

《農芸化学奨励賞》

グラム陰性細菌の細胞表層形成に関与する ABC トランスポーターの研究



東京大学分子細胞生物学研究所 助教 成田 新一 郎

グラム陰性細菌の外膜は内側にリン脂質、外側にリポ多糖をもつ特殊な脂質二重層で、外膜蛋白質とリポ蛋白質の2種類の蛋白質が結合している(図1)。外膜は細菌にとって有害な物質に対する透過障壁としての機能を果たすと同時に、選択的透過性を持ち、グラム陰性細菌の生存戦略において極めて重要な器官である。外膜を構成する4種の因子(リン脂質、リポ多糖、外膜蛋白質、リポ蛋白質)はすべて細胞質または内膜で合成されるため、これらは合成された後に外膜まで輸送される必要がある。外膜因子はすべて疎水的な領域をもつものに対して、内膜と外膜の間のペリプラズム空間は親水的な環境である。このため外膜因子がペリプラズム空間を移動することは熱力学的に不利な反応であり、この問題を克服するため外膜因子の輸送には専用の輸送因子が関与している。

グラム陰性細菌の外膜を構成する4因子のうち、リポ蛋白質とリポ多糖の外膜局在化にABCトランスポーターが関与していることが明らかになっている。ABCトランスポーターはATPの加水分解エネルギーを利用して物質の膜を越えた輸送を触媒するトランスポーターであり、すべての生物界に存在する。本講演ではリポ蛋白質の輸送にかかわるLolCDE、およびリポ多糖の輸送にかかわるLptBFGの2種類のABCトランスポーターについて筆者らが行った研究成果を報告する。

1. リポ蛋白質の内膜からの遊離を触媒する LolCDE の解析

リポ蛋白質はアミノ末端のシステインが脂質で修飾された蛋白質で、脂質部分を介して膜に結合している。リポ蛋白質はシグナルペプチドをもつ前駆体として細胞質で合成された後、Sec膜透過装置によって内膜を越え、内膜上で脂質修飾を受けて成熟体となる。成熟体となったリポ蛋白質は内膜にとどまるものと外膜に輸送されるものに選別され、外膜に向かうリポ蛋白質のみがLolAと水溶性複合体を形成して内膜から遊離する。リポ蛋白質-LolA複合体はペリプラズム空間を横断し外膜に到達すると、受容体蛋白質LolBと相互作用し、リポ蛋白質は外膜に組み込まれる(図2)。これら一連の反応の最初の段階において、リポ蛋白質を内膜から遊離させる因子として同定されたのがLolCDEである。LolCDEは膜貫通サブユニットのLolC, LolEそれぞれ1分子と、ATPaseサブユニットのLolD

2分子からなる。遺伝学的解析の結果、LolC, LolD, LolEをコードする遺伝子はいずれも大腸菌の生育に必須であり、LolCDEを枯渇させると新たに合成された外膜リポ蛋白質がLolAに受け渡されずに内膜にとどまることを明らかにした。ABCトランスポーターは一般に物質の膜を越えた輸送を触媒するが、LolCDEがかかわる反応では輸送基質(リポ蛋白質)はすでに内膜の外側に存在していることがわかった。したがってLolCDEは従来の意味でのトランスポーターではなく、内膜の外葉からリポ蛋白質を引き抜く新奇なABCトランスポーターであった。LolC, LolEの膜配向性を解析した結果、それぞれ4箇所膜貫通領域をもつことがわかった。この数は一般的なABCトランスポーターと比較すると少ない。これはLolCDEには輸送基質を透過させるチャンネルを形成する必要がないためと考えられる。

リポ蛋白質はアミノ末端から2番目(+2位)の残基がアスパラギン酸であれば内膜に局在し、それ以外のアミノ酸であれば外膜に局在するが、この選別シグナルを認識している因子は不明であった。筆者らは+2位の認識に異常をきたした変異株を選択する方法を開発し、+2位にアスパラギン酸をもつリポ蛋白質を外膜に局在化させるLolCの変異体を単離した。この変異体の作用で内膜から遊離したりポ蛋白質は、LolA, LolBへと受け渡されて外膜に局在化した。この発見により、リポ蛋白質の選別シグナルを認識している因子はLolCDEであることが明らかになった。

