

論文内容の要旨

申請者氏名 Bin Mohammad Umar Mohammad Shahrizal

グラム陰性菌の内膜と外膜の構造は、抗生物質などの有害物質から細胞を守るバリアとして機能している。外膜タンパク質が機能するためには、正しく外膜へと組み込まれる必要がある。外膜タンパク質は前駆体タンパク質として細胞質でシグナル配列が付加された状態で合成される。その後シグナル配列の情報に基づき、アンフォールドの構造を保ったまま内膜へ運ばれ、Sec トランスロコンを經由して、ペリプラズム空間へと輸送される。ペリプラズム空間では、シャペロンタンパク質によってフォールディングが抑えられた状態で、外膜の BAM 複合体へと輸送される。そして、BAM 複合体が外膜タンパク質の外膜への挿入とフォールディングを介助する。

大腸菌の BepA はペリプラズム空間に存在するタンパク質であり、外膜タンパク質の形成過程に関わる。BepA は、アミノ酸配列情報から N 末端側に HEXXH モチーフを持つプロテアーゼドメイン、C 末端側にテトラトリコペプチドリピート (TPR) ドメインを持つと推定されていた。また、BepA は外膜タンパク質形成過程においてシャペロンとして働くと同時に、不正確なフォールディング状態の外膜タンパク質の分解にも寄与していると考えられている。BepA の分子メカニズムの解明には、その詳細な立体構造が必要であるため、本研究において BepA の X 線結晶構造解析を進めた。

BepA を過剰に発現させた大腸菌から BepA を精製し、結晶化を行った。BepA の X 線回折実験は SPring-8 で行い、2.6 Å 分解能のデータセットを得た。分子置換法により位相を決定し、BepA の構造を $R_{work}/R_{free} = 0.206/0.263$ になるまで精密化を行った。その結果、BepA の N 末端のプロテアーゼドメインは、11 個の α ヘリックス (a1-a11) と 3 本の β ストランドで構成されており、C 末端側の TPR ドメインは、10 本の連続した非平行 α ヘリックス (H1-H10) で構成されていた。

一方、プロテアーゼの活性部位には HEXXH モチーフと相互作用する亜鉛原子が存在していた。この活性部位は露出しておらず、結晶構造は不活性型であると判断した。決定した構造から、活性部位付近の a9 ヘリックスが移動することでプロテアーゼ活性を示すと考えられた。また、TPR ドメインは一般的に凹みを形成し、ペプチドとの相互作用などに関わるとされるが、BepA の TPR ドメインにも凹みが存在しており負に帯電している。この領域に基質タンパク質が結合することが予測された。BepA の構造解析から、BepA は外膜タンパク質の形成過程時に、その外膜タンパク質と TPR ドメインを介して相互作用し、その相互作用が長くなることで a9 ヘリックスが活性部位から外れ、活性型となり外膜タンパク質の分解を行うと考えられる。ATP などのエネルギー源が存在しないペリプラズム空間において、BepA は外膜タンパク質の形成遅延をモニターし、分解することで外膜の品質管理に関わると考えられる。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Bin Mohammad Umar Mohammad Shahrizal

生体にはさまざまなストレス応答メカニズムが存在する。大腸菌において表層ストレスなどにより活性化する σ^E 経路があり、*bepA*を含む114の遺伝子が影響を受ける。そのため、BepAが外膜の品質管理に関わることが予測されていたが、その具体的な役割については不明であった。過去の研究により、BepAがリポ多糖の輸送を担う外膜タンパク質LptDの成熟化を促進するシャペロンとして働き、またLptDの成熟化が失敗した場合にはLptDを分解することが明らかになっている。BepAは外膜タンパク質の状態に応答し、このシャペロン活性とプロテアーゼ活性を使い分けることで外膜の品質管理に関わっている。BepAが機能不全に陥ると、大腸菌の薬剤耐性が失われるため、BepAを含む外膜タンパク質形成に関わる因子は、新たな抗生物質のターゲットとしても期待されている。

BepAがLptDの生合成に関わることは2013年に米国科学アカデミー紀要(PNAS)にて発表されたが、BepAの分子メカニズムを解明するためには、その詳細構造の情報が必要であった。申請者は、2.6Å分解能にてBepAのX線結晶構造解析を達成した。結晶構造からは、N末端側のプロテアーゼドメインとC末端側のTPRドメインが相互作用した凸凹のある球状構造であり、TPRドメインとプロテアーゼドメインが機能連携を行っていると考えられた。また、共同研究によって、*in vivo*ではN末端側とC末端側が相互作用している状態で活性を示すことを明らかにした。結晶構造解析によって、BepAの活性部位は物理的に閉ざされており、柔軟性が高いと思われる短いヘリックスが活性部位から外れることにより、活性化が起こると予測したが、この活性化機構は2020年に他の研究室から報告された2つの原著論文によって証明された。一方、TPRドメインには負電荷を持つ凹みが存在しており、基質との相互作用を介してシャペロン活性を示すことも予測された。

BepAの結晶構造解析と一連の関連研究の成果を組み合わせることにより、BepAは外膜タンパク質の膜組み込みに関わる外膜タンパク質複合体(BAM複合体)と連携して、外膜タンパク質の膜組み込み時にシャペロンとして機能するとともに、膜組み込み不全となった外膜タンパク質を認識して分解するという役割を担っていると考えられる。また、BepAはN末端側とC末端側の独立したドメインが機能連携を行っていることも示唆された。

以上のように、本論文は抗生物質のターゲットとしても期待される細菌の外膜の品質管理に関わるBepAの結晶構造を明らかにし、その詳細な分子メカニズムを提唱したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】