

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450095

研究課題名(和文)大腸菌外膜リポ蛋白質の輸送不全によるRcsリン酸リレー系活性化の機構

研究課題名(英文) Mechanism of Rcs phosphorelay system activation by defective lipoprotein sorting in Escherichia coli

研究代表者

埜 和之(Tao, Kazuyuki)

東京大学・アイソトープ総合センター・助教

研究者番号：00211996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌等のグラム陰性細菌の細胞表層には、N末端が脂質により修飾されたりポ蛋白質が存在している。これらのリポ蛋白質の多くは、内膜のペリプラズム側で修飾された後Lolシステムにより外膜内葉に輸送される。私たちは、Lolシステムが正常に機能しない状況下ではRcsリン酸リレーに依存してlolA遺伝子の転写が誘導され、リポ蛋白質輸送能力を回復させる応答が起こることを見いだしている。本研究は、この応答のセンサー蛋白質であるRcsF蛋白質がリポ蛋白質の輸送状況をモニターする機構について解析したものである。

研究成果の概要(英文)：In the envelope of gram-negative bacteria, over 90 species of lipoproteins, which are modified with lipid chains and anchored to the membrane via the lipids, are present. After being modified and processed on the outer leaflet of the inner membrane, most of these lipoproteins are transported to the inner leaflet of the outer membrane by the Lol system. We had found that the inhibition of outer membrane transport of lipoproteins triggers lolA transcription in an Rcs phosphorelay system dependent fashion. In this study, we studied the mechanisms of monitoring correct lipoprotein sorting and transport to the outer membrane by RcsF, which is a key molecule of the Rcs phosphorelay system.

研究分野：微生物遺伝学

キーワード：リポ蛋白質 二成分制御系

1. 研究開始当初の背景

大腸菌などのグラム陰性細菌の細胞表面には、N末端が脂質で修飾され、その脂質部分で細胞膜と結合しているリポ蛋白質が存在している。大腸菌では約100種類のリポ蛋白質が存在しており、その90%以上が外膜の内葉に存在している。これらの外膜に存在するリポ蛋白質は、外膜のバレル型蛋白質の構造形成などにおいて重要な役割を果たしている。

外膜に存在するリポ蛋白質は、Sec トランスロコン系に依存して内膜を透過した後、内膜のペリプラズム側で、成熟体のN末端となるシステインへの脂質付加、シグナル配列切断等の修飾を受ける。内膜上で修飾された成熟型リポ蛋白質を外膜に運ぶのがLoI蛋白質群である。脂質修飾されたリポ蛋白質は、内膜に存在するABCトランスポーターの一つであるLoICDE蛋白質複合体と結合、ATP分解に依存して内膜から遊離し、ペリプラズムに存在するリポ蛋白質輸送体であるLoIAと水溶性の複合体を形成する。このLoIA-リポ蛋白質複合体はペリプラズムを横断し外膜に到達、リポ蛋白質は外膜のリポ蛋白質受容体LoIBに引渡される。LoIB蛋白質は、受取ったリポ蛋白質を外膜の内葉に組込む。

私たちは、LoIAの構造・機能を明らかにする研究の過程で種々の変異体を作製してきたが、その中の一つ、I93C/F140Cの二重変異を導入し分子内ジスルフィド結合を形成する変異体は、これまで作成した変異体の中で、最も強くリポ蛋白質の輸送を阻害し、また、野生型細胞の増殖を阻害するドミナントネガティブ型変異であった(文献)。私たちは、この変異蛋白質の発現を誘導することにより、CpxARに依存した細胞表面ストレス応答が誘導され(文献)、さらに、*loIA* 遺伝子自身を含む遺伝子群の発現が、CpxAR系とは独立の経路により誘導されることを見いだした。この変異LoIA蛋白質による*loIA* 遺伝子の発現誘導が起こらない変異体を取得したところ、その変異は*rscC*、*rscF* 遺伝子に見つかったことから、*loIA* 遺伝子の発現はRcsC、RcsF蛋白質などにより構成されるRcsリン酸リレー系により制御されていると考えられた(文献)。

