

## 外膜形成に関わるメタロプロテアーゼ BepA の構造と機能

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科

大矢 康太、宮崎 亮次、甲賀 栄貴、塚崎 智也

Structure and function of the metalloprotease BepA involved in outer membrane protein biogenesis

Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology

Kota Oya, Ryoji Miyazaki, Hidetaka Kohga, Tomoya Tsukazaki

(投稿日 2025/10/19、再投稿日 2025/12/4、受理日 2025/12/10)

キーワード : BepA、LptD、BAM 複合体、AlphaFold

### 概要

グラム陰性細菌の外膜は、細胞の環境適応や抗菌薬耐性に重要な構造であり、外膜タンパク質は BAM ( $\beta$ -barrel assembly machinery) 複合体によって組み込まれる。この過程の品質管理に、亜鉛メタロプロテアーゼ BepA が中心的な役割を果たす。BepA は基質である外膜タンパク質 LptD の成熟を促進するとともに、その異常中間体を分解する二重機能を有する。本稿では、結晶構造解析・機能解析および AlphaFold による構造予測の知見を基に、BepA による LptD 品質管理機構を概説した。BepA は、活性部位を覆う  $\alpha$ 6-loop、H246 を介した“His スイッチ”、基質認識に関与するエッジストランドなどの可動領域を協調的に制御し、機能を切り替えると考えられる。これらの構造変化が活性部位の露出や基質アクセス制御に関与することが示唆された。BepA の構造変化と機能切り替えの理解は、外膜形成および外膜タンパク質品質管理の全体像の解明に寄与すると期待される。

### 1. はじめに

大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌の表層は、内膜 (IM: Inner Membrane) と外膜 (OM: Outer Membrane) の二重の生体膜およびそれらの間に存在するペリプラズム空間から構成される (1)。ペリプラズムには細胞骨格としてペプチドグリカン層が敷き詰められており、この構造は細菌の環境適応や形状維持に重要である (1)。さらに OM は、抗生物質などの有害化合物から細胞内部を保護する重要なバリア機能を担っている (2)。

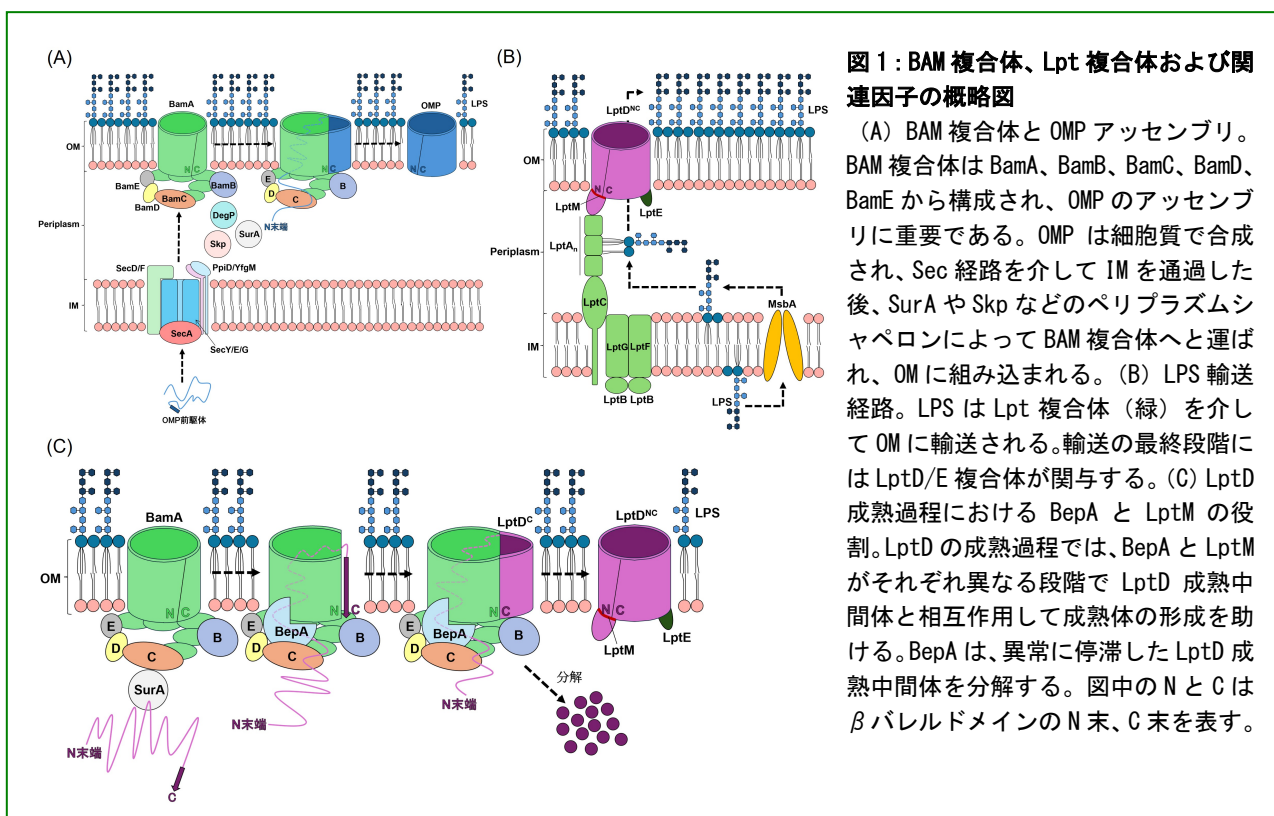
OM の機能発現には、 $\beta$  バレル構造を有する外膜タンパク質 (OMP: Outer Membrane Protein) および OM 外葉に局在するリポ多糖 (LPS: Lipopolysaccharide) が中心的な役割を果たしている (3)。 $\beta$  バレル構造をもつ OMP が適切にフォールディングされ、機能的な  $\beta$  バレルを形成しながら OM へ正しく組み込まれる過程には、BAM ( $\beta$ -barrel assembly machinery) 複合体が中心的な役割を果たす (図 1A) (4)。BAM 複合体は、生物種を超えて保存された  $\beta$  バレル型 OMP である BamA と、リポタンパク質 BamB、BamC、BamD、BamE から構成される (4)。OMP 前駆体は細胞質で合成されたのち、アンフォールド状態を保ったまま SecY/E/G トランスロコン、SecA、SecD/F 複合体 (5)、PpiD/YfgM 複合体 (6) など

