

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 11 月 30 日現在

機関番号：31203

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2010～2014

課題番号：22380049

研究課題名(和文)細菌リポ蛋白質の選別・輸送・膜組み込みの分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms underlying the sorting of bacterial lipoproteins.

研究代表者

徳田 元 (Tokuda, Hajime)

盛岡大学・栄養学部・教授

研究者番号：40125943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：細菌表層構造の形成には、リポ蛋白質を正しく外膜に局在化することが必須である。細菌リポ蛋白質を内膜から外膜に選別して輸送するLolシステムについて、以下を明らかにした。(1)膜蛋白質LolCとLolEの機能の解明。(2)内膜LolCDE複合体、ペリプラズムLolA、外膜LolBが関与するリポ蛋白質選別輸送機構の詳細の解明。(3)リポ蛋白質輸送の欠陥が、ストレス応答系を発動することの発見。(4)膜へのターゲティングに重要なLolBの部分構造の解明。(5)LolCとLolEを標的とする薬剤の開発。

研究成果の概要(英文)：The Lol system catalyzing the sorting of lipoproteins from the inner to outer membranes was studied and the following five major findings were obtained. (1) LolC and LolE are functionally different to each other although their structures are similar. (2) Detailed molecular events involving lipoproteins, LolCDE, LolA, and LolB were revealed. (3) Defective lipoprotein sorting induces the Rcs stress response system. (4) The site of LolB required for membrane targeting was identified. (5) Chemicals, which inhibit the function of LolC and LolE, were found.

研究分野：生化学

キーワード：Lolシステム リポ蛋白質 膜局在化 ペリプラズム 分子シャペロン 細胞表層構造 ABCトランスポーター 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性細菌の外膜は、リン脂質、リポ多糖、バレル型蛋白質、並びにリポ蛋白質を主要な構成要素とする生体膜である。これらの要素が外膜に運ばれる機構は、細菌研究の基礎および応用分野において最重要課題の一つとなっている。本研究は申請者が世界に先駆けてその概略を明らかにしたりポ蛋白質選別輸送機構 Lol システムの分子機構を詳細に明らかにすることを目的としたものである。

研究開始当初、Lol システムは5種類の Lol 因子からなること、内膜(細胞質膜)には、LolC、LolD、LolE からなる ABC トランスポーター複合体があり、ATP のエネルギーによって外膜特異的リポ蛋白質を遊離し、その結果ペリプラズム因子 LolA とリポ蛋白質の複合体ができること、LolA は外膜にアンカーしたりポ蛋白質 LolB にリポ蛋白質を受け渡し、LolB の働きでリポ蛋白質は外膜に組み込まれること、LolA と LolB は疎水性キャビティーを持つよく似た構造の蛋白質であること、などを明らかにしていた。

2. 研究の目的

(1) ABC トランスポーターを構成する膜サブユニット LolC と LolE は互いに構造がよく似ている。LolC と LolE の機能分担を明らかにする。

(2) LolB による膜組み込み機構をさらに分子レベルで明らかにする。

(3) Lol システムを標的とする薬剤の開発。

(4) 膜蛋白質を挿入する機構と Lol システムとの類似性、相違性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 光架橋性のアミノ酸アナログを導入し、LolC と LolE がどのような機能を果たしているかを調べる。また、因子間の相互作用がリポ蛋白質の結合でどのような影響を受けるかを明らかにする。

(2) リポ蛋白質局在化の最終段階を触媒する LolB の分子機構を調べる。

(3) 米国の製薬会社が見いだしたりポ蛋白質輸送を阻害すると推測される薬剤の作用点を明らかにする。

(4) 膜蛋白質を膜に挿入する因子 MPIase の作動機構について in vitro 実験系で解析する。

4. 研究成果

(1) LolC は LolA とのみ、LolE はリポ蛋白質とのみ相互作用し、構造が似ている因子間で明確な機能分担があることが明らかになった。また、LolC-LolA 間の相互作用は、LolA がリポ蛋白質を結合すると観察されなくなった。すなわちリポ蛋白質の逆行輸送が起こらない機構である。

(2) LolB の結晶構造から、分子外に突き出ているループの機能に着目しここに存在す

る Leu を Glu に変えた変異体を作成したところ、膜への組み込み機能がなくなることを示した。すなわち突き出たループ中の疎水性残基が膜組み込みに重要であることを明らかにした。

(3) LolC と LolE が薬剤の標的であることをリポ蛋白質の輸送実験系を用いて明らかにした。また、変異体では薬剤抵抗性になることを示した。

(4) MPIase がなく蛋白質の膜挿入を著しく促進し、この促進と Sec 因子の構造変化が協約していることを示した。

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16件)

Narita, S., and Tokuda, H. Biogenesis and membrane targeting of lipoproteins. Chapter 4.3.7. In "Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology." Böck, R. Curtiss III, J. B. Kaper, P. D. Karp, F. C. Neidhardt, T. Nyström, J. M. Slauch, and C. L. Squires, and D. Ussery (ed), ASM Press. Washington, DC. doi: 10.1128/ecosal.4.3.7 (online journal).

