

### 3. 結果

#### 3-1 基質結合型 LolCDE 複合体の単離および解析

##### 外膜リポ蛋白質を特異的に結合した LolCD<sub>H</sub>E の精製および ATP の影響

C 末端側に His タグを付加した LolD を含む LolCD<sub>H</sub>E を過剰発現させた。1%ドデシルマルトシド (DDM) 存在下、±ATP 条件下で膜画分を可溶化して、His タグアフィニティー (TALON) カラムで LolCD<sub>H</sub>E を精製した。-ATP 条件下で精製した LolCD<sub>H</sub>E には、CD<sub>H</sub>E のバンド以外に複数のマイナーバンドが確認されたのに対して、+ATP 条件下では、これらのバンドは確認されなかった (図 6-A)。

そこで、-ATP 条件下で観察されたマイナーバンドを同定するために、抗外膜リポ蛋白質抗体 (LolB、YcfM、Pal、NlpC および Lpp) を用いたイムノブロッティングを行った結果、-ATP 条件の LolCD<sub>H</sub>E 精製標品では外膜リポ蛋白質が検出されたのに対して、+ATP 条件の LolCD<sub>H</sub>E 精製標品では検出されなかった。一方で、抗内膜リポ蛋白質 (AcrA)、抗外膜蛋白質 (OmpA) 或いは抗内膜蛋白質 (SecG) 抗体を用いたイムノブロッティングを行った結果、±ATP いずれの条件で精製した LolCD<sub>H</sub>E 標品においても、これらの蛋白質は観察できなかった (図 6-B)。また、LolCD<sub>H</sub>E の発現誘導を行わなかった大腸菌から膜画分を調製し、同様の方法で回収したサンプルについて蛋白質定量を行ったが、蛋白質量が少なすぎて定量できなかった。さらに、回収したサンプルの全量を用いて、図 6-B と同様に SDS-PAGE と抗 Pal 抗体によるイムノブロッティングで調べたが、±ATP いずれの条件でも Pal は検出されなかった (図 6-C)。したがって、-ATP 条件で LolCD<sub>H</sub>E と共精製された外膜リポ蛋白質は、カラムへの非特異的な吸着によるのではなく、LolCD<sub>H</sub>E を介してカラムに結合していたことが明らかとなった。また、1 細胞あたりの分子数を比較すると、LolB≒300 (外膜リポ蛋白質) (Matsuyama et al., 1997) に対して、AcrA≒5000-7000 (内膜リポ蛋白質) (Tikhonova and Zgurskaya, 2004) および SecG≒1000 (内膜蛋白質) (Matsuyama et al., 1990; Matsuyama et al., 1992; Nishiyama et al., 1995) とかなり多いのにもかかわらず、AcrA および SecG と LolCD<sub>H</sub>E の結合は見出されなかった。以上の結果は、-ATP 条件で精製した LolCD<sub>H</sub>E は、基質である

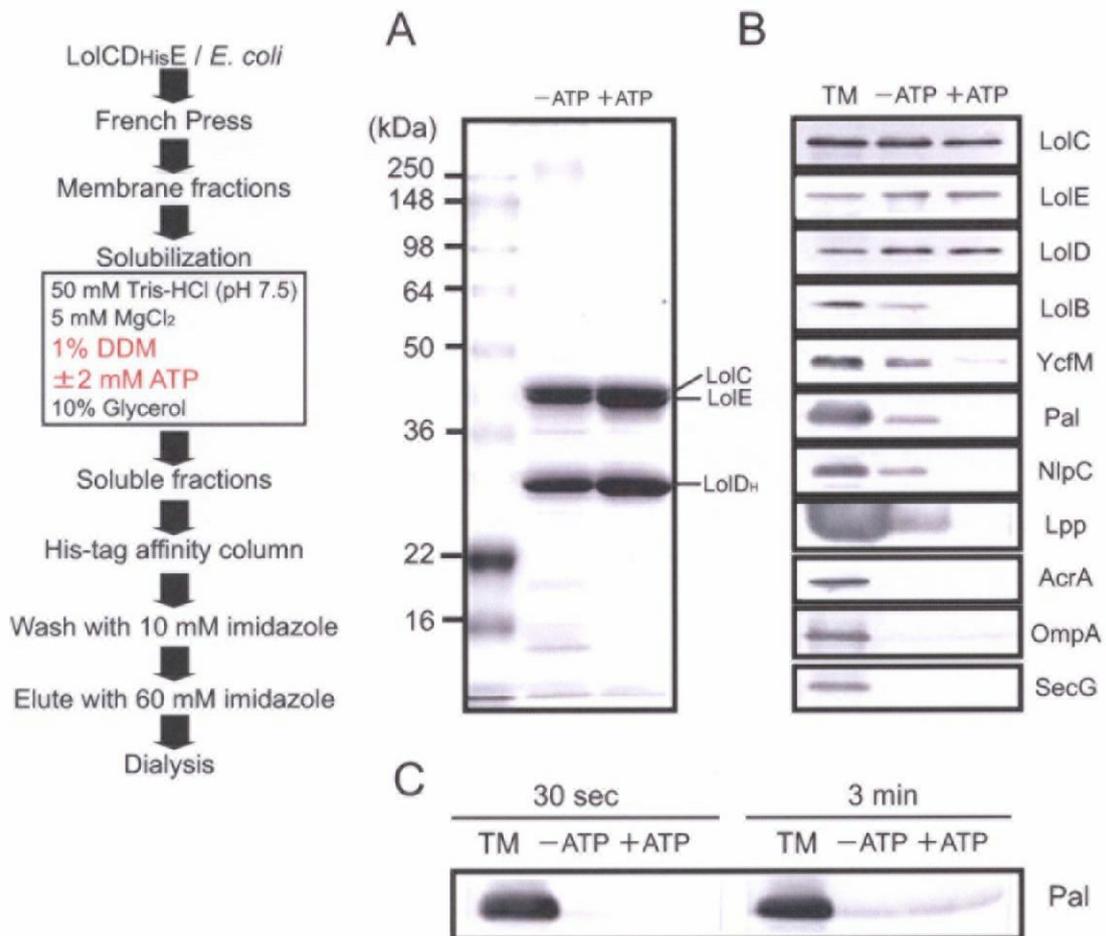


図6 外膜リポ蛋白質を特異的に結合した LolCD<sub>H</sub>E の精製および ATP の影響  
 (A) LolCD<sub>H</sub>E を過剰発現させた大腸菌から調製した膜画分を 1% DDM・±ATP 条件下で可溶化し、TALON カラムで精製した。5 μg の LolCD<sub>H</sub>E 精製標品を、SDS-PAGE で分離して CBB 染色を行った。(B) LolCD<sub>H</sub>E を過剰発現した大腸菌から調製した 5 μg の膜画分と ±ATP 条件で精製した 200 ng の LolCD<sub>H</sub>E を SDS-PAGE で分離して、図に示した抗体によるイムノブロットィングを行った。(C) LolCD<sub>H</sub>E の発現を誘導しなかった大腸菌の膜画分 5 μg と、本大腸菌から(A)と同様の方法で回収したサンプルの全量を、SDS-PAGE で分離して抗 Pal 抗体を用いたイムノブロットィングを行った。図に示した 30 秒および 30 分は、発色時間を示している。

外膜リポ蛋白質を特異的に結合した複合体 (基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E) であることを示している。なお、本実験において、1 L 培養当たり 1.6 mg の基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E を精製することができた。一方で、フリーの LolCD<sub>H</sub>E は、1 L 培養当たり 3.6 mg を取得した。

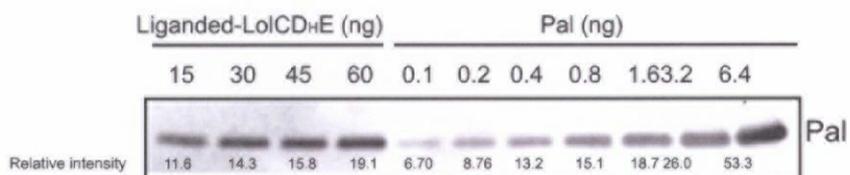
### 基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E に含まれる Pal の定量

基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E に含まれる Pal の量を、精製した Pal を用いて、SDS-PAGE と抗 Pal 抗体によるイムノブロッティングで調べた (図 7-A)。Pal のバンドを定量化した後、検量線を作成して、基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E に含まれる Pal の量を求めた (図 7-B)。3 回の実験の平均値は、LolCD<sub>H</sub>E : Pal = 1 : 0.15 ± 0.036 (mol) であった。リポ蛋白質は細胞あたり約  $7 \times 10^5$  分子存在すると考えられており、このうち Pal はおよそ  $10^4$  分子存在すると考えられている (Cascales et al., 2002)。したがって、全リポ蛋白質に占める Pal の割合は 1.4% 程度である。ところが、全ての LolCDE 分子がリポ蛋白質分子と 1 : 1 で結合していると仮定すると、LolCDE に結合した全リポ蛋白質に占める Pal の割合は約 15% にもなる。本実験では、他のリポ蛋白質を用いた詳細な解析は行っていないため、リポ蛋白質の種類により LolCDE との親和性が異なるのか、或いは、1 分子の LolCDE が何分子のリポ蛋白質と結合するのかが決定されていないが、今後の興味ある研究課題と考えている。

### 基質-LolCD<sub>H</sub>E 複合体の安定性

一度 TALON カラムで精製した基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E を、再度 TALON カラムに通して基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E の複合体としての安定性を調べた (図 8)。その結果、カラムに供した LolCD<sub>H</sub>E 複合体が溶出画分に元と同じサブユニット比 (LolC : LolD : LolE) で回収されていた。これは、凍結融解を 3 回繰り返したサンプルにおいても、同様であった。一方、LolCD<sub>H</sub>E に結合した一部の Pal が非吸着画分に回収されたが、Pal を単独でカラムに供した場合はすべて非吸着画分に回収された。これらの結果は、LolCD<sub>H</sub>E が凍結融解処理に対して安定であること、また基質-LolCD<sub>H</sub>E 複合体も十分な安定性をもっていることを示している。

A



B

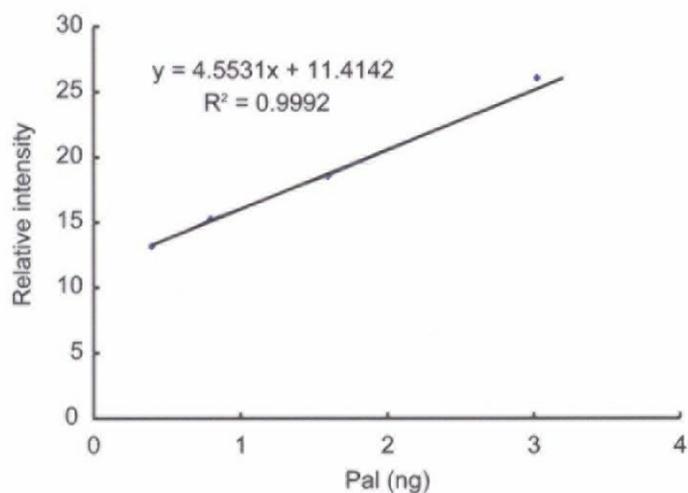


図7 基質結合型 LolCDH E に含まれる Pal の量

(A) 基質結合型 LolCDH E (15-60 ng) と精製した Pal (0.1-6.4 ng) を SDS-PAGE にて分離して抗 Pal 抗体を用いたイムノブロットングを行い、ATTO Densitograph CS Analyzer によりバンドの濃さを定量した。(B) (A) より Pal の検量線を作成して基質結合型 LolCDH E に含まれる Pal の量を定量した。3 回の実験の平均値は、LolCDH E : Pal = 1 : 0.15 ± 0.036 (mol) の割合であった。

