

## 細菌外膜の生合成および維持機構

成田 新一郎

### 1. はじめに

細菌はグラム陽性とグラム陰性に大別される。グラム陽性細菌が細胞質膜の外側に分厚いペプチドグリカン層からなる細胞壁を持つのに対し、大腸菌などのグラム陰性細菌は薄い細胞壁の外側にもう一つの膜構造、外膜を持つ。グラム陰性細菌の細胞質膜（内膜）と外膜は親水的なペリプラズム空間によって隔てられており、この点において、外膜は細胞小器官のような独立した構造体と捉えることができる。外膜の構成は一般的な生体膜とは異なり、内側にリン脂質、外側に複合脂質であるリポ多糖（lipopolysaccharide：LPS）が配向した非対称な脂質二重層となっている。外膜は抗生物質や界面活性剤などの異物に対して効果的な透過障壁として働き、グラム陰性細菌の生育に必須である。このような外膜の透過障壁としての機能は、LPSの性質に負うところが大きいと考えられている<sup>1)</sup>。外膜に局在しているタンパク質もまた、外膜の機能に重要であり、これらも特徴的な構造を持っている。一般に、膜タンパク質は疎水性の $\alpha$ ヘリックスによって膜を貫通するが、グラム陰性細菌の外膜に存在するタンパク質は、 $\beta$ バレル構造をとって外膜を貫通している（これと同じ構造のタンパク質はミトコンドリアや葉緑体の外膜にもみられる）か、アミノ末端のシステインに付加した脂質を介して膜に結合している。前者は外膜タンパク質、後者はリポタンパク質と呼ばれる。以上述べたような外膜の主要構成因子（リン脂質、LPS、外膜タンパク質、リポタンパク質）は、細胞質または内膜で合成され、外膜まで運ばれる。疎水的な外膜因子を親水的なペリプラズム空間を越えて輸送するという熱力学的に不利な反応を実現するために、グラム陰性細菌はそれぞれの外膜因子の輸送に特化した専用の装置を備えている（図1）。本稿では外膜構成因子の局在化と品質管理に関する最近の知見に言及するとともに、外膜でLPSの輸送に働くLptD/E複合体の新奇な生合成機構を紹介する。

### 2. 外膜構成因子の局在化機構

外膜の主要構成因子のうち、内膜から外膜への局在化機構が最初に解明されたのがリポタンパク質である。リポタンパク質はSec膜透過装置の作用で内膜を透過した後、内膜の外側で脂質修飾を受ける。その後、Lol因子と呼ばれる5種類のタンパク質の働きで外膜まで輸送される<sup>2)</sup>。LolAはペリプラズム空間に存在する、リポタンパク質のキャリアータンパク質であり、分子内の疎水性キャビティにリポタンパク質の脂質部分を収納してリポタンパク質と1:1の親水性の複合体を形成し、リポタンパク質を内膜から外膜へと輸送する。この親水性の輸送中間体を調製し、それを用いて*in vitro*で輸送反応を再構成することが可能である。この*in vitro*実験系は、リポタンパク質の輸送機構を研究する上での推進力となっている<sup>2)</sup>。

外膜タンパク質は両親媒性の $\beta$ 構造をとることでペリプラズム空間を通過し、外膜に組み込まれる。外膜タンパク質の輸送にはDegP, SurA, Skpなどのペリプラズムシャペロンと、外膜に存在するBAM複合体が関与する。大腸菌のBAM複合体はOmp85ファミリーに属する外膜タンパク質BamAと、4種のリポタンパク質BamB~Eからなる<sup>3)</sup>。Omp85ファミリーにはBamAホモログだけでなく、ミトコンドリアのSam50や葉緑体のToc75も含まれており、 $\beta$ バレル型タンパク質の生合成機構が進化の過程で保存されていることを暗示している。

LPSは内膜の細胞質側で合成され、ABCトランスポーターMsbAの作用で内膜のペリプラズム側にフリップされた後、一群のLpt因子の働きで外膜外葉まで運ばれる<sup>2)</sup>。リポタンパク質と異なり、LPSを含む親水的な輸送中間体は観察されていないため、Lpt因子によって形成される内膜-外膜間の架橋を介してLPSが運ばれる輸送モデルが有力である。実際、外膜タンパク質であるLptDのN末端ドメイン、ペリプラズムタンパク質のLptA、および内膜タンパク質のLptCは互いによく似たゼリーロール構造をとっており、LPSを内膜から外膜まで運ぶための連続した疎水性チャネルの存在が示唆されている<sup>4,5)</sup>。