して IM を通過する (図 1A)。その後、SurA、DegP、Skp などのペリプラズムシャペロンによって BAM 複合体へ運ばれ、アッセムブリを経て成熟体となる (図 1A) (7)。

LPS は IM の細胞質側で合成され、MsbA によって IM 外葉へ輸送される (3)。IM から OM までの LPS 輸送は、Lpt タンパク質群から構成される Lpt (LPS transport) 複合体が担う (図 1B、緑) (3)。最終段階では、OMP である LptD/E 複合体 (8) が関与し、LPS を OM 外葉へと輸送する (図 1B)。LptD も  $\beta$  バレル型 OMP であり、その成熟過程は詳細に解析されている。まず、LptD 成熟中間体 ( $LptD^C$ ) が形成され、BAM 複合体上でアッセムブリが進行するにつれて LptE と相互作用し、成熟型 LptD ( $LptD^{NC}$ ) へと変換される (8-10)。この LptD の成熟過程には、亜鉛メタロプロテアーゼ BepA が関与することが明らかとなってきた (図 1C) (11)。さらに、BepA が作用した後の段階で、OM リポタンパク質 LptM が LptD/E 複合体と相互作用し、安定な成熟体である LptD/E/M 複合体を形成する (図 1C) (12)。

BepA は M48 メタロプロテアーゼファミリーに属する亜鉛メタロプロテアーゼであり、OMP の品質管理に重要な役割を果たす (11)。BepA は BAM 複合体近傍で LptD 成熟中間体と相互作用し、分子シャペロンのようにその適切な成熟を促進する一方で、BAM 複合体上で異常に停滞した LptD 成熟中間体は分解・除去する (図 1C) (11, 13)。しかしながら、BepA がどのように LptD を認識し、どのようなメカニズムでシャペロン機能とプロテアーゼ機能を切り替えているのかは、いまだ明らかでない。

本稿では、これまでに報告された BepA に関する研究を概説し、BepA による LptD 成熟中間体の認識および品質管理機構について考察する。さらに、AlphaFold3 による構造予測を活用し、BepA の機能切り替えに関与する構造変化に着目して、基質認識機構についても議論する。



## 2. BepAの全体構造と活性部位

BepA は、N 末領域側のプロテアーゼドメインと C 末領域側のテトラトリコペプチドリピート (TPR) ドメインから構成されるタンパク質である (図 2A、B)。大腸菌由来 BepA については、これまでに TPR ドメイン単独構造 (PDB ID: 5XI8) および全長 BepA の結晶構造 (PDB ID: 6AIT、6SAR) が報告されており (14-16)、これらの結晶構造解析に基づき、プロテアーゼドメイン (D28-G288) と TPR ドメイン (V305-M487) が  $\alpha$  ヘリックス ( $\alpha 12$ ) によって連結されていることが明らかにされている (図 2A、B) (15)。これらの立体構造情報は、BepA が OMP の品質管理を担うプロテアーゼ/シャペロンとしての機能や、基質認識の分子機構を理解する上で重要な手がかりを提供してきた。

