

## 論文の内容の要旨

論文題目 Structural Investigation of the Interaction between LolA and LolB Using NMR

(NMR を用いた、タンパク質 LolA と LolB との相互作用に関する研究)

氏 名 中田 真悟

### <序 論>

細菌は、細胞表層に脂質修飾されたリポ蛋白質を持つ。リポ蛋白質は、形態形成、物質輸送、薬剤排出、細胞分裂など重要な機能に関与していると考えられている。リポ蛋白質はアミノ末端に共有結合している 3 本のアシル鎖 (Fig.1) によって細胞膜へとアンカーしている。グラム陰性菌において、リポ蛋白質は、内膜または外膜に局在する。一部のリポ蛋白質は内膜にとどまるが、多くのリポ蛋白質は外膜に局在化して機能を発現する。従ってリポ蛋白質の外膜への輸送は、グラム陰性菌において不可欠な機能である。

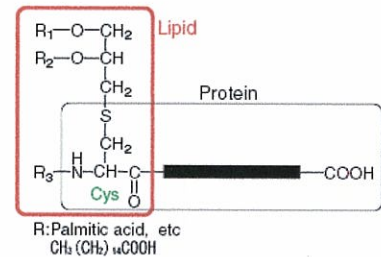


Fig.1: リポ蛋白質の構造

近年、大腸菌を用いた研究により、リポ蛋白質の外膜への局在化に関与する、5つの蛋白質、LolA, LolB, LolC, LolD および LolE が同定され、Lol システムと呼ばれる機構が明らかとなってきた (Fig.2)。LolCDE 複合体は、内膜に埋め込まれたリポ蛋白質を、ペリプラズム中の蛋白質である LolA へ受け渡す役割を担う。リポ蛋白質-LolA 複合体は外膜にアンカーしている受容体 LolB へリポ蛋白質を受け渡す。その後、リポ蛋白質は、外膜へと局在化される。

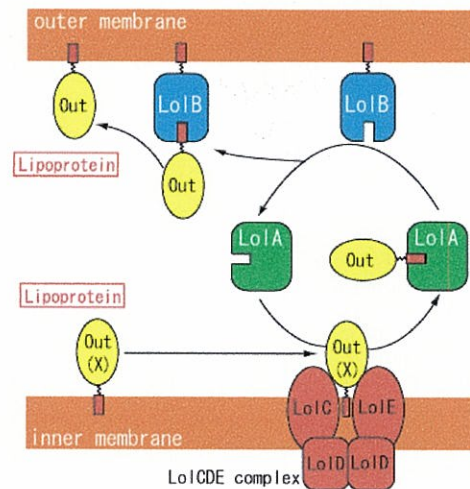


Fig.2: Lol システムと Lol 蛋白質

Lol システムはグラム陰性菌全般に存在する特徴的な機構である。従って、Lol 蛋白質の機能、構造や相互作用の解明は、Lol システムをターゲットとした新規メカニズムを有する抗菌剤の開発につながる可能性がある。LolA と LolB との特異的な相互作用は、リポ蛋白質を LolA から LolB、外膜へと局在化させるステップでの不可欠な機能である。しかし、LolA-LolB 間の相互作用に関する構造情報は明らかとはなっておらず、どのように LolA から LolB へリポ蛋白質が受け渡されるのか不明である。本研究では、この問題に着目し、LolA-LolB 間の相互作用に焦点を当て、解析を行った。

Lol 蛋白質の中で、大腸菌の LolA と LolB については、それぞれの結晶構造が得られている。LolB についてはアミノ末端にアシル鎖を持たない水溶性の変異体 (mLolB) が構造解析に使われている。LolA と LolB のアミノ酸配列相同性は低い、3 次元構造は互いに類似している。LolA, LolB とともに開いた  $\beta$  バレルと  $\alpha$  へ

リックスの蓋を持つ。LolA, LolB の 3 本の  $\alpha$  ヘリックスのうち 2 本は、 $\beta$  バレルの内面に埋め込まれる形となっている。LolA, LolB の内側には、多くの疎水性残基が存在する。従って、その内側部分に、疎水的な、リポ蛋白質のアシル鎖が結合すると推測されている。