リポ蛋白質局在化機構に関する従来の知見は大腸菌のものに限られていた。筆者らは緑膿菌を用いてリポ蛋白質の局在性を規定しているシグナルを探索し、緑膿菌では+3位および+4位の残基が選別シグナルとして働くことを見いだした。緑膿菌のLol因子を精製して輸送活性を調べた結果、+3位および+4位によって規定されるシグナルを認識しているのはLolCDEであることを見いだした。このことから、Lol因子を

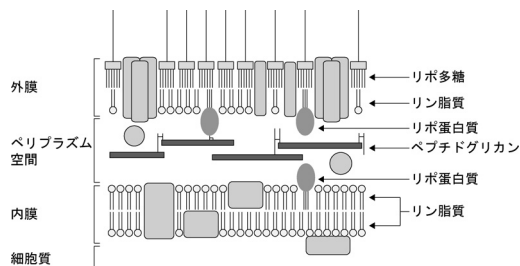


図1 グラム陰性細菌の細胞表層構造

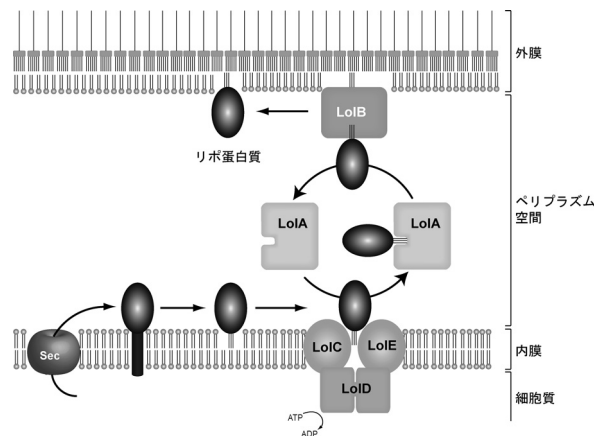


図2 リポ蛋白質の外膜局在化機構

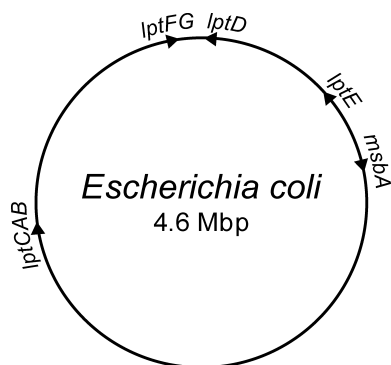


図3 リポ多糖の外膜局在化に関与する遺伝子の大腸菌染色体上の位置

介したリポ蛋白質の選別・局在化システムは細菌種を通して保存されているのに対し、局在化シグナルは進化の過程で多様化したと考えられる。

グラム陰性細菌のリポ蛋白質はN末端システインのSH基とアミノ基にアシル鎖をもつ。このうちアミノ基のアシル化はapolipoprotein N-acyltransferase (Lnt)によって触媒される。多くのグラム陽性細菌はLntをもたず、リポ蛋白質はN-アシル化されない。このためリポ蛋白質のN-アシル化は外膜局在化に関与していることが予想されるが、Lntは大腸菌の生育に必須であるため、*lnt* 遺伝子の欠失変異株は得られていなかった。筆者らはLolCDEを過剰発現することにより、*lnt* 欠失株の単離に成功した。*lnt* 欠失株ではリポ蛋白質はN-アシル化を受ける前のアポリポ蛋白質として存在していた。LolCDEのアポリポ蛋白質に対する親和性は極めて低く、リポ蛋白質のN-アシル化が効率的な外膜局在化に重要であることがわかった。

