

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成17年度 博士課程入学
氏名 小口友樹
指導教員 徳田元

論文題目

蛍光基質を用いた LolA と LolB の Hydrophobic Cavity の解析

グラム陰性菌である大腸菌は細胞質膜の外にもう 1 つ膜構造を有するため、細胞質、内膜、ペリプラズム空間、および外膜の 4 つのコンパートメントから成り立っている。大腸菌の内膜と外膜には、N 末端のシステイン残基が脂質で修飾されて膜にアンカーしているリポ蛋白質とよばれるものが約 90 種類存在し、それらは形態維持、薬剤排出、細胞分裂、蛋白質局在化など多くの重要な細胞機能を担っている。

外膜特異的に局在す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、膜内在性の 3 種の酵素により内膜上で脂質修飾を受けて成熟体となる。その後外膜リポ蛋白質は内膜に存在する ABC トランスポーター LolCDE 複合体によって ATP 依存的に内膜から遊離させられ、リポ蛋白質特異的シャペロン LolA と 1:1 の水溶性複合体を形成する。LolA と複合体を形成した外膜リポ蛋白質はペリプラズム空間を横断した後、自身も外膜リポ蛋白質である LolB へとエネルギー非依存的に受け渡され、その後 LolB によって外膜に挿入されることで局在化が完了する。

X 線結晶構造解析より、LolA と LolB の構造はよく似ており、両者ともハーフバレルと呼ばれる構造をとっており、リポタンパク質が結合すると考えられる疎水的な Cavity とそれを覆う α -helix の蓋を有していることが明らかにされた(図 1)。 α -helix の蓋は LolA では閉じられているのに対し、LolB では閉じられていなかった。また LolB においてのみ、結晶化を行なう際に

使用した緩衝液に含まれる沈殿剤 PEGMME を疎水的な Cavity にとらえた構造が得られた。

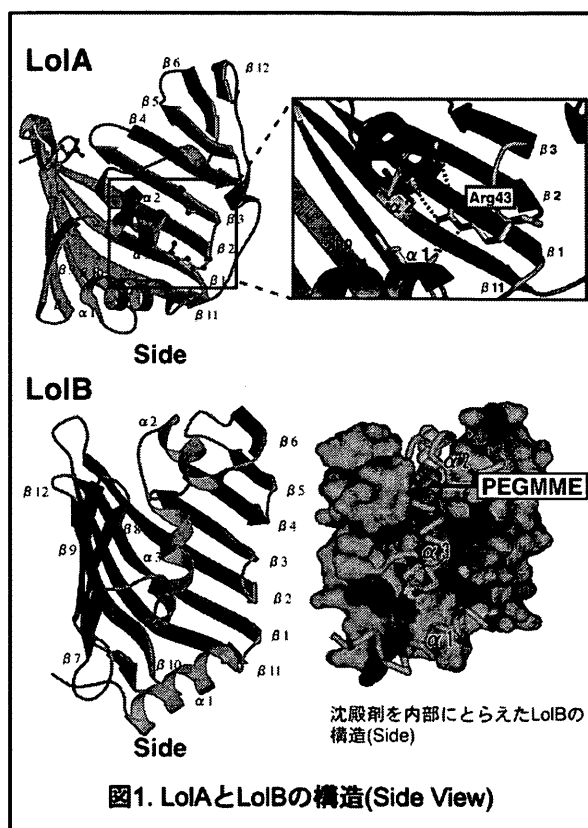
最近、LolA の蓋の開閉を担っていると考えられている残基に変異を導入した LolA(R43L) 変異体の X 線結晶構造解析が行なわれ、2 種類の構造が存在していることが明らかになった。1 つは野生型の LolA と基本的に同じ構造をしており、Cavity が α -helix の蓋によって閉じられた構造(Closed form)をしていた。もう一方では α -helix の蓋が大きく移動しており、Cavity が溶媒へと露出した構造(Open form)をとっていた(図 2)。野生型の LolA が構造解析された際には Open form は観察されなかった。LolA(R43L)では、 α -helix の蓋をつなぎ止めていた 43 番目の Arg が Leu に置換されたため、 α -helix の蓋に可動性が生じたと考えられた。

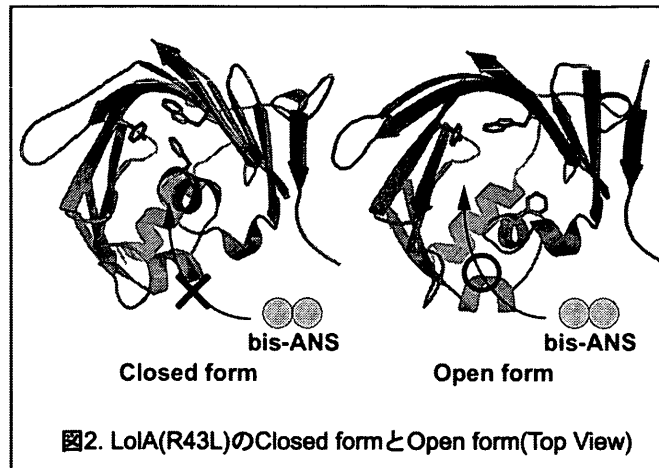
しかし実際に LolA が Closed form や Open form をとるかは不明であった。また、これまでに LolB の構造変化に関する知見も得られていない。LolA や LolB が実際に大きな構造変化をするのであれば、それらを解析する事は LolA や LolB のリポ蛋白質との相互作用を理解する上でも非常に興味深い。

