

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 17 年度博士課程 進学  
氏名 奥田 傑  
指導教員 徳田 元

## 論文題目

### *In vivo* 光架橋法による Lol 因子間の相互作用解析

#### 1. 序論

グラム陰性細菌である大腸菌は、外膜、ペリプラズム空間、内膜、および細胞質の 4 つのコンパートメント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機能を担っている。

リポ蛋白質は、大腸菌の生育に必須な 5 つの Lol 因子によって正しく局在化する。外膜局在化シグナルを持つリポ蛋白質は内膜上で成熟体となり、内膜に存在する ABC トランスポーター LolCDE 複合体によって認識され、ATP の加水分解エネルギーを利用して LolA と 1 : 1 の水溶性複合体を形成し、内膜から遊離する。LolA との複合体となった外膜リポ蛋白質はペリプラズム空間を横断した後、親和性の差によりエネルギー非依存的に外膜リポ蛋白質受容体 LolB へと受け渡され、LolB の働きにより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 による認識を回避するため、内膜に局在する。

LolA はリポ蛋白質局在化機構の中心に位置し、リポ蛋白質を含めたすべての因子と相互作用すると考えられる。したがって、LolA の詳細な機能解析は、リポ蛋白質局在化機構を分子レベルで理解するために重要と考えられる。そこで本研究では、

- 1) LolA と LolB の結晶構造の比較により、機能に重要であると推測される LolA の C 末端領域の欠失変異体を作製し、その機能解析を行った。

2) Lol 因子間の相互作用を解明するため、LolA に部位特異的に光架橋性の分子を導入し、*in vivo* で各因子との相互作用を解析した。

## 2. LolA の C 末端欠失変異体の機能解析

LolA と LolB は結晶構造解析の結果、互いの一次構造の相同性は低いにも関わらず、立体構造はよく似ており、LolAB フォールドという特徴的な立体構造をとっていることが明らかとなった。共に 11 本の逆平行  $\beta$ -ストランドにより構成されるハーフバレルに、3 本の  $\alpha$ -ヘリクスの蓋がついたような構造をとっており、その内部は疎水的なキャビティを形成している。LolA の C 末端には、LolB には存在しない短いヘリクス( $3_{10}$ )と平行  $\beta$ -ストランド( $\beta_{12}$ )を含むループ領域が存在しており、C 末端領域の構造上の違いが両因子の機能の違いに寄与していると推測される。そこで、本研究では図 1 に示した 12 種類の LolA の C 末端欠失変異体を作製し、それらの機能解析することにより C 末端領域の役割を解明することを試みた。

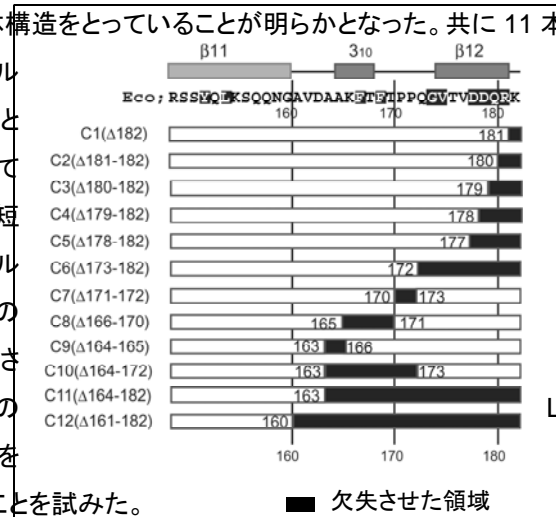


図1 LolA の C 末端欠失変異体

これらの LolA 変異体を単独で発現させた大腸菌の生育を調べたところ、 $\beta_{12}$  を欠失させた変異体(例: C6)を単独で発現させた大腸菌の生育は一時的に低下したのに対し、 $3_{10}$  ヘリクスを欠失させた変異体(例: C8)を単独で発現させた大腸菌は生育することができなかった。また、これらの変異体のリポ蛋白質遊離活性、受け渡し活性は共に低下しており、C 末端領域の重要性が示された。さらに、これらの変異体とリポ蛋白質との複合体は安定性が低下していたことから、LolA の C 末端領域はリポ蛋白質との安定な複合体を形成するために重要な役割を果たしていることが示唆された。特に C8 はリポ蛋白質と安定な複合体を形成できないため、膜のような疎水性物質が存在すると容易にリポ蛋白質を失った。これらの結果は、LolA の C 末端領域の重要性を明らかにするだけでなく、LolA、LolB の共通の構造である疎水的キャビティがリポ蛋白質との結合サイトであることを示唆している。

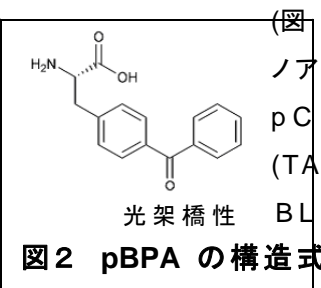
## 3. *In vivo* 光架橋法による Lol 因子間の相互作用解析

Lol システムによるリポ蛋白質の輸送機構は、これまでに変異体の機能解析や結晶構造の解析から進められてきた。その結果、それぞれの因子の作動機構は、かなり詳細に明らかになっている。しかし、リポ蛋白質の受け渡し反応を引き起こす LolCDE と LolA、LolA と LolB 間にどのような相互作用があるかは全く不明である。この理由として、これらの Lol 因子間の相互作用はごく一過的であることが考えられる。Lol 因子間の相互作用解析はリポ蛋白質の輸送機構を理解する上での最重要課題の一つであるが、これらの相互作用を解析するには、新たな実験系の導入が必要である。

