

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成14年度 博士課程入学
氏名 伊東 靖子
指導教員名 徳田 元

論文題目

大腸菌リポ蛋白質の選別輸送を担う ABC トランスポーターの反応機構

細菌の細胞表層には、N 末端の Cys が脂質で修飾されたりポ蛋白質が数多く存在しており、形態維持、物質輸送、薬剤排出などの重要な細胞機能を担っている。大腸菌細胞表層は、外膜と内膜およびそれら2つの膜構造に挟まれた親水性のペリプラズム空間から成っており、約 90 種類あるリポ蛋白質の大部分は外膜に局在し、一部が内膜にとどまっている。リポ蛋白質が内膜にとどまるか、外膜に輸送されるかは、N 末端 (+1 位) Cys の次 (+2 位) のアミノ酸が Asp であるかどうかにより決定されている (+2 位ルール)。

ABC トランスポーター (LolCDE) は、内膜上で成熟体となった外膜リポ蛋白質を、内膜リポ蛋白質と区別して選択的に膜から遊離させる重要な役割を担っており、膜サブユニット (LolC、LolE) および ATPase サブユニット (LolD) が、C : D : E = 1 : 2 : 1 から成る複合体を内膜上で形成している。LolCDE による ATP 加水分解エネルギーを利用して内膜から遊離した外膜リポ蛋白質は、ペリプラズム蛋白質 LolA と 1 : 1 の水溶性複合体を形成してペリプラズム空間を通過し、外膜に存在する受容体蛋白質 LolB を介して外膜に組み込まれる。

本研究では、LolCDE によるリポ蛋白質選別輸送の反応機構を分子レベルで解明することを目的として、研究を行った。

外膜リポ蛋白質を特異的に結合した LolCD_HE の精製および ATP の影響

His タグを LolD の C 末端側につないだ LolCD_HE を過剰発現させた大腸菌から膜画分を調製し、1%ドデシルマルトシド (DDM) 存在下、±ATP 条件下で可溶化して、His タグアフィニティーカラムで精製した。-ATP 条件下で精製した LolCD_HE には、CD_HE のバンド以外に複数のマイナーバンドが確認されたのに対して、+ATP 条件下では、これらのバンドは確認されなかった。そこで、-ATP 条件下で観察されたマイナーバンドを同定するために、抗外膜リポ蛋白質抗体を用いたイムノブロットングを行った結果、-ATP 条件の LolCD_HE 精製標品ではリポ蛋白質が検出されたのに対して、+ATP 条件の LolCD_HE 精製標品では検出されなかった (図 1)。一方で、抗内膜リポ蛋白質、抗外膜蛋白質あるいは抗内膜蛋白質抗体を用いたイムノブロットングを行った結果、±ATP いずれの条件で精製した LolCD_HE 標品においても、これらの蛋白質は観察できなかった。さらに、LolCD_HE の発現誘導を行わなかった大腸菌より調製した膜画分を同様の方法で精製したところ、±ATP いずれの条件でも、外膜リポ蛋白質はカラムに吸着しなかった。このことは、-ATP 条件で LolCD_HE と共精製された外膜リポ蛋白質は、カラムへの非特異的な吸着によるのではなく、LolCD_HE を介してカラムに結合していたことを示している。以上の結果は、-ATP 条件下で精製した LolCD_HE は、基質である外膜リポ蛋白質を特異的に結合した複合体 (基質結合型 LolCD_HE) であることを示している。

