

三量体オートトランスポーターの構造形成機構に関する研究

A study on the folding and assembly mechanism of a trimeric autotransporter

11D5601 青木 英莉子

指導教員 池口 雅道

SYNOPSIS

Haemophilus influenzae adhesin (Hia) belongs to the trimeric autotransporter family and consists of a passenger domain and a transmembrane domain (HiaT). HiaT forms a 12-stranded transmembrane β -barrel. This protein has a unique arginine residue at 1077. Arg1077 side chains from three subunits protrude toward the center of the barrel and close to each other. The arrangement seems to be unfavorable for trimer assembly because of repulsion between the positive charges. To investigate the role of this residue on trimer assembly, we prepared two mutants, R1077M and R1077K, in which arginine at 1077 was replaced with methionine and lysine, respectively. The proteins were expressed using an expression system developed in this study and purified for assembly experiments. Assembly experiments indicate that the neutralization of R1077 positive charge accelerated the rate of assembly but decreased the amount of the correctly assembled trimer. The result suggests that the repulsion between unique arginine residues is important for preventing HiaT from misassembly.

Keywords: trimeric autotransporter, bacteria secretion system, reassembly kinetics, arginine cluster

1. 諸言

グラム陰性菌の表層は、細胞質と接する内膜と細胞外の環境と接する外膜、その間のペリプラズム空間から構成される。グラム陰性菌の外膜には外膜蛋白質が存在し、細胞内外への物質の輸送、病原性に関与している。大部分の外膜蛋白質は膜貫通 β バレル構造であるが、例外的に膜貫通 α ヘリックス型のタンパク質も存在する¹。それら外膜蛋白質の中には病原性に関わる機能を持つオートトランスポーターと呼ばれる蛋白質群が存在する。オートトランスポーターは、N末端のシグナル配列、病原性の機能を持つパッセンジャードメイン、C末端の膜貫通ドメインの3つのドメインから構成されるタンパク質である。細胞質でオートトランスポーターが合成されると、ポリペプチド鎖のN末端に存在するシグナル配列が内膜透過装置のSec複合体に認識され、ペリプラズム空間へ輸送される。その際にシグナル配列はシグナルペプチダーゼIによって切断される。ペリプラズムに運ばれた蛋白質は、ペリプラズムシャペロンによって外膜へ運ばれ、外膜蛋白質の外膜へのアセンブリを促進するBam複合体によって外膜に挿入される。そして、それと同時にまたは後にパッセンジャードメインが、細胞の外に輸送されると考えられている。このパッセンジャーの細胞外輸送の方法としては、パッセンジャードメインが膜貫通ドメイン中心の穴を通り、自発的に細胞外へ運ばれると考えられているが、最近では細胞外輸送を手助けすると考えられる蛋白質も見つかっている

²。また、オートトランスポーターには1本のポリペプチド鎖から構成される単量体オートトランスポーターと3本のポリペプチド鎖から構成される三量体オートトランスポーターが存在する。単量体オートトランスポーターの外膜への挿入やパッセンジャードメインの輸送は、よく研究されている。しかし、三量体オートトランスポーターは単量体オートトランスポーターと異なり、3本のポリペプチド鎖で形成されているため、外膜挿入や輸送反応が複雑であると考えられる。そのため、三量体オートトランスポーターの外膜挿入やパッセンジャードメインの細胞外輸送機構は、未だに解明されていない部分が多い。

三量体オートトランスポーターの一種であるインフルエンザ菌由来のアドヘシン(Hia)は、細菌の宿主細胞への接着を仲介し、細菌の感染時に重要な役割を果たす蛋白質である。パッセンジャードメインの一部を含む膜貫通ドメイン(残基番

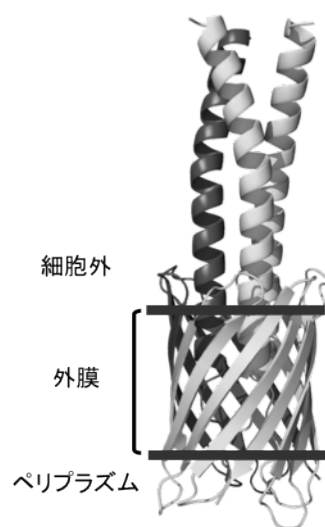
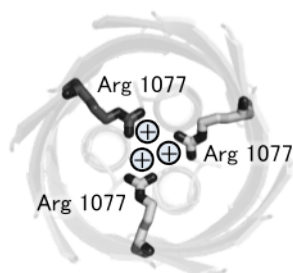


図1 HiaT(992-1098) 結晶構造

号 992-1098)の結晶構造は、Meng らによって解析されている³。その結果、Hia の膜貫通ドメイン(HiaT)は各サブユニットから4本、計12本のストランドからなるβバレル構造を形成し、バレルの中心にはαヘルックスが3ヘリックスバンドルを形成していることが明らかとなった(図1)。