C 末領域側の TPR ドメインは、10 本の逆平行  $\alpha$  ヘリックス (H1-H10) から構成される (図 2A、B) (15)。この TPR ドメインは、BAM 複合体構成因子である BamA、BamC、BamD に加えて、LptD と相互作用することが部位特異的光架橋解析により示されている (14)。特に、TPR ドメイン中の F404 残基は BamA および LptD との相互作用部位として同定されており、この残基の変異により LptD の成熟促進および分解といった BepA 機能の低下が報告されている (14)。さらに、TPR ドメイン内部には負に帯電した親水性の凹み (Pocket) が存在する (図 2D) (15)。Pocket からは、活性部位近傍へ (図 2D 左では上方向へ) と通じる負電荷を帯びた溝が形成されている (図 2D) (15)。Shahrizal らは、プロテアーゼドメインの  $\alpha 2$  ヘリックス上に位置する D69、H1 ヘリックス上の E321、H3 ヘリックス上の D347 および D351、さらに H6-H7 ループ上の D408 および D409 といった酸性残基が Pocket に存在し、基質中の正電荷を帯びた領域との相互作用に関与する可能性を指摘している (15)。さらに Bryant らは、Pocket に加え、プロテアーゼドメイン近傍に存在する正電荷を帯びた Cavity の存在を示した (図 2D 右) (16)。また、Pocket に位置する  $\alpha 11$  ヘリックス上の R280 および H3 ヘリックス上の D347、ならびに Cavity に位置する H10 ヘリックス上の R466 および R470 に変異を導入すると、BepA による OM バリア機能の維持とプロテアーゼ機能が低下すると報告されている (16)。これらの結果から、TPR ドメインを介した BAM 複合体および LptD との相互作用が、BepA による LptD の品質管理に重要な役割を果たしていると考えられる。

N 末領域側のプロテアーゼドメインは、11 本の  $\alpha$  ヘリックス ( $\alpha 1$ - $\alpha 11$ ) および 3 本の  $\beta$  ストランド ( $\beta 1$ - $\beta 3$ ) から構成される (図 2A、B) (15)。活性部位には亜鉛イオンが存在し、亜鉛メタロプロテアーゼに保存された HEXXH モチーフ中の H136 および H140 に加え、 $\alpha 7$  ヘリックス上の E201 が亜鉛イオンに配位している (15, 16)。一般的な亜鉛メタロプロテアーゼでは、亜鉛イオンは 3 つのアミノ酸残基と 1 つの水分子によって配位されるが、BepA では水分子の代わりに  $\alpha 9$ -loop (P239-P247) 内の His-246 が配位している (図 2C) (15-17)。通常、この水分子は近くの Glu 残基によって極性化され求核性が高まり、基質ペプチド結合のカルボニル炭素を攻撃することで加水分解反応が起こる (18)。そのため、BepA の結晶構造は、基質が活性部位にアクセスできない「不活性型」を示している (図 2A、C) (15, 16)。この構造により、BepA は基質の状態にかかわらず無秩序な分解を起こさないよう自己抑制されている。H246 はこの抑制機構の中心であり、プロテアーゼ活性の ON/OFF を切り替える“His スイッチ”として機能するとされている (17)。実際、H246 変異体や H246 を含む  $\alpha 9$ -loop 領域を欠失した変異体 ( $\Delta \alpha 9$ ) では、BepA のプロテアーゼ活性が異常に亢進し、正常にアセンブリされた LptD 成熟中間体さえも分解された (17)。これら