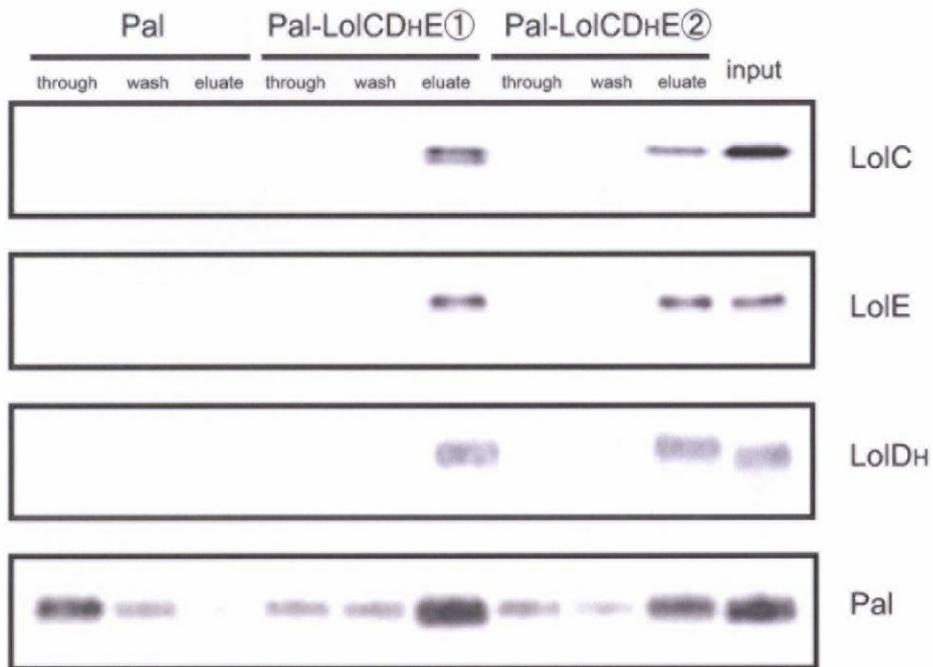


図8 基質-LolCDH 複合体の安定性

精製した1  $\mu\text{g}$  の基質結合型 LolCDH (Pal-LolCDH①)、同精製標品を3回凍結融解した1  $\mu\text{g}$  のサンプル (Pal-LolCDH②) および精製した0.02  $\mu\text{g}$  の Pal (1  $\mu\text{g}$  の基質結合型 LolCDH に含まれる Pal の量) を50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM  $\text{MgSO}_4$ 、0.01% DDM、10% Glycerol に加えて10  $\mu\text{L}$  となるように調製した。以降は、材料と実験方法の「TALON 樹脂を用いた基質と LolCDH との相互作用解析」にしたがって、非吸着、洗浄、溶出画分に分画した。各画分を SDS-PAGE に供し、図に示した抗体を用いたイムノブロッティングを行った。インプットは、TALON 樹脂で処理する前の基質-LolCDH 複合体 (50 ng) である。

## 基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E は再構成系での基質遊離活性をもつ

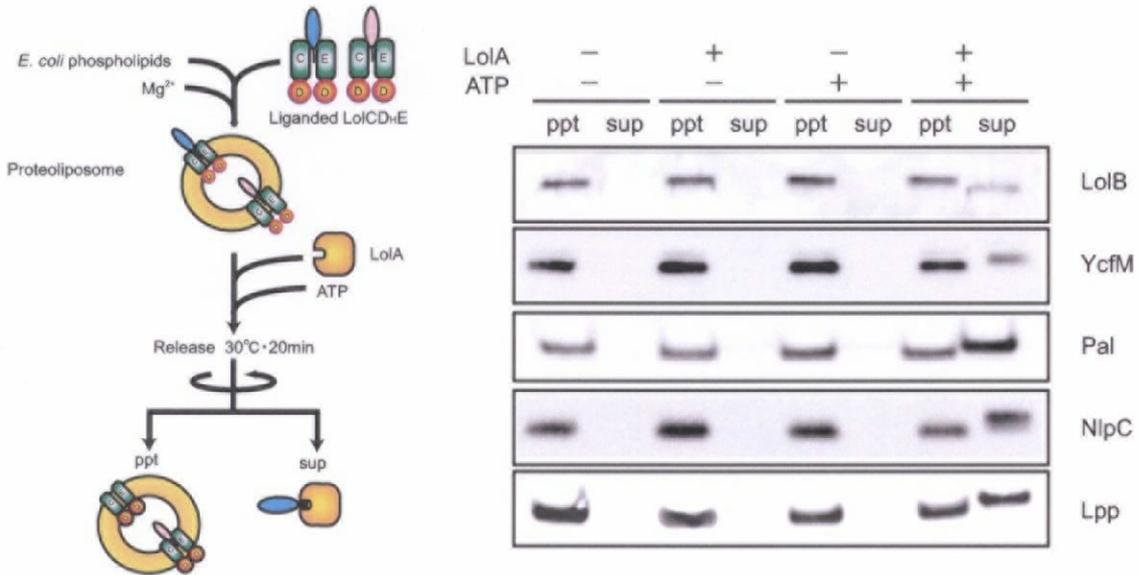
LolCD<sub>H</sub>E によるリポ蛋白質遊離反応には LolA および ATP 加水分解が必須である。そこで、単離した基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E が、結合した基質を膜から遊離させる機能を持つかどうかを調べるために、基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E と大腸菌リン脂質をプロテオリポソームに再構成し、LolA および ATP に依存した基質遊離反応 (30°C・20 分間) を解析した (図 9-A)。その結果、LolCD<sub>H</sub>E に結合した基質 (LolB、YcfM、Pal、NlpC および Lpp) は、LolA および ATP に依存してプロテオリポソームから遊離した。このことは、基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E が機能的な複合体であることを示している。

次に、同様に調製したプロテオリポソームを用いて、ATP の代わりに異なる 7 種類の条件下で基質遊離反応 (30°C・20 分間) を解析した (図 9-B)。ATP の代わりに ADP、AMP、および AMP-PNP を添加しても Pal の遊離活性はみられず、ATPase 阻害剤であるバナジン酸を添加すると Pal の遊離は阻害された。また、Mg<sup>2+</sup>欠損下では ATP を加えても基質の大部分は遊離しなかった (一部の基質は遊離しているが、これはプロテオリポソーム調製時において持ち込まれた Mg<sup>2+</sup>の影響と考えられる)。なお、AMP-PNP は ATP の非加水分解アナログであり、Mg<sup>2+</sup>は ATP 加水分解に必須のコファクターである。また、バナジン酸 (Vi) は無機リン酸 (Pi) アナログであり、ATP の加水分解により生じた Pi と置換して、LolCDE-ADP-Vi 中間体を形成することにより以降の ATPase 活性を阻害すると考えられる。本実験結果は、基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E から基質が遊離するためには、ATP 加水分解が要求されることを示している。

基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E は基質遊離反応の中間体である。

LolCD<sub>H</sub>E を過剰発現させた大腸菌における外膜リポ蛋白質の局在を調べた。大腸菌 (P<sub>BAD</sub>-lolCD<sub>H</sub>、Ptac-lolE) を 30°C で OD<sub>660</sub> = 0.8 になるまで培養した後、そのまま 30 分間培養を続けたものと、0.1% アラビノースおよび 0.1 mM IPTG で 30 分間誘導したものについて各々膜画分を調製し、ショ糖密度勾配遠心法により外膜と内膜とに分画した。LolCD<sub>H</sub>E を過剰発現させた膜では、過剰発現していない膜に比べて分離は悪かったが、Pal は外膜に局在

A



B

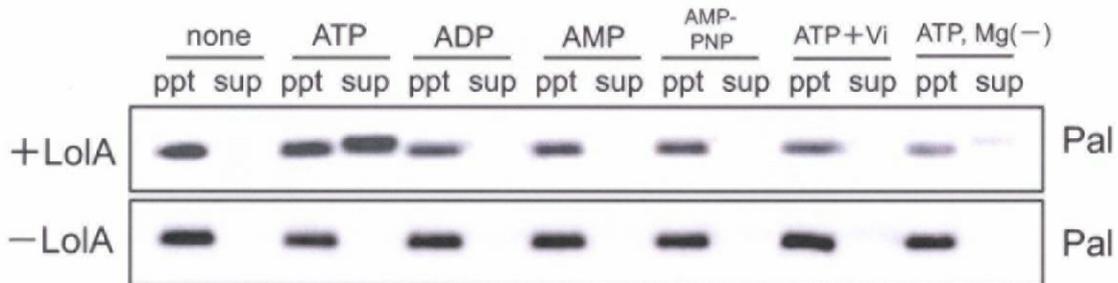


図9 基質結合型 LolCD<sub>2</sub>E は基質遊離反応の機能的な複合体である

(A) 「2. 材料と実験方法 - LolCD<sub>2</sub>E によるリポ蛋白質遊離活性」にしたがってプロテオリポソームを調製し、LolA および ATP を加えて 30°C・20分間の遊離反応を行った。遠心により分画した沈殿 (ppt) および上清 (sup) を SDS-PAGE で分離し、図に示した抗外膜リポ蛋白質抗体を用いて免疫ブロットングを行った。ppt は全体の 1/100 量、sup は全体の 1/3 量をアプライした。(B) LolCD<sub>2</sub>E の Pal 遊離反応におけるヌクレオチド、パナジン酸および Mg<sup>2+</sup> の効果を検討した。検出は(A)と同様に行った。

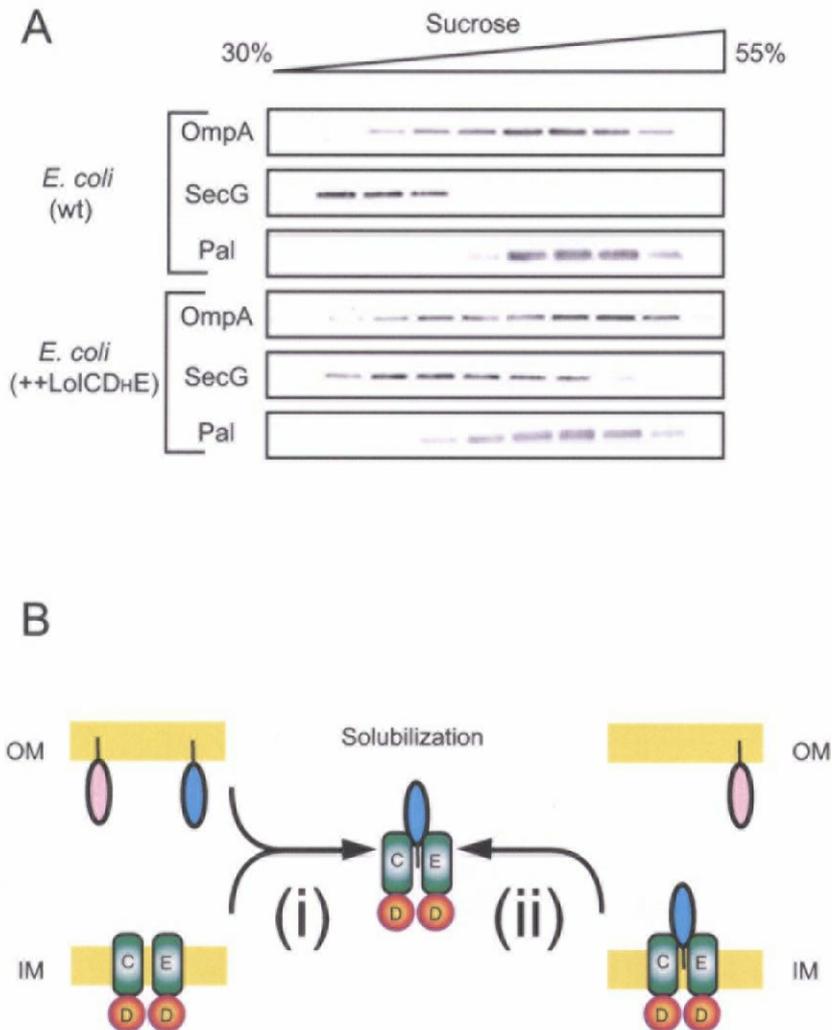


図10 基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E は基質遊離反応の中間体である  
 (A) LolCD<sub>H</sub>E を過剰発現していない大腸菌 (*E. coli* (wt)) および過剰発現した大腸菌 (*E. coli* (++LoiCD<sub>H</sub>E)) をショ糖密度勾配遠心法により内膜と外膜に分画した。SecG は内膜マーカー、OmpA は外膜マーカー。(B) 基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E は実験途上で生成した人為的産物(i)か、或いは内膜上で生成した遊離反応の中間体(ii)か？