本研究では、溶液 NMR 法を用いて、LolA と mLolB との相互作用モードを明らかにした。また、リポ蛋白質のアシル鎖のアナログとして用いた Decanoate と、LolA, mLolB との相互作用解析を行った。これらの相互作用情報から、どのように LolA から LolB へとリポ蛋白質が受け渡されるのか、という点に関してメカニズムを提案した。

## <結果および考察>

### 1. 相互作用解析のための、LolA, mLolB の NMR シグナルの帰属

初めに、LolA, mLolB を用いた NMR による各種相互作用解析のため、 $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  で均一ラベルした LolA、同様にラベルした mLolB の主鎖 NH シグナル帰属を、各種 3 次元測定により行った。LolA, mLolB とも 90% 以上の主鎖 NH シグナルの帰属が達成された。

### 2. LolA, mLolB における、リポ蛋白質アシル鎖アナログの結合部位解析

LolA, LolB とリポ蛋白質との相互作用解析または複合体構造解析は、リポ蛋白質局在化の機能解析において重要であるが、リポ蛋白質アシル鎖の低い溶解度のため、それらの解析は難しい。そこで私たちは、アシル鎖アナログとして飽和脂肪酸を相互作用解析に利用した。溶解度が十分であり、解析に適した、炭素数 10 の Decanoate を用いて実験を行った。初めに、Decanoate のアシル鎖アナログとしての妥当性をはかるために、*in vitro* において、Decanoate による、リポ蛋白質の外膜移行に対する影響を調べた。その結果、外膜へのリポ蛋白質の移行が、Decanoate によって阻害されることが分かった。

次に、LolA, mLolB 中の Decanoate 結合部位の解析を行った。Decanoate 添加に伴う、 $^{15}\text{N}$  均一ラベルした LolA, mLolB それぞれに対し、Decanoate を滴定し、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル中シグナルの化学シフト変化を調べた。この結果より、Decanoate は、疎水的な LolA, mLolB の内側に結合することが分かった。従って、リポ蛋白質のアシル鎖も同様の部分に結合する可能性が高いと考えられる。

LolA の結晶構造においては、3 本のアシル鎖を同時に結合させうる、十分な内側の空間はない。従って、リポ蛋白質結合の際には、LolA はリポ蛋白質が結合していない状態から、いくらか構造変化が起こる可能性が考えられる。

### 3. LolA と mLolB との相互作用モードの解析

次に LolA と mLolB との相互作用モードの解析を行った。

#### 3-1. Isothermal Titration Calorimetry を用いた、LolA と mLolB との結合強度解析

初めに、LolA と mLolB との結合定数を、等温滴定カロリメトリーを用いて調べた。解離定数は  $31 \mu\text{M}$  であり、リポ蛋白質非存在下であっても、LolA-mLolB 間の特異的な相互作用があることが分かった。

### 3-2. LolA-mLolB 複合体の NMR シグナル帰属

$^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  ラベルした LolA、または  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  ラベルした mLolB に、非ラベルの mLolB または LolA を滴定し、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル上のシグナル変化を調べた。この滴定実験データを用いて、LolA-mLolB 複合体中のそれぞれの蛋白質の主鎖 NH シグナルの帰属を行い、LolA 側で 82%、mLolB 側で 84%の、複合体での帰属率が達成された。

複合体の NMR シグナル帰属データおよび複合体形成時の化学シフト変化データは、以降の相互作用解析に用いた。

### 3-3. LolA と mLolB との相互作用モードの解析

LolA-mLolB 複合体の界面残基を明らかにするため、交差飽和 NMR 実験を行った。交差飽和実験においては、まず一方の非ラベル蛋白質全体を磁化的に飽和し、その磁化的飽和が相互作用するラベル蛋白質の結合界面へ移動する。飽和移動されたラベル蛋白質の各アミノ酸残基の、HSQC シグナル強度減少を観測することにより、非ラベル蛋白質との相互作用界面を明らかにすることができる。この実験により、LolA (Fig.3 右パネル) および mLolB の、 $\beta$ バレル中の相互作用残基および領域が大まかに明らかとなった。