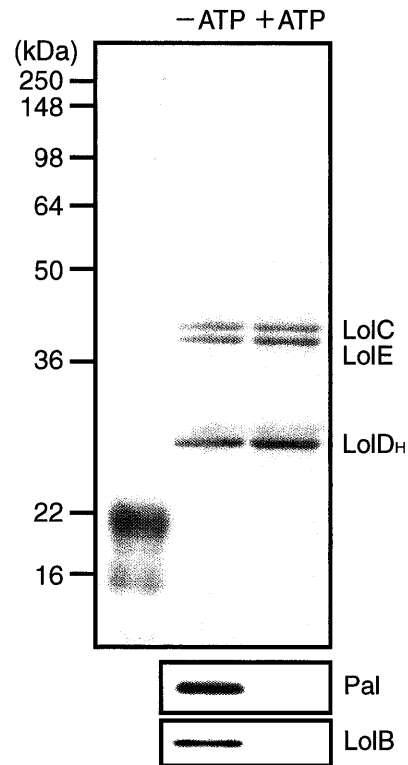


図1 LolCD_HE精製におけるATPの影響 (Pal、LolBは外膜リポ蛋白質)

基質結合型 LolCD_HE は基質遊離反応の機能的な複合体である

LolCD_HE によるリポ蛋白質遊離反応には LolA および ATP 加水分解が必須である。そこで、単離した基質結合型 LolCD_HE が、結合した基質を膜から遊離させる機能を持つかどうかを調べるために、基質結合型 LolCD_HE と大腸菌リン脂質からプロテオリポソームを再構成し、LolA および ATP 加水分解に依存した基質遊離反応を解析した。その結果、LolCD_HE に結合した基質は、LolA および ATP 加水分解に依存してプロテオリポソームから遊離した。このこと

は、基質結合型 LolCD_HE が機能的な複合体であることを示している。

基質結合型 LolCD_HE は基質遊離反応の中間体である

LolCD_HE を過剰発現させた大腸菌の膜を外膜と内膜に分画すると、外膜リポ蛋白質の大部分は外膜に存在した。そこで、基質結合型 LolCD_HE に含まれる外膜リポ蛋白質が、実験途上で LolCD_HE に持ち込まれた人為的産物なのか、遊離反応の中間体として内膜上で形成されたものなのかを調べた。LolCD_HE を過剰発現させた Pal および NlpC (外膜リポ蛋白質の一種) 欠損大腸菌より膜画分を調製し、ここに野生型大腸菌より調製した外膜画分を加えて、LolCD_HE の可溶化・精製を行ったところ、-ATP 条件で精製された LolCD_HE には、Pal および NlpC が結合していなかった。一方で、ここで用いた大腸菌株 (Δpal 、 $\Delta nlpC$) でも、他の外膜リポ蛋白質については、野生型大腸菌と同様に LolCD_HE との結合が観察された。以上の結果は、基質結合型 LolCD_HE は、内膜上で形成された遊離反応の中間体が可溶化・精製されたものであることを示している。

ATP と LolCD_HE との結合が、基質と LolCD_HE 間の疎水的結合を緩める

先に触れたように、LolCD_HE によるリポ蛋白質遊離反応には LolA および ATP 加水分解が必須であるが、LolCD_HE の可溶化・精製においては、膜の可溶化の際に ATP を加えるだけでフリーの LolCD_HE が精製できる。(本実験で調製した膜画分には、ペリプラズム蛋白質 LolA は含まれない。) そこで、単離した基質結合型 LolCD_HE に ATP および DDM を作用させてそれらの効果を調べた。その結果、ATP 存在下では、DDM の濃度に依存して基質の解離が確認されたが、ATP 非存在下では、DDM 濃度に依存した基質の解離は確認されなかった。このことは、基質と LolCD_HE は、疎水的な結合を介して複合体を形成していること、および ATP が基質と LolCD_HE との親和性を低下させることを示している。また、ATP アナログ基質や ATPase 阻害剤等を用いて、ATP 加水分解反応が起こらない条件下で同様の実験を行ったところ、LolCD_HE に結合した基質を外すためには、LolCD_HE による ATP の結合のみで十分であった。本結果は、ATP が加水分解されなくても、ATP の結合エネルギーによって、LolCD_HE とリポ蛋白質の相互作用が低下することを示している。