Nishiyama, 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). doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.061

Morita, Y., Narita, S., Tomida, J., Tokuda, H., and Kawamura, Y. Application of an inducible system to engineer unmarked conditional mutants of essential genes of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Microbiol. Methods **82**, 205-213 (2010). doi:10.1016/j.mimet.2010.06.001

Tao, K., Watanabe, S., Narita, S., and Tokuda, H. A periplasmic LolA derivative with a lethal disulfide bond activates the Cpx stress response system. J. Bacteriol. **192**, 5657-5662 (2010). doi:10.1128/JB.00821-10

Nishiyama, K., and Tokuda, H. Preparation of a highly translocation-competent proOmpA/SecB

complex. *Protein Sci.* **19**, 2402–2408, (2010).
doi:10.1002/pro.520

Sakamoto, C., Satou, R., Tokuda, H., and Narita, S. Novel mutations of the LolCDE complex causing outer membrane localization of lipoproteins despite their inner membrane retention signals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **401**, 586–591 (2010).
doi:10.1016/j.bbrc.2010.09.106

Okuda, S., and Tokuda, H. Lipoprotein Sorting in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 239–259 (2011).
doi:10.1146/annurev-micro-090110-102859

Narita, S., and Tokuda, H. Overexpression of LolCDE allows deletion of the *Escherichia coli* gene encoding apolipoprotein N-acyltransferase. *J. Bacteriol.* **193**, 4832–4840 (2011).
doi:10.1128/JB.05013-11

Morita, K., Tokuda, H., and Nishiyama, S. Multiple SecA molecules drive protein translocation across a single translocon with SecG inversion. *J. Biol. Chem.* **287**, 455–464 (2012).
doi:10.1074/jbc.M111.301754

Tao, K., Narita, S., and Tokuda, H. Defective lipoprotein sorting induces *lola* expression through the Rcs stress response phosphorelay system. *J. Bacteriol.* **194**, 3643–3650 (2012).
doi:10.1128/JB.00553-12

Nishiyama, K., Maeda, M., Yanagisawa, K., Nagase, R., Komura, H., Iwashita, T., Kusumoto, S., Tokuda, H., and Shimamoto, K. MPIase is a glycolipozyme essential for membrane protein integration. *Nature Communications* **3**, 1260 | DOI: 10.1038/ncomms2267 (2012).

Mizutani, M., Mukaiyama, K., Xiao, J., Mori, M., Satou, R., Narita, S., Okuda, S., and Tokuda, H. Functional differentiation of structurally similar membrane subunits of the ABC transporter LolCDE complex. *FEBS Lett.* **587**,

23–29 (2013).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.11.009>

Moser, M., Nagamori, S., Huber, M., Tokuda, H., and Nishiyama, K. Glycolipozyme MPIase is essential for topology inversion of SecG during preprotein translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **110**, 9734–9739 (2013). doi:
10.1073/pnas.1303160110

Hayashi, Y., Tsurumizu, R., Tsukahara, J., Takeda, K., Narita, S., Mori, M., Miki, K., and Tokuda, H. Roles of the protruding loop of factor B essential for the localization of lipoproteins (LolB) in the anchoring of bacterial triacylated proteins to the outer membrane. *J. Biol. Chem.*, **289**, 10530–10539 (2014). DOI
10.1074/jbc.M113.539270

McLeod, S. M., Fleming, P. R., MacCormack, K., McLaughlin, R. E., Whiteaker, J. D., Narita, S., Mori, M., Tokuda, H., and Miller, A. A. Small molecule inhibitors of Gram-negative lipoprotein trafficking discovered by phenotypic screening. *J. Bacteriol.*, **197**, 1075–1082 (2015). doi:
10.1128/JB.02352-14

Nayar, A. S., Dougherty, T. J., Ferguson, K. E., Granger, B. A., McWilliams, L., Stacey, C., Leach, L. J., Narita, S., Tokuda, H., Miller, A. A., Brown, D. G., and McLeod, S. M. Novel antibacterial targets and compounds revealed by a high throughput cell wall reporter assay. *J. Bacteriol.*, **197**, 1726–1734 (2015).
doi:10.1128/JB.02552-14

{ 学会発表 } (計 2 件)

Tokuda, H. How does the LolCDE complex recognize and release bacterial lipoproteins from the cytoplasmic membrane? The JSPS/iCeMS International Symposium“ ABC2011 in Kyoto—ABC Proteins/Membrane Meso-domains/ES-iPS cells”_Nov 16 -17, 2011, Kyoto University, Japan

Tokuda, H. FEBS Special Meeting
“ATP-binding cassette proteins: from
multidrug resistance to genetic diseases”,
February 27-March 5, 2010, Innsbruck,
Austria

〔 図書 〕 (計 2 件)

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). ISBN: 978-1-60327-167-7

Tokuda, H., Sander, P., Lee, B. L., Okuda, S., Grau, T., Tschumi, A., Brülle, J. K., Kurokawa, K., and Nakayama, H. In “Bacterial Membranes: Structural and Molecular Biology”. Bacterial lipoproteins; biogenesis, trafficking and function. pp. 133-177, Han Remaut and Rémi Fronzes, eds, Caister Academic Press, Norfolk, UK (eBook, 2013; print, 2014), ISBN: 978-1-908230-27-0

〔 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 :
出願年月日 :
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/tokuda_lab/members.html

6 . 研究組織
(1)研究代表者

徳田 元 (TOKUDA HAJIME)
盛岡大学・栄養科学部・教授
研究者番号 : 4 0 1 2 5 9 4 3

(2)研究分担者
無し ()

研究者番号 :

(3)連携研究者
無し ()

研究者番号 :