

学 位 論 文

タンパク質膜挿入および膜透過を触媒する糖脂質酵素 MPlase の
生合成機構に関する研究

連合農学研究科
生物資源科学専攻
亀本 有生

— 目 次 —

第 1 章 序論

第 2 章 MPIase 第 1 生合成中間体の生成機構

はじめに

実験方法

結果

考察

おわりに

第 3 章 MPIase と ECA の生合成経路は独立している

はじめに

実験方法

結果

考察

おわりに

第 4 章 低温かつ CdsA 制限条件における YnbB の重要性

はじめに

実験方法

結果

考察

おわりに

第 5 章 結論および総合考察

付録（略語表、使用した大腸菌株）

謝辞

参考文献

第1章 序論

1.1 節 細胞構造と膜タンパク質

すべての生物は細胞から構成される。単純な細胞は、水滴が生体膜で囲まれたものとして描くことができる。生体膜は大きな分子やほとんどの水溶性化合物を通さない障壁となり、細胞やオルガネラを周りの環境から隔てている。そのため、自己と外界を分ける境界線が生体膜であるといえる。あらゆる生体膜は脂質二重層を基本とし、グリセロリン脂質が主成分である。生体膜の脂質は疎水的な性質によって共有結合なしに相互作用しているので、生体膜は柔軟性や流動性をもつ。

生体膜には膜タンパク質が存在する。膜タンパク質は膜内在性タンパク質、膜表在性タンパク質、脂質アンカー型膜タンパク質の3つに分類される。膜内在性タンパク質は脂質二重層を完全に貫通する領域を1つまたは複数もち、膜貫通領域の多くは約20アミノ酸残基からなる α ヘリックス構造をもつ。膜表在性タンパク質は、膜のどちらか一方の表面に付着している。その結合は、電荷-電荷相互作用、ほかの膜タンパク質や膜脂質の極性頭部との水素結合などである。そのため、pHやイオン強度の変化、カオトロピック変性剤により膜から剥がせることが多い。脂質アンカー型膜タンパク質は、脂質アンカーに共有結合して膜に繋ぎ止められている。膜タンパク質は、ゲノムにコードされた全タンパク質の3分の1を占めると見積もられており、栄養分の取込みや不要物の排泄に役立つもの、細胞内外の情報伝達をおこなうもの、代謝反応を触媒するものなどが多く含まれ、生命機能に欠かせない役割をもつ。そのため、疾病に関与するものが多く、創薬研究の標的分子の過半数が膜タンパク質であるといわれている。しかしながら、膜タンパク質は疎水性が高いために取り扱いが難しいことから、機能解析はあまり進んでいない。

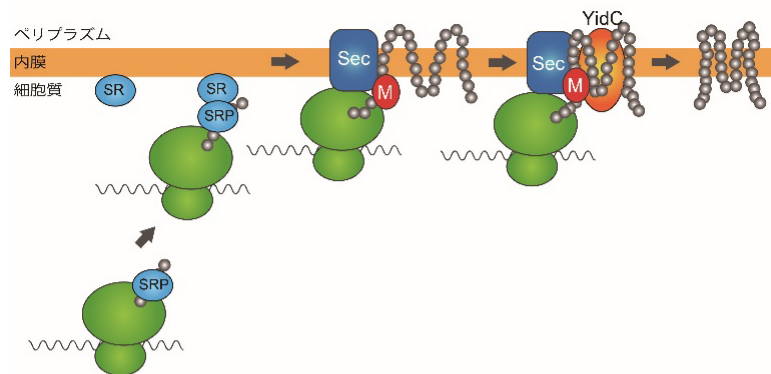
1.2 節 タンパク質膜挿入

膜タンパク質、特に膜内在性タンパク質は高い疎水性を有するものが多い。一方、タンパク質合成の場は親水的な環境の細胞質である。タンパク質がリボソームにより合成された後に細胞質に放出されると、疎水性の高い膜内在性タンパク質は親水的环境にさらされ凝集してしまう。これを回避するため、膜内在性タンパク質は翻訳と膜挿入が共役して進行する。モデル生物大腸菌においては、以下の機構に従って多くのタンパク質膜挿入が進行すると考えられている (Blobel et al., 1975, Luirink et al., 2004, Luirink et al., 2012)。膜タンパク質の新生鎖合成が進んで疎水性の高い膜貫通領域がリボソームから出てくると、この領域を認識するシグナル認識粒子 (SRP) が結合する。その後、膜上に存在する SRP 受容体 (SR) が SRP と結合し、新生鎖が膜へと導かれる。この複合体は膜上に係留され、タンパク質が翻訳されると同時に膜挿入される。その結果、膜内在性タンパク質は即座に疎水的な細胞膜に埋め込まれ、凝集を回避できる。SRP/SR による係留の後、大腸菌を含むバクテリアではタンパク質膜透過チャネル SecYEG 複合体が用いられる (Van den Berg et al., 2004)。SecYEG を用いた膜挿入 (Sec 依存膜挿入) のほかに、SRP/SR や SecYEG に依存しない膜挿入 (Sec 非依存膜挿入) も存在する (Kuhn et al., 1995)。分子量が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は、SRP と膜貫通領域が相互作用する前にリボソームによる合成が終了するため、Sec 非依存で膜挿入される。SRP や SR、SecYEG のホモログは真核生物・原核生物問わずすべての生物に存在し、タンパク質膜挿入のしくみは基本的に生物共通である (Denks et al., 2014, Schatz et al., 1996)。

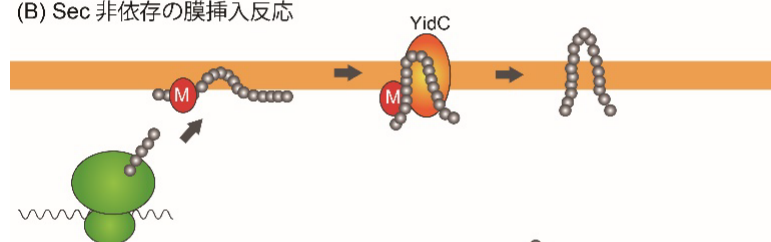
試験管内再構成系を用いた実験から、Sec 非依存膜挿入反応はどの因子にも依存せず、膜貫通領域と膜脂質の疎水的な相互作用により自発的に起こるものと考えられてきた (Kiefer et al., 1999)。しかし近年、生体内においては膜タンパク質の

自発的膜挿入は起こらず、バクテリアではジアシルグリセロール(DAG)、真核生物ではコレステロールが生体膜に存在し、自発的膜挿入が抑制されていることが明らかとなった(Kawashima et al., 2008, Nakamura et al., 2018)。DAG を含めた試験管内再構成系によるタンパク質膜挿入反応が解析された結果、それまで自発的膜挿入すると考えられてきた膜タンパク質も膜挿入しないことが判明した(Kawashima et al., 2008, Nakamura et al., 2018, Nishiyama et al., 2006)。これらのことから、未知の膜挿入因子が存在することが示唆された。

(A) Sec 依存の膜挿入反応



(B) Sec 非依存の膜挿入反応



(C) タンパク質膜透過反応

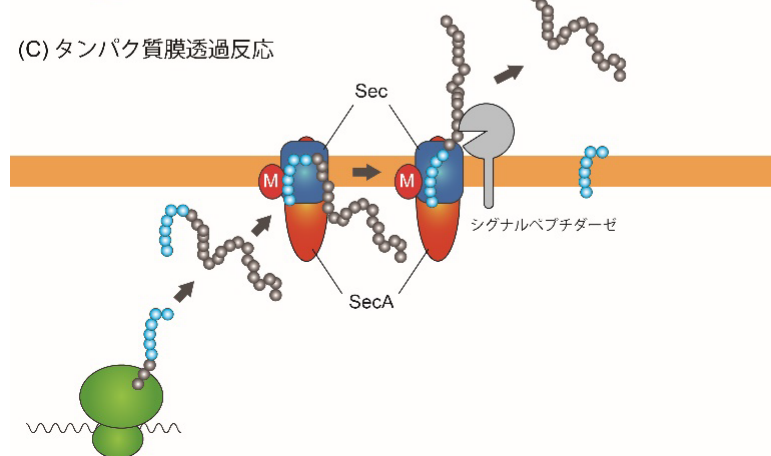


図 1 大腸菌のタンパク質膜挿入・膜透過反応

大腸菌のタンパク質膜挿入反応には(A)Sec 依存と(B)Sec 非依存の 2 つがある。多くのタンパク質性の因子が関わっているが、MPIase は糖脂質である。MPIase はタンパク質膜挿入反応だけでなく、(C)タンパク質膜透過反応にも関与する。図中では MPIase を M で示した。

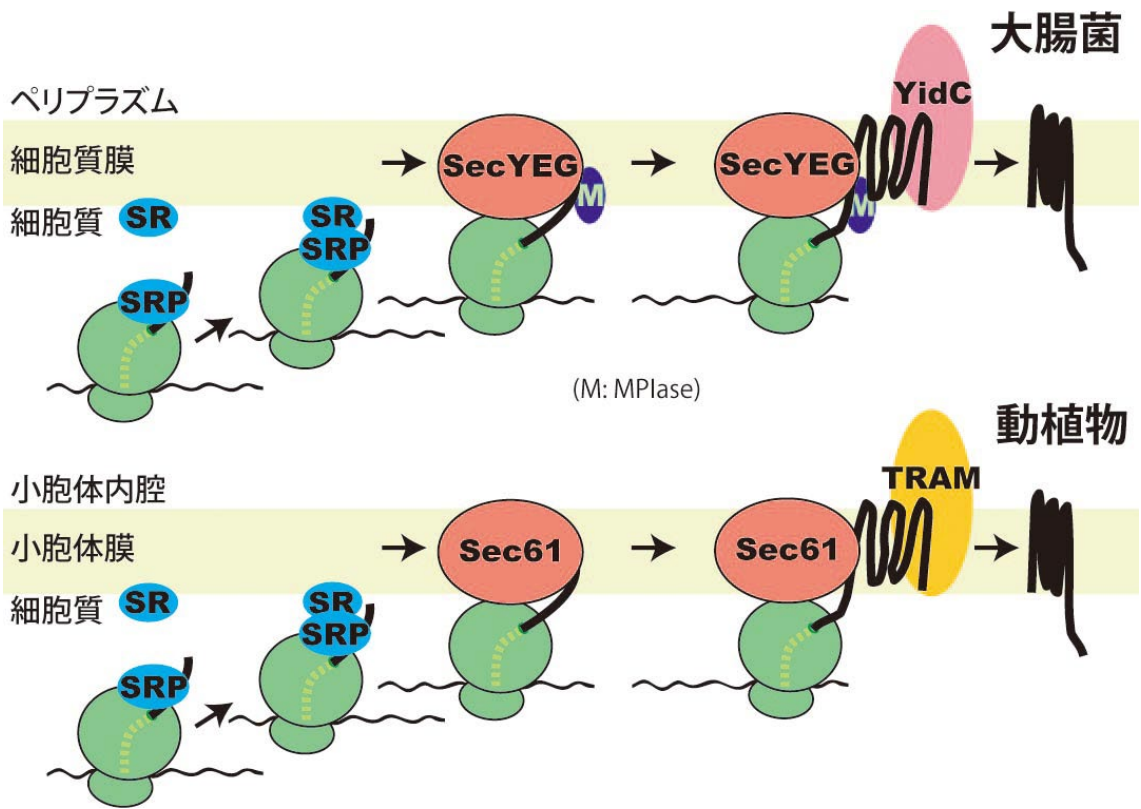


図 2 バクテリア細胞と動物細胞の膜挿入模式図

タンパク質膜挿入には、すべての生物に共通した基本的なしくみがある。

1.3 節 MPIase の発見

前述のように未知の膜挿入因子の存在が示唆され、探索がおこなわれた。その結果、SDS-PAGE 上での分子量が約 8 kDa の新規因子が発見され、タンパク質膜挿入を触媒することが判明したため、のちにタンパク質性の因子ではないことが明らかになったものの「MPIase (Membrane Protein Integrase)」と命名された (Nishiyama et al., 2010)。

MPIase の構造が解析された結果、糖脂質であることが判明した (Nishiyama et al., 2012)。MPIase は糖鎖部と脂質部が、ピロリン酸を介して結合した構造をしている。糖鎖部は、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、2-アセトアミド-2-デオキシマンヌロン酸 (ManNAcA)、4-アセトアミド-4-デオキシフコース (Fuc4NAc) の 3 種類の *N*-アセチルアミノ糖がユニットとなり、この 3 糖ユニットを約 10 回繰り返した構造をとっている。GlcNAc の一部は *O*-アセチル化されている。この *O*-アセチル基を除去すると膜挿入活性がなくなるため、膜挿入活性に重要であることが分かっている (Nishiyama et al., 2012, Fujikawa et al., 2018)。

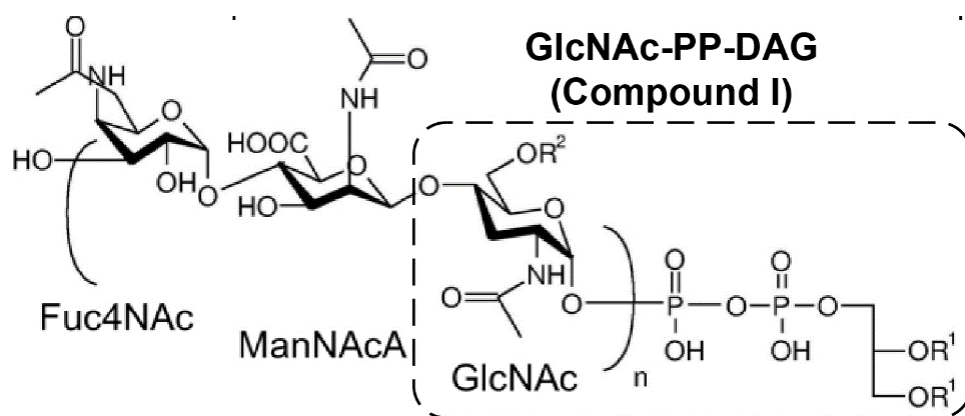


図 3 MPIase の構造

糖鎖の繰り返しユニットは Fuc4NAc、ManNAcA、GlcNAc からなる。繰り返しの数(n)は 9-11、 R^1 は炭素数 16 または 18 のアシル基、 R^2 は水素原子またはアセチル基を示す。MPIase の生合成第 1 中間体と予想した compound I に相当する部分もあわせて図示した。

1.4 節 MPIase の機能および性質

MPIase の発見以来、その機能解析が進められてきた。MPIase は Sec 依存膜挿入・Sec 非依存膜挿入のどちらにおいても必須の因子である(Nishiyama et al., 2012, Kumazaki et al., 2015, Nishiyama et al., 2014, Nishiyama et al., 2015, Nishiyama et al., 2016, Nishikawa et al., 2017, Sasaki et al., 2019, Sawasato et al., 2019a)。試験管内再構成系を用いた実験から、SRP/SR、SecYEG、YidC 等の報告されているすべての膜挿入因子がある条件において、MPIase を再構成した場合にのみ、膜挿入活性が認められる。試験管内再構成系において、MPIase の分子数を大きく上回る分子数の膜タンパク質の膜挿入が観察されることから、MPIase は糖脂質でありながら酵素のようにタンパク質膜挿入反応を触媒している(Nishiyama et al., 2012)。このことから、MPIase は「糖脂質酵素(Glycolipozyme)」と呼ばれることとなった(Nishiyama et al., 2012)。Sec 非依存膜挿入においては、MPIase に先立って発見された YidC が *in vivo* 実験の結果からタンパク質膜挿入に必須の因子であるという報告がされていた(Samuels et al., 2000., Scotti et al., 2000, Samuelson et al., 2001)。しかしながら、試験管内再構成系で再検討がおこなわれた結果、Sec 非依存膜挿入においては、MPIase が膜挿入に必須の因子であり、YidC は膜挿入を促進する因子であることが明らかにされた(Nishikawa et al., 2017, Sasaki et al., 2019)。具体的には以下のように進行すると予想されている。まず、MPIase は Sec 非依存膜挿入反応の初期段階を触媒し、基質の膜貫通領域の一部を細胞質膜に引き込む。続いて、YidC は基質を MPIase から受け取り、膜挿入を完了させる(図1B)。

MPIase は膜挿入に関与するだけでなく、分泌タンパク質の膜透過反応を著しく促進することも明らかとなっている(Moser et al., 2013, Matsumura et al., 2019)。大腸菌において、分泌タンパク質は主に SecYEG 膜透過チャネルを通過して

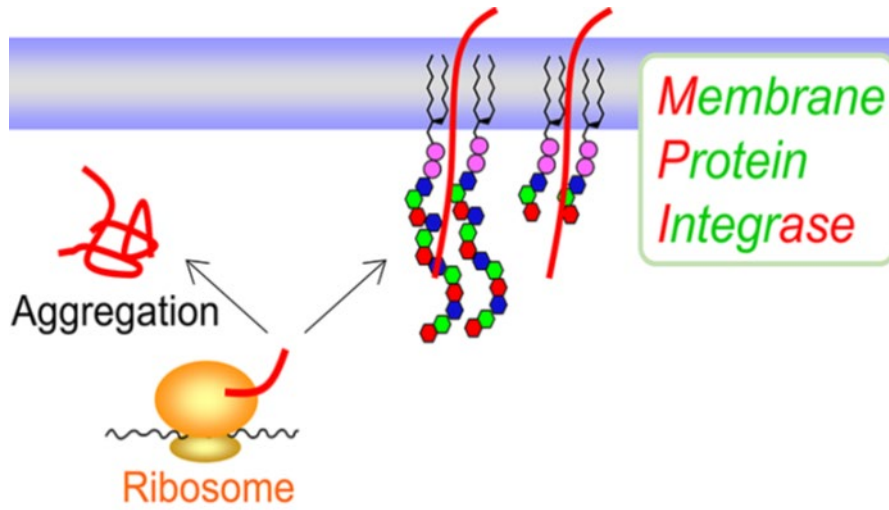
細胞膜の内側からペリプラズムまたは外膜へと輸送される。これをタンパク質膜透過反応と呼ぶ。MPIase は大腸菌の Sec 膜透過反応を約 10 倍に促進する。膜透過反応の際、SecYEG は二量体で機能するが、MPIase は SecYEG と相互作用して SecYEG 二量体構造を大きく変化させる (Moser et al., 2013)。この構造変化がタンパク質膜透過に重要であると考えられている。

MPIase は膜タンパク質の凝集を防ぐ性質をもつ。膜タンパク質をゲル濾過クロマトグラフィーで分離する際、MPIase を共存させると凝集が防がれ、膜タンパク質が可溶性画分に回収される (Nishiyama et al., 2012)。MPIase の糖鎖部分が膜タンパク質を包み込み、膜タンパク質の凝集が防がれる (Mori et al., 2022, Fujikawa et al., 2023)。

MPIase はリン脂質膜中の脂質分子の運動性を上昇させて膜を柔らかくする (Nomura et al., 2019)。MPIase を含むリポソームの固体 NMR 分析の結果から、MPIase は膜の相状態は変化させないが、膜の運動性に影響を与えていることが明らかになった。膜タンパク質の自発的膜挿入抑制物質である DAG やコレステロールを加えたりリポソームはリン脂質の運動性が低下している。これに MPIase を加えると、運動性が回復する。さらに、膜脂質のリン酸部の運動性が著しく上昇し、MPIase の糖鎖の動きにより MPIase のピロリン酸周囲で膜表面に開裂が生じる。これらのことから、生体内で膜の特定の位置にタンパク質を挿入するためには、MPIase による膜物性の変化が重要な役割を果たしていると考えられる。

低温で大腸菌を培養すると MPIase の発現量が増加する (Sawasato et al., 2019b, Sawasato et al., 2019c)。培養温度を通常の 37°C から 20°C に低下させると、MPIase 発現量は 10 倍近くまで増加するが、SecYEG などほかのタンパク質膜挿入因子群はほとんど増加しない。低温下では、脂質の流動性が低下し、細胞膜が硬くなることでタンパク質膜挿入やタンパク質膜透過が阻害されている。

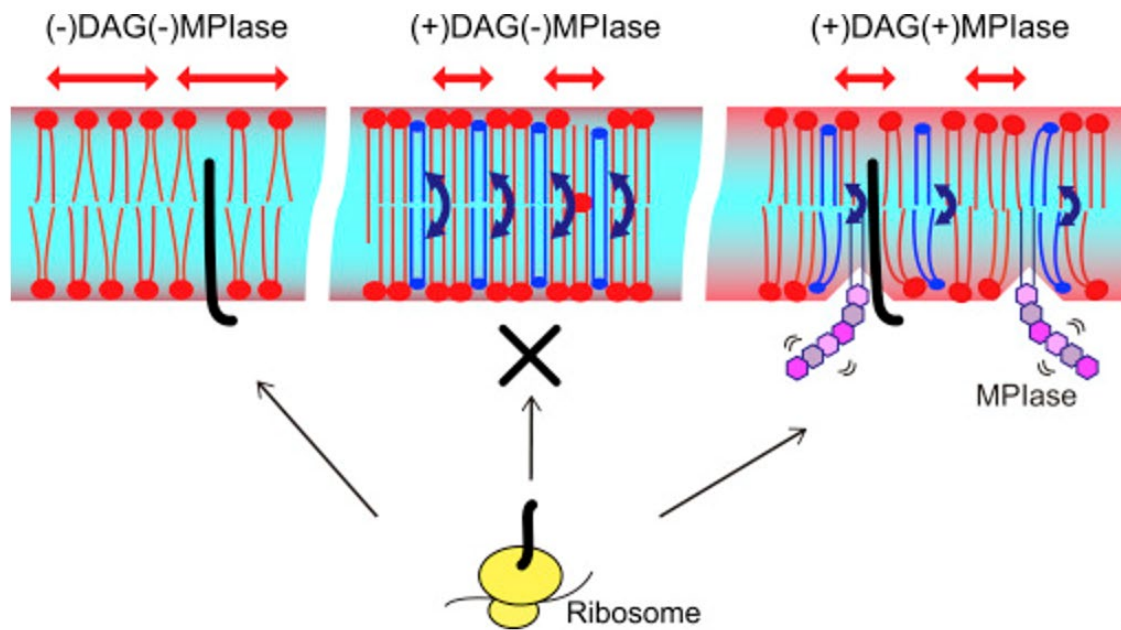
MPIase の増加により、大腸菌は低温下での反応阻害を抑制しようとしていると考えられる。



