

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 6 月 21 日現在

機関番号：31203

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

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 *Escherichia coli* cell envelope.

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：40125943

研究成果の概要（和文）：グラム陰性細菌は共通して生育に必須の外膜構造をもつ。代表的なグラム陰性細菌である大腸菌では、外膜の形成にリポ蛋白質が極めて重要なはたらきをしていると考えられる。大部分のリポ蛋白質は外膜に局在しているが、これは選別シグナルと、5 種類の Lol 因子による輸送系で行われている。本研究は、リポ蛋白質の輸送機構を中心に、外膜を含むエンベロープの形成機構を解析したものである。

研究成果の概要（英文）：Gram-negative bacteria generally possess outer membranes, which are essential for bacterial growth. In *Escherichia coli*, lipoproteins play critical roles in the biogenesis of outer membranes. Most *E. coli* lipoproteins are localized in the outer membrane. This is mediated by the Lol system comprising five Lol proteins in a manner dependent on lipoprotein sorting signals. The mechanisms underlying the biogenesis of *E. coli* outer membranes are examined by analyzing the outer membrane sorting of lipoproteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	21,300,000	0	21,300,000
2008 年度	21,300,000	0	21,300,000
2009 年度	21,300,000	0	21,300,000
2000 年度	21,300,000	0	21,300,000
2011 年度	21,300,000	0	21,300,000
総計	106,500,000	0	106,500,000

科研費の分科・細目：微生物生化学

キーワード：外膜、細胞質膜、リポ蛋白質、 β バレル型蛋白質、Lol 因子、リポ多糖

1. 研究開始当初の背景

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 種類の外膜構成因子が、外膜に運ばれる機構は申請者らが概略を明らかにしたリポ蛋白質の外膜輸送経路以外はほとんど不明であった。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”を世界に先駆けて明らかにした。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示唆する結果を得ていた。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が強く示唆された。外膜はほぼすべてのグラム陰性細菌にとって必須の膜構造であ

る。したがって、病原性細菌に対する薬剤開発のターゲットとしても有望であると注目され始めていた。

2. 研究の目的

外膜を構成する因子はすべて疎水性である。これらの因子が親水性のペリプラズム空間をどのような機構で通過して外膜にまで運ばれるかが解明するべき重要な課題であった。本研究は、既に概略が明らかになっていたリポ蛋白質輸送の分子機構を詳細に解明することによって、外膜形成機構の全体像解明にも貢献することを目的としたものである。

3. 研究の方法

- (1) 基質結合型 Lol 因子の精製と *in vitro* 実験系の構築
- (2) Lol 因子変異体の構築と *in vivo* と *in vitro* における機能解析
- (3) NMR による LolA の構造と機能の相関の解析
- (4) LolCDE 複合体のサブユニットへの解体と再構成
- (5) 再構成系による LolCDE 複合体の脂質要求性の解析
- (6) LolA を阻害する薬剤のスクリーニング法の開発
- (7) 光架橋法によるリポ蛋白質輸送機構の解析
- (8) リポ蛋白質生合成系と輸送系との関連の解析
- (9) リポ蛋白質輸送の阻害によるストレス応答機構の解明
- (10) 細菌におけるリポ蛋白質輸送機構の普遍性の解析
- (11) リポ蛋白質の構造と機能の解析
- (12) リポ多糖を輸送する ABC トランスポーターの構造と機能の解析

4. 研究成果

(1) リポ蛋白質が細胞質膜上で成熟体になった後、外膜に運ばれる機構には、5 種類の Lol 因子からなる経路が働いている。細胞質膜から外膜特異的リポ蛋白質を遊離するのが ABC トランスポーター LolCDE 複合体である。遊離されたリポタンパク質はペリプラズムのキャリア因子 LolA と複合体を形成して親水性の性質をもつようになり、ペリプラズムを横断して外膜に到達する。外膜にアンカーしている LolB が LolA からリポ蛋白質を受け取り、外膜にリポ蛋白質を局在化させる。この機構は疎水性の外膜因子を運ぶモデルとして広く認められていた。外膜構成因子リポ蛋白質の選別輸送機構 Lol 経路の詳細を明らかに

