

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 16 年度博士課程 進学
氏名：溪口 直弘
指導教員：徳田 元

論文題目 ABC トランスポーターLolCDE の反応機構に関する研究

序論

大腸菌を初めとするグラム陰性細菌の細胞表層は、細胞質を包む細胞質膜及び外膜により構成される。外膜に対して細胞質膜を内膜とも呼び、内膜と外膜に挟まれた親水的な領域をペリプラズム空間と呼ぶ。外膜と内膜のペリプラズム側にはリポタンパク質と呼ばれる N 末端のシステイン残基が脂質で修飾されたタンパク質が存在し、脂質部分を膜にアンカーすることで膜表面に存在している。これらは細胞の形態維持、物質輸送、ストレス応答、外膜タンパク質の挿入など細胞表層で多くの重要な機能を担っており、大腸菌ではおよそ 90 種類存在することが知られている。

リポタンパク質はシグナルペプチドを持つ前駆体として細胞質で合成され、Sec 膜透過装置によって内膜を透過する過程でシグナルペプチドの切断、脂質修飾を受けて内膜上で成熟体となる。その後の局在は N 末端のシステイン残基の次のアミノ酸残基 (+2 位) によって決定される。+2 位がアスパラギン酸の場合は内膜に留まり、それ以外の残基を持つものは外膜へと輸送される。この選別と輸送を担うのは Lol システムである。

Lol システムは LolABCDEF の 5 つの因子からなる。内膜の ABC トランスポーターである LolCDE 複合体は、+2 位の局在シグナルに従って内膜上のリポタンパク質を選別し、ATP の加水分解エネルギーを利用してペリプラズムのシャペロンである LolA に受け渡す。LolA との複合体としてペリプラズム空間を横断したリポタンパク質は、外膜の受容体である LolB に受け渡され、外膜に局在する。

これまでの研究で、LolCDE は ATP 非存在下で精製すると基質であるさまざまな外膜リポタンパク質を結合した状態で精製できることが明らかになっている(1)。LolCDE と外膜リポタンパク質 Pal を過剰発現させることにより、1 分子の Pal を結合した LolCDE を精製した。ABC トランスポーターは原核生物、真核生物を問わず広く存在するが、これまでに基質を結合した状態で生体から精製されたものは他に報告されていない。基質結合型 LolCDE は、内膜中で起きるリポタンパク質遊離反応の詳細を解析するのに適していると考えられる。本研究は基質結合型 LolCDE を用いて、リポタンパク質の輸送機構を詳細に解析したものである。

LolCDE-リポタンパク質複合体の界面活性剤感受性

Lol システムは、80 種類程度と予想される外膜リポタンパク質を全て認識し、輸送して

いると考えられている。また、LolCDE が認識するのは、リポタンパク質の共通構造であるジアシルグリセリル基及び N-アシル基で修飾された Cys 残基と考えられている。

LolA は、疎水的なキャビティを持っており、ここにリポタンパク質のアシル基を結合すると予想されている。リポタンパク質を結合していないときには α -ヘリックスが蓋のようにキャビティを塞いでいる。LolB は LolA とよく似た構造をしているが、キャビティは完全には塞がれていない。内膜上のリポタンパク質を LolA に受け渡すためには、LolD による ATP の加水分解エネルギーが必須である。これは LolA のキャビティを覆う蓋を開くために必要であると考えられている。一方、LolA から LolB、及び LolB から外膜へのリポタンパク質の移動には ATP やプロトン勾配などのエネルギーを必要としない。

LolA-リポタンパク質複合体及び LolB-リポタンパク質複合体を界面活性剤 *n*-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM) で処理し、リポタンパク質の解離を観察したところ、LolB-リポタンパク質複合体が解離するためには LolA-リポタンパク質複合体よりも高い DDM 濃度を要求した。従って、LolB の方が LolA よりもリポタンパク質に対する疎水的な親和性が高いと考えられる。このことは、リポタンパク質に対する親和性の差を利用することで、ATP 非依存的なリポタンパク質の受け渡しが行われていることを示している(2)。

