

令和 3 年 6 月 27 日現在

機関番号：21502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06136

研究課題名(和文)細菌外膜LPSトランスロコン生合成におけるBepAの作動機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the operating mechanism of BepA involved in the biosynthesis of bacterial outer membrane LPS translocon

研究代表者

成田 新一郎 (Narita, Shin-ichiro)

山形県立米沢栄養大学・健康栄養学部・教授

研究者番号：30338751

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)：グラム陰性細菌の外膜には、 $\beta$ -バレル構造を持つ外膜タンパク質が存在する。BepAはシャペロン様活性により外膜タンパク質のアセンブリを促進するとともに、プロテアーゼ活性により異常な外膜タンパク質を分解することで外膜の品質維持に貢献している。BepAがアセンブルさせるべき外膜タンパク質と分解すべき外膜タンパク質を選別する機構を解明するために、BepA変異体の機能解析を行った。その結果、BepAのプロテアーゼ活性中心の近傍に位置する 9/H246ループが通常はBepAのプロテアーゼ活性を抑制しており、このループの可逆的な構造変化を伴ってBepAのプロテアーゼ活性が誘導されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、大腸菌プロテアーゼによる外膜の機能維持の分子機構をアミノ酸残基レベルで解明した。ヒスチジン残基を介してプロテアーゼ活性が可逆的に制御されるという新たな活性調節機構を解明したことにより、細胞内タンパク質の品質維持においてプロテアーゼとシャペロンの働きがどのように制御されているかという、大腸菌からヒトまで共通する普遍的なテーマに対して新たな知見を提供することができた。

研究成果の概要(英文)：Outer membrane of gram-negative bacteria contains  $\beta$ -barreled outer membrane proteins. An Escherichia coli periplasmic protein BepA contributes to the maintenance of the structure and quality of the outer membrane by promoting the assembly of outer membrane proteins through its chaperone-like activity, and by degrading and removing abnormal outer membrane proteins through its protease activity. To elucidate the mechanism by which BepA discriminate between outer membrane proteins to be assembled and those to be degraded, we constructed BepA mutants and analyzed their function. We found that the 9/H246 loop located near the protease active site of BepA normally suppresses the protease activity of BepA, and that the reversible conformational change of this loop induces the protease activity of BepA to degrade outer membrane proteins.

研究分野：機能生物化学

キーワード：細胞内タンパク質分解 表層ストレス応答 細菌細胞表層 プロテアーゼ シャペロン 外膜タンパク質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

グラム陰性細菌の外膜は、内葉にリン脂質、外葉にリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) が配向した特殊な脂質二重層構造をとっており、細菌細胞内への異物の侵入を効果的に防いでいる。外膜にはリポタンパク質と外膜タンパク質の二種類のタンパク質が存在し、外膜の機能を支えている。これらのタンパク質はすべて細胞質で合成され、細胞質膜 (内膜) を透過した後、ペリプラズム空間を横断して外膜まで輸送される。リポタンパク質がアミノ末端の脂質部分を介して外膜に結合しているのに対し、外膜タンパク質はβ-バレル構造をとって外膜を貫通している。外膜タンパク質の外膜へのアセンブリには、外膜に存在する BAM (β-barrel assembly machinery) 複合体が働く。本研究で注目する LptD は、ほとんどのグラム陰性細菌にとって生育に必須の外膜タンパク質であり、リポタンパク質である LptE とともに LPS を外膜内葉から外葉へと輸送するトランスロコンを構成している。このトランスロコンは LptE の α-ヘリックスが LptD の β-バレル構造の内部に挿入された特徴的な構造をとるが、このような構造は両者が別個の経路で外膜まで輸送された後、外膜上で形成されると考えられている。

研究代表者らは、外膜タンパク質の外膜へのアセンブリを促進するペリプラズムタンパク質として、BepA (β-barrel assembly enhancing protease) を見出した<sup>1</sup>。BepA は BAM 複合体と相互作用し、そのシャペロン様活性により LptD のアセンブリを促進するとともに、LptD の変異や LptE の欠損などによって LptD/E 複合体の形成が阻害された際は、そのプロテアーゼ活性により LptD を分解除去することで外膜の品質維持に貢献している<sup>1, 2</sup>。本研究の開始当初に、BepA の tetratricopeptide repeat (TPR) ドメインの立体構造が決定されるとともに、TPR ドメインが BAM 複合体および LptD との相互作用に重要であることが明らかになり、LptD との相互作用に関与する BepA のアミノ酸残基が明らかになった<sup>2</sup>。

### 2. 研究の目的

本研究では、従来の研究を通じて得られた知見に基づき、次の2つの課題を設定した。

- ・ BepA が LptD/E 複合体のアセンブリを促進する機構の解析
- ・ BepA がアセンブルさせるべき LptD と分解すべき LptD を選別する機構の解析

これらの解析を通じて得られる知見をから、細胞内タンパク質の品質維持においてプロテアーゼとシャペロンの働きがどのように制御されているかという問題に対して、普遍的な洞察を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

X線結晶構造解析により決定された立体構造に基づき、BepA の機能に重要と考えられるアミノ酸残基に変異を導入し、大腸菌細胞内における BepA のコンフォメーションと機能を以下の方法で解析した。BepA のコンフォメーションに関しては、分子内で近接すると予測されるアミノ酸残基を結晶構造から予測し、これらをシステインに置換した変異体を作製して細胞内における分子内 S-S 結合の形成を電気泳動での移動度を指標に解析した。BepA の機能については、*bepA* 遺伝子を欠失する変異株の薬剤感受性を BepA 変異体が相補できるかどうかを指標に評価したほか、BepA 変異体依存的な LptD のアセンブリ促進や分解を、イムノプロットティングや、免疫沈降法を組み合わせたパルスチェイス実験によって解析した。また、BepA のプロテアーゼ活性に対する変異導入の影響を *in vitro* で評価するために、BepA 変異体を精製し、α-カゼインの切断活性を指標に解析した。