した (図 10-A)。

そこで、基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E に含まれる外膜リポ蛋白質が、膜可溶化の際に外膜から人為的に持ち込まれたものなのか (図 10-B (i))、或いは遊離反応の中間体として内膜上で LolCD<sub>H</sub>E と結合したものが精製されたのか (図 10-B (ii)) を調べるために、LolCD<sub>H</sub>E を過剰発現させた大腸菌変異株 ( $\Delta pal$ ) より膜画分を調製し (図 10-D, lane 4)、ここに野生型大腸菌より調製した外膜画分 (図 10-C, OM) を質量比 1:1 の割合で加えて混成膜系 (図 10-D, lane 7) を調製した。本混成膜系より、LolCD<sub>H</sub>E の可溶化・精製を行ったところ、-ATP 条件で精製された LolCD<sub>H</sub>E には、Pal が結合していなかったのに対して、他の外膜リポ蛋白質については、野生型大腸菌の場合と同様に LolCD<sub>H</sub>E との結合が観察された (図 10-D, lane 2, 8)。以上の結果は、本研究で可溶化・精製された基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E は、内膜上で形成された遊離反応の中間体であることを示している。

#### ヌクレオチド、Vi および Mg<sup>2+</sup>の影響

LolCD<sub>H</sub>E によるリポ蛋白質遊離反応には LolA および ATP 加水分解が必須であるが、LolCD<sub>H</sub>E の可溶化・精製においては、膜の可溶化の際に ATP を加えるだけでフリーの LolCD<sub>H</sub>E が精製できる。なお、膜画分にはペリプラズム蛋白質 LolA は含まれない。そこで、ここで観られた ATP の役割を明らかとするために、LolCD<sub>H</sub>E の可溶化・精製におけるヌクレオチド、バナジン酸およびマグネシウムの影響を解析した (図 11)。LolCD<sub>H</sub>E を過剰発現した大腸菌から調製した 20 mg の膜画分を、異なる 5 種類の条件下 (「2. 材料と実験方法—LolCD<sub>H</sub>E の精製②」に示した可溶化溶液の  $\pm 2$  mM ATP の代わりに、2 mM ADP、2 mM AMP 或いは 2 mM AMP-PNP を加えたもの、2 mM ATP および 20 mM Vi を加えたもの、Mg<sup>2+</sup>非存在下で 2 mM ATP を加えたもの) で可溶化した。通常  $\pm 2$  mM ATP による可溶化も同時に行いコントロールとした。膜の可溶化以降の操作はすべて、「2. 材料と実験方法—LolCD<sub>H</sub>E の精製② (解析用の少量精製)」にしたがった。なおバッファー (バッファー A、B および透析バッファー) は ATP を除いたものを用いた。精製した LolCD<sub>H</sub>E を SDS-PAGE で分離して CBB 染色と抗 Pal 抗体を用いたイムノブロットングで解析したところ、ヌクレオチドとして ADP、AMP-PNP を加えると、ATP を加えた時と同様にフリーの LolCD<sub>H</sub>E が精製された。

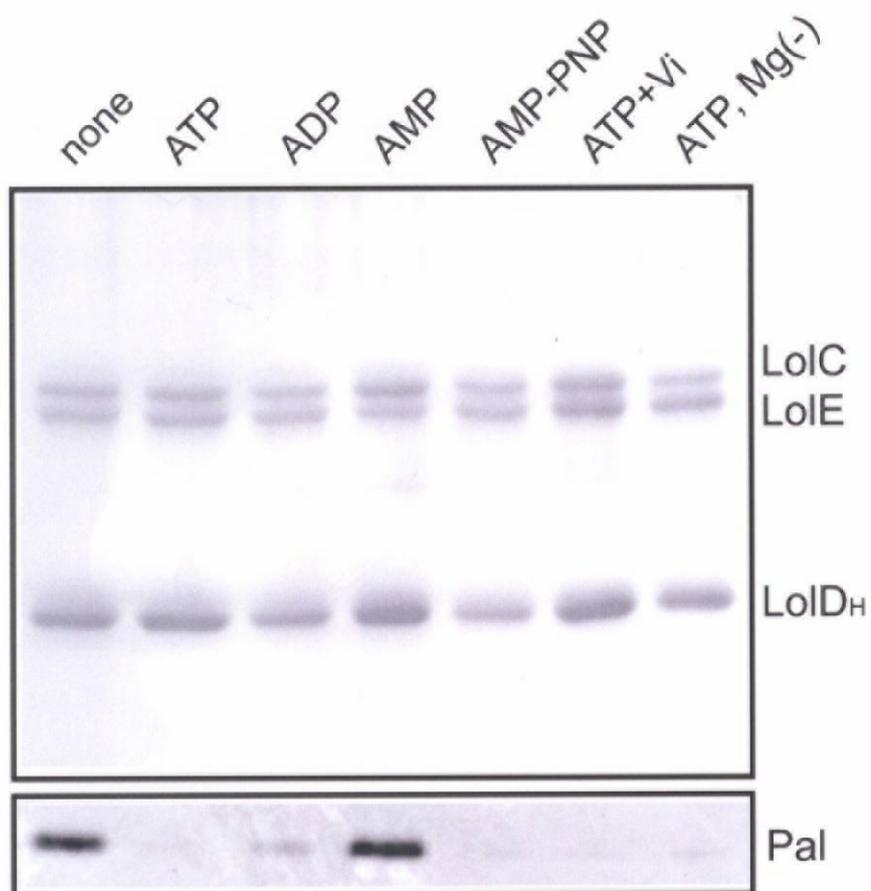


図11 ヌクレオチド、Vi および  $Mg^{2+}$  の影響

LolCDH を過剰発現した大腸菌より調製した膜を様々な条件下で可溶化した(2 mM ATP、ADP、AMP、AMP-PNP、2 mM ATP-20 mM Vi(+), 2 mM ATP- $Mg^{2+}$ (-))。膜の可溶化以降の操作はすべて、「2. 材料と実験方法-LolCDHの精製・(解析用の少量精製)」にしたがった。なおバッファー(バッファーA、Bおよび透析バッファー)はATPを除いたものを用いた。回収したLolCDH精製標品をSDS-PAGEで分離してCBB染色と抗Pal抗体を用いたイムノブロットングにより検出した。

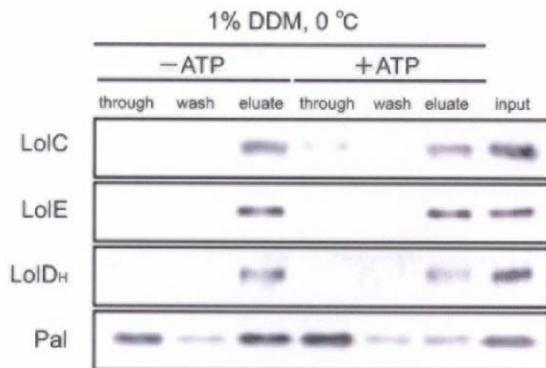
さらに、Vi を添加した場合も、 $Mg^{2+}$ を除いた場合も、フリーの LolCD<sub>H</sub>E が精製された。一方で、AMP を添加した場合は、基質-LolCD<sub>H</sub>E 複合体として精製された。

AMP-PNP は ATP の非加水分解アナログであり、Vi は ATPase 阻害剤、また  $Mg^{2+}$ は ATP 加水分解に必須のコファクターである。したがってこれらの結果は、LolCD<sub>H</sub>E による ATP 加水分解ではなく、ATP が LolCD<sub>H</sub>E に結合するだけで、基質と LolCD<sub>H</sub>E との相互作用が弱められることを示している。一方で、ADP は ATP とほぼ同様の効果を示したが、AMP ではヌクレオチドを加えない場合と同様の効果であった。このことは、ADP 結合型 LolCD<sub>H</sub>E は、ATP 結合型とほぼ同様に基質との親和性が低くなることを示唆しており、また AMP は LolCD<sub>H</sub>E に結合できないのではないかと考えられる。

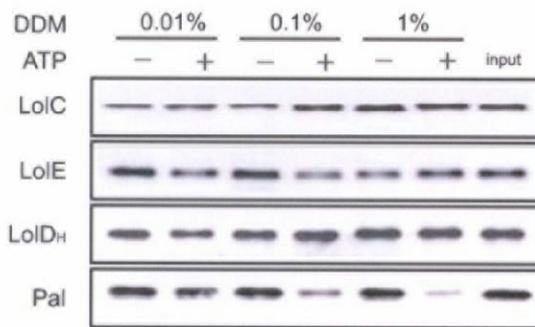
#### ATP が LolCD<sub>H</sub>E に結合すると、基質と LolCD<sub>H</sub>E 間の疎水的結合が弱くなる

基質-LolCD<sub>H</sub>E 複合体に対する ATP および DDM の効果を調べるために、本複合体の *in vitro* 解析を行った。本複合体を、ATP および DDM 存在下で氷上で30分間静置した後、TALON 樹脂を用いてスルー、洗浄および溶出画分に分画した。まず、本複合体に対する ATP の影響を調べるために、1%DDM 存在下で ATP を加えたもの加えないものについて各フラクションで検出された Pal の量をイムノプロットングにより解析した (図 12-A)。その結果、ATP 存在下では大部分の Pal がスルーに検出され、残りの少量の Pal が LolCD<sub>H</sub>E と共に溶出されたのに対し、ATP 非存在下でも一部の Pal はスルーに検出されたが、LolCD<sub>H</sub>E と共に溶出された Pal の量は ATP 存在下で溶出された Pal の量よりも多くなっていた。このことは、ATP に依存して Pal が LolCD<sub>H</sub>E から解離することを示している。次に、本複合体に対する DDM の効果を調べるために DDM 濃度を変えて同様の実験を行い、溶出画分のみをイムノプロットングにより比較した (図 12-B)。その結果、ATP 非存在下では、DDM 濃度を変えても LolCD<sub>H</sub>E と共に溶出される Pal の量に変化はなかったが、ATP 存在下では DDM の濃度に依存して基質が LolCDE から解離したために、LolCD<sub>H</sub>E と共に溶出される Pal の量が減少した。以上の実験から、ATP は基質-LolCD<sub>H</sub>E 間の疎水的相互作用を弱める作用をもつことが示された。なお、データは示していないが、温度を 30℃に上げて同様の実験を行うと、ATP 非存在下でも、DDM 濃度に依存した基質の解離が観られるようになり、±ATP による顕著な違

