

令和 5 年 10 月 29 日現在

機関番号：31203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05396

研究課題名(和文)細菌リポ蛋白質の選別的な膜局在化を支える分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms underlying the selective membrane localization of bacterial lipoproteins

研究代表者

徳田 元 (TOKUDA, Hajime)

盛岡大学・盛岡大学顧問・名誉教授

研究者番号：40125943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌に存在する約100種のリポ蛋白質は、一部を除いて外膜に輸送される。リポ蛋白質の選別と外膜への輸送は、5種類のLol因子からなる機構が触媒する。本研究は、Lolシステムの分子機構を構造に基づいて明らかにするために行った。光感受性のアミノ酸アナログを細胞質膜に存在するLolCDEのさまざまな位置に導入し、リポ蛋白質との結合を架橋反応より解析した。その結果LolC、LolEのリポ蛋白質結合部位とLolCとLolE間相互作用部位を同定した。LolCDEによるリポ蛋白質の認識と遊離を解析するin vitro実験系を確立し、ATP依存のリポ蛋白質遊離反応を阻害する低分子阻害物質の機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌に広く存在するリポ蛋白質は、細胞表層に存在するさまざまな機能に中心的な役割を果たす蛋白質群である。リポ蛋白質が選別されて外膜に輸送される仕組みは、基礎科学的な面から興味があるだけでなく、細菌感染症の制御という応用面からも重要である。大腸菌におけるリポ蛋白質の選別的外膜局在化機構は、研究代表者らが明らかにしたLolシステムが触媒している。Lolシステムはほかの細菌にも広く存在する機構であることが明らかになりつつある。研究代表者らは、Lolシステムを標的とする薬剤を見出しており、本研究で構造に基づいたLolシステムの機構と、作用する薬剤の機構が解明されたことは社会的にも大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：Approximately 100 species of lipoproteins in *E. coli* are transported to the outer membrane, while some remains in cytoplasmic membranes. Lipoprotein sorting and transport to the outer membrane is catalyzed by a mechanism consisting of five Lol factors. The purpose of this study was to elucidate the molecular mechanism of the Lol system based on its structure. We introduced a light-sensitive amino acid analog into various positions of LolCDE in the cytoplasmic membrane, and analyzed the binding to lipoproteins by light-dependent cross-linking reaction. As a result, we clarified the lipoprotein binding sites of LolC and LolE. We also revealed the interaction site of LolC and LolE. Furthermore, we established an in vitro experimental system to analyze the lipoprotein recognition and release reaction by LolCDE, and clarified the inhibitory mechanism of low-molecular-weight substances that inhibit the ATP-dependent lipoprotein release reaction.

研究分野：微生物生化学

キーワード：リポ蛋白質 細胞質膜 外膜 蛋白質局在化 阻害剤 Lolシステム 選別シグナル

1. 研究開始当初の背景

細菌には、アミノ末端のシステイン残基が脂質修飾されたリポ蛋白質が広く存在する。これらは細胞質で前駆体として合成された後、細胞質膜(内膜)の外葉(ペリプラズム側)に輸送され、一連の反応によりトリアシル基がシステイン残基に付加された成熟体となる。その後外膜を持っているグラム陰性細菌では、内膜残留シグナルを持つもの以外は外膜に運ばれる。大腸菌で合成されるリポ蛋白質は、その大部分が外膜に運ばれる。リポ蛋白質は脂質部分で膜にアンカーし、細胞表面におけるさまざまな機能に参与する重要な膜蛋白質群である。細菌の生育に必須な機能に参与しているリポ蛋白質も存在するため、リポ蛋白質の選別・局在化機構は、感染制御の面からも注目されている機構である。

本研究代表者は、リポ蛋白質の選別と外膜移行に、LoIと命名した5種類の蛋白質が関与していることを明らかにし、その機構を生化学的に解明した(1)。大腸菌には約100種類のリポ蛋白質が存在するが、アミノ酸配列に共通性はなく、アミノ末端のトリアシル化されたシステイン残基のみが共通構造である。本研究代表者が発見したLoIシステムは、トリアシル化されたシステイン残基を認識し、すべてのリポ蛋白質の選別・輸送に関わる機構である。

リポ蛋白質は、細胞質膜に存在するABCトランスポーターLoICDE複合体によってATP依存的にペリプラズムに存在するシャペロンLoIAに受け渡され、外膜の受容体LoIBに運ばれ外膜にアンカーされる。LoI因子間の相互作用は、一方向的なリポ蛋白質運搬に重要であり、LoIA-LoIB間の相互作用、リポ蛋白質との相互作用については、光感受性アミノ酸アナログpBPAをLoI因子の特定部位に導入し、光化学架橋の形成によって明らかにしてきた(2)。

2. 研究の目的

ABCトランスポーターは生物界に広く存在する蛋白質であるが、大部分は脂質二重層を越える輸送反応(取り込みや排出)を触媒する。一方、LoICDEは、脂質二重層の片側からリポ蛋白質をペリプラズム側に運ぶ例の少ないABCトランスポーターである。細胞質膜内から薬剤を輩出するABCトランスポーターとしてMacBが知られている。MacBの結晶構造から、LoICDEの構造と類似していることが示唆された(3)。そこで、LoICDEの作動機構とリポ蛋白質の選別機構を、構造に基づいてより詳細に明らかにするために本研究を開始した。

