

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻

平成11年度博士課程 入学

宮本厚樹

指導教官 徳田 元

論文題目 リポ蛋白質の局在化に関与する分子シャペロン LolA の機能解析

[はじめに]

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)および細胞質の4つのコンパートメントから成り立っている。外膜と内膜にはN末端のシステイン残基が脂質修飾されたリポ蛋白質が90種あまり存在しており、形態維持、細胞分裂、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多くの重要な細胞機能を担っている。リポ蛋白質のN末端であるシステインの次のアミノ酸残基(+2位)がアスパラギン酸である場合は内膜に、アスパラギン酸以外のアミノ酸残基であるリポ蛋白質は外膜に局在化する。すなわち、+2位のアミノ酸残基は膜局在化を決定する選別シグナルであり、“+2ルール”とよばれている。この“+2ルール”から、大部分のリポ蛋白質は外膜に存在すると考えられているが、不溶性の外膜リポ蛋白質がどのように水溶性の環境であるペリプラズム空間を通るのかは長い間不明であった。当研究室では、外膜リポ蛋白質の局在化には大腸菌の生育に必須である5種類の Lol (localization of lipoprotein) 因子が関与していることを明らかにしている。

外膜リポ蛋白質は、内膜に存在するABCトランスポーターである LolCDE の作用により、ペリプラ

ズム空間に存在するリポ蛋白質に特異的な分子シャペロンである LolA と1:1の水溶性複合体を形成して内膜から遊離する。次に LolA 複合体としてペリプラズム空間を横断した外膜リポ蛋白質は、外膜に存在する受容体蛋白質 LolB に受け渡され、最終的に外膜へ組み込まれる(図 1)。

このように LolA は、リポ蛋白質の内膜からの遊離、水溶性複合体の形成、そして LolB への受け渡しの機能を有する多機能蛋白質である。本研究では、LolA の機能を詳しく解析するために部位特異的変異株を取得し、解析した。

変異 LolA の取得

グラム陰性細菌には広く LolA ホモログが存在している。LolA ホモログ間で保存されたアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換するために、プラスミド上のアラビノースプロモーター支配下の *lolA* 遺伝子に部位特異的変異を導入した。なお、変異体の精製を容易にするために LolA の C 末端にはヒスチジンタグが付加されるように工夫し、それが LolA の機能には影響を与えないことを確認した。このプラスミドを用いて、染色体上の野生型 *lolA* 遺伝子がラクトースプロモーターに制御された大腸菌を形質転換した。この株では変異 LolA 蛋白質がアラビノースに、野生型 LolA が IPTG[isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside]に依存して発現した。LolA の機能が欠損した変異株を得るために、アラビノースのみが存在する条件下で生育できない株を選択した。その結果、LolA の N 末端から 43 番目の Arg が Leu に置換された変異体 LolA (R43L)を取得した。また、dominant-negative を示す変異株を得るためにアラビノースと IPTG が共存する条件下で変異 LolA とともに野生型 LolA を発現させても生育できない株を選択した。その結果、47 番目の Phe が Glu に置換された変異体 LolA (F47E)を取得した。LolA (R43L)、LolA (F47E)および野生型 LolA は過剰発現させた大腸菌のペリプラズム画分から金属アフィニティークロマトグラフィによって精製し、生化学的解析に使用した。

LolA (R43L)の解析

野生型 LolA を発現させた大腸菌では、外膜リポ蛋白質である Lpp と Pal はペリプラズム画分にはみられないが、LolA (R43L)を発現させた大腸菌のペリプラズム画分には Lpp と Pal の蓄積がみ

