

プロテオバクテリアにおけるリポ蛋白質局在化機構の多様性に関する研究

成田 新一郎

(東京大学 分子細胞生物学研究所)

研究の目的

細菌リポ蛋白質はN末端のシステイン残基が脂質で修飾された蛋白質の一群で、細胞質で前駆体として合成された後、細胞質膜(内膜)上で成熟体となり、脂質を介して膜に結合する¹⁾。グラム陰性細菌においては、リポ蛋白質は内膜にとどまるものと外膜に運ばれるものに仕分けられ、外膜リポ蛋白質はLolシステムと呼ばれる輸送装置によって外膜に運ばれる²⁾。リポ蛋白質の外膜局在化機構はこれまで大腸菌を用いて解析が進められ、その分子基盤に対する理解が深まっている。Lol因子をコードする遺伝子の多くは細菌間でよく保存されていることから、Lolシステムを介したリポ蛋白質の外膜局在化はグラム陰性細菌に普遍的な輸送機構であると考えられている。しかしリポ蛋白質の外膜受容体であるLolBは β , δ , γ -プロテオバクテリアには存在するが、 α -プロテオバクテリアはLolBホモログを欠く。本研究では α -プロテオバクテリアにおけるリポ蛋白質局在化機構を解明するために、根粒菌のLol因子をクローン化し機能解析を行った。

方法

ミヤコグサ根粒菌(*Mesorhizobium loti* MAFF 303099)のゲノムDNAからLolAホモログ(mll4242, mll8064)の成熟体部分をコードする領域をPCRにより増幅し、N末端に大腸菌外膜蛋白質OmpFのシグナル配列、C末端にHisタグが融合したLolAをコードするプラスミドを作製した。またLolC, LolDホモログ(mll1342, mll1341)をコードする領域を増幅し、LolDのC末端にHisタグ修飾するためのDNA配列を付加してプラスミドにクローン化した。作製したプラスミドを大腸菌C43株に導入して発現させ、金属アフィニティークロマトグラフィーによりLol蛋白質を精製した。大腸菌スフェロプラストからのリポ蛋白質遊離活性は松山らの方法³⁾に従い測定した。

結果

2000年に全ゲノムの塩基配列が決定された*M. loti*の染色体には2種の*lolA*ホモログ(mll4242, mll8064)が存在するのに対し、*lolB*のホモログは存在しない⁴⁾。また大腸菌ではLolC, LolD, LolEが1: 2: 1の分子比でABCトランスポーター複合体を形成するのに対し、*M. loti*は*lolE*に相当する遺伝子を欠く。LolDはATPaseサブユニットであり、LolCとLolEはそれぞれ膜を4回貫通する膜サブユニットである⁵⁾。LolCとLolEは互いに26%の配列相同性を持つ類似した蛋白質であるため、*M. loti*ではABCトランスポーターの膜サブユニットはLolCとLolEのヘテロダイマーではなくLolCがホモダイマーを形成して機能していると予測された。

*M. loti*の染色体にコードされる2種のLolAホモログLolA1, LolA2をそれぞれ大腸

菌で発現させ、シグナルペプチドが切断された成熟体蛋白質をペリプラズム画分から回収し精製した。LolA2 は精製後ただちに不溶化したため、以降の解析から除外した。一方、LolC, LolD ホモログを大腸菌で発現させて膜画分を調製し、膜蛋白質を *n*-dodecyl- β -D-maltopyranoside で可溶化した後、LolD の C 末端に付加した His タグを利用してアフィニティークロマトグラフィーに供したところ、LolC と LolD が 1: 1 の割合で結合した複合体が精製された。このことから、*M. loti* では LolC, LolD 2 分子ずつからなる複合体がリポ蛋白質特異的 ABC トランスポーターとして機能していることが示唆された。

LolA および LolCDE 複合体によるリポ蛋白質局在化反応は、大腸菌スフェロプラストを用いた実験系により解析することができる⁶⁾。*M. loti* の LolC および LolD を発現する大腸菌をスフェロプラストに変換し、LolA1 を添加したところ、大腸菌外膜リポ蛋白質 Lpp がスフェロプラストの上清画分に検出された。これに対して、ベクターを導入した大腸菌スフェロプラストに LolA1 を加えても Lpp の遊離は確認されなかった。これらの結果から LolA1 が LolCD に依存してリポ蛋白質を内膜から遊離させる活性を有していることが明らかになった。

結論

本研究では *M. loti* の LolCD と LolA1 を介したリポ蛋白質の内膜からの遊離反応を、大腸菌スフェロプラストを用いて再構築した。この結果から、Lol 因子を介したリポ蛋白質の輸送経路が α -プラオテオバクテリアにおいても保存されていることが明らかになった。一方、LolB ホモログを欠くこれらの菌においてリポ蛋白質が LolA からどのように外膜に局在化するかは依然不明である。今後、リポ蛋白質と LolA との複合体を用いてリポ蛋白質の根粒菌外膜への組み込み反応を解析する必要がある。これらの研究を通じてグラム陰性細菌におけるリポ蛋白質の外膜局在化機構がどのように進化してきたかが明らかになることが期待される。

文献

- 1) Pugsley AP: The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 1993; 57: 50-108.
- 2) Narita S, Matsuyama S, Tokuda H: Lipoprotein trafficking in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 2004; 182: 1-6.
- 3) Matsuyama S, Tajima T, Tokuda H: A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. *EMBO J.* 1995; 14: 3365-3372.
- 4) Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S: Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA*

Res. 2000; 7: 331–338.

- 5) Yakushi T, Masuda K, Narita S, Matsuyama S, Tokuda H: A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2: 212-218.
- 6) Narita S, Tanaka K, Matsuyama S, Tokuda H: Disruption of *lolCDE*, encoding an ATP-binding cassette transporter, is lethal for *Escherichia coli* and prevents release of lipoproteins from the inner membrane. *J. Bacteriol.* 2002; 184: 1417-1422.