

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 10 年度博士課程入学

氏名 梶田 和宏

指導教官 徳田 元

## 論文題目

リポ蛋白質の膜からの遊離を触媒する ABC トランスポーター

グラム陰性細菌である大腸菌の細胞は、外膜、ペリプラズム空間、内膜（細胞質膜）、細胞質の 4 つのコンパートメントからなっている。大腸菌の外膜、および内膜にはリポ蛋白質と呼ばれる N 末端のシステイン残基が脂質修飾を受けた蛋白質が存在している。リポ蛋白質は、その脂質部分を介して膜と結合している膜表在性蛋白質であり、蛋白質部分は内膜および外膜のペリプラズム空間側に配向している。大腸菌には約 90 種類のリポ蛋白質が存在していると考えられており、形態維持、物質輸送、薬剤排出、蛋白質の分泌、ペプチドグリカン合成と分解などの細胞機能に関与している。

シグナルペプチドを持つ前駆体として合成されたりポ蛋白質は内膜を透過する過程で脂質修飾とシグナルペプチドの切断を受け、その後脂質修飾されたシステイン残基の次のアミノ酸残基(+2 位)がアスパラギン酸であるリポ蛋白質は内膜にとどまり、それ以外のアミノ酸残基を持つリポ蛋白質は外膜へ運ばれることが知られていた。しかしリポ蛋白質の選別機構や外膜への局在化機構は長い間不明だった。数年前、当研究室においてリポ蛋白質の外膜への局在化に関与する 2 つの因子が同定され、それらの機能が解析された。その結果、リポ蛋白質はペリプラズム空間のシャペロン蛋白質 LolA と 1:1 の可溶性の複合体を形成して内膜から遊離し、外膜に存在するレセプター蛋白質 LolB の働きによって外膜に組み込まれることが明らかとなった。さらに可溶化した内膜画分とリポ蛋白質を再構成し

たプロテオリボソームを用いた解析から、リポ蛋白質の膜からの遊離には ATP と内膜因子が必要であることが明らかとなり、リポ蛋白質の遊離に関与する ATPase 活性を持つ内膜因子の存在が示唆された。

本論文は、この内膜因子が 3 種の蛋白質からなる ABC トランスポーターであることを明らかにし、これが関与するリポ蛋白質の選別と膜からの遊離の機構について詳細に検討したものである。

#### リポ蛋白質の膜からの遊離に関与する ABC トランスポーター LolCDE

本研究の開始直前に、遺伝子量効果によってリポ蛋白質の遊離活性を上昇させる大腸菌染色体の DNA 断片が当研究室ですでに得られていた。この DNA 断片には 7 つの *orf* (Open Reading Frame)が見いだされていた。どの *orf* がリポ蛋白質の遊離活性を上昇させるのかを、種々の DNA 断片を運ぶ多コピー数プラスミドを作成し、それらを保持する大腸菌から内膜蛋白質を調製し、リポ蛋白質とともにプロテオリボソームに再構成して調べた。その結果、*ycfU*、*ycfV* および *ycfW* の 3 つの *orf* がリポ蛋白質の遊離活性を上昇させることが示された。そこで、これら 3 つの *orf* を運ぶプラスミドを保持する大腸菌の内膜画分からリポ蛋白質遊離活性を精製した結果、最終精製標品には 3 つの蛋白質が 1:2:1 の複合体として含まれていることが明らかになった。これらの蛋白質が *ycfU*、*ycfV* および *ycfW* の遺伝子産物であることを示し、それぞれ LolC、LolD、LolE 蛋白質と命名した (1)。

LolCDE 複合体の精製標品を用いた再構成実験から LolCDE によるリポ蛋白質の膜からの遊離は ATP と LolA に依存するだけでなく、リポ蛋白質の局在化シグナルとして機能する +2 位のアミノ酸残基にも依存することが示された。つまり、外膜局在化シグナルを持つリポ蛋白質である Pal や L10P は効率よく遊離させたが、+2 位を内膜局在化シグナルであるアスパラギン酸に変異させた Pal(D)や L10P(D)は全く遊離させなかった。この結果は再構成系で観察される LolCDE によるリポ蛋白質の膜からの遊離が *in vivo* を反映した現象であることを示している。