2. リポ多糖の外膜局在化に関与する LptBFG の解析

リポ多糖の外膜局在化にかかわる因子は長い間不明であったが、最近になって輸送因子をコードする *lpt* 遺伝子群が同定され、リポ多糖の輸送機構に関する研究が注目を集めている。以前の研究から、ABCトランスポーター MsbA がリポ多糖を内膜の内葉から外葉へとフリップすることが知られていた。最近の大腸菌変異株を用いた遺伝学的研究から、内膜蛋白質の LptB, LptC およびペリプラズム蛋白質の LptA がリポ多糖の外膜局在化に関与していることが示された。このうち *lptB* 遺伝子は大腸菌染色体上 72 分に位置し、ABC 蛋白質をコードする (図3)。 *lptB* の近傍に膜サブユニットをコードする遺伝子がないため、LptB が ABC トランスポーターを構成するかは定かではなかったが、バイオインフォマティクスによる解析から染色体上 97 分に位置する *yjgP*, *yjgQ* が膜サブユニットの候補として浮上した。これらの遺伝子の発現を抑制するとリポ多糖の外膜輸送が阻害されたことから、YjgP, YjgQ が LptB と協調して働く可能性が示唆された。筆者らは YjgP (LptF), YjgQ (LptG) が実際に LptB と複合体を形成するかどうかを検討するため、これらの遺伝子を大腸菌で共発現させ、生化学的解析を行った。その結果、LptB, LptF, LptG は 2:1:1 の分子比で ABC トランスポーター複合体を形成することを見いだした。LptBFG はヌクレオチド結合サブユニットと膜サブユニットをコードする遺伝子が染色体上の離れた位置に存在することが

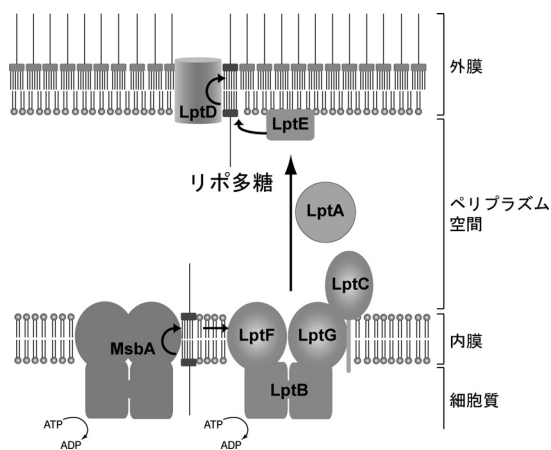


図4 リポ多糖の外膜局在化モデル

示された最初の ABC トランスポーターである。また、内膜因子の LptC が LptBFG 複合体に結合することも明らかになった。これらの結果から、LptBFG/C 複合体は LolCDE と類似した機能をもつと推測される。すなわち、LptBFG/C は MsbA の働きで内膜外葉に移行したリポ多糖を膜から遊離させ、ペリプラズムの LptA に受け渡すものと考えられる (図4)。本研究はリポ多糖の輸送反応を *in vitro* で解析するうえで基盤となるものであり、今後リポ多糖の外膜局在化機構の解明につながることを期待される。

おわりに

最近筆者らは上述した *lnt* 欠失株が低温感受性を示すことを見いだした。このことから、リポ蛋白質の N-アシル化は細菌の低温適応に関与している可能性が考えられる。この知見はリポ蛋白質が担う新規機能の存在を示唆しており、生物工学的な応用も含めて今後の研究の展開が期待される。

大腸菌染色体上には 79 種の ABC 蛋白質がコードされているが、大腸菌の生育に必須であることが示されている ABC トランスポーターは、細胞表層形成にかかわる LolCDE, MsbA, LptBFG の 3 種のみである。またすべての Lol 因子および Lpt 因子が大腸菌の生育に必須であり、これらはグラム陰性細菌に対する新たな抗生物質の標的分子として期待される。

本研究は、東京大学分子細胞生物学研究所細胞形成研究分野において行ったものである。本研究を行う機会を与えていただき、ご指導ご鞭撻いただきました当研究分野の徳田元教授に心より感謝いたします。リポ蛋白質輸送機構に関する研究の先駆者である松山伸一先生 (現 立教大学) には生化学的解析の基本的手法にはじまり、数々のご指導をいただきました。厚く御礼申し上げます。当研究室の准教授としての的確な助言をいただきました西山賢一先生 (現 岩手大学) に感謝いたします。緑膿菌リポ蛋白質に関する研究をご支援いただきました中江太治先生 (現 北里大学) に深く感謝いたします。井口八郎先生には研究者としての基礎を教わり、温かいご指導、ご鞭撻を賜りました。深く感謝いたします。本研究成果は多くの先生方、学生の努力の賜物であり、ご協力いただいた皆様に厚く御礼申し上げます。最後になりましたが、本賞に推薦くださいました日本農芸化学会副会長の太田明德先生に心より御礼申し上げます。