K. Fujikawa, S. Suzuki *et al.* *ACS Chem. Biol.* (2018)

図 4 MPIase の機能様式予想図

リボソームで合成された膜タンパク質の新生鎖が MPIase の糖鎖に包まれ、凝集が防がれる。MPIase の脂質部は、MPIase を細胞質膜上に固定する役割があり、糖鎖部に捕捉された基質は膜の中へと引き込まれる。



K. Nomura *et al. Biophys. J.* (2019)

図 5 DAG/MPIase が膜表面に与える変化

DAG がリン脂質膜に存在するとリン脂質の配置が密になり、自発的なタンパク質膜挿入が阻害される。DAG も MPIase もない場合、膜タンパク質の自発的膜挿入が起こってしまい、これは実際の生体内環境を反映していない。MPIase もある条件では、MPIase のピロリン酸部分の周囲のリン脂質膜に開裂ができ、局所的にタンパク質膜挿入がしやすくなる。

1.5 節 MPIase と ECA の比較

MPIase の構造は、大腸菌の外膜外葉主要構成因子 ECA (Enterobacterial Common Antigen) と似ている (Nishiyama et al., 2012) (3.1 節参照)。しかし、ECA も MPIase と同じ 3 糖ユニットの繰り返しをもつものの、MPIase の繰り返し数が 9-11 であるのに対して、ECA は 18-55 と、長いうえに不均一である。また、MPIase は糖鎖部と脂質部がピロリン酸を介して結合するのに対し、ECA ではモノリン酸を介して結合するという違いがある。MPIase の脂質部は内膜への固定化、糖鎖部は合成直後の膜タンパク質との相互作用に関わっていると考えられている (Nishiyama et al., 2012, Fujikawa et al., 2018, Nomura et al., 2019)。しかし、MPIase と同様の糖鎖をもつ ECA では膜挿入活性は全く見られない (Nishiyama et al., 2012)。これらのことから、糖鎖の長さが膜挿入活性に重要であると考えられている。

ECA の機能は不明であり、大腸菌の増殖に必須でない (Kuhn et al., 1988, Rick et al., 1996)。一方、ECA 生合成酵素群およびそれらの触媒機能は大部分が解明されている (Erbel et al., 2003, Jorgenson et al., 2016, Mitchell et al., 2018)。ECA の 3 糖ユニットは、内膜内葉のウンデカプレノール上で生合成され、その後、内膜外葉へ転移し、糖鎖重合で長く伸びた糖鎖部がウンデカプレノールから切り離され、フォスファチジン酸 (PA) に転移する。

1.6 節 MPIase の生合成

MPIase の発現には、CdsA とそのパラログ YnbB が関与していることが明らかにされている(Sawasato et al., 2019a, Sato et al., 2019)。内膜に局在する CdsA は、CDP-ジアシルグリセロール(CDP-DAG)生合成酵素である(Icho et al., 1985)。大腸菌においては、CDP-DAG がすべてのリン脂質の前駆体である(Ganong et al., 1980)。CdsA は増殖に必須の酵素であり(Sawasato et al., 2019a, Ganong et al., 1980)、すべての生物に CdsA のホモログが存在する(Sawasato et al., 2019a, Shen et al., 1996)。YnbB は CdsA 同様に内膜局在するが、これまで機能不明であった。YnbB は CDP-DAG 生合成能が低く、MPIase の生合成に特化した酵素であることが示唆されている(Sato et al., 2019)。CdsA 枯渇条件では MPIase 発現量が著しく減少し、反対に CdsA 過剰発現株では MPIase 発現量が増加する。YnbB 過剰発現株でも MPIase 発現量が増加する(Sawasato et al., 2019a, Sato et al., 2019)。これらのことから、CdsA/YnbB は MPIase 生合成酵素であると結論された。しかしながら、MPIase 生合成の分子機構は未解明のままであったため、第 2 章で検証した。

MPIase と ECA が類似していることから、両者の生合成経路は一部重複していることが予想されたが、ECA 生合成遺伝子の 1 つである *wecA* を欠失した変異株においても MPIase 発現量に影響がない(Nishiyama et al., 2012)ことから、MPIase と ECA の生合成経路は独立している可能性が想起された。このことを第 3 章で検証した。

YnbB は CdsA と同様に MPIase 生合成に関与することが示されていたものの、*ynbB* 遺伝子欠損株は何の表現型も示さず、また CdsA の代替因子にもならない(Sawasato et al., 2019a, Sato et al., 2019)ため、その重要性については不明であった(図 6)。第 4 章では、YnbB の重要性について遺伝学的に検証した。

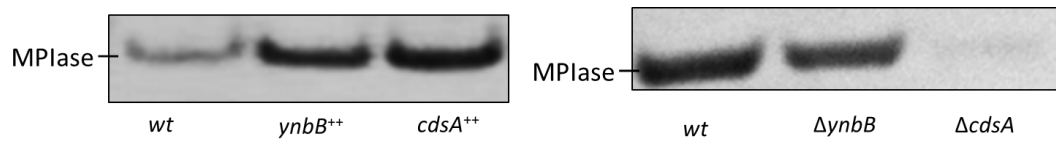


図 6 CdsA/YnbB による MPIase 発現量の変化

左側が CdsA/YnbB を過剰発現した場合、右側が CdsA/YnbB を欠損させた場合の MPIase の発現量である。野生型株(*wt*)に比べて、MPIase 発現量が変化する。

第 2 章 MPIase 第 1 生合成中間体の生成機構

2.1 節 はじめに

当研究室の佐藤らが MPIase 生合成に関与する因子として内膜タンパク質 CdsA および YnbB を同定した(Sawasato et al., 2019a)。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、原核生物と真核生物の全生物にホモログ酵素が保存されており、それらは CDS ファミリーを形成する(Sawasato et al., 2019a, Sekiya et al., 2021)。大腸菌における CDP-DAG は、すべてのリン脂質の前駆体として用いられており、CdsA は増殖に必須である(Ganong et al., 1980)。YnbB は CdsA のパラログである(Sawasato et al., 2019a, Sato et al., 2019)。実験的に CdsA/YnbB が MPIase の発現に関与することは確かめられ、特に CdsA は MPIase の発現に必須であることが示された(Sawasato et al., 2019a)。

1998 年に出版された Rick らの ECA 生合成の論文(Rick et al., 1998)において、バクテリアから新規糖脂質 ManNAcA-GlcNAc-PP-DAG (DGP-disaccharide)が発見された。DGP-disaccharide は MPIase の部分構造と完全一致している。それ以降、DGP-disaccharide についての研究報告はなく、生体内における意義は不明のままであったが、MPIase の構造が判明した現在では、DGP-disaccharide は MPIase の前駆体のひとつであろうと考えられる。つまり、MPIase は ECA とは異なり、はじめから PA に糖が付加して糖鎖が伸長していくような生合成過程を経ると考えられる。これらのことから、脂質部に糖が 1 つのみ結合した GlcNAc-PP-DAG が、DGP-disaccharide の 1 段階前の MPIase 前駆体であり、MPIase の生合成第 1 中間体であると仮定した。以下、GlcNAc-PP-DAG を compound I と呼称する。

MPIase が多段階反応を経て生合成される代謝産物であることは、その構造から

明らかである。前述したリン脂質生合成酵素 CdsA は MPIase の発現に関与していることが明らかであったが(第 1 章参照)、MPIase 生合成経路のどの反応を触媒するかは未解明であった。また、compound I が生体内に存在するという報告はこれまでになく、compound I が実際に生合成されることを示す必要がある。compound I の構造は、CDP-DAG の構造と比較的似ているといえる。また、compound I はグリセロリン脂質である。そのため、CDP-DAG 生合成酵素である CdsA が MPIase 生合成経路における compound I 生合成にも関与する可能性を考えた。本章ではこれを検証することとした。

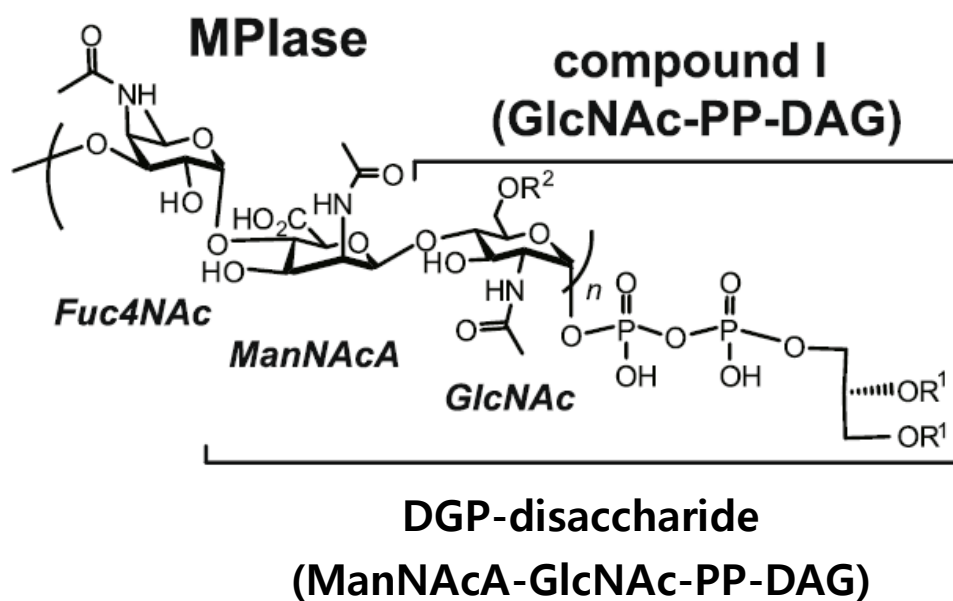


図 7 MPIase の構造

compound I と DGP-disaccharide に相当する部分もあわせて図示した。

2.2 節 実験方法

2.2.1 項 [¹⁴C]-PA を用いた compound I 生合成反応および検出

大腸菌内膜の反転膜小胞(INV)は既報法(Nishiyama et al., 2012)に従って調製し、INV および細胞質のタンパク質濃度は BSA を標準物質としてローリー法(Lowry et al., 1951)により定量した。

反応液は、2 mg タンパク質/mL INV、5 mg タンパク質/mL 細胞質、[¹⁴C]-PA (4 μM; 約 23 kBq/mL)、1 mM シチジン 5'-三リン酸(CTP)、1 mM GlcNAc-1P、1.5% オクチルグルコシド(OG)、5 mM 硫酸マグネシウム、40 mM 硫酸カリウム (80 mEq/L K⁺)、50 mM pH 緩衝液(詳細後述)を 1.5 mL 容試験管内で混合し、合計液量が 20 μL または 40 μL になるようにした。混合後、37°Cで保温し酵素反応させた。反応液をシリカゲルプレートにスポットし、展開溶媒(Sawasato et al., 2019a)で展開した。展開後のプレートの放射性スポットを Phosphorimager を用いて検出し(オートラジオグラフィ)、Image Quant の定量プログラムを用いて ¹⁴C 由来のスポット強度を定量した。また、アニスアルデヒド試薬(エタノール 500 mL、硫酸 12.5 mL、酢酸 6 mL、*p*-アニスアルデヒド 9.5 mL)にプレートを浸し、ホットプレートで加熱することで有機化合物のバンドを呈色した。

生合成反応の際の pH 緩衝液は目的の pH に応じて緩衝液を用いた([pH4.5・pH5.0・pH5.5] クエン酸-クエン酸ナトリウム、[pH6.0・pH6.5] Bis-Tris-H₂SO₄、[pH7.5] HEPES-KOH、[pH8.5] Tricine-KOH、[pH9.5・pH10.0・pH10.5] 炭酸水素ナトリウム-炭酸ナトリウム)。

2.2.2 項 LC-MS 分析用の compound I 生合成反応

反応に使用する INV-PA 混合プロテオリポソームを以下のように調製した。メタノールに溶かした PA(C16:0)をガラス試験管に 200 μg 分取し、窒素ガス流下で完全に乾固させた。INV 可溶化液は、2 mg タンパク質/mL INV(RS80/CdsA8 過剰発現株由来)、3% OG、50 mM Tricine-KOH(pH8.5)、1 mM DTT、10% グリセロールを混合し、合計容量 0.5 mL とした。INV を十分に可溶化するため氷上で 30 分間静置した後、4°C、150,000 $\times g$ 、30 分間遠心した。遠心上清を PA の入ったガラスチューブに入れ、音波処理によりよく混合した。混合液を透析用緩衝液 (50 mM Tricine-KOH(pH8.5)、1 mM DTT) に対して透析し、プロテオリポソームを形成させた。得られたプロテオリポソームは、液体窒素による瞬間凍結-融解-音波処理を 3 回繰り返して均一化、単層化させた(Sasaki et al., 2019)。

生合成反応液は、1.5 mg タンパク質/mL プロテオリポソーム、1 mM CTP、1 mM GlcNAc-1P、5 mM 硫酸マグネシウム、30 mM 硫酸カリウム、20 mM Tricine-KOH(pH8.5)、1 mM ATP、10 mM クレアチンリン酸、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ クレアチンキナーゼ(ウサギ筋肉由来)を混合し、合計容量を 0.6 mL とした反応液混合後、37°Cで一晩保温し酵素反応させた。反応終了後、反応液を 4°C、150,000 $\times g$ 、2 時間遠心し、沈殿(反応産物が含まれるプロテオリポソーム)を回収した。沈殿に溶媒(クロロホルム:メタノール=1:1)を 25 μL 加え、沈殿をよく溶かしてリポソーム構造を破壊した後、再度乾固させた。この乾燥試料を LC-MS および LC-MS/MS 分析に供した(サントリー生命科学研究所により実施、詳細は Sawasato et al., 2019a を参照)。

2.3 節 結果

2.3.1 項 compound I の生合成基質の決定

先行研究において、compound I 生合成反応におけるいくつかの基質の組み合わせが考案されたが、いずれの組み合わせも compound I 生合成反応は検出されなかった(データ省略)。まだ試されていなかった PA、CTP、GlcNAc 供与体の組み合わせを試し、compound I が生合成されるかを調べた。GlcNAc 供与体には、UDP-GlcNAc、CDP-GlcNAc、GlcNAc-1 リン酸(GlcNAc-1P)の 3 種を用いた。UDP-GlcNAc と GlcNAc-1P は大腸菌の糖転移反応の GlcNAc 供与体としてよく使われることが知られている。CDP-GlcNAc は生体内に存在することがまったく報告されていないが、CdsA は CTP または dCTP に対して基質特異性が非常に高く、シチジン以外の NTP または dNTP をほとんど認識しないと報告されている(Sparrow et al., 1985)ことを考慮し、GlcNAc 供与体の候補に選定した。MPIase の細胞内発現量は総リン脂質量に対して非常に少ない(モル比で 0.05%程度)と見積もられている(Nishiyama et al., 2012, Fujikawa et al., 2018)。そのため、MPIase 生合成中間体の量も非常に少なく、一般的に中間体は最終産物よりも安定性が低いことも加味すると、生合成された compound I の量はごく微量で検出できない可能性がある。そのため、放射性 [^{14}C]-PA を用い、オートラジオグラフィーで反応産物を検出した(図 8)。compound I 生合成反応後の反応液を薄層クロマトグラフィー(TLC)で分離し、オートラジオグラフィーで検出した結果、3 種類の GlcNAc 供与体のうち、GlcNAc-1P 添加の反応後レーンに特異的なスポットが現れた。この特異的なスポットの Rf 値は、化学合成標品の compound I の Rf 値と一致した。このことから、compound I の GlcNAc 供与体は GlcNAc-1P であることが示唆された。

次に、この GlcNAc-1P 添加時の特異的なスポットが compound I であることを

確かめるために、基質依存性および INV (CdsA 過剰発現株由来) 依存性を調べた。生合成された compound I をより検出しやすくするために、GN80 株および RS80 株の INV を用いた。GN80 (*cdsA8* 変異株) は *cdsA* 遺伝子に変異がある pH 感受性変異体であり、アルカリ条件下において細胞内に PA を蓄積し、CdsA 下流のリン脂質生合成が阻害される (Ganong et al., 1982)。また、GN80 は pH8.5 において MPIase の生合成量が増加することが明らかにされている (図 9) (Sawasato et al., 2019a)。これらのことから、CdsA8 変異は CDP-DAG の解離阻害を起こす変異である可能性を考えた。その場合、CdsA8 は GlcNAc-1P と反応する時間が野生型 CdsA に比べて長くなる分、GN80 株では compound I 生合成量が増加することを期待した。RS80 は、GN80 から CDP-DAG の加水分解酵素遺伝子 *cdh* を欠損させた変異体である。pH6.5-8.5 で compound I 生合成反応をおこなったところ、pH を上げるにつれて compound I が増加し、CDP-DAG が減少する様子が観察された (図 10)。反応液と化学合成標品を同一プレート上で重ね打ちして展開することにより、オートラジオグラフィーで観察される CDP-DAG および compound I の R_f 値が化学合成標品のものと確かに一致することを示した (図 10)。この系を用いて、pH8.5 で compound I 生合成条件を調べた結果、PA、CTP、GlcNAc-1P、INV をすべて添加した場合のみ、TLC 上で特異的に強い compound I のバンドが検出された (図 11、図 12)。また、基質を PA と CTP のみにし、反応開始後に GlcNAc-1P を添加して生合成産物の変化を観察した。その結果、GlcNAc-1P 添加後に compound I と思われる展開位置のバンドが増強した (図 13)。これらの結果から、compound I の生合成基質は PA、CTP、GlcNAc-1P であることが示された。

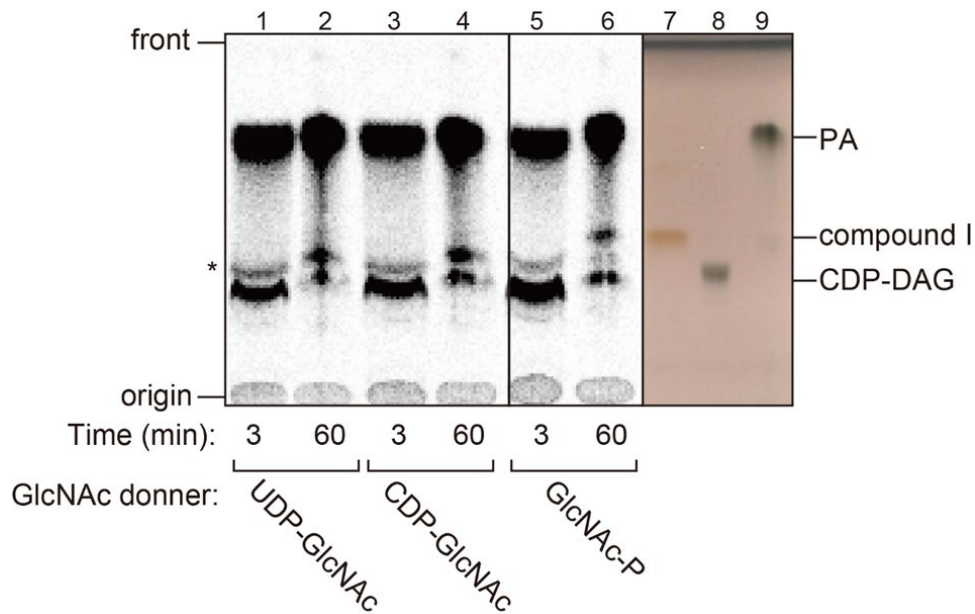


図 8 GlcNAc 供与体の決定

INV(JM109/pTac-CdsA 由来) を OG で可溶化後、 $[^{14}\text{C}]$ -PA、CTP と図に示す GlcNAc 供与体と混合し、 37°C で反応させた。反応開始 3 分経過時、60 分経過時の反応液を TLC で分析した。薄層プレートでの展開は、以下の 3 種類の溶媒で連続して展開した。展開溶媒①クロロホルム：メタノール=4:1、展開溶媒②クロロホルム：メタノール：水=10:5:1、展開溶媒③クロロホルム：メタノール：酢酸=10:5:1。展開溶媒①はプレートの最大展開距離の約 75%まで、展開溶媒②および③は 100%展開した。レーン 1-6 はオートラジオグラフィ検出のため、 $[^{14}\text{C}]$ -PA 由来のバンドのみが視認できる。化学合成標品(compound I ;レーン 7、CDP-DAG;レーン 8、PA;レーン 9)はアニスアルデヒド試薬で呈色した。アスタリスクは $[^{14}\text{C}]$ -PA の分解産物の位置である。60 分間反応時の CDP-DAG が少ないのは、CDP-DAG 加水分解酵素(Cdh)により加水分解されたためであると考えられる。