LolCDE とリポタンパク質の結合も ATP によって界面活性剤感受性が変化することが報告されている。そこで基質結合型 LolCDE を用いて LolA、LolB の場合と同様に界面活性剤感受性の変化から、リポタンパク質との結合が ATP の結合や加水分解によってどのように影響を受けるかを詳細に調べた。LolA 及び ATP 非存在下では 4% の DDM で処理しても基質である Pal は LolCDE から解離しなかった。一方で ATP を加えて同様の実験を行うと、DDM がおよそ 2% に達した時に LolCDE から Pal が解離した。このことから、LolCDE は主に疎水結合により基質を結合していること、ATP が基質との親和性を弱めることが示唆された。さらに ATP の役割を詳細に調べるために、ATP の非加水分解アナログである AMP-PNP を用いて実験を行った。その結果、Pal は ATP を加えたときと同様約 2% の DDM で解離した。またこのことは ATP を結合できるが加水分解できない LolD 変異体 (E171Q) を持つ LolCDE 複合体を用いても同様の結果が得られた。すなわち、LolCDE とリポタンパク質間の疎水結合の低下は、ATP の加水分解ではなく、ATP の結合によって引き起こされていると考えられる。

基質結合型 LolCDE からの界面活性剤存在下での基質遊離実験

これまでは LolCDE によるリポタンパク質の遊離反応を *in vitro* で観察するには LolCDE とリポタンパク質のリポソームへの再構成が必要であった。しかし LolCDE やリポタンパク質の配向性を制御することができず、リポソームの外側を向いたものと内側を向いたものが混在してしまうなどの問題があった。このため様々な条件検討にも関わらず、再構成した Pal のうち遊離するのは 10% 以下であった。

基質結合型 LolCDE を利用すれば、リポソームに再構成することなく ATP と LolA に依存したシングルターンオーバーの基質遊離反応が DDM 中で見られるのではないかと考えた。そこで ATP を加えても LolCDE からリポタンパク質が解離しない 0.01% DDM 溶液中で、基質結合型 LolCDE に ATP と LolA を加えた。LolD には His タグが付加されているため、His タグアフィニティレジンである TALON レジンをを用いて LolCDE と遊離した基質を分離した。その結果、LolA と ATP に依存して Pal が遊離することが分かった。遊離した Pal は LolA との可溶性複合体であること、この複合体と LolB を反応させると Pal は外膜に組み込まれることも明らかとなった。すなわち、DDM 中で基質結合型 LolCDE を用い

ればリポタンパク質を LolA へ受け渡す反応が観察できることが明らかとなった。

バナジン酸トラップによるリポタンパク質遊離反応の解析

DDM 中での LolA に依存した遊離反応におけるヌクレオチドの影響を調べたところ、AMP-PNP では LolA へのリポタンパク質の受け渡しが起こらなかった。従って、DDM 中での LolA へのリポタンパク質の受け渡しには ATP の加水分解が必須である。

次に、ATP の加水分解によって生じた ADP を結合した状態で停止した LolCDE を、バナジン酸によって作製することを試みた (バナジン酸トラップ)。大腸菌のマルトース輸送性 ABC トランスポーター MalFGK などにおいて、ADP とバナジン酸が結合した状態で停止した中間体が得られている。LolCDE におけるバナジン酸トラップの条件を検討したところ、1mM で最も効率よく ADP がトラップされた。基質結合型 LolCDE に LolA、ATP、バナジン酸を加えて遊離反応を行わせたところ、バナジン酸を加えないときと同程度に Pal の遊離が起こった。さらに LolA 非存在下でバナジン酸トラップを行った後に LolA を加えてもリポタンパク質の遊離が起こった。このことから、LolCDE は ATP を加水分解して ADP とリン酸が結合した状態では既にリポタンパク質を LolA に受け渡していることが明らかにされた。この後の ADP 及びリン酸の解離は、再びリポタンパク質を結合できる構造に戻るステップだと考えられる。この段階で止まっている LolCDE はリポタンパク質を結合できないため、触媒的に働くことができないと考えられる。

