

平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：31203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07008

研究課題名(和文) ペリプラズムプロテアーゼBepAによる細菌外膜の品質管理機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism for quality control of bacterial outer membrane by the periplasmic protease BepA

研究代表者

成田 新一郎 (Narita, Shin-ichiro)

盛岡大学・栄養科学部・教授

研究者番号：30338751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌ペリプラズムに存在するプロテアーゼであるBepAは、外膜タンパク質の膜組み込み装置であるBAM複合体と相互作用し、リポ多糖の輸送に関わる外膜タンパク質LptDの生合成と品質管理に働く。本研究課題では、BepAのC末端側に位置するTPRドメインに着目し、このドメインを構成するアミノ酸残基に対して系統的な部位特異的in vivo光架橋解析を行い、BepAとBAM複合体ならびにLptDとの相互作用の様式を解析した。解析結果に基づいた変異解析の結果、TPRドメインはBAM複合体や基質タンパク質との相互作用を担い、BepAの機能発現に必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：BepA is an Escherichia coli periplasmic protease involved in biogenesis and quality control of LptD, a component of the outer membrane lipopolysaccharide translocon. BepA can associate with the BAM complex driving integration of outer membrane proteins into the outer membrane. However, the molecular mechanism of BepA function and its association with the BAM complex remained unknown. In this study, we performed a systematic site-directed in vivo photo-cross-linking analysis to reveal the protein-protein interactions mediated by the BepA TPR domain. We revealed the mode of interaction between the BepA domain and the BAM complex as well as LptD. Mutational analysis indicated that BepA TPR domain is essential and protein-protein interactions mediated by the TPR domain is critical for the function of BepA.

研究分野：機能生物化学

キーワード：細胞内タンパク質分解 表層ストレス応答 細菌細胞表層 プロテアーゼ シャペロン 外膜タンパク質 ジスルフィド結合 タンパク質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌の細胞表層の最も重要な特徴の一つは、内膜と外膜の二重の膜構造の存在である。外膜は4つの主要因子(リン脂質・リポ多糖・外膜タンパク質・リポタンパク質)からなる特異な膜構造であり、抗生物質などの異物に対し極めて効果的な透過障壁として働く。外膜を構成する因子は細胞質または内膜上で合成され、内膜と外膜の間にある親水的なペリプラズム空間を通過して外膜まで輸送される。それぞれの外膜構成因子の輸送には専用の輸送装置が働いているが、近年、リポ多糖の外膜組み込みに関わる LptD/E 複合体の立体構造、および外膜タンパク質の外膜組み込みに関わる BAM 複合体の立体構造が解明され、これらの複合体の作動機構に関する研究が注目を集めている。

外膜の機能が保たれていることはグラム陰性細菌の生存に重要であり、外膜因子の生合成に関わる遺伝子の多くが菌の生育に必須である。また、細菌は複数の表層ストレス応答機構を備えて、外膜の構造および機能を維持している。特に σ^E 経路は大腸菌において最も重要な表層ストレス応答機構の一つと考えられている。*bepA* 遺伝子は σ^E レギュロンのメンバーであり、BepA はリポ多糖の輸送に関わる外膜タンパク質 LptD の生合成を促進するシャペロンとして働くとともに、生合成に失敗した LptD を分解するプロテアーゼとしても働く¹。BepA を欠く株では LptD の正常な生合成が阻害され、エリスロマイシンなど通常は外膜を透過しにくい抗生物質に対して感受性を示す。また、BepA は BAM 複合体と相互作用していることが明らかになっている。

2. 研究の目的

BepA はペプチダーゼ M48 ファミリーに属するメタロプロテアーゼであり、N 末端側にプロテアーゼドメイン、C 末端側に tetratricopeptide repeat (TPR) ドメインを持つ。TPR ドメインは一般にタンパク質間相互作用に関与することが知られており、BepA もこの領域で基質と相互作用することが予想されるが、BepA と基質との相互作用の様式は明らかになっていなかった。本研究では外膜タンパク質の生合成と品質管理過程において、BepA が基質タンパク質や BAM 複合体とどのように相互作用するかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

BepA の TPR ドメインを構成する 179 残基のアミノ酸 (309 番目から 487 番目) を一つずつ光架橋性非天然アミノ酸 p-benzoyl-L-phenylalanine (pBPA) に置換して *in vivo* 光架橋実験を行い、BepA と基質タン

パク質との相互作用する部位の同定を試みた。このために、BepA の TPR ドメインを構成する全ての残基に対応するコドンに部位特異的変異を導入し、これら一つずつアンバーコドンに置換した変異体をコードするプラスミドセットを作製した。アンバーサブレッサー-tRNA と変異型アミノアシル tRNA 合成酵素を利用してこれらのコドンに対応する位置に pBPA が導入された BepA 変異体を大腸菌細胞内で発現させ、365 nm の近紫外光を照射して架橋複合体を形成させた後、抗 BepA 抗体を用いたイムノプロットング解析を行った。

4. 研究成果

pBPA を導入した BepA 変異体を発現する大腸菌では、複数の細胞内因子が BepA との架橋複合体を形成することが確認された。架橋複合体を生じた 42 の BepA(pBPA)変異体について、BAM 複合体の構成因子である BamA, BamC, BamD に対する抗体を用いてイムノプロットング解析を行ったところ、下表に示すアミノ酸残基に pBPA を導入した BepA 変異体が、BamA, BamC, BamD と架橋複合体を形成することがわかった。

pBPA を導入した BepA の残基	架橋形成したタンパク質
A396, F404, Q428, R480	BamA
S451, S455, L459	BamC
N323, D444, S448, S452, Q464, Q478, K482	BamD

