

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380046
 研究課題名 (和文) 細菌リポ蛋白質を選別し膜局在化を司るシステムの分子メカニズム
 研究課題名 (英文) Molecular mechanisms underlying the membrane sorting of bacterial lipoproteins
 研究代表者
 徳田 元 (TOKUDA HAJIME)
 東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
 研究者番号：40125943

研究成果の概要 (和文)：細菌に広く存在しているリポ蛋白質は、アミノ末端のシステイン残基が脂質で修飾され、これを利用して膜に結合している。リポ蛋白質は、細胞表層の機能に重要な貢献をしている一群の膜蛋白質である。外膜のあるグラム陰性菌では、外膜と内膜(細胞質膜)に仕分けシグナルに従って局在している。リポ蛋白質を選別し、それぞれの膜に運ぶ機構には、5種類の Lol 因子が関与していることを明らかにした。本研究は、Lol 因子が疎水性のリポ蛋白質を親水的環境を通過して輸送する分子機構を解析したものである。

研究成果の概要 (英文)：Lipoproteins possessing the lipid-attached cysteine residue at the N-terminus are widely distributed among bacteria and anchored to membranes through the N-terminal lipids. Lipoproteins are involved in various functions present in cell surfaces and localized in either the inner or outer membrane of Gram-negative bacteria depending on their sorting signals. We have revealed that five Lol factors are involved in the membrane sorting of lipoproteins. The mechanisms underlying the specific membrane sorting of lipoproteins by Lol proteins are examined in this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2008 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：微生物生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：膜局在化、ABC トランスポーター、分子シャペロン、ペリプラズム、リポ蛋白質

1. 研究開始当初の背景

リポ蛋白質の選別輸送系 Lol システムを構成する因子のうち、LolA と LolB については結

晶構造を解明した。両因子は一方が開いた β バレル型構造で、内部にリポ蛋白質の脂質部分と結合すると考えられる疎水性キ

キャビティーがありリポ蛋白質の結合サイトと推測された。また、リポ蛋白質結合型として LolCDE 複合体を精製する条件を見だし、内膜で起きる初期反応の分子機序について重要な知見を得た。

2. 研究の目的

解明すべき研究課題は、①LolCDE 複合体が、細胞質側で ATP を分解し、ペリプラズム側でリポ蛋白質を遊離する機構、②分子シャペロン LolA がリポ蛋白質と可溶性複合体を形成する機構、③リポ蛋白質受容体 LolB が LolA からリポ蛋白質を受け取り、外膜に定着させる機構、④Lol 因子間の相互作用様式、⑤緑膿菌における Lol システムの機能、ならびにリポ蛋白質選別シグナルの解明などであった。

3. 研究の方法

①緑膿菌の選別シグナルの解析は、N 末端領域に変異を導入したりポ蛋白質を緑膿菌で発現させ、局在の膜特異性を調べる方法と、緑膿菌から精製した Lol 因子をプロテオリポソームに再構成する方法で調べた。②大腸菌 LolCDE を、脂質組成を変えたプロテオリポソームに再構成し選別に与える影響を調べた。③LolC、LolD、LolE をそれぞれ単独に精製しプロテオリポソームに再構成してリポ蛋白質遊離活性を調べた。④反応中間体である基質を結合した LolCDE、LolA、LolB を、それぞれを大量に精製して解析に用いた。⑤LolA と LolB の疎水性キャビティーの解析には、蛍光物質 bis-ANS を用いた。⑥光架橋性のアミノ酸アナログを Lol 因子に導入し、因子間の相互作用を解析した。⑦LolB の機能を解析するため、N 末端が脂質修飾されない変異体

