

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007年度～2011年度

課題番号：19058003

研究課題名（和文）大腸菌エンベロープ形成機構の解明

研究課題名（英文）Biogenesis of *E. coli* cell envelope

研究代表者

徳田 元 (TOKUDA HAJIME)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：40125943

研究分野：生化学、分子生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：蛋白質輸送、分子シャペロン、膜局在化、リポ蛋白質、細胞表層、リポ多糖

1. 研究計画の概要

大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌の外膜には、リポ多糖、リン脂質、少数の膜貫通型 β バレル型蛋白質、多数の膜アンカー型リポ蛋白質が存在している。これら4種類の膜構成因子が、外膜に運ばれる機構は不明である。申請者らは、リポ蛋白質を外膜に運ぶ蛋白質ネットワーク“Lol システム”の全体像を世界に先駆けて明らかにした。また大腸菌には少なくとも90種のリポ蛋白質が存在することを明らかにした。さらに、Lol システムの阻害や、特定のリポ蛋白質遺伝子の破壊が、外膜形成を阻害する事を見いだした。外膜構成因子の輸送に中心的な役割を担っている因子は、表層構造に多数存在するリポ蛋白質の中にあり、エンベロープ形成のネットワークとなっている事を示している。本研究は、リポ蛋白質輸送機構の研究成果を一層発展させ、外膜形成機構の全容解明を目的とする。

2. 研究の進捗状況

(1) リポ蛋白質選別輸送の分子機構：

リポ蛋白質を選別して外膜に輸送する Lol 因子間の相互作用を in vivo 光架橋法で解析し、LolA と LolB はリポ蛋白質が結合する疎水的キャビティーの入り口を互いに結合させてリポ蛋白質を移動させることを明らかにした。ABC トランスポーターの膜サブユニット LolC と LolA 間でも同様の相互作用が推

測される。NMR による解析によっても、LolA と LolB は疎水的キャビティーを連結させて相互作用することを示した。

LolA の疎水的キャビティーはリポ蛋白質を結合すると開くことを明らかにした。LolD による ATP 加水分解エネルギーが LolC や LolE に伝達され LolA の構造変化を引き起こすと考えられる。

外膜リポ蛋白質である LolB の機能に脂質アンカーは必須でないことを明らかにし、蛋白質部分には、リポ蛋白質の結合、膜へのターゲティング、リポ蛋白質膜挿入の機能があることを示した。

(2) 内膜蛋白質挿入に関与する新因子：

内膜蛋白質の膜挿入を in vitro で解析すると自発的挿入が起きることがあるが、これは本来膜に存在するジアシルグリセロールが無いためであること、新因子はジアシルグリセロール存在下でも蛋白質の膜挿入を促進することを示した。

(3) リポ多糖輸送に関与する ABC トランスポーターの同定：

細菌の ABC トランスポーターを構成するサブユニットの遺伝子は、一般的にオペロンを形成している。リポ多糖の外膜輸送に関わるとされている LptB と LptF/G は遺伝子が離れた場所に

存在する。さらに、別のLptC もリポ多糖輸送に重要とされている。リポ多糖輸送に関与する ABC トランスポーターは、LptBFGC の複合体であることを明らかにした。

3. 現在までの達成度

本研究は当初の計画以上に進展していると評価している。その理由は、リポ蛋白質輸送機構の詳細な分子機構が一層明らかになったためである。特に LolA と LolB の疎水性キャビティの開閉を実証したこと、LolA と他の因子間の相互作用を新規に導入した光架橋法で解明したことである。さらに、リポ多糖輸送に関わる新規 ABC トランスポーターの構造を生化学的に明らかにしたこと、内膜に蛋白質を挿入する新規因子の機能を明らかにしたことが顕著な研究成果と考える。

4. 今後の研究の推進方策

リポ蛋白質輸送因子間の相互作用解析に導入した光架橋法はエンベロープ形成に関わる他の因子の機能解析にも有効であると期待している。これまでに明らかにした疎水性キャビティの開閉機構は、表面プラズモン共鳴解析などによりさらに詳細に明らかにする。リポ多糖輸送性 ABC トランスポーターは再構成系によりその機能を解析する。膜挿入新規因子は複合脂質であり、その構造を明らかにする。

5. 代表的な研究成果

(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 23 件)

[学会発表] (計 33 件)

[図書] (計 4 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

代表的な研究成果

(1) 雑誌論文 (すべて査読有り)

Okuda, S., Tokuda, H. (2009) Model of mouth-to-mouth transfer of bacterial lipoproteins through inner membrane LolC, periplasmic LolA, and outer membrane LolB. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 106, 5877-5882

Taniguchi, N., Tokuda, H. (2008) Molecular events involved in a single cycle of ligand transfer from an ATP-binding cassette transporter, LolCDE, to a

molecular chaperone, LolA. *J. Biol. Chem.* 283, 8538-8544

Kawashima, Y., Miyazaki, E., Müller, M., Tokuda, H., Nishiyama, K. (2008)

Diacylglycerol specifically blocks spontaneous integration of membrane proteins and allows detection of a factor-assisted integration. *J. Biol. Chem.* 283, 24489-24496

Oguchi, Y., Takeda, K., Watanabe, S., Yokota, N., Miki, K., Tokuda, H. (2008) Opening and closing of the hydrophobic cavity of LolA coupled to lipoprotein binding and release. *J. Biol. Chem.* 283, 25414-25420

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