

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 宮本 厚樹

大腸菌の外膜と内膜には N 末端のシステイン残基が脂質修飾されたリポ蛋白質が存在している。外膜リポ蛋白質は、内膜に存在する ABC トランスポーターである LolCDE の作用により、ペリプラズム空間に存在するリポ蛋白質に特異的な分子シャペロンである LolA と 1:1 の水溶性複合体を形成して内膜から遊離する。次に LolA 複合体としてペリプラズム空間を横断した外膜リポ蛋白質は、外膜に存在する受容体蛋白質 LolB に受け渡され、最終的に外膜へ組み込まれる。このように LolA はリポ蛋白質の内膜からの遊離、水溶性複合体の形成、そして LolB への受け渡しの機能を有する多機能蛋白質である。本論文は、リポ蛋白質の局在化機構を分子レベルで理解するために、多機能蛋白質である LolA の構造と機能の関係を明らかにすることを目的として行っている。

グラム陰性細菌には広く LolA ホモログが存在している。LolA ホモログ間で保存されたアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換するために、プラスミド上の *lolA* 遺伝子に部位特異的変異を導入した。その結果、ペリプラズム画分に外膜リポ蛋白質である Lpp と Pal の蓄積がみられた変異体 LolA (R43L) と優勢欠損変異の表現型を示した変異体 LolA (F47E) を取得した。

LolA (R43L) の精製標品を用いてスフェロプラストから Lpp を遊離する反応を調べたところ、LolA (R43L) は Lpp を遊離する機能を正常に示し、かつ Lpp と水溶性複合体を形成した。次に LolA (R43L) / Lpp 複合体に外膜画分を加えてリポ蛋白質を LolB へ受け渡す反応を調べたところ、LolA (R43L) 存在下で遊離した Lpp は外膜に組み込まれなかった。以上の結果から、LolA (R43L) はリポ蛋白質を内膜から遊離し、水溶性複合体を形成する機能は正常であるが、LolB へ受け渡す機能に欠陥がある変異体であることが示された。

LolA (F47E) の精製標品を用いてスフェロプラストから Lpp、または Pal を遊離する反応を調べたところ、LolA (F47E) は Lpp を全く遊離せず、Pal を遊離する反応も野生型 LolA に比べて低下していた。しかし遊離された Pal は LolA (F47E) と水溶性複合体を形成していたため、LolA (F47E) / Pal 複合体を用いて Pal を LolB へ受け渡す反応を調べた。その結果、LolA (F47E) による Pal の LolB に依存した外膜への組み込みは正常であった。以上の結果から、LolA (F47E) はリポ蛋白質と水溶性複合体を形成する機能、および LolB への受け渡しの機能は正常であるが、リポ蛋白質を内膜から遊離する機能に欠陥をもつ変異体であることが示された。さらに、LolA (F47E) のリポ蛋白質を遊離する機能が異常になった理由を明らかにするため、再構成実験系を用いて解析した。アデニンヌクレオチドである ATP、ADP、AMP、また加水分解されない ATP アナログである AMP-PNP 存在下で LolCDE を再構成したプロテオリポソームを調製し、それに野生型 LolA または F47E を加えて 30°C で反応させた。超遠心でプロテオリポソーム画分と上清に分画し、それぞれの画分を抗 LolA 抗体を用いたイムブロットングで解析した結果、LolA (F47E) は、LolCDE との結合がヌクレオチド非依存になっているだけでなく、ATP 存在下でも LolCDE から解離できないほど強く相互作用していることが示された。また、ADP、AMP、そして AMP-PNP 存在下で野生型 LolA はプロテオリポソーム画分に回収された。このことから、加水分解されないアデニンヌクレオチドを結合し

た LolCDE は LolA と相互作用するが、その後解離することができないと考えられた。また、LolA は LolCDE と直接相互作用するかどうかについてはこれまで不明であったが、LolA と LolCDE は直接相互作用していることがはじめて示唆された。一方、ATP 存在下では LolA と LolCDE の結合はみられなかった。これは ATP を結合した LolCDE が LolA と相互作用した後、速やかに ATP を加水分解することによって LolA/リポ蛋白質複合体を LolCDE から解離させるためであると考えられた。つまり、ATP 加水分解エネルギーは LolCDE から LolA/リポ蛋白質複合体を解離するときに利用されていることが示唆された。

以上、本論文は大腸菌リポ蛋白質の局在化に関与する分子シャペロン LolA の機能解析を行ったものであり、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。