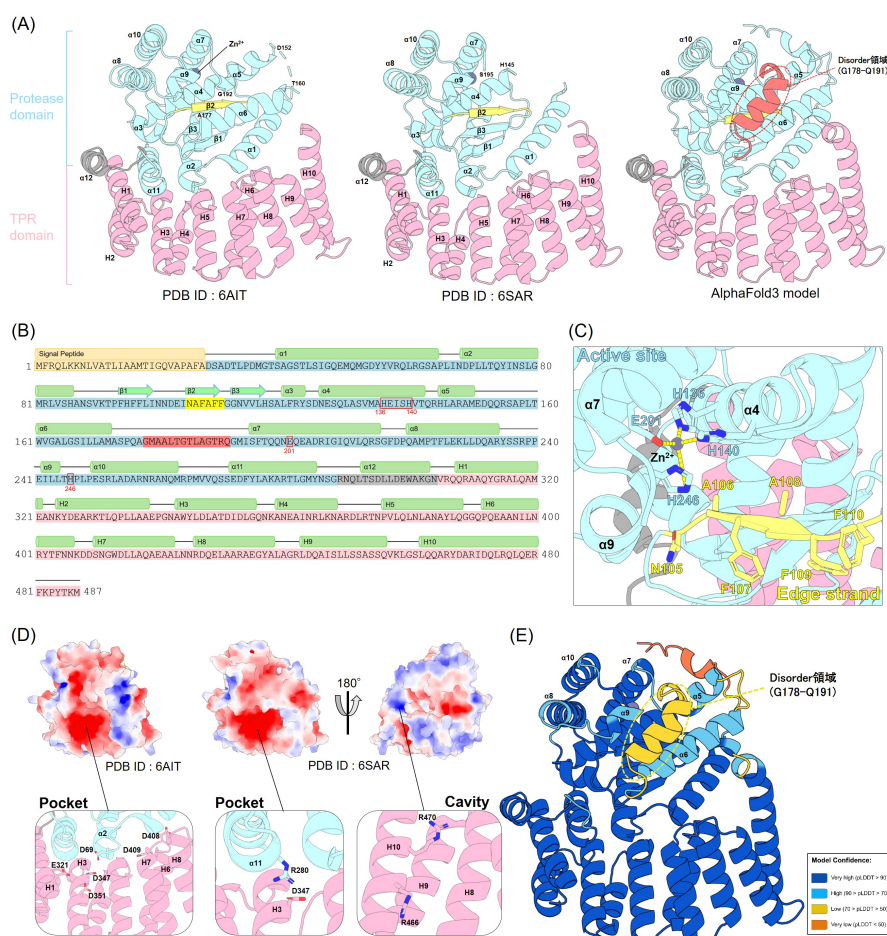


図 2 : BepA の構造

(A) BepA の結晶構造と AlphaFold3 による予測構造。プロテアーゼドメインをシアン、TPR ドメインをピンクで示す。両ドメイン間の  $\alpha 12$  ヘリックスはグレーで示した。活性部位の亜鉛イオンは、グレーの球で示した。AlphaFold3 モデルでは、結晶構造解析でモデル化されていない  $\alpha 6$ - $\alpha 7$  間領域 (G178-Q191) が、活性部位を覆う形で予測された (赤)。(B) BepA のアミノ酸配列。 $\alpha$ ヘリックス構造の領域を  $\alpha 1$ -12 および H1-10 で、 $\beta$ ストランドの領域を  $\beta 1$ -3 で示した。HEXXH モチーフおよび、亜鉛イオンに配位するアミノ酸残基 (H136、H140、E201、H246) を赤枠で表示した。 $\beta 2$ ストランド(エッジストランド)は黄色で示し、活性部位の蓋と予測される Disorder 領域は赤色で示した。(C) 活性部位周辺の構造 (PDB ID: 6SAR)。亜鉛イオン (グレーの球) に、H136、H140、E201、H246 が配位している。 $\beta 2$ ストランド (エッジストランド) を黄色で示した。(D) TPR ドメインの表面静電ポテンシャルマップ。表面は静電ポテンシャルに基づいて着色しており、赤は負に帯電した領域、青は正に帯電した領域を示す。左と中央の図は、(A) と同じ向きから見た構造である。結晶構造 (PDB ID: 6AIT および 6SAR) では、TPR ドメイン内に負に帯電した Pocket およびプロテアーゼドメイン側に開口する溝が存在する。中央の図を 180 度回転させた右図では、正に帯電した Cavity が見られる。拡大図は、それぞれの領域に含まれる特徴的な親水性残基の側鎖を示した。(E) AlphaFold3 予測構造。BepA の pLDDT スコアを色分け表示して示した。

の結果は、H246 を含む構造変化により BepA が基質の状態に応じた活性制御を行うことを強く示唆している。

BepA のプロテアーゼ機能とシャペロン機能の双方に関与する要素として、活性部位に隣接する「エッジストランド」と呼ばれる  $\beta 2$  ストランドがある (図 2A-C) (13)。このエッジストランドは LptD 成熟中間体と直接相互作用し、BepA の両機能に関与することが報告されている (13)。Miyazaki らは、この領域を構成する残基 N105-F109 の変異体で、LptD



に対する分解活性および成熟促進機能のいずれもが低下することを示し、この領域の二次構造が機能発現に重要であることを明らかにした (13)。さらに、部位特異的光架橋およびジスルフィド架橋解析により、BepA のエッジストランドが LptD の  $\beta$  バレル形成ドメイン N 末領域にある Y331 残基と直接接触することが示された (13)。また、BepA が BAM 複合体上でアセンブリ途上の LptD 成熟中間体と相互作用することも明らかとなり、BepA が LptD の成熟段階に応じて認識を切り替えている可能性が示唆される (13)。