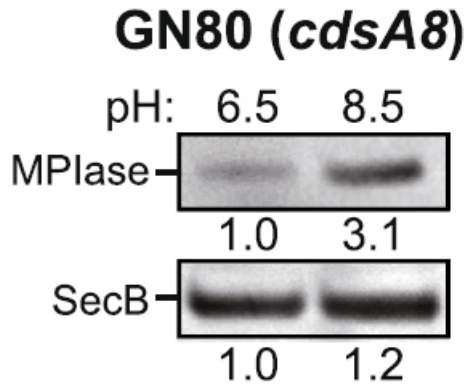


図 9 GN80 株の MPIase 発現量

pH6.5 または pH8.5 の培地で培養した GN80 の MPIase 発現量を比較した。SecB の発現量をローディングコントロールとして並べて示した。MPIase および SecB はイムノブロットティングで検出し、pH6.5 条件に対する pH8.5 条件の発現量を数値化して示した。

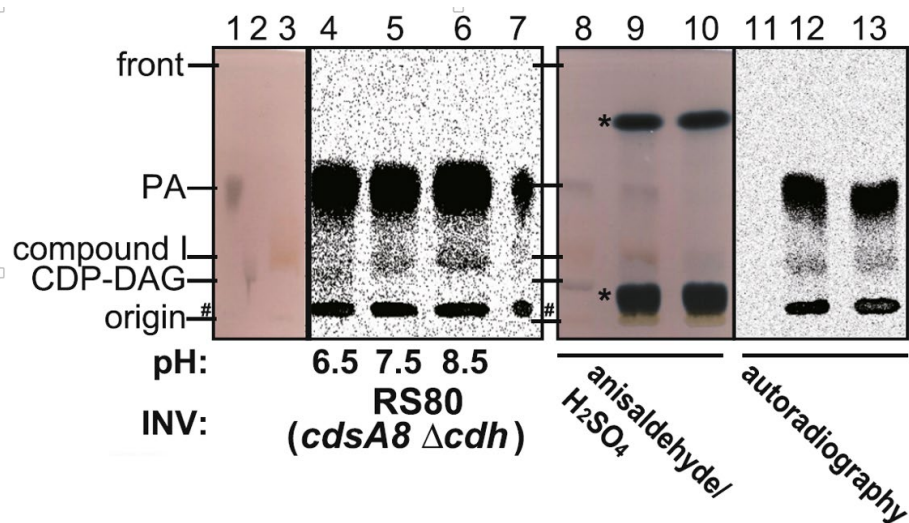


図 10 pH 変化による生合成産物の変化、生合成産物の Rf 値の確認

INV(RS80 Δ *cdh*由来)を OG で可溶化後、[¹⁴C]-PA、CTP、GlcNAc-1P と混合し、それぞれの pH で反応させ、反応液の TLC 分析をおこなった。化学合成標品(PA;レーン 1、CDP-DAG;レーン 2、compound I ;レーン 3、[¹⁴C]-PA;レーン 7、PA・CDP-DAG・compound I 混合;レーン 8 と 11)も展開し、それぞれの展開位置を示した。標品と反応液を重ね打ちして展開位置を確認した(レーン 9 と 12)。レーン 6、9、10、12、13 は同じ反応液を使用した。展開溶媒は、クロロホルム:アセトン:80v/v% アセトニトリル水溶液=1:6:6 を用いた。#は [¹⁴C]-PA の夾雑物、アスタリスクは OG(上)とスクロース(下)を示す。

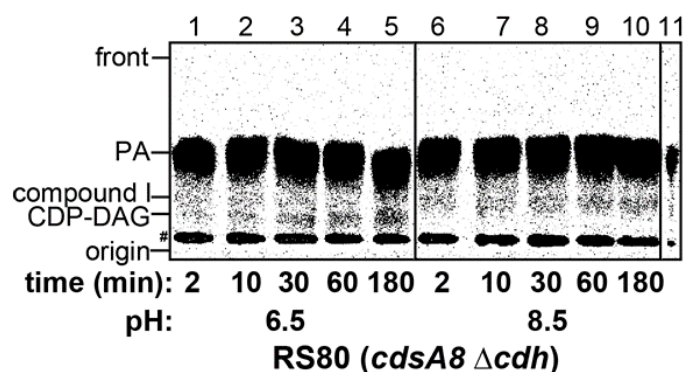


図 11 生合成量の経時的変化

INV(RS80 Δcdh 由来)を OG で可溶化後、 $[^{14}\text{C}]$ -PA、CTP、GlcNAc-1P と混合し、pH6.5 または pH8.5 で反応させ、一定時間ごとに反応液を分取しオートラジオグラフィーによる TLC 分析をおこなった。展開溶媒は、クロロホルム:アセトン:80v/v% アセトニトリル水溶液=1:6:6 を用いた。レーン 11 は $[^{14}\text{C}]$ -PA である。#は $[^{14}\text{C}]$ -PA の夾雑物を示す。

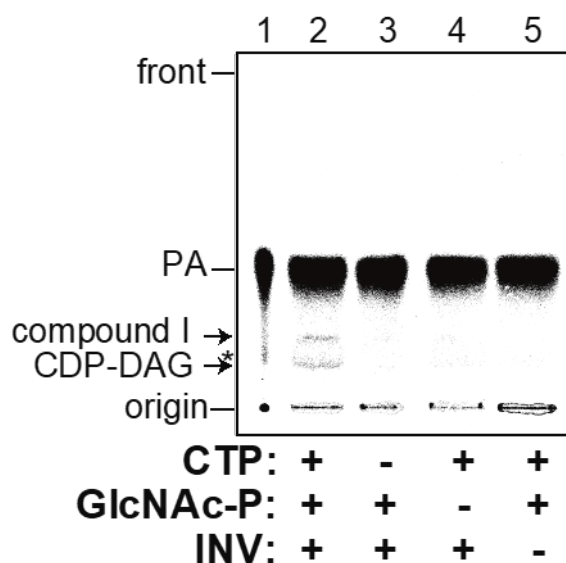


図 12 compound I の基質依存性、INV 依存性

INV(GN80/pTac-CdsA8 由来)を OG で可溶化後、 $[^{14}\text{C}]$ -PA、CTP、GlcNAc-1P と混合し、反応させた。反応液を展開溶媒(クロロホルム:アセトン:80v/v% アセトニトリル水溶液=1:6:6)で展開し、オートラジオグラフィーを用いた TLC 分析をおこなった。レーン 1 は $[^{14}\text{C}]$ -PA であり、アスタリスクで $[^{14}\text{C}]$ -PA の分解物を示した。

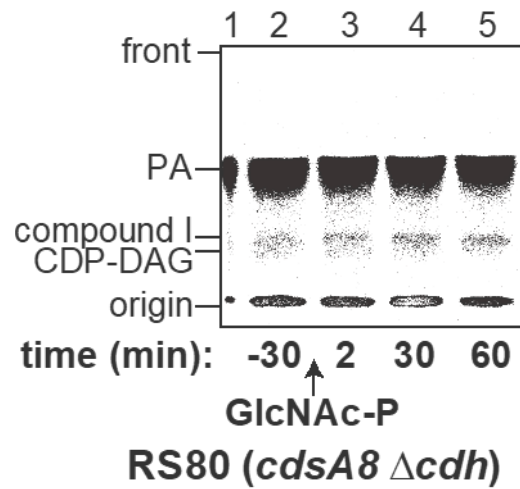


図 13 GlcNAc-1P 添加による CDP-DAG から compound I への転換

GlcNAc-1P 添加前後の compound I 生合成変化を観察した。GlcNAc-1P 添加の 60 分前に GlcNAc-1P を除いた反応液の反応を開始し、図中の time=0 時点で GlcNAc-1P を添加した。レーン 1 は ^{14}C -PA である。

2.3.2 項 compound I は CDP-DAG 生合成直後に CdsA 上で生合成される

経時的な compound I と CDP-DAG の生合成の関係を調べた。ここでは INV の代わりに INV を 6% コール酸ナトリウムで抽出した可溶化画分(cholate-sup)を用いた。この cholate-sup は CdsA8 の生合成活性が総 INV に比べ弱まり、反応液を展開した compound I と CDP-DAG の両方を同一プレート上で観察しやすくなっている。pH8.5 で生合成産物を経時的に観察したところ、compound I の量は反応時間が進むにつれ増加した一方、CDP-DAG の量は反応開始 5 分で頭打ちとなり、その後一定レベルに保たれた(図 14)。このとき、compound I は CDP-DAG 生合成より後に生合成されている様子がみられた(図 14)。オートラジオグラフィで検出された PA と CDP-DAG のバンドの強度比から生合成された CDP-DAG のモル数を概算するとともに、反応液中の CdsA8 のモル数も概算し照合した。その結果、CDP-DAG は 0.7-1.4 pmol/20 μ L 反応系、CdsA8 は 0.8-1.6 pmol/20 μ L 反応系で、同じようなモル数であることが明らかとなった。これらのことから、生合成された後の CDP-DAG が CdsA 上で compound I に変換されることが強く示唆された。また、compound I に変換されない限り、高 pH において CDP-DAG は CdsA8 変異体から放出されないことも示唆された。

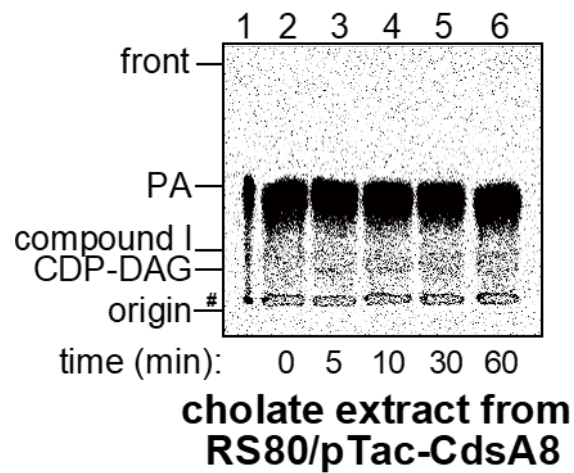


図 14 CdsA8 による compound I と CDP-DAG の生合成量の経時的変化

INV(RS80/pTac-CdsA8 由来)の 6% コール酸 Na 抽出物(cholate-sup)を用いて経時的変化を観察した。cholate-sup と基質を pH8.5 で反応させ、反応液を一定時間ごとに分取し、TLC 分析をおこなった後、オートラジオグラフィーにより生成物を検出した。レーン 1 は ^{14}C -PA である。

2.3.3 項 質量分析による反応産物の確認

前述の通り、TLC 分析により compound I の生合成が確かめられ、生合成された compound I のバンドの Rf 値が複数の展開条件で化学合成標品のものと一致することも確認した(データ省略)。しかしながら、生合成量の少なさ(20 μ L 反応液中に数 pmol 程度)から LC-MS の検出限界を下回り、質量分析での compound I 生合成証明をできずにいた。そこで、compound I の量を増やすために①反応系の量、②INV 抽出物と PA のプロテオリポソーム化、③CTP 再生系の導入の 3 つを検討した。その結果、LC-MS で反応液中の compound I を検出することが可能になった。サントリー生命科学研究所・藤川研究員、島本主幹研究員(当時)による LC-MS 解析(分解能 10,000)の結果、反応液中の compound I と考えられるピークと化学合成標品の溶出時間および質量電荷比が一致した(図 15、図 16)。compound I と考えられる溶出時間 5.2 分のピークを MS/MS 解析に導入したところ、compound I が開裂した場合に発生すると推定されるフラグメントイオンの m/z と一致する、2つのピークが検出された(図 16c)。また、GlcNAc-1P のみを反応液組成から除いた場合、CDP-DAG の溶出ピークは変わらない強度で検出される一方、compound I のピークは消失した(図 17)。これらのことから、compound I が実際に生合成されること、および、compound I の基質が GlcNAc-1P であることが質量分析によっても示された。

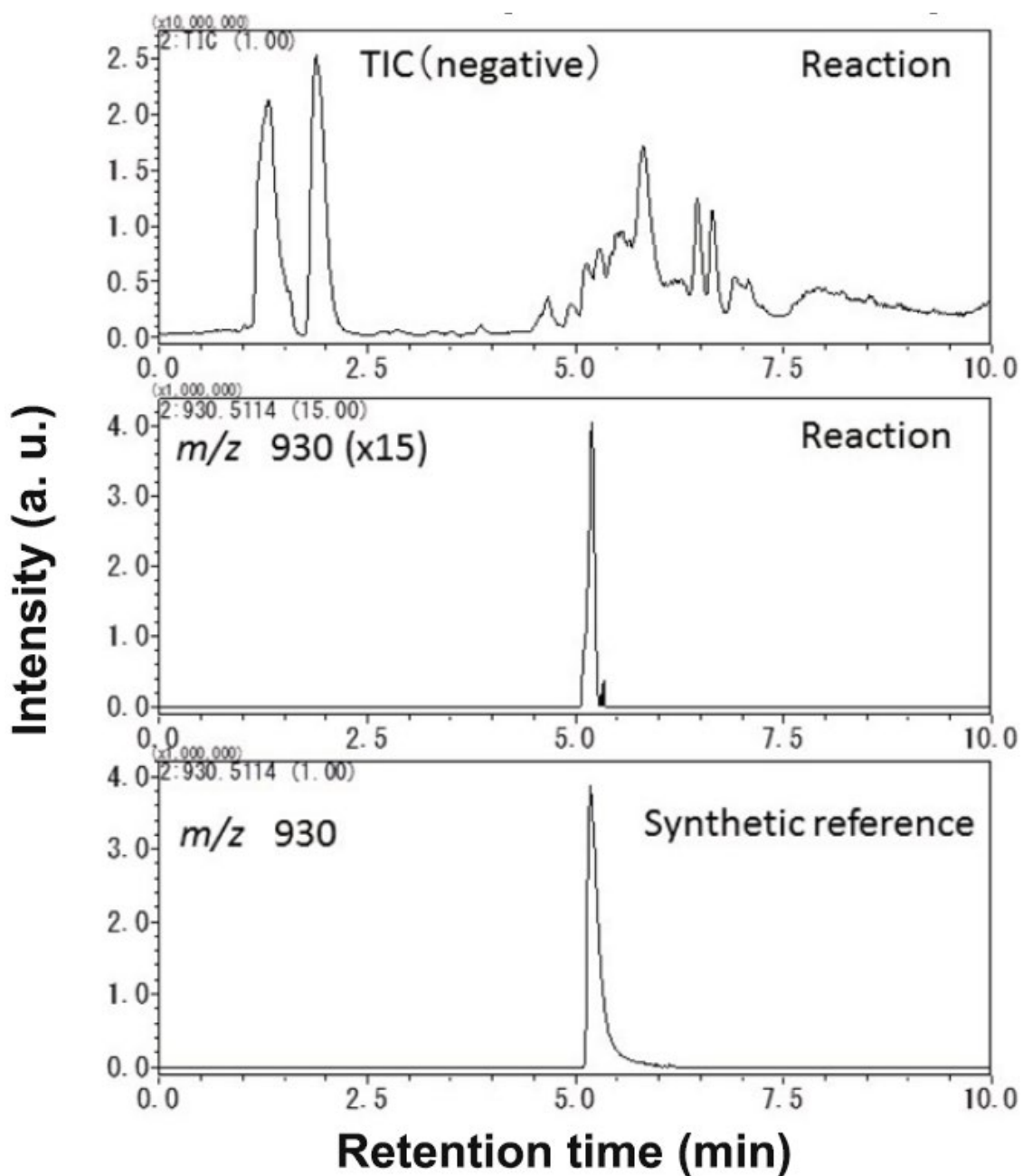


図 15 LC-MS による compound I の検出

(上) 生合成反応液の総イオンクロマトグラム(TIC)。(中央) 生合成反応液の m/z 930.5114 における抽出イオンクロマトグラム(EIC)。(下) 化学合成標品 compound I の m/z 930.5114 における EIC。

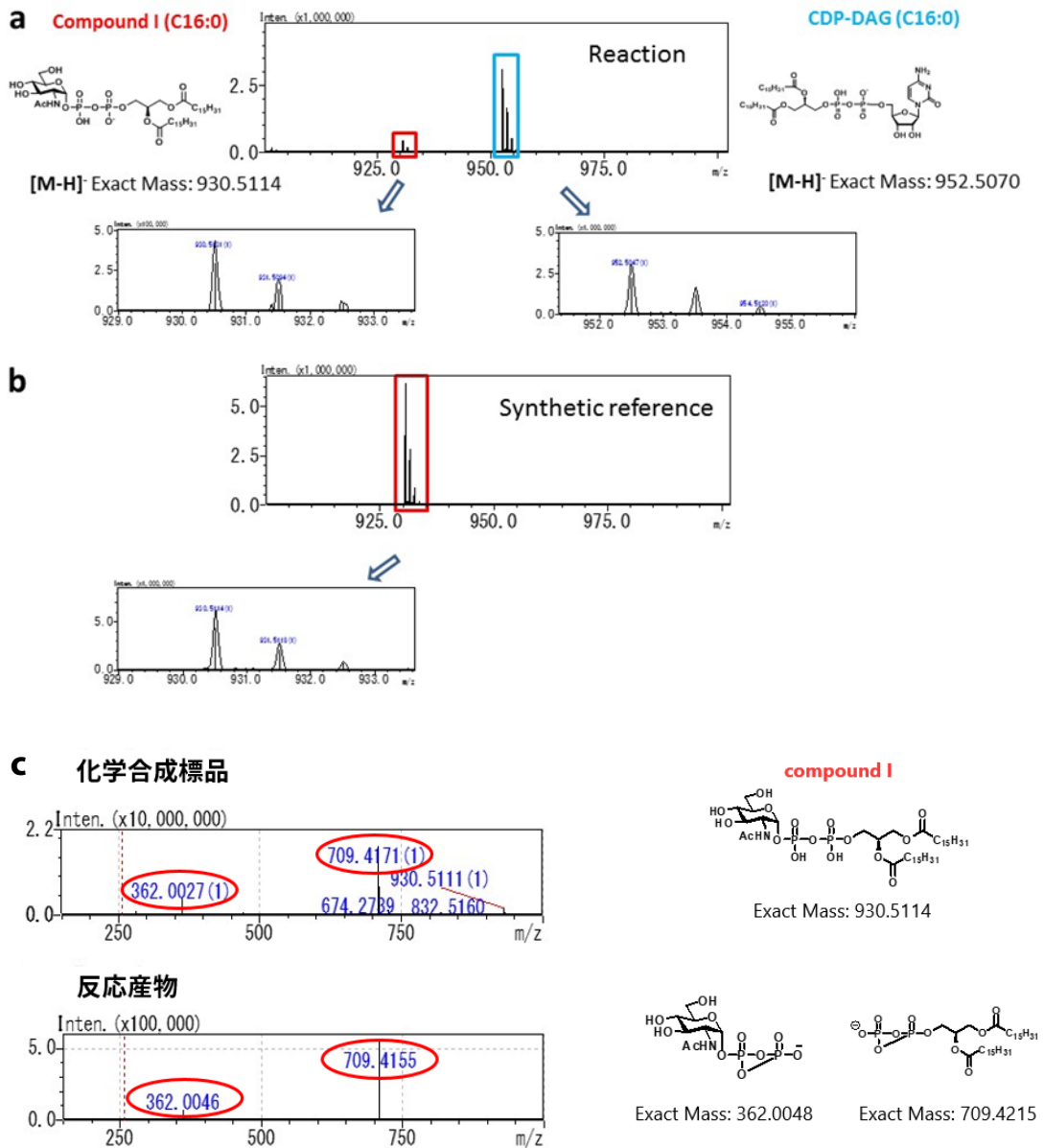


図 16 compound I と CDP-DAG の MS スペクトル

(a) 反応液の HPLC で 5.2 分に溶出されるピークの MS スペクトル。m/z=930 と 950 は、それぞれ compound I と CDP-DAG の質量電荷比を表す。(b) 化学合成標品 compound I の HPLC で 5.2 分に溶出されるピークの MS スペクトル。(c) LC-MS/MS 解析によって得られた compound I 化学合成標品と生合成反応液中の compound I のスペクトル。どちらも同様のフラグメントピーク化を起こした。フラグメントの質量と合致する compound I 由来フラグメントイオンを併せて示した。