A



B



C



基質結合型 LolCDHε

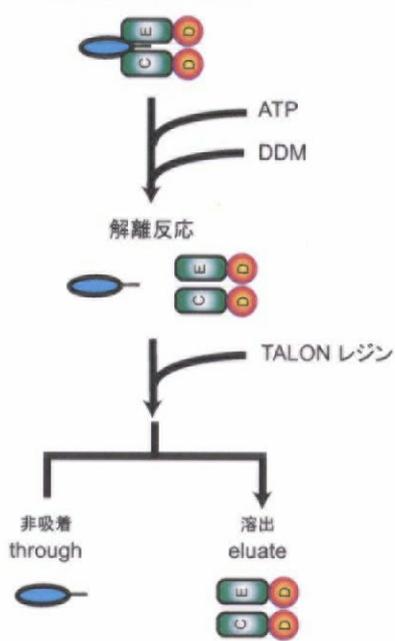


図12 基質結合型 LolCDHε の *in vitro* 解析  
 (A) 基質結合型 LolCDHε を ±ATP および 1% DDM 存在下で氷上で 30 分間インキュベートした。反応後、各サンプルを TALON レジンに通して、非吸着、洗浄および溶出画分に分離し、各画分を SDS-PAGE で分離して、図に示した抗体を用いたイムノプロットングを行った。(B)基質結合型 LolCDHε を ±ATP 存在下および 0.01%, 0.1% 或いは 1% DDM の濃度下で氷上で 30 分間インキュベートした。(A)と同様に分離し、溶出画分のみを検出した。(C) 基質結合型 LolCDHε からの Pal の解離を図11と同様の様々な条件下で解析した。但し、基質解離反応は 1% DDM 条件下で 4°C・2 時間で行い、使用したヌクレオチド濃度は全て 10 mM、Vi は 20 mM とした。(A)と同様に分離し、溶出画分のみを検出した。インプット は、TALON 樹脂で処理する前の基質-LolCDHε 複合体 (50 ng) である。

いは観られなくなった。

基質結合型 LolCD<sub>H</sub>E の *in vitro* 解析において観られた ATP の影響が ATP 加水分解によるものかどうかを調べるために、本複合体に対して 1% DDM 存在下で 10 mM ヌクレオチド、20 mM Vi および 5 mM Mg<sup>2+</sup> を用いてその効果を調べた (図 12-C)。その結果、解離反応を 4°C・2 時間行った場合には、図 11 の結果と同様に、ATP、ADP、AMP-PNP は基質を LolCD<sub>H</sub>E から解離させ、さらに、Vi を添加した場合でも、Mg<sup>2+</sup> を除いた場合でも、基質が LolCD<sub>H</sub>E から解離した。一方で、AMP を添加した場合は、基質は LolCD<sub>H</sub>E に結合したままであった。なお、データは示していないが、図 11 と同様にヌクレオチドの濃度を 2 mM にして反応を 4°C・30 分間しか行わない場合には、ATP 以外のヌクレオチドの効果はほとんど観られなかった。図 11 で行った実験と本実験との違いは脂質の有無であるから、脂質が、LolCDE によるヌクレオチドの結合や LolCDE からの基質の解離を促進するのかもしれない。

#### Walker モチーフ変異体 LolCD<sub>H</sub>(K48M)E および LolCD<sub>H</sub>(E171Q)E の解析

全ての ABC 蛋白質において、ATP の結合、加水分解に重要な Walker モチーフが保存されている。これまでに、Walker モチーフ A (GxGKST) で保存された Lys を Met に置換した変異体では、ATP を結合できなくなることが、TAP トランスポーターや MDR1 など報告されている (Lapinski et al., 2001; Muller et al., 1996)。一方で、Walker モチーフ B (Φ<sub>4</sub>DE) で保存された Glu を Gln に置換した変異体では、ATP の結合は正常であるが、ATP 加水分解能を失うことが、数多くの ABC 蛋白質で報告されている (Moody et al., 2002; Smith et al., 2002)。特に、大腸菌 LolD と 43.7% の相同性を有する超高熱古細菌 *Methanococcus jannaschii* の MJ0796 蛋白質では、E171Q (Walker B) 変異により NaATP に依存した二量体構造をとることが示されており、その結晶構造も取得されている (Smith et al., 2002)。そこで、LolCDE の機能と ATP との関係性を明らかにするために、2 つの Walker モチーフ変異体 LolCD<sub>H</sub>(K48M)E および LolCD<sub>H</sub>(E171Q)E を構築し (図 13-A)、ATPase サブユニット LolD における ATP 結合・加水分解の各反応が、膜貫通サブユニット LolC および LolE の基質結合部位を介した基質結合・遊離の各反応とどのように共役しているのかを解析した。

P<sub>BAD</sub>-lolCD<sub>H</sub> および変異を入れた P<sub>BAD</sub>-lolCD<sub>H</sub>(K48M)、P<sub>BAD</sub>-lolCD<sub>H</sub>(E171Q) を、Ptac-lolE と

一緒に JM109 に導入した株を薬剤のみのプレートおよび誘導プレート上で 30℃、一晚培養したところ、 $P_{BAD-lolCD_H}$ ,  $P_{tac-lolE}$  / JM109 はいずれのプレートでも生育したが、 $P_{BAD-lolCD_H(K48M)}$ ,  $P_{tac-lolE}$  / JM109 および  $P_{BAD-lolCD_H(E171Q)}$ ,  $P_{tac-lolE}$  / JM109 は、誘導プレートでは生育しなかった (図 13-B)。一方、 $LolCD_H(K48M)E$  或いは  $LolCD_H(E171Q)E$  を保有する株を、液体培地で対数増殖期中～後期 ( $OD_{660} = 0.6-0.8$ ) まで培養した後に発現誘導を行った場合は、野生型  $LolCD_HE$  を保有する株と同様に生育し、 $LolCD_HE$  蛋白質の発現レベルも同程度であった。

そこで、変異型  $LolCD_HE$  を過剰発現させた大腸菌より膜画分を調製して、 $LolCD_HE$  の可溶化・精製を行ったところ、 $LolCD_HE$  複合体形成能は野生型の場合と同程度であった (図 14-A)。-ATP 条件で調製した野生型および変異型  $LolCD_HE$  について ATPase 活性を測定したところ (図 14-B)、野生型  $LolCD_HE$  は、少なくとも 30℃・2 時間の安定な活性を示したのに対して、 $LolCD_H(K48M)E$  および  $LolCD_H(E171Q)E$  は完全に活性を失っていた。さらに、-ATP 条件で調製した野生型および変異型  $LolCD_HE$  についてリポ蛋白質遊離活性を調べたところ (図 14-C)、 $LolCD_H(K48M)E$  および  $LolCD_H(E171Q)E$  はリポ蛋白質遊離活性を示さなかった。一方で、ATP 存在下で可溶化・精製された野生型および変異型  $LolCD_HE$  を比較すると、ATP を結合できない  $LolCD_H(K48M)E$  は基質との複合体として精製されたのに対して、ATP の加水分解はできないが ATP を結合できる  $LolCD_H(E171Q)E$  は、野生型と同様にフリーの  $LolCDE$  として精製された (図 14-A)。 $LolCD_H(K48M)E$  が ATP 存在下でも基質と結合できることは、 $LolCD_HE$  は ATP と結合する前に (ATP と結合しなくとも) 基質と結合して、基質- $LolCD_HE$  複合体を形成することを示している。さらに、 $LolCD_H(E171Q)E$  が ATP 存在下で野生型と同様にフリーの  $LolCDE$  として精製できることは、ATPase サブユニット  $LolD$  による ATP の結合が、何らかのシグナルとして膜サブユニット  $LolC$  および  $LolE$  に伝達され、基質との相互作用を緩めるのに必要なエネルギーを供給していることを示している。

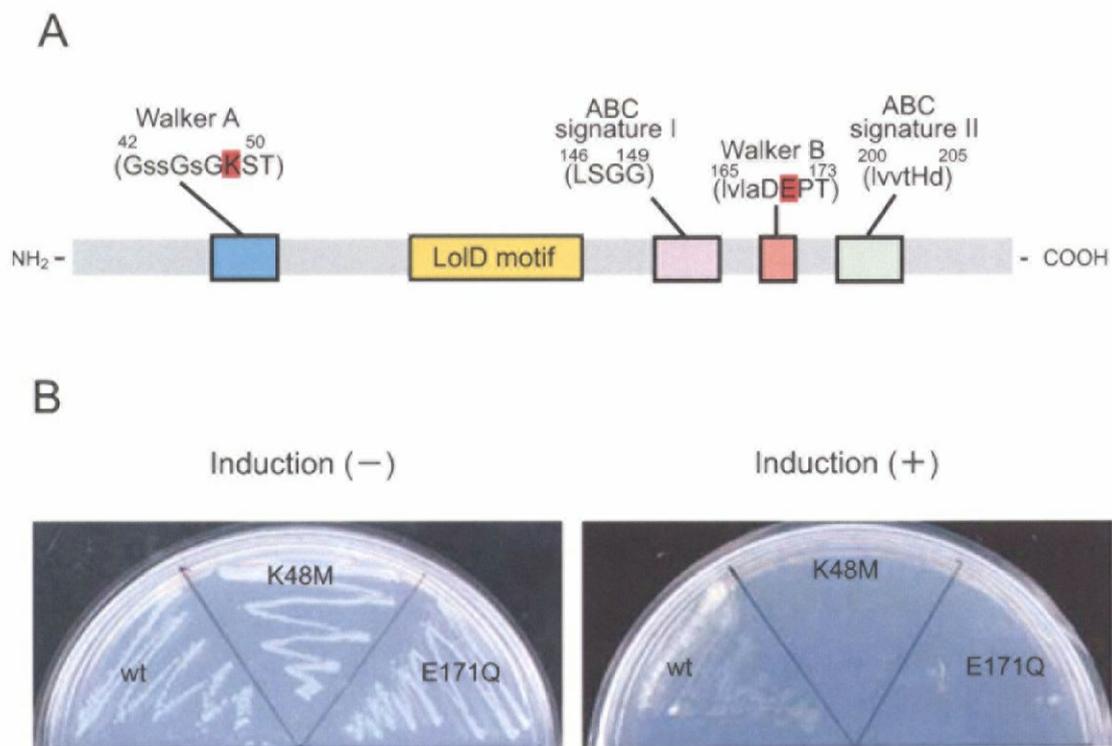


図13 Walkerモチーフ変異体 LolCD<sub>H</sub>(K48M)E および LolCD<sub>H</sub>(E171Q)E の構築  
 (A) LolDサブユニットのドメイン構造。(B) 構築した変異体を薬剤のみ (50 µg/mL Ap、25 µg/mL Cm) のプレートおよび薬剤と誘導剤 (0.2% アラビノース、0.04 mM IPTG) を添加したプレートにて 30°C で一晩培養した (wt : P<sub>BAD</sub>-lolCD<sub>H</sub>, Ptac-lolE / JM109、K48M : P<sub>BAD</sub>-lolCD<sub>H</sub> (K48M), Ptac-lolE / JM109、E171Q : P<sub>BAD</sub>-lolCD<sub>H</sub> (E171Q), Ptac-lolE / JM109)。