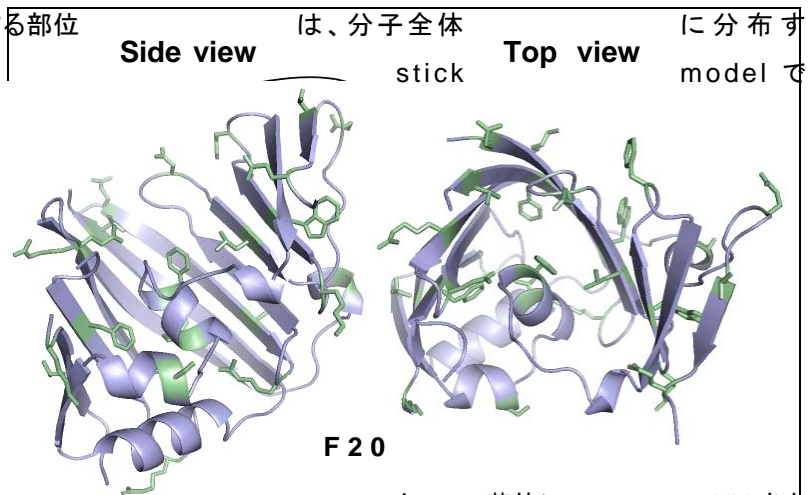
蛋白質の相互作用解析法の一つとして、*in vitro* での光架橋反応がある。しかし、*in vitro* での光架橋反応は、まず光架橋性のアミノ酸を tRNA に結合させ、そのアミノアシル tRNA を用いて翻訳を行い、

その後精製、光架橋、と手間がかかるため網羅的解析には適していない。そこで近年、生体内で光架橋性の人工的なアミノ酸を蛋白質に導入する技術が開発され、*in vivo*での光架橋反応が可能になった。この実験系では細胞内で部位特異的に光架橋性のアミノ酸を導入した蛋白質を発現させ、細胞に特定の波長の光を照射するだけで光架橋反応が起こるため、*in vitro*の実験系と比較すると簡易で、網羅的な解析にも有効な手段と考えられる。また、架橋反応が *in vivo*で行われるため、より生体内での状態を反映した結果が得られることが期待される。そこで本研究では、*in vivo* 光架橋法を用いて LolA を中心とした Lol 因子間の相互作用解析を試みた。

プラスミド pSup-BpaRS-6TRN は、pBPA(p-benzoyl phenylalanine)と結合する amber suppressor tRNA と、pBPA-tRNA を合成するアミノシル tRNA 合成酵素の両方を発現する。プラスミド DF-Duet-LolA-FLAG は、LolA-FLAG の任意の部位を amber codon (TAG) に変えた LolA 変異体を発現させる。これら 2 種のプラスミドを大腸菌 21 に導入した。amber suppressor tRNA が amber codon を認識して pBPA を導入するため、この株では任意の残基に pBPA を導入した LolA 変異体を発現させることが可能である。変異を導入する部位は、分子全体に分布するように選んだ。図 3 で



側鎖を表示した残基が pBPA を導入した位置である。さらにこの株に、LolA との相互作用を解析したい蛋白質 (LolCDE、または可溶性にした LolB 変異体 mLolB-his) を発現させるプラスミドを導入し、LolA 変異体と同時に過剰発現させ



照射することにより、光架橋反応を行なった。また基質であるリポ蛋白質の一つ Pal を過剰発現させる際は、LolA 変異体がコードされた Duet vector から同時に過剰発現させた。光架橋反応を行った菌体を回収し、SDS-PAGE、Western blotting を行い、任意の抗体を用いて光架橋産物を検出した。

架橋実験の結果、図 3 に示した LolA の Side view のハーフバレル上部(丸で囲んだ領域)が LolC と mLolB の両方との相互作用に重要な領域であることが明らかになった。すなわち LolA のこの領域が、LolCDE からのリポ蛋白質の受け取りと LolB へのリポ蛋白質の受け渡しの両方に関わっていると考えられる。LolA が、細胞質に存在する LolD と架橋されないのは予想通りだが、興味深いことに LolC と配列上相同性があり、膜配向性もよく似た LolE とは架橋されなかった。この結果は、これまでに解明されていない LolC と LolE の機能の違いを示していると考えられる。

Pal と架橋した部位は、mLolB-his や LolC と架橋した部位に加えて、LolA のキャビティの内部の

残基(例:  $\beta$  1 の F20、図 3 の矢印)に及んだ。この結果は、LolA はキャビティの内部にリポ蛋白質の一部を包み込むようにして輸送しているという、これまで考えられてきたモデルを支持している。

本研究はこれまで明らかでなかった Lol 因子間の相互作用解析を試みたものである。本研究により、LolA が他の Lol 因子と相互作用する際に重要な領域が明らかになった。現在までに *in vivo* 光架橋法を用いて蛋白質同士の相互作用を解明した報告はほとんど例がない。したがって、この技術を用いて Lol 因子のように一過的な蛋白質同士の相互作用がうまく解析できたことは、他の蛋白質の機能解析にもすぐれた実験手法になると考えられる。近年、グラム陰性細菌の外膜蛋白質の組み込みに関与する複合体が解明され始め、その複雑な複合体の相互作用に注目が集まっている。*in vivo* 光架橋法は、このような複雑な複合体の解析や新たな相互作用因子の探索にも適していると考えられ、今後様々な系に応用されることが予想される。