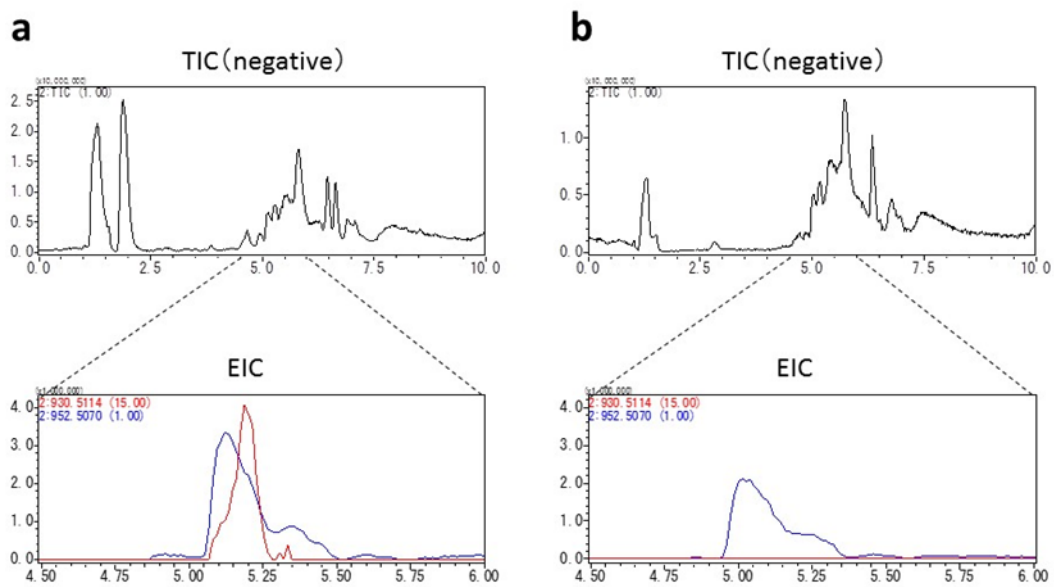


図 17 MS スペクトルによる GlcNAc-1P 依存性の確認

GlcNAc-1P 添加時(a)、GlcNAc-1P 非添加時(b)の反応液のイオンクロマトグラム。赤が compound I (m/z 930.5114)、青が CDP-DAG(m/z 952.5070)を表す。

2.4 節 考察

CdsA は CDP-DAG 生合成酵素としてよく知られていたが、本研究により、MPIase 生合成中間体の compound I 生合成酵素でもあることが明らかになった (Sawasato et al., 2019a)。MPIase の前駆体と考えられる機能不明物質 DGP-disaccharide がバクテリアで発見された報告 (Rick et al., 1998) を根拠として、MPIase の 3 糖繰り返しユニットははじめから PA 上に生合成されると考え、MPIase 生合成第 1 中間体は GlcNAc-PP-DAG (compound I) であるという仮説を立てた。CdsA が CDP-DAG 生合成酵素であることから、CDP-DAG を基質として compound I 生合成反応が起こるかどうかを検証した結果、反応溶液中に CDP-DAG が存在するだけでは compound I 生合成には不十分であることが明らかとなっている (データ省略)。それに対して本研究では、CDP-DAG の生合成基質である PA、CTP とともに GlcNAc 供与体を添加することにより compound I が生合成されることを見出した。compound I は、PA、CTP、GlcNAc-1P から生合成される。このことは、複数条件の TLC 分析および高分解能 MS 分析により証明された。本研究では、精製 CdsA ではなく、ほかの因子も含まれた内膜画分 INV を実験に用いたことで、CdsA 以外の成分による影響を完全に排除することはできない。しかしながら、CdsA 枯渇により MPIase も枯渇すること、compound I 生合成反応が見られるのは CdsA 過剰発現株由来の INV を用いた場合のみであることや、CdsA8 粗精製画分を用いても compound I 生合成が観察されることなどから、CdsA が compound I 生合成因子であることに相違はないと結論した。

GN80 は、アルカリ pH 条件下でリン脂質生合成反応が阻害される *cdsA* 遺伝子変異株である (Ganong et al., 1982)。GN80 を pH8.5 で培養し、リン脂質生合成反応および MPIase 生合成反応に及ぼす影響を調べた。その結果、リン脂質生合成反応は著しく阻害されていたが、MPIase 発現量は約 3 倍に増加していた (図 9)。

すなわち、GN80 はアルカリ条件下においてリン脂質生合成は阻害されるが、MPIase 生合成が促進される変異株であることが明らかになった。CdsA8 粗酵素液を用いた実験でも、GlcNAc-1P の結合によって CDP-DAG が compound I へと変換されることが示唆された(図 14)。CdsA8 変異は、CdsA の 207 番目のチロシン残基がヒスチジン残基に置換される変異であった(Sawasato et al., 2019a)。この変異部位を結晶構造が報告されている超好熱性グラム陰性細菌の CdsA の構造(Liu et al., 2014)に照合すると、PA が結合する部位の近傍に位置していることが明らかになった(Sawasato et al., 2019a)。アルカリ条件下では、ヒスチジン残基の脱プロトン化によって CDP-DAG の解離が阻害され、リン脂質生合成反応が阻害されたと考えられる。一方、CDP-DAG が CdsA 分子内部に保持され、GlcNAc-1P と反応する機会が増加したことで結果的に compound I 生合成が促進され、その下流の完全長 MPIase の発現量も増加したと考えられる。MPIase の発現量は総リン脂質や CDP-DAG に比べてかなり少ない(総リン脂質の 1,000 分の 1 以下と見積もられる)。野生株 CdsA を含む実験条件では compound I 生合成反応を検出できなかった要因のひとつの可能性として、MPIase の発現量が非常に低いことが挙げられる。CdsA8 (pH8.5) 条件では、CDP-DAG の解離が阻害されることが compound I を検出可能にしているといえる。

以上のことから、以下のような compound I 生合成反応モデル(図 18)を提唱した。①まず、CdsA は PA と CTP から CDP-DAG を生合成する。②ほとんどの CDP-DAG はそのまま放出されて各種リン脂質生合成経路に入るが、一部の CDP-DAG は CdsA から解離する前に CMP 部分が GlcNAc-1P に置換され、compound I へと変換される。この一連の反応は CdsA 内でおこなわれ、一度解離した CDP-DAG は compound I にならない。生合成された compound I は

未知の MPIase 生合成経路に入り、MPIase へと生合成されていく。

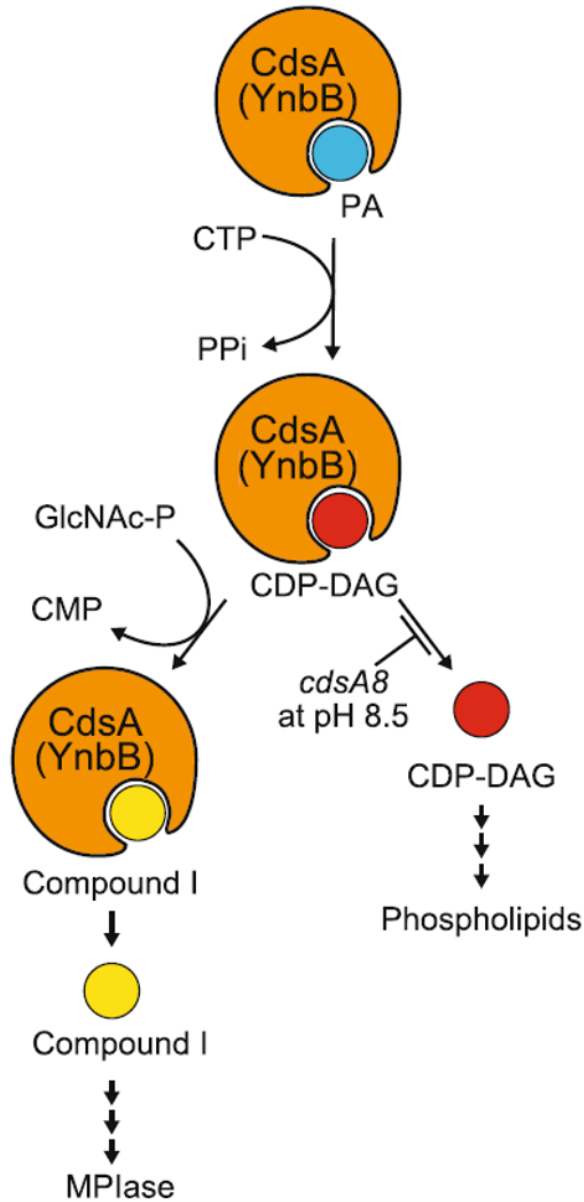


図 18 CdsA による compound I 生合成反応機構モデル

CdsA/YnbB が PA と CTP からはじめに CDP-DAG を生合成する。その後、GlcNAc-1P を取り込み、compound I を生合成する。*cdsA8*変異では、CdsA から CDP-DAG が解離するのが阻害される。CDP-DAG の解離阻害が、結果として compound I 生合成を増加させる。

2.5 節 おわりに

本章では、CdsA が CDP-DAG 生合成のほかに MPIase 第 1 中間体 compound I の生合成も担うことを明らかにした。TLC および LC-MS を用い、compound I は PA、CTP、GlcNAc-1P から生合成されることを示した。また、compound I 生合成のためには、CdsA が生合成した CDP-DAG が CdsA から解離する前に GlcNAc-1P と反応することが重要であることを示し、CdsA による compound I 生合成反応のモデルを提示した。

第3章 MPIase と ECA の生合成経路は独立している

3.1 節 はじめに

MPIase の構造(図 19)は 2012 年の論文(Nishiyama et al., 2012)にて決定されている。MPIase は糖鎖部とジアシルグリセロール(DAG)の脂質部が、ピロリン酸を介して結合した構造をしている。糖鎖部は、GlcNAc、ManNAcA、Fuc4NAc がユニットとなり、このユニットが約 10 回繰り返されている。この糖鎖は、糖脂質 ECA (Enterobacterial Common Antigen) の糖鎖とよく似ている(Nishiyama et al., 2012)。ECA は大腸菌の細胞表面に局在する外膜主要因子の一つである。MPIase の 3 糖ユニット繰り返し数が 9-11 であるのに対して、ECA の繰り返し数は 18-55 と、長いうえに不均一である。もう一つの構造上の違いは、糖鎖部と脂質部をつなぐリンカーである。MPIase のリンカーはピロリン酸であるのに対し、ECA のリンカーはモノリン酸である(図 19)。2 つの糖脂質の構造がよく似ていることに加え、両者の糖鎖を構成している ManNAcA と Fuc4NAc は希少糖である。これらのことから、2 つの希少糖の細胞内生合成経路は、MPIase の生合成にも ECA の生合成にも共有されているのではないかと考えられていた。

ECA の生合成経路は、大部分が解明されている(図 20)(Erbel et al., 2003, Jorgenson et al., 2016, Mitchell et al., 2018)。ECA の 3 糖ユニットは、内膜内葉上のウンデカプレノール上で生合成され、その後、糖鎖は内膜外葉上で伸長したのちフォスファチジン酸(PA)に転移し外膜に輸送される(図 20)(Erbel et al., 2003, Jorgenson et al., 2016, Mitchell et al., 2018)。その一方で、MPIase の糖鎖ははじめから PA 上で生合成される(図 20、第 2 章)(Sawasato et al., 2019a)。このことは、両者の細胞内局在が内膜と外膜に分かれていることに対応していると考えられる。MPIase 生合成には CdsA が関与し、CdsA を枯渇させると MPIase の発現も大幅に減少する(Sawasato et al., 2019a)。また、ECA

生合成酵素の1つである WecA を欠損させた場合に、MPIase の発現量は何の影響も受けないことも報告されている (Nishiyama et al., 2012)。しかしながら、MPIase 生合成酵素である CdsA の欠損が ECA の発現に影響を与えるかどうかや、WecA 以外の ECA 生合成酵素の欠損が MPIase の発現に影響を与えるかどうかについては、不明であった。本章では、MPIase と ECA のそれぞれの生合成遺伝子の欠損が、他方の糖脂質の発現に与える影響を調べた。

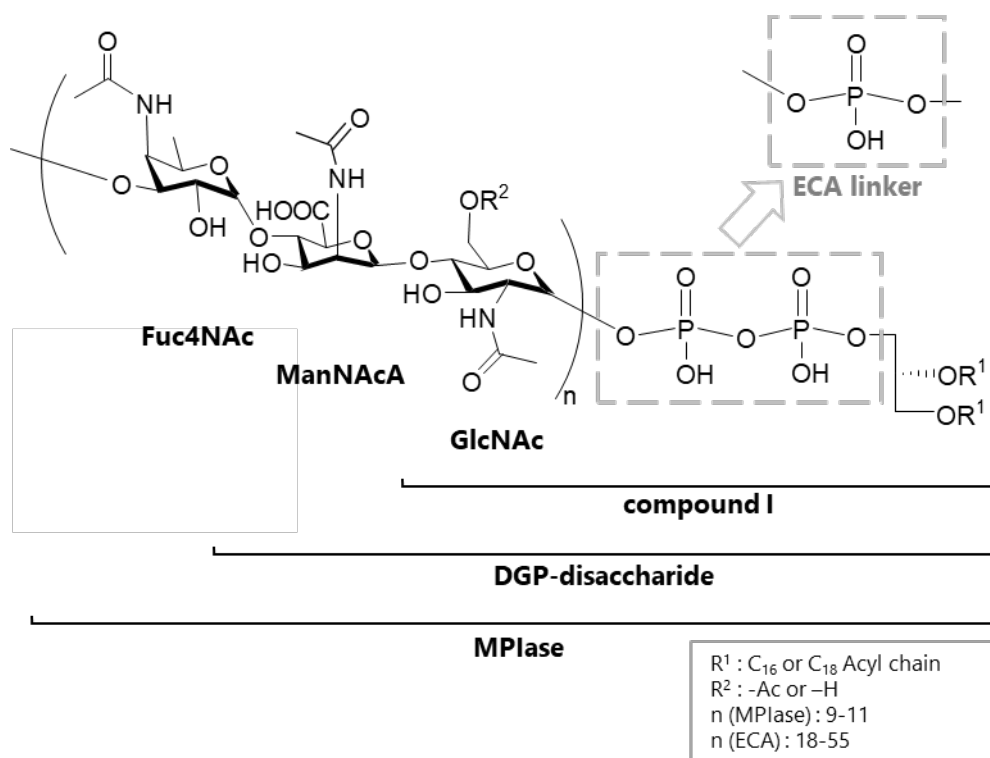


図 19 MPIase と ECA の構造

糖鎖の繰り返しユニットは Fuc4NAc、ManNAcA、GlcNAc からなる。繰り返しの数(n)は、MPIase では 9-11、ECA では 18-55 である。糖鎖と DAG を繋ぐリンカーは、MPIase ではピロリン酸、ECA ではモノリン酸である。compound I と DGP-disaccharide の構造もあわせて図示した。

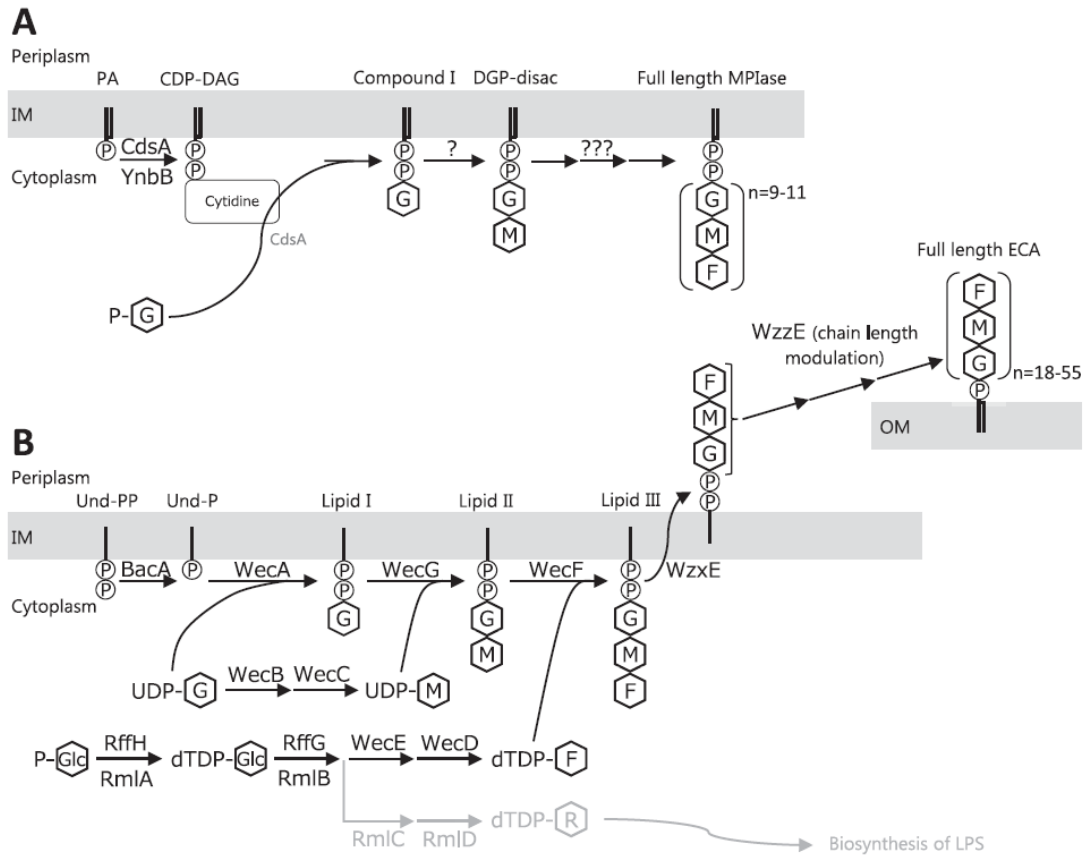


図 20 MPIase と ECA の生合成経路

MPIase(A)とECA(B)の生合成スキームを、それぞれまとめた。図中のGはGlcNAc、MはManNAc、FはFuc4NAc、Glcはグルコース、Rはラムノースを表す。

3.2 節 実験方法

3.2.1 項 MPIase および RpmJ のイムノブロットティング

大腸菌培養液を TCA 処理し、沈殿を回収した。まず、培養液に TCA を終濃度 5% になるように加え、氷上で 1 時間静置した。4°C、11,000×g、10 分間遠心して上清を除いた後、培養液と等量の氷冷したアセトンを加えて懸濁し、氷上で 30 分間静置した。4°C、11,000×g、10 分間遠心して上清を除き、沈殿を乾燥させた。培養終了時の OD660 値から、以下の(式)を用いて培養液に含まれる総タンパク質量を算出した。

$$(式) \quad OD660 \text{ 値} \times 0.2 = \text{培地 1 mL 中の総タンパク質量(mg)}$$

算出したタンパク質量から濃度が等しくなるよう、沈殿を電気泳動用サンプルバッファーに溶解し、SDS-PAGE をおこなった。SDS-PAGE 終了後のゲルから試料を PVDF 膜に転写した(Nishiyama et al., 2012)。PVDF 膜をよく乾燥させ、37°C に加温した 0.1% ポリ(メタクリル酸イソブチル)/シクロヘキサン溶液に静かに 75 秒間浸しコーティングした(Sawasato et al., 2019b)。PVDF 膜を再度よく乾燥させ、メタノールに数秒間浸した後、ブロッキング溶液(10v/v% 馬血清/TBS 緩衝液 (TBS 緩衝液:50 mM Tris-HCl (pH7.5)、137.9 mM 塩化ナトリウム、2.7 mM 塩化カリウム))に浸し、37°C で 1 時間または 4°C で一晩静置した。MPIase を検出する場合、抗 MPIase 抗体(Nishiyama et al., 2012)を一次抗体として、PVDF 膜を 2,000 分の 1 希釈抗 MPIase 抗体/TBS 緩衝液に浸し、37°C でゆっくりと振盪(20 往復/毎分程度)した。RpmJ を検出する場合、抗 RpmJ 抗体(Ikegami et al., 2005)を一次抗体として、メンブレンを 2,000 分の 1 希釈抗 RpmJ 抗体/TBS 緩衝液に浸し、37°C で振盪(40 往復/毎分程度)した。すべての一次抗体は、フォスファターゼ標識された抗ウサギ IgG 抗体を二次抗体に用いて検出した。一次抗体反応後のメンブレンを 2,000 分の 1 希釈二次抗体/TBS 緩衝液

に浸し、上記の一次抗体の場合に準じて浸透した。メンブレンを TBS 緩衝液で洗浄後、発色試薬(NBT、BCIP)を添加した発色用緩衝液(100 mM Tris-HCl (pH9.5)、100 mM 塩化ナトリウム、50 mM 硫酸マグネシウム))に浸し、37°Cで振盪した。

バンドの強度は ATTO CS Analyzer 4 を用いて定量した。RpmJ をローディングコントロールとして使用した(Ikegami et al., 2005)。

3.2.2 項 ECA の TLC-免疫染色

SDS-PAGE 用に調製した電気泳動用 TCA 沈殿試料を TLC 用シリカゲルプレートに供し、展開溶媒(Sol. C(クロロホルム:エタノール:水=3:7:4))で展開した(Nishiyama et al., 2012)。使用した抗 MPIase 抗体は ECA にもある程度結合することが報告(Nishiyama et al., 2012)されているため、展開後のシリカゲルプレートを抗 MPIase 抗体で免疫染色した。免疫染色については、3.2.1 項の MPIase のイムノプロットティング方法にすべて準じた。

