

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 原 崇

---

大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌の外膜と内膜には、リポ蛋白質と呼ばれる N 末端の Cys 残基が脂質修飾を受けた蛋白質が存在しており、脂質部分を介して膜と結合している。大腸菌では、リポ蛋白質は約 90 種類あまり存在し、様々な細胞機能にたずさわっている。リポ蛋白質はシグナルペプチドをもつ前駆体として細胞質で合成され、内膜を通過する過程でシグナルペプチドの切断と脂質修飾を受け、成熟体リポ蛋白質となる。その後、N 末端の Cys 残基の次のアミノ酸残基 (+2 位) が Asp であるリポ蛋白質は内膜に、それ以外のアミノ酸残基をもつリポ蛋白質は外膜に局在化する。すなわち、リポ蛋白質の+2 位のアミノ酸残基は局在場所を決定づける『選別シグナル』である。本論文は、+2 位のアミノ酸残基のどのような構造や性質が選別に重要なのかを明らかにするために、リポ蛋白質の+2 位のアミノ酸残基を様々な修飾試薬を用いて改変し、この改変されたリポ蛋白質が LolCDE によってどのように選別されるのかについて解析したものである。

外膜リポ蛋白質 Pal の+2 位の Ser を Cys に置換した Pal(S2C)に Cys 特異的修飾試薬を用いて種々の分子を付加した Pal(S2C)-X を作製し、精製 LolCDE、リン脂質および Pal(S2C)-X から作製したプロテオリポソームで、LolA 存在下に Pal(S2C)-X の遊離を調べた。ヨード酢酸をはじめ、負電荷を持つ分子を付加した Pal(S2C)-(-)も効率よく膜から遊離し、負電荷そのものが内膜局在化シグナルとして機能しているのではないことを明らかにした。また、+2 位に大きな分子を導入しても阻害は全く見られなかった。これらの結果から、+2 位のアミノ酸残基の側鎖は外膜局在化シグナルとして積極的に認識されていないことが示唆された。そこで、Pal(S2C)の側鎖を過ギ酸で酸化させることにより、+2 位の側鎖の長さや末端の負電荷が Asp に類似した構造(C-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub>)を持つ Pal(S2C) OX を作製し、再構成遊離実験を行った結果、Pal(S2C) OX は遊離しなかった。これらの結果から、+2 位に Asp に類似した構造が存在するときのみ内膜局在化シグナルとして機能し、それ以外はたとえアミノ酸の構造でなくても外膜局在化シグナルとして機能することが明らかとなった。

+2 位の Asp の側鎖を化学修飾することにより、内膜局在化シグナルを外膜局在化シグナルへ改変することを試みた。+2 位のみ Asp をもつ人工リポ蛋白質 SCLP(DQ)と Asp を全く含まない SCLP(S)を作製した。再構成遊離実験において、SCLP(DQ)は LolA と LolCDE 存在下でも遊離しなかったが、SCLP(DQ)の+2 位の Asp にカルボキシル基特異的架橋剤 EDC を介して biotin を付加させた SCLP(DQ)-EDC-Bio では遊離が確認された。

外膜局在化シグナルを持つ Pal に Cys を導入し、Cys 修飾試薬による修飾を調べ、+2 位の残基はリン脂質と相互作用している可能性が考えられた。そこで、アミノ基特異的修飾試薬 SNA を用いてホスファチジルエタノールアミン(PE)の正電荷を取り除いた SNA-PL を作

成した。この SNA-PL を用いた再構成遊離実験で、外膜リポ蛋白質の遊離効率はほとんど変化しないものの、内膜リポ蛋白質の遊離効率が大きく上昇した。この結果は Asp と PE との静電的相互作用がリポ蛋白質の選別に関わっている可能性を示唆した。

以上、本論文はリポ蛋白質選別シグナルである、+2 位の残基の構造的特徴を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。