

平成 23 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20780050

研究課題名 (和文) 緑膿菌リポ蛋白質の選択的局在化を支える分子機構の解析

研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of lipoprotein-sorting in *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

成田 新一郎 (NARITA SHIN-ICHIRO)

京都大学・ウイルス研究所・特定助教

研究者番号：30338751

研究成果の概要 (和文)：緑膿菌などのグラム陰性細菌の内膜と外膜には、脂質で修飾されたりリポ蛋白質が存在する。それぞれのリポ蛋白質がどちらの膜に局在するかは厳密に規定されている。緑膿菌ではリポ蛋白質の 3 番目と 4 番目のアミノ酸残基が膜局在性を規定していることが明らかになっているが、そのルールは不明である。緑膿菌リポ蛋白質の局在化ルールを解明するために、3 番目と 4 番目のアミノ酸をランダムに置換し、内膜局在化シグナルとして働く組み合わせを選択した。その結果、Lys、Glu など電荷を持つアミノ酸が 3 番目の位置にあると、リポ蛋白質が内膜に局在化することがわかった。

研究成果の概要 (英文)：Lipoproteins are located either in the inner or outer membranes of gram-negative bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*. Membrane localization of lipoproteins in *P. aeruginosa* is strictly determined by the residues at positions 3 and 4. To establish the sorting rule for lipoproteins in *P. aeruginosa*, combinations of amino acids at positions 3 and 4 that function as inner membrane retention signals for lipoproteins were selected. It turned out that charged residues such as Lys and Glu present at position 3 caused inner membrane retention of lipoproteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物学、細菌細胞表層、緑膿菌、薬剤耐性、リポ蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質の輸送・局在化は細胞機能に必須の生命活動であり、その機構に関する研究は多

種多様な生物を対象として行われている。細菌蛋白質が細胞内あるいは細胞外へ輸送される仕組みを解明することは、単に生物学的な興味に答えるにとどまらず、細菌感染症の

克服を目指す医学上の命題、更には細菌を利用した物質生産といった産業上の要求にも応えるものである。特にグラム陰性細菌の外膜に存在する蛋白質は、細胞質で合成された後に内膜とペリプラズム空間を經由して外膜に局在化するため、その輸送機構は複雑で、遺伝学、生化学、構造生物学など様々な手法を用いた研究が国内外で進められている。また、病原性細菌では外膜は宿主と直接相互作用する器官であり、外膜に存在する蛋白質が宿主の免疫応答を引き起こすことが知られている。外膜はグラム陰性細菌の生育に必須であるため、蛋白質を外膜に輸送する装置を標的とした抗生物質の開発が期待されている。

外膜を構成する4つの因子(リン脂質、リポ多糖、外膜蛋白質、リポ蛋白質)はすべて細菌の生育に必須である。外膜蛋白質とリポ蛋白質の輸送機構は特に理解が進んでいる。リポ蛋白質はアミノ末端のCysが脂質で修飾された蛋白質の総称であり、グラム陰性細菌では内膜と外膜に存在している。これまでに大腸菌外膜リポ蛋白質の輸送に関わる5つの因子LolA~Eが同定され、生化学的、構造生物学的解析によってリポ蛋白質の輸送機構が詳細に解析されている。大腸菌ではリポ蛋白質のアミノ末端から2番目(+2位)の残基がAspであれば、そのリポ蛋白質は内膜に局在することが知られている。これは、LolCDE複合体が+2位にAspを持つリポ蛋白質を認識しないためと考えられている。一方、+2位にAsp以外の19種類のアミノ酸を持つリポ蛋白質は、すべてがLolCDEに認識され、LolA、LolBと受け渡されて外膜に局在化する。*in vitro*の解析の結果、内膜のリン脂質の組成を変えると+2位にAspを持つリポ蛋白質がLolCDEに認識されるようになることから、リン脂質とAspの相互作用の重要性が示唆されている。一方、大腸菌以外の細菌では、内膜リポ蛋白質の+2位は必ずしもAspにはなっていない。研究代表者は、緑膿菌では+2位ではなく+3位と+4位の残基によってリポ蛋白質の膜局在性が規定されていることを明らかにした。さらに、5つのLol因子が緑膿菌においてもリポ蛋白質の外膜局在化を担っていることを、*in vitro*で輸送活性を測定して明らかにするとともに、LolCDEがリポ蛋白質の局在化シグナルの認識に関与していることを示した。