サブユニットからの LolCDE 複合体の再構成

これまでに、単独で精製した LolC、LolD、LolE をリポソームに再構成することでリポタンパク質遊離活性を再現することができている。そこでサブユニットからの複合体の形成を界面活性剤存在下で解析した。LolC、LolD、LolE を 0.01% DDM 存在下でインキュベートし、ゲル濾過によって複合体と未会合のサブユニットを分離した。その結果、サブユニットはリン脂質と共にインキュベートすることで複合体を形成し、その反応は温度依存的に促進されることが明らかとなった(3)。LolC、D、E の各サブユニットについて様々な変異体を取得されており、本実験によってサブユニット間の相互作用など詳細な機能解析が可能になった。

さらに、LolD と LolE のみでリポタンパク質遊離活性を持つ複合体が形成されることが明らかになった。LolC と LolD のみでも複合体が形成されたが、活性はなかった。(3)。今後変異体を用いることで LolC と LolE の機能分担などが明らかになることが期待される。

まとめ

本研究は基質結合型 LolCDE を利用して、リポタンパク質遊離反応の詳細な反応機序を界面活性剤存在下で明らかにしたものである。本研究により LolCDE から LolA へのリポタンパク質の受け渡しをシングルターンオーバーで解析する実験系が確立された。この実験系によって、ATP の結合と加水分解がリポタンパク質との結合にどのような影響を与え、LolA にリポタンパク質が受け渡されているかが明らかになった (図 1)。

また、界面活性剤存在下でサブユニットから LolCDE 複合体を再構成する実験系を構築した。これにより複合体に対するリン脂質の重要性が明らかになった。

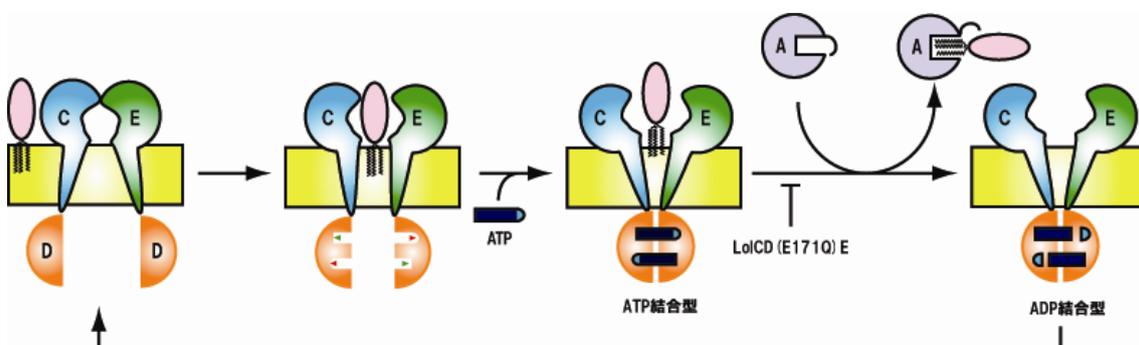


図1 LolCDE によるリポタンパク質遊離反応の触媒機構

(1) Ito Y., Kanamaru K., Taniguchi N., Miyamoto S., Tokuda H. (2006) A novel ligand bound ABC transporter, LolCDE, provides insight into the molecular mechanisms underlying membrane detachment of bacterial lipoproteins. *Mol. Microbiol.*, **62**(4), 1064-1075

(2) Taniguchi N., Matsuyama S., Tokuda H. (2005) Mechanisms underlying energy-independent transfer of lipoproteins from LolA to LolB, which have similar unclosed β -barrel structures. *J. Biol. Chem.*, **280**(41), 34481-34488

(3) Kanamaru K., Taniguchi N., Miyamoto S., Narita S., Tokuda H. (2007) Complete reconstitution of an ATP-binding cassette transporter LolCDE complex from separately isolated subunits. *FEBS J.*, **274**, 3034-3043