

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 福田 歩

細菌の細胞表層には、N 末端のシステイン残基が脂質で修飾されたりポ蛋白質が存在し、物質輸送や細胞分裂、形態維持、ペプチドグリカンの合成など様々な細胞機能に重要な役割を果たしている。グラム陰性細菌である大腸菌の細胞は、細胞質、細胞質膜（内膜）、ペリプラズム、および外膜の4つのコンパートメントからなっている。リポ蛋白質は、Sec 蛋白質膜透過装置に認識されるためのシグナルペプチドを N 末端に持つ前駆体として細胞質で合成され、内膜を透過する過程で3段階の反応を経て成熟体となる。成熟体化の第1段階では、ジアシルグリセリル基転移酵素がリポ蛋白質前駆体中の成熟体部分の N 末端となるシステイン残基の側鎖にジアシルグリセリル基を付加し、ジアシルグリセリルプロリポ蛋白質 (DGproLipoprotein) が生成する。第2段階の反応では、シグナルペプチダーゼⅡがジアシルグリセリルプロリポ蛋白質のシグナルペプチドを切断し、アポリポ蛋白質 (apoLipoprotein) が生成する。第3段階の反応では、N-アシル基転移酵素がアポリポ蛋白質 N 末端のアミノ基にアシル基を付加して成熟体リポ蛋白質が生成する。その後、成熟体リポ蛋白質は Lol システムを介した選別と輸送の結果、内膜から外膜のいずれかに局在化する。リポ蛋白質に特徴的な構造である脂質分子の第一の役割は、膜にリポ蛋白質を留める錨としての機能であると考えられる。しかしこれまで、リポ蛋白質が Lol システムの基質となるために脂質分子が果たす役割については不明であった。本論文は、リポ蛋白質の成熟体化過程において最後に付加される N-アシル基に注目し、Lol システムを介したリポ蛋白質の大腸菌内膜からの遊離には N-アシル基が必須であることを明らかにしたものである。

N-アシル基が Lol システムを介したリポ蛋白質局在化に果たす機能を解析するため、大腸菌外膜リポ蛋白質である Pal の C 末端にヒスチジンタグを導入した Pal-His の apo 型 (apoPal-His) を基質に用い、*in vitro* の遊離実験をおこなった。精製を容易にするためにヒスチジンタグを導入した Pal-His が、Lol システムを介して正常に外膜に局在化することから、Pal-His が遊離実験の基質として適当であることを確認した。また、金属アフィニティーカラムを用いて Pal-His を精製する方法を確立した。グロボマイシンでシグナルペプチダーゼⅡを阻害して DGproPal-His を蓄積させた大腸菌膜画分を材料とし、シグナルペプチダーゼⅡと N-アシル基転移酵素の熱安定性の差を利用して apoPal-His を調製する方法を確立し、これを遊離実験の基質に用いた。精製した LolCDE 複合体、LolA、基質リポ蛋白質、大腸菌リン脂質から成るプロテオリポソーム再構成系を用いた遊離実験の結果、apoPal-His は遊離反応の基質にならないことが示唆された。つぎに、N-アシル化が外膜リポ蛋白質の遊離に必須であるか否かを確かめるために、N-アシル基転移酵素を精製して再構成系に加え、apoPal-His から生じた成熟体 Pal-His が遊離するか否かを調べた。N-アシル基転移酵素の C 末端にヒスチジンタグを導入した Lnt-His を、金属アフィニティーカラムで精製する方法を確立した。Lnt-His を先述のプロテオリポソーム再構成系に加えて遊離実験をおこなった結果、apoPal-His は Lnt-His に依存して成熟体 Pal-His に変換し、Lol

システムに依存して膜から遊離した。したがって、N-アシル基は Lol システムを介した外膜リポ蛋白質の内膜からの遊離に必須であることが明らかとなった。

また、精製した Lnt-His を用いて N-アシル基転移酵素の基質特異性を解析した結果、N-アシル基転移酵素は大腸菌に存在する主要リン脂質をアシル基供与体として利用可能であることが示唆された。また、リン脂質中のアシル基の組成が大腸菌と異なる枯草菌を用いて調製した apoPal-His をアシル基受容体に用いた解析の結果、N-アシル基転移酵素はアシル基受容体であるアポリポ蛋白質のジアシルグリセリル基を認識し、種特異的なアシル基の組成を好むことが示唆された。

以上、本論文はリポ蛋白質局在化における脂質分子の機能について明らかにしたものであり、リポ蛋白質局在化機構の解明に貢献すると期待される。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。