

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：31203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570152

研究課題名(和文) ストレス応答に関与するシャペロン/プロテアーゼを介した細菌細胞表面の品質管理機構

研究課題名(英文) Analysis of a chaperone/protease involved in quality control of bacterial cell surface

研究代表者

成田 新一郎 (NARITA, Shin-ichiro)

盛岡大学・栄養学部・准教授

研究者番号：30338751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：E表層ストレス応答経路は大腸菌の細胞表面の機能維持に重要である。Eによって転写誘導されるyfgC遺伝子を欠失すると、大腸菌が多くの薬剤に対して感受性化することが知られていたが、YfgCの機能は不明であった。研究代表者らは、細菌外膜においてリポ多糖の輸送に関わるLptDの生合成にはジスルフィド結合の組換えが必要であることを見だし、YfgCがその過程を促進すること、さらにYfgCはアセンブリーに失敗したLptDを分解することを見いだした。これらの結果に基づき、YfgCをBepA (-barrel assembly-enhancing protease)と改称することを提唱した。

研究成果の概要(英文)：Escherichia coli is equipped with envelope stress-response systems to sense and cope with disorders of outer membrane (OM) constituents. The E-dependent stress response system is one of the most important for the maintenance of the OM structure and function. Disruption of yfgC, a E-regulated gene, sensitizes cells to multiple drugs, suggesting that it is involved in maintaining OM integrity. However, the specific function of YfgC remained unclear. We revealed that YfgC promotes assembly of LptD, an OM protein involved in the transport of lipopolysaccharides, which undergoes intramolecular disulfide rearrangement during its biogenesis. YfgC also promoted degradation of incorrectly folded LptD. BepA thus controls the quality of OM proteins by promoting either the biogenesis or elimination of OM proteins, depending on their folding state. Based on these results, we suggested that YfgC should be renamed as BepA (-barrel assembly-enhancing protease).

研究分野：機能生物化学

キーワード：細菌細胞表面 表層ストレス応答 E 外膜タンパク質 リポ多糖 プロテアーゼ ジスルフィド結合
大腸菌

1. 研究開始当初の背景

大腸菌などのグラム陰性細菌は細胞質膜(内膜)の外側にもう一つの膜構造(外膜)を持っている。外膜を構成する因子はすべて細胞質または内膜上で合成され、専用の輸送装置の働きで外膜まで輸送される。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、細菌は表層ストレス応答機構を備えて外的環境の変化に対応している。大腸菌は複数の表層ストレス応答機構を備えているが、中でも σ^F 経路は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。これまでに114の遺伝子が σ^F による制御を受ける遺伝子(σ^F レギュロン)のメンバーとして同定されているが、機能が明らかでない遺伝子も多く含まれている。細胞表層の品質管理機構を理解するため、これらの遺伝子の働きを解明することが求められている。本研究の開始当初において、 σ^F レギュロンのメンバーである *yfgC* (*bepA*) 遺伝子を欠失する大腸菌が多く薬剤に対して感受性化することが報告されていた。また、種々の化学物質に対する感受性のプロファイリングから、*bepA* 遺伝子が外膜の生合成あるいは品質管理に働いていることが示唆されていた。

外膜の透過障壁としての機能は、リポ多糖(lipopolysaccharide, LPS)の性質に負うところが大きい。LPSは内膜の細胞質側で合成され、ABCトランスポーターMsbAの作用で内膜のペリプラズム側にフリップされた後、一群のLpt因子の働きで外膜外葉まで運ばれる。LPSはLpt因子によって形成される内膜-外膜間の架橋を運ばれると考えられている。外膜タンパク質であるLptDのN末端ドメイン、ペリプラズムタンパク質のLptA、および内膜タンパク質のLptCは互いによく似たゼリーロール構造をとり、LPSはこれらのLpt因子が形成する連続した疎水性チャネルを通過して内膜から外膜まで運ばれると考えられている。

外膜タンパク質LptDとリポタンパク質LptEはともに大腸菌の生育に必須であり、LPSを外膜外葉に局在化させるために必要である。LptDとLptEは外膜で複合体を形成している。LptDのN末端ドメインとC末端の β バレルドメインの間には、2組のジスルフィド結合が存在する。即ち、LptDはN末端ドメインに2つ(C_{31} , C_{173}), β バレルドメインに2つ(C_{724} , C_{725})の合計4つのシステイン残基を持ち、ジスルフィド結合は連続しない2つのシステイン残基間(C_{31} - C_{724} および C_{173} - C_{725})で形成されることが明らかとなっている。

