



Title	膜タンパク質膜挿入に関わる糖脂質因子と基質タンパク質の相互作用解析
Author(s)	森, 祥子
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/89496">https://doi.org/10.18910/89496</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 森 祥子 )

論文題名 膜タンパク質膜挿入に関わる糖脂質因子と基質タンパク質の相互作用解析

## 論文内容の要旨

リボソームにより合成された新生タンパク質を生体膜に組み込む機構は、基本的にはすべての生物種で保存されているが、詳細な点では未解明の部分も多い。大腸菌における膜タンパク質の膜挿入には、膜透過装置トランスロコンであるSecYEGや膜シャペロンYidCが作用することが知られるが、さらに、特徴的な構造を有する糖脂質MPIase (Membrane Protein Integrase) も必須であることが明らかとなっている。MPIaseによる膜挿入機構の解明に向け、本研究では、膜挿入の初期段階での分子間相互作用に着目し、主に物理化学的解析を実施した。膜透過装置トランスロコン非依存膜挿入タンパク質としてこれまでに多くの研究実績があるPf3ファージのコートタンパク質 (Pf3コート) およびその変異体と、MPIaseの種々の類縁体を用いて解析を行った。

CD測定の結果、MPIaseが溶液中に存在することでPf3コートの二次構造が変化し、これらの分子間に直接的な相互作用が働く可能性が示唆された。これらの分子を表面プラズモン共鳴 (SPR) 法に供したところ、MPIaseとPf3コートの直接的な分子間相互作用を初めて観測した。MPIaseの最小活性構造である合成類縁体mini-MPIase-3を含む脂質膜とPf3コートについてもSPRにより相互作用を観測しており、二分子間の相互作用解析は実際の脂質膜中でも生じる相互作用を検出していると考えている。さらに天然MPIaseおよびその合成類縁体を用いて詳細なSPR解析を実施し、その親和性および結合／解離速度定数を算出した。ピロリン酸を除いた類縁体で親和性が極めて弱く、ピロリン酸が分子間相互作用に重要であることが明らかとなった。また天然体と比べて糖鎖の短い合成類縁体では、親和性に差は無いものの結合および解離速度が低下しており、天然体と合成類縁体の膜挿入活性の違いから、糖鎖部分の速い結合・解離が効率的な膜挿入に寄与することが示唆された。

さらにMPIaseを構成する三糖の類縁体を用いて飽和移動差NMR (STD-NMR) およびドッキングシミュレーションを用いた詳細な解析を実施した。STD-NMRでは、GlcNAcの6位O-アセチル基がPf3コートと相互作用しており、この影響で分子全体がより強くPf3コートと結合する傾向が示された。ドッキングシミュレーションでは、O-アセチル基およびピロリン酸が相互作用に寄与し、基質タンパク質側は疎水性残基や塩基性残基により糖鎖およびピロリン酸と近接する様子が示された。この結果は、SPR測定においてPf3コートの疎水性領域または塩基性残基を除いた変異体を用いるとMPIaseとの相互作用が減弱したことから実験的にも裏付けられた。

本研究により、膜タンパク質膜挿入因子MPIaseと基質タンパク質の分子間相互作用を初めて実証し、この相互作用に寄与するMPIaseと基質タンパク質それぞれの部分構造を明らかにした。MPIaseのアセチル基とタンパク質の疎水性領域の疎水性相互作用や、MPIaseのピロリン酸とタンパク質の塩基性アミノ酸残基の静電相互作用が、MPIaseによる膜タンパク質膜挿入において重要な役割を果たすと考えられる。これらの結果からMPIaseは、長い糖鎖で新生タンパク質を捕捉し二次構造を変化させることで凝集を抑制した後、アセチル基などによる速い結合・解離を繰り返しながら、ピロリン酸の存在する膜表面へとタンパク質を運搬するという膜挿入機構を提唱した。

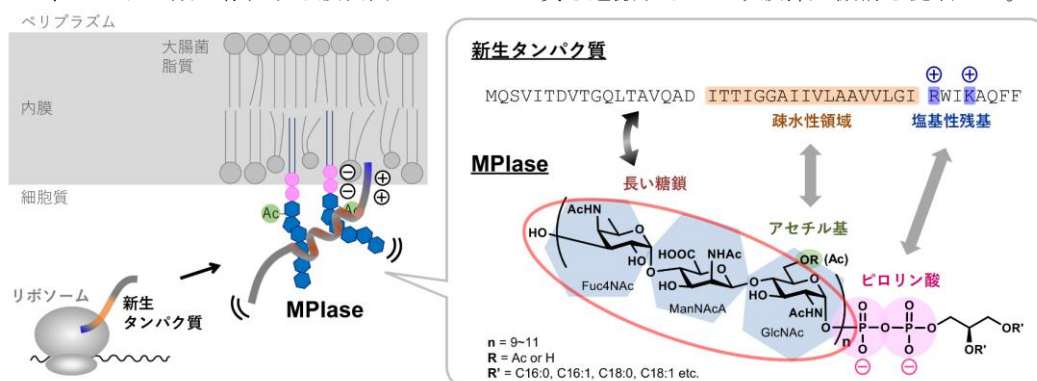


図1 膜タンパク質膜挿入における糖脂質MPIaseと基質タンパク質の相互作用

Inducing nascent proteins generated from the ribosome to appropriate locations is an indispensable biological function in every organism. Integration of proteins into inner membranes in *Escherichia coli* is mediated by proteinaceous factors, such as Sec translocons and an insertase YidC. Additionally, a glycolipid named MPIase (Membrane Protein Integrase) was proven essential for membrane protein integration. It is composed of a long sugar chain and pyrophospholipid. A synthesized minimal unit of MPIase possessing only one trisaccharide, mini-MPIase-3, involves an essential structure for the integration activity. In this study, to elucidate integration mechanisms using MPIase, we analyzed intermolecular interactions of MPIase or its synthetic analogs with a model substrate, the Pf3 coat protein, using physicochemical methods.