## 2. 研究の目的

本研究では緑膿菌の外膜に存在する蛋白質のうち、リポ蛋白質に注目し、これらがどのような分子機構で内膜から外膜まで輸送されるかを、基質と輸送装置の両面から解明することを目的とした。緑膿菌ゲノムは185

種類のリポ蛋白質をコードするORFを有している。このうち膜局在性がわかっているリポ蛋白質は30種類程度であるが、内膜リポ蛋白質、外膜リポ蛋白質のいずれの+3位、+4位にも保存された残基は存在しない。すなわち、緑膿菌においてリポ蛋白質の膜局在性を決めている領域は明らかになったが、そのルールが未解明である点であった。本研究では、リポ蛋白質の+3位、+4位の残基に特異的に変異を導入することにより、局在化シグナルを網羅的に解析し、そこからルールを導き出すことを目的とした。一方、リポ蛋白質の膜局在性を規定する輸送装置の側から述べると、LolCDEが局在化シグナルの認識に関わることが明らかになっている。そこで二つの課題としてLolCDEがいかんにして2つのアミノ酸残基の組合せを認識してリポ蛋白質を選別し、局在化させるかを明らかにすることを目的とした。

グラム陰性細菌のリポ蛋白質は内膜に留まるものと外膜まで輸送されるものが内膜上で選別される。ただし、外膜リポ蛋白質がLolCDEに認識されるためのシグナルを持っているとは限らない。寧ろ、内膜に留まるリポ蛋白質がLolCDEに認識されないためのシグナルを持っている可能性もある。LolCDEとシグナルとの相互作用機構の解析を通じて、これらのシグナルの機能を解明することを期待した。+3位、+4位の2つのアミノ酸残基からなるシグナルと、1つの輸送装置がいかんにして選択的な輸送を支えているかを理解することは、他の蛋白質の輸送装置における基質認識機構を理解する上でも役立つものと考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) 緑膿菌におけるリポ蛋白質の局在化ルールの解析

緑膿菌のリポ蛋白質であるMexAが内膜に局在するとMexAB-OprM多剤排出ポンプが機能を発揮するのに対し、MexAが外膜に局在すると排出ポンプが機能しない(図1)。こ

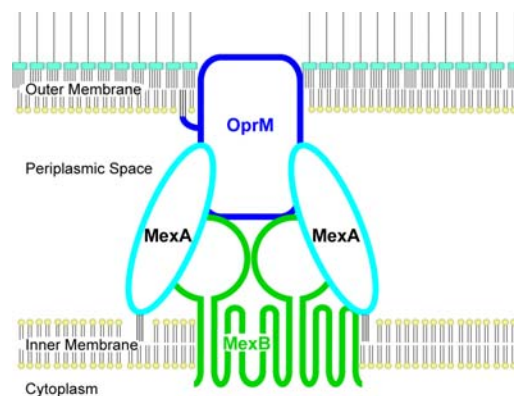


図1. MexA-OprM多剤排出ポンプの模式図

れを利用して、緑膿菌リポ蛋白質の局在を *in vivo* で評価した。*mexA* 遺伝子を欠損する緑膿菌に *MexA* 変異体をコードするプラスミドを導入し、菌の薬剤感受性を測定することによって *MexA* 変異体が内膜/外膜のどちらに局在しているかを判定することができる。+3 位、+4 位をランダムに置換した *MexA* 変異体をコードするプラスミドライブラリーを構築して緑膿菌に導入し、薬剤耐性クローンを単離した。次にこれらのクローンの塩基配列を決定し、内膜局在化シグナルとして機能する残基をリストアップした。*MexAB-OprM* ポンプを構成する *OprM* もまたリポ蛋白質であり、*OprM* の外膜局在化は排出ポンプの機能に必須であると考えられる。これを利用して、外膜局在化シグナルとして機能する+3 位、+4 位残基をリストアップした。

