

(発表論文) Gunasinghe, D. S.§, **Shiota, T.**§, Stubenrauch, C. J, Schulze, K. E., Webb, C. T., Fulcher, A. J., Dunstan, R. A., Hay, I. D., Naderer, T., Whelan, D. R., Bell, T. D. M., Elgass, K. D., Strugnell, R. A., and Lithgow, T.* (2018) The WD40 protein BamB mediates coupling of BAM complexes into assembly precincts in the bacterial outer membrane. *Cell Rep.*, 2018 23 (9), 2782-2794. (§These authors contributed equally.)

大腸菌などのグラム陰性菌と呼ばれるバクテリアのグループは2枚の細胞膜を持っています。外側の膜(外膜)にはベータバレルという構造をもつタンパク質が埋まっており、これをベータバレル型膜タンパク質といいます。これらは生存に必須な栄養や老廃物を通したり、毒素を排出したり、バクテリアが我々の体に接触して感染のために有利な環境を作り出したりと、様々な機能をもった、多くの種類のタンパク質が存在します(図1)。タンパク質というのはアミノ酸が連なったひも状の分子で、目的の場所で正しく折りたたまれなければ機能を発揮できません。ベータバレル型膜タンパク質の場合はバクテリア外膜でベータバレル構造を作ることが重要です。これらを実現するのは外膜に存在するBAM複合体と呼ばれる分子機械が行なっています。大腸菌のBAM複合体はBamA~Eという名前のついた5つのタンパク質のパーツから成り立っており、この分子機械の形はすでに報告されていました。しかし、このBAM複合体がバクテリア外膜にどのように存在し、働いているかは不明でした。

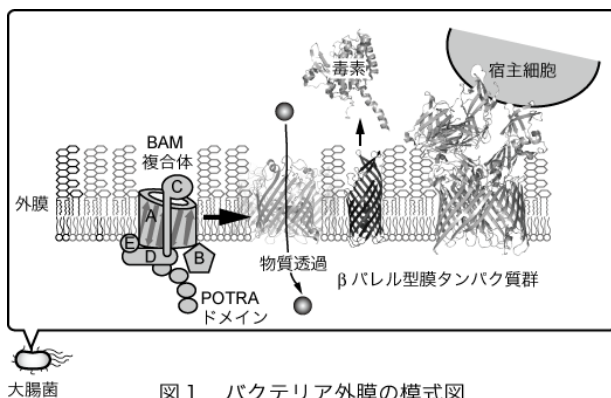
そこで私たちはまず、BAM複合体が大腸菌外膜中でどのように存在しているかをdSTORM超解像度顕微鏡という、生物中に存在する分子を非常に詳細に解析できる機械を使って調べました。その結果、BAM複合体はバクテリア外膜で複数が集まりクラスターを形成していることが分かりました(図2)。さらに、遺伝子組み換えをした大腸菌を使うことで、BamBというパーツがこのクラスターをつくるのに重要だという事が分かりました。

では、BamBはどのようにしてクラスターを形成させているのでしょうか?クラスターを形成するにはBamBが複数のタンパク質とくっついている(相互作用している)必要があります。そこで、BamBのどこが他のどのようなタンパク質と相互作用しているかを調べるため、部位特異的光架橋法と呼ばれる方法を使いました。部位特異的光架橋法は、タンパク質を構成するアミノ酸を一ヶ所人工的なアミノ酸に変更します。このアミノ酸は紫外線を照射されると、近くにいるタンパク質と共有結合とよばれる非常に安定的な状態で架橋とよばれる分子の結合が起こります。この2つのタンパク質が結合したものを架橋産物と呼びます。部位特異的光架橋法では、架橋産物からタンパク質のどのアミノ酸がどういったタンパク質かを調べる事ができます。解析の結果、BamBは先に報告されているBamAと接触している面だけでなく、その反対側の面でもBamAと相互作用している事が分かりました。この結果からBamBは2つの面で別々のBamAと相互作用する事で、複数のBAM複合体を近づけてBAM複合体のクラスターを形成している事が分かりました。