リン脂質も外膜まで輸送されなければならないが、その輸送機構については不明な点が多く、本稿では言及しない。

盛岡大学栄養科学部（〒020-0694 岩手県滝沢市砂込808）

**Biogenesis and quality control of the outer membrane of gram-negative bacteria**

Shin-ichiro Narita (Faculty of Nutritional Sciences, University of Morioka, 808 Sunakomi, Takizawa, Iwate 020-0694, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870450

© 2015 公益社団法人日本生化学会

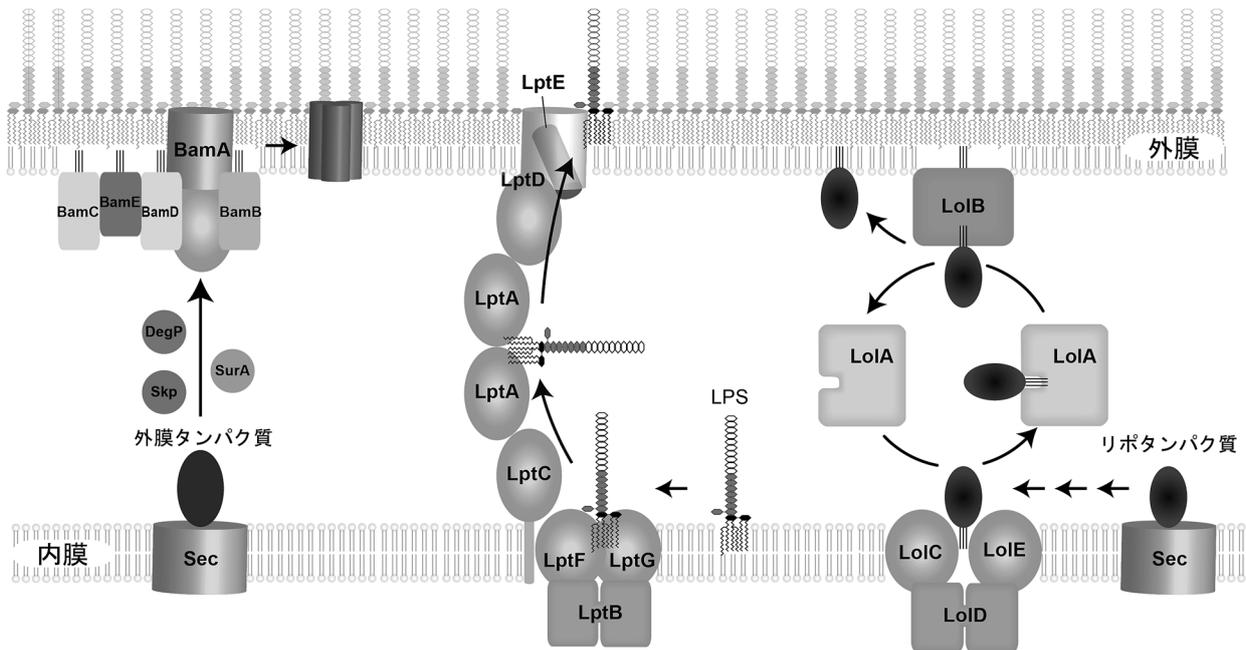


図1 グラム陰性細菌における外膜構成因子の局在化機構

外膜タンパク質、LPS、リポタンパク質は細胞質で合成され、内膜、ペリプラズム空間を越えて外膜まで輸送される。Sec膜透過装置の働きで内膜を透過した外膜タンパク質はDegP, SurA, SkpなどのペリプラズムシャペロンとBAM複合体 (BamA~E) の作用で外膜に挿入される。LPSはLpt因子によって形成される疎水性チャンネルを通してペリプラズム空間をバイパスすると考えられるのに対し、リポタンパク質の輸送では親水的なりポタンパク質-LolA複合体がペリプラズム空間を横断する。