## (2) LolCDE によるリポ蛋白質局在化シグナル認識機構の解析

大腸菌 LolCDE は ATP 非存在下では一部がリポ蛋白質との複合体として精製される。これはリポ蛋白質遊離反応における中間体と考えられ、LolCDE によるリポ蛋白質認識機構を解析する上で新たな実験系となることが期待されている。これまでの研究により、大腸菌で発現させた緑膿菌 LolCDE を ATP 非存在下で精製すると外膜リポ蛋白質である Pal が含まれていることが明らかになっている。本研究では+3 位、+4 位の残基を置換したリポ蛋白質を LolCDE とともに緑膿菌内で過剰発現させ、LolCDE とともに共精製されるリポ蛋白質を検出することにより、局在化シグナルと LolCDE の相互作用機序を解析した。

## 4. 研究成果

(1) +3 位、+4 位をランダムに置換した *MexA* 変異体をコードするプラスミドライブラリーを構築して緑膿菌に導入し、薬剤耐性となった形質転換体を 192 個分離した(図2)。塩基配列を決定した結果、これらの中には 94 通りのアミノ酸配列が含まれていた。+3 位で

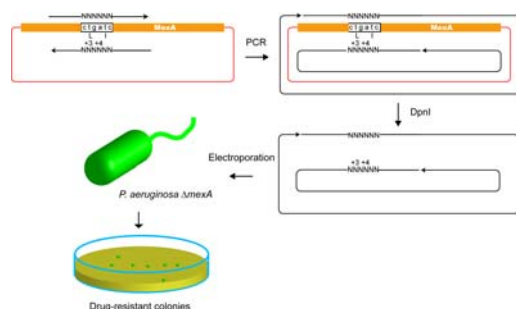


図2. 内膜シグナルを持つリポ蛋白質の選択

は Lys、Glu など親水性の高い残基が比較的多かったのに対し、+4 位では Ser、Thr が多く見られた(図3)。+3 位の Lys と+4 位の Ser

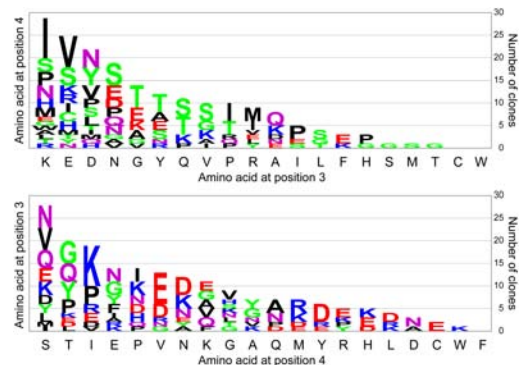


図3. 選択された *MexA* の+3 位、+4 位残基

に着目して、系統的な解析を行ったところ、+3 位が Lys のとき、+4 位を 20 種類のアミノ酸に置換した *MexA* 変異体の中では、+4 位に Cys を持つ変異体でのみ薬剤耐性の低下が見られた。一方、+4 位が Ser である場合は、+3 位に Cys または Trp を持つ *MexA* 変異体の薬剤耐性が低下していた。細胞を分画してこれらの *MexA* 変異体の膜局在性を決定したところ、Lys-Cys および Cys-Ser 配列を持つ *MexA* 変異体は内膜に、Trip-Ser 配列を持つ *MexA* 変異体は外膜に局在していた。+3 位または+4 位に Cys を持つ変異体は *MexA* 分子間でジスルフィド結合を形成するために薬剤排出ポンプの活性が低下したと考えられる。一方、+3 位の Trp は単独で外膜シグナルとして機能することが明らかとなった。また、外膜リポ蛋白質 *OprM* の+3 位、+4 位を内膜局在化シグナルである Lys-Ser に置換したところ、この変異体の薬剤耐性の低下は僅かであった。*OprM* は外膜で  $\beta$ -バレル構造をとることが知られており、*OprM* の外膜局在化が+3 位、+4 位残基よりも蛋白質部分の性質に依存していることが示唆された。

