

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 池上 文緒

大腸菌の蛋白質膜透過装置は、SecY、SecE、SecE からなる膜内在性因子複合体に、膜表在性の ATPase である SecA が加わってコア部分が形成される。この膜透過装置は、ペリプラズムや外膜に存在するいわゆる分泌蛋白質の内膜透過だけでなく、内膜蛋白質の挿入の場でもある。分泌蛋白質は翻訳後に膜透過されるが、膜蛋白質の挿入は翻訳と共役して起きる。装置を構成する因子の遺伝子が、蛋白質合成に関与する遺伝子とオペロンを形成していることは、蛋白質の合成と膜透過や膜挿入が密接に関連する必要があるためではないかとされてきた。secY 遺伝子は、11 種のリボソーム蛋白質をコードする *spc* オペロン内に位置し、下流には 50S リボソームサブユニットの蛋白質 L36 の遺伝子 *rpmJ* が存在している。大腸菌 L36 は 38 アミノ酸よりなる塩基性蛋白質であり、このホモログは細菌はもとより、ミトコンドリアや葉緑体にも存在する。しかし、L36 の機能に関する知見はほとんど得られていない。本論文は、*rpmJ* 遺伝子の欠失が細胞機能に及ぼす影響を解析したものである。

大腸菌 MC4100 染色体上の *rpmJ* 遺伝子を Tn10 由来の *tetA* 遺伝子と置換することによって *rpmJ* 欠失変異株 AY101 を構築した。*tetA* 遺伝子産物は内膜蛋白質であるため、膜挿入に二次的影響を与える可能性を考え、*tetA* 遺伝子を細胞質蛋白質の遺伝子である *cat* と置換した AY201 株も構築した。

AY101 は 37°C 以上では生育できず、長時間の培養によって溶菌した。一方、AY201 は 42°C でも正常に生育した。薬剤耐性マーカーの違いだけで変異株の表現型が異なったのは、AY101 の生育阻害が単に *rpmJ* 遺伝子の欠失による影響だけではないことを示している。変異株のリボソーム蛋白質組成は、L36 以外に変化は見られなかった。また、変異株の蛋白質合成能は生育速度と強い相関が見られた。これらの結果は、L36 がリボソームにおける蛋白質合成に必須ではないことを示唆している。

37°C で 3 時間培養した細胞を分画し、蛋白質組成を調べた。細胞質と外膜蛋白質の組成には変異による変化は見られなかった。AY101 を溶菌がはじまるまで培養すると、外膜主要リポ蛋白質 Lpp 量が減少した。培養時間にかかわらず、*rpmJ* 欠失変異株のペリプラズム画分では、糖やアミノ酸などの輸送に関与する基質結合蛋白質が顕著に減少していた。さらに、AY101 の内膜画分には、ファージ感染により誘導されるファージショック蛋白質 PspA が発現していた。PspA は蛋白質の膜透過阻害や、プロトン駆動力の減少によっても発現が誘導されることから、AY101 では内膜の機能にストレスが生じていることが示唆された。

AY201 における、膜透過因子 (SecA/D/E/F/G/Y) の量は、野生型と比べ SecY 量がおおよそ半分に減少していたが、他の因子の量は変わらなかった。AY101 では、SecY が野生型の 20% に、また SecE/F/G の量もおおよそ半分に減少していた。さらに、膜透過阻害によって上昇す

る SecA 量は AY101、AY201 においてそれぞれ野生型のおよそ 2.5 倍、3 倍に増加していた。さらに、両変異株では培養温度にかかわらず、OmpA と MalE の前駆体が蓄積していた。以上の結果は、L36 の欠失によって膜内在性 Sec 因子が減少し、分泌型蛋白質の膜透過が阻害されたことを示唆している。

rpmJ 欠失変異は、*rpmJ* 遺伝子によっては相補されなかったが、*secY* によって相補された。これらの結果より、*rpmJ* 欠失変異による表現型の直接の原因は、SecY 量の減少によるものであることが強く示唆された。Reverse transcription-PCR を用いて解析した *secY* の mRNA 量には差がないことから、内膜中の SecY 量が減少する原因は、SecY の翻訳から内膜への組み込みの段階に L36 が関与するためであることが示唆された。

以上、本論文はリボソーム蛋白質 L36 遺伝子破壊が蛋白質膜透過に及ぼす影響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。