### 3. $\sigma^E$ 依存的表層ストレス応答機構

細胞表層の重要性を反映するように、細菌は幾重もの表層ストレス応答機構を備えている。大腸菌における主要な表層ストレス応答経路として、 $\sigma^E$ 、Cpx, Psp, Bae, Rcsの5経路が知られている。これらはさまざまな表層ストレスに応答して遺伝子の発現を制御し、外的環境の変化に順応して細菌が生体内の恒常性を維持することに貢献している<sup>6)</sup>。中でも $\sigma^E$ 経路は大腸菌の生育に必須の表層ストレス応答経路であり、その重要性が注目されている。熱ストレスなどによって外膜タンパク質がミスフォールドしたり、LPSや外膜タンパク質の外膜へのアセンブリーが阻害されたりすると、DegS, RsePといった内膜プロテアーゼによるアンチ $\sigma$ タンパク質RseAの連続的な切断を介したシグナル伝達を経て $\sigma^E$ が活性化される<sup>6, 7)</sup>。 $\sigma^E$ はRNAポリメラーゼの置換型サブユニットとして働き、ペリプラズム空間で働くシャペロンやプロテアーゼ、BAM因子、LPS合成酵素などをコードする遺伝子の転写を誘導する。また、 $\sigma^E$ によって転写誘導されるノンコーディングRNAは、外膜タンパク質やリポタンパク質の翻訳を抑制する。これらの応答により、 $\sigma^E$ は外膜タンパク質がミスフォールディングする可能性を低減する<sup>7)</sup>。余談ながら、 $\sigma^E$ は大腸菌の生育に必須であるにも関わらず、*hicB*遺伝子を欠失する変異株は $\sigma^E$ がなくても生育できることが知られている<sup>8)</sup>。*hicB*

はトキシン-アンチトキシン (TA) システムのアンチトキシンをコードし、トキシンをコードする*hicA*とオペロンを構成する<sup>9)</sup>。TAシステムは原核生物に広く保存された遺伝子対で、通常の生育条件ではアンチトキシンが結合することでトキシンを不活化しているが、細胞が栄養飢餓などストレスにさらされるとトキシスが活性化し、自身の細胞機能を阻害する。筆者らは大腸菌が $\sigma^E$ がなくても生育できるようになるためにはトキシンのRNA切断活性が必要であることを明らかにした<sup>10)</sup>。この知見は表層ストレス応答にTAシステムが関与していることを示唆している。

大腸菌では114の遺伝子が $\sigma^E$ レギュロンのメンバーとして同定されているが、中には機能が解明されていない遺伝子も含まれる<sup>11)</sup>。筆者らはこれらの一つ、ペリプラズムのプロテアーゼをコードすると予想される*bepA*に注目して機能解析を進めてきた。*BepA*はメタロプロテアーゼの活性部位モチーフ (HEXXH) を含むN末端ドメインと、TPR (tetratricopeptide repeat) モチーフを含むC末端ドメインからなる。通常、外膜はエリスロマイシンやバンコマイシンなどの分子量の大きな抗生物質を透過させないが、*bepA*を欠失すると大腸菌がこれらの抗生物質に対して感受性を示すようになることから、*BepA*は外膜の生合成や品質管理に関与していることが示唆されていた。筆者らは*bepA*欠失株のエリスロマイシン感受性を抑制するマル

チコピーサプレッサーを探索し、LptEを過剰発現すると *bepA* 欠失株の抗生物質感受性が抑制されることを見いだした。この発見をきっかけに、以下に述べる LptD/E 複合体生合成における BepA の役割が明らかとなった。

#### 4. LPSの輸送に働く LptD/E 複合体の生合成機構

外膜タンパク質 LptD とリポタンパク質 LptE はともに大腸菌の生育に必須であり、LPS を外膜外葉に局在化させるために必要である。LptD と LptE は外膜で複合体を形成していることが知られていたが、興味深いことに LptE は LptD の  $\beta$  バレルの中に存在していることが明らかになった<sup>12)</sup>。この複合体は、LptD と LptE がそれぞれ別個の経路で外膜まで運ばれ、外膜上で相互作用することによってアセンブリーが始まるという点でも特徴的である<sup>13)</sup>。外膜タンパク質の多くは膜を貫通する  $\beta$  バレルと比較的短い膜外ループからなるが、LptD は N 末端側に上述のゼリーロールドメインを持ち、この領域がペリプラズム空間に露出している<sup>4)</sup>。LptD のもう一つの構造的特徴として、N 末端ドメインと C 末端の  $\beta$  バレルドメインの間に存在する 2 組のジスルフィド結合があげられる。LptD は N 末端ドメインに二つ (C<sub>31</sub>, C<sub>173</sub>)、 $\beta$  バレルドメインに二つ (C<sub>724</sub>, C<sub>725</sub>) の合計四つのシステイン残基を持つが、ジスルフィド結合は連続しない二つのシステイン残基間 (C<sub>31</sub>~C<sub>724</sub> および C<sub>173</sub>~C<sub>725</sub>) で形成される。Kahne のグループはこれら 2 組の非連続なジスルフィド結合がはじめから形成されるのではなく、連続したシステイン残基間 (C<sub>31</sub>~C<sub>173</sub> および C<sub>724</sub>~C<sub>725</sub>) で形成されたジスルフィド結合が異性化されて形成されること、およびこの過程には LptE が必要であることを示した<sup>13)</sup>。