Rcsリン酸リレー系は二成分制御系に類似した遺伝子発現制御系であり、莢膜構成成分の生合成に関わる遺伝子群の発現調節系として発見された。この系では、内膜上のRcsCDが細胞質の転写アクチベータRcsBをリン酸化することにより、標的遺伝子群の発現が活性化される。遺伝学的解析から、内膜上のRcsCDキナーゼの活性化には、LoIシステムにより外膜に輸送されるリポ蛋白質のひとつであるRcsFが必要であることが明らかになっていたが、物理的に離れている内膜と外膜の間でどのようにシグナル伝達が起こるのかは不明であった。

これらのLoIA変異体によるRcsリン酸リ

レー系活性化に関する一連の結果は、LoIAI93C/F140C変異体により外膜リポ蛋白質の輸送不全が生じた状況では、Rcs系のセンサー分子と考えられている外膜リポ蛋白質RcsFが内膜上に留まり、そこでRcsCDキナーゼと物理的に相互作用することによりキナーゼを活性化していると考えたと説明でき、さらには、Rcs系を活性化する他の条件下でも同様のリポ蛋白質の輸送不全を介してRcs系が活性化しているのではないかと予想された。

2. 研究の目的

これまで不明であった外膜リポ蛋白質RcsFが内膜上のRcsCDキナーゼを活性化する分子メカニズムが、外膜リポ蛋白質の輸送阻害現象により説明できるかどうかを検証すること、すなわち

(1)「RcsF蛋白質は外膜リポ蛋白質の輸送状況をモニターするセンサーであり、内膜上に滞留することによりRcs系を活性化する」
(2)「リポ蛋白質輸送不全が起こることが、Rcsリン酸リレー系の活性化の一般的な原因となっている」

という仮説の当否を生化学的・遺伝学的に検証することを目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) Rcsリン酸リレー系活性化の定量は、*loIA-lacZ* 融合遺伝子の発現をベータガラクトシダーゼ活性を測定することにより行った。

(2) 部位特異的変異導入により細胞内局在の変化したRcsF蛋白質を作成・発現させることにより、RcsF蛋白質局在部位の違いによるRcs系活性化への影響を調べた。

また、蛋白質表面に露出している電荷をもつアミノ酸を、逆の電荷をもつアミノ酸、及び、アラニンに変化させた変異体シリーズを作成しRcsリン酸リレー系の活性化の程度を調べることにより、そのアミノ酸のシグナル伝達に於ける役割について検討した。

(3) PCR反応の誤塩基挿入を利用して、*rscF* 遺伝子のランダムな位置に突然変異を導入したライブラリーを作成した。この中から、Rcsリン酸リレー系の活性化に欠損をもつ変異体をインディケータプレート上でスクリーニングした。野生型に比べてRcsF蛋白質発現の程度が低下したクローンは解析から除いた上で、塩基配列を決定し変異の場所を同定した。

(4) 大腸菌細胞内では、特殊なサブレッサー-tRNAを利用することにより、ある蛋白質の特定の部位へ光架橋性非天然アミノ酸ベンゾイルフェニルアラニン(BPA)を導入することができる。そこへ紫外線照射することにより、近傍の蛋白質とその目的蛋白質との間で架橋形成することができる。この手法を用いて、Rcs系活性化時に内膜上に留まったRcsFと相互作用する因子、及び、相互作用する部

位について検討した。

(5) RcsF 蛋白質と光架橋により複合体を形成した蛋白質は、C-末端に付加した 6xHis タグを用いて部分精製後、SDS-PAGE により単一バンドとして切出し、質量分析による解析を行った。

4. 研究成果

(1) LolA または LolB 蛋白質を欠乏させ、リポ蛋白質の輸送が起こらない条件下では Rcs リン酸リレー系が強く活性化された。このことから、ドミナントネガティブ型 LolA 変異体で見られた Rcs リン酸リレー系の活性化は、ある特別な性質の LolA 変異体 (I93C/F140C 変異) によるものではなく、外膜リポタンパク質輸送阻害に直接関連した現象であると考えられた。

(2) 細胞内局在部位を決定するリポボックス配列を改変した RcsF タンパク質を作製し、Rcs リン酸リレー系の活性化への影響を調べた。その結果、ペリプラズムに遊離したもの、内膜に脂質でアンカーしたもの、シグナルペプチドが切断されず内膜にアンカーしたもの、いずれの場合でも、Rcs 系の活性化が観察された。このことから内膜上に滞留した RcsF 蛋白質がシグナル伝達の下流に位置する RcsCD キナーゼの活性化を行うことが示唆された。

