

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 菅井 理絵

大腸菌の蛋白質膜透過には7種類のSec因子が関与している。SecAは細胞質にも膜にも存在するATPase活性を持つ因子である。SecAに前駆体蛋白質とATPが結合すると膜に挿入し、ATPの加水分解によって前駆体から解離し、膜から脱離する。このようなSecAサイクルによって蛋白質膜透過が直接駆動されると考えられている。SecGは膜透過を促進し、膜透過反応に伴って膜内配向性の反転・回復を繰り返す。SecGの構造変化はSecAサイクルに共役し、膜透過反応の促進に重要であると考えられている。一方、膜の酸性リン脂質はSecAのATPase活性を上昇させ、膜透過活性を促進する。*secG*遺伝子破壊株 ( $\Delta secG$ 株) では膜透過活性が低下し、生育が低温感受性となるが、酸性リン脂質量の上昇により膜透過活性が回復する。これらのことから、リン脂質とSecGの機能には密接な関連があると考えられている。本論文は蛋白質膜透過反応におけるSecGの機能をより詳しく解析することを目的としたものである。

第一章では、 $\Delta secG$ 株の低温感受性を抑制するマルチコピーサプレッサーとして得られた、大腸菌の染色体上約22分に位置する1 kbpの断片内にコードされる遺伝子の機能解析を行っている。この断片内には、*yccL*遺伝子や*sfa*遺伝子が含まれていたが、*yccL*遺伝子が $\Delta secG$ 株の低温感受性を抑制することが判明したため、*yccL*遺伝子を*gnsA* (*secG* null mutant suppressor A) 遺伝子と呼ぶことにした。*sfa*遺伝子は、膜の不飽和脂肪酸合成に必須な*fabA*遺伝子の温度感受性変異株、*fabA6*変異のマルチコピーサプレッサーであると報告されているが、*sfa*遺伝子ではなく*gnsA*遺伝子によって*fabA6*変異が抑制されることを明らかにした。さらに、*gnsA*遺伝子と相同性の高い*ydfY*遺伝子を発見し、この遺伝子を過剰発現すると両変異を抑制したため、*ydfY*遺伝子を*gnsB*遺伝子と呼ぶことにした。 $\Delta secG$ 株は膜透過活性が阻害されるが、GnsA、GnsBを過剰発現させると*in vivo*、*in vitro*において膜透過活性が回復した。これは、GnsA、GnsBの過剰発現により37℃と20℃のどちらでも膜の不飽和脂肪酸量が上昇したためであることを明らかにした。

第二章では、GnsAの過剰発現が低温下におけるリン脂質組成に与える影響を調べている。20℃でGnsAを過剰発現させると酸性リン脂質の割合が増加していた。このとき、全リン脂質中への<sup>32</sup>Pの取り込みは通常より5分の1程度に減少し、さらにバルスラベル実験によりGnsAは過剰発現によってリン脂質の合成を抑制すること、

20℃では特にPEの合成が強く抑制されることを明らかにした。GnsAの過剰発現により酸性リン脂質が過剰発現されたのではないと考えられるため、 $\Delta secG$ 株の低温感受性の抑制には不飽和脂肪酸量の増加が重要であることが判明した。

第三章では、蛋白質膜透過反応におけるSecA・SecGサイクルの共役機構について、SecGの反転が阻害されたSecG・PhoA融合蛋白質を用いて解析している。*in vitro*における膜透過活性は、SecAの濃度を上昇させるとSecG+膜では上昇するが、SecG・PhoA膜では変化せず、高濃度のSecA存在下ではSecG+膜より低かった。SecG・PhoA膜の膜透過活性はSecA依存で進行することが判明したため、SecG・PhoA膜では添加するSecAによる促進が起こらないことが示唆された。SecG・PhoAの発現により膜結合型SecA量のみがSecG+膜より3倍多かった。SecG・PhoA膜のトリプシン消化によりSecAの46 kDa断片が出現した。SecG+膜ではこの断片は極めて少量であった。両膜ともに膜透過反応後にトリプシン消化すると46 kDa断片量が減少した。これらの結果から、SecAの46 kDa断片の出現はSecAサイクルの中間体から生じたものであり、SecGの反転阻害により多く蓄積すると思われる。SecG+膜では、SecA・SecGの化学架橋産物が膜透過に依存して増加するが、SecG・PhoA膜では逆に減少した。これらの結果から、細胞質SecAは膜透過活性の促進に重要であること、また、SecGの反転は細胞質SecAをSecAサイクルに加える役割を果たすことがはじめて明らかになった。

以上、本論文はSecGの機能について解析したものであり、より詳細な蛋白質膜透過機構の解明につながるものである。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。