

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 清水 久代

大腸菌のゲノムにコードされている蛋白質のうち、30%以上が内膜、ペリプラズム、外膜などに局在する。これらの蛋白質を、内膜を越えて輸送する反応や、内膜に挿入する反応に生じた欠陥は、細胞にとって強いストレスとなり、これらの反応が強く阻害されると細胞は生育できない。蛋白質の内膜輸送反応に欠陥が生じると、SecAの発現が翻訳段階で上昇することが知られているが、他の遺伝子の発現が転写レベルでどのような影響を受けるかはこれまでほとんど解析されていない。本論文は分泌蛋白質の膜透過不全が遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析したものであり、三章よりなる。

第一章は序論であり、蛋白質膜透過反応機構について現在までに明らかになっている知見をまとめ、その生理的意義が論じられている。

第二章では、膜透過装置を構成する膜蛋白質であるSecEを、遺伝子破壊により欠損させた時、遺伝子発現にどのような変化が現れるか調べている。*secE*遺伝子破壊株KN553と野生型株K003を20°Cまたは37°Cで培養し、抽出した全RNAを鋳型に蛍光標識したcDNAを合成した。蛍光標識cDNAと大腸菌ゲノムDNAマイクロアレイを用いて、遺伝子発現の変化を網羅的に調べた。前駆体蛋白質が蓄積する20°Cでは、蛋白質合成系に関与する遺伝子群を中心に132遺伝子の誘導が見られた。一方、リボゾーム蛋白質の遺伝子とオペロンを形成する*secY*遺伝子を除き、Sec装置構成因子の遺伝子発現には顕著な誘導は見られなかった。SecEの機能はリン脂質の役割と深く関連しているが、*secE*遺伝子破壊によりリン脂質合成の前駆物質であるグリセロール三リン酸合成経路の遺伝子群が誘導されていた。Sec因子に生じたある種の温度感受性変異は、分子シャペロンDnaK、GroEL/ESの過剰発現で抑制される。これらの遺伝子は発現が誘導されていたが、蛋白質のレベルでは明らかな上昇は見られなかった。また、エネルギー形成に関連するTCA回路の遺伝子群に大きな誘導が見られた。これらの一連の遺伝子発現の変化は、膜透過反応に大きな阻害がみられない37°Cにおいても、同様の傾向であった。また、SigmaSに関連する一連の遺伝子に誘導が見られた。SigmaSをコードする*rpoS*遺伝子には大きな誘導は見られなかったが、蛋白質レベルでは、20°Cにおいて*secE*遺伝子破壊株では野生型株に対して7倍程度の蓄積が認められた。一方、37°Cにおいてはレベルに差は見られなかった。これらの結果に基づき、遺伝子発現変化の生理的意義が詳細に論じられている。

第三章では、*secG*遺伝子破壊株の低温感受性を回復させる*gnsA*の過剰発現が、遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析している。*gnsA*は過剰発現により膜リン脂質のアシル基の不飽和度を上昇させ、酸性リン脂質の割合を増加させるが、その機構は不明である。*secG*遺伝子破壊株で*gnsA*を過剰発現させると、20°Cでは172遺伝子の発現が誘導された。一方、37°Cでは14遺伝子が誘導されるに過ぎなかった。また*gnsA*を過剰発現させた株では、浸透圧変化に応答する遺伝子が多数誘導されていた。そこで、培地浸透圧を変化させて生育を調べ、*gnsA*の過剰発現は細胞を浸透圧感受性とすることが判明した。*gnsA*の過剰発現は、*secG*遺伝子破壊株の低温感受性を回復させるが、同時に細胞表層構造の形成にストレスを与えると考えられる。

以上、本論文は蛋白質膜透過反応の不全が遺伝子発現に与える影響を網羅的に明らかにしたものであり、学術上応用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。