### 4. 研究成果

本研究の遂行過程において、本研究課題と関連する共同研究の結果から BepA の全長にわたる立体構造が X線結晶構造解析により決定され、BepA を構成するドメインの相対的配置や、プロテアーゼ活性部位の位置に関する知見が得られた<sup>3</sup>。そこでまず本研究では、BepA が実際に細胞内において、結晶構造解析によって明らかとなったコンフォメーションをとっているかど

うかを検証した。BepA は N 末端側のプロテアーゼドメインと C 末端側の TPR ドメインから構成されるが、結晶構造ではプロテアーゼドメインの複数の  $\alpha$  ヘリックスが、TPR ドメインの N 末端側と強く相互作用していた。また、プロテアーゼドメインの N 末端側は TPR ドメインの C 末端側に存在するアミノ酸との間で水素結合を形成していた。これらの相互作用に関わる残基をシステインに置換したところ、S-S 結合が形成されたことから、細胞内においても BepA が結晶構造と同様のコンフォメーションを取ることが明らかとなった。これらの S-S 結合を形成した BepA 変異体は、*in vivo* において野生型 BepA の機能を代替したことから、BepA の機能発現にはドメイン間の大きなコンフォメーション変化が必要ないことが示唆された。一方、結晶構造では BepA のプロテアーゼの活性中心がプロテアーゼドメインのヘリックスやループに覆われており、プロテアーゼ活性を発揮するためにはコンフォメーション変化が必要であることが示唆された<sup>3</sup>。

X 線結晶構造解析の結果から、BepA の 9 番目の  $\alpha$ -ヘリックス( $\alpha 9$ )を含むループ領域( $\alpha 9/H246$  ループ)がプロテアーゼ活性部位を覆い、基質の活性部位へのアクセスを妨げていると考えられた。また、活性部位の亜鉛イオンへの水分子の結合も、 $\alpha 9/H246$  ループに存在するアミノ酸残基(His-246)によって阻害されていた。このことから、定常状態では BepA のプロテアーゼの活性中心に基質が接近できない可能性が示唆された<sup>3</sup>。BepA がプロテアーゼ活性を発揮する過程においてコンフォメーション変化を起こす可能性を検証するため、BepA の  $\alpha 9/H246$  ループに変異を導入した変異体を作製し、*in vivo* および *in vitro* で BepA のプロテアーゼ活性の検討を行った。その結果、BepA の  $\alpha 9/H246$  ループに欠失変異を導入した変異体や、His-246 を他のアミノ酸に置換した変異体は、*in vivo* において恒常的に LptD を分解するようになるとともに、*in vitro* においても  $\alpha$ -カゼインの切断活性が亢進していることが明らかになった。反対に、BepA にジスルフィド結合を導入して  $\alpha 9/H246$  ループの動きを制限すると、BepA による LptD の分解が抑制された。これらの結果から、 $\alpha 9/H246$  ループが BepA のプロテアーゼ活性を抑制していること、および BepA がプロテアーゼ活性を発揮するためには  $\alpha 9/H246$  ループの移動を伴うコンフォメーション変化が必要であることが示唆された<sup>4</sup>。これらの研究成果をまとめて公表した論文において、BepA の  $\alpha 9/H246$  ループが通常はプロテアーゼ活性の発現を抑制しており、LptD を分解する際には  $\alpha 9/H246$  ループの可逆的な構造変化を伴って BepA のプロテアーゼ活性が誘導される「ヒスチジンスイッチモデル」を提唱した<sup>4</sup>。更に本研究では BepA の  $\alpha 9/H246$  ループの欠失変異体のプロテアーゼ活性を、蛍光タンパク質を用いて経時的に検出する実験系の構築を行った。今後、これらの実験系を用いて BepA のプロテアーゼ活性を定量的に解析することにより、プロテアーゼによる基質認識機構やプロテアーゼ活性の制御機構に関する理解が進むことが期待される。

#### < 引用文献 >

1. Narita et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110: E3612-E3621. 2013
2. Daimon et al. Mol. Microbiol. 106: 760-776. 2017
3. Shahrizal et al. J. Mol. Biol. 431: 625-635. 2019
4. Daimon et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 117: 27989-27996. 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasushi Daimon, Shin-ichiro Narita, Ryoji Miyazaki, Yohei Hizukuri, Hiroyuki Mori, Yoshiki Tanaka, Tomoya Tsukazaki, Yoshinori Akiyama	4. 巻 117
2. 論文標題 Reversible auto-inhibitory regulation of Escherichia coli metalloprotease BepA for selective $\beta$ -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 $\beta$ -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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mohammad Shahrizal Mohammad Umar, Shintaro Nakayama, Yasushi Daimon, Yoshiki Tanaka, Shin-ichiro Narita, Yoshinori Akiyama, and Tomoya Tsukazaki
2. 発表標題 Crystal structure of BepA, $\beta$ -barrel assembly-enhancing protease.
3. 学会等名 Bacterial Protein Export 2018 meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究テーマ  
<https://sites.google.com/view/yunsnarita/home/yan-jiutema>

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
研究協力者	大門 康志  (Daimon Yasushi)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・研究員  (14301)	
連携研究者	秋山 芳展  (Akiyama Yoshinori)  (10192460)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授  (14301)	

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
---------	---------