

# タンパク質膜挿入・膜透過に関与する新規糖脂質の生合成経路の決定

西山 賢一

(岩手大学 農学部附属寒冷バイオフィロンティア研究センター)

## 研究の目的

タンパク質の膜挿入や膜透過の機構は大腸菌から高等生物まで基本的に保存されており、その分子機構の解明は細胞生物学的に最も重要な課題の一つである。さらに、有用物質の分泌生産や、機能未知の膜タンパク質の機能解析やその創薬ターゲットへの応用といった観点からも注目されている。申請者らはモデル生物大腸菌を用いて、*in vivo*の反応を忠実に反映したタンパク質膜挿入・膜透過の再構成系を確立した<sup>1,2)</sup>。この再構成系を利用して、タンパク質膜挿入・膜透過には既知のタンパク質性因子だけでなく新規複合糖脂質が必須であることを発見した。一部のタンパク質はこの糖脂質のみに依存して膜挿入することから、この糖脂質を MPIase (*Membrane Protein Integrase*)と命名した<sup>2)</sup>。本研究では、MPIase 生合成経路を決定することを目的とした。そのため、まず MPIase の構造を完全に決定し (図 1)、構造活性相関を解析して、MPIase の作用機作を明らかにした<sup>3)</sup>。続いて、これらの研究で得られた知見から MPIase の生合成経路を予測し、MPIase 生合成因子の検索を行った。

## 方法

### MPIase の精製と検出

大腸菌 MC4100 を培養し、内膜を調製し、尿素、コール酸ナトリウム、トリクロロ酢酸の順で抽出した。その後、陰イオン交換クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィーにより高純度 MPIase を精製した。MPIase は TLC/アニスアルデヒド・硫酸染色あるいは SDS-PAGE/銀染色で検出した<sup>2)</sup>。

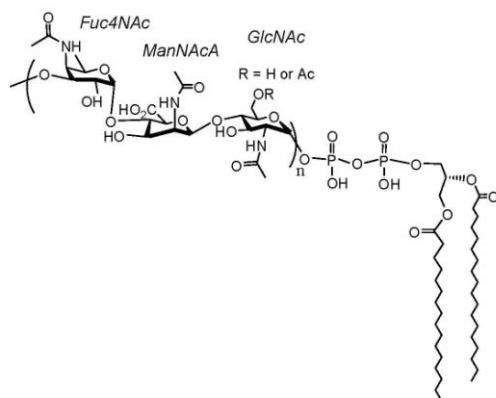


図 1. MPIase の構造。

脂質部分は C16 あるいは C18 の脂肪酸である。糖鎖は 4 アセトアミドフコース (Fuc4NAc)、N アセチルマンノサミンウロン酸 (ManNAcA)、N アセチルグルコサミン (GlcNAc) を単位とした繰り返しを示し、n は 9~11 の整数を示す。分子の約 1/3 の R がアセチル基である。

## リポソームの再構成とタンパク質膜挿入活性の測定

クロロホルム：エタノール：水（3/7/4）の溶媒中で MPIase とリン脂質、ジアシルグリセロール（DAG）を混合し、減圧乾燥した。水溶液を添加して音波処理によりリポソームを形成した。基質膜タンパク質として 3L-Pf3 coat<sup>4)</sup>をリポソーム存在下試験管内合成し、膜挿入した 3L-Pf3 coat をプロテイナーゼ K 耐性のバンドとして検出した。

## 抗 MPIase 抗体の調製

MPIase を架橋剤 EDAC により担体タンパク質 KLH に架橋させ、ウサギを免疫した。

## 結果

### 1. MPIase の構造決定

高純度の MPIase を精製し、MPIase 自身やその酸・塩基加水分解産物の NMR 解析、MS 解析の組み合わせにより MPIase の構造を決定した。これらの解析で明確に構造が決定できなかった部分については、部分合成標品を用意し、それらとの比較により構造を決定した。その結果、MPIase の構造は図 1 に示す構造であることが結論された。驚いたことに、MPIase の糖鎖構造は、外膜構成因子である ECA（enterobacterial common antigen）と類似していることが判明した。MPIase と ECA との相違点は、ECA における糖鎖の繰り返しが  $n=18\sim 55$  であるのに対して MPIase では  $n=9\sim 11$  であること、ECA における脂質との連結部はリン酸ジエステルであるのに対して MPIase ではピロリン酸であることであった。

