

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 渡辺 祥司
指導教員名 徳田 元

論文題目 大腸菌リポ蛋白質特異的分子シャペロン LolA の結晶構造に基づいた機能解析

1. 序論

グラム陰性細菌である大腸菌は、外膜、ペリプラズム、内膜、および細胞質の4つの区画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で修飾されたリポ蛋白質が約 90 種類存在しており、細胞の形態維持、細胞分裂、物質輸送、薬剤排出など多くの重要な細胞生理機能を担っている。

リポ蛋白質は、内膜に存在する LolCDE 複合体、ペリプラズムに存在するリポ蛋白質特異的分子シャペロン LolA、および外膜に存在するリポ蛋白質受容体 LolB が触媒する一連の反応によって外膜に局在する。これら全ての Lol 因子は大腸菌の生育に必須である。

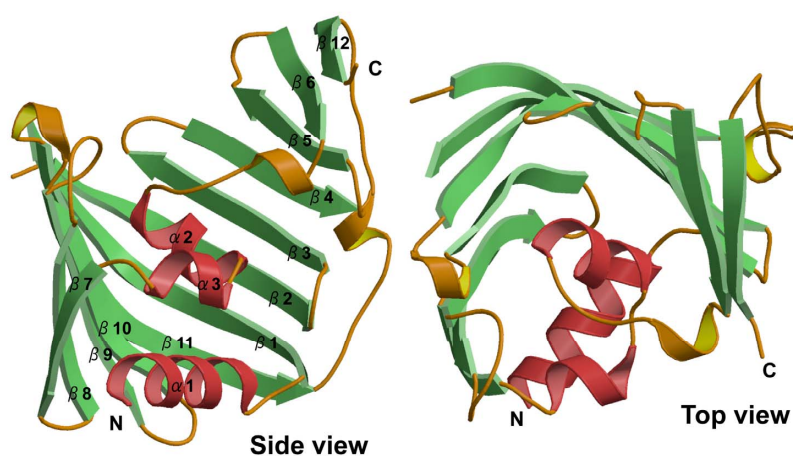


図1; LolAの構造

外膜局在化シグナルを持つリポ蛋白質は LolCDE 複合体に認識され、ATP の加水分解エネルギーを利用し LolA と 1:1 の水溶性複合体を形成して内膜から遊離する。複合体としてペリプラズム空間を横断したリポ蛋白質は、LolB へ受け渡され、外膜に組み込まれる。一方、内膜局在化シグナ

ルを持つリポ蛋白質は LolCDE 複合体の認識を回避するため、内膜に局在する。

LolA と LolB は一次構造の相同性は低いにもかかわらず、立体構造は良く似ており LolAB フォールドと呼ばれている。LolA は 11 本の逆平行 シート、1 本の平行 シート、および 3 本のヘリックスにより構成されており、片方が開いたハーフバレル構造にヘリックスの蓋がついている構造をしている(図1)。これまでの解析から LolA の機能には、1- 2 間のループに存在する Arg43 と 1 に存在する Leu10、1- 1 間に存在する Val13、および 2 に存在する Ile93 と Ala94 の間で形成される水素結合が重要であると推測されている。Arg43 を Leu に置換した変異 LolA は、リポ蛋白質を結合して複合体を形成することはできるが LolB にリポ蛋白質を受け渡すことができない。このことから、Arg43 と 4 残基間で形成される水素結合は、LolCDE 複合体の ATP 加水分解エネルギーにより切断され、ヘリックスが開くことによりリポ蛋白質が結合すると予測されている。また、Ile93 と疎水的キャビティーを形成している 10 に存在する Phe140 との疎水的相互作用はリポ蛋白質の結合に重要であると推測されている(図2)。

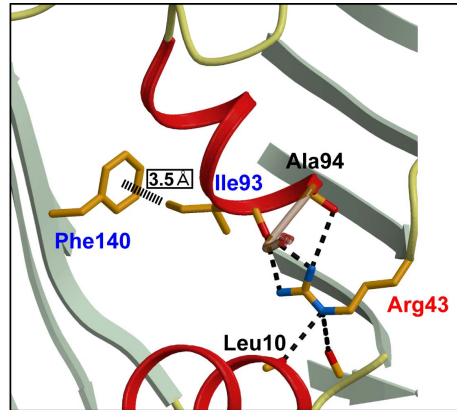


図2; 機能に重要であると推測されている残基間の相互作用

2. 結晶構造に基づいた網羅的な変異体の構築

LolA の結晶構造から特に重要であると推測された 15 残基に部位特異的な変異を導入した。その結果、12 残基について合計 23 種の機能を失った変異 LolA を取得した。これらの内、3 残基について得られた 5 種類の変異体は、野生型 LolA の機能を阻害する優性欠損変異体であった。