3. 研究の方法

LoICDE複合体は、ATPaseサブユニットLoID2分子と、膜サブユニットLoIC、LoIEそれぞれ1分子からなる。LoICとLoIEは、どちらも膜を4回貫通する膜蛋白質である。LoIAやLoIBの機能解析での方法(2)に準じ、LoIC、LoIEの膜貫通領域とペリプラズム領域の特定のアミノ酸残基一個をpBPAで置換した変異体を多数作製した。標的とするアミノ酸残基のコドンアンバーコドンに変換し、アンバー変異特異的にpBPAを取り込む実験系を使用した。一箇所にpBPAを取り込んだ変異LoICまたはLoIEを持つLoICDE複合体を大腸菌で発現し、別途調製したリポ蛋白質Palや、LoIAとの相互作用を架橋反応から解析した。また、選別シグナルやATPがリポ蛋白質との架橋にどう影響するかを調べた。さらにLoICDEの阻害剤が相互作用に与える影響についても調べた。架橋産物は、SDSゲル電気泳動で解析し、それぞれの抗体を用いて検出した。

4. 研究成果

リポ蛋白質との架橋産物が観察されたのは、LoIC、LoIEどちらの場合も限られた残基にpBPAを導入したときであった。すなわち、これらの残基がリポ蛋白質との相互作用部位に存在すると考えられる。

LoIC-LoIE間の相互作用に参与する残基が明らかになった。

LoIAと相互作用するLoIC、LoIEの部位が明らかになった。

阻害剤の阻害様式が明らかになった。LoICDEの機能を阻害する低分子物質は、リポ蛋白質をLoICDEから放出し、その結果LoICDEからLoIAへのリポ蛋白質受け渡しを阻害することが明らかになった。阻害剤によってLoICDEの構造が変化することの手掛かりになる知見である。LoIC-LoIE間の相互作用がどのように影響されるかを明らかにすれば、機能に重要な構造についての知見が得られると期待される。

内膜残留シグナルを持つリポ蛋白質は、LoICDEと相互作用しない。すなわち、LoICDEとの相互作用を回避する働きを持つシグナルであることが明らかになった。なお、別の解析から、これにはリン脂質が重要であることが示唆されている。

ATPはLoICDEとリポ蛋白質との相互作用に必須ではないが、LoIAにリポ蛋白質を受け渡すためには必須であった。

以上の研究成果は、論文発表の予定である(4)。

<引用文献>

- (1) Okuda, S., and Tokuda, H. Lipoprotein Sorting in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 239-259 (2011).
- (2) 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).
- (3) Okada, U., Yamashita, E., Neuberger, A., Morimoto, M., van Veen, HW., Murakami, S. Crystal structure of tripartite-type ABC transporter MacB from *Acinetobacter baumannii*. *Nat Commun* **8**, 1336 (2017) .
- (4) Tao, K., Narita, S., Okada,U., Murakami,S., Tokuda, H., Dissection of an ABC transporter LolCDE function analyzed by photo-crosslinking. (under review)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murakami Satoshi, Adachi Hiroaki, Matsumura Hiroyoshi, Takano Kazufumi, Inoue Tsuyoshi, Mori Yusuke	4. 巻 173
2. 論文標題 Real-time monitoring of polyacrylamide gel electrophoresis by the shadowgraph technique	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 65 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Bharatham Nagakumar, Bhowmik Purnendu, Aoki Maho, Okada Ui, Sharma Sreevalli, Yamashita Eiki, Shanbhag Anirudh P., Rajagopal Sreenath, Thomas Teby, Sarma Maitrayee, Narjari Riya, Nagaraj Savitha, Ramachandran Vasanthi, Katagihallimath Nainesh, Datta Santanu, Murakami Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Structure and function relationship of OqxB efflux pump from Klebsiella pneumoniae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25679-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Raturi Sagar, Nair Asha V., Shinoda Keiko, Singh Himansha, Bai Boyan, Murakami Satoshi, Fujitani Hideaki, van Veen Hendrik W.	4. 巻 4
2. 論文標題 Engineered MATE multidrug transporters reveal two functionally distinct ion-coupling pathways in NorM from Vibrio cholerae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02081-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murakami, Okada, van Veen	4. 巻 594
2. 論文標題 Tripartite transporters as mechanotransmitters in periplasmic alternating-access mechanisms.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3908-3919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Daimon 他7名	4. 巻 117
2. 論文標題 Reversible auto-inhibitory regulation of Escherichia coli metalloproteinase BepA for selective -barrel protein degradation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	6. 最初と最後の頁 27989-27996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2010301117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mohammad Shahrizal, Yasushi Daimon, Yoshiki Tanaka, Yugo Hayashi, Shintaro Nakayama, Shigehiro Iwaki, Shin-ichiro Narita, Hironari Kamikubo, Yoshinori Akiyama, Tomoya Tsukazaki	4. 巻 431
2. 論文標題 Structural basis of the function of the -barrel assembly-enhancing protease BepA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 625-635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2018.11.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Horikawa, L.-W. Hung, H.-B. Kim, D. Shaya, C.-Y. Kim, T. C. Terwilliger, E. Yamashita, M. Aoki, U. Okada and S. Murakami	4. 巻 74
2. 論文標題 BpeB, a major resistance-nodulation-cell division transporter from Burkholderia cenocepacia: construct design, crystallization and preliminary structural analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Crystallogr. F	6. 最初と最後の頁 710-716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X18013547	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	埜 和之 (Tao Kazuyuki) (00211996)	東京大学・アイソトープ総合センター・助教 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村上 聡 (Murakami Satoshi) (30300966)	東京工業大学・生命理工学院・教授 (12608)	
研究分担者	成田 新一郎 (Narita Sin-ichirou) (30338751)	山形県立米沢栄養大学・健康栄養学部・教授 (21502)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関