BepA の結晶構造 (PDB ID: 6AIT および 6SAR) には、モデル化されていない Disorder 領域が存在する (15, 16)。6AIT 構造では  $\alpha 5$ - $\alpha 6$  間 (Q153-L159) および  $\alpha 6$ - $\alpha 7$  間 (G178-Q191) に対応する電子密度が観測されず、これらの領域はモデル化されていない (図 2A 左)

(15)。一方、6SAR 構造ではさらに広範囲の残基 L146-I194 がモデル化されていない (図 2A 中央) (16)。 $\alpha 6$ - $\alpha 7$  間の Disorder 領域および  $\alpha 6$  ヘリックスを含む  $\alpha 6$ -loop (W161-I194) 領域は、活性部位を覆う位置にあると推定されるが、高い柔軟性のため電子密度が観測されなかったと考えられる。

近年、AlphaFold をはじめとする AI によるタンパク質立体構造予測ツールが構造生物学で重要な役割を果たしている (19-22)。筆者らは、BepA の結晶構造 (6AIT, 6SAR) でモデル化されなかった Disorder 領域を補うため、AlphaFold3 (<https://alphafoldserver.com/>) を用いて BepA 単体の構造予測を行った (図 2A 右、E)。予測構造では、 $\alpha 6$ -loop 領域が  $\alpha$  ヘリックス構造をとり、活性部位およびエッジストランドを覆う位置にあることが示された (図 2A 右、E)。しかし、構造信頼度を示す pLDDT (predicted Local Distance Difference Test) スコアは低く (図 2E)、一定の構造をとっていないと考えられる。BepA のプロテアーゼ活性は、H246 による化学的制御に加え、 $\alpha 6$ -loop 領域が活性部位へのアクセスを物理的に阻害する“活性部位の蓋”として機能することで、基質アクセスやプロテアーゼ活性を調節している可能性が示唆される (15-17)。

### 3. BepA の構造変化についての考察

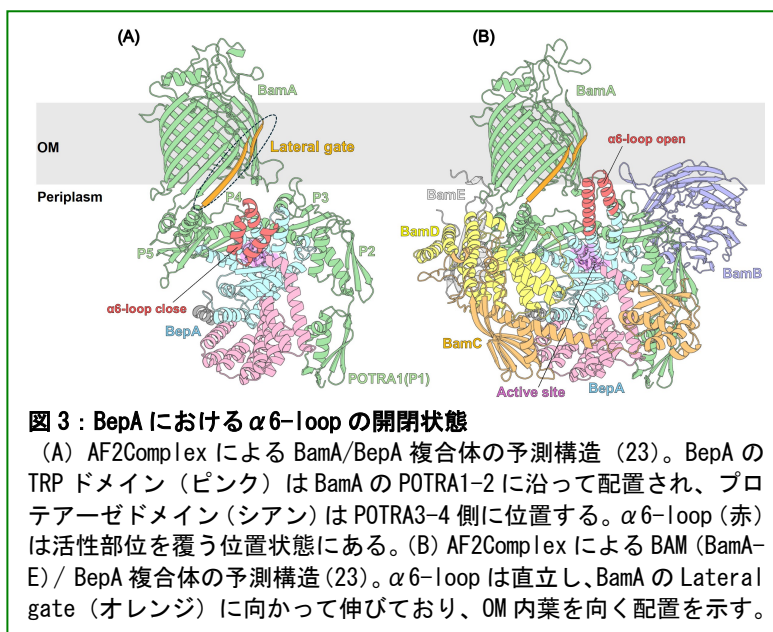
BAM 複合体による LptD の膜組み込み過程において、BepA は LptD の構造状態に応じて成熟促進あるいは分解を担う (13)。この機能の切り替えは、2 章で述べた複数の領域が協調的に構造変化を起こすことによって実現されることが考えられる。特に、(i) 活性部位を覆う  $\alpha 6$ -loop、(ii) H246 が関与する His スイッチ、(iii) 基質と相互作用するエッジストランドの三つの領域が重要である。本章では、このうち (i) 活性部位を覆う  $\alpha 6$ -loop および (ii) H246 が関与する His スイッチに焦点を当て、AlphaFold による構造予測を考慮しつつ、それぞれの領域が果たす役割について考察する。

