

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 19 年度博士課程 進学
氏 名 川嶋 洋介
指導教員 徳田 元

論文題目 大腸菌膜タンパク質の膜局在機構の解析

大腸菌は細胞質膜である内膜とその外側にある外膜の二種類の生体膜を持つ。その間はペリプラズム空間と呼ばれている。内膜と外膜にはそれぞれ異なるタイプの膜タンパク質が局在している。内膜には α ヘリックス型の膜貫通領域で膜に内在する内膜タンパク質があり、外膜には β バレル型の構造をとって膜に内在する β バレル型外膜タンパク質がある。さらに、N末端のシステイン残基が脂質修飾されたりポタンパク質が、内膜と外膜の両方に存在している。これらの膜タンパク質は細胞質で合成された後、各種の局在機構によってそれぞれがあるべき場所に運ばれ局在する。内膜内在型のタンパク質以外は前駆体として合成され、局在化の課程で成熟体に変換される。

本研究では、大腸菌の膜タンパク質の膜局在機構の解析を行った。第一章ではジアシルグリセロール (DAG) が内膜タンパク質の自発的膜挿入を抑制するという現象について解析を行った。第二章では外膜リポタンパク質と β バレル型外膜タンパク質の両方の特徴を併せ持つと考えられる外膜タンパク質 CusC の局在機構の解析を行った。

[第一章]

大腸菌の内膜タンパク質はいくつかの異なる経路で膜挿入すると考えられている。M13 ファージの procoat をはじめとする一連の内膜タンパク質は、分泌タンパク質の膜透過に関与する *sec* 遺伝子の変異株でもその膜挿入が影響されないことから、Sec 非依存的膜挿入と

呼ばれている。さらにリン脂質のみで形成されたリポソームの存在下で M13 procoat を *in vitro* 合成すると、M13 procoat はリポソームに自発的に膜挿入する。これらのことから、Sec 非依存的な内膜タンパク質は内膜に自発的に膜挿入していると考えられていた。その後、YidC が枯渇した株では M13 procoat の膜挿入が阻害されていることが明らかとなり、YidC が Sec 非依存的な膜挿入にも働く「insertase」であると提唱された。しかし、この説に否定的な報告もいくつかあり、特に Pf3 フェージの coat の変異体である 3L Pf3 coat は Sec、YidC、膜電位のいずれにも依存せずに膜挿入するため、自発的膜挿入機構を支持する強力な証拠となっている。最近、Sec 依存的に膜挿入する MtlA でもリポソームには自発的に膜挿入することが明らかになった。さらに、DAG を含むリポソームでは M13 procoat や MtlA の自発的膜挿入が抑制されることが明らかになり、Sec 依存の MtlA の膜挿入を再構成するには DAG 添加により自発的膜挿入を抑制することが必須であった。こうした系を用いて膜挿入反応に関与する新規膜挿入因子が同定された。この膜挿入因子を DAG が含まれるリポソームに再構成したプロテオリポソームを用いて膜挿入活性を測定したところ、M13 procoat と MtlA の双方で膜挿入が確認された。従って、これまで自発的に膜挿入すると考えられていた内膜タンパク質は、実際には DAG によって自発的膜挿入が抑制され、その上で膜挿入因子の働きで膜挿入する可能性が考えられる。本研究では 3L Pf3 coat を基質膜タンパク質として DAG の自発的膜挿入抑制機構の解析を行った。さらに *in vivo* における DAG の重要性を調べるため、DAG 枯渇株の構築を試みた⁽¹⁾。

大腸菌リン脂質のみからなるリポソーム存在下で 3L Pf3 coat を *in vitro* 合成したところ、リポソームへの自発的膜挿入が観察された。一方、DAG を含むリポソームでは 3L Pf3 coat の自発的膜挿入が完全に抑制された。次に、DAG の含有率を変化させたリポソームを調製して膜挿入活性を調べたところ、DAG の濃度が 1%程度でも自発的膜挿入が大きく抑制され、DAG の濃度が上昇していくにつれてさらに自発的膜挿入の抑制効果が強くなっていくことが明らかになった。ここまでの実験で用いたリポソームの直径は 20~50 nm だった。リポソームのサイズが膜挿入反応に及ぼす影響を調べるため、直径が約 400 nm のリポソームを調製して膜挿入活性を測定した。両方のリポソームで膜挿入活性に違いは見られず、DAG による自発的膜挿入の抑制にはリポソームのサイズは影響しないことがわかった。

大腸菌の DAG を定量した結果、約 1.5%の DAG が含まれることがわかった。この値は自発的膜挿入を十分に抑制する値である。*in vivo* での DAG の有効性を示すために DAG 枯渇株の構築を試みた。しかし、DAG にリン酸を付加してホスファチジン酸を生成する DgkA を過剰発現させても、DAG 生成に関与する既知の遺伝子全てを破壊しても、さらにその両者を組み合わせても DAG の含有率は野生株と変わらなかった。これは未知の代謝経路から DAG が供給され DAG の枯渇を防いでいるためと考えられ、DAG が大腸菌にとって重要な物質であることが強く示唆される。

