

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 塚原 淳

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は、細菌に広く存在し、脂質部分で膜にアンカーしている。大腸菌では、リポ蛋白質の局在化に5種類のLol (Localization of lipoproteins) 因子が関与している。内膜のペリプラズム側で成熟体となったリポ蛋白質は、+2位のアミノ酸がアスパラギン酸であるリポ蛋白質以外は、ABC トランスポーターLoiCDEの作用で、ペリプラズムに局在する蛋白質LolAと1:1の水溶性複合体を形成し内膜から遊離する。LolAと複合体を形成しペリプラズムを横断したリポ蛋白質は、外膜に局在する受容体蛋白質LolBにエネルギー非依存的に受け渡され外膜へと組み込まれる。LolB自身も外膜に結合したリポ蛋白質であるが、N末端のシステインをアラニンに置換して、可溶性のペリプラズム蛋白質とした変異体(mLolB)は、LolAからリポ蛋白質を受け取ることができる。本論文は、mLolBの機能解析と、表面プラズモン共鳴(Surface plasmon resonance; SPR)法を用いて、LolA、mLolB、リポ蛋白質、脂質二重層間の相互作用を解析したものである。

lolB 遺伝子の条件欠損変異株に mLolB をプラスミドから供給し生育を調べたところ、野生株と同様に生育した。この時、生育に必要な mLolB の発現量は、野生型 LolB と同程度であった。また、リポ蛋白質の外膜への輸送は正常であった。mLolB のリポ蛋白質組み込み能を *in vitro* で解析した。まず、大腸菌スフェロプラストに LolA を加え主要外膜リポ蛋白質(Lpp)を LolA との複合体として遊離させ、Lpp-LolA 複合体を調製した。この複合体に LolB を含まない外膜と精製した mLolB を加えて Lpp の外膜への組み込み反応を行ったところ、LolB を含む外膜と同様に mLolB に依存して Lpp が外膜へ移行した。これらの結果から mLolB は *in vitro* においても LolB と同様、リポ蛋白質の外膜への組み込み活性を持つことがわかった。

外膜にアンカーしない mLolB がリポ蛋白質を外膜に組み込んだことから、リポ蛋白質の受容体が外膜にさらにもう1つ存在する可能性が考えられた。Lpp-LolA 複合体に mLolB と内膜を加えて組み込み反応を行ったところ、mLolB は Lpp を内膜へも組み込んだ。さらに、Lpp-LolA 複合体に mLolB とリボソームを加えると、リボソームにもリポ蛋白質を組み込んだ。以上の結果から、リポ蛋白質の膜組み込みに必須な因子は LolB 以外にはないことと、LolB には膜特異性を決定する機能がないことがわかった。

さらに、mLolB のみを発現した株では、一過的に内膜にリポ蛋白質が蓄積することがわかった。このことから、LolB の脂質修飾および外膜局在化は機能に必須ではないが、リポ蛋白質を確実に外膜に組み込むのに必要であると考えられる。

野生型大腸菌のリン脂質はホスファチジルエタノールアミン(PE, 75%)、ホスファチジルグリセロール(PG, 20%)、そして、カルジオリピン(CL, 5%)から構成されている。このうち、PGとCLは、生理的条件下で脂質二重層を形成できるため、bilayer lipid と呼ばれている。一方、PEは極性基がアシル基より小さなコーン型の構造を取っているため、単独では脂質二重層を形成で

きず non-bilayer lipid と呼ばれている。これら 3 種類のリン脂質を任意の割合で混合、リポソームを調製し、mLolB によるリポ蛋白質の組み込み活性を調べたところ、PE 濃度の増加に伴いリポ蛋白質の組み込み活性が上昇した。このことから、リポ蛋白質の組み込み活性は、non-bilayer lipid によって促進される可能性が示唆された。

従来のスフェロプラストを用いたリポ蛋白質の受け渡し反応では、LolA と LolB 間の相互作用の強さ、および速度論的解析を行うことはできなかった。そこで、SPR を用いて解析した。センサーチップ表面に mLolB を固定し LolA との相互作用を解析したところ、LolA は解離定数 $181 \mu\text{M}$ で mLolB と結合した。この相互作用はセンサーグラムが箱型となったため、親和性の低い相互作用であると考えられる。次に、LolA から LolB へのリポ蛋白質の受け渡し反応を解析した。外膜リポ蛋白質である Pal と LolA の複合体を調製しセンサーチップに添加すると、Pal はセンサーチップ表面の mLolB へと受け渡されシグナルの上昇が見られた。サンプルの添加終了後、LolA は速やかに解離するが Pal は mLolB と結合したままのため、この時のシグナルを測定することでリポ蛋白質の LolA から mLolB への受け渡し速度を求めた。Pal-LolA 複合体の濃度が $0.23 \mu\text{M}$ の時、Pal の mLolB への受け渡し速度は $4.4 \text{ (pmol Pal/min)}$ であった。また、リポ蛋白質を LolB へと受け渡すことができない変異体 LolA (R43L) では、野生型 LolA に比べて著しく減少し $0.17 \text{ (pmol Pal/min)}$ であった。SPR を用いて、リポ蛋白質の LolA から LolB への受け渡し活性を定量的に評価するアッセイ系を構築することができた。

SPR を用いて LolB とリン脂質の相互作用を解析した。センサーチップ上にリン脂質を固定し、mLolB と脂質二重層の相互作用を解析したところ、mLolB は $313 \mu\text{M}$ で脂質二重層と相互作用した。LolA-LolB 間相互作用と同様にセンサーグラムが箱型となったため、解離速度が速い相互作用であると考えられる。さらに、68 番目のロイシンをアスパラギン酸に置換した変異体 mLolB (L68E) と脂質二重層の相互作用解析も行った。68 番目のロイシンは、疎水性アミノ酸残基にもかかわらず、親水的な環境に露出したループ上に存在し、親水性残基に変異するとリポ蛋白質の組み込み活性が著しく低下する変異体であり、脂質二重層との相互作用が弱くなっていると予想された。しかし、mLolB (L68E) は、解離定数 $400 \mu\text{M}$ で脂質二重層と相互作用し、野生型 LolB との間に有意な差は見られなかった。このことから、LolB は疎水性ループ以外の領域でリン脂質と相互作用し、68 番目のロイシンはリポ蛋白質を外膜へ移行させる反応に重要であると考えられる。

次に、Pal の mLolB から脂質二重層への組み込み速度を求めた。脂質二重層を形成させたセンサーチップに Pal-mLolB 複合体を添加すると、Pal が脂質二重層に組み込まれた。サンプルの添加が終了し緩衝液にかわると、mLolB は速やかに脂質二重層から解離するため、この時のシグナルを測定し Pal の組み込み速度を求めた。Pal-mLolB 複合体の濃度が $0.47 \mu\text{M}$ の時、野生型 mLolB では $0.23 \text{ (pmol Pal/min)}$ の速度で Pal は脂質二重層に組み込まれた。一方、mLolB (L68E) 変異体では $0.016 \text{ (pmol Pal/min)}$ であり、野生型の 7% であった。この結果は、これまでの変異体解析と一致しており、リポ蛋白質の脂質二重層への組み込みを定量的に解析するアッセイ系が確立できたと考えられる。

以上、本論文は、mLolB が LolB の機能を代替できることを見だし、外膜へのリポ蛋白質組み込み活性を明らかにすると共に、各因子間の相互作用の解析に SPR を用いたアッセイ系を確立したものであり、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。