(2) 緑膿菌 LolCDE を緑膿菌で発現させて精製し、ATPase 活性とリポ蛋白質遊離活性を保持していることを確認した。ATP 存在下で精製した LolCDE の精製画分には外膜リポ蛋白質 *OprL* は検出されなかったのに対して、ATP 非存在下で精製した LolCDE の精製画分には *OprL* が検出された。これは LolCDE による外膜リポ蛋白質輸送の中間体と考えられ、ATP 存在下では LolCDE のリポ蛋白質に対する親和性が低下するためにリポ蛋白質が解離したと考えられる。

LolCDE とリポ蛋白質の相互作用を解析するために、人工リポ蛋白質 *LipoMalE* の+3 位、+4 位を置換し外膜シグナルとした *LipoMalE*(SLI)、および内膜シグナルとした

LipoMalE(SKS)をコードするプラスミドを導入し、緑膿菌においてこれらのリポ蛋白質と LolCDE を共発現させた。ATP 非存在下で LolCDE を精製したところ、LipoMalE は+3 位、+4 位のアミノ酸に関わらず LolCDE と共精製されたのに対し、ATP 存在下で精製した LolCDE では LipoMalE の結合量は減少した。このことから ATP の結合によって LolCDE の LipoMalE に対する親和性が低下することが示唆された。

ATP 非存在下では、LipoMalE(SKS)の結合量は LipoMalE(SLI)より少なかったことから、LolCDE はリポ蛋白質を結合するステップにおいて内膜リポ蛋白質と外膜リポ蛋白質を選別する可能性が示唆された。一方で、内膜シグナルを持つ LipoMalE(SKS)の一部は LolCDE と結合したことから、LolCDE がリポ蛋白質を遊離するステップにおいても選別を行っている可能性も示唆された。

近年、 $\beta$ -バレル型外膜蛋白質を外膜に組み込む機能を持つ外膜リポ蛋白質が 4 種同定され、外膜の生合成におけるリポ蛋白質の重要性が特に注目されている。これらのリポ蛋白質はグラム陰性細菌の生育に極めて重要であることから、リポ蛋白質の外膜輸送装置は新たな抗生物質のターゲットとして有望である。また、緑膿菌などの院内感染起因菌では、多剤排出ポンプの高発現による抗生物質への耐性化が問題となっている。多くの場合、リポ蛋白質が排出ポンプの構成因子となっている。したがって、本研究で得られた知見を基にリポ蛋白質の輸送装置に対する阻害剤が開発されれば、耐性化した菌に対して従来の抗生物質を再び使用することが期待できる。

リポ蛋白質の+3 位、+4 位が膜局在性を規定するというルールは、緑膿菌以外のグラム陰性細菌においても広く保存されていると予想される。本研究でシグナルの全体像を明らかにしたことで、多くの機能未知のリポ蛋白質の各々について局在情報を与えることが可能になった。特に外膜に局在するリポ蛋白質に関する情報は、病原性細菌に対する抗生物質やワクチンのターゲットを探索する上でも有用と考えられる。

#### 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 8 件)

- ① Shin-ichiro Narita. ABC transporters involved in the biogenesis of the outer membrane in gram-negative bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有 doi:10.1271/bbb.110115 (2011)

- ② Chihiro Sakamoto, Rika Satou, Hajime Tokuda and Shin-ichiro Narita. Novel mutations of the LolCDE complex causing outer membrane localization of lipoproteins despite their inner membrane retention signals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 401: 586-591 (2010)
- ③ Kazuyuki Tao, Shoji Watanabe, Shin-ichiro Narita and Hajime Tokuda. A periplasmic LolA derivative with a lethal disulfide bond activates the Cpx stress response system. *J. Bacteriol.* 査読有 192: 5657-5662 (2010)
- ④ Yuji Morita, Shin-ichiro Narita, Junko Tomida, Hajime Tokuda and Yoshiaki Kawamura. Application of an inducible system to engineer unmarked conditional mutants of essential genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol. Methods.* 査読有 82: 205-213 (2010)
- ⑤ Shin-ichiro Narita and Hajime Tokuda. Biochemical characterization of an ABC transporter LptBFGC complex required for the outer membrane sorting of lipopolysaccharide. *FEBS Lett.* 査読有 583: 2160-2164 (2009)
- ⑥ Jun Tsukahara, Keita Mukaiyama, Suguru Okuda, Shin-ichiro Narita and Hajime Tokuda. Dissection of the LolB function; lipoprotein binding, membrane targeting, and incorporation of lipoproteins into lipid bilayers. *FEBS J.* 査読有 276: 4496-4504 (2009)
- ⑦ Masaki Yasuda, Asako Iguchi-Yokoyama, Shin-ichi Matsuyama, Hajime Tokuda and Shin-ichiro Narita. Membrane topology and functional importance of the periplasmic region of ABC transporter LolCDE. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有 73: 2310-2316 (2009)
- ⑧ Jun Tsukahara, Shin-ichiro Narita and Hajime Tokuda. Real time analysis of lipoprotein transfer from LolA to LolB by means of surface plasmon resonance. *FEBS Lett.* 査読有 583: 2987-2990 (2009)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 成田新一郎、大腸菌リポ蛋白質の外膜局在化に関わる ABC トランスポーターの解析、2010 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの細胞構築と増殖制御の