そこで本研究では始めに LolA(R43L)の構造解析で得られた知見をもとに、蛍光試薬を用いて LolA の構造変化の解析を行なった。

LolA の Closed form、Open form の検証

蛍光試薬である bis-ANS は水溶液中ではほとんど蛍光が検出されないが、蛋白質の疎水的な部位と相互作用すると蛍光強度が著しく増加する。精製した LolA、LolA(R43L)に bis-ANS を加え蛍光強度の測定を行なった。LolA を加えた場合は蛍光強度の増加はわずかであった。一方 LolA(R43L)を加えた場合は非常に大きな蛍光強度の増加が見られた。この結果より、LolA はそのほとんどが Closed form として存在しており、bis-ANS が Cavity に入る事ができないと考えられる。一方、LolA(R43L)の中には Open form が存在するため、疎水的 Cavity に bis-ANS が作用できると推察された。





LolA-リポ蛋白質複合体の Closed form、Open form の検証

LolA はそのほとんどが Closed form として存在している事が示唆されたが、リポ蛋白質と複合体を形成する際には Open form へ変換されると考えられる。そこで実際に LolA とリポ蛋白質の複合体を発現精製し、bis-ANS の結合を調べた。LolA-リポ蛋白質複合体は同一のプラスミド上で LolA と外膜リポ蛋白質である Pal を過剰発現させることで、LolA と Pal の比率が 1:1 の複合体を精製した。¹⁾ LolA-Pal に bis-ANS を加えたところ、LolA(R43L)に bis-ANS を加えた場合と同程度まで蛍光強度が大きく増加した。

次に LolA(R43L)がどの程度の比率で Open form を形成しているのかを明らかにすることを目的とし、LolA(R43L)-Pal 複合体として精製し、bis-ANS による検証を行なった。LolA(R43L)-Pal に bis-ANS を加えたところ、蛍光強度の増加は LolA-Pal や LolA(R43L)に bis-ANS を加えた場合と同程度であった。また、bis-ANS の最大蛍光強度を示す波長がほぼ一致した。これらのことから bis-ANS は LolA-Pal、LolA(R43L)および LolA(R43L)-Pal と相互作用する際、同じ部位に作用している事が推察された。また LolA もリポ蛋白質と複合体を形成する際には Open form へと変換されること、ならびに LolA(R43L)の大部分は Open form として存在していることが示唆された。

Lol システムにおける LolA のリサイクルシステムの解析

大腸菌のペリプラズム画分を調製した際、LolA とリポ蛋白質の中間体が観察されないことから、LolA によるリポ蛋白質の輸送は迅速に行なわれると考えられている。また主要外膜リポ蛋白質 Lpp は細胞あたり $10^5 \sim 10^6$ 分子ほど存在するのに対し、LolA は 150-300 分子ほどしか存在しない。これらのことから、LolA は Lol システムにおいて一度リポ蛋白質と複合体を形成し、LolB へとリポ蛋白質を受け渡しフリーとなった後、繰り返しリポ蛋白質と複合体を形成すると考えられている。(LolA のリサイクル)

大腸菌スフェロプラストに LolA-Pal を加えたところ、リポ蛋白質の遊離は観察されなかった

が、LolA-Pal に LolB の脂質修飾部分を除き可溶性となった LolB 変異体である mLolB を加え、Pal を mLolB に受け渡しフリーとなった LolA のみを精製したところ、リポ蛋白質遊離活性を有していた。また LolA-Pal より得られた LolA に bis-ANS を加えたところ、LolA-Pal を加えた場合よりも蛍光強度は大きく減少していた。以上の結果より、Lol システムにおいて LolA はリサイクルされていることが示唆された。さらに LolA は基質であるリポ蛋白質の結合の有無で可逆的に Closed form と Open form を形成している事が示唆された。

mLolB の構造変化の解析

LolA とは異なり、LolB では Cavity に沈殿剤 PEGMME をとらえた結晶が得られたことから、LolB は少なくとも一部が Open form となっていると考えられている(図 2)。そこでフリーの mLolB と mLolB-Pal 複合体を精製し、bis-ANS の結合を調べた。

mLolB に bis-ANS を加えた場合は LolA に加えた場合と比較して数倍程度の蛍光強度の増加が見られた。次に mLolB-Pal に bis-ANS を加えた場合、mLolB を加えた場合よりも蛍光強度がさらに大きく増加した。これらの結果から、mLolB は単独でも Cavity が溶媒へと露出しており、bis-ANS が作用する事が可能になっていると考えられる。しかし mLolB-Pal における bis-ANS の蛍光強度の著しい増加から、mLolB はリポ蛋白質と複合体を形成する際、Cavity はさらに大きく開くことが推察された。

まとめ

本研究では蛍光試薬を用いて LolA と LolB に基質が結合した状態とフリーの状態の疎水的 Cavity の Closed form、Open form の検証を行なった。その結果、LolA と LolB は基質の結合に共役して Closed form から Open form へと構造変化することが明らかとなった。また本研究において、リポ蛋白質と複合体を形成する際の LolB の構造変化に関する知見が初めて得られた。本研究結果は Lol システムの解明のみならず多くの輸送システムの理解を深める上で重要な知見を与えている。

(参考文献)

1) Watanabe, S., Oguchi, Y., Yokota, N., and Tokuda, H. *Protein Sci*, 16, 2741-2749 (2007)