

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成10年度博士課程進学

氏名 福田 歩

指導教官 徳田 元

論文題目

大腸菌リポ蛋白質の脂質修飾と局在化機構の解析

細菌の細胞表層には、N末端のシステイン残基が脂質で修飾されたりポ蛋白質が存在し、物質輸送や細胞分裂、形態維持、ペプチドグリカンの合成など様々な細胞機能に関与している。グラム陰性細菌である大腸菌の細胞は、細胞質、細胞質膜（内膜）、ペリプラズム、および外膜の4つのコンパートメントからなっている。リポ蛋白質は、Sec膜透過装置に認識されるためのシグナルペプチドをN末端に持つ前駆体として細胞質で合成される。つぎに、細胞質膜を透過する過程で図1に示す3段階の反応を経て成熟体となる。ステップ1では、シグナルペプチド切断部位付近のリポボックスとよばれる配列（Leu-Ala/Ser-Gly/Ala-Cys）がジアシルグリセリル基転位酵素（Lgt）によって認識され、フォスファチジルグリセロール由来のジアシルグリセリル基がシステイン残基に付加される。これを、ジアシルグリセリル基の修飾された前駆体という意味で、DG-リポ蛋白質前駆体（DG-proLipoprotein）と呼ぶ。ステップ2では、リポ蛋白質に特異的なシグナルペプチダーゼであるシグナルペプチダーゼII（LspA）によってシグナルペプチドが切断され、ジアシルグリセリル基で修飾されたシステイン残基が新たなN末端となる。これを、成熟体の一段階前という意味で、アポリポ蛋白質（apoLipoprotein）と呼ぶ。また、ステップ2の反応はグロボマ

イシンにより阻害を受ける。ステップ3では、新たに生じた N 末端のアミノ基が N-アシル基転位酵素 (Lnt) によってアシル化され、成熟体となる。

図2に示すように、リポ蛋白質成熟体の最終的な局在場所は内膜か外膜のペリプラズム側である。局在場所の選別については、脂質修飾されたシステイン残基のとなりのアミノ酸がアスパラギン酸 (D) の場合は内膜に留まり、それ以外のアミノ酸 (X) のものは外膜へ輸送されることがわかっており、大腸菌で現在知られている90余りのリポ蛋白質のうち、90%以上が外膜に局在すると考えられている。これらリポ蛋白質の選別および外膜への輸送を行っているのが Lol システムである。Lol システムは、内膜に存在する ABC トランスポーターである LolCDE 複合体、リポ蛋白質と 1 : 1 の可溶性複合体を形成して外膜へ運搬する LolA、外膜でリポ蛋白質を受け取る LolB からなる。

リポ蛋白質に特徴的な構造である脂質分子の第一の役割は、膜にリポ蛋白質を留める錨としての機能であると考えられる。しかしこれまで、リポ蛋白質が Lol システムの基質となるために脂質分子が果たす役割については不明であった。そこで本論文では、リポ蛋白質の成熟過程において最後に付加される N-アシル基に注目し、アポリポ蛋白質を基質とした解析をおこなった。その結果、外膜に局在するリポ蛋白質が Lol システムに依存して内膜から遊離するためには、N-アシル基が必須であることを明らかにした。

アポリポ蛋白質は Lol システムの基質にならない

基質には、外膜リポ蛋白質である Pal の C 末端にヒスチジンタグを導入した Pal-His を用いた。スフェロプラストを用いて *in vivo* の遊離実験を行った結果、Pal-His は Pal と同様に Lol システムに依存して内膜から遊離することを確認した。また、Pal-His が細胞内において正しく外膜へ局在していることも確認した。したがって、ヒスチジンタグの導入は Pal の基質としての性質に影響を与えないと判断し、以降の解析に用いた。また、金属アフィニティーカラムを用いて Pal-His を精製する方法も確立した。

次に、apoPal-His 合成のための条件を検討した。簡単な方法および原理は以下の通りである。グロボマイシンでシグナルペプチダーゼ II を阻害しつつ Pal-His の発現を誘導し、前駆体 (DGproPal-His) を蓄積させた膜画分を調製した。次に、75℃の緩衝液に膜画分を加え、シグナルペプチダーゼ II からグロボマイシンを解離させた。シグナルペプチダーゼ II は熱に安定な酵素であり、75℃

でも活性を保持しているため、シグナルペプチドの切断が起こる。一方、N-アシル基転位酵素は失活するため N-アシル基の付加反応は進行せず、apoPal-His が得られた。

Pal-His および apoPal-His を基質とし、精製した LolCDE 複合体、大腸菌リン脂質とともにプロテオリポソームを再構成し、*in vitro* における遊離実験を行った。Pal-His は LolA の添加に依存して効率良くプロテオリポソームから遊離した。一方、apoPal-His はプロテオリポソームに留まったままであった。この結果は、リポ蛋白質が Lol システムの基質となるためには、N-アシル基が必須であることを示唆している。

N-アシル基転位酵素 (Lnt) の精製

apoPal-His は 75℃ という条件で人工的に調製した。したがって、apoPal-His が遊離しないのは、細胞内の実際の反応を反映しているわけではなく、人為的な操作によって基質としての性質が損なわれた結果を観察しているに過ぎないという可能性が否定できない。この可能性を検討するために、N-アシル基転位酵素を精製して再構成系に加え、apoPal-His から生じた成熟体 Pal-His が遊離するか否かを確認した。

