

審査結果の要旨

氏名 中田 真悟

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と題する本論文は、主に溶液 NMR 法を用い、タンパク質 LolA と LolB との相互作用、また、それらタンパク質とリポ蛋白質のアシル鎖アナログの Decanoate との相互作用を解析した成果を述べたものである。LolA と LolB は、グラム陰性菌に重要なリポ蛋白質を内膜から外膜へ局在化させる役割を担う。本論文は7つの章からなり、第1章において序論を、第2章から第6章においては各実験の結果・考察をまとめている。第7章において本研究の総括を述べている。

第2章においては、NMR を用いた相互作用解析の土台となる LolA と LolB のそれぞれの主鎖アミド基由来の NMR シグナルの帰属を行っている。LolB としてはアミノ末端がアシル鎖によって修飾されず、従って可溶性となる変異体 (mLolB) を用いている。LolA, mLolB の発現系を構築し、十分な収量、純度を達成している。その後、安定同位体標識の方法を複数検討し、 ^2H , ^{13}C , ^{15}N でラベルした LolA および mLolB を作製し、最終的に次章以降の相互作用解析に十分な、90%以上の主鎖帰属率を達成している。

第3章においては、LolA, mLolB とリポ蛋白質との相互作用に関する情報を得るため、リポ蛋白質のアシル鎖のアナログとして、Decanoate を用いている。初めに、Decanoate がリポ蛋白質の外膜移行に阻害をかけることを発見し、Decanoate を用いることの妥当性を確認した。その後、Decanoate の、LolA, mLolB それぞれに対する結合実験を、化学シフト変化実験を用いて行い、Decanoate が LolA, mLolB の疎水的なキャビティに結合することを発見している。この結果より、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結論している。また、LolA の結晶構造においては、リポ蛋白質アシル鎖が結合する十分なキャビティ空間がなく、アシル鎖が結合する際には、その空間が広がるような構造変化が起こる可能性について述べている。

第4章においては、LolA と mLolB との相互作用解析を行っている。初めに、等温滴定カロリメトリー法により、LolA と mLolB の複合体の解離定数を $31\ \mu\text{M}$ と決定し、リポタンパク質非存在化でも、特異的な結合が存在することを述べている。次に LolA と mLolB の複合体の主鎖 NMR シグナルの帰属を行い、交差飽和実験により、複合体の界面を LolA, mLolB 両方について決定している。さらに複合体の配向を調べるため、スピンラベル試薬を用いた常磁性緩和実験を行っている。LolA の5部位にそれぞれスピンラベル試薬を導入

した LolA を準備し、それぞれの部位からの、相互作用時の mLolB の近接領域を明らかにしている。さらにその結果より複合体の相対配向を明らかにしている。これらの結果より、LolA の β バレル内側と mLolB の β バレル外側が相互作用する、特徴的な相互作用モードを明らかにしている。

第 5 章においては、LolA と mLolB の複合体形成時の LolA の構造変化について解析を進めている。前章より複合体の相互作用界面および配向が明らかとなったが、LolA, mLolB それぞれの既知の結晶構造を用いた場合、前章の結果と矛盾しない複合体モデルが得られないと述べている。従って複合体形成時、LolA, mLolB の両方またはいずれかが構造変化を起こす必要があると述べている。構造変化について調べるため、まず LolA と mLolB の複合体形成時の化学シフト変化を受けた領域と、交差飽和実験において界面と同定された領域の比較を行っている。LolA においては、化学シフト変化を顕著に受けた領域が、交差飽和実験での界面領域に比べて β バレル中に広がっていることを明らかにしている。一方で mLolB においてはその 2 つの実験での領域がほぼ一致していることを明らかにしている。従って、複合体形成時、mLolB は大きな構造変化を起こさないが、LolA は β バレルの構造変化を起こすと結論している。この結論は、重水素/水素交換実験および、 $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$ の化学シフトを指標としたこの章の実験によっても支持されている。

第 6 章においては、上記の結果を用いて、グラム陰性菌における LolA から LolB へのリポ蛋白質受け渡しの分子メカニズムモデルを次のように提案している。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 β 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 β バレルの一部内側が、LolB の β 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 β 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している。その証拠の一つの先行の研究として、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を述べている。

以上、本研究の成果は、抗グラム陰性菌薬の新たなターゲットであるものの未解明な部分が多い Lol システムに関して、構造および機能の解明に大きく貢献するものであり、これを行った学位申請者は博士（薬学）の称号を得るにふさわしいと判断した。