

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 12 年度博士課程 入学

氏名 原 崇

指導教官 徳田 元

### 論文題目

大腸菌リポ蛋白質の局在場所を決定する選別シグナルの解析

大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌の細胞は、外膜、ペリプラズム空間、内膜および、細胞質の4つのコンパートメントから形成されている。外膜と内膜にはリポ蛋白質と呼ばれる N 末端の Cys 残基が脂質修飾を受けた蛋白質が存在しており、脂質部分を介して膜と結合している。リポ蛋白質は約 90 種類あまり存在し、形態維持、薬剤排出、蛋白質分泌、細胞分裂、ペプチドグリカンの合成と分解など様々な細胞機能にたずさわっている。リポ蛋白質はシグナルペプチドをもつ前駆体として細胞質で合成され、内膜を通過する過程でシグナルペプチドの切断と、脂質修飾を受け成熟体リポ蛋白質となる。その後、N 末端の Cys 残基の次のアミノ酸残基 (+2 位) が Asp であるリポ蛋白質は内膜に、それ以外のアミノ酸残基をもつリポ蛋白質は外膜に局在化する。つまり、リポ蛋白質の+2 位のアミノ酸残基は局在場所を決定づける『選別シグナル』として働いている。当研究室ではこのリポ蛋白質の選択的な膜局在化に関与する 5 つの Lol 蛋白質を見だし、その機能解析を通して次のようなモデルを提唱している(図 1)。外膜リポ蛋白質は内膜の ABC トランスポーター LolCDE の作用でペリプラズムのシャペロン蛋白質 LolA と 1:1 の水溶性複合体を形成することにより内膜から遊離し、外膜受容体 LolB の働きで外膜に組み込まれる。これに対し、+2 位に Asp を持つ内膜リポ蛋白質は LolCDE の基質とならないため、LolA と複合体を形成できずに内膜に留まる。すなわち、+2 位の Asp は

Lol 回避シグナルとして働く。これらの Lol 蛋白質は生育に必須であるだけでなく、グラム陰性細菌で広く保存されていることから、Lol システムによるリポ蛋白質の選別と輸送はグラム陰性細菌に普遍的に存在する細胞機能であると考えられる。この Lol システムの発見によりリポ蛋白質の局在化機構の概要は示されたが、詳細な機構の解明はこれからの課題である<sup>1)</sup>。それらの中でリポ蛋白質のわずか1アミノ酸残基の違いで局在場所が決定される選別機構は興味もたれる。本研究では+2位のアミノ酸残基のどのような構造や性質が選別に重要なのかを明らかにするために、外膜リポ蛋白質の選別シグナルを様々な修飾試薬を用いて改変し、この改変されたリポ蛋白質が LolCDE によってどのように選別されるのかについて解析した。さらに、+2位のアミノ酸残基と膜のリン脂質の関係についても解析を行った。

### 選別シグナルの化学修飾

リポ蛋白質の選別シグナルの構造を改変するため、外膜リポ蛋白質 Pal の+2位の Ser を Cys に置換した Pal(S2C)に Cys 特異的修飾試薬を用いて種々の分子(X)を付加した Pal(S2C)-X を作成した。この Pal(S2C)-X を LolCDE がどのように選別するのかを調べるため、精製 LolCDE、リン脂質および Pal(S2C)-X からプロテオリポソームを調製し、LolA 存在下でリポ蛋白質が遊離されるかどうかを調べた。

外膜に局在化することが確認された Pal(S2C)に内膜局在化シグナルとして機能する Asp に特徴的な負電荷を導入することにより遊離が阻害されるのではないかと考え、ヨード酢酸をはじめとするいくつかの負電荷を持つ分子を付加した Pal(S2C)-(-)を作成した。しかし、いずれの場合も効率よく膜から遊離したことから、負電荷そのものが内膜局在化シグナルとして機能しているのではないことが明らかとなった。このことは+2位の Glu が内膜局在化シグナルにはならないことから支持される。

次に Asp を除く 19 アミノ酸残基が積極的に認識されているのであれば、+2位に大きな分子を導入することにより立体的障害が生じ認識が阻害されると考えられた。そこで、分子量約 500 である iodoacetyl biotin を付加した Pal(S2C)-Bio を調製し遊離実験を行った結果、意外なことに阻害は全く見られなかった。このことは+2位のアミノ酸残基の側鎖は外膜局在化シグナルとして積極的に認識されていないことを示唆している。

上記の化学修飾試薬以外にも複数の修飾試薬を用いて再構成遊離実験を行ったが、外膜局在化シグナルを内膜局在化シグナルに改変できたものはなかった。それは Cys 側鎖に修飾試薬を付加すると内膜局在化シグナルとして働く Asp

の側鎖の長さより長くなってしまふからではないかと考えた。そこで、Pal(S2C)の側鎖を過ギ酸で酸化させることにより、+2位の側鎖の長さと同様の末端の負電荷が Asp に類似した構造(C-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)を持つ Pal(S2C) OX を作成した。これを基質に再構成遊離実験を行った結果、Pal を酸化させた Pal OX は膜から遊離したものの Pal(S2C) OX は遊離しなかった。これら一連の結果から、+2位に Asp に類似した構造が存在するときのみ内膜局在化シグナルとして機能し、それ以外はたとえアミノ酸の構造でなくても外膜局在化シグナルとして機能することが明らかとなった (図 2)。

