

氏名	ひらの ゆう 平 野 優
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第3160号
学位授与の日付	平成19年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科化学専攻
学位論文題目	Structural studies of the outer membrane lipoprotein NlpE from <i>Escherichia coli</i> (大腸菌由来外膜リポタンパク質 NlpE の構造研究)
論文調査委員	(主査) 教授 三木邦夫 教授 伊藤維昭 教授 杉山 弘

論 文 内 容 の 要 旨

NlpE (New lipoprotein E) はグラム陰性菌に広く見られる外膜リポタンパク質である。N末端のシステイン残基が脂質修飾を受け、その脂質を外膜ペリプラズム側に挿入している。大腸菌における研究から、NlpE は細胞質の外側で起こるストレスに応答する Cpx シグナル伝達系を活性化すると報告されている。特に非生物表面への細胞接着時や NlpE を過剰発現時に、Cpx 経路の活性化に関与することが知られている。最近、細胞外の銅濃度上昇により Cpx 経路が活性化されることが報告され、NlpE の関与が示唆されている。一方、大腸菌の NlpE には3つの特徴的なアミノ酸配列モチーフが存在している。1つは酸化還元タンパク質によく見られる CXXC モチーフ、2つ目はセリンプロテアーゼの阻害タンパク質に見られる protease inhibitor signature モチーフ、そして3つ目は銅輸送タンパク質に見られる putative copper-binding モチーフである。Cpx 経路を活性化する要因としては、細胞外 pH の上昇や内膜構造の異常などがあるとされる。Cpx 経路の活性化の結果、ペリプラズムではたらくシャペロンタンパク質 DegP, DsbA, PpiA などの発現が誘導される。そのため Cpx 経路の活性化を引き起こす原因は、ペリプラズムにおけるタンパク質の構造異常にあるのではないかと考えられている。特に P 型線毛のサブユニット PapE については、そのフォールディング中間状態が Cpx 経路の活性化を引き起こすと考えられている。これまでに Cpx 経路活性化因子としては、PapE の三次元構造が得られている。本研究は、NlpE の構造解析を行い、Cpx 経路活性化のメカニズムについて知見を得ることを目的としている。

本研究における大腸菌由来 NlpE の結晶構造解析では、脂質修飾を受けない Cys1Ala 変異体を使用しており、この変異体を用いることで NlpE は水溶性となり、ペリプラズム画分より回収したこの変異体タンパク質を用いて構造解析、生化学実験を行った。結晶はポリエチレングリコール8000を沈殿剤とした条件において得られ、位相決定は Se-Met 置換体を用いた多波長異常分散法により行っている。Se-Met 置換体における 2.6 Å 分解能のデータを用いたモデルの精密化を行った結果、 $R=22.4\%$ 、 $R_{free}=27.0\%$ となった。

NlpE の全体構造は、バレル構造を持った2つのドメインからなっていた。N末ドメインは8本のストランドからなる逆平行型 β バレル構造をとっており、C末ドメインは5本のストランドからなる逆平行型 β バレルと1本の α ヘリックスからなっていた。非対称単位中の2分子はドメインスワップダイマーを形成しており、ポリペプチド鎖の中央部分がドメインスワップに関わる非常に特異的な構造をとっていた。NlpE の3つのモチーフの内、CXXC モチーフと inhibitor signature モチーフは互いに近接な位置に存在していた。また、putative copper-binding モチーフは金属の結合に関与する可能性が低いと考えられる。NlpE の各ドメイン構造については、N末ドメインはバクテリアのリポカリン Blc と構造類似性を持っており、C末ドメインは核酸や糖結合タンパク質に見られる oligonucleotide/ oligosaccharide binding (OB) fold をとっていることが明らかになった。NlpE の機能に重要であると考えられる CXXC モチーフのシステイン残基については、生化学実験と結晶構造から、酸化還元状態が変化しやすく金属の結合を制御する際に重要な役割を果たすことが示唆された。以上のような構造の特徴から、NlpE に見られる構造不安定性が Cpx 経路活性化に重要であることが示された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、大腸菌由来の外膜リポタンパク質 NlpE の立体構造を、X 線結晶構造解析によって決定し、その構造と機能の相関について考察したものである。NlpE はグラム陰性菌に広く存在し、細胞質の外側で起こるストレスに応答する Cpx シグナル伝達経路の活性化に関与することが知られている。本研究では、脂質修飾を受けない Cys1Ala 変異体を用いることで NlpE を水溶性タンパク質として取り扱い、ペリプラズム画分より回収した NlpE 変異体タンパク質を精製し、X 線回折実験に用いることのできる結晶を得ている。構造解析に際しては、Se-Met 置換体を用いた多波長異常分散法により位相を決定している。最終的に Se-Met 置換体における 2.6 Å 分解能のデータを用い結晶構造の精密化を行い、十分の精度を有する ($R=22.4\%$, $R_{\text{free}}=27.0\%$) 分子構造モデルが得られている。

結晶構造解析の結果、NlpE の全体構造はバレル構造を持った 2 つのドメインからなること、N 末ドメインはバクテリアのリポカリン Blc と構造類似性があり、C 末ドメインは核酸や糖結合タンパク質に見られる oligonucleotide/oligosaccharide binding (OB) fold をとっていることを明らかにしている。また、非対称単位中の 2 分子はドメインスワップダイマーを形成しており、ポリペプチド鎖の中央部分がドメインスワップに関わる非常に特異的な構造をとっていることを明らかにしている。さらに、NlpE の機能に重要であると考えられる CXXC モチーフのシステイン残基については、生化学実験の結果と結晶構造から、酸化還元状態が変化しやすく金属の結合を制御する際に重要な役割を果たすと推定している。

以上のような構造の特徴から、NlpE による Cpx 経路活性化のメカニズムを考察している。その際には、NlpE が溶液中ではモノマーとして存在することが確認されたため、ドメインスワップダイマー構造からモノマーモデルを作成し構造の特徴を議論している。NlpE の N 末ドメインについては、 β バレル構造に構造変化が起こりやすいと推定し、その構造変化は PapE のフォールディング中間状態において予想される β バレル構造の変化と類似していることを示している。細胞接着時には線毛構造の変化により NlpE に構造変化が起こり、Cpx 経路の活性化につながる、また、NlpE の過剰発現時には、細胞質で合成された NlpE が内膜ペリプラズム側に蓄積して、ペリプラズムのシャペロンの働きから逃れることで、構造に異常を持った NlpE が Cpx 経路の活性化につながると推定している。さらには細胞外の銅濃度上昇の際には、NlpE の CXXC モチーフにおける銅の結合乖離によって NlpE に構造変化が引き起こされ Cpx 経路の活性化が引き起こされると予想している。このように、NlpE による Cpx 経路活性化においては、NlpE に見られる構造不安定性が重要な役割を果たすという機構を提唱している。

以上のように、本研究は大腸菌由来リポタンパク質 NlpE の構造解析を行い、細胞質外ストレスに応答する Cpx シグナル伝達経路の活性化機構の考察に成功したものと評価することができる。これらの研究成果は、当該分野の進展に確かな寄与があるものであり、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められた。論文内容とそれに関連する分野について試問した結果、合格と認めた。