LolD 蛋白質は ABC(ATP Binding Cassette)トランスポーターの ATPase サブユニットに特異的に見られる Walker モチーフと ABC トランスポーターモチーフをもっている。さらに、LolC と LolE は内膜の尿素処理では可溶化されなかったことから膜内在性蛋白質であると考えられた。これらのサブユニット構成から LolCDE 複合体は典型的な細菌型 ABC トランスポーターファミリーに属していると結論づけた。LolCDE のホモログは、LolA や LolB のホモログと同様に広くグラム陰性細菌に見いだされたことから、Lol 蛋白質によるリポ蛋白質の局在化機構はグラム陰性細菌に普遍的に存在していると考えられる。

これまでに知られている ABC トランスポーターは膜の内から外へ、あるいは外から内

への膜を横断した物質の輸送を担うと考えられている (図 A)。一方、LolCDE は膜表面にアンカーしているリポ蛋白質を膜から遊離させる ABC トランスポーターであると思われた。そこで LolCDE が再構成されたプロテオリポソームを調製した後、Pal をプロテオリポソームの外側表面にのみ配向させて遊離反応を調べた。Pal は LolA に依存して遊離したことから、LolCDE は膜表面に存在する物質 (リポ蛋白質) を膜から遊離させる新しいタイプの ABC トランスポーターであることが示された (図 A)。LolCDE がリポ蛋白質の膜透過には関与せず、遊離反応を触媒する ABC トランスポーターであることは、当研究室で得られた LolCDE 変異株を用いても示されている。

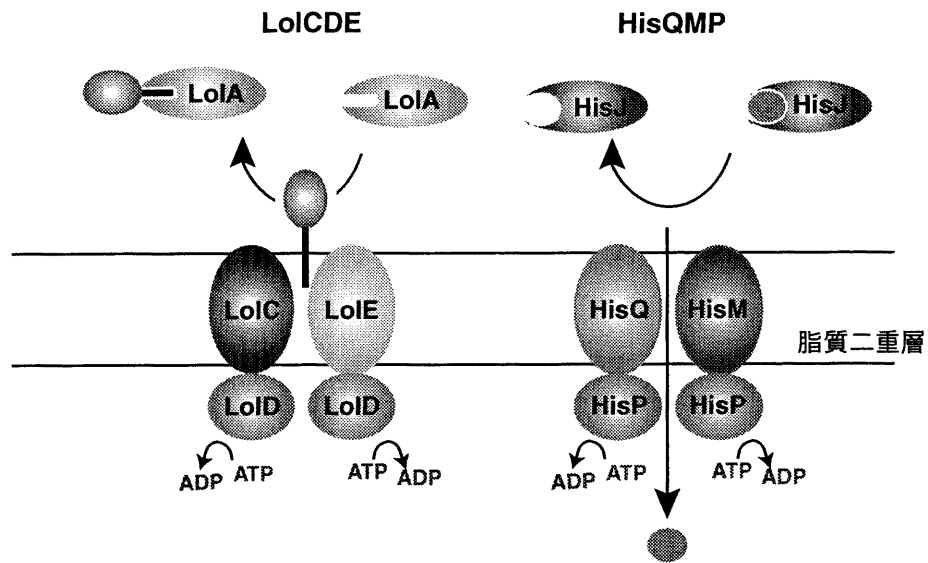
#### リポ蛋白質の局在化シグナルに依存した LolCDE ATPase 活性の促進

これまでの知見からリポ蛋白質の局在化シグナルに依存した膜からの遊離には LolCDE 複合体と LolA が必須であることが示された。しかし LolCDE と LolA のどちらが局在化シグナルを識別しているのかは不明だった。また外膜局在化シグナルと内膜局在化シグナルは、どのように認識されているのかも明らかではなかった。そこでリポ蛋白質の膜からの遊離における局在化シグナル認識機構を理解するために、L10P の遊離に、過剰量の Pal や Pal (D) がどのように影響するかを調べたところ、外膜局在化シグナルをもつ Pal によって L10P の遊離は強く阻害されたが、内膜局在化シグナルをもつ Pal (D) によってはまったく阻害されなかった。これは Pal(D) が LolCDE/LolA による遊離反応の基質にはならないことを示唆している。そこで次に LolCDE の ATPase 活性に対する局在化シグナルの影響を調べた。Pal (D) 存在下では LolCDE の ATPase 活性は全く促進されなかったが、Pal に依存した ATPase 活性の促進が観察された。また ATPase 活性の促進は LolA 非存在下で観察された。これらの結果により、リポ蛋白質の外膜局在化シグナルを直接認識しているのは LolCDE 複合体であることが明らかとなった (図 B)。これらの知見から内膜局在化シグナルをもつリポ蛋白質は、LolCDE の基質にならないため内膜にとどまることが強く示唆された。