DgkA 過剰発現株から調製した内膜から膜挿入因子を除去した上で可溶化し、さらに ATP

を添加して DgkA を活性化させ可溶化した内膜成分の DAG を枯渇させた。この内膜成分をリポソームに再構成したプロテオリポソームを調製し、このプロテオリポソームに対する膜挿入活性を調べたところ、プロテオリポソームに対して自発的膜挿入することがわかった。自発的膜挿入が生じたのは DgkA の過剰発現と ATP 添加の二つの条件がそろった場合のみだったことから、この自発的膜挿入は内膜 DAG の枯渇によって生じた現象だと考えられる。

以上の結果から、自発的膜挿入すると考えられていた 3L Pf3 coat も DAG によって自発的膜挿入が抑制されることが明らかとなり、DAG には内膜タンパク質の自発的膜挿入を普遍的に抑制する効果があることが強く示唆された。また、大腸菌の DAG 含有率は自発的膜挿入を充分抑制できる値であることが明らかとなり、内膜中の DAG の枯渇により自発的膜挿入が起こることが示唆された。これらのことから *in vivo* においても DAG によって自発的膜挿入が抑制されていると考えられる。

[第二章]

大腸菌の外膜に存在するタンパク質には、N 末端のシステインが脂質で修飾され脂質部分で外膜に結合するリポタンパク質と、 β バレル型の構造をとって外膜に内在する β バレル型外膜タンパク質（以下、外膜タンパク質と記述する）の二種類がある。このうちリポタンパク質は内膜上で脂質修飾を受けた後、内膜タンパク質複合体である LolCDE の作用でペリプラズムタンパク質 LolA と 1:1 の水溶性複合体を形成し、内膜から遊離する。LolA とともにペリプラズムを横断したリポタンパク質は外膜リポタンパク質 LolB の作用で外膜へと組み込まれる。これらの Lol 因子によるリポタンパク質の局在機構を Lol システムと呼ぶ。一方、外膜タンパク質は内膜透過後ペリプラズムシャペロンの作用でペリプラズムを横断し、外膜に存在する Bam 複合体の作用で外膜に挿入されると考えられている。この局在機構を Bam システムと呼ぶ。Lol システムは様々な研究によりその全容が解明されつつあるが、Bam システムについては不明な点が多い。その大きな理由として、Lol システムは *in vitro* の実験系が確立されているのに対し、Bam システムでは *in vitro* 実験系が確立されていないことが挙げられる。

本研究では、リポタンパク質であり、かつ β バレル型の構造を持つと考えられる CusC を基質タンパク質として用い、Lol システムの実験系を利用しつつ外膜タンパク質の局在機構の解析を試みた。

リポタンパク質は N 末端から 2 番目の残基 (+2 位) がアスパラギン酸だと LolCDE に認識されず内膜に局在する。これは +2 ルールと呼ばれている。CusC の +2 位をアスパラギン酸に置換すると内膜に局在するようになった。これは CusC が LolCDE による選別を受けることを示している。

内膜からの CusC の遊離を *in vitro* で検出した。まず CusC 発現株からスフェロプラストを

調製し、そこに LolA を添加して CusC がスフェロプラストから遊離するかを調べた。LolA を添加すると CusC がスフェロプラストから遊離したことから、CusC は LolA によって内膜から遊離しペリプラズムへと運ばれることが強く示唆された。さらに、LolA と複合体を形成して遊離した CusC を外膜と混ぜて、LolB によって CusC が外膜へと組み込まれるかを調べたところ、LolB が含まれる外膜に対しては CusC が組み込まれた。その一方で、LolB が存在しない外膜では CusC の組み込みは起こらなかった。このことから CusC は LolB 依存で外膜に局在することが示され、CusC は Lol システムによりペリプラズムを横断し外膜へと局在することが示唆された。

CusC のシグナルペプチドを外膜タンパク質 OmpF のシグナルペプチドに置換し、脂質修飾が起こらない変異体 mCusC を構築した。mCusC の細胞内での局在を調べたところ、主にペリプラズムに局在することが明らかとなった。また、スフェロプラストから分泌させた mCusC を外膜と混ぜても mCusC はほとんど外膜には局在しなかった。このことから、脂質修飾が CusC の外膜局在に必要であることが示された。

本研究により、リポタンパク質と β バレル型タンパク質の両方の特徴を併せ持つ CusC は、リポタンパク質の局在機構である Lol システムによって外膜へと局在することが示された。また、mCusC が外膜タンパク質の特徴である β バレル領域を持ちながら外膜に局在しなかったことで、CusC の外膜局在は脂質修飾すなわち Lol システムに依存していることが強く示唆された。

参考論文

- (1) [Kawashima Y.](#), Miyazaki E., Müller M., Tokuda H., Nishiyama K. (2008) *J Biol Chem*, Vol.283, pp.24489-24496