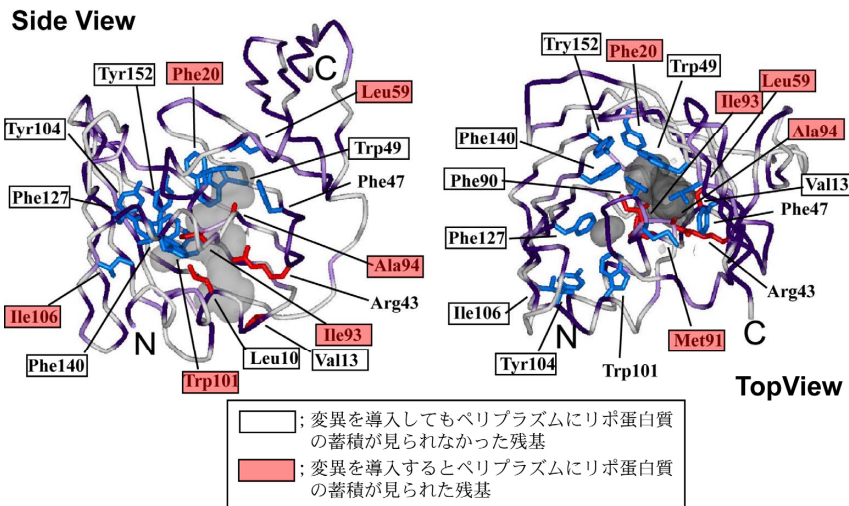


図3; 変異を導入した残基

変異体を過剰発現させた大腸菌からペリプラズムを調製して外膜リポ蛋白質 Lpp または Pal の抗体でウェスタンブロッティングを行った。通常、野生型の大腸菌において、リポ蛋白質はペリプラズムからは検出されない。しかし、蓋の役割をしているヘリックスを構成する 4 残基 7 種類の変異

体、および疎水的キャビティーを形成している 2 残基 4 種類の変異体において Lpp および Pal が検出された。これらの変異体はリポ蛋白質との相互作用が強くなったか、LolB と相互作用できな

くなった変異体であると考えられる。一方で、ペリプラズムに Lpp および Pal が検出されなかった 8 残基 12 種類の変異体は、リポ蛋白質と結合ができなくなったか、LolCDE 複合体と相互作用ができなくなった変異体であると考えられる (図 3)。

3. 優性欠損変異体 LolA(I93G)の機能解析

網羅的に構築した変異体のうち、Ile93 は親水的な Asp (I93N)や Glu (I93E)に置換すると機能を失い、LolA として単独で発現すると大腸菌は生育できない。一方で、側鎖の小さい Gly (I93G)に置換すると、生育を支持しないだけでなく優性欠損変異体となった。また、I93N または I93E を過剰発現させた大腸菌のペリプラズムにはリポ蛋白質は蓄積しないのに対して、I93G を過剰発現させた大腸菌のペリプラズムにはリポ蛋白質が蓄積していた。現在までに、ペリプラズムにリポ蛋白質を蓄積する優性欠損変異体は取得されておらず、*in vitro* における詳細な機能解析を行った。

精製した Ile93 変異体を用いてスフェロプラストからのリポ蛋白質遊離実験を行った。その結果、I93N および I93E はリポ蛋白質の遊離機能を失っていた。このことから、Ile93 と Phe140 との疎水的相互作用 (図 2) はリポ蛋白質との結合に重要であると考えられる。一方で、I93G は野生型 LolA より約 1.5 倍強い遊離活性を有していたが、リポ蛋白質を外膜へ組み込む活性は野生型の約 25%であった。

