

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 榎 田 和 宏

大腸菌の外膜、および内膜にはリポ蛋白質と呼ばれるN末端のシステイン残基が脂質で修飾された蛋白質が存在している。脂質修飾されたシステイン残基の次がアスパラギン酸以外のアミノ酸残基であると、リポ蛋白質はペリプラズムのシャペロン蛋白質 LolA と可溶性の複合体を形成して内膜から遊離する。この遊離にはATPと内膜因子が必要である。本論文は、この内膜因子が3種の蛋白質からなるABCトランスポーターであることを明らかにし、これが関与するリポ蛋白質の選別と膜からの遊離機構について詳細に検討したものである。

序論ではリポ蛋白質の選別と外膜局在化機構に関するこれまでの知見が述べられている。結果の項は、内膜因子の同定について述べたものである。本研究の開始直前に、遺伝子量効果によってリポ蛋白質の遊離活性を上昇させる大腸菌染色体のDNA断片が得られていた。このDNA断片には7つの *orf* (Open Reading Frame) が見いだされていたので、リポ蛋白質の遊離活性に必要な *orf* を調べ、*ycfU*、*ycfV* および *ycfW* の3つであることを明らかにしている。これら3つの *orf* を運ぶプラスミドを保持する大腸菌の内膜画分からリポ蛋白質遊離活性を精製し、3つの蛋白質が1:2:1の複合体として含まれ、これらが *ycfU*、*ycfV* および *ycfW* の遺伝子産物であることを示し、それぞれ LolC、LolD、LolE 蛋白質と命名した。次に LolCDE 複合体の精製標品を用いた再構成実験から LolCDE によるリポ蛋白質の膜からの遊離は局在化シグナルに依存することが示された。この結果は再構成系で観察される LolCDE によるリポ蛋白質の膜からの遊離が *in vivo* を反映した現象であることを示している。

LolD 蛋白質はABC (ATP Binding Cassette) トランスポーターのATPaseサブユニットに特異的に見られるWalkerモチーフとABCトランスポーターモチーフをもっている。また、LolCとLolEは内膜の尿素処理では可溶化しないことから膜内在性蛋白質であると考えられた。これらのサブユニット構成から LolCDE 複合体は典型的な細菌型ABCトランスポーターであると考えられた。既知のABCトランスポーターは脂質2重層を越えた物質の輸送を担うと考えられている。一方、LolCDEは膜表面にアンカーしているリポ蛋白質を膜から遊離させるABCトランスポーターであると思われた。そこで LolCDE を再構成したプロテオリポソームの外側表面にのみリポ蛋白質を配向させて遊離反応を調べた。リポ蛋白質は LolA に依存して遊離したことから、LolCDEは膜表面に存在するリポ蛋白質を膜から遊離させる新しいタイプのABCトランスポーターであると結論した。

リポ蛋白質の膜からの遊離における局在化シグナル認識機構を理解するために、外膜局在化シグナルをもつリポ蛋白質の遊離が他のリポ蛋白質によってどのように影響されるかを調べ、内膜局在化シグナルをもつリポ蛋白質が LolCDE/LolA の基質にはならないことを明らかにした。次に LolCDE の

ATPase 活性に対する局在化シグナルの影響を調べ、ATPase 活性は外膜局在化シグナルを持つリポ蛋白質では促進されるが、内膜局在化シグナルを持つリポ蛋白質によっては促進されないことを見いだした。これらの結果により、リポ蛋白質の外膜局在化シグナルを直接認識しているのは LolCDE 複合体であること、また内膜局在化シグナルをもつリポ蛋白質は、LolCDE の基質にならないため内膜にとどまることを明らかにした。

以上、本論文はリポ蛋白質の選別と膜からの遊離を司る新しいタイプの ABC トランスポーター LolCDE の同定と機能解析について述べたもので、学術上、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（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。