この HiaT には特徴的な配置を持つアルギニン残基(残基番号 1077)が存在する。このアルギニンの側鎖は、βバレルのストランドからバレル中心に向かって伸びている。その結果、各サブユニットから伸びるアルギニン側鎖の先端が、バレルの中心に集合する(図2)。アルギニンは正電荷を持つアミノ酸であるため、バレル中心に電荷が集まるような配置はお互いの反発を引き起こすと考えられる。このような静電反発は3本のポリペプチド鎖が集まり、バレル構造を形成する際に不利な影響を及ぼすと考えられる。したがって、このアルギニンがアセンブリにおいてどのような影響を及ぼすのか興味を持たれた。

図2 特徴的なアルギニン残基



ペリプラズム側からHiaTを見た図

2. HiaT 発現系の構築と培養時間の最適化

HiaT のアセンブリ実験には、多量の精製 HiaT が必要となる。それゆえ、収量のより良い HiaT 発現系の構築と培養時間の最適化を行った。HiaT の大腸菌における発現系の構築は、Meng らによって確立されている³。その発現系は pASK-IBA12 ベクターを用いており、このベクターで HiaT を発現させると、N 末端に大腸菌外膜蛋白質 OmpA のシグナル配列、精製用のタグ Strep-tag が付加される。このシグナル配列によって、HiaT は大腸菌のペリプラズムに運ばれ外膜に挿入される。この方法では蛋白質を外膜に発現させているが、内膜透過のためのシグナル配列を欠損させる事により細胞質に封入体として発現させる方法が知られている。この方法では蛋白質が天然構造を再構成できる事が条件ではあるが、大量の蛋白質を得られる可能性がある。例を挙げると、外膜蛋白質の OmpA で外膜発現時の約 20 倍の蛋白質が得ら

れている⁴。本研究では、強力な T7 プロモーターを有する pET-3c ベクターを用いて、シグナル配列を含む HiaT とシグナル配列を含まない HiaT の発現を行った。各発現系の HiaT 発現量は、(1)精製蛋白質のクーマシー染色による定量、(2)細胞表面露出 HiaT のフローサイトメトリー解析、(3)大腸菌破碎液の不可溶性画分、または膜画分を含む可溶性画分のイムノブロットング解析によって評価した。その結果、(1)の実験により、シグナル配列を含む発現系、含まない発現系共に、HiaT の精製量は2時間で頭打ちになる事が明らかとなった。さらに、シグナル配列を含まない発現系における HiaT の収量は、シグナルを含むものと比較して約 1/4 の収量となった。また、(2)の実験により、シグナル配列を含まない発現系では、HiaT は大腸菌の表面に発現していない事が示された。一方、シグナル配列を含む発現系では HiaT が外膜に発現している事が示された。しかし、発現誘導後の培養時間が2時間を越えると、HiaT を発現しない大腸菌が増加していく事が確認された。恐らくこの現象は、大腸菌のプラスミド欠落やプラスミド遺伝子の再編成によって引き起こされたと考えられる。(3)の実験では、シグナル配列を含む発現系で封入体の形成が観察されたが、シグナル配列を含まない発現系では観察されなかった。さらに、シグナル配列を含む HiaT とシグナル配列を含まない HiaT の局在を調べるために、ショ糖濃度勾配遠心を行った。その結果、双方の発現系共に外膜に HiaT が局在している事が確認された。しかしながら、シグナル配列欠損 HiaT 発現大腸菌では、フローサイトメトリー実験により、HiaT は外膜へ発現していない事が示されている。よって、生細胞ではシグナル配列欠損 HiaT は細胞質に存在しているが、細胞破碎により外膜と接触可能となり外膜へアセンブリしたと考えられる。

以上の結果より、より多くの収量を得られたのはシグナル配列を含む発現系であった。そして、この発現系ではプラスミドの欠落や再編成が起こるため、短時間の培養時間が適している。また、生細胞において、シグナル配列欠損 HiaT は外膜にアセンブリしていないが、細胞破碎により外膜にアセンブリできるようになる。よって、細胞破碎を経た実験では、HiaT は外膜画分で検出されると考えられる。

3. Hia 膜貫通ドメインの三量体再構成実験

一般的な水溶性蛋白質は SDS 電気泳動において変性し、多量体の場合は単量体分子量に相当する位置にバンドが検出されることが知られている。しかし、

HiaT は SDS 電気泳動中も三量体構造を保ち、三量体に相当する分子量の位置にバンドが検出される。この特性を利用することにより、HiaT の三量体形成反応は SDS 電気泳動にて容易に観察できる。また、HiaT のバレル中心の α ヘリックスを残基番号 1022 番まで短くしたもの (mHiaT) も、HiaT と同様に SDS 電気泳動条件下で三量体構造を保ち、三量体に相当する分子量の位置にバンドが検出される (図 3)。膜貫通ドメイン再構成実験では、HiaT と mHiaT の 2 種類の蛋白質を使用した。