I93G が野生型より強い遊離活性を有していることに着目し、リポ蛋白質の遊離競合実験を行った。一定量の野生型 LolA-FLAG に対して、野生型 LolA-His または I93G-His の量を変化させて加えた LolA 溶液を用いて、スフェロプラストからリポ蛋白質を遊離させた。その後、FLAG 抗体カラムまたは His タグカラムを用いて LolA と複合体を形成しているリポ蛋白質の量を調べた。その結果、野生型 LolA-His の添加量に依存して LolA-His と複合体を形成するリポ蛋白質の量が増加した。最終的に等量の野生型 LolA-His を加えたとき、結合しているリポ蛋白質の比率は 1:1 となった。それに対して I93G-His を混合させたとき、野生型 LolA-FLAG と I93G-His の量比が 2:1 以上になると、遊離したリポ蛋白質の全てが I93G-His と複合体を形成していた。すなわち、この結果は I93G が野生型 LolA より優先的にリポ蛋白質と結合することを示している。

Gly は、ヘリックスを破壊する残基の一つである。I93G は 2 ヘリックスが Gly により破壊され、内部の疎水的キャビティーが露出している構造をしていると考えられる。その結果、野生型 LolA よりリポ蛋白質との親和性が高くなり LolCDE 複合体により提示されたリポ蛋白質を優先的に結合するようになったと考えられる。また、LolB-リポ蛋白質の親和性より I93G-リポ蛋白質の親和性の方が高くなったので、LolB に受け渡せなくなったと考えられる。その結果、過剰発現させるとペリプラズムに I93G-リポ蛋白質複合体が蓄積し、大腸菌の生育を阻害する優性欠損変異体の表現型を示したと考えられる。

以上の解析結果は、蓋の役割をしている LolA の ヘリックスの開閉がリポ蛋白質との親和性を調節し、LolCDE 複合体からリポ蛋白質の遊離および LolB への受け渡しを効率よく進行させるために重要な役割を担っていることを示唆している。

4. Cys 導入によるリポ蛋白質結合機構の解明

Ile93 変異体の解析により、リポ蛋白質の結合には蓋の開閉が重要であることが明らかとなった。そこで、野生型 LolA には Cys が存在しないことを利用して Ile93 と Phe140 に Cys を導入することにより、基質結合機構の解明を目的として解析を行った。

Ile93 を Cys に置換した I93C および Phe140 を Cys に置換した F140C は、LolA として単独で発現させると野生型の大腸菌と同じ生育を示した。一方で、両方の残基を Cys に置換した I93C/F140C は、生育を支持しないだけでなく優性欠損変異体であった。しかし、I93C/F140C の *in vivo* の表現型は、還元剤の添加により野生型と同じ表現型に回復した。このことから、I93C/F140C は分子内で S-S 結合を形成し、蓋である 2 ヘリックスが開くことができない変異体であると推測された。そこで、精製した I93C/F140C を用いて、LolCDE 複合体および Pal を組み込んだプロテオリポソームから Pal の遊離活性を調べた。その結果、I93C/F140C は野生型 LolA と比較して約 60% の活性しか有していなかった。この結果は、I93C/F140C の酸化型と還元型との混在が原因であると予想した。そこで、酸化剤または還元剤で処理した I93C/F140C を用いて遊離活性を調べた。その結果、還元剤で処理した I93C/F140C は野生型 LolA と同じ活性を示した。一方で、酸化剤で処理したものは野生型 LolA の約 20% しか活性を有していなかった。これらの結果は、リポ蛋白質を結合するためには 2 ヘリックスが開くことが重要であることを裏付けている。更に、スパーサーアームの長さが異なる 3 種の SH 基特異的架橋剤で処理した I93C/F140C の遊離活性を調べたところ、スパーサーアームの長さが短くなればなるほど LolA の遊離活性は低下していった。以上の解析により、リポ蛋白質を結合するためには蓋の役割をしている 2 ヘリックスが少なくとも 16.1 以上開く必要があると考えられる。

5. 総括

結晶構造に基づいた LolA の機能解析により、蓋である 2 ヘリックスの開閉がリポ蛋白質の結合および LolB への受け渡しに重要な役割を果たしていることが本研究で示された。また、Cys 変異体を用いた解析によりリポ蛋白質の結合機構の一端を解明することができた。今後、Cys 変異体の更なる詳細な研究により、リポ蛋白質結合機構の全貌解明および各 Lol 因子間の相互作用部位の特定などの解析に期待が持たれる。