BepA を欠く株の抗生物質感受性が LptE の過剰発現によって抑制されるという筆者らの実験結果は、BepA が LptD/E 複合体の生合成に関与していることを暗示していた。イムノブロットング解析では、LptD の量に対する BepA の有無による差はみられなかった。しかし、非還元条件で SDS-PAGE を行うと、BepA を欠く株では、正常なジスルフィド結合を持つ LptD (これを LptD<sup>NC</sup> と記す) よりも移動度の大きなバンドが蓄積していることがわかった。LptD の四つのシステイン残基を一つずつセリン残基に置換した変異体を発現させて SDS-PAGE での移動度を調べたところ、BepA を欠く株で蓄積する移動度の大きなバンドは、連続したシステイン残基間で架橋された分子種 (LptD<sup>C</sup>) のものであることがわかった。パルスチェイス実験を行うと、Kahne らの報告と同様、LptD においてはまず連続したジスルフィド結合が形成され、それが 30°C では 40 分程度をかけて正しいジスルフィド結合に組み換わることがわかった。これに対して、BepA を欠く株では

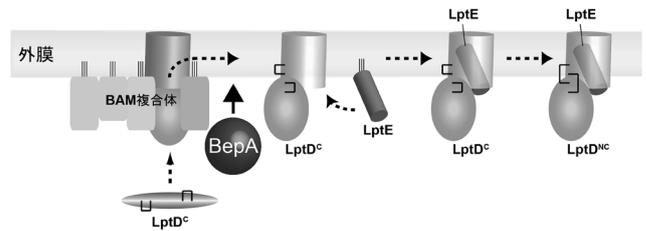


図2 LptD/E 複合体の生合成

LptD は連続するシステイン残基間に形成されたジスルフィド結合を持つ状態 (LptD<sup>C</sup>) で外膜に挿入され、LptE と相互作用することによりジスルフィド結合の組換えを行い成熟体 (LptD<sup>NC</sup>) となる。BepA は LptD の BAM 複合体からの解離あるいは LptE との相互作用を促進することで、LptD/E 複合体のアセンブリーに働いていると考えられる。コの字はジスルフィド結合を表す。

このジスルフィド結合の組換えが遅く、チェイス後 80 分を経過しても約半数が LptD<sup>C</sup> のままであった<sup>14)</sup>。野生株で BepA を過剰発現すると LptD<sup>C</sup> から LptD<sup>NC</sup> への変換が促進されることから、BepA による LptD のジスルフィド結合の異性化は LptD 生合成の律速段階になっていると考えられる。また、この LptD<sup>C</sup> から LptD<sup>NC</sup> への変換は、BepA のプロテアーゼ活性部位の変異体によっても促進された<sup>14)</sup>。LptD が BAM 複合体依存的に外膜に挿入されること<sup>3)</sup>、細胞内の BepA の少なくとも一部が BAM 複合体と近接していること<sup>14)</sup> を考慮すると、BepA はシャペロン様の活性をもって LptD の BAM 複合体からの解離、あるいは LptE との相互作用を促進することにより、LptD/E 複合体のアセンブリーを促進していると考えられる (図2)。

LptD が外膜でアセンブルするには LptE が必要であるが、筆者らは LptE を枯渇させると LptD<sup>C</sup> が分解されることを見いだした。この LptD<sup>C</sup> の分解には BepA が関与しており、BepA のプロテアーゼ活性を欠損させると分解が抑制された<sup>14)</sup>。したがって BepA は、LptD の生合成を促進するが、LptD がフォールディングに失敗した場合はこれを分解除去することにより、外膜の品質を保証していると考えられる。BepA を欠く株が薬剤感受性を示す原因としては、ミスフォールドした LptD が外膜に蓄積することのほか、機能的な LptD/E 複合体の不足により LPS の輸送が阻害され、外膜脂質の配向性に異常が生じることによって、外膜の透過障壁としての機能が低下することが考えられる。

BepA のシャペロン活性とプロテアーゼ活性が、LptD のフォールディング状態に応じてどのように制御されているかは不明である。BepA はプロテアーゼドメインと TPR ドメインからなるが、後者は一般にタンパク質間相互作用に働くことが知られており、BepA もこの領域で基質と相互作用する可能性がある。結合した基質が正常にアセンブルすることが見込めない状態であれば、BepA のプロテアーゼとしての機能が活性化されるのかもしれない。今後、そ