2. 研究の目的

σ^F 経路は大腸菌の生育に必須の表層ストレス応答機構であり、 σ^F が活性化されると、ペリプラズムのシャペロンや外膜タンパク

質の膜挿入に働くタンパク質の発現が上昇するとともに、外膜タンパク質の発現が small non-coding RNA を介して抑制される。これらの知見から、 σ^F 経路には細胞表層におけるタンパク質のミスフォールディングを防ぐ役割があると考えられている。 σ^F によって発現制御を受ける遺伝子が具体的にどのような機能をもっているか、或いはストレス応答によって細胞表層の物理化学的性質がどのように変化するかについては明らかになっていない点が多いため、細胞表層の生合成および品質管理における表層ストレス応答機構の役割を明らかにし、生物学的意義を解明することは、細菌からヒトまで保存される unfolded protein responses の機能に関して基本的な共通概念が得られることにつながる。特に、グラム陰性細菌の外膜透過性の維持機構を理解することは、細菌の制御を目的とした新たな化合物の開発につながる。本研究では前述したように σ^F レギュロンのメンバーであり、かつ欠失すると大腸菌に薬剤感受性をもたらす *bepA* 遺伝子の機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

C末端にHisタグを付加したBepAを大腸菌で過剰発現させ、金属アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製したBepAのプロテアーゼ活性を α -カゼインを基質に用いて測定した。

大腸菌の全ORFを網羅するプラスミドライブラリーであるASKAライブラリーを*bepA*欠失株に導入し、抗生物質であるエリスロマイシンに対して耐性を示すクローンをスクリーニングした。

イムノプロットングや、パルスチェイスと免疫沈降を組み合わせてLptDを検出する際には、非還元条件でSDS-PAGEを行うことで、LptDのジスルフィド結合の状態を評価した。

光架橋能を持つ非天然型アミノ酸の導入、または化学架橋剤の添加により、BepAと近接する因子を探索した。また、共免疫沈降により、BepAとBAM複合体との相互作用を検討した。

4. 研究成果

精製したBepAを用いてプロテアーゼ活性を調べたところ、BepAによる α -カゼインの切断が観察され、金属イオンキレーターの添加やプロテアーゼ活性部位モチーフ($H^{136}EXXH$)への変異導入によって切断活性が阻害された。また、BepAの活性部位モチーフ変異体は*bepA*欠失株の薬剤感受性を相補できず、野生株で発現させると薬剤感受性を亢進させた。これらの結果から、BepAのプロテアーゼ活性は細胞表層の機能維持に重要であることが明らかになった。一方、

これらの変異体は特定の条件では *bepA* 欠失株の薬剤感受性を相補することから、BepA はプロテアーゼ活性に依存しない機能も持つと考えられる。

bepA 欠失株のエリスロマイシン感受性を指標にマルチコピーサプレッサーを選択したところ、LptE の過剰発現によって *bepA* 欠失株の薬剤感受性が抑制された。LptE は LptD の生合成に関与することが知られているため、*bepA* 欠失株における LptD の状態を調べたところ、非還元的 SDS-PAGE において正常な LptD よりも大きな泳動度を示す分子種が観察された。この LptD の分子種は還元的条件で SDS-PAGE を行うと正常な LptD と同等の泳動度を示したことから、SH 基を介した修飾あるいは特殊なジスルフィド結合が形成されていることが示唆された。そこで LptD のシステイン残基を一つずつセリンに置換した変異体を作製して *bepA* 欠失株で発現させ、非還元的条件での泳動度を検討した結果、*bepA* 欠失株では連続した2つのシステイン残基間 (C_{31} - C_{173} および C_{724} - C_{725}) でジスルフィド結合が形成された LptD (これを LptD^C、正常なジスルフィド結合を持つ LptD を LptD^{NC} と記す) が蓄積していることが明らかとなった。パルスチェイス実験の結果、野生株においては LptD はまず連続したジスルフィド結合を形成し、30°C では 40 分程度をかけて正しいジスルフィド結合に組換わることがわかった。これに対して、*bepA* 欠失株ではこのジスルフィド結合の組換えが遅く、チェイス後 80 分を経過しても約半数が LptD^C のままであった。野生株で BepA を過剰発現すると LptD^C から LptD^{NC} への変換が促進されたことから、BepA による LptD のジスルフィド結合の異性化は LptD 生合成の律速段階になっていることが示唆された。また、この LptD^C から LptD^{NC} への変換は、BepA のプロテアーゼ活性部位の変異体によっても促進された。LptD が BAM 複合体依存的に外膜に挿入されること、また後述するように細胞内の BepA の少なくとも一部が BAM 複合体と近接していることから、BepA はシャペロン様の活性を以て LptD の BAM 複合体からの解離、あるいは LptE との相互作用を促進することにより、LptD/E 複合体のアセンブリーを促進していると考えられた。

本研究の実施中、Harvard University の Daniel Kahne 教授らのグループが LptD の生合成過程についての論文を発表した()。内容は、LptD は合成されると C_{31} - C_{173} 、 C_{724} - C_{725} の 2 組のジスルフィド結合を持つ前駆体の状態で外膜にターゲットされ、LptE との相互作用が引き金となって C_{31} - C_{724} 、 C_{173} - C_{725} のジスルフィド結合を持つ成熟体へと変換されるというもので、研究代表者らが得た上記実験結果と一致する報告であった。

光架橋能を持つ非天然型アミノ酸や化学架橋剤を用いた架橋実験、およびブルダウンアッセイの結果、BepA は外膜タンパク質の

生合成に関与する BAM 複合体と相互作用することがわかった。これらの結果から、BepA は BAM 複合体の近傍で外膜タンパク質のアセンブリーを促進する一方、フォールディングが阻害された際はそれらを取り除く働きをするシャペロン/プロテアーゼであると結論した。