LolA-mLolB 複合体における分子間の相対配置を含め、より詳細に複合体の相互作用情報を得るため、スピンラベル試薬 (MTSL, (1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl- $\Delta^3$ -pyrroline-3-methyl)methanethiosulfonate)を用いて、常磁性緩和実験を行った。MTSL から最大 25 Å 程度の距離に存在する原子核において、NMR シグナル強度減少が起こることが知られている。LolA の 5 残基をそれぞれシステイン変異し、MTSL で修飾した 5 種類の LolA 試料と、 $^{15}\text{N}$  ラベルした mLolB 試料を用いて常磁性緩和実験を行い、それら 5 残基からの、mLolB 中の近接領域を明らかにした。また、この結果より LolA の  $\beta$ バレル一部内側が mLolB の  $\beta$ バレル外側と相互作用することも明らかとなった。以上の交差飽和実験、常磁性緩和実験により、LolA-mLolB 複合体の相互作用モードが明らかとなった。

### 4. LolA と mLolB 相互作用時の、LolA の構造変化

明らかとなっている、LolA, mLolB それぞれの結晶構造を用いた場合、上述の相互作用モードと矛盾しない複合体モデルを構築することができない。従って、複合体形成時、LolA, mLolB 両方またはいずれかが、構造変化を起こす必要があると考えられる。構造変化に関する情報を得るため、LolA-mLolB 複合体形成時の、

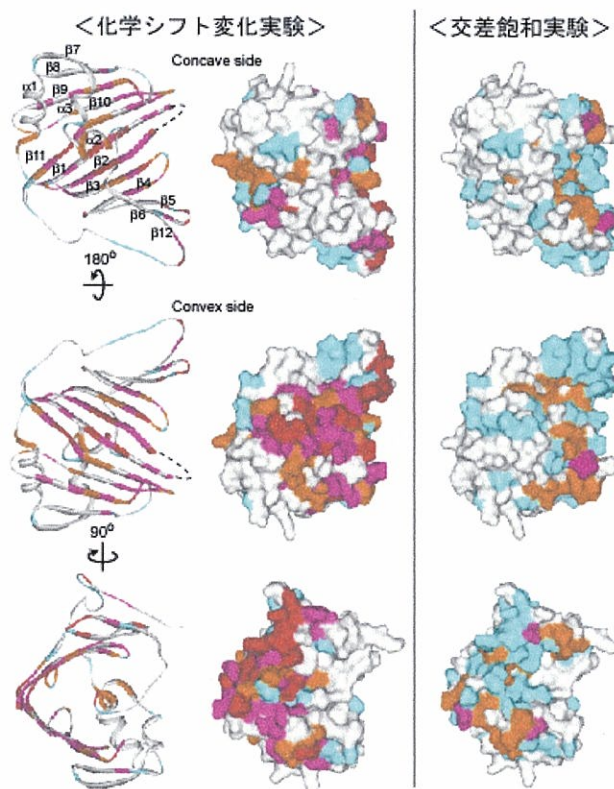


Fig.3: 化学シフト変化実験 (左側パネル)と交差飽和実験 (右側パネル)において、mLolB と複合体形成時の、LolA の影響を受けたアミノ酸残基の結晶構造へのマッピング

交差飽和実験と化学シフト変化実験の結果の違いを調べた。LolA においては、複合体形成時、顕著に化学シフト変化を起こしたアミノ酸残基が、交差飽和実験で影響を受けた領域に比べて、より広範囲に  $\beta$  バレル中に分散していた (Fig.3)。一方、mLolB においては、両実験における、影響を受けた残基の領域がほぼ一致していた。この結果は、LolA においては、複合体形成時、顕著な構造変化が起こることを示唆する。mLolB においては、比較的構造変化が小さいことが示唆される。重水素/水素交換実験からは、mLolB に比べ、LolA の速い重水素/水素交換速度が観測され、LolA のより大きい構造の揺らぎが示唆された。この結果も LolA の構造変化の可能性を支持する。