CD spectra of the solution with MPIase and Pf3 coat proteins showed that MPIase altered the secondary structure of Pf3 coat proteins. Surface plasmon resonance (SPR) analyses revealed the importance of a pyrophosphate for affinity to the Pf3 coat proteins. Compared with mini-MPIase-3, natural MPIase showed faster association and dissociation due to its long sugar chain despite the slight difference in affinity. To focus on more detailed MPIase substructures, we performed docking simulations and saturation transfer difference (STD)-NMR. These experiments yielded that the 6-*O*-acetyl group on glucosamine and the phosphate of MPIase play important roles leading to interactions with the Pf3 coat proteins. The high affinity of MPIase to the hydrophobic region and the basic amino acid residues of the protein was suggested by docking simulations and proven experimentally by SPR using protein mutants devoid of target regions. These results demonstrated the direct interactions of MPIase with a substrate protein and revealed detailed mechanisms of membrane protein integration.

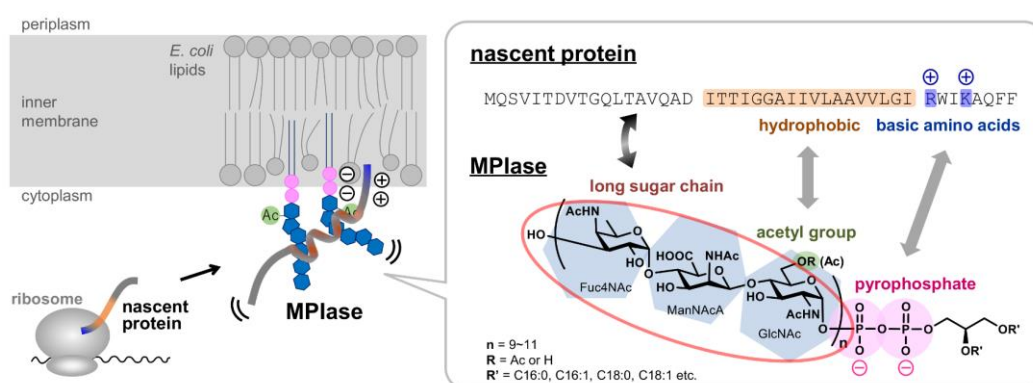


Fig. 1 Interaction between MPIase and substrate protein in membrane protein integration

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (森 祥子)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査 教 授	村田道雄
	副 査 特任教授	島本啓子
	副 査 教 授	深瀬浩一
	副 査 教 授	中谷和彦

## 論文審査の結果の要旨

膜タンパク質は全タンパク質の約 30%を占め、学術的にも社会的にも重要な研究テーマである。その生合成機構の解明も進んでいるが、重要課題も未解明のまま残されている。そのひとつが、膜挿入過程の分子機構である。疎水性の高い膜挿入タンパク質が、合成装置であるリボゾームから脂質膜に移動・結合する過程については分かっていないことも多い。森氏の所属研究機関において、その重要因子である糖脂質 MPIase が発見され、それを契機とした機構解明が期待されていた。同氏は学位論文研究として、細菌の内膜において、タンパク質が膜に挿入される分子機構の解明を目指し、短い膜タンパク質の挿入活性を持つ MPIase と基質タンパク質 Pf3 の相互作用を分子・原子レベルで明らかにした。実験手法として、表面プラズモン共鳴法 (SPR)、飽和移動差 NMR 法、ドッキングシミュレーションなどを用いて、MPIase とその合成類縁体について膜タンパク質挿入活性および MPIase 糖鎖部のタンパク質凝集抑制効果等を評価し、これらの結果を考察することによってタンパク質膜挿入モデルの構築を試みた。すなわち、多くの膜タンパク質は、膜貫通時に  $\alpha$  ヘリックスを形成する配列の膜内側に塩基性アミノ酸を有しており、この構造に適合して MPIase の各ドメインが機能することを見出した。例えば、糖鎖にアセチル基が置換することによってタンパク質膜挿入部分との親和性が増大すること、MPIase の糖鎖とアシル鎖を接続するピロリン酸が上述の塩基性アミノ酸と強い静電相互作用を有すること、また、長い糖鎖が疎水性ペプチド部分を迅速に補足することなどの機能モデルを提唱するに至った。実験面では、合成基質タンパク質の溶解性やリボソームを用いた SPR 測定の再現性などの実験上の問題点を克服して、信頼性のある実験結果を得たことは特筆に値する。これらの成果は、分子機構の詳細において未解明な部分の多い膜タンパク質の生合成機構に対して重要な知見を与えるものであり、細菌に留まらず、広い生物種に共通する概念を含んでいると考えられる。

以上の研究業績によって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。