#### 3.1. $\alpha 6$ -loop の開放による活性部位の露出

$\alpha 6$ -loop は BepA の活性部位を覆い、基質のアクセスを制御する「活性部位の蓋」として機能すると考えられている (図 2A 右) (13, 15)。結晶構造ではこの領域に関する十分な構造が得られていないものの、AlphaFold は構造未決定の柔軟性の高い領域について予測が可能であり (19, 20)、BepA に関しては Gao らの研究が興味深い結果を示している (23)。

Gao らは AF2Complex を用いて BamA/BepA 複合体および BAM (BamA-E) /BepA 複合体モデルを予測し、結晶構造で未モデル化であった領域を“active-site lid”と定義して、その開閉状態を評価した (図 3) (23)。この“active-site lid”は、本稿で定義する  $\alpha 6$ -loop に相当する領域である。これらの予測構造において、BepA はいずれのモデルでも BamA の

POTRA1-5 (P1-P5) 領域と近接しており、TPR ドメインは POTRA1-2 に沿って、プロテアーゼドメインは POTRA3-4 に沿って位置していた (図 3)。BamA/BepA 複合体モデルでは、 $\alpha$ 6-loop は活性部位を覆っていたのに対し (図 3A)、BAM/BepA 複合体モデルでは  $\alpha$ 6-loop が開いて活性部位が露出した構造が予測された (図 3B)。この「開いた」状態では、 $\alpha$ 6-loop が直立し、BamA の Lateral gate に沿うような位置をとり、OM 内葉へ差し込まれるような配置をしていた (図 3B)。これらの結果から Gao らは、BepA の基質認識において、通常は  $\alpha$ 6-loop が活性部位を覆うことで不要な分解を防ぐ一方、基質のフォールディングが停滞した場合には  $\alpha$ 6-loop が開いて活性部位を露出させ、基質分解を誘導するという仮説を提唱している。



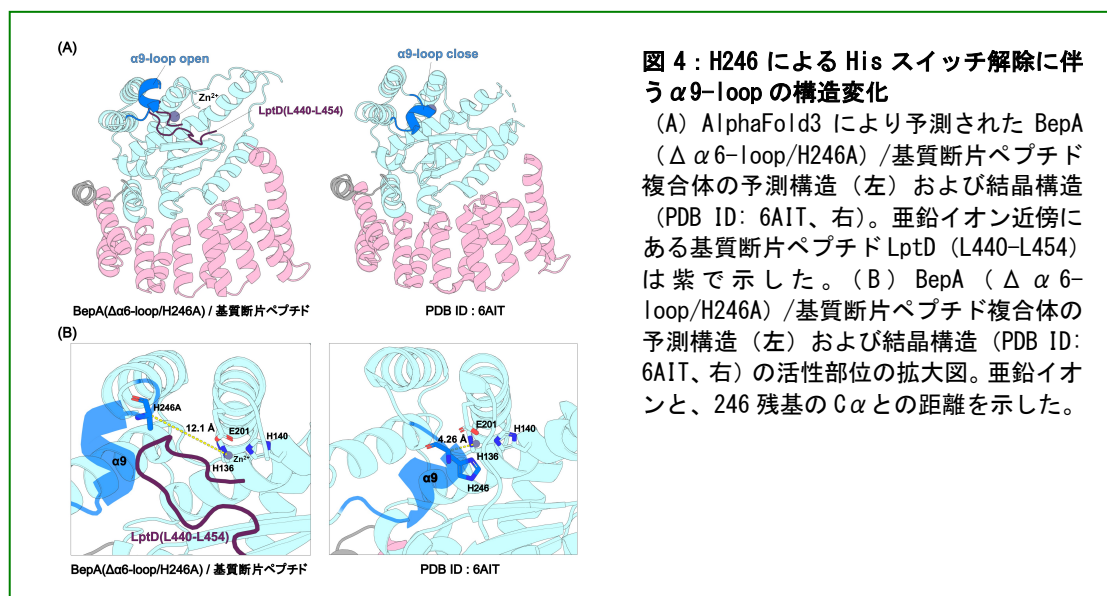
### 3.2. H246によるHisスイッチ解除と $\alpha$ 9-loopの構造変化の可能性

2 章で述べたように、H246 は第 4 配位子として亜鉛イオンに結合し、“His スイッチ”として機能すると考えられている (図 2C) (17)。本節では、この His スイッチがどのように解除されるのかを考察するため、AlphaFold3 を用いた構造予測により  $\alpha$ 9-loop の構造変化を解析した。