の機構を解明するためには、生化学的解析だけでなく、BepA全長あるいはTPRドメインの立体構造の決定が重要であろう。

## 5. おわりに

LPSが外膜外葉まで正常に輸送されるためには、LptD/E複合体が外膜で正常にアセンブルする必要があり、そのためにはLptDを輸送するBAM経路とLptEを輸送するLol経路がともに正常に機能していることが前提となる。また、BAM複合体を構成する因子のうち、外膜タンパク質であるBamAを除く四つのタンパク質がリポタンパク質である。リポタンパク質の輸送活性はRcs表層ストレス応答経路で働くリポタンパク質RcsFがモニターしており、RcsFの外膜輸送が阻害されるとリン酸リレーシグナル伝達系が活性化され、*lolA*の転写が誘導される<sup>15)</sup>。さらにRcsFはOmpAなどの外膜タンパク質のβバレル内腔に入って外膜外葉に達することによって、BAM経路の活性もモニターしていることが報告されている<sup>16)</sup>。これらの知見は、外膜構成因子が協調して働くことによって外膜の頑健性を維持していることを示している。今後は外膜構成因子の輸送活性が統合的に制御される機構を解明することが重要になると考えられる。

## 謝辞

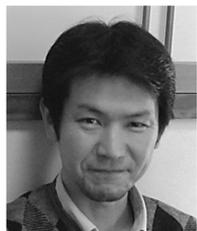
BepAに関する研究は京都大学ウイルス研究所・秋山芳展教授の研究室において行われました。この場をお借りして御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Nikaido, H. (2003) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **67**, 593–656.
- 2) Narita, S. (2011) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1044–1054.
- 3) Ricci, D.P. & Silhavy, T.J. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 1067–1084.
- 4) Qiao, S., Luo, Q., Zhao, Y., Zhang, X.C., & Huang, Y. (2014) *Nature*, **511**, 108–111.
- 5) Freinkman, E., Okuda, S., Ruiz, N., & Kahne, D. (2012) *Biochemistry*, **51**, 4800–4806.
- 6) Rowley, G., Spector, M., Kormanec, J., & Roberts, M. (2006) *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**, 383–394.
- 7) Lima, S., Guo, M.S., Chaba, R., Gross, C.A., & Sauer, R.T. (2013) *Science*, **340**, 837–841.
- 8) Button, J.E., Silhavy, T.J., & Ruiz, N. (2007) *J. Bacteriol.*, **189**, 1523–1530.
- 9) Jørgensen, M.G., Pandey, D.P., Jaskolska, M., & Gerdes, K. (2009) *J. Bacteriol.*, **191**, 1191–1199.
- 10) Daimon, Y., Narita, S., & Akiyama, Y. (2015) *J. Bacteriol.*, **197**, 2316–2324.
- 11) Bury-Moné, S., Nomane, Y., Reymond, N., Barbet, R., Jacquet, E., Imbeaud, S., Jacq, A., & Bouloc, P. (2009) *PLoS Genet.*, **5**, e1000651.
- 12) Freinkman, E., Chng, S.S., & Kahne, D. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 2486–2491.
- 13) Chng, S.S., Xue, M., Garner, R.A., Kadokura, H., Boyd, D., Beckwith, J., & Kahne, D. (2012) *Science*, **337**, 1665–1668.
- 14) Narita, S., Masui, C., Suzuki, T., Dohmae, N., & Akiyama, Y. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, E3612–E3621.
- 15) Tao, K., Narita, S., & Tokuda, H. (2012) *J. Bacteriol.*, **194**, 3643–3650.
- 16) Cho, S.H., Szewczyk, J., Pesavento, C., Zietek, M., Banzhaf, M., Roszczenko, P., Asmar, A., Laloux, G., Hov, A.K., Leverrier, P., van der Henst, C., Vertommen, D., Typas, A., & Collet, J.F. (2014) *Cell*, **159**, 1652–1664.

## 著者寸描

### ●成田 新一郎 (なりた しんいちろう)



盛岡大学栄養科学部准教授。博士（理学）。

■略歴 1999年京都大学大学院理学研究科修了。CREST研究員、東海大学医学部助手、東京大学分子細胞生物学研究所助手、同助教、京都大学ウイルス研究所特定助教、盛岡大学栄養科学部助教を経て2013年より現職。

■研究テーマと抱負 グラム陰性細菌の細胞表層形成機構と品質管理機構、およびその生物学的意義の解明。願わくは誰が聞いても面白く、かつ誰も調べたことがない研究を。

■趣味 研究（仕事が趣味という意味ではなく）。

■ウェブサイト [http://www.morioka-u.ac.jp/kyoin/narita\\_shinichiro.php](http://www.morioka-u.ac.jp/kyoin/narita_shinichiro.php)