(mLolB) を構築した。

4. 研究成果

①大腸菌とは異なり、緑膿菌では+3位、+4位のアミノ酸残基の組み合わせが選別シグナルであることを初めて明らかにした。この成果は、その後フランスの Pugsley らのグループによる研究を先導した。②ホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルグリセロールは選別シグナルに必須であることを明らかにした。③LolE と LolD のみからリポ蛋白質の遊離活性が再構成でき、最少活性には LolC が不要であることを見出した。個々のサブユニットから活性を再構成した例は ABC トランスポーターでは最初である。④LolA と LolB の疎水性キャビティーはリポ蛋白質の結合により開き、リポ蛋白質を解離すると閉じることを明らかにした。さらに、LolA の閉じた構造のみがリポ蛋白質遊離活性を持つことを示した。⑤LolA が LolB や LolC と相互作用する部位は疎水性キャビティーの入り口であること、LolB が LolA と相互作用する部位も疎水性キャビティーの入り口であることを明らかにした。すなわち LolA から LolB へリポ蛋白質は“口移し”で受け渡されることを初めて明らかにした。⑥LolB には、LolA からリポ蛋白質を受け取る機能、リン脂質と相互作用する機能、結合しているリポ蛋白質をリン脂質層に組み込む機能があることを明らかにした。これらの研究成果により、ATP の無いペリプラズム空間で、効率良くリポ蛋白質が LolA から LolB を経由して外膜に定着する機構の詳細が一段と明らかになった。さらに、ABC トランスポーター LolCE によるリポ蛋白質

遊離反応では、LolC が LolA の結合サイトとして機能し、LolE がリポ蛋白質の結合サイトとして機能することを初めて明らかにした。

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 23 件)

①Nishiyama, K., Maeda, M., Abe, M., Kanamori, T., Shimamoto, K., Kusumoto, S., Ueda, T., and Tokuda, H. A novel complete reconstitution system for membrane integration of the simplest membrane protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 733-736 (2010).

②Tokuda, H. Biogenesis of outer membranes in Gram-negative bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 465-473 (2009).

③ Okuda, S., and Tokuda, H. Model of mouth-to-mouth transfer of bacterial lipoproteins through inner membrane LolC, periplasmic LolA, and outer membrane LolB. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **106**, 5877-5882 (2009).

④Tsukahara, J., Mukaiyama, K., Okuda, S., Narita, S., and Tokuda, H. Dissection of the LolB function; lipoprotein binding, membrane targeting, and incorporation of lipoproteins into lipid bilayers. *FEBS J.* **276**, 4496-4504 (2009).

⑤ Narita, S., and Tokuda, H. Biochemical characterization of an ABC transporter LptBFGC complex required for the outer membrane sorting of lipopolysaccharides. *FEBS Lett.* **583**, 2160-2164 (2009).

⑥Nakada, S., Sakakura, M., Takahashi, H., Okuda, S., Tokuda, H., and Shimada, I. Structural investigation of the interaction between LolA and LolB using NMR. *J. Biol. Chem.* **284**, 24634-24643

(2009).

⑦Yasuda, M., Iguchi-Yokoyama, A., Matsuyama, S., Tokuda, H., and Narita, S. Membrane topology and functional importance of the periplasmic region of ABC transporter LolCDE. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2310-2316 (2009).

⑧Tsukahara, J., Narita, S., and Tokuda, H. Real time analysis of lipoprotein transfer from LolA to LolB by means of surface plasmon resonance. *FEBS Lett.* **583**, 2987-2990 (2009).

⑨Nishiyama, K., and Tokuda, H. Development of a functional *in vitro* integration system for an integral membrane protein, SecE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 920-924 (2009).

⑩ Taniguchi, N., and Tokuda, H. Molecular events involved in a single cycle of ligand transfer from an ATP-binding cassette transporter, LolCDE, to a molecular chaperone, LolA. *J. Biol. Chem.* **283**, 8538-8544 (2008).

⑪Okuda, S., Watanabe, S., and Tokuda, H. A short helix in the C-terminal region of LolA is important for the specific membrane localization of lipoproteins. *FEBS Lett.* **582**, 2247-2251 (2008).

⑫Kawashima, Y., Miyazaki, E., Müller, M., Tokuda, H., and Nishiyama, K. Diacylglycerol specifically blocks spontaneous integration of membrane proteins and allows detection of a factor-assisted integration. *J. Biol. Chem.* **283**, 24489-24496 (2008).