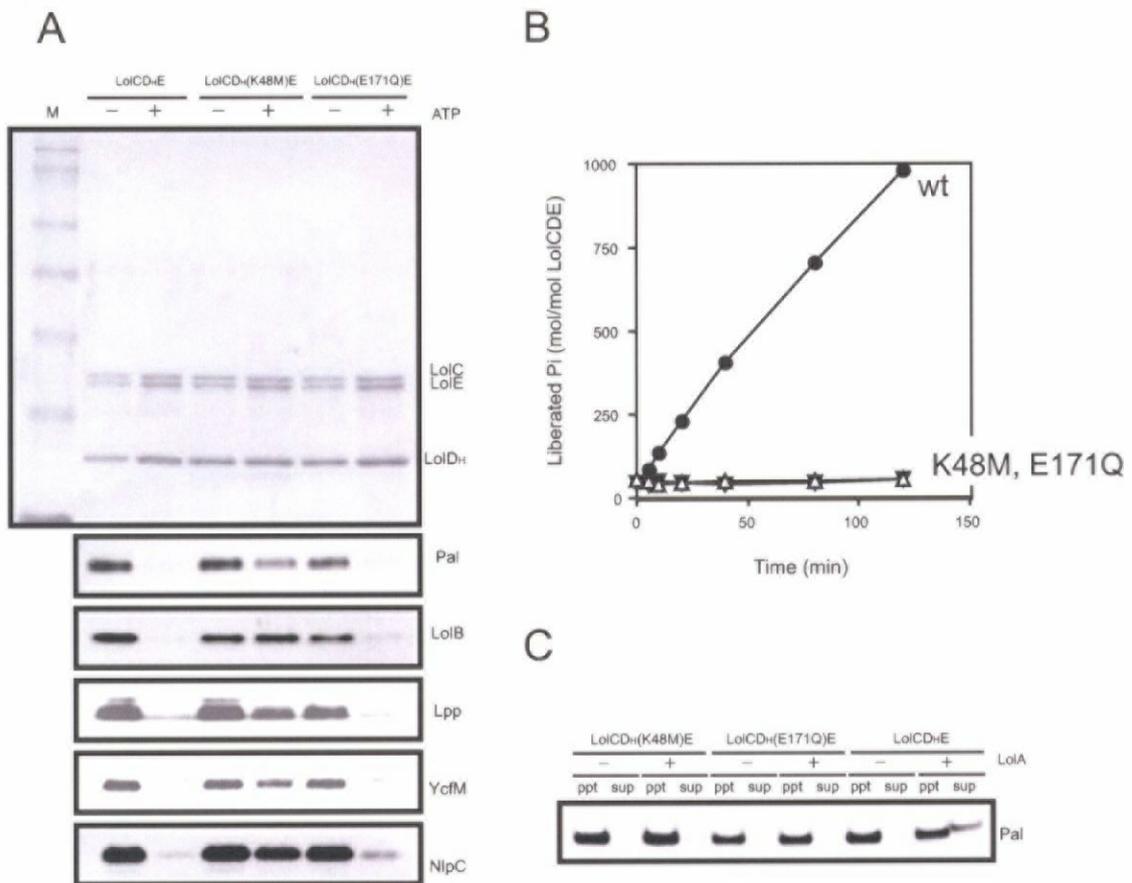


図14 Walker モチーフ変異体 LolCD<sub>H</sub>(K48M)E および LolCD<sub>H</sub>(E171Q)E の解析  
 (A) LolCD<sub>H</sub>E, LolCD<sub>H</sub>(K48M)E および LolCD<sub>H</sub>(E171Q)E を±ATP 条件下で同様に精製して、SDS-PAGE で分離して CBB 染色或いは、図に示した抗体を用いたイムノブロッティングを行った。(B) LolCD<sub>H</sub>E, LolCD<sub>H</sub>(K48M)E および LolCD<sub>H</sub>(E171Q)E の ATPase 活性。(C) LolCD<sub>H</sub>E, LolCD<sub>H</sub>(K48M)E および LolCD<sub>H</sub>(E171Q)E のリボ蛋白質遊離活性。

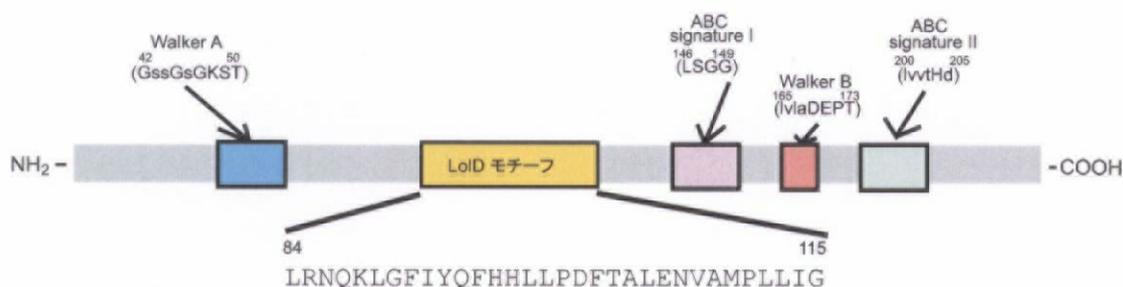
### 3-2 LolD モチーフの解析

#### LolD モチーフの特徴

LolD には ABC トランスポーターの ATPase サブユニットに共通にみられる Walker モチーフや ABC signature 配列のほかに、「LolD モチーフ」と呼ばれる領域がある (図 15-A)。本モチーフは、大腸菌 ABC トランスポーター間での保存は低いが、LolD ホモログ間では特異的に保存されているため、LolCDE の機能に重要な働きを担っていると考えられる (図 15-B)。但し、LolD モチーフ内の Gln は広く保存されており、Gln を中心としたフレキシブルな領域は Q ループと呼ばれる。Q ループ周辺の配列は、LolD ホモログのみならず、他の ABC 蛋白質においても各ホモログ間での特異的な保存が見出されており、ABC 蛋白質を分類する一つの指標として用いられている (図 16)。

2002 年に報告された BtuCD の結晶構造をみると、ATPase サブユニット BtuD の Q ループは膜サブユニット BtuC との境界面に位置し、BtuC からサイトゾルに突き出た L ループと近接していた (図 5-B、図 17-A)。Rees ら (2002) は、BtuCD、MsbA の結晶構造および他の ABC 蛋白質の配列を基にして L ループ領域のアライメントを作成し、L ループの折れ曲がり点 (L1 と L2 の間) にある Gly の保存を見出した (図 17-B)。一方、細菌型取り込み系の ABC 輸送体では、サイトゾル側に向けた親水性のループ領域に EAA----G のコンセンサス配列 (EAA ループと呼ばれる) が見出されており (図 17-C) (Kerppola and Ames, 1992)、本領域の変異が輸送活性を損なうことが知られている (Mourez et al., 1997)。また、マルトーストランスポーター (MalFGK<sub>2</sub>) において、MalF の EAA ループに存在する S403、MalG の A192 と G196 は、MalK の Q ループに存在する A85 と近接している結果が得られており、EAA ループと Q ループが相互作用することが示唆されている (Hunke et al., 2000)。LolC および LolE についても、ホモログ蛋白質間のコンセンサス配列として EAA----G が見出されている (Kurata et al., unpublished results)。ヒスチジンパーミアアーゼ (HisMQP<sub>2</sub>) の HisM および HisQ の EAA ループにおける Gly と L ループにおける Gly は位置が異なっているものの (図 17-B、C)、サイトゾル側の親水性ループが NBD との相互作用に重要な役割を担うことは否定できない。LolCDE においては、LolC および LolE のトポロジー構造の特徴 (図 17-D) から、

A



B

(i) グラム陰性細菌の LolD ホモログ

Eco LRNQKLGFIYQFHLLPDFTALENVAMPLLIG  
 Sfl LRNQKLGFIYQFHLLPDFTALENVAMPLLIG  
 Sen LRNQKLGFIYQFHLLPDFTALENVAMPLLIG  
 Sty LRNQKLGFIYQFHLLPDFTALENVAMPLLIG  
 Ype LRNRELGFYQFHLLPDFTALENVAMPLLIG  
 Plu LRNHELGFYQFHLLPDFNAVENVAMPLLIG  
 Hin LRNRYLGFVYQFHLLMADFTAENVMMPMLIG  
 Pmu LRNQYLGFIYQFHLLMADFSALENVAMPMLIG  
 Vch IRNQHLGFVYQFHLLADFSALENVAMPLLIG  
 Vpa LRNKHLGFVYQFHLLADFTALENVAMPLLIG  
 Ppr IRNQELGFVYQFHLLADFSAMENVAMPLLIG  
 Pae LRNRALGFVYQFHLLPEFTAENVCMPPLLIG

(ii) 大腸菌の ABC トランスポーター

LolD LRNQKLGFIYQFHLLPDFTALENVAMPLLIG  
 ArtP DLRRNVGMVFQYQNLWPHLTVQQNLEAPCRV  
 BtuD KLALHRAVLSQQTPPFATPVWHYLTQHDK  
 CcmA LWIGHQPGIKRRLTAENLHFYHRDGDQAQCL  
 FhuC AFARKVAYLPQQLPPAEGMTVRELVAIGRYPW  
 FtsE FLRRQIGMIFQDHLLMDRTVYDNVAIPLIA  
 GlnQ LIRQEAGMVFQYFYLPHLTAENVMFGPLRV  
 GltL KLRSRVGMVFQHFELPHLSIENLTLAQVKVL  
 HisP LLRTRLTMVFQHFNLWSHMTVLENVMEAPIQV  
 LivF IMREAVAIVPEGRRVFSRMTVEENLAMGGFFA  
 MalK PAERGVGMVFQSYALPHLSVAENMSFGLKLA  
 NikD ATIMNPRSAFNPLHTMHTHARETCLALGKPAD  
 PhnC KSRHTGYIFQQFNLVNRLSVLENVLI GALGS  
 PstB LLRAKVGVMVFQKPTPFMSIYDNI AFGVRLFE  
 SapF FRSQRIRMIFQDPSTLNPRQRISQILDPLRL  
 TauB GPGAERGVVFQNEGLLPWRNVQDNVAFGLQLA

図15 LolD モチーフの特徴

(A) LolD サブユニットのドメイン構造および LolD モチーフの配列。(B) LolD モチーフにおける (i) グラム陰性細菌 LolD ホモログ蛋白質間のアライメント (Eco ; *Escherichia coli*, Sfl ; *Shigella flexneri*, Sen ; *Salmonella enterica*, Sty ; *Salmonella typhimurium*, Ype ; *Yersinia pestis*, Plu ; *Photobacterium luminescens*, Hin ; *Haemophilus influenzae*, Pmu ; *Pasteurella multocida*, Vch ; *Vibrio cholerae*, Vpa ; *Vibrio parahaemolyticus*, Ppr ; *Photobacterium profundum*, Pae ; *Pseudomonas aeruginosa*) および (ii) 大腸菌の ABC トランスポーター間のアライメント。大腸菌 LolD モチーフの保存配列を赤色で示す。

LolD		MalK	
	▼		▼
Eco	LRNQKLGFIYQFHLLPDFTALENVAMPLLIG	Eco	PAERGVGMVFQSYALYPHLSVAENMSFGLKLA
Sfi	LRNQKLGFIYQFHLLPDFTALENVAMPLLIG	Sfi	PAERGVGMVFQSYALYPHLSVAENMSFGLKLA
Sen	LRNQKLGFIYQFHLLPDFTALENVAMPLLIG	Sen	PAERGVGMVFQSYALYPHLSVAENMSFGLKLA
Sty	LRNQKLGFIYQFHLLPDFTALENVAMPLLIG	Sty	PAERGVGMVFQSYALYPHLSVAENMSFGLKLA
Ype	LRNRELGFYQFHLLPDFTALENVAMPLLIG	Plu	PAKRGVGMVFQSYALYPHLSVADNMSFGMKLA
Plu	LRNHELGFYQFHLLPDFNAVENVAMPLLIG	Ype	PSEKRGVGMVFQSYALYPHLSVAENMSFGLKLA
Hin	LRNRYLGFVYQFHLLMADFTAENVMMPMLIG	Vch	PSKRGVGMVFQSYALYPHLSVAENMSFGLKLS
Pmu	LRNQYLGFVYQFHLLMADFSALENVAMPMLIG	Ppr	PSDRGVGMVFQSYALYPHLSVAENMSFGLKLA
Vch	LRNQHLGFVYQFHLLMADFSALENVAMPLLIG	Sme	PARRGIAMVFQSYALYPHLSVYKSLAFLETA
Vpa	LRNKHLGFVYQFHLLMADFTAENVAMPLLIG	Pae	PAKRDLAMVFQTYALYPHMTVRRNLSFALDLA
Ppr	LRNQEIGFVYQFHLLMADFSAMENVAMPLLIG	Atu	PADRGIAMVFQSYALYPHMTVAENLSFGLRMM
Pae	LRNRALGFVYQFHLLPEFTAENVCMPLLIG	Bma	SAKRGIAMVFQSYALYPHMTLYDNMAFGLKLA