(3) 実際に、内膜に脂質を介して結合している RcsF タンパク質が RcsCD キナーゼ等と物理的に相互作用するかどうかを *in vivo* の光架橋実験で検証するために、光反応性アミノ酸ベンゾイルフェニルアラニンを用いた RcsF タンパク質の特定の部位に導入するための rcsF 変異体 シリーズを作成し、光架橋実験を行った。その結果、RcsF タンパク質のリンカー部分 (C 末端側の球状ドメインと膜アンカーとの間のフレキシブルな領域) 及び、C 末端の球状ドメインの一部と特異的に相互作用するタンパク質が検出された。

光架橋産物を精製するための His タグを付加した RcsF 蛋白質を作成し、野生型と同様に機能することを確認した上で、この RcsF と架橋形成したタンパク質を精製し、質量分析により解析した。その結果、この複合体を形成する相手側タンパク質は、外膜ポリンの一つである OmpA タンパク質であることが明らかとなった。ompA 遺伝子欠損株を作成し、Rcs リン酸リレー系活性化への効果を調べたところ、多少の影響はあるものの、Rcs リン酸リレー系の活性化は概ね正常に近いレベルで起こることがわかった。Rcs 系制御における OmpA と RcsF 相互作用の役割は今後の検討課題である。

なお、Rcs 系の内膜に存在するセンサーキナーゼである RcsC 蛋白質、及び、RcsD 蛋白質と、RcsF 蛋白質との架橋産物はこれ迄のところ観察できていない。このことは RcsF が RcsC 又は RcsD キナーゼと直接相互作用することにより活性化するのではなく、他のメカ

ニズムにより情報伝達が起こっている可能性を示唆している。

(4) RcsF タンパク質において、シグナル感知・伝達において重要な役割をもつ領域を同定するために、部位特異的およびランダムに変異導入した RcsF からその機能に欠損を持つものを同定した。その結果、Rcs 系活性化に欠陥をもたらす変異は、リポ蛋白質の局在部位を決定するリポボックスの部分と、C 末端領域の一部に集中していた。この C 末端部分の領域は、OmpA と相互作用する部分とは異なっていることから、他の因子との相互作用部位である可能性がある。

(5) シグナル伝達に重要であると考えられる C 末端領域の部分と特異的に相互作用する因子を同定することを目的として、この領域において蛋白質表面に露出しているアミノ酸を光架橋性アミノ酸に置換するためのアンバー変異体の作成を行い、部位特異的光架橋実験を行った。その結果、いくつかの部位に光架橋性アミノ酸を導入した場合に、複合体形成が観察された。これらの複合体形成の相手側蛋白質は、Rcs リン酸リレー系のシグナル伝達に於いて重要な役割をもつものである可能性がある。

引用文献

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

Tao K, Watanabe S, Narita S, Tokuda H. 2010. A Periplasmic LolA derivative with a lethal disulfide bond activates the Cpx stress response system. *J Bacteriol.* 192:5657-5662.

Tao K, Narita S, Tokuda H. 2012. Defective lipoprotein sorting induces *lolA* expression through the Rcs stress response phosphorelay system. *J Bacteriol* 194:3643-3650

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Saito R, Kasai A, Ogihara S, Yamada K, Tao K. 2015 Rapid assay of A2058T-mutated 23S rRNA allelic profiles associated with high-level macrolide resistance in *Moraxella catarrhalis*. *J Med Microbiol* 64: 990-992 doi: 10.1099/jmm.0.000130 査読有

Messaoudi N, Gautier V, Kthiri F, Lelandais G, Mihoub M, Joseleau-Petit D, Caldas T, Bohn C, Tolosa L, Rao G, Tao K, Landoulsi A, Bouloc P, Richarme G. 2013 Global stress response in prokaryotic model of DJ-1 associated parkinsonism. *J Bacteriol* 195: 1167-1178 doi:

10.1128/JB.02202-12 査読有

〔学会発表〕(計1件)

埜 和之 大腸菌外膜リポ蛋白質輸送不全による Rcs リン酸リレー系に依存した *lola* 転写活性化 生命科学シンポジウム 2014年4月26日 東京大学(東京都文京区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

埜 和之 (TAO Kazuyuki)

東京大学・アイソトープ総合センター・助教

研究者番号：00211996