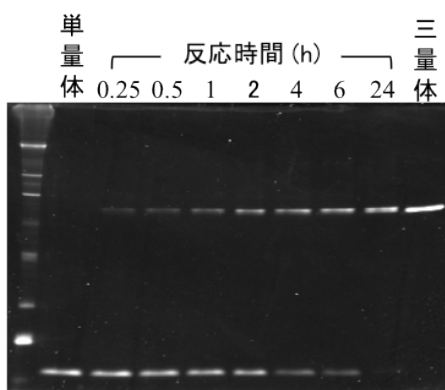


図3 SDS電気泳動における mHiaT三量体形成反応の追跡

精製後の HiaT (残基番号 998-1098) と mHiaT (残基番号 1022-1098) は三量体を形成しており、リアセンプリ反応を行うには単量体に解離させる必要がある。精製後の HiaT と mHiaT 溶液には界面活性剤が含まれる。これをアセトンで蛋白質を沈殿させることにより除去した。次に単量体に解離させるためにギ酸処理を行った。そして、遠心濃縮器でギ酸を除き、乾燥させた単量体 HiaT または mHiaT を、尿素溶液で可溶化した。その後、界面活性剤を含むリアセンプリ溶液で尿素を希釈することにより、リアセンプリ反応を開始させた。各時間リアセンプリ反応を行い、SDS 電気泳動により時間毎の三量体形成量を観測した。HiaT と mHiaT のリアセンプリ実験を行った結果、HiaT では間違った多量体構造に由来すると思われるバンドが多数観測された。しかし mHiaT ではそのようなバンドは、ほぼ観測されなかった。この結果より、以降のアセンプリ実験にはミスアセンプリを起こしにくい mHiaT を用いて実験を行った。

4. R1077 のアセンプリにおける役割

HiaT のバレル中心でのアルギニン同士の反発がアセンプリにどのような影響を与えるか調べるために、HiaT の 1077 番目のアルギニンを電荷のないア

ミノ酸のメチオニンに置換し、バレル中心の静電反発を無くする変異体 (R1077M) を作製した。精製した野生型 mHiaT (WT) とメチオニン変異体 (R1077M) は、CD スペクトルによって同様の二次構造を持つ事が確認された。そして、双方の蛋白質を前述と同様の方法を用いてアセンプリ実験を行った。三量体と単量体の割合は、SDS 電気泳動後のバンドから定量を行った (図 4)。

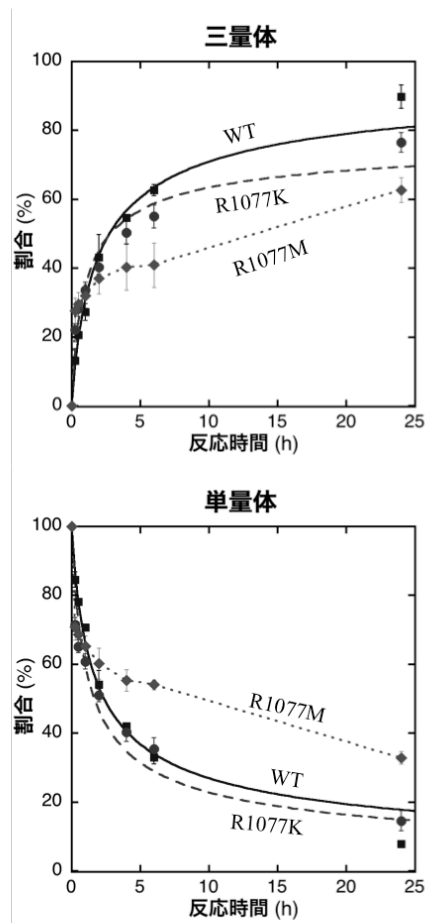


図4 mHiaT三量体再構成における各バンドの経時変化

その結果、WT の三量体形成反応は三次反応の式でフィッティングすることができた。よって、HiaT の三量体は 3 本のポリペプチド鎖が同時に集まることにより構造を形成すると考えられる。また、R1077M の三量体形成反応は極めて速く、電気泳動で追跡不可能であったためフィッティングは行わなかった。このリアセンプリ実験での結果、R1077M の三量体形成反応は、WT の形成反応より速いことが示された。しかしながら、R1077M の三量体形成割合は WT より大きく減少していた。また、R1077M の三量体形成反応は WT より速いが、24 時間後の単量体量は R1077M の方が多い。これは、間違った構造や多量体を形成

