

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 永 森 收 志

大腸菌における分泌蛋白質の細胞質膜透過は Sec 因子から構成される膜透過装置によって行われる。ATPaseである SecAはATPの結合により膜に深く挿入し、SecYEG複合体が形成するチャンネルに前駆体蛋白質を送り込み、ATP加水分解によって膜から脱離する。この挿入・脱離サイクルの繰り返しが、膜透過の駆動力と考えられている。本論文は、SecAサイクルに共役して膜内配向性が反転する SecGの膜内における構造とその変化を詳細に解析したものである。

序論は蛋白質膜透過機構についてのこれまでの知見を述べ、SecAやSecGの構造変化が果たす役割について論じている。また、SecGの構造変化を検出する方法の問題点について議論し、新しい検出方法を確立する重要性が指摘されている。

第1章では、膜内におけるSecGの詳細な配向性を決定するため、様々な位置にシステイン残基を一残基持つSecG変異体を18種構築し、SH基特異的の化学修飾試薬である*N*-ethylmaleimide (NEM) や4-acetamide-4'-maleimidylstibene-2,2'-disulfonic acid (AMS) によって化学修飾した結果が述べられている。NEMやAMSは、膜外に露出しているシステイン残基のみに反応し、NEMは膜を透過するがAMSは膜透過性が低いため、両試薬を用いると細胞質側とペリプラズム側のシステイン残基を区別することが出来る。その結果、膜透過反応非存在下におけるSecGは、提唱されているSecGの膜内配向性モデルと同じであることが明らかとなった。さらに、一番目と二番目の膜貫通領域の間で修飾試薬に対する感受性が異なることから、二つの膜貫通領域が膜透過装置内において異なった環境下に存在していることが明らかにされている。また、ジスルフィド結合によりホモ二量体を形成したSecGホモ二量体は、機能を保持しており、膜透過装置内に存在していることが示されている。次に、SecGの膜透過促進機能は、配向性の反転と密接に関係すると考えられているため、二量体が配向性を反転させるかが調べられている。膜透過反応を、ATPの非加水分解アナログであるAMP-PNPで止めると膜に挿入したSecAは安定化し、野生型SecGは配向性を反転させる。変異SecGの二量体もジスルフィド結合を保持した状態で、野生型同様に配向性が反転することが明らかにされている。

第2章では、SecGの配向性反転をシステイン特異的の化学修飾により解析することが試みられている。システイン残基をペリプラズム側に持つSecG変異体の反転膜小胞を還元後、AMSによるSecGの修飾を調べると、蛋白質膜透過反応に依存してAMSに修飾されたSecGの量が増加した。AMSの膜透過性は低いため、ペリプラズム側のシステイン残基が細胞質側に露出した結果、AMSで修飾されたことが強く示唆されている。様々な位置にシステイン残基を持つ変異体の反転膜小胞を用いて、AMS修飾実験を行った結果、ペリプラズムの変異体は、C末端の近くにシステイン残基を持つものほど、膜透過反応に依存

したAMSの修飾効率が上昇する事を示している。一方、細胞質側にシステイン残基を持つ変異体は、膜透過反応に依存して、修飾効率が若干低下したことを示している。細胞質にシステイン残基をもつ変異体のスフェロプラストを用いてAMSで修飾すると、蛋白質膜透過が進行している条件下でのみSecGが修飾された。細胞質側のシステイン残基がSecGの反転によってペリプラズム側に露出し、AMSにより修飾されることが明らかにされている。これらの結果から、AMSによる化学修飾を指標とした、SecGの配向性反転を検出する実験系が述べられている。

以上本論文は、SecGの膜内での詳細な構造と膜内配向性の反転を検出する新たな実験系を確立したものであり、学術上寄与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（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。