

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鈴木 浩史

大腸菌における分泌型蛋白質の細胞質膜透過は、Sec 因子が構成する装置により触媒されている。SecA は、前駆体と ATP の結合によって細胞質膜へ挿入し、ATP の加水分解によって前駆体と解離し、細胞質膜から脱離する。SecA が膜挿入と脱離を繰り返すことが膜透過反応の駆動力であり、その効率は膜透過反応の速度に直接影響する。SecE は膜透過反応を強く促進し、反応に共役してその膜内配向性を反転させる。*secE* 遺伝子破壊株は、生育および膜透過反応が低温感受性となるが、酸性リン脂質の合成に重要な役割を果たす *pgsA* 遺伝子を過剰発現すると、低温感受性は抑制される。本研究は、膜透過反応において大きな構造変化を示す SecA と SecE の機能的関連を調べ、酸性リン脂質が SecA サイクルを促進する理由について詳細に検討し、さらに、必須因子である SecE の構造と機能について解析したものである。

序論では、蛋白質膜透過反応の生理的意義と、反応機構についてこれまでに得られている知見が述べられている。

第一章では、SecAとSecEの機能的相互作用が述べられている。*pgsA* 遺伝子の過剰発現が他の Sec 因子の低温感受性変異を抑制するかどうかを調べ、*secAcsR11* 変異の低温感受性を特異的に抑制することを見いだした。そこで、*secAcsR11* 変異株に *secE* 遺伝子破壊変異を導入し、常温でも膜透過反応が強く阻害され致死となることを見いだした。*secAcsR11* の変異部位は分泌型蛋白質との相互作用部位にあり、proOmpA に対する親和性が低下していることを見いだした。細胞質膜に挿入する SecA の量は、低温感受性 SecA (csSecA) や *secE* 遺伝子破壊株から調製した反転膜小胞 (Δ SecE 膜) を用いると減少した。 Δ SecE 膜と csSecA を用いた場合、SecA は全く膜挿入しなかった。これらの結果から、二重変異株が生育できないのは、駆動力である SecA サイクルがほとんど機能しないためであると考えられた。また、膜透過反応の際、反転する SecE の量は csSecA を用いると大幅に減少し、SecE の反転が SecA の膜挿入に依存した反応であることを明らかにした。

第二章では、*pgsA* 遺伝子の過剰発現による Δ *secE* 変異株と *secAcsR11* 変異株の低温感受性抑制機構が解析されている。*pgsA* 遺伝子を過剰発現すると、酸性リン脂質である phosphatidylglycerol 量が上昇し、 Δ *secE* 変異株や *secAcsR11* 変異株の 20°C での膜透過が促進されることを明らかにした。酸性リン脂質量の増加は、csSecA や Δ SecE 膜を用いた時の proOmpA の膜透過を強く促進すること、20°C における SecA の ATPase 活性を特異的に促進することを明らかにした。この ATPase 活性の促進は、低温下のみで観察された。SecE の主要な機能は、低温下において SecA の挿入-脱離サイクルを効率的に進行させることであると考えられるが、その機能は酸性リン脂質量の上昇により部分的に代替可能であると考えられた。

第三章では、SecE の構造と機能の関連が述べられている。SecE は膜を貫通する領域が 3 カ所あるが、N 末端側の 2 カ所の膜貫通領域は膜透過反応には必須でない。SecE の C 末端領域 (SecE-C) は、N 末端領域 (SecE-N) との相互作用によって安定化されることを明らかにした。しかし、SecE-N によって安定化されるのは過剰発現した SecE-C であること、SecE-N と SecE-C の相互作用は Sec 装置外で起こっており、そのために SecE-C の Sec 装置への組み込みが減少することが示唆された。また、SecE-C は SecY や SecG との複合体形成が不安定になっていた。以上の結果から、SecE の N 末端側の領域には C 末端側と相互作用するが、膜透過反応を促進する活性はないことが示された。

以上、本論文は膜透過反応の駆動力である SecA の膜挿入と脱離には、SecG、リン脂質組成、プロトン駆動力などが大きく影響すること、特に SecG の反転が SecA サイクルを円滑に進めるために重要な働きをしていること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。