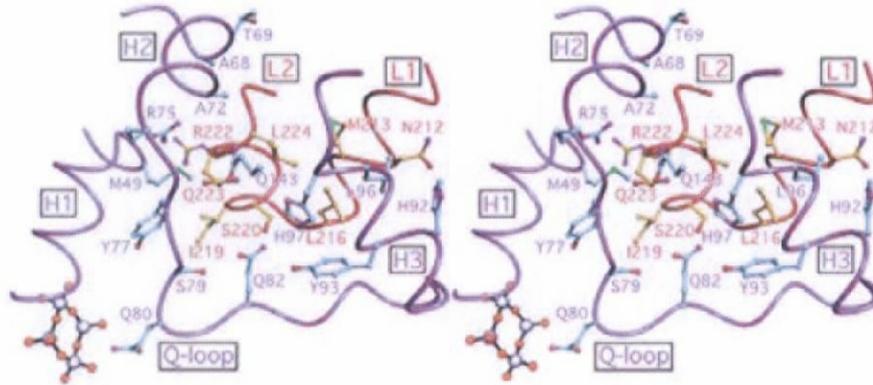
  

BtuD		MsbA	
	▼		▼
Eco	KLALHRAYLSQQQTPPFATPVWHYLT LHQHDK	Eco	SLRNQVALVSNVHVFNDTVANNIAYARTEQY
Sfi	KLALHRAYLSQQQTPPFAMPVWHYLT LHQHDK	Sfi	SLRNQVALVSNVHVFNDTVANNIAYARTEQY
Sen	TLAQHRAYLAQQNPPFAMPVWHYLT LHQPDK	Sen	SLRNQVALVSNVHVFNDTVANNIAYARTEEY
Ype	ELARQRAYLSQQSALSMPVFQYLSLYQPAG	Sty	SLRNQVALVSNVHVFNDTVANNIAYARTEEY
Vch	ELARHRAYLAQNNKPSFQLHVFQYLALSVPAN	Ype	ALRNQVALVSNVHVFNDTVANNIAYARNEQY
Ppr	SLARMRCYLSQQDRPAFSVAVYHYLALSLSAL	Plu	SLRGQVALVSNVHVFNDTVANNIAYASENRY
Plu	QLARYRAWLSQQISSVPI MPVFQYLQLHLAAH	Vch	NLRRHFALVSNVHVFNDTVANNIAYAAEGEY
Vvu	EQAIYRAYLQQSRPAFNVDVFQMLALSLPVG	Vpa	NLREQFALVSNVHVFNDTVANNIAYATEDKY
		Ppr	NLRDQVAVVSNVHVFNDTVANNIAYASGDSF
		Hin	NLRENCVAVVSNVHVFNDTVANNIAYAAQDKY
		Pmu	SLRKNCAVVSNVHVFNDTVANNIAYAAKDKY

図16 Q ループ周辺配列の重要性

LolD モチーフに相当する領域の各ホモログ蛋白質 (LolD、MalK、BtuD、MsbA) におけるアライメント (Sme ; *Sinorhizobium meliloti*, Atu ; *Agrobacterium tumefaciens*, Bma ; *Burkholderia mallei*, Vvu ; *Vibrio vulnificus*, それ以外は図11で示した)。各ホモログ間で全てにおいて保存されたアミノ酸残基を赤色で示す。黒矢印で示したグルタミンは全ての ABC 蛋白質で保存されている。

A



B

			L1	L2
			▲▲▲▲	▲▲▲▲
			■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■
<i>E. coli</i> _BtuC	208	SRP	M	N
<i>E. coli</i> _MsbA	112	PVS	F	D
<i>S. typ.</i> _HisM	122	AGA	R	S
<i>S. typ.</i> _HisQ	113	RGAF	M	V
<i>L. lac</i> _LmrA	114	VKY	F	D
<i>H. sap.</i> _MDR1	160	IGW	F	D
<i>H. sap.</i> _MDR1	772	LQG	F	T
<i>H. sap.</i> _TAP1	273	TEFF	Q	N
<i>H. sap.</i> _TAP2	238	LGFF	Q	E
<i>H. sap.</i> _MRP1	412	NSAR	K	S
<i>H. sap.</i> _MRP1	1032	GYS	M	A
<i>H. sap.</i> _CFTR	244	MMKY	R	D
<i>H. sap.</i> _CFTR	1052	FTH	L	V

C

Eco LoIC	VMEKQGEVA	ILQ	TQGL	T	PRQ	I	M	V	F	M	V	Q
Eco LoIE	VKDKSGDI	AVL	R	L	T	G	A	K	D	G	L	I
Eco MalF	IPDDLYEASAM	---	D	G	A	G	P	F	Q	N	F	F
Eco MalG	IDSSLEEAAAL	---	D	G	A	T	P	W	Q	A	F	R
Eco HisM	VPHGEIEAARA	---	Y	G	F	S	T	F	K	M	Y	R
Eco HisQ	VPKGHIEAATA	---	F	G	F	T	R	G	Q	V	F	R

D

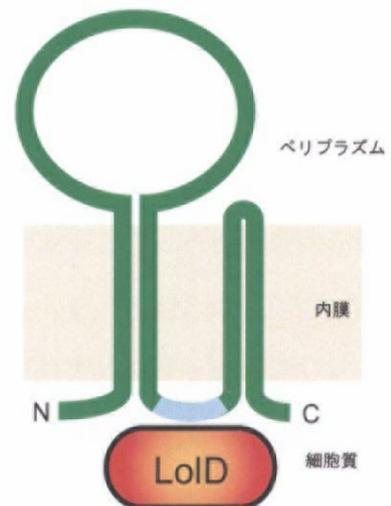


図17 NBDとMSDのインターフェイス

(A) BtuCDの結晶構造からBtuD (NBD)とBtuC (MSD)とのインターフェイスにおけるLループ(赤)とQループ(青)の相互作用を示した。左にあるボール&スティックは、サイクロテトラバナジン酸。  
 (B) MSDのアライメント(*L. lac*; *Lactococcus lactis*, *H. sap*; *Homo sapiens*, それ以外は図15で示した)。BtuDのLループ(二次構造)を上を示した。その下に、BtuDの側鎖および主鎖と接触するアミノ酸の位置を、各々黒塗り■および白抜き□で示した。Lループの折れ曲がり点(L1とL2の間)にあるGly(白抜き)は全てにおいて保存されている。灰色の網掛けは保存の高いアミノ酸。(C) EAAループのアライメント(EAA----Gがコンセンサス配列(赤))。Glyは全てにおいて保存されているが、(B)のGly(HisQおよびHisMの緑色部分)とは異なる。(D) LolCおよびLolE共通のトポロジーモデル。ともにN末端側とC末端側を細胞質に向け、大きなペリプラズムループをもつ。膜貫通領域(TM1-4)は4つあり、EAAループ(水色)はTM2とTM3の間にある。

サイトゾル側のループは TM2 と TM3 の間にある領域しかありえないため、TM2 と TM3 の間にある領域が Q ループと相互作用していると予想している。

### LolD モチーフ変異体の構築

LolD モチーフの機能を検討するために、LolD モチーフ 32 アミノ酸残基すべてを部位特異的変異導入法により任意のアミノ酸残基に置換して、変異体を作製した。Ptac プロモーター下流につないだ *lolD<sub>H</sub>* 遺伝子内に変異の入ったプラスミドを MC4100 に導入し、±IPTG プレートで培養して、IPTG プレート上で生育阻害を示す株について LolD<sub>H</sub> 蛋白質発現および *lolD<sub>H</sub>* 遺伝子を解析した結果、変異を導入した 32 アミノ酸残基のうち 12 種類のアミノ酸残基において、合計 26 種類のドミナントネガティブ変異体を取得した (図 18)。取得できなかった 20 種類のアミノ酸残基すべてについては、それぞれ 5 個の無作為に拾ったコロニーからプラスミドを抽出して *lolD* 遺伝子を解析した。その結果、すべてに変異が入っていることを確認した。

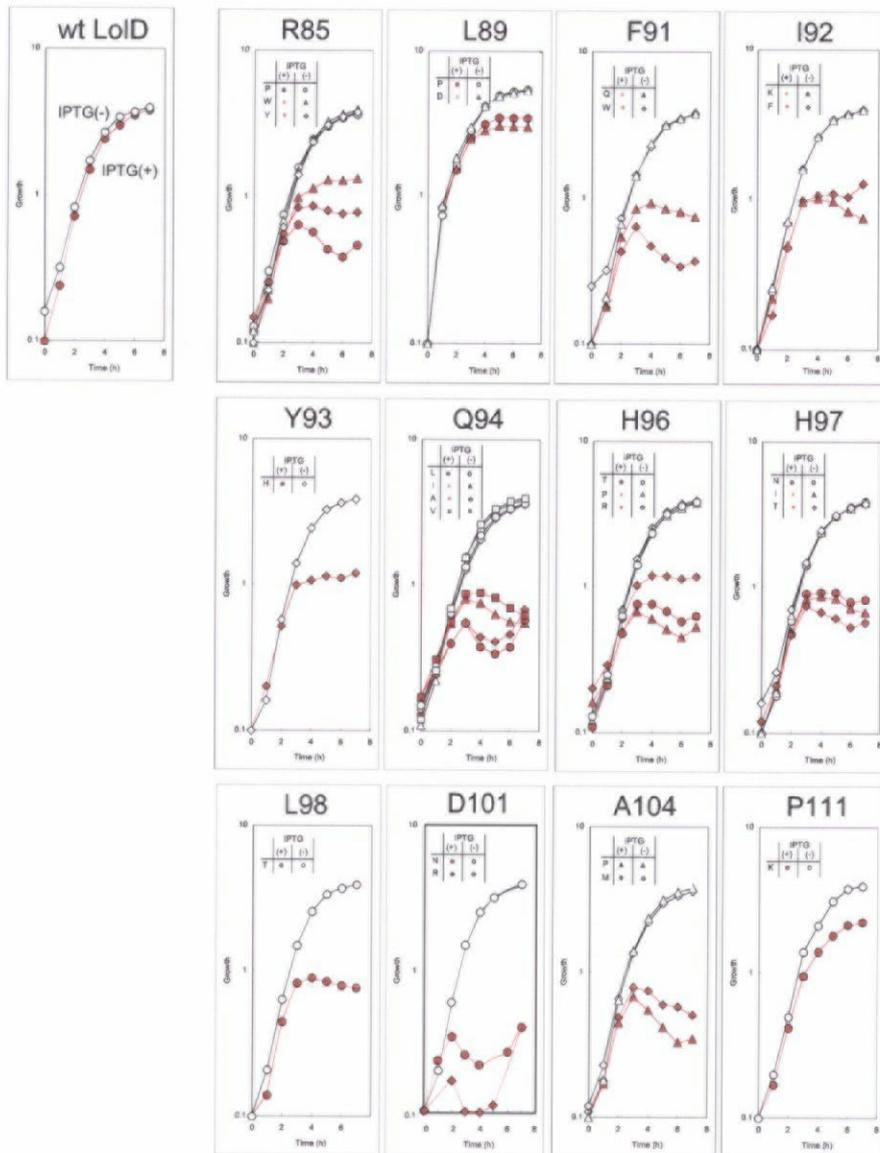
LB 液体培地にて 30°C で一晩培養した野生型 Ptac-*lolD<sub>H</sub>* 或いは変異型 Ptac-*lolD<sub>H</sub>* (*m*) を有する大腸菌の培養液を、IPTG を含むまたは含まない LB 液体培地に 100 倍希釈となるように添加して、引き続き 30°C 培養を続けた。その結果、野生型 LolD<sub>H</sub> を IPTG により過剰発現した大腸菌は正常に生育したのに対して、取得した変異型 LolD<sub>H</sub>(*m*) を IPTG により過剰発現した大腸菌は、26 種類全ての変異体において IPTG 誘導に伴う生育阻害が観察された (図 19-A)。特に、変異体 LolD<sub>H</sub>(D101N) および LolD<sub>H</sub>(D101R) を過剰発現させた大腸菌の生育阻害が著しかった。以上の結果は、過剰発現した変異 LolD 蛋白質は、正常な LolD 機能を欠いていることを示している。また 26 種類全ての変異株が、変異 LolD 蛋白質を安定に発現していた (図 19-B)。

