

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 伊東 靖子

大腸菌の細胞表層には約 90 種類のリポ蛋白質が存在し、その大部分が外膜に、一部が内膜に局在して重要な細胞機能を担っている。内膜上で成熟体となったりリポ蛋白質のうち、+2 位が Asp であるものは内膜にとどまり、+2 位が Asp 以外のもは、ABC トランスポーター (Lo1CDE) の ATP 加水分解エネルギーを利用して内膜から遊離する。内膜から遊離したりリポ蛋白質は、ペリプラズム蛋白質 Lo1A および外膜受容体蛋白質 Lo1B を介して外膜に挿入される。Lo1CDE は、C : D : E = 1 : 2 : 1 から成る典型的な細菌型 ABC トランスポーターであるが、細胞膜の外側にアンカーした基質を膜から遊離させるという点で、他の ABC 蛋白質には見られない特徴をもつ。本研究は、Lo1CDE の触媒機構を明らかとするために、膜サブユニット (Lo1C、Lo1E) における基質の結合・解離の各反応と ATPase サブユニット (Lo1D) における ATP の結合・加水分解の各反応とがどのように共役しているのかについて解析したものである。

Lo1CDE を過剰発現させた大腸菌膜画分を界面活性剤ドデシルマルトシド (DDM) で可溶化し、Lo1D に付加した His タグを利用してアフィニティーカラムで精製した。ATP 非存在下で精製した Lo1CDE は外膜リポ蛋白質を結合していたのに対し、ATP 存在下で精製した Lo1CDE は結合していなかった。一方、内膜リポ蛋白質や、脂質修飾されていない膜蛋白質は精製した Lo1CDE には結合していなかった。すなわち、ATP 非存在下で Lo1CDE を精製すると、基質結合型の Lo1CDE が得られることが明らかになった。このような基質結合型の ABC トランスポーターを精製した例にはない。

基質結合型 Lo1CDE をプロテオリポソームに再構成し、Lo1A と ATP を加えると Lo1CDE に結合していたリポ蛋白質はプロテオリポソームから遊離した。また、基質結合型 Lo1CDE は、リポ蛋白質と Lo1CDE を別々に可溶化すると生じないことから、精製の過程で形成されたものではないことを明らかにした。以上の結果は、基質結合型 Lo1CDE が内膜上で生成したりリポ蛋白質遊離反応の中間体であることを示唆している。

基質結合型 Lo1CDE に対する ATP および DDM の影響を調べるために、*in vitro* で解析を行った。ATP 存在下では、DDM の濃度に依存して基質が解離したが、ATP 非存在下では、基質の解離はなかった。また、ATP の加水分解ではなく ATP の結合によって Lo1CDE と基質との相互作用が低下し、DDM の濃度が充分高い場合はリポ蛋白質が解離することが示された。

ATP 結合能を失った Lo1CDE 変異体、および ATP 結合能は正常であるが ATP 加水分解能に欠陥を持つ Lo1CDE 変異体を構築した。これらの変異体を用いて解析した結果、Lo1CDE は ATP の結合に先だつてリポ蛋白質と結合することが明らかとなった。また、Lo1CDE と基質との相互作用を低下させるためには、ATP の結合が必要であることが示された。

これらの知見を基に、ABC トランスポーターLo1CDE がリポ蛋白質を遊離するときの反応

機序に関するモデルを提案した。

以上、本論文は、基質結合型 Lo1CDE 複合体を基軸とした解析により、Lo1CDE における主要な触媒機構を明らかとしたものであり、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。