### 2. MPIase の構造-活性相関

MPIase の構造-活性相関を明らかにするために、MPIase を化学的処理や酵素的処理により MPIase 誘導体を構築した。MPIase をピロリン酸フォスファターゼで処理するとピロリン酸中央部で切断され、可溶性の糖鎖が生成する（PP-MPIase）。一方、NaOH 処理すると、ピロリン酸中央部と GlcNAc 残基中の R 基（アセチル基）が切断され NaOH-MPIase が生成する。これらの MPIase 誘導体の膜挿入活性を調べたところ、PP-MPIase では野生型 MPIase より高い活性が検出されたが、NaOH-MPIase では膜挿入活性が全く検出されなかった。これらのことから、MPIase の脂質部分は活性には必須ではないこと、GlcNAc 残基のアセチル基は活性に必須であることが判明した。

MPIase と ECA は構造が類似しているため、ECA に膜挿入活性がないかどうか調べた。その結果、ECA を再構成したリポソームでは、膜挿入活性は全く検出されなかった。このことは、膜挿入活性には糖鎖の長さが重要であることを強く示唆している。

PP-MPIase は水溶性であるため、活性測定の際リポソームに再構成する必要がない。そのため、タンパク質膜挿入反応がそのタンパク質合成に共役するかどうか調べた。PP-MPIase 存在下で膜タンパク質を合成すると、膜挿入反応はタンパク質合成終了後でも進行した。実際、PP-MPIase 存在下で合成した膜タンパク質は、PP-MPIase と可溶性の複合体を形成していた。したがって、MPIase には膜挿入反応に特化したシャペロン

活性があるといえる。

### 3. MPIase 生合成因子の検索

抗 MPIase 抗体を用いて MPIase の細胞内局在を調べた。その結果、予想通り MPIase は内膜にのみ存在することが判明した。また、この抗体により、糖鎖部分が類似する ECA やその前駆体のバンドも検出された。一方、ECA 生合成変異株である *wecA* 変異株や *wecF* 変異株では、ECA のバンドは全く検出されなかったが、MPIase のバンドは野生株と同様に検出された。これらの結果は、MPIase と ECA は構造が類似しているもののそれらの生合成経路は大きく異なることを示している。

MPIase と ECA の構造で大きな違いは、糖鎖と脂質との連結部がピロリン酸カリウムかという点である。ECA はウンデカプレノール上で糖鎖が伸長し、最終的にリン脂質に転移され成熟体となることが知られている。一方、MPIase では最初の糖 (GlcNAc) が直接フォスファチジン酸 (PA) か DAG に転移することが予想される。そのため、UDP-GlcNAc と PA、DAG あるいは CDP-DAG を混合し、大腸菌細胞質画分あるいは膜画分を加えて反応が進行するかどうか調べた。その結果、UDP-GlcNAc、PA に膜画分を加えると、GlcNAc-PP-DAG と考えられる反応産物が得られた。この反応産物は個々の因子に依存して生成した。この活性を指標に精製を進めたところ、Cdh タンパク質が同定された。しかし、*cdh* 変異株でも MPIase は発現していたことから、Cdh 以外にも同様の活性をもつ因子があることが考えられる。

### 結論

本研究では、タンパク質膜挿入・膜透過反応に必須の糖脂質 MPIase の構造を完全に決定し、構造活性相関を明らかにした。その結果、MPIase にはタンパク質膜挿入に特化したシャペロン活性があるだけでなく、それに続く膜挿入も駆動することが明らかになった。また、MPIase による膜挿入は触媒的に進行することも明らかになっている<sup>2)</sup>。これらは、MPIase は糖脂質でありながら酵素様の機能をもっていることを示している。これらのことから、MPIase は糖脂質酵素 (glycolipozyme) であるという概念を提唱できるのではないかと考えている。

MPIase と ECA は構造的に類似しているが、細胞内での局在や生合成経路も大きく異なることが判明した。本研究では MPIase の生合成経路の第一段階に関与すると考えられる因子 Cdh を同定したが、*cdh* 遺伝子を欠失しても MPIase の生合成は影響を受けなかった。MPIase は重要な機能を担うために複数の生合成酵素が存在する可能性が考えられる。今後は *cdh* 遺伝子破壊株から同様の実験を進めることにより、さらなる MPIase 生合成因子の検索が可能になると考えられる。

### 文献

- 1) Nishiyama, K. *et al.* (2006) A derivative of lipid A is involved in signal recognition particle/SecYEG-dependent and -independent membrane integrations. *J. Biol. Chem.* **281**: 35667-35676.

- 2) Nishiyama, K. *et al.* (2010) A novel complete reconstitution system for membrane integration of the simplest membrane protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**: 733-736.
- 3) Nishiyama, K. *et al.* (2012) MPIase is a glycolipozyme essential for membrane protein integration. *Nature Communications.* **3**: 1260 DOI: 10.1038/ncomms2267
- 4) Kawashima, Y., Miyazaki, E., Muller, M., Tokuda, H. & Nishiyama, K. (2008) Diacylglycerol specifically blocks spontaneous integration of membrane proteins and allows detection of a factor-assisted integration. *J. Biol. Chem.* **283**: 24489-24496.