BepA のスイッチ解除状態を模倣するため、 $\alpha$ 9-loop 上の H246 をアラニンに置換し、亜鉛イオンとの配位を阻害した。また、基質アクセスを容易にするため、活性部位の蓋として機能するとされる  $\alpha$ 6-loop を削除した。これらの変異を組み合わせた BepA ( $\Delta$   $\alpha$ 6-loop/H246A) と基質断片ペプチドとの複合体を AlphaFold3 により予測した。用いた基質断片ペプチドは、LptD の  $\beta$  バレルドメインの配列 (I230-L784) を N 末端側から 15 残基ごとに分割した 37 種類のペプチドである。

その結果、結晶構造 (PDB ID: 6AIT) の BepA と比較して、 $\alpha$ 9-loop が外側に移動した構造がいくつか予測された (図 4A, B)。図 4 は、Miyazaki らによって BepA との相互作用が報告された LptD 領域 (L440-L454) を基質とした予測構造の一例であり (13)、その中でも最も大きく  $\alpha$ 9-loop が移動した構造を示している。予測したすべての構造について、活性部位中心に存在する亜鉛イオンと 246 残基の C $\alpha$  原子との距離を測定したところ、距離は 3.83-14.0 Å の範囲にあり、中央値は 7.20 Å であった。結晶構造ではこの距離が 4.26 Å であるため、変異体の導入により  $\alpha$ 9-loop が外側へ移動し、亜鉛イオン近傍への基質アクセスが容易になったと考えられる。また、多くの複合体予測では pLDDT 値が低いものの、図 4A に示すように亜鉛イオン近傍に断片ペプチドが位置していた。これらの結果から、 $\alpha$ 9-loop の構造変化が亜鉛イオンを露出させ、基質ペプチドの分解を可能にするために重要であると考えられる。さらに、BepA が BAM 複合体や基質と相互作用することで  $\alpha$ 9-loop

の動きを促進し得ることから (13, 17)、AlphaFold による予測は基質依存的な構造変化の一部を再現している可能性がある。今後は、どのような条件で  $\alpha 9$ -loop の開放が誘導され得るのかを詳細に検討する必要がある。



#### 4. BepA による LptD 品質管理モデル

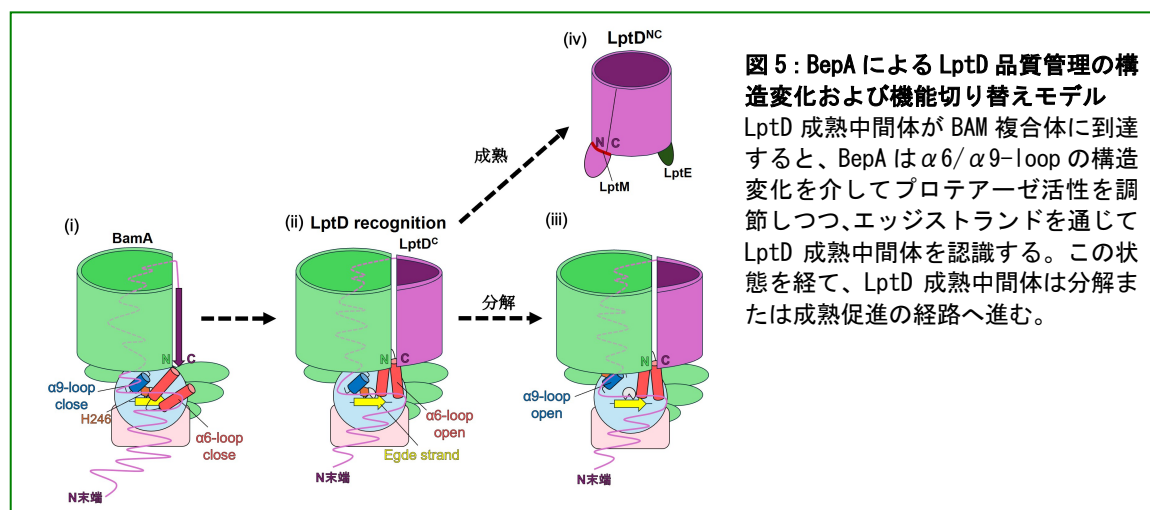
BepA による LptD の品質管理機構は、結晶構造解析と機能解析、さらに AlphaFold を用いた構造予測により、複数の領域が連携して LptD の成熟促進と分解を担うことが明らかになってきた (11, 13, 15, 17, 23)。また、LptD の品質管理には、前期に DegP、中期に YcaL、後期に BepA が関与することが報告されている (24)。本節では、これまでに報告された知見ならびに筆者らが行った AlphaFold3 による構造予測の結果を統合し、BepA による LptD 品質管理モデルを示す (図 5)。