< 引用文献 >

Chng SS, Xue M, Garner RA, Kadokura H, Boyd D, Beckwith J, Kahne D. Disulfide rearrangement triggered by translocon assembly controls lipopolysaccharide export. *Science*. 337: 1665-1668. 2012

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Kazuyuki Tao, Shin-ichiro Narita and Hajime Tokuda. Defective lipoprotein sorting induces *lolA* expression through the Rcs stress response phosphorelay system. *J. Bacteriol.* 査読有 194: 3643-3650. 2012

Masanori Mizutani, Keita Mukaiyama, Jing Xiao, Makiko Mori, Rika Satou, Shin-ichiro Narita, Suguru Okuda and Hajime Tokuda. Functional differentiation of structurally similar membrane subunits of the ABC transporter LolCDE complex. *FEBS Lett.* 査読有 587: 23-29. 2013

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.* 査読有 110: E3612-E3621. 2013 doi: 10.1073/pnas.1312012110

Yumi Hayashi, Ryoji Tsurumizu, Jun Tsukahara, Kazuki Takeda, Sin-ichiro Narita, Makiko Mori, Kunio Miki and Hajime Tokuda. 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.* 査読有 289: 10530-10539. 2014

Sarah M. McLeod, Paul R. Fleming, Kathleen MacCormack, Robert E. McLaughlin, James D. Whiteaker, Shin-ichiro Narita, Makiko Mori, Hajime Tokuda and Alita A. Miller. Small molecule inhibitors of Gram-negative lipoprotein trafficking discovered by phenotypic screening. *J. Bacteriol.* 査読有 197: 1075-1082. 2015

Asha S. Nayar, Thomas J. Dougherty, Keith E. Ferguson, Brett A. Granger, Lisa McWilliams,

Clare Stacey, Lindsey J. Leach, Shin-ichiro Narita, Hajime Tokuda, Alita A. Miller, Dean G. Brown, and Sarah M. McLeod. Novel antibacterial targets and compounds revealed by a high throughput cell wall reporter assay. J. Bacteriol. 査読有 197: 1726-1734. 2015

〔学会発表〕(計 10 件)

成田新一郎. 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 28 日

大門康志、成田新一郎、秋山芳展. 大腸菌における σ^E 依存性表層ストレス応答と toxin-antitoxin system の関わり. 第 9 回 21 世紀大腸菌研究会 (長浜) 2012 年 6 月 22 日

成田新一郎、秋山芳展. 大腸菌外膜タンパク質の品質管理にかかわる新規プロテアーゼホモログ BepA の解析. 2012 年度国立遺伝学研究所研究会「代謝、増殖、分裂研究会」(三島) 2012 年 12 月 8 日

大門康志、成田新一郎、志波優、吉川博文、秋山芳展. 大腸菌における σ^E の必須性と toxin-antitoxin システムの関わり. 2012 年度国立遺伝学研究所研究会「代謝、増殖、分裂研究会」(三島) 2012 年 12 月 9 日

成田新一郎、鈴木健裕、堂前直、秋山芳展. 大腸菌 β パレル型膜タンパク質の生合成に関わる BepA (YfgC) の機能解析. 日本農芸化学会 2013 年度 (平成 25 年度) 大会 (仙台) 2013 年 3 月 28 日

成田新一郎、秋山芳展. 大腸菌 β パレル型タンパク質の品質管理に関わるプロテアーゼホモログ BepA (YfgC) の機能解析. 2012 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの構築とその維持機構の研究」(三島) 2013 年 3 月 29 日

舩井千草、成田新一郎、秋山芳展. 部位特異的 in vivo 光架橋法による大腸菌ペリプラズムタンパク質 BepA(YfgC) の近接因子探索. 第 10 回 21 世紀大腸菌研究会 (伊豆) 2013 年 6 月 20 日

成田新一郎、舩井千草、鈴木健裕、堂前直、秋山芳展. 大腸菌プロテアーゼ BepA は外膜タンパク質の組立と分解を促進する. 日本農芸化学会東北支部第 148 会大会 (盛岡) 2013 年 10 月 26 日

大門康志、成田新一郎. 大腸菌の表層ストレス応答に関わる σ^E の必須性は TA システムにおける toxin の活性化により解消される. 第 88 回日本細菌学会総会 (岐阜) 2015 年 3

月 26 日

大門康志、成田新一郎、秋山芳展. σ^E の欠失による大腸菌の致死性は TA システムトキシンの活性化により抑制される. 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山) 2015 年 3 月 27 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：
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.virus.kyoto-u.ac.jp/about/y2013/akiyama201309.html>

<http://goo.gl/mCP2hH>

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・准教授
研究者番号：30338751

(2) 研究分担者

秋山 芳展 (AKIYAMA, Yoshinori)
京都大学・ウイルス研究所・教授
研究者番号：10192460

(3) 研究協力者

大門 康志 (DAIMON, Yasushi)