次の疑問は、なぜ大腸菌はBAM複合体のクラスターを作っているのか?すなわち、大腸菌にとってBAM複合体をクラスターにすることがベータバレル型膜タンパク質を外膜に組込むのにとってどう有利なのか?というものです。それを調べるため私たちは新しい解析方法である EMM アセンブリー

アッセイという方法を開発しました。これは、大腸菌から単離した膜に対して、折り畳まれていないβバレル型膜タンパク質(OmpC)を加えます。単離された膜には BAM 複合体等の分子機械が含まれていますので、その働きによって折り畳まれていない OmpC が、膜に組込まれていきます。OmpC は正しく膜に組込まれると、安定に存在するために3つ1組のトライマーを形成します。OmpC がトライマーを形成する様子をモニターすることで、BAM 複合体の分子機械の性能を評価することができます。この手法を用いて、パーツが全て揃っている（クラスターを形成している）BAM 複合体をもつ膜と、BamB が足りずクラスターが形成できない BAM 複合体を含む膜に、折り畳まれていないβバレル型膜タンパク質を加えて、その組込みをチェックしました。解析の結果、BamB がない、すなわち BAM 複合体がクラスターを形成していない場合、OmpC は素早くトライマーを形成できないことが分かりました。すなわち、大腸菌は OmpC を効率よく安定的なトライマーにするため BAM 複合体をクラスター化させていることを明らかにしました（図3）。我々はこのクラスターを Assembly precinct（タンパク質アセンブリーのための区域）と名付け、その形成には BamB が重要であることが分かりました。

近年、抗生物質が聞かない薬剤耐性菌の発生や、感染症の拡大が問題となっています。こういった問題に対し、細菌の性質を理解することが非常に重要であり、今回の成果はその一端を担うものです。



大腸菌 図1 バクテリア外膜の模式図

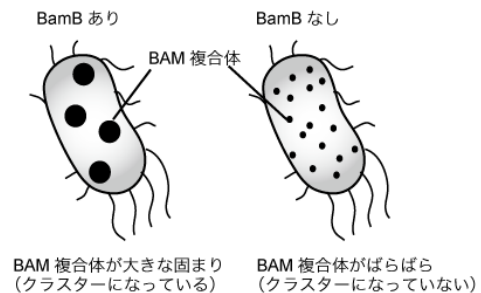


図2 dSTORM による BAM 複合体の見え方の模式図

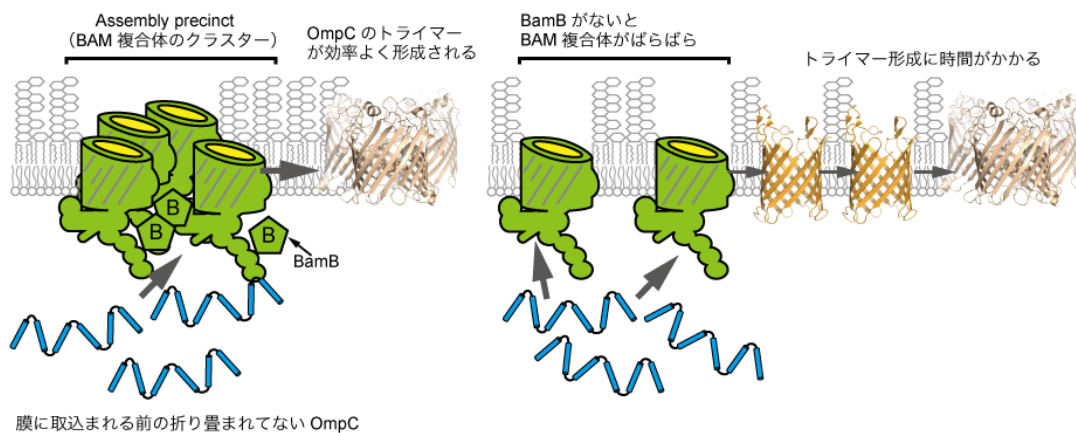


図3 BAM 複合体のクラスターによるタンパク質輸送、組立て機構の模式図