⑬Oguchi, Y., Takeda, K., Watanabe, S., Yokota, N., Miki, K., and Tokuda, H. Opening and closing of the hydrophobic cavity of LolA coupled to lipoprotein binding and release. *J.*

Biol. Chem. **283**, 25414-25420 (2008).

⑭ Watanabe, S., Oguchi, Y., Takeda, K., Miki, K., and Tokuda, H. Introduction of a lethal redox switch that controls the opening and closing of the hydrophobic cavity in LolA. J. Biol. Chem. **283**, 25421-25427 (2008).

⑮ Ito, H., Ura, A., Oyamada, Y., Yoshida, H., Yamagishi, J., Narita, S., Matsuyama, S., and Tokuda, H. A new screening method to identify inhibitors of Lol (localization of lipoproteins) system, a novel antibacterial target. Microbiol. Immunol. **51**, 263-270 (2007).

⑯ Narita, S., and Tokuda, H. Amino acids at positions 3 and 4 determine the membrane specificity of *Pseudomonas aeruginosa* lipoproteins. J. Biol. Chem. **282**, 13372-13378 (2007).

⑰ Tanaka, S., Narita, S., and Tokuda, H. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* Lol system as a lipoprotein sorting mechanism. J. Biol. Chem. **282**, 13379-13384 (2007).

⑱ Miyamoto, S., and Tokuda, H. Diverse effects of phospholipids on lipoprotein sorting and ATP hydrolysis by the ABC transporter LolCDE complex. Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes **1768**, 1848-1854 (2007).

⑲ Kanamaru, K., Miyamoto, S., Narita, S., and Tokuda, H. Complete reconstitution of an ATP-binding cassette transporter LolCDE complex from separately isolated subunits. FEBS J. **274**, 3034-3043 (2007).

⑳ Watanabe, S., Oguchi, Y., Yokota, N., and Tokuda, H. Large-scale preparation of the homogeneous LolA-lipoprotein complex and efficient in vitro transfer of lipoproteins to the outer membrane in a LolB-dependent manner. Protein Sci. **16**, 2741-2749

(2007).

[学会発表] (計 3 件)

① Tokuda, H. Sorting of lipoproteins to the outer membrane of Gram-negative bacteria. Final Keynote Address, FEBS Special Meeting "ATP-binding cassette proteins: from multidrug resistance to genetic diseases", February 27-March 5, 2010, Innsbruck, Austria

② Tokuda, H. Molecular events involved in a single cycle of ligand transfer from an ATP-binding cassette transporter LolCDE to a molecular chaperone LolA. FEBS Special Meeting "ATP-binding cassette proteins: from multidrug resistance to genetic diseases", March 1-8, 2008, Innsbruck, Austria

③ Tokuda, H. Sorting of lipoproteins to the outer membrane of Gram-negative bacteria. The 2007 ASBMB meeting, April 28-May 2, 2007, Washington DC, USA

[図書] (計 4 件)

① Narita, S., and Tokuda, H. Sorting of bacterial lipoproteins to the outer membrane by the Lol system. In "Methods in Molecular Biology; Protein Secretion", A. Economou (ed), Humana press, pp. 117-129 (2010).

② Narita, S., and Tokuda, H. Biogenesis and membrane targeting of lipoproteins. In "*E. coli* and *Salmonella*", Tracy Palmer (ed), ASM Press.

③ Tokuda, H., Matsuyama, S., and Tanaka-Masuda, K., Structure, function and transport of lipoproteins in *Escherichia coli*. In "The Periplasm", M. Ehrmann (ed), ASM press, pp. 67-79 (2007).

④ Narita, S., and Tokuda, H. The function of the ABC transporter LolCDE in protein transport to

the outer membrane of *E. coli*. in *The Enzymes*, vol. 25, pp. 149-172 (2007).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：大腸菌膜タンパク質挿入因子

発明者：西山賢一、徳田元、植田卓也、金森

崇、楠本正一、前田将秀、島本啓子

権利者：サントリーホールディングス株式会社

種類：特許

番号：特願 2010-048520

出願年月日：平成 22 年 3 月 5 日

国内外の別：国内

○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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳田 元 (TOKUDA HAJIME)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：4 0 1 2 5 9 4 3

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し