

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16077

研究課題名(和文)試験管内アッセイ系による大腸菌外膜タンパク質膜組込み装置の分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of E. coli BAM complex by in vitro assay system.

研究代表者

塩田 拓也 (Shiota, Takuya)

宮崎大学・キャリアマネジメント推進機構・准教授

研究者番号：20819304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：グラム陰性菌の外膜に存在するバレル型膜タンパク質は、生育や感染など様々な役割を担っている。これらが機能するためには、正しい立体構造を伴った膜組込み(アセンブリー)が必須である。アセンブリーは外膜に存在するBAM複合体によって行われる。本研究では、独自の試験管内アッセイ法によって、基質に存在するBAM複合体に認識される特徴的な配列を見つけた。さらに、中性子反射率法によって基質やサブユニットの結合に伴って引き起こされるBAM複合体の構造変化を検出することに成功した。また、ミトコンドリアのバレル型膜タンパク質の輸送に関わる装置の立体構造および、輸送に関わる連携機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の輸送に関わる分子機械を動的に解析することは技術的な挑戦を伴う。本研究では、試験管内アッセイ法と中性子反射率法という2つの手法を駆使し、その動的な分子機構の一端を解明した。グラム陰性菌はWHOが指定する喫緊に対策が必要な薬剤耐性菌の75%を占める。アセンブリーはグラム陰性菌の生育に必須の生理現象であり、事実アセンブリー装置を標的とした抗生物質が近年報告されている。本研究では、アセンブリーの中核を担うBAM複合体について、分子機構の解明に大きく貢献しうる構造変化を解明した。さらに、基質に存在するシグナルを発見した。これらは、今後の分子標的薬の設計を容易にすることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The outer membrane of gram-negative bacteria contains beta-barrel membrane proteins. The process of the insertion of beta-barrel membrane proteins and the correct protein folding termed assembly is an essential process for cell viability. The beta-barrel assembly machine (BAM) complex responsible for the assembly, and it is composed of beta-barrel membrane protein, BamA and four lipoproteins BamB, BamC, BamD, BamE. In this study, we investigated the molecular mechanisms of the BAM complex by our original in vitro reconstitution assay and neutron reflectometry. We revealed that the substrate protein contains an important region at the third and fifth beta-strand from the C-terminal and substrate or BamE binding stimulates the conformational changing of the POTRA domains of BamA.

研究分野：微生物学

キーワード：BAM複合体 グラム陰性菌 バレル型膜タンパク質 ミトコンドリア トランスロケータ

1. 研究開始当初の背景

病原性大腸菌やヘリコバクター・ピロリを含むグラム陰性菌の外膜には β バレル型膜タンパク質が存在する。これらは栄養老廃物の交換 (生育)、宿主との接着や毒素の放出 (感染)、さらには外膜の透過障壁能の強化 (防御) といった外界と関わる全ての生命現象に関与する重要なタンパク質群である。すべての外膜タンパク質は、正しい立体構造を伴った膜組込み (アセンブリー) が行われなければ機能を発揮することができない。アセンブリーは、BAM 複合体とよばれる膜組込み装置によって行われる。BAM 複合体は、 β バレル型膜タンパク質である BamA と、4 つのリポタンパク質 BamB、BamC、BamD、BamE から構成される (図 1)。研究開始当初、BAM 複合体の様々な立体構造が、複数のグループから相次いで報告され、その構造の違いから作動原理が議論されていた。しかしながら、各サブユニットの役割や基質タンパク質の通り路が不明であり、その分子機構には不明な点が多かった。外膜タンパク質のアセンブリーに対する分子標的薬をデザインするためには、タンパク質の立体構造による作動原理予測から、より詳細な分子機構の解明が必要であった。