未成熟 LptD が BAM 複合体に到達した段階では、(i) BepA は H246 が亜鉛イオンに配位した抑制状態にあり、活性部位は  $\alpha 6$ -loop によって覆われている (13, 17)。このとき BepA は不要な分解を行わず、LptD の成熟過程を監視していると考えられる (13, 17)。(ii) BAM 複合体あるいは基質からのシグナルにより  $\alpha 6$ -loop が開放すると、エッジストランドおよび活性部位が露出し、エッジストランドを介して LptD 成熟中間体を認識する (13)。正常な LptD の成熟が進行すると、LptD 成熟中間体は BepA から解離する (13)。一方で、正常に成熟できない異常 LptD が BAM/BepA 上で停滞する場合には、(iii)  $\alpha 9$ -loop 内の H246 が亜鉛イオンから外れて His スイッチが解除され、LptD 成熟中間体は分解に導かれる (17)。BepA による選別を経た LptD 成熟中間体は、(iv) LptE と複合体を形成する (11, 13)。LptE は LptD 成熟中間体の  $\beta$  バレル内部に収まり、その折りたたみおよび構造安定化に関与することで、複合体の成熟を完成させる (8-10)。形成された LptD/E 複合体は BamA から OM へと放出され、その後、OM リポタンパク質 LptM が結合し、複合体のさらなる安定化に関与する (12)。

これまで述べてきたように、BepA は LptD および BAM 複合体と連携し、OM 形成の品質管理を担っている。先行研究から、BepA は OM の恒常性維持に寄与し、その機能不全変異株



では抗菌薬感受性が上昇することが報告されている (11)。したがって、BepA は OM の透過障壁を制御する調節因子として、有望な創薬ターゲットの候補である。構造予測で示されたモデルを手がかりに、BepA が BAM 複合体および LptD 成熟中間体とどのように相互作用し、どのように構造変化と機能切り替えを行うのかを明らかにすることは、今後の重要な課題である。本稿で紹介した BepA に関する知見が、BepA のみならず、OM および OMP の生合成機構全体の理解を深める一助となれば幸いである。



## 参考文献

- 1) Miller, S. I. & Salama, N. R., *PLoS Biol.*, **16**, e2004935 (2018)
- 2) Nikaido, H., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **67**, 593-656 (2003)
- 3) Sperandio, P., et al., *J. Biol. Chem.*, **292**, 17981-17990 (2017)
- 4) Diederichs, K. A., et al., *J. Mol. Biol.*, **433**, 166894 (2021)
- 5) Tsukazaki, T., *FEMS Microbiol. Lett.*, **365**, fny112 (2018)
- 6) Miyazaki, R., et al., *J. Biol. Chem.*, **298**, 102572 (2022)
- 7) Combs, A. N. & Silhavy, T. J., *Annu. Rev. Microbiol.*, **78**, 191-211 (2024)
- 8) Qiao, S., et al., *Nature*, **511**, 108-111 (2014)
- 9) Chng, S.-S., et al., *Science*, **337**, 1665-1668 (2012)
- 10) Chimalakonda, G., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 2492-2497 (2011)
- 11) Narita, S., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, E3612-E3621 (2013)
- 12) Miyazaki, R., et al., *Cell Rep.*, **44**, 116013 (2025)
- 13) Miyazaki, R., et al., *eLife*, **10**, e70541 (2021)
- 14) Daimon, Y., et al., *Mol. Microbiol.*, **106**, 760-776 (2017)
- 15) Shahrizal, M., et al., *J. Mol. Biol.*, **431**, 625-635 (2019)
- 16) Bryant, J. A., et al., *J. Bacteriol.*, **203**, e00434-20 (2020)
- 17) Daimon, Y., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 27989-27996 (2020)
- 18) Klein, T., et al., *Chem. Rev.*, **118**, 1137-1168 (2018)
- 19) Jumper, J., et al., *Nature*, **596**, 583-589 (2021)
- 20) Abramson, J., et al., *Nature*, **630**, 493-500 (2024)



- 21) Chai Discovery Team, *bioRxiv*, 2024.10.10.615955 (2024)
- 22) Passaro, S., et al., *bioRxiv*, 2025.06.14.659707 (2025)
- 23) Gao, M., et al., *eLife*, **11**, e82885 (2022)
- 24) Soltes, G. R., et al., *J. Bacteriol.*, **199**, e00418-17 (2017)



このコンテンツはクリエイティブ・コモンズ 表示 - 非営利 - 改変禁止 4.0国際 ライセンスの下に提供されています。

© 日本蛋白質科学会 2025 Licensed under クリエイティブ・コモンズ 表示 - 非営利 - 改変禁止 4.0国際 ライセンス