研究」2011年3月31日、三島

- ② Shin-ichiro Narita and Hajime Tokuda. Overexpression of LolCDE suppresses the growth defect of an *Escherichia coli* mutant that lacks apolipoprotein *N*-acyltransferase. The 3rd International Symposium on Protein Community. 2010年9月13日. Nara
- ③ 成田新一郎、 グラム陰性細菌の細胞表層形成に關与するABCトランスポーターの研究、日本農芸化学会關東支部 2010年度第1回支部例会、2010年7月17日、つくば
- ④ 成田新一郎、 徳田元、細菌リポタンパク質の外膜局在化を司るABCトランスポーターLolCDEの機能、第5回トランスポーター研究会、2010年7月11日、東京
- ⑤ 成田新一郎、 グラム陰性細菌の細胞表層形成に關与するABCトランスポーターの研究、日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月27日、東京
- ⑥ 林裕美、成田新一郎、 徳田元、リポ蛋白質外膜挿入活性におけるLolBのLeu68の役割、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日、横浜
- ⑦ 森田雄二、成田新一郎、 富田純子、河村好章、緑膿菌生存必須遺伝子破壊株構築法の開発：ABC輸送系遺伝子lolCDE破壊株の構築、第46回日本細菌学会中部支部総会、2009年10月23-24日、名古屋
- ⑧ 伊藤博光、阿倍泰子、成田新一郎、 徳田元、大腸菌外膜リポ蛋白質YfgLの機能解析、第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会、2008年12月10日、神戸
- ⑨ 森田雄二、成田新一郎、 富田純子、河村好章、緑膿菌リポタンパク質特異的ABCトランスポーターLolCDEの条件的in-frame欠失体構築の試み、第45回日本細菌学会中部支部総会、2008年10月17日、金沢
- ⑩ Shin-ichiro Narita, Kotomi Ishimaru and Hajime Tokuda. Genetic selection of inner-membrane sorting signals for the MexA lipoprotein, which constitutes RND efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. Gordon Research Conference on Bacterial Cell Surfaces. 2008年6月22日-27日. New London, NH, USA

〔図書〕(計2件)

- ① Shin-ichiro Narita and Hajime Tokuda. Sorting of bacterial lipoproteins to the outer membrane by the Lol system. A. Economou (ed.), Protein secretion: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology Vol. 619) Chapter 7. Humana Press (Totowa, USA) (2010)
- ② Shin-ichiro Narita and Hajime Tokuda. Biogenesis and membrane targeting of lipoproteins. A. Böck, R. Curtiss III, J. B. Kaper, P. D. Karp, F. C. Neidhardt, T. Nyström, J. M. Slauch, C. L. Squires, and D. Ussery (ed.), EcoSal—*Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Chapter 4.3.7. ASM Press (Washington, DC, USA) (2010)

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/akiyama/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

成田 新一郎 (NARITA SHIN-ICHIRO)  
京都大学・ウイルス研究所・特定助教  
研究者番号：30338751

### (2) 研究協力者

徳田 元 (TOKUDA HAJIME)  
盛岡大学・栄養科学部・教授  
石丸 琴美 (ISHIMARU KOTOMI)  
東京大学・農学生命科学研究科・大学院生  
寺崎 健士 (TERASAKI TAKESHI)  
東京大学・農学生命科学研究科・大学院生