### 内膜局在化シグナルから外膜局在化シグナルへの改変

+2位の Asp の構造が内膜局在化シグナルとして機能しているのであれば、逆に Asp の側鎖を化学修飾することにより、内膜局在化シグナルを外膜局在化シグナルへ改変できるのではないかと考えた。そこで+2位のみ Asp をもつ人工リポ蛋白質 SCLP(DQ)と Asp を全く含まない SCLP(S)を作成した。これらはリポ蛋白質特異的シグナルペプチダーゼの阻害剤であるグロボマイシンによりシグナルペプチドの切断が阻害され、また+2位の選別シグナルに依存してそれぞれ内膜と外膜に局在化したことからリポ蛋白質であることが確認された。再構成遊離実験において、SCLP(DQ)は LolA と LolCDE 存在下でも遊離しなかったが、SCLP(DQ)の+2位の Asp にカルボキシル基特異的架橋剤 EDC を介して biotin を付加させた SCLP(DQ)-EDC-Bio では遊離が確認された。このことから、Asp の構造と性質は LolCDE からの認識を回避するために必要な機能を有することが明らかとなった (図 2)。

### 選別シグナルはリン脂質中もしくはリン脂質との境界に位置する

外膜局在化シグナルを持つ Pal と+2位、+3位、+4位にそれぞれ Cys を持つ Pal derivatives を大腸菌リン脂質で作ったリポソーム上に組み込み、膜非透過性である Cys 修飾試薬を用いて修飾効率を比べた結果、+2位に Cys が存在したときに修飾の阻害が見られた。この結果から選別シグナル(+2位)がリン脂質に埋まっていることが示唆され、+2位のアミノ酸残基とリン脂質の相互作用がリポ蛋白質の選別に関与している可能性が考えられた。

### 大腸菌リン脂質ホスファチジルエタノールアミンの修飾

大腸菌リン脂質(PL)の 75%を占めるホスファチジルエタノールアミン(PE)はリン酸基の負電荷とアミノ基の正電荷を持つ。このアミノ基の正電荷と内膜局在化シグナルの負電荷が相互作用し、内膜リポ蛋白質の N 末端構造を LolCDE

が認識できないような特異的構造に変えているのではないかと考えた。そこで、アミノ基特異的修飾試薬 SNA を用いて PE の正電荷を取り除いた SNA-PL を作成した。この SNA-PL を用いて再構成遊離実験を行った結果、外膜リポ蛋白質の遊離効率はほとんど変化しないものの、内膜リポ蛋白質の遊離効率が大きく上昇した。SNA-PL が LolCDE に与える影響は除外できないが、この結果は Asp と PE との静電的相互作用がリポ蛋白質の選別に関わっている可能性を示唆した。

### まとめ

本研究により、+2 位に Asp に類似した構造をもつリポ蛋白質のみが LolCDE による認識を特異的に回避することが明らかとなった。また、Asp とリン脂質との静電的相互作用により内膜リポ蛋白質の N 末端構造を立体的に変化させ、LolCDE からの認識を回避している可能性が示唆された。Asp と同じ負電荷をもつ Glu や負電荷を導入したアミノ酸残基が内膜局在化シグナルとして機能しないのは、その側鎖が Asp より長い分だけ構造に柔軟性を与えられ、Asp 特異的に作られる N 末端構造とは異なるためではないかと考えられる。

1) Fukuda, A., Matsuyama, S., Hara, T., Nakayama, J., Nagasawa, H., Tokuda, H. Aminoacylation of the N-terminal cysteine is essential for Lol-dependent release of lipoproteins from membranes but does not depend on lipoprotein sorting signals (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 43512-43518

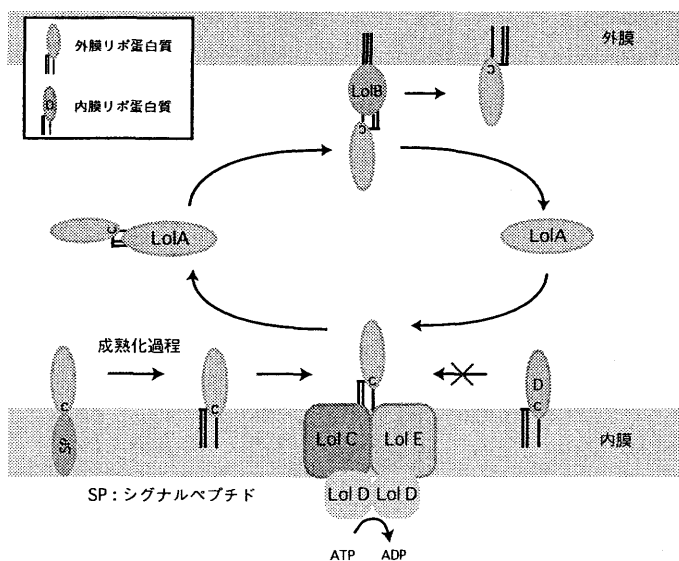


図1 Lolシステムによるリポ蛋白質の膜局在化機構

	+2 位の構造	リポ蛋白質の遊離
Cys	C-CH <sub>2</sub> -SH	+
Asp	C-CH <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>	-
Glu	C-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>	+
外膜局在化シグナルの修飾		
Cys+IAA	C-CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>	+
Cys(Oxidized)	C-CH <sub>2</sub> -SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-
Cys+Iodo	C-CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>2</sub> -C(=O)-NH-(( ))-BIOTIN	+
内膜局在化シグナルの修飾		
Asp+EDC +Biotin Amine	C-CH <sub>2</sub> -C(=O)-NH-CH <sub>2</sub> -(( ))-BIOTIN	+

図2 +2位のアミノ酸化学修飾による膜からの遊離反応への影響