

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成15年度 博士課程入学
氏名 宮本 重彦
指導教員 徳田 元

論文題目

ABC トランスポーターLolCDE によるリポ蛋白質選別機構

大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌の細胞表層は、外膜、ペリプラズム、内膜および細胞質の4つのコンパートメントで形成されている。細菌に広く存在するリポ蛋白質は、N末端のシステイン残基が脂質修飾を受け、その脂質部分で外膜または内膜にアンカーする膜表在性の蛋白質である。大腸菌には約90種類のリポ蛋白質が存在し、形態維持、薬剤排出、細胞分裂、物質輸送など多くの重要な細胞機能を担っている。

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となる。その後のリポ蛋白質の膜局在はN末端のシステイン残基の次のアミノ酸残基(+2位)で決定され、+2位がAspのものは内膜に、Asp以外のものは外膜に局在する(+2位ルール)。外膜局在化シグナルをもつリポ蛋白質はABCトランスポーターLolCDEの働きにより内膜から遊離し、ペリプラズムでリポ蛋白質特異的シャペロンLolAと水溶性複合体を形成する。その後、受容体蛋白質LolBに受け渡され外膜に組み込まれる。一方、+2位がAspであるリポ蛋白質はLolCDEによる認識を回避するため内膜に留まる。リポ蛋白質の内膜残留には+2位のAspの側鎖の負電荷と主鎖との距離が重要であり、Aspの側鎖と膜の構成成分であるホスファチジルエタノールアミン(PE)の正電荷と

の静電的相互作用により形成するリポ蛋白質-PE 複合体が LolCDE の認識を回避すると考えられている (図 1). このように, リポ蛋白質の選別は 1 アミノ酸残基により決定され, その選別にリン脂質が関与している非常に興味深いシステムである

野生型大腸菌のリン脂質は PE (70%), ホスファチジルグリセロール (PG, 25%), そしてカルジオリピン (CL, 5%) から構成される (図 2). このうち PG と CL は分子全体として負電荷を持つ酸性リン脂質であり, また生理的条件下で脂質二重層を形成できるため bilayer lipid と呼ばれる. 一方, PE はリン酸基に正電荷を有するエタノールアミンが結合しており, また, 極性基が小さいコーン型の構造をとるため, 単独では脂質二重層を形成できず non-bilayer lipid と呼ばれる. さらに, CL は 2 価のカチオンが高濃度に存在すると bilayer から non-bilayer に構造変化することが知られている.

本研究では, LolCDE によるリポ蛋白質の選別輸送の反応機構を解明することを目的として, LolCDE とリン脂質との相互作用に着目し解析を行った.