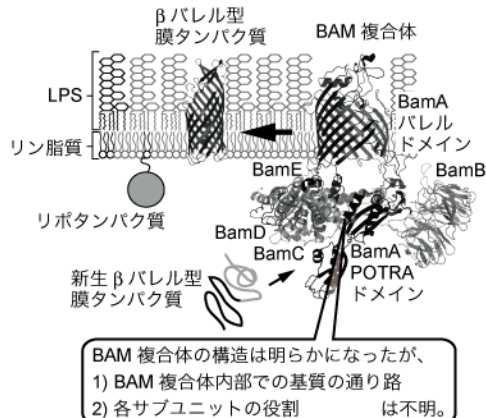


図 1 *E. coli* 外膜の構成因子と構造および、BAM 複合体を介した β バレル型膜タンパク質の輸送経路。X 線結晶構造解析による BAM 複合体の立体構造 (PDB: 5D0O)。

2. 研究の目的

本研究では、BAM 複合体の機能解析について、以下の 2 つの目的を設定した。

① BAM 複合体のどのサブユニットが基質のどの部位と相互作用するのか？

β バレル型膜タンパク質の最も C 末端側に位置する β ストランドには、「 β シグナル」と呼ばれる特徴的なアミノ酸配列が存在する。出芽酵母のミトコンドリアと大腸菌の両方の解析から、 β シグナルが BamA の β バレルドメインに存在する「ラテラルゲート」とよばれる部分と相互作用することが明らかにされていた。しかしながら、巨大な β バレル型膜タンパク質のアセンブリーが、 β シグナルとラテラルゲートの相互作用のみで実現されているとは考えにくく、他の領域、部位での相互作用が存在する可能性が極めて高い。本研究では、その解明を目指した。

② BAM 複合体が基質と結合した際にどのような構造変化を引き起こすのか？

先行研究で明らかにされている、個々のサブユニットの構造、2 つ以上のサブユニットからなる構造、もしくは、複合体全体の構造のそれぞれが、輸送中のどの状態に相当するのかを明らかにすることを旨とする。特に、これまでの構造では、BamA のペリプラズムに露出した POTRA ドメインと呼ばれる領域がダイナミックに動くことが示唆されている。本研究では、基質結合によって POTRA ドメインがどのように動くのかについての解明を目指した。

さらに派生的なプロジェクトとして、グラム陰性菌外膜と同様に β バレル型膜タンパク質が存在する、ミトコンドリア外膜における β バレル型膜タンパク質輸送経路の分子機構の解明を行い、その比較を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

以下の 3 つの方法を中心に用いて研究を進めた。

① EMM アセンブリーアッセイ

EMM アセンブリーアッセイは、基質である β バレル型膜タンパク質を *in vitro* で合成し、*E. coli* から単離した膜画分である、EMM (*E. coli* Microsomal Membrane) に取込ませ、その膜組込み量を経時的に解析することで、高い時間分解能で β バレル型膜タンパク質の膜組込みを解析できる手法である。本研究では、EMM アセンブリーアッセイが試験管内アッセイ法であるという特徴を最大限に活かし、基質を断片化したペプチドを加えて競合実験を行うことで、BAM 複合体と相互作用する基質の領域を同定した。

② 中性子反射率法

BAM 複合体の連続的な構造変化を捉えるため、中性子反射率法を用いた。中性子反射率法は、中性子ビームを界面で反射させ、その反射率、波長、角度から、界面の厚さ、密度、表面粗さを解析できる手法である。生体膜の解析は、中性子を遮断しない Si から成る Wafer 上に膜タンパク質と脂質から成る生体膜を再構築し、生体膜と、その上部に存在する溶液部分との固液界面を解析することで行う。本研究では、BAM 複合体の POTRA ドメインの構造変化を観察するため、POTRA ドメインと反対側の領域にヒスタグを付加した BamA を用いて、生体膜の再構築を行った。その後、再構築した膜に、基質や BAM 複合体の他のサブユニットと添加し、その構造変化を観察した。