## 5. LolA から LolB へのリポ蛋白質移行メカニズム

以上のNMR解析より、次のようなLolAからLolBへのリポ蛋白質受け渡しモデルを提案する (Fig.4)。1) LolA が、LolCDE からリポ蛋白質を受け取る。この際、アシル鎖は LolA の  $\beta$  バレル内側の疎水的部分に結合する。2) LolA-リポ蛋白質複合体は、外膜にアンカーしている LolB と相互作用する。その相互作用モードは、LolA の  $\beta$  バレルの一部内側が、LolB の  $\beta$  バレル外側と結合する形となる。従って、疎水的な内側を有するトンネル様構造が形成される形で、LolA と LolB が結合する。また、LolA はフリーの状態からいくらかの構造変化を必要とする。3) LolA の  $\beta$  バレル内側に結合したリポ蛋白質のアシル基は、その疎水性トンネルを通り、LolB へと移行する。

LolA から LolB へのリポ蛋白質が移行するドライビングフォースは、単純に、リポ蛋白質の、より高い LolB へのアフィニティであると推測される。その証拠の一つとして、先行の研究があるが、外膜局在化リポ蛋白質の一つ、Pal が、LolA よりも mLolB に対して、疎水性相互作用が強いことが示されている。

### <総括>

本研究では、主に NMR 法を用いて、LolA と mLolB、また、LolA、mLolB とリポ蛋白質のアシル鎖アナログの相互作用解析を行い、相

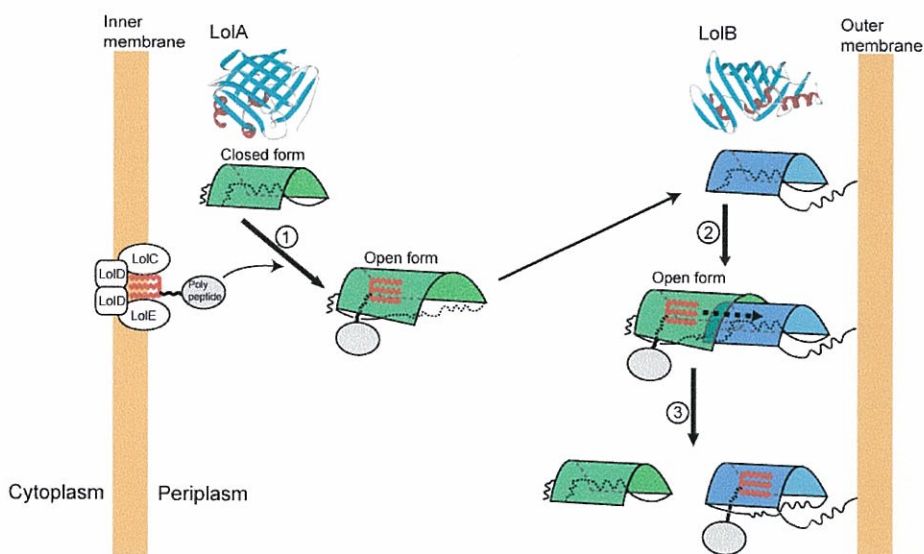


Fig.4: リポ蛋白質移行モデル

互作用モードに関する新たな知見を得た。解明した LolA-mLolB の相互作用モードでは、疎水性の内側を持つ、トンネル様構造が形成される。この構造は疎水的なリポ蛋白質アシル鎖の受け渡しに適している。

今回解明した結果は、Lol 蛋白質のシステムのみならず、他の脂質結合蛋白質の機能や構造にも通じる新たな知見を与える可能性がある。また、今回明らかにした情報を利用して、Lol システムをターゲットとした、多剤耐性グラム陰性菌に有効な抗菌薬の開発も期待される。