するためにリポ蛋白質を結合した Lol 因子を精製し、リポ蛋白質の結合と解離に必要な条件を詳細に解析できる実験系を確立した。この *in vitro* 実験系によって、変異型 Lol 因子の機能を解析した。さらに NMR と光架橋法により、LolA から LolB にリポ蛋白質が受け渡される機構が解明された。これらの解析から明らかになったリポ蛋白質外膜輸送の分子機構は以下のようである。

- ① 外膜特異的リポ蛋白質は LolE と結合する。LolC には LolA が結合する。
- ② LolD による ATP 加水分解のエネルギーでリポ蛋白質は LolE から LolC 上に存在する LolA に受け渡される。この時、LolA の疎水性キャビティーがリポ蛋白質アシル基の結合部位として働く。
- ③ LolA-リポ蛋白質複合体は、ペリプラズム空間を外膜にまで移動する。
- ④ 外膜にアンカーした LolB は、構造が LolA とよく似ており、疎水性キャビティーをもっている。しかし LolB の疎水性キャビティーはリポ蛋白質に対する親和性が LolA より高い。この親和性の違いがリポ蛋白質受け渡しの駆動力となる。
- ⑤ LolB によって最終的局在場所である外膜にリポ蛋白質が組み込まれる。

(2) その他リポ蛋白質輸送で以下の知見を得た。

- ① リポ蛋白質輸送の阻害は、ストレス応答機構である Cpx 二成分制御系を活性化することを見いだした。
- ② リポ蛋白質輸送の阻害により、LolA の発現が上昇すること、これには、ストレス応答機構 Rcs 系が関与し、構成因子である外膜リポ蛋白質 RcsF はリポ蛋白質輸送をモニターする機能があることを明らかにした。
- ③ LolCDE のサブユニットを精製し、サブユニットから活性のある複合体を再構成することに成功し、LolE の機能が特にリポ蛋白質遊離には重要であることを見いだした。
- ④ 緑膿菌のリポ蛋白質輸送も、大腸菌と同様の機構で起きること、しかし選別シグナルは異なっていることを明らかにした。
- ⑤ 再構成実験系で、LolCDE によるリポ蛋白質選別シグナルの認識にはリン脂質種が重要であることを明らかにした。
- ⑥ リポ蛋白質生合成の最終段階を触媒する酵素 Lnt はこれまで必須であると考えられていたが、LolCDE を大量発現し、外膜主要リポ蛋白質 Lpp を欠損すると遺伝子を破壊することができることを見いだした。

(3)

- ① リポ多糖を外膜に輸送するための最初の反

応である細胞質膜からの遊離には、ABC トランスポーターLptBFG 複合体が関与していること、この複合体には、膜蛋白質 LptC も含まれることを明らかにした。

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 3 1 件)

1. Morita, K., Tokuda, H., and Nishiyama, K. Multiple SecA molecules drive protein translocation across a single translocon with SecE inversion. *J. Biol. Chem.* **287**, 455-464 (2012). 査読有り doi:10.1074/jbc.M111.301754
2. Tao, K., Narita, S., and Tokuda, H. Defective lipoprotein sorting induces *lola* expression through the Rcs stress response phosphorelay system. *J. Bacteriol.* in press (2012). 査読有り doi:10.1128/JB.00553-12
3. Okuda, S., and Tokuda, H. Lipoprotein Sorting in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 239-259 (2011). 査読有り doi:10.1146/annurev-micro-090110-102859
4. 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). 査読有り doi:10.1128/JB.05013-11
5. 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). 査読有り doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.061
6. 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). 査読有り doi:10.1016/j.mimet.2010.06.001
7. 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). 査読有り doi:10.1128/JB.00821-10
8. Nishiyama, K., and Tokuda, H. Preparation of a highly translocation-competent proOmpA/SecB complex. *Protein Sci.* **19**, 2402-2408, (2010). 査読有り DOI 10.1002/pro.520
9. 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). 査読有り doi:10.1016/j.bbrc.2010.09.106