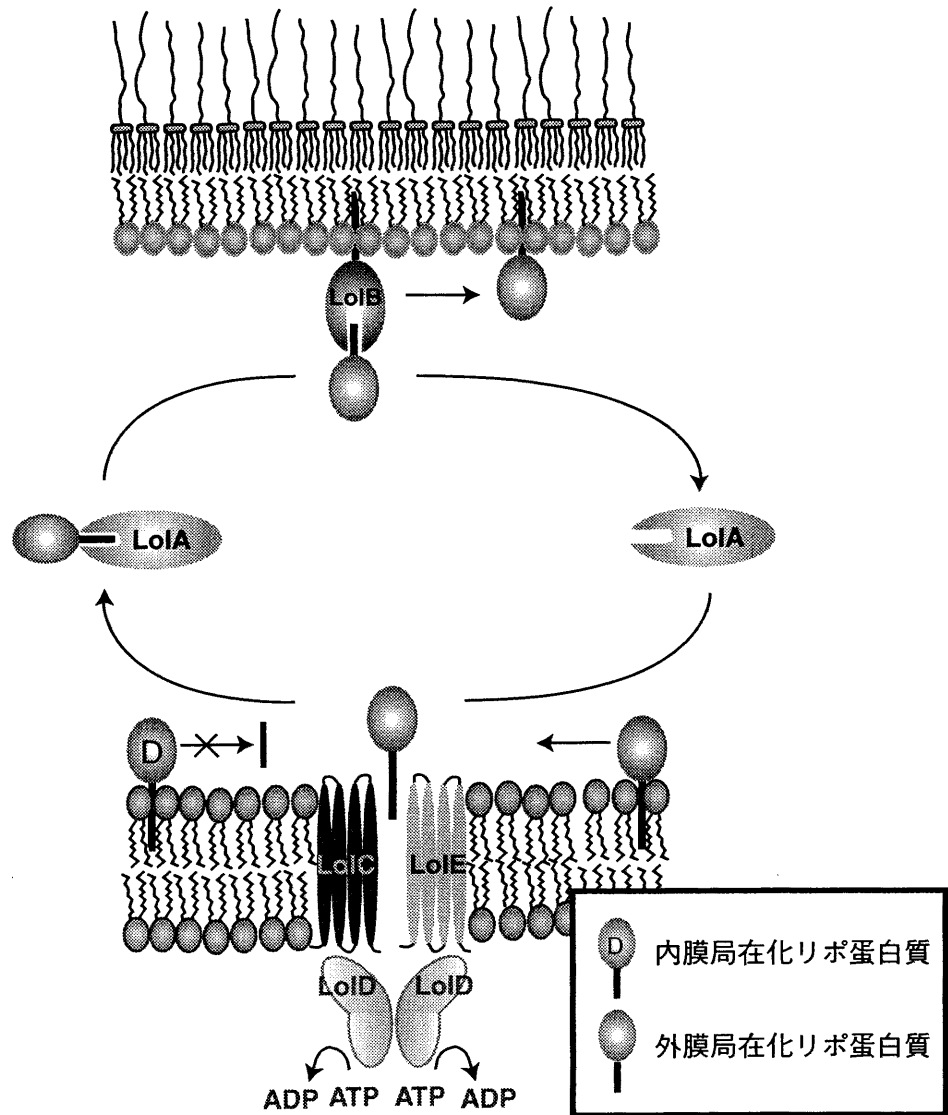
本論文ではリポ蛋白質の選別と膜からの遊離を司る新しいタイプの ABC トランスポーター LolCDE の同定と機能解析について述べた。今後は本研究の成果を基礎としてリポ蛋白質の膜からの遊離に依存した LolCDE ATPase 活性の解析や局在化シグナルを識別するサブユニットの同定とその分子機構の解明が期待される。

1) Yakushi T, Masuda K, Narita S, Matsuyama S, Tokuda H

Nature Cell Biol. 2000 Apr;2(4):212-8.



図A LoICDEと既知のABCトランスポーターの機能の相違  
HisQMPは代表的な細菌型のABCトランスポーターである



図B リポ蛋白質の局在化機構