し三量体の形成能力を失った R1077M が単量体のバンドとして検出されたためと考えられる。

次に、リアセンブリした WT と R1077M の二次構造を調べるために CD スペクトル測定を行った(図 5)。その結果、WT のリアセンブリ溶液の CD スペクトルは、天然状態の WT のスペクトルとほぼ重なった。しかし、R1077M リアセンブリ溶液から得られた CD スペクトルは、天然状態のスペクトルと大きく異なっていた。これらの結果より、リアセンブリした WT は天然状態と同じ二次構造を持っているが、R1077M リアセンブリ溶液には天然状態と異なる構造を持つ分子が含まれていると考えられる。

さらに、WT と R1077M の性質の違いが電荷を無くしたことによるものかを確かめるために、アルギニンと同様に正電荷を持つリジンに置換した変異体(R1077K)を作製し同様の実験を行った。その結果、リジン変異体は WT と同様の結果を示した。よって、メチオニンに変異したことによる変化は、電荷反発を無くしたことによる影響と考えられる。

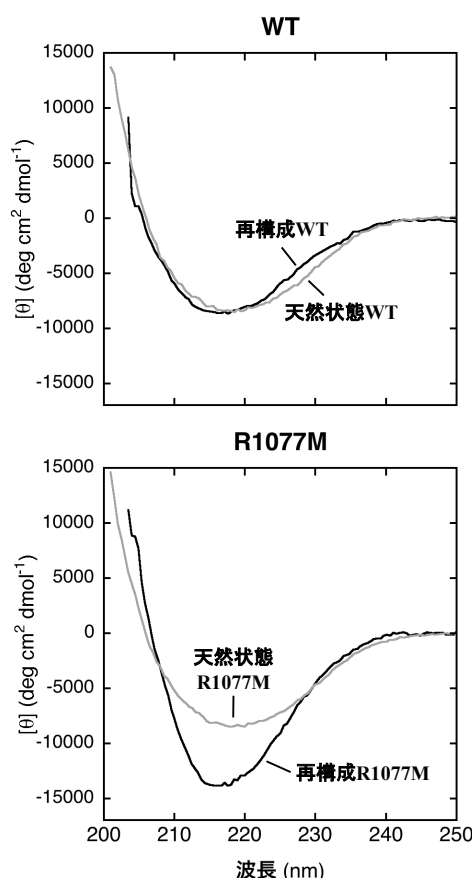


図5 再構成mHiaT WT/R1077MのCDスペクトル

5. 結論

HiaT のバレル中心にはアルギニン残基が3つ集まるような構造が存在する。アルギニンは電荷を持つアミノ酸であるがゆえに、アルギニンが集まる構造では静電反発を起こしているように見える。生体膜に HiaT が埋もれている状態であれば、膜の存在によってアルギニンの反発による影響が抑え込まれているという可能性もある。しかし、界面活性剤で可溶化し精製してきた HiaT 三量体はとても安定である。よって生体膜中での三量体安定化にアルギニンが大きく関わっている可能性は低いと考えられる。また、界面活性剤存在下での R1077M 三量体の安定性もとても高く、メチオニン変異による三量体構造の安定性への影響は観察されなかった。

三量体再構成実験では、HiaT はポリペプチド鎖が1本ずつ集まって三量体を形成するのではなく、同時に3本の鎖が集まり三量体を形成しているということが明らかとなった。そして、HiaT のメチオニン変異体では三量体形成速度は上昇したが、間違った構造を形成する割合が多くなった。よって三量体中心でのアルギニン同士の反発は、間違った構造形成を防いでいると考えられる。これらの結果から、HiaT における 1077 番目のアルギニン側鎖間の反発は、ポリペプチド鎖が集まり構造形成する際に天然構造以外の多量体形成を防ぐ役割を持つと考えられる。

6. 参照

- (1) Dong, C.; Beis, K.; Nesper, J.; Brunkan-Lamontagne, A. L.; Clarke, B. R.; Whitfield, C.; Naismith, J. H. *Nature* **2006**, *444*, 226.
- (2) Selkrig, J.; Mosbahi, K.; Webb, C. T.; Belousoff, M. J.; Perry, A. J.; Wells, T. J.; Morris, F.; Leyton, D. L.; Totsika, M.; Phan, M. D.; Celik, N.; Kelly, M.; Oates, C.; Hartland, E. L.; Robins-Browne, R. M.; Ramarathinam, S. H.; Purcell, A. W.; Schembri, M. A.; Strugnell, R. A.; Henderson, I. R.; Walker, D.; Lithgow, T. *Nature structural & molecular biology* **2012**, *19*, 506.
- (3) Meng, G.; Surana, N. K.; St Geme, J. W., 3rd; Waksman, G. *The EMBO journal* **2006**, *25*, 2297.
- (4) Bannwarth, M.; Schulz, G. E. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2003**, *1610*, 37.