### 変異 LolD を過剰発現させた Lpp 欠損大腸菌の生育

JE5506 株、およびその Lpp を欠損した JE5505 株で変異型 Ptac-*lolD<sub>H</sub>*(*m*) を発現させて生育の違いを観察した (図 20)。変異体 LolD<sub>H</sub>(D101N) および LolD<sub>H</sub>(D101R) では、JE5506 株お



A



B

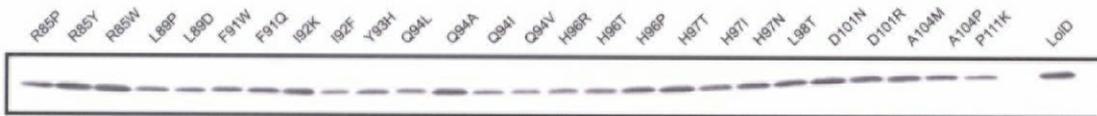


図19 LoID ドミナントネガティブ変異体の取得

(A) LoID モチーフ32アミノ酸のうち 12 アミノ酸において、合計 26 種類のドミナントネガティブ変異体を取得した。取得した変異体を±IPTG を含む LB 液体培地で 30°C 培養して、菌の生育を観察した。(B) 取得した変異体を発現した細胞において LoID 変異体の蛋白質発現レベルを調べた。

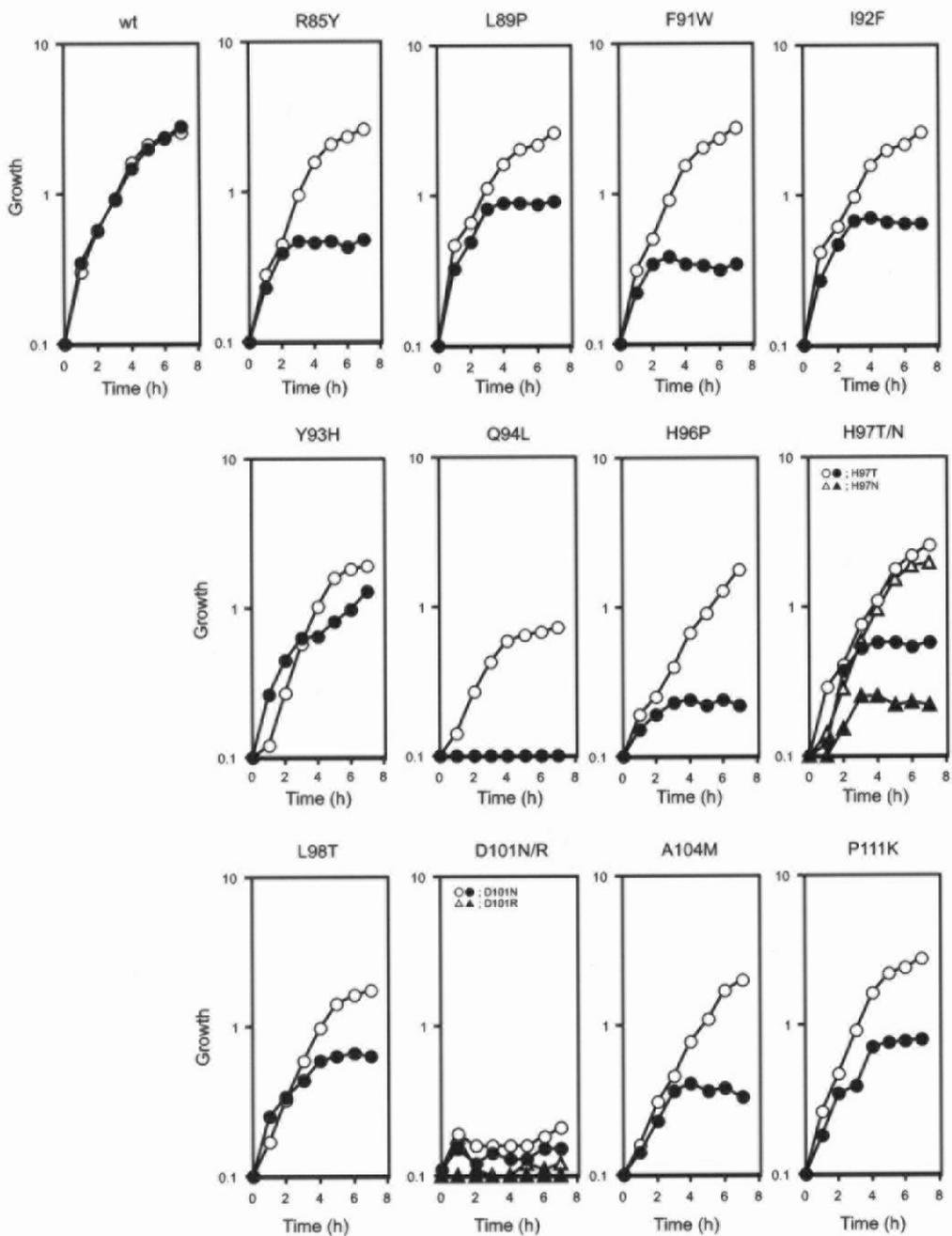


図20 変異 *LoiD* による生育阻害に対する *Lpp* の影響  
 JE5506 株および JE5505 株 (JE5506 株の *Lpp* を欠損させた株) で変異 *Ptac-LoiD<sub>H</sub>* を発現させて生育の違いを観察した。●および ▲ は JE5506 株、○および △ は JE5505 株を示す。

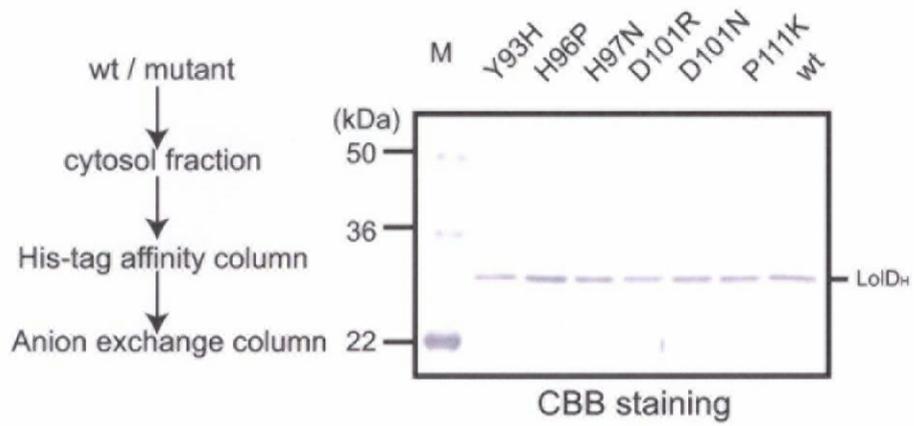
よび JE5505( $\Delta lpp$ ) 株いずれの株でもほとんど生育しなかったが、それ以外の変異体では、JE5505( $\Delta lpp$ ) 株の方が、JE5506 株に比べて生育が良好であった。以前の研究により、外膜リポ蛋白質が内膜に蓄積すると、菌は致死的影响を受けることが知られていた。したがって、JE5506 株で変異型 LolD<sub>H</sub>(m) を過剰発現させると主要外膜リポ蛋白質である Lpp ( $5 \times 10^5$  /cell) (Braun., 1975) が大量に内膜に蓄積するために菌の生育が悪くなり、一方で、JE5505( $\Delta lpp$ ) 株では、他のリポ蛋白質は内膜へ蓄積するものの Lpp が内膜に蓄積しないので、その分だけ菌の生育が回復するのではないかと考えている。なお、Lpp の有無にかかわらず、Lol システムによるリポ蛋白質の局在化は生育に必須であり、5 種類の Lol 因子のいずれの遺伝子を破壊しても致死的效果を示す。

### LolD<sub>H</sub> および LolCD<sub>H</sub>E 複合体の ATPase 活性

野生型 Ptac-*lolD<sub>H</sub>* あるいは変異型 Ptac-*lolD<sub>H</sub>* (*m*) を発現した大腸菌 DLP79-36 株( $\Delta lpp$ ) から細胞質画分を調製し、TALON カラムおよび MonoQ カラムを用いて野生型 LolD<sub>H</sub> および変異型 LolD<sub>H</sub>(m) 蛋白質を精製した (図 21-A)。全ての変異株 (26 種類) から蛋白質の精製を試みたが、可溶化蛋白質として十分回収されたのは 6 種の変異蛋白質 (Y93H, H96P, H97N, D101R, D101N, P111K) のみだった。精製した変異型 LolD<sub>H</sub>(m) 蛋白質の ATPase 活性を測定したところ、LolD モチーフの前半に位置する 3 つの変異体 (Y93H, H96P, H97N) では野生型 LolD<sub>H</sub> と同等の ATPase 活性を示し、LolD モチーフの後半に位置する残りの 3 つの変異体 (D101R, D101N, P111K) では野生型 LolD<sub>H</sub> の 2 分の 1 程度の活性を示した (図 21-B)。

野生型 PBAD-*lolCD<sub>H</sub>* あるいは 6 種の変異型 PBAD-*lolCD<sub>H</sub>* (*m*) を、Ptac-*lolE* と共に発現させた大腸菌 JM83 株の膜画分を、1% DDM および ATP 存在下で可溶化し、TALON カラムを用いて野生型 LolCD<sub>H</sub>E および変異型 LolCD<sub>H</sub>(m) E 蛋白質を精製した (図 22-A)。各々の精製標品を SDS-PAGE で分離して、CBB 染色で検出したところ、精製した変異型 LolCD<sub>H</sub>(m)E 複合体は、野生型 LolCD<sub>H</sub>E 複合体と同様のサブユニット構成比を有していた。このことは、変異型 LolCD<sub>H</sub>(m)E 複合体は野生型と同等の複合体形成能を持つことを示している。野生型 LolCD<sub>H</sub>E 複合体および変異型 LolCD<sub>H</sub>(m)E 複合体の ATPase 活性を測定したところ、野生型に比べて変異型では顕著に ATPase 活性が損なわれていた (図 22-B)。