3.3 節 結果

3.3.1 項 ECA 生合成遺伝子欠失変異株の MPIase 発現量は野生株と同じである

MPIase は大腸菌の増殖に必須であり(Sawasato et al., 2019a)、ECA は必須ではない(Kuhn et al., 1988, Rick et al., 1996)。もし ManNAcA 供与体や Fuc4NAc 供与体などの生合成遺伝子が MPIase・ECA 共通であるならば、ECA 生合成遺伝子欠失株は上記の希少糖を含まない最少培地で増殖できないと仮定した。これを検証するため、Keio コレクションの ECA 生合成遺伝子欠失株を最少培地で培養し、対数増殖期の倍加時間を求めた。全 14 株の ECA 変異株を野生株と比較して、定常期には若干の差が見られたものの(図 21)、対数増殖期の倍加時間はどれも同様のレベルであった(表 1)。これらの結果から、調べた 14 の ECA 生合成遺伝子の欠失により、増殖に必須である MPIase の生合成は影響を受けないことが示唆された。これらの欠失株の MPIase の細胞内発現量を比較したところ、野生株の発現量と同レベルであった。糖ヌクレオチドの生合成に関わる遺伝子 (*wecB-E*, *rffG-H*, *rmlA-B*)の欠失株においても MPIase 発現量は変化しなかったことから、MPIase 生合成に必要な希少糖供与体の生合成遺伝子群は別に存在している可能性が強く示唆された。

次に、ECA の発現量を TLC-免疫染色法を用いて確認した(図 21)。すべての *wec* 遺伝子欠失株と *rffH* 遺伝子欠失株からは、ECA は検出されなかった。その他の欠失株においては、野生株と同等量の ECA が検出された。*rmlA* および *rmlB* は *rml* オペロン(別名 *rfb* オペロン)に含まれる遺伝子で、このオペロンは LPS の生合成に関与している(Giraud et al., 2000)。dTDP-グルコースは、LPS の糖供与体である dTDP-ラムノースの生合成にも用いられることが報告されている(Giraud et al., 2000)。後述のように RffH と RmlA はパラログであるが、*rffH* 欠失株の

ECA 発現量は検出限界以下であったため、*rmlA* の発現量は非常に少ない可能性が高い。リボソームプロファイリングを用いた網羅的解析では、RmlA タンパク質合成速度は RffH のそれよりも速いことが報告されている(Li et al., 2014)。そのため、RmlA タンパク質は細胞中で不安定である可能性がある。次に、*rffH/rmlA* 二重欠失株(NF07)と *rffG/rmlB* 二重欠失株(NF08)を作成した。*rffH* または *rmlA* は dTDP- α -D-グルコース生合成反応を、*rffG* または *rmlB* は dTDP-4-デヒドロ-6-デオキシ- α -D-グルコース生合成反応を(図 20)(Giraud et al., 2000, Sivaraman et al., 2002)、それぞれ担うホモログ遺伝子ペアである。NF07 および NF08 についても前述の欠失株に対する実験と同様の実験をおこなった。その結果、どちらの二重欠失株も野生型と同様の増殖曲線(図 22)と倍加時間(表 1)を示した。MPIase 発現量についても、ほかの単一欠失株と同様に十分発現していた。これらのことから、MPIase の Fuc4NAc 生合成を司る遺伝子が ECA 生合成遺伝子とは別に存在することが示された。NF07 においては ECA の発現が検出されなかった一方で、NF08 においては野生型と同等の ECA が検出された(図 22)。この結果は、未知の MPIase 生合成酵素が、RffG/RmlB による触媒反応を代わりにおこなうことが可能であることを示唆している。

wzxE 欠損株および *wzzE* 欠損株においては、MPIase 生合成にも ECA 生合成にも影響が見られなかった(図 21)。これらの遺伝子がコードする酵素は、ECA の Lipid III の輸送と 3 糖ユニットの重合をそれぞれ触媒する(Rick et al., 2003)。MPIase は内膜の細胞質側で機能するため、この 2 つの酵素が MPIase に関与する可能性は低い。ECA 生合成経路についても、WzxE や WzzE 同様の機能をもつほかの酵素が存在し、ECA の発現に関与している可能性が考えられる。一方、TLC 上では Lipid III と成熟体 ECA の展開位置が変わらずに、Lipid III にも抗体が反応した結果、ECA が発現しているように見えているという可能性も考えられる。

表 1 本研究で使用した大腸菌株および最少培地で培養したときの倍加時間

Strain	Genotype	Doubling time (h)*
BW25113	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1</i>	2.4+/-0.2
JW3029-KC	BW25113 <i>ΔbacA::kan</i>	2.1+/-0.3
JW3758-KC	BW25113 <i>ΔwecA::kan</i>	1.9+/-0.1
JW5600-KC	BW25113 <i>ΔwecB::kan</i>	1.8+/-0.2
JW5599-KC	BW25113 <i>ΔwecC::kan</i>	2.1+/-0.4
JW5597-KC	BW25113 <i>ΔwecD::kan</i>	2.3+/-0.3
JW3765-KC	BW25113 <i>ΔwecE::kan</i>	2.1+/-0.2
JW5596-KC	BW25113 <i>ΔwecF::kan</i>	2.2+/-0.2
JW3770-KC	BW25113 <i>ΔwecG::kan</i>	2.1+/-0.1
JW5598-KC	BW25113 <i>ΔrffG::kan</i>	2.2+/-0.4
JW3763-KC	BW25113 <i>ΔrffH::kan</i>	2.2+/-0.1
JW2024-KC	BW25113 <i>ΔrmlA::kan</i>	2.1+/-0.2
JW2026-KC	BW25113 <i>ΔrmlB::kan</i>	2.1+/-0.3
JW3766-KC	BW25113 <i>ΔwzxE::kan</i>	1.9+/-0.6
JW5601-KC	BW25113 <i>ΔwzzE::kan</i>	2.2+/-0.3
NF07	BW25113 <i>ΔrffH ΔrmlA::kan</i>	1.7+/-0.1
NF08	BW25113 <i>ΔrffG ΔrmlB::kan</i>	1.9+/-0.2
KS23/pAra-CdsA	MC4100 <i>ara⁺ ΔcdsA::cat ΔynbB/pAra-CdsA (ParaB-cdsA spc^c)</i>	nd

*倍加時間は 4 回の独立した培養の結果から算出した平均時間を、平均 +/- 標準偏差の形で表示した。nd は測定結果なしを表す。

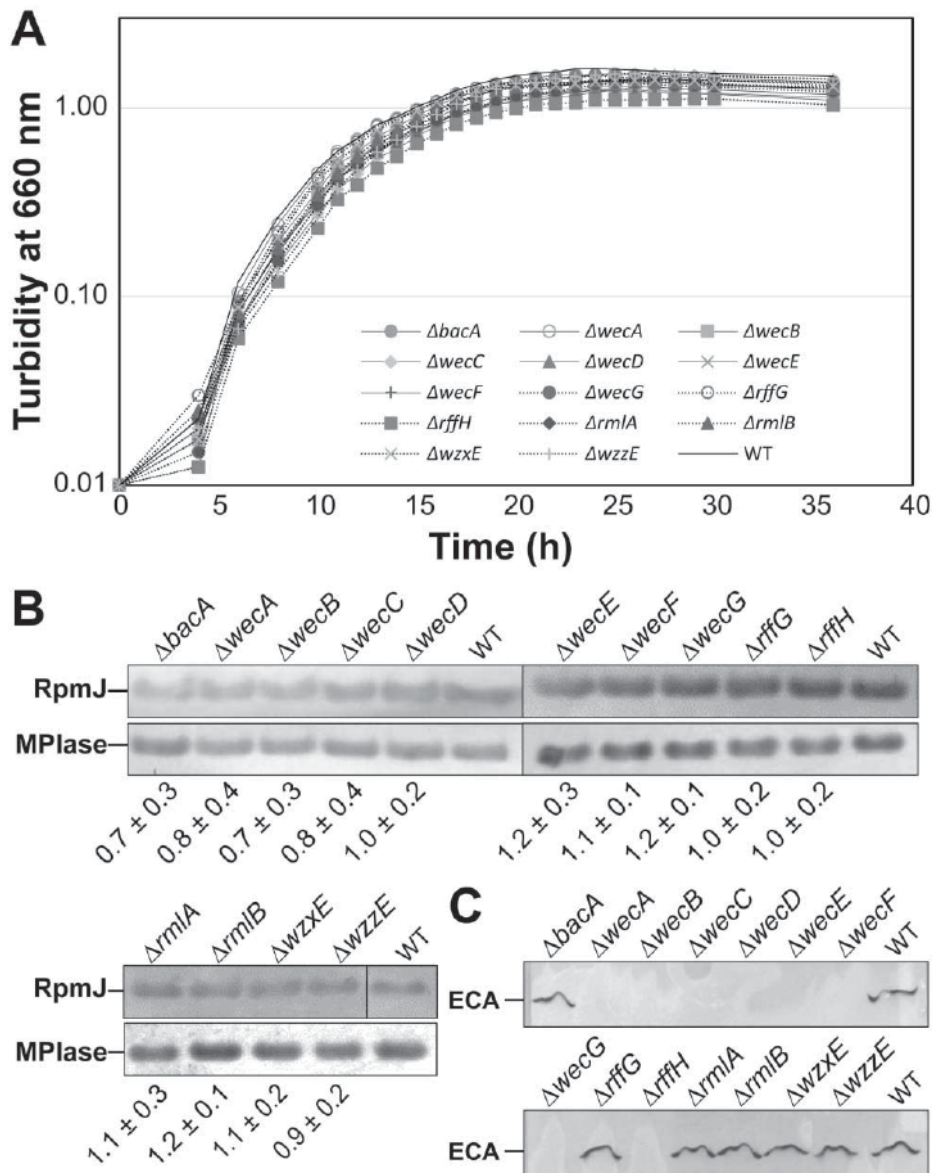


図 21 ECA 遺伝子欠失株の増殖曲線、MPIase 発現量、ECA 発現量

(A) LB 培地一晚培養液から集菌した菌体を M9 培地で 3 回洗浄し、0.2% グリセロールを添加した M9 培地に植え継いだ。37°C で振盪培養し、波長 660 nm における濁度を一定時間ごとに測定した。(B) MPIase の発現量を、SDS-PAGE ののちイムノブロッティングをおこない解析した。RpmJ の発現量をローディングコントロールとして並べて示した。野生型株 (WT) に対する各変異株の MPIase 発現量を数値化し、各バンドの下に示した。平均値と標準偏差は独立した 3 回の実験結果より算出した。(C) 各変異株および WT 株の ECA 発現量を解析した。ECA は TLC-免疫染色により検出した。

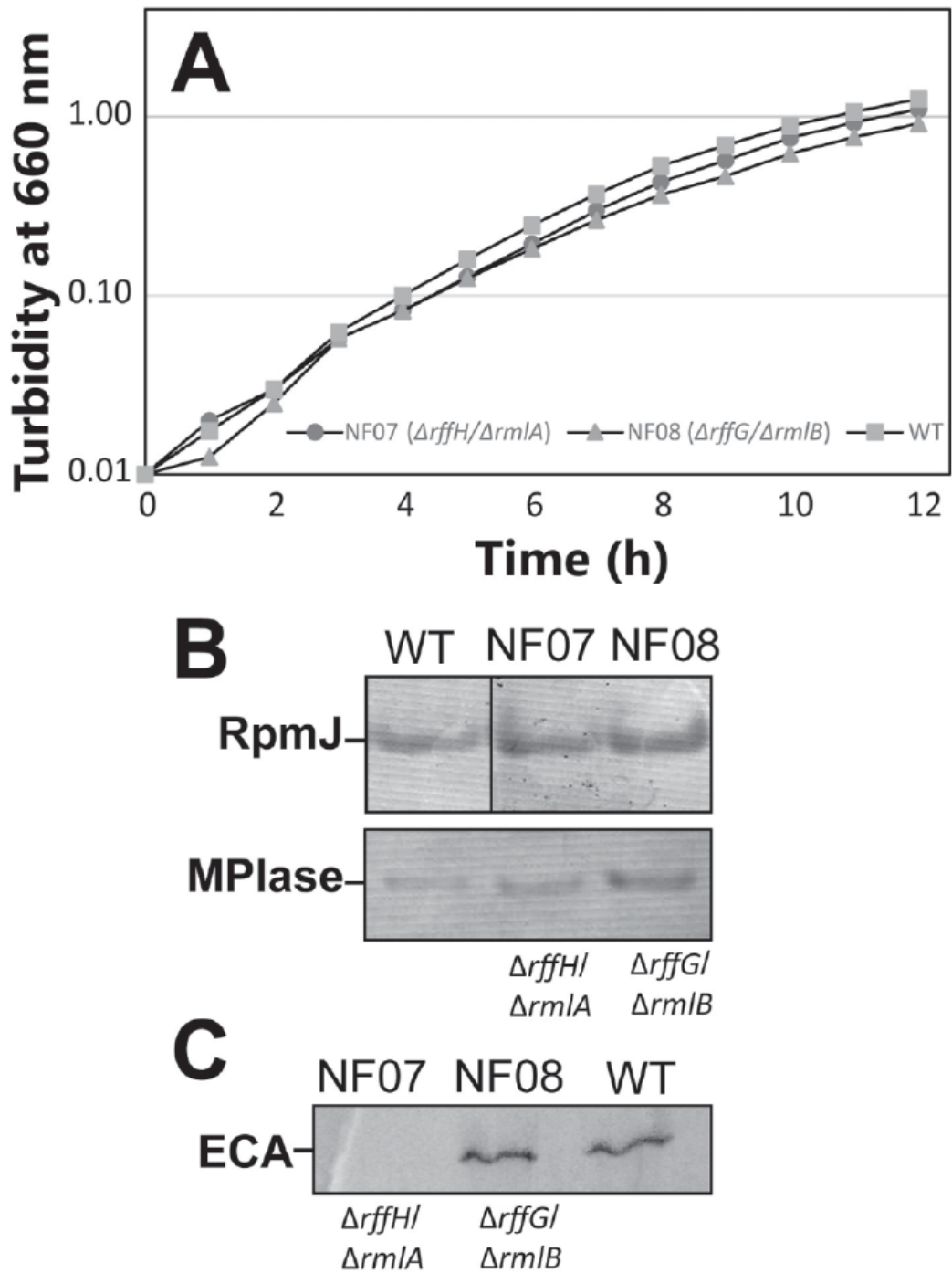


図 22 二重欠失株の増殖曲線、MPIase 発現量、ECA 発現量

(A)NF07 と NF08 をグリセロール添加 M9 培地で 37°C で振盪培養した。波長 660 nm における濁度を測定した。(B)MPIase 発現量を、イムノブロットングにより検出した。(C)ECA 発現量を、TLC-免疫染色により検出した。

3.3.2 項 MPIase 枯渇株においても ECA の発現量は減少しない

MPIase の枯渇が ECA の発現に与える影響を調べた(図 23)。CdsA/YnbB は CDP-DAG 生合成酵素であり、MPIase 生合成酵素でもある。MPIase を枯渇可能な変異株(KS23/ pAra-*cdsA*) (Sawasato et al., 2019a)を用いて ECA の発現を確認した。KS23/pAra-*cdsA*は *cdsA/ynbB*二重欠失に加えて pAra-*cdsA* ベクターが導入された変異株であり、培地からアラビノースを除去すると MPIase が枯渇する。MPIase 枯渇条件下において、ECA の発現量は減少せず、数倍に増加した。この ECA 増加の理由は不明であるが、*cdsA* 欠失によるリン脂質生合成の変動が多面的な影響をもたらした可能性が考えられる。とはいえ、MPIase の枯渇は ECA の減少を引き起こさなかったことから、MPIase の生合成経路は ECA の生合成経路と重なっていないことが示された。

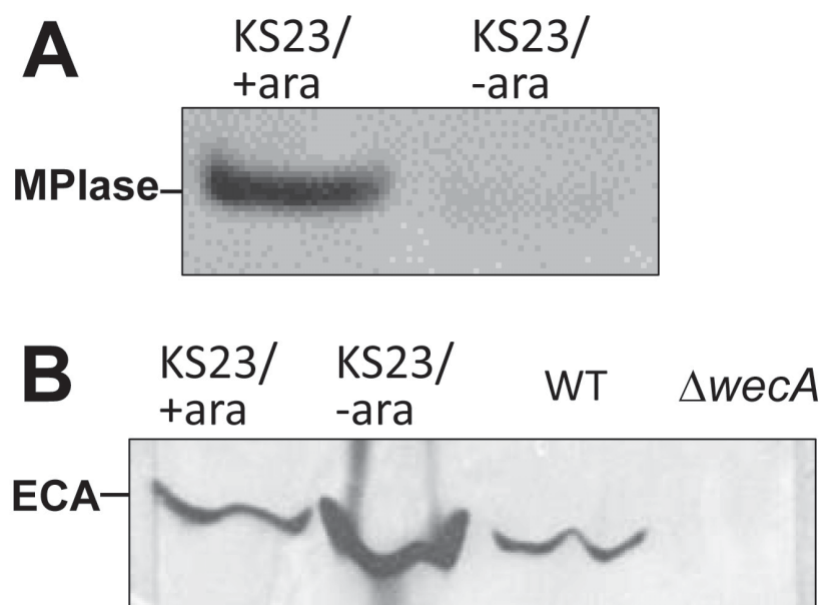


図 23 MPIase 枯渇株の ECA 発現量

(A) *cdsA/ynbB* 欠損により MPIase は枯渇する。KS23/pAra-CdsA を 0.002% アラビノース添加 LB 培地で一晩培養後、集菌した菌体を LB 培地で 3 回洗浄し、アラビノース添加(+ara) または非添加(-ara)の LB 培地で培養した。MPIase 発現量は、イムノブロットティングで検出した。(B) MPIase 枯渇株における ECA 発現量。ECA 発現量を TLC-免疫染色により検出した。対照として BW25113(WT)と JW3758-KC($\Delta wecA$)を並べて示した。

3.4 節 考察

本研究において、ECA 生合成遺伝子変異株における MPIase 発現量、および、MPIase 生合成遺伝子変異株の ECA 発現量を解析した。検証したすべての ECA 生合成遺伝子欠失株における MPIase 発現量は変化しなかった(図 21、図 22)。また、MPIase 生合成遺伝子欠失株における ECA 発現量は減少しなかった(図 23)。これらの結果から、2つの糖脂質 MPIase と ECA の生合成遺伝子群は独立して存在していることが明らかになった。本研究で使用した Keio コレクションは、Lambda-Red システムを介した遺伝子破壊(Baba et al., 2006)の過程で予期せぬ変異が生じている可能性を完全には否定できないものの、それを考慮しても MPIase 専用の生合成経路が存在する可能性は極めて高いと考えられる。

MPIase と ECA の糖鎖は極めてよく似ているにもかかわらず、その生合成経路はまったく異なる。繰り返しの 3 糖ユニットは、ECA の場合はウンデカプレノール上に生合成され、MPIase の場合は直接 PA 上に生合成される。*wzxE* 欠失株内では、Lipid III が内膜内葉に蓄積すると考えられる。その内膜内葉は MPIase が生合成される場であり、蓄積した Lipid III の 3 糖ユニットが MPIase 生合成に転用されてもおかしくない。しかしながら、*wzxE* 欠失株の MPIase は増加しなかった(図 21)。このことから、Lipid III が MPIase の生合成に利用される可能性は低いと考えられる。

サルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* の ECA についての研究において、*rmlA* 欠損株では Fuc4NAc の供給が止まり、ManNAcA-GlcNAc-PP-ウンデカプレノール(Lipid II)が蓄積することが報告されている(Rick et al., 1998)。さらに、この *rmlA* 変異株には、ManNAcA-GlcNAc-PP-DAG (DGP-disaccharide)という未知の糖脂質も蓄積することが報告されている(Rick et al., 1998)。MPIase が発見され、その構造が決定された現在では、DGP-

disaccharide は *S. typhimurium* における MPIase の生合成中間体であることが推測できる。この報告は、MPIase の 3 糖ユニットが PA 上に生合成されるという仮説を強く支持するものである。本章の結果から、大腸菌において、*rmlA* 欠失株は野生株レベルの ECA を発現する一方、同じ反応触媒機能をもつといわれていた *rffH* を欠失した株では ECA の発現が検出されなかった(図 21)。これらのことから、大腸菌の *rffH* は *S. typhimurium* の *rmlA* に相当する機能をもつと考えられる。それにもかかわらず、大腸菌 *rmlA* および *rffH* 欠失株は野生株と同等量の MPIase を発現した(図 21)。これらのことから、MPIase 生合成専用の別の Fuc4NAc 生合成経路が存在することが示唆される。*S. typhimurium* の *rmlA* 変異株については、痕跡量の ECA が質量分析で検出されることも報告されている(Rick et al., 1998)。この報告は、MPIase 生合成経路で作られた Fuc4NAc がわずかに ECA 生合成に転用された結果、痕跡量の ECA が生合成された可能性を示唆している。

2 つの糖脂質にとって、ManNAcA と Fuc4NAc は特徴的な糖である。前述の通り、MPIase 生合成独自の Fuc4NAc 生合成経路の存在が示された。ManNAcA の場合を考えると、ECA の ManNAcA 生合成反応を担うのは *wecB* と *wecC* である(図 20)(Rick et al., 1996)。この 2 遺伝子は、UDP-GlcNAc を UDP-ManNAcA へと変換する。*wecB* および *wecC* の各欠失株における MPIase 発現量に変化は見られなかったため(図 21)、MPIase の ManNAcA 生合成反応を担うのはこの 2 遺伝子ではない別の遺伝子であると考えられる。この場合、MPIase には UDP-ManNAcA ではない ManNAcA 供与体が利用される可能性が考えられる。