- 1 0. Tokuda, H. Biogenesis of outer membranes in Gram-negative bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 465-473 (2009). 査読有り DOI 10.1007/978-1-60327-412-8_7,
- 1 1. Okuda, S., and Tokuda, H. 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 (2009). 査読有り doi_10.1073_pnas.0900896106
- 1 2. Tsukahara, J., Mukaiyama, K., Okuda, S., Narita, S., and Tokuda, H. Dissection of the LolB function; lipoprotein binding, membrane targeting, and incorporation of lipoproteins into lipid bilayers. *FEBS J.* **276**, 4496-4504 (2009). 査読有り doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07156.x
- 1 3. Narita, S., and Tokuda, H. Biochemical characterization of an ABC transporter LptBFGC complex required for the outer membrane sorting of lipopolysaccharides. *FEBS Lett.* **583**, 2160-2164 (2009). 査読有り doi:10.1016/j.febslet.2005.10.038
- 1 4. Nakada, S., Sakakura, M., Takahashi, H., Okuda, S., Tokuda, H., and Shimada, I. Structural investigation of the interaction between LolA and LolB using NMR. *J. Biol. Chem.* **284**, 24634-24643 (2009). 査読有り DOI 10.1074/jbc.M109.001149
- 1 5. Yasuda, M., Iguchi-Yokoyama, A., Matsuyama, S., Tokuda, H., and Narita, S. Membrane topology and functional importance of the periplasmic region of ABC transporter LolCDE. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2310-2316 (2009). 査読有り DOI 10.1074/jbc.M109.001149
- 1 6. Tsukahara, J., Narita, S., and Tokuda, H. Real time analysis of lipoprotein transfer from LolA to LolB by means of surface plasmon resonance. *FEBS Lett.* **583**, 2987-2990 (2009). 査読有り doi:10.1016/j.febslet.2009.08.032
- 1 7. Nishiyama, K., and Tokuda, H. Development of a functional *in vitro* integration system for an integral membrane protein, SecE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 920-924 (2009). 査読有り doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.078

- 1 8 . Taniguchi, N., and Tokuda, H. 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 (2008). 査読有り DOI 10.1074/jbc.M800026200
 - 1 9 . Okuda, S., Watanabe, S., and Tokuda, H. A short helix in the C-terminal region of LolA is important for the specific membrane localization of lipoproteins. *FEBS Lett.* **582**, 2247-2251 (2008). 査読有り doi:10.1016/j.febslet.2008.05.022
 - 2 0 . Kawashima, Y., Miyazaki, E., Müller, M., Tokuda, H., and Nishiyama, K. Diacylglycerol specifically blocks spontaneous integration of membrane proteins and allows detection of a factor-assisted integration. *J. Biol. Chem.* **283**, 24489-24496 (2008). 査読有り DOI 10.1074/jbc.M80812200
 - 2 1 . Oguchi, Y., Takeda, K., Watanabe, S., Yokota, N., Miki, K., and Tokuda, H. Opening and closing of the hydrophobic cavity of LolA coupled to lipoprotein binding and release. *J. Biol. Chem.* **283**, 25414-25420 (2008). 査読有り DOI 10.1074/jbc.M804736200
 - 2 2 . Watanabe, S., Oguchi, Y., Takeda, K., Miki, K., and Tokuda, H. Introduction of a lethal redox switch that controls the opening and closing of the hydrophobic cavity in LolA. *J. Biol. Chem.* **283**, 25421-25427 (2008). 査読有り DOI 10.1074/jbc.M804737200
 - 2 3 . Ito, H., Ura, A., Oyamada, Y., Yoshida, H., Yamagishi, J., Narita, S., Matsuyama, S., and Tokuda, H. A new screening method to identify inhibitors of Lol (localization of lipoproteins) system, a novel antibacterial target. *Microbiol. Immunol.* **51**, 263-270 (2007). 査読有り [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1348-0421](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1348-0421)
 - 2 4 . Narita, S., and Tokuda, H. Amino acids at positions 3 and 4 determine the membrane specificity of *Pseudomonas aeruginosa* lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **282**, 13372-13378 (2007). 査読有り DOI 10.1074/jbc.M611839200
 - 2 5 . Tanaka, S., Narita, S., and Tokuda, H. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* Lol system as a lipoprotein sorting mechanism. *J. Biol. Chem.* **282**, 13379-13384 (2007). 査読有り DOI 10.1074/jbc.M611840200
 - 2 6 . Miyamoto, S., and Tokuda, H. Diverse effects of phospholipids on lipoprotein sorting and ATP hydrolysis by the ABC transporter LolCDE complex. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes* **1768**, 1848-1854 (2007). 査読有り doi:10.1016/j.bbmem.2007.04.005
 - 2 7 . Kanamaru, K., Miyamoto, S., Narita, S., and Tokuda, H. Complete reconstitution of an ATP-binding cassette transporter LolCDE complex from separately isolated subunits. *FEBS J.* **274**, 3034-3043 (2007). 査読有り doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05832.x
 - 2 8 . Hirano, Y., Hossain, Md. M., Takeda, K., Tokuda, H., and Miki, K. Structural studies of the Cpx pathway activator NlpE on the outer membrane of *Escherichia coli*. *Structure* **15**, 963-976 (2007). 査読有り DOI 10.1016/j.str.2007.06.014
 - 2 9 . Sugai, R., Takemae, K., Tokuda, H., and Nishiyama, K. Topology inversion of SecG is essential for the cytosolic SecA-dependent stimulation of protein translocation. *J. Biol. Chem.* **282**, 29540-29548 (2007). 査読有り DOI 10.1074/jbc.M704716200
 - 3 0 . Nakada, S., Sakakura, M., Takahashi, H., Tokuda, H., and Shimada, I. Backbone resonance assignment for the outer membrane lipoprotein receptor LolB from *Escherichia coli*. *Biomol. NMR Assign.* **1**, 121-123 (2007). 査読有り DOI 10.1074/jbc.M109.001149
 - 3 1 . Watanabe, S., Oguchi, Y., Yokota, N., and Tokuda, H. Large-scale preparation of the homogeneous LolA-lipoprotein complex and efficient in vitro transfer of lipoproteins to the outer membrane in a LolB-dependent manner. *Protein Sci.* **16**, 2741-2749 (2007). 査読有り doi:10.1110/ps.073101307
- 〔学会発表〕 (計 4 件)
- 1 . 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
 - 2 . Tokuda, H. Sorting of lipoproteins to the outer membrane of Gram-negative bacteria. Final Keynote Address, FEBS Special Meeting “ATP-binding cassette proteins: from multidrug resistance to genetic diseases”, February 27-March 5, 2010, Innsbruck, Austria
 - 3 . Tokuda, H. Molecular events involved in a single cycle of ligand transfer from an ATP-binding cassette transporter LolCDE to a molecular chaperone LolA. FEBS Special Meeting “ATP-binding cassette proteins:

from multidrug resistance to genetic diseases”, March 1-8, 2008, Innsbruck, Austria

4. Tokuda, H. Sorting of lipoproteins to the outer membrane of Gram-negative bacteria. The 2007 ASBMB meeting, April 28-May 2, 2007, Washington DC, USA

〔図書〕(計 件)

1. Tokuda, H., Sander, P., Lee, B. L., Okuda, S., Grau, T., Tschumi, A., Brülle, J. K., Kurokawa, K., and Nakayama, H. Bacterial lipoproteins; biogenesis, trafficking and function. in press Chapter 4 in Bacterial Membranes: Structural and Molecular Biology Han Remaut and Rémi Fronzes, eds, Horizon Scientific Press 査読有り
2. 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. Schlauch, and C. L. Squires, and D. Ussery (ed), ASM Press. Washington, DC. doi: 10.1128/ecosal.4.3.7 (online journal). 査読有り
3. 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). 査読無し DOI 10.1007/978-1-60327-412-8_7,
4. Narita, S., and Tokuda, H. The function of the ABC transporter LolCDE in protein transport to the outer membrane of *E. coli*. in The Enzymes, vol. 25, pp. 149-172 (2007). 査読有り DOI:10.1016/S1874-6047(07)25007-3
5. Tokuda, H., Matsuyama, S., and Tanaka-Masuda, K., Structure, function and transport of lipoproteins in *Escherichia coli*. In “The Periplasm”, M. Ehrmann (ed), ASM press, pp. 67-79 (2007). 査読有り

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/sec/index-3.html>

http://www.morioka-u.ac.jp/UV_ns/tokuda_lab/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳田 元 (TOKUDA, HAJIME)

研究者番号 : 40125943

(2) 研究分担者

松山 伸一 (MATSUYAMA SHIN-ICHI)

研究者番号 : 50183108

西山 賢一 (NISIYAMA KENNICHI)

研究者番号 : 80291334

成田 新一郎 (NARITA SHIN-ICHIRO)

研究者番号 : 30338751

埜 和之 (TAO KAZUYUKI)

研究者番号 : 00211996

竹田 一旗 (TAKEDA KAZUKI)

研究者番号 : 30332290