnbB と MPIase 生合成能をもたない酵母 CDP-DAG 生合成酵素である Tam41p が共発現する条件下では生育可能となり、YnbB は MPIase の生合成に特化している酵素である可能性が指摘されていた。MPIase は生育に必須な因子であるにもかかわらず、これまで ynbB 欠損株では生育の表現型は観察されておらず、YnbB の重要性は不明瞭であった。そこで、MPIase の要求量が上昇する寒冷環境下において、CdsA の発現量を制限した条件では、YnbB の機能が観察できるのではないかと考え、実験をおこなった。細胞内の MPIase 量は低温培養条件下で急速かつ持続的に発現誘導され、この代謝変化は CdsA の発現上昇によって引き起こされることが、近年報告されている。低温環境では細胞膜の流動性低下が生じ、そのままではタンパク質膜挿入反応などの重要な生命活動に影響が及ぶため、これに対処するために MPIase の発現量が上昇すると考えられている。本研究では、YnbB が MPIase の生合成と菌の生育に対して果たす役割を明らかにするために、発現が厳密に制御可能なプラスミドベクターを使用し、CdsA 発現レベルが制限された条件や低温条件を組み合わせ、YnbB 機能の検証をおこなった。その結果、YnbB は CdsA の補助的因子であるものの、CdsA の発現が抑制された低温環境下においては、大腸菌の増殖に必須となった。これは ynbB 遺伝子の重要性が示された初めての報告である。また、この場合の必須性は YnbB の MPIase 生合成能によるものであり、低温環境下では YnbB の発現量が CdsA のように転写レベルで誘導されることを明らかにした。これらのことより、MPIase 生合成の観点から YnbB の重要性が解明された。

論文審査の結果の要旨

すべての生物の細胞は生体膜で覆われ、膜が細胞内外を隔てている。生体膜には多種多様な膜タンパク質が埋め込まれており、生命活動に重要な機能を担っている。タンパク質膜挿入のしくみはあらゆる生物に広く保存されており、その解析の途上、タンパク質膜挿入反応に必須の因子として MPIase と呼ばれる因子が発見された。MPIase は非タンパク質性の糖脂質であるにもかかわらず、膜挿入反応を触媒する。MPIase の生体内機能についてはデータが蓄積されてきていたが、MPIase 自身の生合成機構はほとんど未解明であった。本研究では、MPIase の生合成メカニズムの解明を目的として実施され、以下の 3 つの成果が得られた。

1 つ目は、MPIase の生合成第 1 中間体の生成機構の解明である。先行研究により、MPIase の生合成に関与する因子として、CdsA およびそのパラログ YnbB が同定されていた。CdsA は CDP-ジアシルグリセロール (CDP-DAG) 生合成酵素として知られており、高等植

物やヒトなどの真核生物にも広く保存されている。申請者は、CdsA の CDP-DAG 生合成機能と MPIase の構造情報から、MPIase の第 1 生合成中間体 (compound I) の構造とその生合成基質を予想し、予想した中間体生合成反応が実際に起こるかどうかを調べた。その結果、compound I がフォスファチジン酸 (PA) と CTP、GlcNAc-1 リン酸を基質として確かに生合成されることを、オートラジオグラフィおよび質量分析によって示した。

2 つ目に、MPIase と構造が類似した糖脂質の生合成遺伝子群を解析し、MPIase の生合成経路が類似糖脂質とは高度に独立していることを立証した。大腸菌の細胞表面には、ECA (enterobacterial common antigen) という糖脂質が大量に存在し、ECA と MPIase の構造は極めてよく似ているため、すでに報告されている ECA 生合成遺伝子の中に、MPIase 生合成も重複しておこなう遺伝子が含まれている可能性が考えられた。しかし、両者は局在性や増殖必須性などに大きな相違があるため、一部が重複している可能性はあっても全体の経路は独立しているであろうと推測し、ECA 生合成遺伝子の単一遺伝子欠失株コレクションを用いて、その検証をおこなった。その結果、すべての ECA 生合成遺伝子欠失株において、MPIase の発現量はまったく影響を受けなかった。すなわち、MPIase と ECA の構造は酷似しているにもかかわらず、両者の生合成経路はまったく異なることが明らかとなった。

3 つ目は、YnbB が大腸菌の生育に必須となる条件の発見である。CdsA が大腸菌の生育に必須の因子であることに対して、パラログである YnbB は必須でなく、これまで YnbB 欠損による表現型は観察されていなかった。申請者は、発現が厳密に制御可能なプラスミドベクターを使用し、YnbB の発現と機能を解析した。その結果、YnbB は CdsA の発現が抑制され、かつ、低温環境下の条件で、大腸菌の生育に必須となった。これは YnbB の重要性が示された初めての報告である。また、この場合の必須性は YnbB の MPIase 生合成能によるものであることも示した。

本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り、以上の内容を審査した結果、本論文を博士 (農学) の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. Kamemoto Y, Funaba N, Kawakami M, Sawasato K, Kanno K, Suzuki S, Nishikawa H, Sato R, Nishiyama KI (2020)
Biosynthesis of glycolipid MPIase (membrane protein integrase) is independent of the genes for ECA (enterobacterial common antigen)
The Journal of General and Applied Microbiology; 66(3): 169-174
2. Kamemoto Y, Hikage R, Han Y, Sekiya Y, Sawasato K, Nishiyama KI (2023)
Coordinated upregulation of two CDP-diacylglycerol synthases, YnbB and CdsA, is essential for cell growth and membrane protein export in the cold
FEMS Microbiology Letters; 370: fnad131