3.5 節 おわりに

本章では、MPIase と ECA の生合成経路がまったく異なることを明らかにした。MPIase と ECA は構造が非常によく似た糖脂質であるが、その糖供与体の生合成経路の時点から独立しており、MPIase の生合成を担う遺伝子および糖供与体は ECA のものと重複しないと結論付けた。

第4章 低温かつ CdsA の制限された条件における YnbB の重要性

4.1 節 はじめに

第1章・第2章で述べたように、CdsA/YnbB が MPIase の第1中間体生合成酵素である。YnbB は CdsA のパラログであり(Sato et al., 2019, Sawasato et al., 2019c)、両者のタンパク質の C 末端側は非常に相同性が高い(配列相同性は約 55%)、一方で N 末端側はさほど高くない(相同性約 9%)(Sato et al., 2019)。c*dsA* の欠損は致命的であり、配列がよく似ているにも関わらず、y*nbB* を過剰発現しても生育を相補しないことが示唆されている(Sato et al., 2019, Sawasato et al., 2019c)。これは YnbB が CdsA の補助的な立ち位置にあることを示唆している。一方で、c*dsA* 欠損株は、YnbB と酵母のミトコンドリア CDP-DAG 合成酵素である Tam41p(EC2.7.7.41)が同時に過剰発現された条件では生存可能になる(Sato et al., 2019)。Tam41p 自体は MPIase の生合成能力がないため、c*dsA* 欠損を相補することができない(Sawasato et al., 2019c)。そのため、YnbB は MPIase の生合成に特化しているのだろうと言及されている(Sato et al., 2019)。YnbB は CDP-DAG を合成し、その後 MPIase 中間体の compound I を生成する能力があることが示されているが、これまで y*nbB* 欠損株では検出可能な増殖上の表現型は観察されていない。

MPIase は低温培養条件で急速かつ持続的に発現誘導される。低温環境ではバクテリアの膜の流動性が低下する(Marr and Ingraham, 1962, Raetz, 1978, Wickner et al., 1991, Pogliano and Beckwith, 1993)ため、タンパク質の輸送のためにより高い MPIase レベルが必要となると考えられている(Sawasato et al., 2019a, Sawasato et al., 2019b)。CdsA は、低温で急速で一過的な誘導がかかるものと、ゆっくりかつ持続的に誘導がかかるものの、2つのプロモーターを介して mRNA レベルを増加させることにより、この MPIase の発現誘導を達成して

おり(Sawasato et al., 2019a)、YnbB も CdsA と同様に低温下で発現誘導される可能性があると示唆されている。しかし、*cdsA* と *ynbB* の二重欠損株(プラスミドからCdsAを発現)は、低温培養時に MPIase の生合成量増加の幅が低くなったものの、増殖の表現型は野生型株と同様だった(Sawasato et al., 2019b)。このように、MPIase 生合成レベル上昇への YnbB の関与は不明瞭であった。

本研究では、YnbB のもつ MPIase 生合成と細胞増殖における重要性を明らかにすることを目的に、より厳密に発現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および低温条件を詳細に検証した。

4.2 節 実験方法

4.2.1 使用した大腸菌変異株およびプラスミド

使用した大腸菌変異株およびプラスミドは以下の通りである。タンパク質膜挿入基質の M13 procoat の発現には、プラスミド pMS119-PC の導入をおこない、1 mM IPTG の添加により発現を誘導した。

Plasmids	Relevant genotype and description	Reference
pAra-CdsA(ATG)	<i>cdsA</i> with start codon of ATG was cloned into pKQ2 under control of arabinose promoter, spectinomycin-resistant	(Sawasato et al., 2019c)
pAra-CdsA(TTG)	ATG in pAra-CdsA(ATG) was changed to TTG	(Sawasato et al., 2019c)
pTac-CdsA(TTG)	<i>cdsA</i> with start codon of TTG was cloned into pUSI2 under control of <i>tac</i> promoter, ampicillin resistant	(Sawasato et al., 2019b)
pTac-YnbB	<i>ynbB</i> was cloned into pUSI2 under control of <i>tac</i> promoter, ampicillin resistant	(Sato et al., 2019)
pMS119-PC	Gene for M13 procoat is cloned under control of <i>tac</i> promoter, ampicillin resistant	(Sawasato et al., 2019c)
Strains		
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA Δ(lac-proAB)/F' [traD36 proAB⁺ lacI^s lacZΔM15]</i>	(Yanisch-Perron et al., 1985)
EK413	MC4100 <i>ara</i> ⁺	(Nishiyama et al., 1996)
KS21	EK413 Δ <i>ynbB</i>	(Sawasato et al., 2019c)
KS22	EK413 Δ <i>cdsA::cat</i> harboring pAra-CdsA(ATG)	(Sawasato et al., 2019c)
KS23	EK413 Δ <i>cdsA::cat ΔynbB</i> harboring pAra-CdsA(ATG)	(Sawasato et al., 2019c)
YS22	EK413 Δ <i>cdsA::cat pcnB80 zad1::Tn10</i> harboring pAra-CdsA(ATG)	(Sawasato et al., 2019a)
YS23	EK413 Δ <i>cdsA::cat ΔynbB pcnB80 zad1::Tn10</i> harboring pAra-CdsA(ATG)	(Sawasato et al., 2019a)
RH22	EK413 Δ <i>cdsA::cat pcnB80 zad1::Tn10</i> harboring pAra-CdsA(TTG)	This study
RH23	EK413 Δ <i>cdsA::cat ΔynbB pcnB80 zad1::Tn10</i> harboring pAra-CdsA(TTG)	This study

4.2.2 RT-PCR

RH22 の培養には 0.2%アラビノースを添加した。YnbB の過剰発現株である pTac-YnbB を導入した JM109 を、YnbB mRNA のポジティブコントロールとして使用し、pTac からの *ynbB* の誘導のために 1 mM IPTG を培地に添加して培養した。大腸菌細胞からの total RNA 抽出物は、フェノール/クロロホルム(1:1)液を培養液と直接混合した後、エタノール沈殿法によって調製した(Sawasato et al., 2019a に記載)。抽出前の培養液の温度変化による代謝変化を避けるために、フェノール/クロロホルム(1:1)液混合までの操作は極力短時間でおこなった。DNA を RNase-free DNase で消化した後、PrimeScript™ RT-PCR Kit(Takara)を使用して RT-PCR を実施した(メーカーの公式マニュアル記載のプロトコルに準拠)。培養温度に依存しない発現コントロールとして TufA の mRNA を採用し、RT-PCR に使用した各プライマーは以下に示した。PCR サイクル数は、YnbB mRNA の検出では標準条件の 30 サイクルより多い 33 サイクル、TufA mRNA の検出には標準条件の 30 サイクルを使用した。RT-PCR 産物はアガロースゲル電気泳動後にエチジウムブロマイド染色で分析した。

Primer	Sequence (5' -> 3')
YnbB5	GTTTTCTGCATACCGTGAGC
YnbB3comp	TGGCTGACATCACGACATC
TufA5	ACGTACAAAACCGCACGTTA
TufA3comp	TTAGCCCAGAACTTTAGCAA

4.2.3 イムノブロットイング

3.2.1 の方法に準拠した。

4.2.4 リン脂質分析

一晩培養した培養液を LB 培地に 1:100 の希釈度で接種した。染色体 *cdsA* 欠損株には、プラスミドから CdsA を誘導するためにアラビノース(0.2%)を培地に添加した。37°Cで対数増殖期中期まで振盪培養したものを 37°C試料とし、37°Cで対数増殖期初期まで培養した後に 20°Cに変更してさらに 2 時間培養したものを 20°C試料とした。培養後、総リン脂質を Bligh and Dyer (1959) に記載されている方法に従って抽出した。リン脂質は、展開溶媒にクロロホルム/メタノール/水:10/5/1 を、呈色試薬にアニスアルデヒド試薬を用いて、TLC で分析した。

4.3 節 結果

4.3.1 CdsA が制限された条件下では、寒冷環境での増殖には *ynbB* の発現が必要である

過去の報告では、*cdsA/ynbB* 二重欠損株 KS23 が、*cdsA* 遺伝子がアラビノース制御系によって制御された相補プラスミド pAra-CdsA(ATG)から発現される状態での増殖が調査された(Sato et al., 2019, Sawasato et al., 2019c)。MPIase の低温下上昇は影響を受けていたが、増殖性を見ると KS23 は低温でもよく増殖した(Sawasato et al., 2019b)。野生型 CdsA の染色体上の開始コドンは非典型的な「TTG」であり、その翻訳開始の効率は ATG 型よりも約 3~100 倍低い(Reddy et al., 1985, O'Donnell and Janssen, 2001, Hecht et al., 2017)ため、プラスミド由来の CdsA(ATG)の発現レベルが、*ynbB* 遺伝子の欠損の影響を遮蔽している可能性考えられる。この可能性を検証するために、CdsA の開始コドンを「TTG」に置き換えたプラスミド pAra-CdsA(TTG)をもつ RH22 および RH23 を新たに構築した。pAra-CdsA(ATG)ではなく pAra-CdsA(TTG)をもつ *cdsA/ynbB* 二重欠損株 RH23 は、20°C培養の結果、アラビノースの存在下でも増殖が見られず(表 2)、pAra-CdsA(TTG)からの CdsA のレベルがとても低いために低温での増殖には十分ではないことが示唆された。これとは対照的に、*cdsA* 単一欠損株 RH22(*ynbB*⁺)は、アラビノース存在下、20°Cで培養された場合、EK413 野生型株と同様によく増殖した(表 2)。これは YnbB が CdsA 制限条件下かつ低温条件下での増殖において不可欠であることを示唆している。基本的に同じ結果が、CdsA 供給源として pTac-CdsA(TTG)を使用した場合にも得られた。この条件では、CdsA は IPTG 存在下で強力なプロモーターとして作動する *tac* プロモーター支配下から発現するにも関わらず、IPTG の存在下で 20°Cにて培養された場合に pTac-CdsA(TTG)をもつ YS23 および RH23 は増殖しなかった。一方で、

IPTG の存在下で 20°Cにて培養された同じく pTac-CdsA(TTG)をもつ YS22 および RH22 はよく生育し、アラビノースを添加しなかった場合でも生育した(表 2)。ここで、上記の YS22、YS23、RH22、および RH23 における pTac-CdsA(TTG) の細胞内コピー数は、*pcnB* 変異導入により非常に低いレベルに制御されている (Lopilato et al., 1986, Liu and Parkinson, 1989)。pTac-CdsA(TTG) のコピー数が多い *pcnB*⁺ 株である KS23 の場合、IPTG の存在下で 20°Cでもよく増殖した。また、pAra-CdsA(TTG)および pTac-CdsA(TTG)の両方からアラビノースと IPTG の添加によって CdsA(TTG)を同時に発現させると、RH23 の低温での増殖阻害が緩和された(表 2)。したがって、*pcnB* 変異や非典型的な TTG 開始コード自体は、低温感受性表現型の原因になっているわけではない。

表2 各培養条件での増殖結果

	Chromosome			Plasmid			IPTG	Growth				
	<i>cdsA</i>	<i>ynbB</i>	<i>pcnB</i>	pAra-CdsA(ATG)	pAra-CdsA(TTG)	pTac-CdsA(TTG)		(+ arabinose)		(- arabinose)		
							37°C	20°C	37°C	20°C	13°C	
EK413	+	+	+	-	-	-	-	++	++	++	++	++
KS22	Δ	+	+	+	-	-	-	++	+	-	-	nd
KS23	Δ	Δ	+	+	-	-	-	++	++	-	-	nd
YS22	Δ	+	Δ	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
YS23	Δ	Δ	Δ	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
RH22	Δ	+	Δ	-	+	-	-	++	++	-	-	nd
RH23	Δ	Δ	Δ	-	+	-	-	++	-	-	-	nd
KS22	Δ	+	+	+	-	+	+	++	++	++	++	nd
KS23	Δ	Δ	+	+	-	+	+	++	++	++	++	nd
YS22	Δ	+	Δ	+	-	+	+	++	++	++	++	nd
YS23	Δ	Δ	Δ	+	-	+	+	++	++	++	-	nd
RH22	Δ	+	Δ	-	+	+	+	++	++	++	++	nd
RH23	Δ	Δ	Δ	-	+	+	+	++	++	++	-	nd
KS21	+	Δ	+	-	-	-	-	nd	nd	++	++	++

*要求性に応じて 0.2%アラビノースまたは 1 mM IPTG を添加した LB 寒天培地に大腸菌を植菌し、静置培養した結果をまとめた。培養は 37°C/14 時間または 20°C/2.5 日間、13°C/7 日間でおこなった。記号はそれぞれ、++: EK413 と同等に良好な増殖を示したもの、+: はっきりとコロニーが観察されたが、コロニーが EK413 より小さかったもの、-: シングルコロニーが形成されなかったものを示す。

4.3.2 MPIase の発現レベルは、寒冷条件下で YnbB の mRNA レベルに依存して上昇する

MPIase 量は、低温で CdsA の mRNA が誘導されることにより急速かつ持続的に増加する(Sawasato et al., 2019a)。CdsA の発現レベルが抑制されている場合、YnbB の mRNA の発現レベルも既報の CdsA と同様に低温で発現誘導される可能性がある。この可能性を検証するために、RT-PCR を用いて YnbB の mRNA レベルを測定した。野生型株(EK413; 図 24)を 37°C で培養した場合、YnbB の mRNA は検出されたものの非常に低いレベルで、検出に標準より 3 サイクル多い PCR 条件を要した。一方、20°C での発現レベルは、こちらも検出に標準より 3 サイクル多い PCR 条件を要したが、37°C に比べ約 3 倍に増加し(図 24 レーン 4)、野生型の細胞でも低温環境では YnbB mRNA の量が誘導されていることを示唆する結果となった。RH22 をアラビノースの存在下、37°C で培養した場合、YnbB の mRNA レベルは EK413 と比較して増加した(図 24 レーン 1)。これは通常の培養温度であっても、CdsA の発現レベルが pAra-CdsA(TTG)からで低い場合には YnbB を上昇させて相補しようとしている可能性を示唆している。アラビノースの存在下、20°C で培養された RH22 の YnbB mRNA レベルは、37°C でのレベルと比較してさらに増加した(図 24 レーン 2)。低温での発現が誘導されない TufA (Phadtare and Inouye, 2004)の mRNA のレベルは、すべての条件下で同様であった(図 24)。これらの結果は、YnbB 遺伝子の mRNA レベルは、通常の増殖条件下では非常に低いが、CdsA のレベルが低いか細胞が低温で培養される場合には誘導され、その両方が組み合わされる場合には大きく増加する(7-8 倍)ことを示している。このことは、前述の CdsA 制限条件下での低温での増殖において YnbB が必要であるという結果と一致している。

以前の研究では、YnbB が MPIase の生合成に特化している可能性が示唆されていることから(Sato et al., 2019)、次に YnbB の発現誘導が MPIase の発現レ

ベルに及ぼす効果を調べた。その結果、RH22(*ynbB*⁺)がアラビノースの存在下で培養された場合、低温での MPIase 量の発現誘導が明確に観察された(図 25)。MPIase 上昇量の程度は、野生型株 EK413 と同じであった(図 25)。一方で、RH23(Δ *ynbB*)では MPIase の増加が完全に消失した(図 25)。これは、低い程度とはいえ MPIase の発現誘導が観察された KS23 とは異なる(Sawasato et al., 2019b)(図 25)。これにより、CdsA 制限条件下での低温での増殖阻害が、YnbB の欠乏による MPIase 発現誘導の不足に起因することが強く示唆された。ローディングコントロールとして使用された SecB のレベルはすべてのサンプルで同様であった(図 25)。以上の結果は、CdsA と同様、YnbB も MPIase の低温下増大に関与していることを示している。

これらの株を 37°C および 20°C で培養した際のリン脂質の含有量も分析した。CdsA または YnbB の不足によってリン脂質の合成が十分でない場合、CDP-DAG 生合成の基質として利用されるフォスファチジン酸(PA)の蓄積が観察されるはずである。実際には、20°C で培養された RH23 を含むすべての条件下で PA の蓄積は観察されなかった(図 26)。これらの結果から、RH23 が 20°C で増殖できなかった原因は、リン脂質の生合成が不足していることではなく、MPIase の発現誘導不足であることが示された。また、20°C で培養された RH22、および 37°C、20°C で培養された RH23 では、CL 存在比が高かった(図 26)。CL は SecYEG の二量体状態を安定化し、SecA の ATPase 活性を向上させることによってタンパク質輸送を促進すると報告されている(Ryabichko et al., 2020)。したがって、CL の増加が MPIase の発現レベルの低下によるタンパク質輸送の阻害を部分的に緩和した可能性が示唆される。

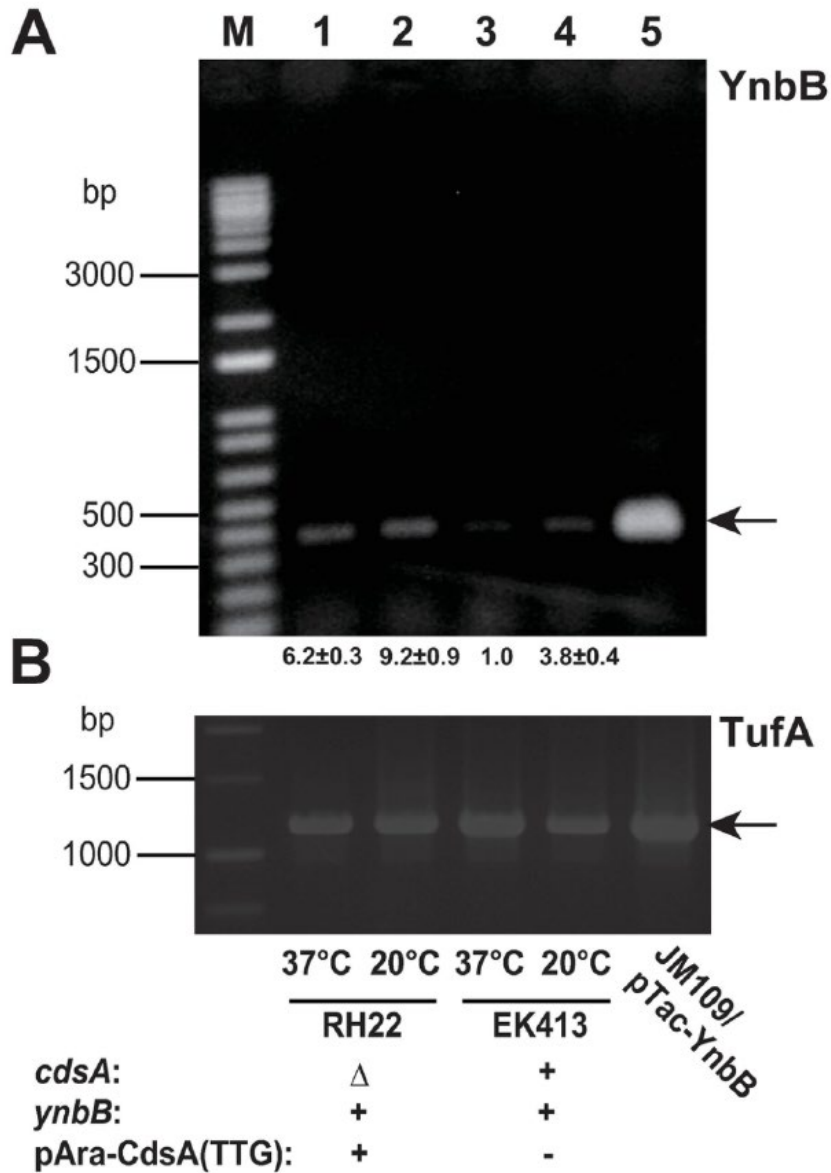


図 24 YnbB mRNA の低温下での発現誘導

37°Cまたは20°Cで培養したRH22 ($\Delta cdsA$ *Para-cdsA ynbB*⁺) および EK413 (*cdsA*⁺ *ynbB*⁺)から調製したRNA画分を、RT-PCRに供して(A)YnbB mRNAおよび(B) TufA mRNAを検出した。PCR増幅されたYnbB mRNAの内部領域(378 bp)がアガロースゲル上でバンドとして検出された。レーンM:分子量マーカー。(A)の下部に示した数値はYnbB mRNAの、「EK413-37°C(レーン3)」に対する相対的な定量値を表し、平均+/-標準偏差の形で、3回の独立した実験から計算した。定量値はTufA mRNAの強度で標準化した。