N-アシル基転位酵素 (Lnt) はグラム陰性細菌にのみ特徴的に存在する生育に必須の膜蛋白質である。N 末端半分に 6 つの膜貫通領域を持ち、C 末端半分は親水的なドメインを形成していると予想される。C 末端にヒスチジンタグを導入した Lnt-His をプラスミドから発現させ、精製を試みた。Lnt-His を膜から可溶化するのに 3 種類の非イオン性界面活性剤を検討したが、いずれを使用しても可溶化および金属アフィニティーカラムによる精製は可能であった。このうち、回収率が最もよいシュークロースモノカプレートを採用した。

Lol システムによる外膜リポ蛋白質の遊離には N-アシル基が必須である

75℃ 処理で調製した apoPal-His を基質とし、精製した N-アシル基転位酵素を加え、LolCDE 複合体とともにプロテオリポソームを再構成した。30℃、1 時間のインキュベーションによって apoPal-His は成熟体に変換した。さらに LolA に依存して効率よく遊離した。以上の結果から、外膜リポ蛋白質が Lol システムによって内膜から遊離するためには、N-アシル基が必須であると結論するに至った。

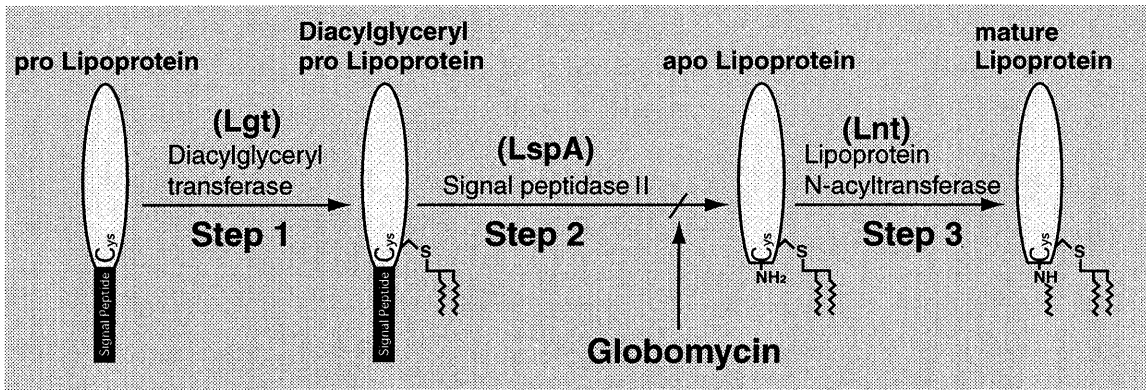


図1 リポ蛋白質の成熟体化反応

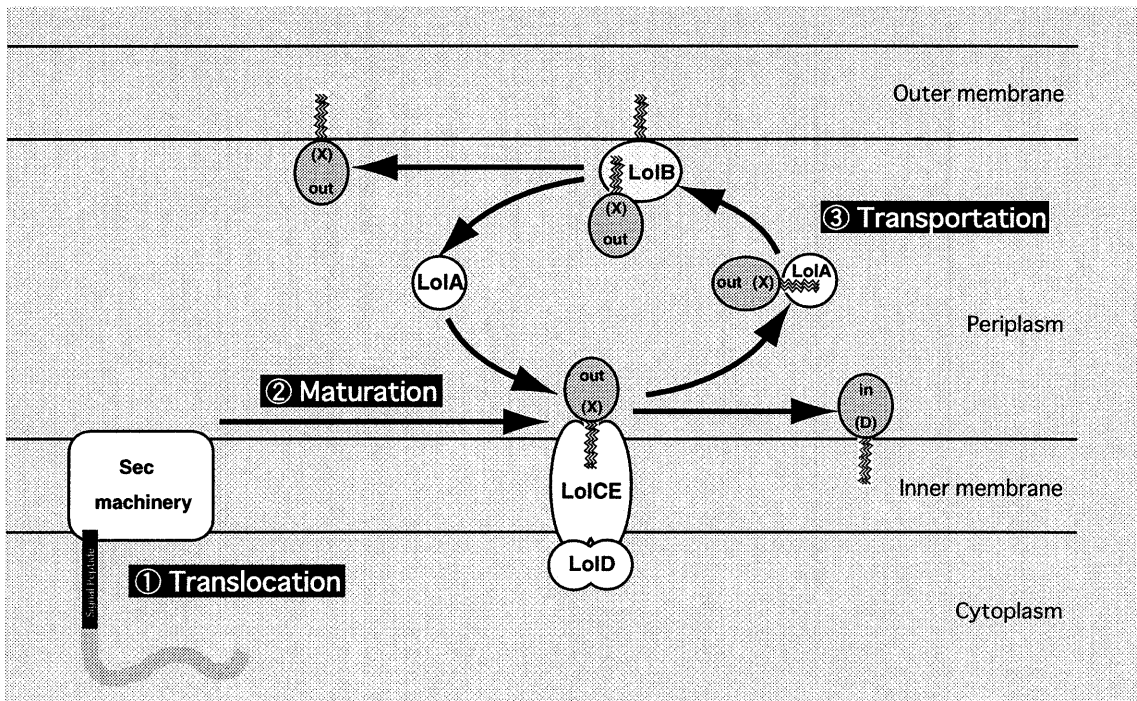


図2 リポ蛋白質局在化機構の模式図