られた。このことから LolA (R43L) はリポ蛋白質の遊離機能は正常であるが、LolB へ受け渡す反応に欠陥がある変異体であることが推測された。このことを証明するため、まず LolA (R43L) のスフェロプラストからの Lpp を遊離する機能を調べた。その結果、LolA (R43L) は Lpp を遊離する機能を正常に示し、かつ Lpp と水溶性複合体を形成した。次に LolA (R43L) /Lpp 複合体に外膜画分を加えてリポ蛋白質を LolB へ受け渡す反応を調べた。野生型 LolA 存在下で遊離したほとんどの Lpp は、LolB に依存して外膜に組み込まれたが、LolA (R43L) 存在下で遊離した Lpp は外膜に組み込まれなかった。以上の結果から、LolA (R43L) はリポ蛋白質を内膜から遊離し水溶性複合体を形成する機能は正常であるが、LolB へ受け渡す機能が欠損している変異体であることが明らかとなった。

LolA (F47E) の解析

LolA (F47E) の機能を解析するため、スフェロプラストを用いて Lpp, または Pal を遊離する機能を調べた。その結果、LolA (F47E) は Lpp を全く遊離せず、Pal を遊離する反応も野生型 LolA に比べて低下していた。しかし遊離された Pal は LolA (F47E) と水溶性複合体を形成していた。そこで、LolA (F47E) /Pal 複合体を用いて Pal を LolB へ受け渡す反応を調べた。その結果、LolA (F47E) による Pal の LolB に依存した外膜への組み込みは正常であった。以上の結果から、LolA (F47E) はリポ蛋白質と水溶性複合体を形成する機能、および LolB への受け渡しの機能は正常であるが、リポ蛋白質を内膜から遊離する機能に欠陥をもつ変異体であることが明らかとなった。

LolA (F47E) のリポ蛋白質を遊離する機能が異常になった理由を明らかにするため、再構成実験系を用いて解析した。まず、ATP 存在下で LolCDE を大腸菌リン脂質に組み込んだプロテオリポソームを調製した。このプロテオリポソームに野生型 LolA または LolA (F47E) を加えて反応させた後、遠心してプロテオリポソーム画分(沈殿)と上清画分に分離した。その結果、野生型 LolA はプロテオリポソーム画分には回収されなかったが、LolA (F47E) は LolCDE に結合してプロテオリポソーム画分に回収された。野生型 LolA は AMP-PNP などのヌクレオチドに依存してプロテオリポソーム画分に回収された。一方、LolA (F47E) はヌクレオチドがなくても LolCDE に結合してプロテオ

リポソーム画分に回収された。このことから、LolA (F47E) は LolCDE と強く結合して解離できにくいためにリポ蛋白質を遊離する機能に異常を示すことが示唆された。また、LolCDE と強く結合した LolA (F47E) は野生型 LolA と LolCDE の結合を妨げると考えられ、これは *in vivo* において dominant-negative を示した結果とも一致する。

三次構造からみた R43 と F47 の位置

最近共同研究により LolA の結晶化に成功し、LolA の三次構造が明らかになった。LolA は片方が開いた筒状の β シート構造を全体的にとっており、内面が疎水性、外側が親水性を示している (図 2)。R43 と F47 はそれぞれ 2 番目と 3 番目の β シートの末端にそれぞれ位置しており、LolA の構造の中でも内側のほぼ中心部位に存在している。R43 と F47 は近い部位に存在しているが、リポ蛋白質の遊離と LolB への受け渡しというそれぞれ異なる機能において重要な部位であることは非常に興味深い。

LolA-LolCDE 間の結合と解離

ATP 存在下で LolCDE を組み込んだプロテオリポソームに野生型 LolA を加えても LolCDE への結合はみられなかった。一方、ADP, AMP, または加水分解されない ATP アナログである AMP-PNP を加えて再構成実験を行ったところ、リポ蛋白質の有無にかかわらず、野生型 LolA は LolCDE と結合した。以上の結果から、LolA はヌクレオチドを結合した LolCDE と相互作用し、LolCDE が ATP を加水分解すると LolA/リポ蛋白質複合体を形成して LolCDE から解離するというモデルが提唱された。