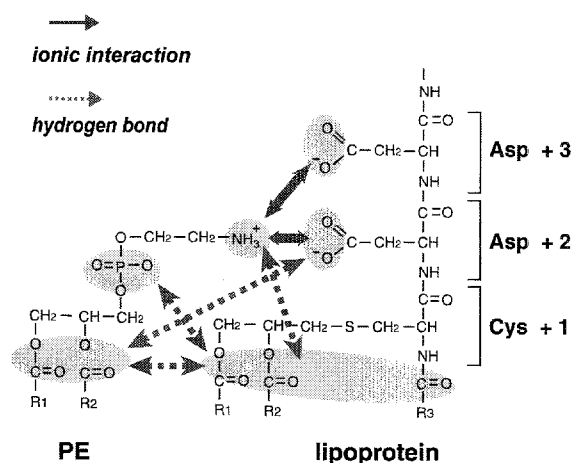


図1 内膜リポ蛋白質とPE の相互作用モデル

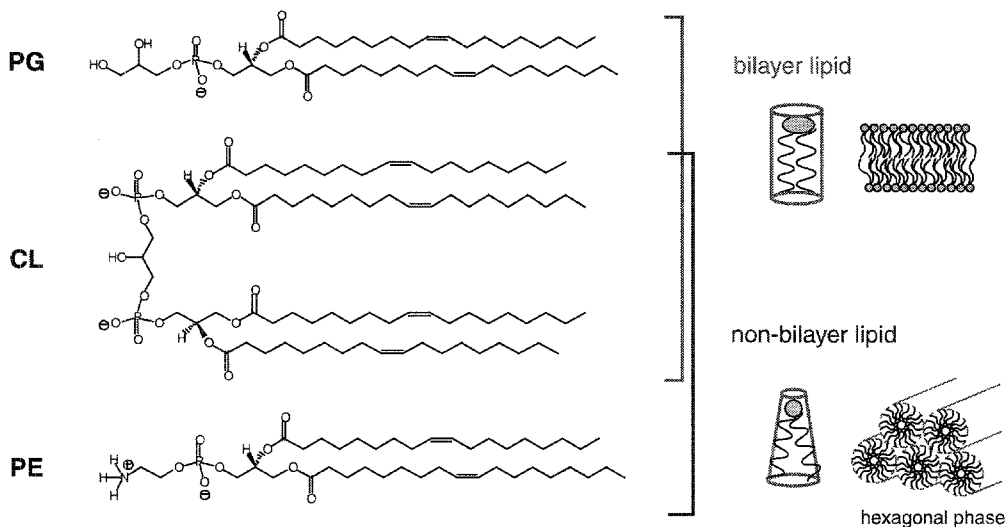


図2 大腸菌リン脂質の構造

CL-プロテオリポソームからのリポ蛋白質の遊離の解析

それぞれ精製した LolCDE, 外膜リポ蛋白質である Pal, もしくは Pal の+2位の Ser を Asp に置換した変異体 Pal(D)を, 大腸菌リン脂質および CL を用いてプロテオリポソームに再構成し, リン脂質と局在化シグナルの関係を調べた. 大腸菌リン脂質を用いた場合, 外膜局在化シ

グナルをもつ Pal のみが LolA 依存的な遊離を示した。一方、正電荷を持たない CL を用いてプロテオリポソームを作製した場合、Pal に加え Pal(D)も遊離を示し、選別シグナルに非依存的な遊離が観察された。特に CL-リポソームからのリポ蛋白質の遊離効率は Mg 濃度の増加に伴い著しく上昇し、10 mM Mg²⁺では Pal(D)は Pal と同程度の遊離を示した。CL は高 Mg 濃度条件下において non-bilayer 構造へと変化するため LolCDE のリポ蛋白質遊離活性は non-bilayer lipid によって促進される可能性が示唆された。

LolCDE の ATPase 活性は基質となるリポ蛋白質の添加により促進されることが知られている。LolCDE を CL-リポソームに再構成した場合、ATPase 活性は Pal のみならず Pal(D)の添加でも促進された。これらの結果は CL-リポソームでは+2 位の Asp は Lol 回避シグナルとして機能せず、LolCDE に正常に認識されることを示している。また、CL-リポソームから遊離した Pal と Pal(D)はいずれも LolA と複合体を形成し、LolB 依存的に膜に挿入されることもこの遊離が Lol システムに依存した機能的な反応であることを示している。