本研究課題と関連する国際共同研究の結果から、BamA の 224 番目のグルタミン酸残基の位置に pBPA を導入した変異体が、BepA と架橋複合体を形成することが明らかとなった。BAM 複合体の結晶構造解析から、BamA のこのアミノ酸残基はペリプラズムのリング状構造内部に位置することがわかっている。BepA の TPR ドメインが BAM 複合体と直接的に相互作用するという本研究課題の結果を踏まえれば、BepA の TPR ドメインは BAM 複合体のペリプラズム側のリング状構造内部に局在して相互作用することが考えられる。

続いて、TPR ドメインに pBPA を導入した BepA 変異体のうち、N323, N364, F404, S455, K458 および S461 に pBPA を導入したものについて、これらを発現する大腸菌に近紫外光を照射し、生じた架橋複合体を BepA の C 末端に付加した His タグを利用して精製した。精製した架橋複合体を質量分析に供した結果、上記イムノプロットング解析で BepA との相互作用が確認されたタンパク質に加え、LptD が BepA(N323pBPA) および BepA(F404pBPA) と架橋複合体を形成することが明らかとなった。このことから、BepA の TPR ドメインは BAM 複合体だけでなく、

基質タンパク質である LptD と相互作用することが示唆された。

BepA の TPR ドメインに対応するコドンにアンバーコドンを導入したクローンをを用い、アンバーサプレッサー-tRNA を持たない *bepA* 欠失株でこれらの変異体を発現させることにより、TPR ドメインを部分的に欠失させた BepA を発現させた。抗生物質感受性の相補能を指標に BepA の欠失変異体の機能を評価したところ、TPR ドメインを欠失する BepA 変異体は機能を失っていることがわかった。この結果から、TPR ドメインは BepA の機能発現に必要であることが明らかとなった。

本研究課題の遂行中、関連する共同研究の成果により X 線結晶構造解析に基づく BepA の TPR ドメインの構造データが利用可能となった。本研究課題で BAM 複合体や LptD と相互作用することが明らかとなった BepA のアミノ酸残基の位置を、BepA の TPR ドメインの立体構造にマッピングした結果、BamA, BamC, BamD と相互作用するアミノ酸残基は TPR ドメインの C 末端側のサブドメインに集中することがわかった。一方、LptD と相互作用する 2 つのアミノ酸残基のうち、F404 は TPR ドメインの C 末端側サブドメインに位置するのに対し、N323 は TPR ドメインの N 末端側のサブドメインに位置していた。

BepA の機能において重要なアミノ酸残基を同定するために、BAM 複合体または LptD との相互作用が確認されたアミノ酸残基をアラニンに置換した BepA 変異体を作製し、それらの機能を解析した。その結果、F404 をアラニンに置換した BepA 変異体は *bepA* 欠失株の抗生物質感受性を相補することができないことがわかった。更に変異解析を進めた結果、F404 を芳香族アミノ酸以外のアミノ酸に置換すると BepA の機能が失われることがわかった。また、pBPA を導入した BepA と BAM 複合体や LptD との架橋形成効率は、F404 に変異を導入することによって低下した。これらの結果から、TPR ドメインを介した BAM 複合体や基質タンパク質との相互作用は、BepA の機能発現に重要であることがわかった。

<引用文献>

Shin-ichiro Narita, Chigusa Masui, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae and Yoshinori Akiyama. Protease homolog BepA (YfgC) promotes assembly and degradation of β -barrel membrane proteins in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110: E3612-E3621. 2013

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Yasushi Daimon, Shin-ichiro Narita and

Yoshinori Akiyama. Activation of toxin-antitoxin system toxins suppresses lethality caused by the loss of σ^E in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 査読有 197: 2316-2324. 2015 doi: 10.1128/JB.00079-15.

Yasushi Daimon, Chigusa Iwama (Masui), Yoshiki Tanaka, Takuya Shiota, Takehiro Suzuki, Ryoji Miyazaki, Hiroto Sakurada, Trevor Lithgow, Naoshi Dohmae, Hiroyuki Mori, Tomoya Tsukazaki, Shin-ichiro Narita, Yoshinori Akiyama. The TPR domain of BepA is required for productive interaction with substrate proteins and the β -barrel assembly machinery (BAM) complex. Mol. Microbiol. 査読有 106: 760-776. 2017 doi: 10.1111/mmi.13844.

Shin-ichiro Narita and Hajime Tokuda. Bacterial lipoproteins; biogenesis, sorting and quality control. Biochim. Biophys. Acta. 査読有 1862: 1414-1423. 2017 doi: 10.1016/j.bbailip.2016.11.009.

[学会発表](計 1 件)

大門康志、舛井千草、宮崎亮次、櫻田洋人、田中良樹、鈴木健裕、堂前直、森博幸、塚崎智也、成田新一郎、秋山芳展：大腸菌のペリプラズムプロテアーゼ BepA は、TPR domain を介したタンパク質間相互作用により外膜機能を維持する。日本農芸化学会 2017 年度大会、京都、2017 年 3 月 19 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://www.morioka-u.ac.jp/UV_ns/kyouin/narita_shinichiro.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

成田 新一郎 (NARITA, Shin-ichiro)
盛岡大学・栄養科学部・教授
研究者番号：30338751

(2) 連携研究者

秋山 芳展 (AKIYAMA, Yoshinori)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・
教授
研究者番号：10192460

(3) 研究協力者

大門 康志 (DAIMON, Yasushi)