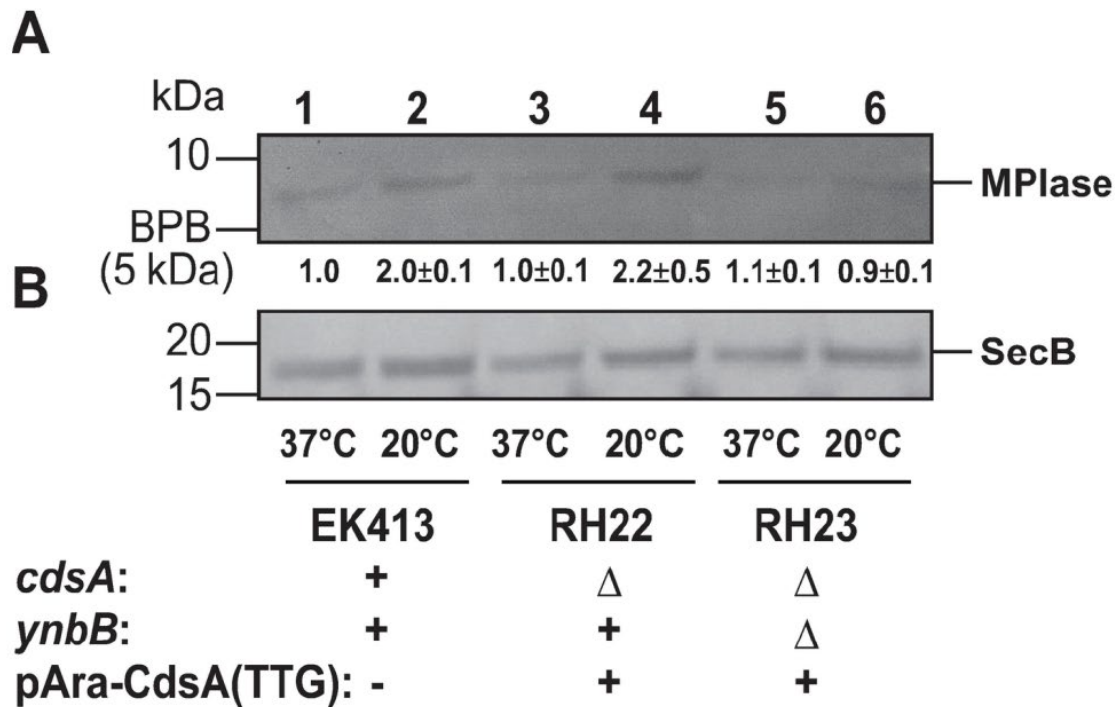


図 25 YnbB による低温下での MPIase 発現量増加

EK413 および RH22、RH23 をそれぞれ 37°C または 20°C で培養した後、培養液を TCA 処理し、SDS-PAGE 後に(A)抗 MPIase および(B)抗 SecB 抗体を用いたイムノブロットティングに供した。RH22 および RH23 の培養には 0.2%アラビノースを添加した。SDS-PAGE には、(A)0.5 μ g および(B)5 μ g のタンパク質量に相当するサンプル量を泳動した。(A)の下部に示した数値は、MPIase の「EK413-37°C(レーン 1)」に対する相対的な定量値を表し、平均 \pm 標準偏差の形で、3 回の独立した実験から計算した。定量値は SecB の強度で標準化した。

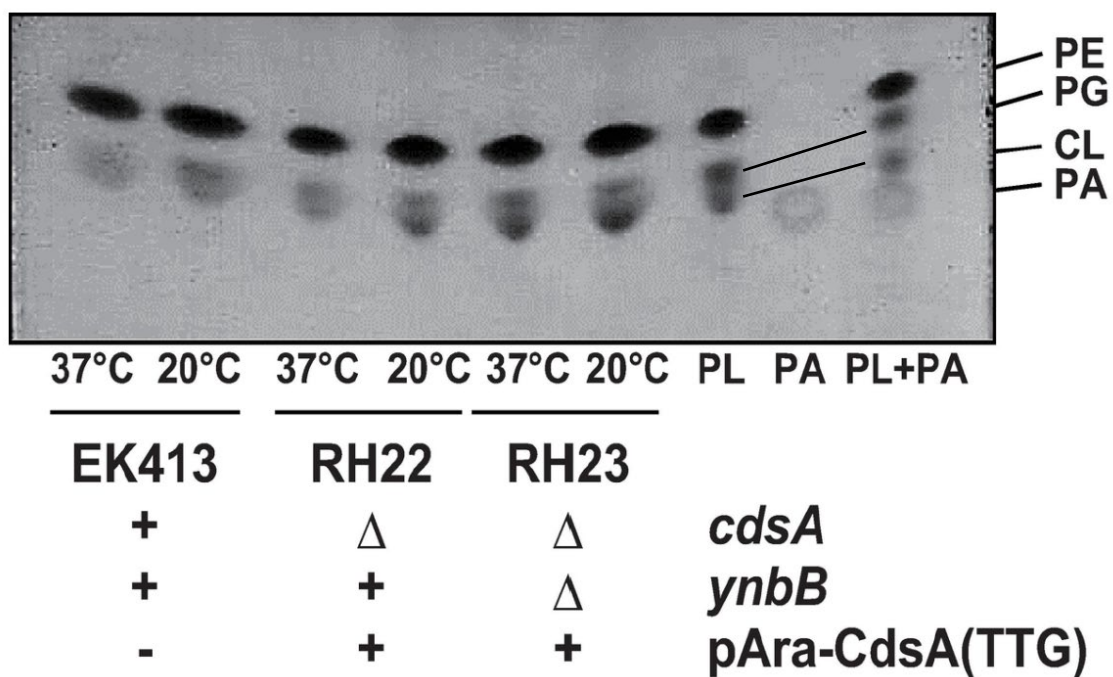


図 26 PAの蓄積状況

図 25 で使用した EK413 および RH22、RH23 の培養液から総脂質を抽出し、タンパク質当量で 10 μg ずつを TLC 分析した。右側のレーンには、大腸菌から抽出された極性リン脂質標品 (PL) (10 μg) および PA 化学合成標品 (5 μg) を同時に展開した。PA および PL 中のフォスファチジルエタノールアミン (PE)、フォスファチジルグリセロール (PG)、カルジオリピン (CL) の位置を右に示した。

4.3.3 CdsA が制限された低温条件下で YnbB が欠如すると、内膜へのタンパク質膜挿入および膜透過が阻害される

in vivo および *in vitro* の両方で、MPIase はタンパク質膜挿入に必須であり、タンパク質膜透過を促進することが示されている (Sawasato et al., 2019c)。KS23 では MPIase のレベルが抑制されると、低温下でタンパク質膜透過の遅れが観察されたが、タンパク質膜挿入の阻害は観察されなかった (Sawasato et al., 2019b)。本研究では、CdsA が制限された条件下で YnbB が発現誘導され、MPIase レベルが増加することにより、タンパク質膜挿入および膜透過がどのような影響を受けるか調べた。

M13 procoat は、N 末端に付加されたシグナル配列で内膜への挿入後に、膜の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る (Ito et al., 1979)。この M13 procoat の膜挿入は MPIase によって駆動される (Sawasato et al., 2019c)。M13 procoat を RH22 および RH23 で発現させると、37°C では野生型株と同様に効率的なシグナル配列のプロセッシングが観察され、これらの条件下では M13 procoat が膜に効率的に挿入されたことを示している (図 27)。一方、RH23 では低温環境で M13 procoat の蓄積が観察された。これは MPIase の不足がタンパク質膜挿入の阻害を引き起こしたことを示唆している (図 27)。アラビノースの存在下で培養された RH23 では、膜透過前駆体タンパク質である proOmpA の蓄積も観察されたが、RH22 では観察されなかった (図 27)。これは、MPIase の不足が膜透過反応の阻害を引き起こしたことを示唆している。これらの結果は、CdsA が制限された低温条件下での YnbB の重要性を支持している。

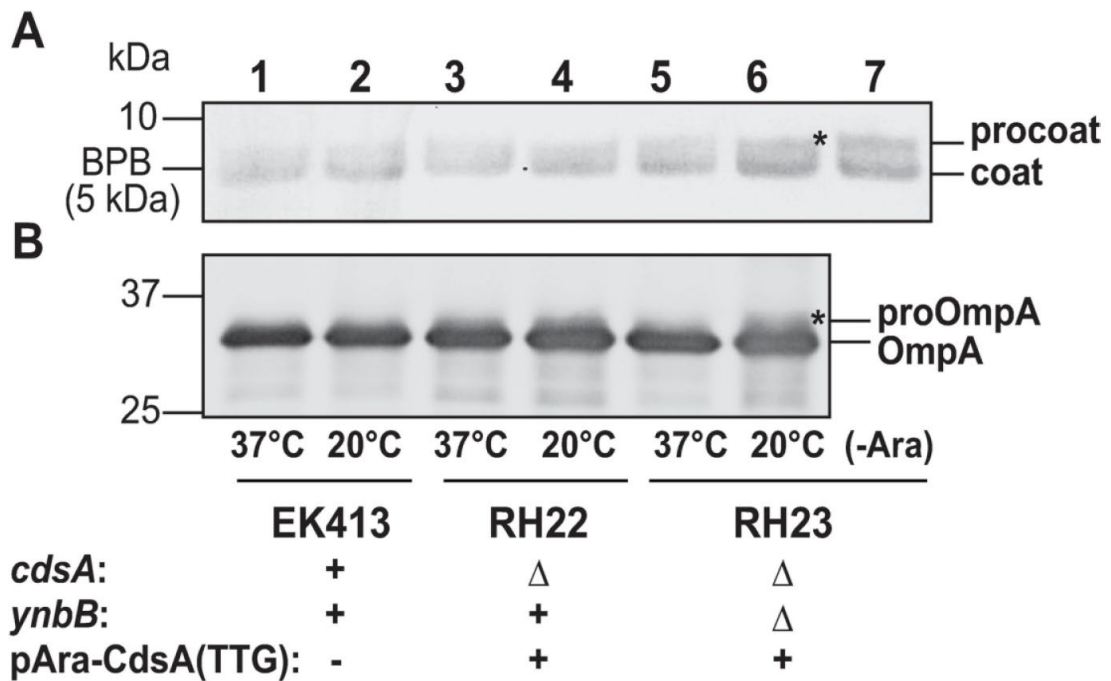


図 27 M13 procoat(膜挿入基質前駆体)および proOmpA(膜透過基質前駆体)の蓄積状況

図 25 で使用した EK413 および RH22、RH23 のイムノブロットティングサンプルを用いて、タンパク質当量で 5 μ g ずつを SDS-PAGE に供した後、(A)抗 M13 procoat/M13 coat 抗体および(B)抗 proOmpA/OmpA 抗体を用いたイムノブロットティングをおこなった。

M13procoat を蓄積させるために、RH23 は 1 mM の IPTG を添加した LB 培地中で 37°C で培養した(レーン 7)。蓄積した M13 procoat および proOmpA の位置をアスタリスク(*)で示した。

4.4 節 考察

本研究では、*ynbB* 遺伝子の機能について詳細に再評価した。先行研究で *ynbB* 遺伝子の重要性が明らかにされてこなかったのは、*cdsA* 欠損株に pAra-CdsA(ATG)をもつプラスミドから CdsA を誘導しており、アラビノースが添加されたすべての条件下で増殖可能になっていたためである (Sato et al., 2019, Sawasato et al., 2019c)。一方で、発現レベルが低い pAra-CdsA(TTG)を CdsA 相補プラスミドとして使用すると、アラビノースの添加によって CdsA を誘導しても、*cdsA* 欠損株の生育は低温感受性を示した。この低温感受性は *ynbB* 遺伝子の欠乏による表現型であり、初めて *ynbB* 遺伝子の生育に対する重要性が示されたものと言える。YnbB は MPIase の生合成に特化しているため (Sato et al., 2019)、低温感受性は MPIase 生合成の寒冷時の発現誘導不足により、タンパク質の膜挿入と膜透過が十分に進行できないことによる生育阻害であると考えられる。加えて、タンパク質輸送を促進することが報告されている CL の増加は観察されたが (Ryabichko et al., 2020)、pAra-CdsA(TTG)をもつ RH23 も低温時に PA を蓄積しなかったという結果から、リン脂質の生合成が抑制された結果の阻害ではないことが示唆された。すなわち、MPIase の発現誘導が不足したため、タンパク質の輸送に欠陥が生じたという結果であると言える。したがって、YnbB が MPIase の生合成に専念していることが再確認された。ただし、*ynbB* 単一欠損株 KS21 は 20°C よりもさらに低温の 13°C で培養されても表現型が現れなかったため、YnbB はあくまで CdsA の補助的な MPIase 生合成因子であるといえる。一方で、*ynbB* の欠損または過剰発現が大腸菌のリピドームに大きな変化を引き起こすとも報告されており (Jeucken et al., 2019)、YnbB が脂質の生合成ネットワークに関与していることも示唆されている。CdsA が制限された条件下で、*ynbB* 発現が 37°C でも誘導されたという事実は、YnbB がリピドームに関与していることとも整合している。

多くのパラログ酵素は互いに代替可能であるが、YnbB は過剰発現させても CdsA を代替することができない (Sato et al., 2019, Sawasato et al., 2019c)。これら 2 つのタンパク質は配列相同性をもっているが、相同性の高い領域は C 末端側のみ限定されている (Sato et al., 2019)。YnbB の N 末端側の役割はまだ明確になっておらず、N 末端側の配列に相同な機能性ドメインは報告されていない。YnbB は、酵母のミトコンドリア CDP-DAG 合成酵素である Tam41p が共発現した場合にのみ、*cdsA* の欠損を相補する (Sato et al., 2019)。したがって、N 末端側ドメインは compound I の生合成に働くと考えられる。

CdsA の mRNA 転写は、低温環境で急速かつ持続的に誘導され、MPIase レベルを上昇させる。これにより寒冷下でタンパク質の輸送が十分可能となる (Sawasato et al., 2019a, Sawasato et al., 2019b)。タンパク質の輸送自体が低温感受性のプロセスであると報告されており (Pogliano et al., 1993)、寒冷時には膜の流動性が低下するのがその理由であると考えられている (Marr et al., 1962, Raetz, 1978, Wickner et al., 1991, Nomura et al., 2019)。タンパク質輸送に関与するタンパク質性因子 (SecYEG、YidC、SRP など) の発現レベルは、細胞が低温条件におかれても変化しない (Nishiyama et al., 1993, Nishiyama et al., 1994, Sasaki et al., 2019, Sawasato et al., 2019b)。低温条件下で唯一 MPIase が発現誘導される因子であり、これがタンパク質輸送の低温感受性の抑制に寄与していると強く示唆されている (Sawasato et al., 2019b)。

上流の *ynbA* 遺伝子の終止コドン (TAA) と *ynbB* の開始コドン (ATG) はオーバーラップしており、*ynbA* と *ynbB* はオペロンを形成していると考えられる。また、*ynbA* のプロモーターは BglJ-RcsB システムによって活性化されることが示されている (Nishiyama et al., 1994, Salscheider et al., 2014)。BglJ-RcsB シス

テムは一般的なストレス応答など、多岐にわたる役割を担っている (Clarke, 2010)。ゆえに、YnbB が寒冷ストレス時にアップレギュレートされるという本研究の実験結果は、これらの報告とも整合している。CdsA の発現制御と比較すると、*cdsA* および *cdsA* とオペロンを組む上流の遺伝子群は BglJ-RcsB システムによって制御されていないため、*ynbB* と *cdsA* の低温環境下での誘導メカニズムについては異なると考えられる。

4.5 節 おわりに

本章では、YnbB の重要性について、パラログであり必須遺伝子産物である CdsA の発現を従来より厳密に制御できる変異体群を利用することにより調べた。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では、大腸菌の増殖に必須となることを見出した。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 CdsA がそうであるように YnbB の発現量が転写レベルで発現誘導されるものと結論付けた。

第 5 章 結論および総合考察

本研究において、タンパク質膜挿入に必須の糖脂質酵素 MPIase の生合成経路の探索をおこなった。その結果、先に MPIase 生合成因子として同定されていた CdsA が、MPIase 生合成第 1 中間体 compound I の生合成反応を触媒することを明らかにした(第 2 章)。compound I は、CdsA が PA と CTP から CDP-DAG を生合成した際、その CDP-DAG が CdsA から解離する前に GlcNAc-1P と反応することにより生合成されるという、CDP-DAG と compound I の関係も示した。compound I の構造および生合成基質が、立てた仮説と一致していることは、複数条件の TLC-オートラジオグラフィ分析のほか、高分解能質量分析の結果から示された。構造が非常に類似している ECA と MPIase は、糖供与体生合成の段階から生合成経路が独立していることも本研究で結論付けた(第 3 章)。CdsA は大腸菌のすべてのリン脂質生合成の根幹を担う酵素として、また、真核生物も含め多種多様な生物種に保存されている酵素として、古くから同定され機能研究がおこなわれていたため、比較的情報の蓄積があった。それに比べると YnbB は CdsA の配列と相同性があるものの実際の機能は長らく不明であり、2019 年に MPIase 生合成因子として報告されたのが、最初の具体的な触媒機能報告であった。その報告以降、いくつかの変異体解析を用いた機能の追求が試みられたものの、*ynbB* 変異体による表現型が観察されることはなく、これまで YnbB の細胞内における重要性は不明瞭なままであったが、CdsA の発現レベルが低く制限され、かつ、MPIase の高発現が必要になる低温環境下におかれると、YnbB の欠損が増殖に必須になることを見出した。これは明確に *ynbB* 欠損による表現型が観察された最初の報告となる。この際の生育に対する必須性は、*ynbB* 欠損によってタンパク質膜挿入・膜透過に必要な量の MPIase を供給できなくなることによって生じるものであることが強く示唆された(第 4 章)。

MPIase の発現量は、総リン脂質や CDP-DAG に比べてかなり少ない(リン脂質の 1,000 分の 1 以下と見積もられる)。また、ECA の発現量と比較しても非常に少ない。構造に注目すると、ECA の糖鎖部と脂質部をつなぐリンカーがモノリン酸であるのに対して、MPIase のリンカーは不安定なピロリン酸である。この違いから、MPIase にピロリン酸が使われていることが、MPIase の発現量を低く抑えるしくみに関与していると示唆される。バクテリアでは GlcNAc 供与体として UDP-GlcNAc が使用されることが多く、ECA の GlcNAc 供与体も UDP-GlcNAc である(Rush et al., 1997)。一方で、第 2 章の結果から MPIase 生合成には GlcNAc-1P が使用されることが明らかとなった。この供与体の違いも ECA と MPIase を作り分ける際の経路独立性の助けとなって、発現量や局在場所が大きく異なる 2 つの構造が酷似した糖脂質の生合成を厳密に制御することを可能にしていると考えられる。

大腸菌において、MPIase はあらゆるタンパク質膜挿入に必須の因子であると考えられている(Nishiyama et al., 2012, Kumazaki et al., 2015, Nishiyama et al., 2014, Nishiyama et al., 2015, Nishiyama et al., 2016, Nishikawa et al., 2017, Sasaki et al., 2019, Sawasato et al., 2019a)。また、MPIase は多種多様な膜タンパク質の凝集を防ぐことが報告されている(Nishiyama et al., 2012, Nishikawa et al., 2017, Nomura et al., 2019)。膜タンパク質は全ゲノムがコードするタンパク質の 3 分の 1 を占め、生命活動に重要な役割を果たす。ヒトでは疾病に関連するものが多く、創薬のターゲットの過半数は膜タンパク質ともいわれるものの、精製や結晶化が難しく解析が進んでいないのが現状である。MPIase 生合成の第 1 段階を担う CdsA のホモログ遺伝子はすべての生物にコードされており、当研究室の別プロジェクトにより真核生物の複数の CdsA ホモログが MPIase 生合成能を保持していることが明らかにされた

(Sawasato et al., 2019a, Sekiya et al., 2021, 当研究室・日景ら 未発表データ)。大腸菌の MPIase 生合成因子群や生合成機構を解明することにより、真核生物の MPIase ホモログの発現制御にも共通した理解が得られることが大いに期待でき、それが未だ機能解析が進んでいない多くの膜タンパク質の研究を進展させる助けになることも期待できる。今後、CdsA/YnbB 以降の MPIase 生合成経路の全貌が解明されることが切望される。

付録 1 略語表

本文中で使用した略語をまとめた。

略称	正式名称・意味
INV	反転膜小胞
PA	1,2-ジパルミトイル- <i>sn</i> -グリセロ-3-リン酸(C16:0)
CTP	シチジン 5'-三リン酸
dCTP	2'-デオキシシチジン 5'-三リン酸
CDP	シチジン 5'-二リン酸
CMP	シチジン 5'-一リン酸
ATP	アデノシン 5'-三リン酸
UDP	ウリジン 5'-二リン酸
dTDP	2'-デオキシチミジン 5'-二リン酸
NTP	ヌクレオシド 5'-三リン酸(ATP、GTP、CTP、UTP など)
dNTP	2'-デオキシヌクレオシド 5'-三リン酸
GlcNAc-1P	<i>N</i> -アセチル- α -D-グルコサミン 1-リン酸
OG	オクチルグルコシド
Tris	トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン
Bis-Tris	ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン
HEPES	2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸
Tricine	<i>N</i> -[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン
DTT	ジチオトレイトール
TCA	トリクロロ酢酸

NBT	ニトロブルーテトラゾリウム溶液 “BCIP/NBT Color Development Substrate” (プロメガ社)
BCIP	5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸溶液 “BCIP/NBT Color Development Substrate” (プロメガ社)
LPS	リポ多糖
PVDF 膜	ポリフッ化ビニリデン膜 Immobilon-P (メルク社)
OD	光学密度
TLC	薄層クロマトグラフィー
Rf 値	移動比
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
RI	放射性同位体
Phosphorimager	RI イメージング装置 STORM (GE ヘルスケア社)
Image Quant	イメージ解析ソフトウェア ImageQuant TL(GE ヘルスケア社)