③ 部位特異的光架橋法

基質と BAM 複合体、輸送装置のサブユニット間の相互作用を解析するために、部位特異的光架橋法を用いた。この手法は、目的タンパク質の任意の部位に光架橋側鎖をもつ非天然アミノ酸である *p*-benzoyl-L-phenylalanine (BPA) を導入し、紫外線を照射することで、近傍のタンパク質との間に形成される共有結合によって固定された架橋産物から相互作用を解析できる。本研究では、BAM 複合体のサブユニットのひとつ BamD とミトコンドリアで β バレル型膜タンパク質の輸送に関わる TOM 複合体について、この手法を用いて相互作用解析を実施した。

4. 研究成果

① 大腸菌外膜 β バレル型膜タンパク質に存在する新規シグナルの同定

基質に BAM 複合体と相互作用する部位を、EMM アセンブリーアッセイを技術基盤とした競合阻害実験によって探索した。具体的には、大腸菌の外膜に最も多く存在する β バレル型膜タンパク質である OmpC を断片化したペプチドライブラリーを作成し、EMM アセンブリーアッセイに添加し、競合阻害を引き起こす部位を同定した。その結果、4 種類のペプチド領域が決定された。決定された OmpC の 4 領域の中に存在するよく保存されたアミノ酸残基について変異体解析を行ったところ、4 つのペプチド領域のうち、3 つの領域では実際にシグナルとして機能している領域であることが明らかになった。3 つのうち一つはベータシグナル領域であり、あと二つは C 末端側から 3 本目、5 本目のベータストランド領域であった。本研究から、もっとも C 末端側のベータストランドだけでなく、後ろから 3 本目、5 本目にもシグナルが存在することが明らかになった。

② 中性子反射率法による BAM 複合体の構造変化の検出に成功

中性子反射率法で生体膜を解析するには、中性子を遮断しない高純度 Si 基盤上に生体膜を再構築し、その上部を溶液で満たして解析を行う。BAM 複合体のペリプラズム部分の基質結合に呼応した構造変化を解析するためには、BAM 複合体の向きを揃えて生体膜を再構築する必要があった。そこで、われわれは、BamA の機能を棄損せず、細胞表層に露出した部分に His タグを付加できる部位を見つけ出した。そして、オーストラリア Monash 大学の Shen 博士との共同研究により、金薄膜を蒸着し、それに Ni-NTA を結合させた Si-Wafer 上で BamA を含む生体膜の再構築に成功した。さらに、この BamA は Pet と呼ばれる基質タンパク質の添加によって POTRA ドメインが伸長することが観察された (Ding *et al.*, *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2020)。(図 2)

さらに、この再構築系を用いて、BAM 複合体のサブユニットである BamB、BamD、BamE が BamA の POTRA ドメインの構造変化にどのような影響を与えるかについて検討した。その結果、BamB と BamD の結合は BamA の構造に影響を与えないが、BamE は BamA の POTRA ドメインの伸長を促すことを突き止めた (Chen *et al.*, *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2021) (図 2)。