Walker モチーフ変異体 LolCD_H(K48M)E および LolCD_H(E171Q)E の解析

全ての ABC 蛋白質において、ATP の結合、加水分解に重要な Walker モチーフが保存されている。これまでに、Walker モチーフ A の Lys を Met に置換した変異体は ATP 結合能を失うこと、また、Walker モチーフ B の Glu を Gln に置換した変異体は ATP 結合能は正常であるが ATP 加水分解能が損なわれて

いることが報告されていた。そこで、LolCDE の機能と ATP の関係を明らかにするために、2つの Walker モチーフ変異体 LolCD_H(K48M)E と LolCD_H(E171Q)E を構築し、ATPase サブユニット LolD における ATP 結合・加水分解の各反応が、膜サブユニット LolC および LolE の基質結合部位を介した基質結合・遊離の各反応とどのように共役しているのかを解析した。

どちらの変異体も、LolCD_HE 複合体形成能は野生型と同様に正常であったが、ATPase 活性およびリポ蛋白質遊離活性を完全に失っていた。一方で、ATP を結合できない LolCD_H(K48M)E は ATP 存在下でも基質との複合体として精製されたことから、LolCDE は ATP と結合する前に基質と結合することが明らかとなった。これに対して、ATP 加水分解はできないが ATP を結合できる LolCD_H(E171Q)E は、ATP 存在下では野生型と同様にフリーの LolCDE として精製された。このことは、ATPase サブユニット LolD による ATP の結合が、何らかのシグナルとして膜サブユニット LolC および LolE に伝達され、基質との相互作用を緩めるのに必要なエネルギーを供給していることを示している。

まとめ

本実験では、外膜リポ蛋白質を特異的に結合した LolCD_HE 複合体を基質遊離反応の機能的中間体として単離精製することに成功した。これは、数ある ABC 蛋白質の中で初めての例である。また、LolCDE は ATP との結合よりも先に基質と結合すること (図 2-(i))、LolD による ATP の結合が、基質と膜サブユニット LolC および LolE との相互作用を弱めること (図 2-(ii))、LolCDE の触媒サイクルを廻すためには、LolA へのリポ蛋白質の受け渡しと LolD による ATP 加水分解が要求されること (図 2-(iii)) が明らかとなった。本実験を通して考案された触媒モデルは、広く ABC 蛋白質の触媒機構を考える上で、重要な知見を与えると考えている。

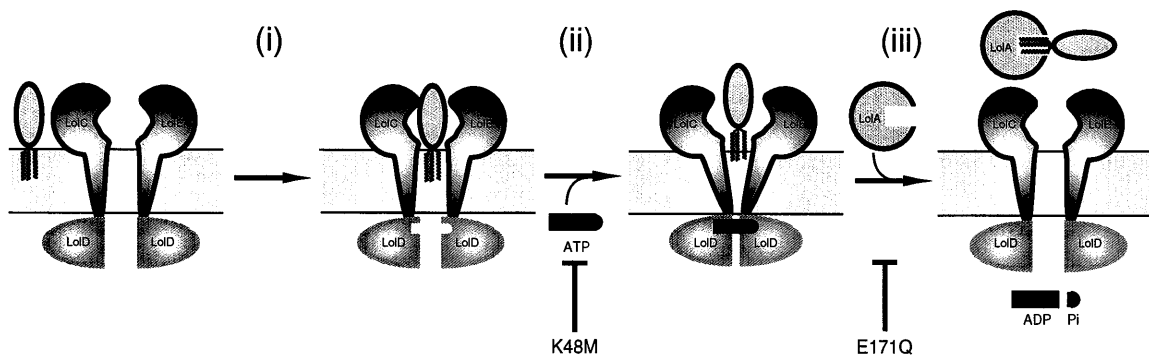


図2 LolCDEによるリポ蛋白質遊離反応の触媒機構