

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780062

研究課題名（和文） 細菌リポ蛋白質の輸送装置による基質認識機構の解明

研究課題名（英文） Mechanism of substrate recognition by bacterial lipoprotein transport equipment

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）：グラム陰性細菌のリポ蛋白質は細胞質で前駆体として合成され、Sec 膜透過装置の作用で内膜を透過した後、内膜に存在する酵素群の作用で成熟体となる。Lnt はリポ蛋白質生合成の最終段階でアミノ末端システインのアミノ基にアシル鎖を付加する酵素である。Lnt はグラム陰性細菌の生育に必須であると考えられていたが、本研究ではリポ蛋白質特異的 ABC トランスポーター LolCDE を過剰発現させることにより、Lnt 遺伝子を欠失する大腸菌を作製することに成功し、アミノ末端にアシル鎖を持たない「アポリポ蛋白質」とリポ蛋白質輸送因子(Lol 因子)との相互作用を解析した。

研究成果の概要（英文）：Bacterial lipoproteins represent a subset of membrane-associated proteins that are covalently modified with lipids at the N-terminal cysteine. The final step of lipoprotein modification, N-acylation of apolipoproteins, is mediated by Lnt. *lnt* null strains could be constructed when LolCDE was overproduced in strains lacking either the major outer membrane lipoprotein Lpp or transpeptidases that cross-link Lpp with peptidoglycan. We revealed that affinity of LolCDE for apolipoprotein is very low, and therefore overexpression of LolCDE is required for its release and sorting to the outer membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：細菌細胞表層・ABC トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

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越えて外膜に達するため、その輸

送機構は複雑で、様々な実験手法を用いた研究が国内外で進められている。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。また、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。

外膜には2種類の蛋白質が存在する。ひとつはいわゆる外膜蛋白質であり、 β -バレル構造を形成して外膜を貫通する。もうひとつはアミノ末端のシステインが脂質で修飾されたリポ蛋白質で、脂質部分を介して膜に結合している。リポ蛋白質は細胞質で前駆体として合成され、Sec 膜透過装置の作用で内膜を透過した後、内膜に存在する3つの酵素(Lgt、LspA、Lnt)の作用で成熟体となる。まず、Lgt はリポ蛋白質前駆体のアミノ末端領域にあるシステインのSH基にジアシルグリセロールを付加する。次いでLspAがシグナルペプチドを切断し、さらにLntが新たにアミノ末端となったシステインのアミノ基にアシル鎖を付加する。その結果、成熟体リポ蛋白質はアミノ末端のシステインのSH基に付加された2本のアシル鎖と、アミノ基に付加された1本のアシル鎖を介して内膜に結合した状態になる。その後、成熟体リポ蛋白質は内膜に存在するABCトランスポーターLolCDE複合体の作用により内膜から遊離し、ペリプラズムのLolAと水溶性の複合体を形成する。次いでリポ蛋白質は外膜のLolBの作用で外膜に組み込まれる。

2. 研究の目的

リポ蛋白質は外膜の生合成に必須であり、リポ蛋白質の生合成および輸送に関わる遺伝子も全て大腸菌の生育に必須であることがわかっている。しかし、個々の輸送因子がいかんしてリポ蛋白質を認識、結合し、次の輸送因子に受け渡すかについては明らかにされていない。これらの課題に取り組むには、リポ蛋白質生合成の変異株を用いることが有効であるが、リポ蛋白質の生合成に関わる遺伝子は必須であるため、*in vivo*でリポ蛋白質の分子構造を変化させて輸送や機能を解析することはできなかった。本研究ではLolCDEを過剰発現させることにより、Lnt遺伝子を欠失する大腸菌を作製し、アミノ末端にアシル鎖を持たない「アポリポ蛋白質」とLol因子との相互作用を解析することにより、リポ蛋白質のどのような構造が個々のLol因子によって認識され輸送されるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Lnt欠失株におけるリポ蛋白質の膜局在性を解析し、アミノ基のアシル化(*N*-acylation)を欠くことによるリポ蛋白質の選別および外膜局在化への影響を検討した。リポ蛋白質の膜局在性は、アミノ末端の次(+2位)のアミノ酸によって規定されており、+2位がアス

パラギン酸のリポ蛋白質は内膜に、それ以外のアミノ酸であれば外膜に選別されて局在化する。Lnt欠失株の膜画分をショ糖密度勾配遠心法によって内膜と外膜を分画し、リポ蛋白質をウェスタンブロッティングにより検出して膜局在性を決定した。更に、リポ蛋白質の外膜局在化反応の各ステップを、Lnt欠失株を用いて解析した。

