

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 宮台 英典

大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌には、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広く存在する。リポ蛋白質は、脂質部分で外膜または内膜にアンカーする膜表在性蛋白質であり、ペリプラズム空間を含む細胞表層のさまざまな機能に関与していると考えられる。大腸菌 K12 株には、少なくとも約 90 種のリポ蛋白質が存在し、その大部分は外膜に局在する。リポ蛋白質 NlpC、NlpI、RlpA、RlpB、Spr、YcfM、YfgL、YfiO の遺伝子を欠損させると生育や運動能、薬剤感受性が大きく変化するが、これらのリポ蛋白質の機能は不明である。また、ペリプラズムにミスフォールドした蛋白質が蓄積すると品質管理機構が作動し、ミスフォールド蛋白質は分解除去される。この品質管理機構に関与するリポ蛋白質は、これまで NlpE 以外には知られていない。本論文は、リポ蛋白質の機能を網羅的に解明する手がかりとして、上記 8 種のリポ蛋白質の抗体を作製し、膜局在化を明らかにすると共に、90 種のリポ蛋白質がペリプラズムの品質管理機構に及ぼす影響を解析したものである。

重要な機能を持つと考えられる上記 8 種のリポ蛋白質を、SecA-C95 との融合蛋白質として過剰発現し、封入体画分から精製し、ポリクローナル抗体を作製した。抗体を用いて、リポ蛋白質の局在を調べたところ、いずれも膜局在化シグナル配列からの予測通り、外膜に局在することが明らかとなった。また大腸菌の生育期の違いによる各リポ蛋白質の発現量の変化を調べ、NlpI 以外は生育期にかかわらず発現している事を明らかにした。一方、遺伝子破壊によって細胞分裂が阻害されることが報告されている NlpI は、対数増殖期のみを発現されることを見いだした。

次に、リポ蛋白質の過剰発現がペリプラズムの品質管理機構である Cpx 二成分情報系に及ぼす影響を調べた。これまで、外膜リポ蛋白質 NlpE の過剰発現のみが Cpx 系を活性化し、ペリプラズムプロテアーゼ DegP を発現誘導するとされていた。90 種のリポ蛋白質を過剰発現させた結果、NlpE 以外にも DegP を発現誘導するリポ蛋白質があることを明らかにした。特に、内膜リポ蛋白質 YafY の過剰発現は、NlpE 以上に強く Cpx 系に依存して DegP の発現を誘導した。NlpE や YafY の膜局在化シグナルを変更した変異体を過剰発現し、内膜に局在したりリポ蛋白質が品質管理機構の活性化には重要であることを示唆した。

内膜リポ蛋白質である YfjS はアミノ酸配列が YafY と 91%の相同性を持つリポ蛋白質であるにもかかわらず、YfjS の過剰発現による DegP の発現を誘導しなかった。2 種のリポ蛋白質間で異なっている 12 個のアミノ酸のどれが DegP の発現

誘導に重要なかを明らかにするため、多数の変異体を作製し過剰発現して DegP の発現誘導を解析した。その結果、YafY の 40 番目のアスパラギン酸、41 番目のチロシン、116 番目のグルタミンが特に重要であることを明らかにした。

以上、本論文は重要な機能を持っていることが推測されるリポ蛋白質の抗体を作製し、その膜局在化を明らかにすると共に、ペリプラズムの品質管理機構に強く関与するリポ蛋白質を見いだしたものであり、学術上、応用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。