付録 2 使用した大腸菌株 (第 4 章以外)

株の名称	遺伝子型	文献
BW25113	<i>rrnB3</i> Δ <i>lacZ4787</i> <i>hsdR514</i> Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ (<i>rhaBAD</i>)568 <i>rph-1</i>	Baba et al., 2006
JW3029-KC	BW25113 Δ <i>bacA::kan</i>	Baba et al., 2006
JW3758-KC	BW25113 Δ <i>wecA::kan</i>	Baba et al., 2006
JW5600-KC	BW25113 Δ <i>wecB::kan</i>	Baba et al., 2006
JW5599-KC	BW25113 Δ <i>wecC::kan</i>	Baba et al., 2006
JW5597-KC	BW25113 Δ <i>wecD::kan</i>	Baba et al., 2006
JW3765-KC	BW25113 Δ <i>wecE::kan</i>	Baba et al., 2006
JW5596-KC	BW25113 Δ <i>wecF::kan</i>	Baba et al., 2006
JW3770-KC	BW25113 Δ <i>wecG::kan</i>	Baba et al., 2006
JW5598-KC	BW25113 Δ <i>rffG::kan</i>	Baba et al., 2006
JW3763-KC	BW25113 Δ <i>rffH::kan</i>	Baba et al., 2006
JW2024-KC	BW25113 Δ <i>rmlA::kan</i>	Baba et al., 2006
JW2026-KC	BW25113 Δ <i>rmlB::kan</i>	Baba et al., 2006
JW3766-KC	BW25113 Δ <i>wzxE::kan</i>	Baba et al., 2006
JW5601-KC	BW25113 Δ <i>wzzE::kan</i>	Baba et al., 2006
NF07	BW25113 Δ <i>rffH</i> Δ <i>rmlA::kan</i>	This study
NF08	BW25113 Δ <i>rffG</i> Δ <i>rmlB::kan</i>	This study
KS23/pAra- <i>cdsA</i>	MC4100 <i>ara+</i> Δ <i>cdsA::cat</i> Δ <i>ynbB</i> /pAra- <i>cdsA</i> (<i>ParaB-cdsA spc</i>)	Sawasato et al., 2019a
GN80	F- <i>thr-1</i> <i>araC14</i> <i>cdsA8</i> <i>lacY1</i> <i>tsx-78</i> Δ (<i>galK-attLAM</i>)99 <i>eda-50</i> <i>hisG4</i> (Oc) <i>rfbC1</i> <i>rpsL136</i> (strR) <i>xylA5</i> <i>mtl-1</i> <i>thiE1</i>	Ganong et al., 1982
RS80	GN80 Δ <i>cdh</i>	Sawasato et al., 2019a
EK413	MC4100 <i>ara+</i>	Nishiyama et al., 1996
JM109	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻</i> <i>m_K⁺</i>) <i>e14-</i> (<i>mcrA-</i>) <i>supE44</i> <i>relA1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>)/F' [<i>traD36</i> <i>proAB+</i> <i>lac I^F</i> <i>lacZ</i> Δ M15]	Yanisch-Perron et al., 1985

Keio コレクション(株名末尾が KC のもの)は NBRP(国立遺伝学研究所)より分

譲を受けた。アラビノースを除去した培地で KS23/pAra-*cdsA* 株を 2 時間培養することにより、MPIase 枯渇株とした(詳細は Sawasato et al., 2019a)。最少培地として、0.2%グリセロールを炭素源として加えた M9 培地を用い、富栄養培地として LB 培地を用いた(Maniatis et al., 1982)。

NF07 株および NF08 株を以下のように構築した。はじめに、JW3763-KC (BW25113 $\Delta rffH::kan$)または JW5598-KC (BW25113 $\Delta rffG::kan$)のカナマイシン耐性遺伝子カセットを pCP20 を用いて取り除き(Cherepanov et al., 1995)、続いて、それぞれに $\Delta rmlA::kan$ または $\Delta rmlB::kan$ 対立遺伝子を P1 トランスダクション法(Datsenko et al., 2000)により導入した。

第 4 章で使用した株は第 4 章内(4.2 節)にまとめた。

謝辞

本研究は多くの方々のお力添えにより遂行することができました。心より感謝いたします。主指導教員である岩手大学の西山賢一教授には、私が学部生のころから研究活動に関わるあらゆる面で、非常に手厚く熱心なご指導をいただきました。副指導教官を引き受けてくださった岩手大学の西向めぐみ教授と山形大学の豊増知伸教授には、異分野の観点からの多大なるご助言と励ましの言葉をいただきました。弘前大学の吉田孝教授には、西向教授と豊増教授とともに、ご多忙の中、学位審査の副査をお引き受けいただきました。公益財団法人サントリー生命科学財団生物有機化学研究所の藤川紘樹博士と島本啓子博士特任部長には、CDP-GlcNAc と compound I の有機合成および反応液成分の質量分析を実施していただくとともに、多大なご助言をいただきました。NBRP 国立遺伝学研究所の仁木宏典教授には、Keio コレクションと BW25113 株をご提供いただきました。

そして、研究室の皆様の支えに心より感謝いたします。特に、会社勤めと並行して博士課程の研究をおこなう中で、日景瑠那さんと Han Youjung さんのご協力なくしてはこの研究の遂行はあり得ませんでした。感謝の念に堪えません。また、第 2 章と第 3 章の内容を論文投稿した際の共著者でもあり、私に研究室に配属されて間もないころから実験の指導をしてくださった先輩の佐藤諒さん、私の指導力の足りなさに申し訳なく思っておりますが、同じ MPIase 生合成研究グループで共に研究してくださった後輩の川上真由さんと船場菜々香さんに、拝謝いたします。

また、学会や研究会などで様々な視点からの問いかけやご助言をくださった方々、岩手大学農学部応用生物化学課程の先生方および同期の皆さんには、多くのことを学びました。

ご協力・ご支援いただいたすべての皆様に、厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology* 2, 2006.0008 (2006)
- Blobel, G., and 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. *Journal of Cell Biology* 67, 835-851 (1975)
- Cherepanov, P. P., and Wackernagel, W. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9-14 (1995)
- Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6640-6645 (2000)
- Denks, K., Vogt, A., Sachelaru, I., Petriman, N. A., Kudva, R., and Koch, H. G. The Sec translocon mediated protein transport in prokaryotes and eukaryotes. *Molecular Membrane Biology* 31, 58-84 (2014)
- Erbel, P. J., Barr, K., Gao, N., Gerwig, G. J., Rick, P. D., and Gardner, K. H. Identification and biosynthesis of cyclic enterobacterial common antigen in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 185, 1995-2004 (2003)
- Fujikawa, K., Han, Y., Osawa, T., Mori, S., Nomura, K., Muramoto, M., Nishiyama, K. I., and Shimamoto, K. Structural Requirements of a Glycolipid MPIase for Membrane Protein Integration. *Chemistry* 29(30), e202300437 (2023)
- Fujikawa, K., Suzuki, S., Nagase, R., Ikeda, S., Mori, S., Nomura, K., Nishiyama, K., and Shimamoto, K. Syntheses and activities of the functional structures of a glycolipid essential for membrane protein integration. *ACS Chemical Biology* 13, 2719-2727 (2018)

- Ganong, B. R., and Raetz, C. R. Massive accumulation of phosphatidic acid in conditionally lethal CDP-diglyceride synthetase mutants and cytidine auxotrophs of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 257, 389-394 (1982)
- Ganong, B. R., Leonard, J. M., and Raetz, C. R. Phosphatidic acid accumulation in the membranes of *Escherichia coli* mutants defective in CDP-diglyceride synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 255, 1623-1629 (1980)
- Giraud, M. F., and Naismith, J. H. The rhamnose pathway. *Current Opinion in Structural Biology* 10, 687-696 (2000)
- Goodall, E. C. A., Robinson, A., Johnston, I. G., Jabbari, S., Turner, K. A., Cunningham, A. F., Lund, P. A., Cole, J. A., and Henderson, I. R. The Essential Genome of *Escherichia coli* K-12. *mBio* 9 (2018)
- Hemm, M. R., Paul, B. J., Miranda-Rios, J., Zhang, A., Soltanzad, N., and Storz, G. Small stress response proteins in *Escherichia coli*: proteins missed by classical proteomic studies. *Journal of Bacteriology* 192, 46-58 (2010)
- Icho, T., Sparrow, C. P., and Raetz, C. R. Molecular cloning and sequencing of the gene for CDP-diglyceride synthetase of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 260, 12078-12083 (1985)
- Ikegami, A., Nishiyama, K., Matsuyama, S., and Tokuda, H. Disruption of *rpmJ* encoding ribosomal protein L36 decreases the expression of *secY* upstream of the *spc* operon and inhibits protein translocation in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69, 1595-1602 (2005)
- Jeucken, A., Molenaar, M. R., van de Lest, C. H. A., Jansen, J. W. A., Helms, J. B., and Brouwers, J. F. A Comprehensive Functional Characterization of *Escherichia coli* Lipid Genes. *Cell Reports* 27(5), 1597-1606.e2 (2019)
- Jorgenson, M. A., Kannan, S., Laubacher, M. E., and Young, K. D. Dead-end intermediates in the enterobacterial common antigen pathway induce morphological defects in *Escherichia coli* by competing for undecaprenyl phosphate. *Molecular Microbiology* 100, 1-14 (2016)

- Kato, J., and Hashimoto, M. Construction of consecutive deletions of the *Escherichia coli* chromosome. *Molecular Systems Biology* 3, 132 (2007)
- Kawashima, Y., Miyazaki, E., Muller, M., Tokuda, H., and Nishiyama, K. Diacylglycerol specifically blocks spontaneous integration of membrane proteins and allows detection of a factor-assisted integration. *Journal of Biological Chemistry* 283, 24489-24496 (2008)
- Kiefer, D., and Kuhn, A. Hydrophobic forces drive spontaneous membrane insertion of the bacteriophage Pf3 coat protein without topological control. *EMBO Journal* 18, 6299-6306 (1999)
- Kuhn, A. Major coat proteins of bacteriophage Pf3 and M13 as model systems for Sec-independent protein transport. *FEMS Microbiology Reviews* 17, 185-190 (1995)
- Kuhn, H. M., Meier-Dieter, U., and Mayer, H. ECA, the enterobacterial common antigen. *FEMS Microbiology Reviews* 4, 195-222 (1988)
- Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K., Sugano, Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y., Maturana, A. D., Tanaka, Y., Mori, H., Sugita, Y., Arisaka, F., Ito, K., Ishitani, R., Tsukazaki, T., and Nureki, O. Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature* 509, 516-520 (2014)
- Li, G. W., Burkhardt, D., Gross, C., and Weissman, J. S. Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. *Cell* 157, 624-635 (2014)
- Liu, X., Yin, Y., Wu, J., and Liu, Z. Structure and mechanism of an intramembrane liponucleotide synthetase central for phospholipid biosynthesis. *Nature Communications* 5, 4244 (2014)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275 (1951)
- Luirink, J., and Sinning, I. SRP-mediated protein targeting: structure and

function revisited. *Biochimica et Biophysica Acta* 1694, 17-35 (2004)

Luirink, J., Yu, Z., Wagner, S., and de Gier, J. W. Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817, 965-976 (2012)

Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL Press, New York (1982)

Marr, A. G., and Ingraham, J. L. Effect of temperature on composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 84(6), 1260-1267 (1962)

Matsumura, K., Yamada, M., Yamashita, T., Muto, H., Nishiyama, K., Shimoi, H., and Isobe, K. Expression of alcohol oxidase gene from *Ochrobactrum* sp. AIU 033 in recombinant *Escherichia coli* through the twin-arginine translocation pathway. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 128, 13-21 (2019)

Mitchell, A. M., Srikumar, T., and Silhavy, T. J. Cyclic Enterobacterial Common Antigen Maintains the Outer Membrane Permeability Barrier of *Escherichia coli* in a Manner Controlled by YhdP. *mBio* 9 (2018)

Mori, S., Nomura, K., Fujikawa, K., Osawa, T., Shionyu, M., Yoda, T., Shirai, T., Tsuda, S., Yoshizawa-Kumagaya, K., Masuda, S., Nishio, H., Yoshiya, T., Suzuki, S., Muramoto, M., Nishiyama, K., and Shimamoto, K. Intermolecular Interactions between a Membrane Protein and Glycolipid Essential for Membrane Protein integration. *ACS Chemical Biology* 17, 609-618 (2022)

Moser, M., Nagamori, S., Huber, M., Tokuda, H., and Nishiyama, K. Glycolipozyme MPIase is essential for topology inversion of SecE during preprotein translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 9734-9739 (2013)

Nakamura, S., Suzuki, S., Saito, H., and Nishiyama, K. Cholesterol blocks spontaneous insertion of membrane proteins into liposomes of phosphatidylcholine. *Journal of Biochemistry* 163, 313-319 (2018)

Nishikawa, H., Sasaki, M., and Nishiyama, K. Membrane insertion of F₀c subunit of F₀F₁ ATPase depends on glycolipozyme MPIase and is stimulated by YidC.

Biochemical and Biophysical Research Communications 487, 477-482 (2017)

Nishiyama, K. MPIase, a multi-functional glycolipid involved in protein insertion into and protein translocation across membranes. *Seikagaku* 88, 744-747 (2016)

Nishiyama, K., and Endo, Y. Relationship between glycolipozyme MPIase and components comprising the protein transport machinery. *Medical Research Archives* 2(2015)

Nishiyama, K., and Shimamoto, K. Glycolipozyme membrane protein integrase (MPIase): recent data. *Biomolecular Concepts* 5, 429-438 (2014)

Nishiyama, K., Ikegami, A., Moser, M., Schiltz, E., Tokuda, H., and Muller, M. A derivative of lipid A is involved in signal recognition particle/SecYEG-dependent and -independent membrane integrations. *Journal of Biological Chemistry* 281, 35667-35676 (2006)

Nishiyama, K., Maeda, M., Abe, M., Kanamori, T., Shimamoto, K., Kusumoto, S., Ueda, T., and Tokuda, H. A novel complete reconstitution system for membrane integration of the simplest membrane protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394, 733-736 (2010)

Nishiyama, K., Maeda, M., Yanagisawa, K., Nagase, R., Komura, H., Iwashita, T., Yamagaki, T., Kusumoto, S., Tokuda, H., and Shimamoto, K. MPIase is a glycolipozyme essential for membrane protein integration. *Nature Communications* 3, 1260 (2012)

Nomura, K., Yamaguchi, T., Mori, S., Fujikawa, K., Nishiyama, K., Shimanouchi, T., Tanimoto, Y., Morigaki, K., and Shimamoto, K. Alteration of membrane physicochemical properties by two factors for membrane protein integration. *Biophysical Journal* 117, 99-110 (2019)

Pogliano, K.J. and Beckwith, J. The Cs *sec* mutants of *Escherichia coli* reflect the cold sensitivity of protein export itself. *Genetics* 133: 763-773 (1993)

Raetz, C.R. Enzymology, genetics, and regulation of membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* 42: 614-659 (1978)

- Raetz, C.R., and Dowhan, W. Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 265: 1235-1238 (1990)
- Rai, A. K., and Mitchell, A. M. Enterobacterial Common Antigen: Synthesis and Function of an Enigmatic Molecule. *mBio* 11(4), e01914-20 (2020)
- Reddy, P., Peterkofsky, A., and McKenney, K. Translational efficiency of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene: mutating the UUG initiation codon to GUG or AUG results in increased gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 5656-5660 (1985)
- Rick, P. D., and Silver, R. P. Enterobacterial common antigen and capsular polysaccharides. In *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, 2nd ed.*, ASM Press, Washington, D.C. (1996)
- Rick, P. D., Barr, K., Sankaran, K., Kajimura, J., Rush, J. S., and Waechter, C. J. Evidence that the *wzxE* gene of *Escherichia coli* K-12 encodes a protein involved in the transbilayer movement of a trisaccharide-lipid intermediate in the assembly of enterobacterial common antigen. *Journal of Biological Chemistry* 278, 16534-16542 (2003)
- Rick, P. D., Hubbard, G. L., Kitaoka, M., Nagaki, H., Kinoshita, T., Dowd, S., Simplaceanu, V., and Ho, C. Characterization of the lipid-carrier involved in the synthesis of enterobacterial common antigen (ECA) and identification of a novel phosphoglyceride in a mutant of *Salmonella typhimurium* defective in ECA synthesis. *Glycobiology* 8, 557-567 (1998)
- Rush, J. S., Rick, P. D., and Waechter, C. J. Polyisoprenyl phosphate specificity of UDP-GlcNAc:undecaprenyl phosphate *N*-acetylglucosaminyl 1-P transferase from *E.coli*. *Glycobiology* 7, 315-322 (1997)
- Ryabichko, S., Ferreira, V. M., Vitrac, H., Kiyamova, R., Dowhan, W., & Bogdanov, M. Cardiolipin is required *in vivo* for the stability of bacterial translocon and optimal membrane protein translocation and insertion. *Scientific Reports* 10, 6296 (2020)
- Samuelson, J. C., Chen, M., Jiang, F., Moller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G. J., and Dalbey, R. E. YidC mediates membrane protein insertion in

bacteria. *Nature* 406, 637-641 (2000)

Samuelson, J. C., Jiang, F., Yi, L., Chen, M., de Gier, J. W., Kuhn, A., and Dalbey, R. E. Function of YidC for the insertion of M13 procoat protein in *Escherichia coli*: translocation of mutants that show differences in their membrane potential dependence and Sec requirement. *Journal of Biological Chemistry* 276, 34847-34852 (2001)

Sasaki, M., Nishikawa, H., Suzuki, S., Moser, M., Huber, M., Sawasato, K., Matsubayashi, H. T., Kumazaki, K., Tsukazaki, T., Kuruma, Y., Nureki, O., Ueda, T., and Nishiyama, K. The bacterial protein YidC accelerates MPIase-dependent integration of membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry* 294, 18898-18908 (2019)

Sato, R., Sawasato, K., and Nishiyama, K. YnbB is a CdsA paralogue dedicated to biosynthesis of glycolipid MPIase involved in membrane protein integration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 510, 636-642 (2019)

Sawasato, K., Sato, R., Nishikawa, H., Iimura, N., Kamemoto, Y., Fujikawa, K., Yamaguchi, T., Kuruma, Y., Tamura, Y., Endo, T., Ueda, T., Shimamoto, K., and Nishiyama, K. CdsA is involved in biosynthesis of glycolipid MPIase essential for membrane protein integration *in vivo*. *Scientific Reports* 9, 1372 (2019)

Sawasato, K., Sekiya, Y., and Nishiyama, K. Two-step induction of cdsA promoters leads to upregulation of the glycolipid MPIase at cold temperature. *FEBS Letters* 593, 1711-1723 (2019)

Sawasato, K., Suzuki, S., and Nishiyama, K. Increased expression of the bacterial glycolipid MPIase is required for efficient protein translocation across membranes in cold conditions. *Journal of Biological Chemistry* 294, 8403-8411 (2019)

Schatz, G., and Dobberstein, B. Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519-1526 (1996)

Scotti, P. A., Urbanus, M. L., Brunner, J., de Gier, J. W., von Heijne, G., van der Does, C., Driessen, A. J., Oudega, B., and Luirink, J. YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxalp, is a component of the Sec translocase.

EMBO Journal 19, 542-549 (2000)

Sekiya, Y., Sawasato, K., and Nishiyama, K. Expression of Cds4/5 of *Arabidopsis* chloroplasts in *E. coli* reveals the membrane topology of the C-terminal region of CDP-diacylglycerol synthases. *Genes to Cells* 26, 727-738 (2021)

Shen, H., Heacock, P. N., Clancey, C. J., and Dowhan, W. The CDS1 gene encoding CDP-diacylglycerol synthase in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for cell growth. *Journal of Biological Chemistry* 271, 789-795 (1996)

Shibui, T., Uchida, M., and Teranishi, Y. A new hybrid promoter and its expression vector in *Escherichia coli*. *Agricultural and Biological Chemistry* 52, 983-988 (1988)

Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., and Ueda, T. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nature Biotechnology* 19, 751-755 (2001)

Sivaraman, J., Sauve, V., Matte, A., and Cygler, M. Crystal structure of *Escherichia coli* glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RffH) complexed with dTTP and Mg²⁺. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44214-44219 (2002)

Sparrow, C. P., and Raetz, C. R. Purification and properties of the membrane-bound CDP-diglyceride synthetase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 260, 12084-12091 (1985)

Tamura, Y., Harada, Y., Nishikawa, S., Yamano, K., Kamiya, M., Shiota, T., Kuroda, T., Kuge, O., Sesaki, H., Imai, K., Tomii, K., and Endo, T. Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria. *Cell Metabolism* 17: 709-718 (2013)

Tamura, Y., Harada, Y., Yamano, K., Watanabe, K., Ishikawa, D., Ohshima, C., Nishikawa, S., Yamamoto, H., and Endo, T. Identification of Tam41 maintaining integrity of the TIM23 protein translocator complex in mitochondria. *Journal of Cell Biology* 174: 631-637 (2006)

Van den Berg, B., Clemons, W. M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., and Rapoport, T. A. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427, 36-44 (2004)

Wickner, W., Driessen, A. J., and Hartl, F. U. The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annual Review of Biochemistry* 60, 101-124 (1991)

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119 (1985)