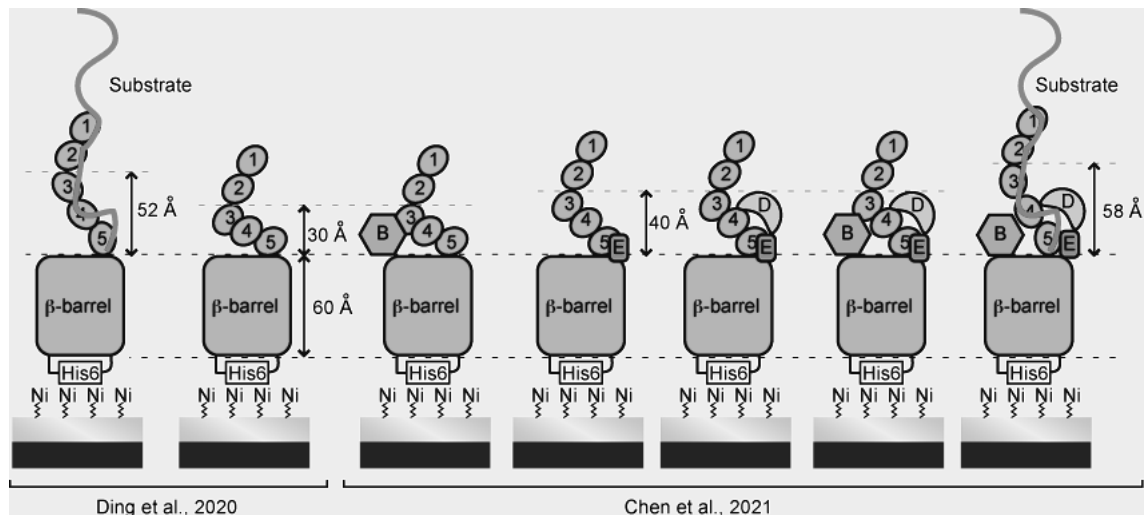


図 2. 中性子反射率法で明らかになった BAM 複合体の構造変化

③ ミトコンドリアのタンパク質輸送装置 TOM 複合体の構造、機能の一端を解明

京都産業大学の遠藤研究室を中心とした国際共同研究グループに参画し、ミトコンドリアの外膜に存在する膜透過装置 TOM 複合体の cryo-EM 構造を決定した (Araiso *et al.*, *Nature* 2019)。我々は、部位特異的光架橋法を駆使して、TOM 複合体が他の輸送装置と密接に連携しており、さまざまな経路に滞りなくタンパク質を輸送する機能を有していることを明らかにした。その中には、Tim10 とよばれるタンパク質が存在していた。Tim10 は β バレル型膜タンパク質を TOM 複合体から SAM 複合体に受け渡す上で重要な役割をになっており、TOM 複合体は β バレル型膜タンパク質を効率よく受け渡すシステムを有していることを突き止めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Araiso Yuhei, Tsutsumi Akihisa, Qiu Jian, Imai Kenichiro, Shiota Takuya, Ariyama Hirotsuka, Ando Toshio, Becker Thomas, Lithgow Trevor, Wiedemann Nils, Pfanner Nikolaus, Kikkawa Masahide, Endo Toshiya et al.	4. 巻 575
2. 論文標題 Structure of the mitochondrial import gate reveals distinct preprotein paths	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 395-401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1680-7	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 Ding Yue, Shiota Takuya, Le Brun Anton P., Dunstan Rhys A., Wang Bo, Hsu Hsien-Yi, Lithgow Trevor, Shen Hsin-Hui	4. 巻 1862
2. 論文標題 Characterization of BamA reconstituted into a solid-supported lipid bilayer as a platform for measuring dynamics during substrate protein assembly into the membrane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183317 ~ 183317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2020.183317	査読の有無 無
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 Chen Xiaoyu, Ding Yue, Bamert Rebecca S., Le Brun Anton P., Duff Anthony P., Wu Chun-Ming, Hsu Hsien-Yi, Shiota Takuya, Lithgow Trevor, Shen Hsin-Hui	4. 巻 in press
2. 論文標題 Substrate-dependent arrangements of the subunits of the BAM complex determined by neutron reflectometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183587 ~ 183587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2021.183587	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塩田拓也
2. 発表標題 大腸菌外膜 バレル型膜タンパク質輸送阻害ペプチドの探索
3. 学会等名 第16回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩田拓也
2. 発表標題 バクテリア外膜タンパク質アセンブリー解析の新手法「EMMアセンブリーアッセイ」
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩田拓也
2. 発表標題 Two major technical improvement unlocked the secret of mitochondrial protein entry gate.
3. 学会等名 Osaka Mito 2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩田拓也
2. 発表標題 大腸菌のその瞬間の外膜タンパク質の輸送をin vitroで再現する、EMMアセンブリーアッセイ
3. 学会等名 ゲノム微生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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