4. 研究成果

主要外膜リポ蛋白質Lppを欠損する大腸菌変異株においてLolCDEを過剰発現したところ、Lnt遺伝子を欠失する大腸菌(Δ Lnt株)を構築することができた。この株で発現させたリポ蛋白質は分子量が小さく、エドマン分解によるアミノ酸配列の分析が可能であったことから、アポリポ蛋白質と確認された。 Δ Lnt株の膜画分をショ糖密度勾配遠心法によって内膜と外膜を分画し、イムノブロッティングにより検出したところ、アポリポ蛋白質は正常に外膜に局在していたが、一過的に過剰発現させたapoLppは大部分が内膜に蓄積した。 Δ Lnt株をスフェロプラスト化した後にリポ蛋白質を合成させ、LolAに依存して培地中に遊離するリポ蛋白質を検出したところ、アポリポ蛋白質の内膜からの遊離効率は著しく低下していた。大腸菌の内膜を調製しATP非存在下でLolCDEを膜から可溶化し精製すると、輸送途中のリポ蛋白質を結合したLolCDEが得られることが知られるが、アポリポ蛋白質を結合したLolCDEは検出されなかった。このことからLolCDEのアポリポ蛋白質に対する親和性は低いことがわかった。以上の結果から、グラム陰性細菌のリポ蛋白質はLntによるアミノ末端のアシル化を受けることでLolCDEに対する親和性が格段に高くなり、効率よく外膜に輸送されるようになると考えられる。

LppはC末端のLysを介してペプチドグリカンと共有結合しており、細胞表層の頑健性維持に貢献している。Lppの内膜への誤局在は、内膜とペプチドグリカンがLppを介して融合することにより、致命的に働くことが知られている。Lppとペプチドグリカンの共有結合の形成を触媒する酵素(L-D-transpeptidase)は3種存在し、それぞれ*ybiS*、*erfK*、*ycfS*遺伝子によってコードされている。*ybiS erfK ycfS*三重欠失株においてLolCDEを過剰発現したところ、 Δ Lnt株を構築することができた。ウェスタンブロッティングの結果、この株におけるLppの量は野生株に匹敵し、Tricine-SDS-PAGEでの泳動度は増大していることがわかった。これらの結果から、Lntを不活化した際の主要な毒性は、誤局在したLppとペプチドグリカンの共有結合からもたらされることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- 1) Shin-ichiro Narita
ABC transporters involved in the biogenesis of the outer membrane in gram-negative bacteria.
Biosci. Biotechnol. Biochem. 75: 1044-1054. 2011 (査読有)
- 2) Shin-ichiro Narita and Hajime Tokuda
Overexpression of LolCDE allows the deletion of the *Escherichia coli* gene encoding apolipoprotein N-acyltransferase. J. Bacteriol. 193: 4832-4830. 2011 (査読有)
- 3) 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. 82: 205-213. 2010 (査読有)
- 4) 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. 192: 5657-5662. 2010 (査読有)
- 5) 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. 401: 586-591. 2010 (査読有)

〔学会発表〕 (計 6 件)

- 1) 成田新一郎、秋山芳展
大腸菌細胞表層の品質管理に関わるプロテアーゼホモログ YfgC の機能解析
第 85 回日本細菌学会総会
(長崎) 2012 年 3 月 27-29 日

- 2) 成田新一郎、秋山芳展
大腸菌表層タンパク質の品質管理に関わる新規プロテアーゼホモログの解析
第 8 回 21 世紀大腸菌研究会
(南木曾) 2011 年 5 月 18-19 日
- 3) 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」(国立遺伝学研究所)
2011 年 3 月 30-31 日
- 4) 成田新一郎
グラム陰性細菌の細胞表層形成に関与する ABC トランスポーターの研究
日本農芸化学会関東支部 2010 年度
第 1 回支部例会 (筑波大学) 2010 年 7 月 17 日
- 5) 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年会
(東京) 2010 年 7 月 10-11 日
- 6) 成田新一郎
グラム陰性細菌の細胞表層形成に関与する ABC トランスポーターの研究
日本農芸化学会 2010 年度大会
(東京) 2010 年 3 月 27-30 日

〔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. Schlauch, 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
研究者番号：40125943