PE は選別シグナル依存のリポ蛋白質の遊離に重要である

CL-リポソームを用いた解析より、LolCDE のリポ蛋白質遊離活性は non-bilayer lipid により促進される可能性が示唆された。そこで、生理的条件下で non-bilayer 構造をとるジアシルグリセロールおよび PE が LolCDE の活性に与える影響について検討した。その結果、大腸菌リン脂質に 5% のジアシルグリセロールを添加したプロテオリポソームでは選別シグナルに依存した遊離を示し、Pal の遊離のみ約 2 倍に増加した。次に、PE が LolCDE のリポ蛋白質遊離活性およびリポ蛋白質の選別に与える影響を検討するため、低 Mg 濃度条件下 CL-リポソーム中の PE 含量をさまざまに変化させ Pal および Pal(D)の遊離実験を行った。その結果、リポソームからの Pal の遊離は PE 含量の増加に伴い用量依存的に増加した。これらの結果から、non-bilayer lipid は LolCDE のリポ蛋白質遊離活性を促進することが明らかとなった。Non-bilayer lipid はアシル基に比べ極性基が小さい構造をとるため、リポソーム中の含量が増加すると膜の水平方向の圧力を変化させることが知られている。Non-bilayer lipid は膜の圧力を変化させ、LolCDE の膜中の構造を最適な状態へと保つことで活性を調節していると推察できる。一方 Pal(D)の遊離は 25% PE では促進されたが、それ以上 PE を増加すると逆に抑制された。これは 25%以上では non-bilayer lipid による促進効果より、PE と +2 位の Asp との相互作用による抑制効果が強く現れたためと考えられる。以上の結果より、PE は極性基の正電荷と内膜リポ蛋白質との相互作用により Lol 回避メカニズムに関与しているだけでなく、non-bilayer lipid としての性質により LolCDE の構造を調節し、活性を維持する役割を担っていると考えられる。

PE 欠損株を用いた解析

PE の生合成前駆体であるホスファチジルセリンの合成酵素, *pssA* 破壊株では PE が完全に欠失するが, 培地中に二価のカチオンを添加することで生育可能である. この PE 欠損株のリン脂質は約 50%ずつの CL と PG から構成される. 再構成遊離実験の結果から, PE 欠損株では内膜リポ蛋白質が誤って外膜に局在している可能性が考えられた. そこで, PE 欠損株の全膜面分をショ糖密度勾配により外膜と内膜に分画しリポ蛋白質の膜局在を調べた. その結果, PE 欠損株においても野生型大腸菌と同様の局在を示し, +2 位に Asp をもつものは内膜に局在していた. この原因として, PE 欠損株では *lolCDE* 遺伝子に変異が起きてリポ蛋白質の選別を制御している可能性や, 野生株と比較して大幅に増加した PG が *LolCDE* の選別機構に影響している可能性などが考えられる.

PG は *LolCDE* の ATPase 活性を抑制する

PG が *LolCDE* によるリポ蛋白質の輸送および選別機構に与える影響について検討する目的で, CL と PG からなるプロテオリポソーム作製し, Pal および Pal(D)の遊離実験を行った. 10 mM Mg 存在下, CL-リポソーム中の PG 含量を増加した場合, PG の増加に伴いリポ蛋白質の遊離が減少した. この遊離の抑制効果は Pal(D)に対してより顕著であり, 50%以上 PG を含むリポソームからの Pal(D)の遊離は観察されなかった. 次に 70%PE, 30%CL を含むリポソームの CL を PG に順次置換し, *LolCDE* の ATPase 活性を測定した. その結果, PG 含量の増加に伴い ATPase 活性は低下し, 25%~30%では大腸菌リン脂質と同程度の活性を示した. これらの結果から, PG は *LolCDE* の ATPase 活性を抑制することでリポ蛋白質の選別機構に寄与していると考えられる. PE 欠損株では, 通常より過剰の PG が *LolCDE* の活性を抑制し, 誤って内膜リポ蛋白質が遊離されるのを妨げていると考えられる.

まとめ

本研究により, *LolCDE* はリン脂質組成の影響を強く受け, リポ蛋白質の選別には PE と PG が重要な役割を果たしていることが示唆された. リン脂質はリポ蛋白質を介した間接的作用と *LolCDE* の ATPase に対する直接作用の両方によりリポ蛋白質選別機構に関与していると考えられる. 膜蛋白質の機能解析ではリン脂質の影響を考慮することは必要不可欠であり, 本研究結果は, *LolCDE* によるリポ蛋白質選別機構の解明のみならず, 多くの膜蛋白質の機能解析を行う上で重要な知見を与えていると考えている.