A



B

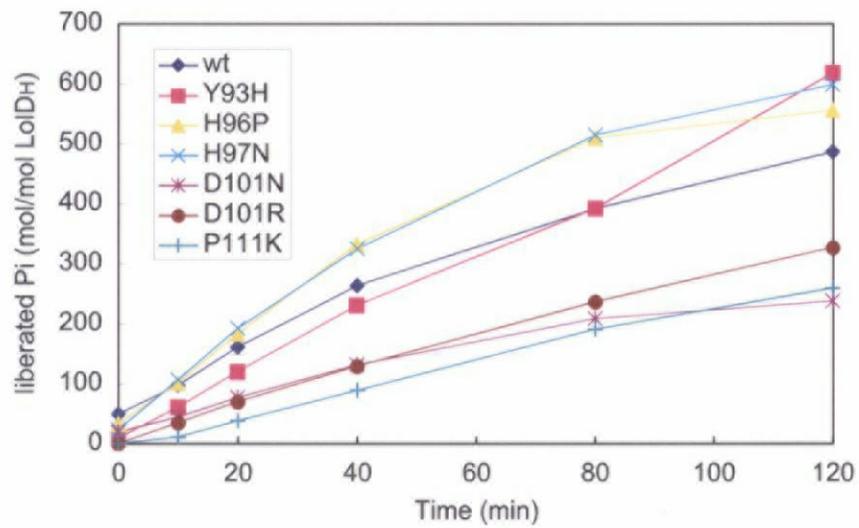
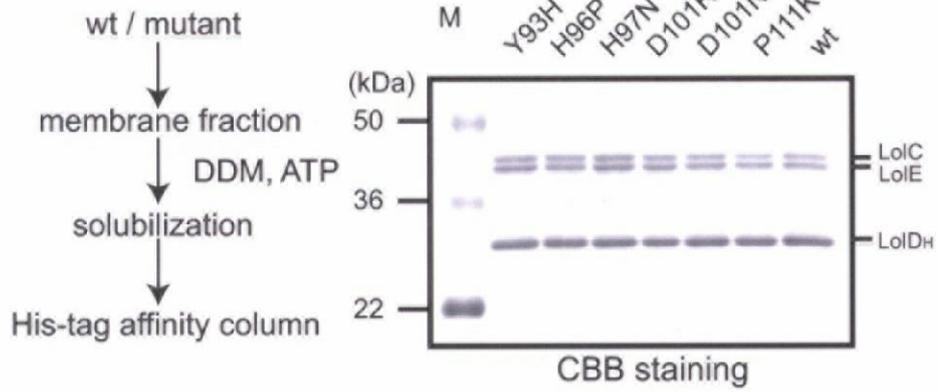


図21 野生型 LolDH および変異型 LolDH の精製および ATPase 活性  
 (A)野生型 LolDH および変異型 LolDH の精製。(B)野生型 LolDH および変異型 LolDH の ATPase 活性。

A



B

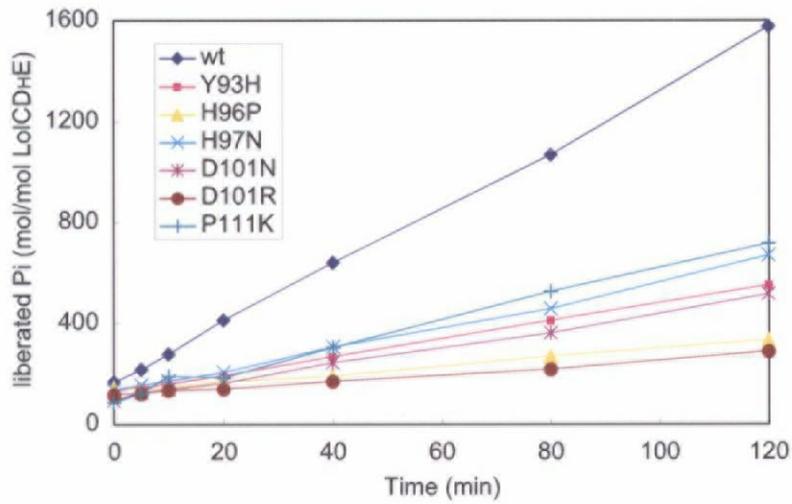


図22 野生型および変異型 LolCDHε の精製および ATPase 活性  
 (A) 野生型および変異型 LolCDHε の精製。(B) 野生型 LolCDHε および変異型 LolCDHε の ATPase 活性。

興味深いのは、3つの変異体（Y93H、H96P、H97N）において、単独 LolD<sub>H</sub> の ATPase 活性は野生型とほぼ同じであった（図 21-B）のに対し、複合体 LolCD<sub>H</sub>E の ATPase 活性では顕著な減少が観られた（図 22-B）ことである。本実験結果は、本モチーフが膜サブユニットと ATPase サブユニットとの相互作用に重要な領域であることを示唆している。

#### ATP 非存在下での LolD モチーフ変異体の複合体形成能

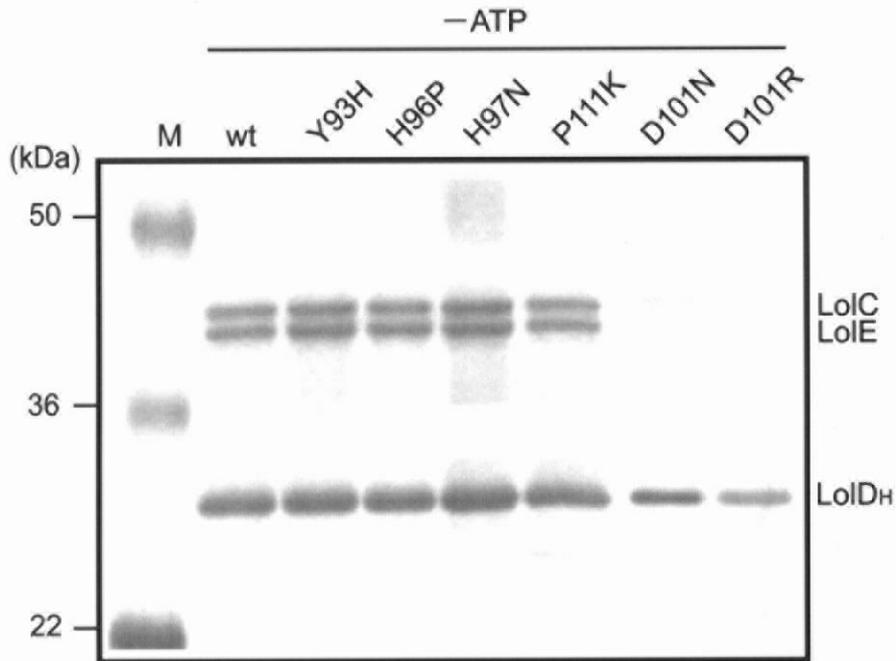
図 22-A で示したように、野生型および変異型 LolCD<sub>H</sub>E 複合体を 1% DDM および ATP 存在下で膜から可溶化し、TALON カラムを用いて精製すると、変異型は野生型と同様に精製された。一方で、野生型および変異型 LolCD<sub>H</sub>E 複合体を 1% DDM および ATP 非存在下で膜から可溶化して精製したところ、LolCD<sub>H</sub> (D101N) E および LolCD<sub>H</sub> (D101R) E は、LolC および LolE の大部分が LolD から解離していた（図 23-A）。LolCD<sub>H</sub>E、LolCD<sub>H</sub> (D101N) E 或いは LolCD<sub>H</sub> (D101R) E を過剰発現させた大腸菌から調製した膜画分には、いずれも同程度の LolC および LolE が検出されたので、LolCD<sub>H</sub> (D101N) E および LolCD<sub>H</sub> (D101R) E の LolC および LolE は、ATP 非存在下での膜の可溶化、精製のステップで LolD から解離したのであろう。以上の結果は、101 番目のアスパラギン酸の変異により、LolCD<sub>H</sub>E の安定な複合体形成に ATP が必要となったことを示している。

また、±ATP で精製した各々の変異型 LolCD<sub>H</sub>E は野生型 LolCD<sub>H</sub>E と同様に、-ATP 条件では (D101N および D101R 変異体を除く) 基質と結合しており、+ATP 条件では基質を解離していた（図 23-B）。本結果は、LolD モチーフが基質との結合および解離には関与していないことを示唆している。しかしながら、本実験では、①基質との結合、②基質と結合した LolCDE における ATP との親和性、および③ATP と結合した LolCDE における基質との親和性をさらに詳細に決定していない。本モチーフが、これらの各反応に全く関与していないかどうかは今後の興味ある研究課題である。

#### LolCD<sub>H</sub>(H96P)E のリポ蛋白質遊離活性

取得した変異体の中で、H96P は、単独 LolD<sub>H</sub> の ATPase 活性は野生型とほぼ同じであるの

A



B

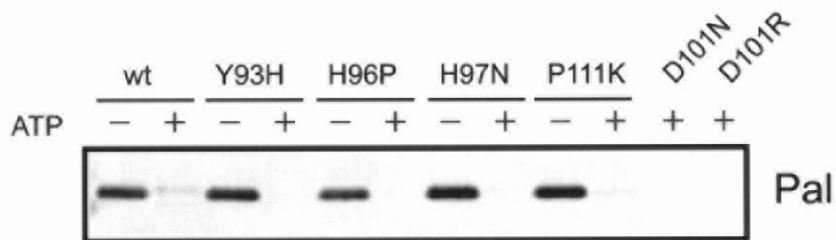


図23 ATP 非存在での LolD モチーフ変異体の複合体形成能

(A) ATP 非存在下で精製したときの野生型および変異型 LolCD<sub>H</sub>E 複合体形成能。(B) ± ATP 条件下で調製した野生型および変異型 LolCD<sub>H</sub>E 精製標品に対して、抗 Pal 抗体を用いたイムノブロットティングを行った。LolCD<sub>H</sub>(D101N)E および LolCD<sub>H</sub>(D101R)E については、+ATP の結果のみを示した。

に対し (図 21-B)、複合体 LolCD<sub>H</sub>E の ATPase 活性は変異体の中でもっとも低いという興味ある性質を有していた (図 22-B)。そこで、LolCD<sub>H</sub>(H96P)E によるリポ蛋白質遊離活性を測定し、野生型 LolCD<sub>H</sub>E と比較した (図 24)。各々10 秒、10 分、20 分間の遊離反応を行ったところ、両方とも LolA に依存したリポ蛋白質遊離活性は見出されたが、LolCD<sub>H</sub>(H96P)E では効率が著しく低下していた。このことは、LolCD<sub>H</sub>(H96P)E がリポ蛋白質を膜から遊離する機能を損なっていることを示している。

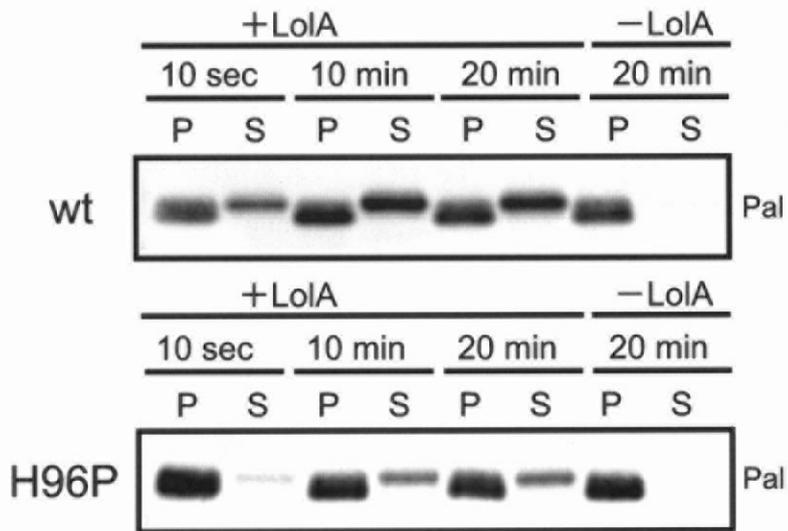


図24 LolCD<sub>H</sub>(H96P)E 変異体のリポ蛋白質遊離活性  
 野生型 LolCD<sub>H</sub>E と変異型 LolCD<sub>H</sub>(H96P)E を±LoIA 条件下において 30 °C で 10 秒、10 分、20 分間のリポ蛋白質遊離反応を行い、抗 Pal 抗体を用いたイムノプロットングを行った。