

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 渡辺祥司

大腸菌のリポ蛋白質は、内膜に存在する LolCDE 複合体、ペリプラズムに存在する分子シャペロン LolA、および外膜に存在する受容体 LolB が触媒する一連の反応によって外膜に運ばれる。最近、LolA と LolB の結晶構造が解明され、両因子は片方が開いたハーフバレル構造に α ヘリックスの蓋がついている構造をしていることが明らかとなった。本論文は、結晶構造に基づいた LolA の機能を、原子レベルで解析したものである。

LolA の結晶構造から特に重要であると推測された 15 残基に部位特異的変異を導入した変異体を構築した。その結果、12 残基について合計 23 種の機能を失った変異 LolA を取得した。これらの内、3 残基について得られた 5 種類の変異体は、野生型 LolA の機能を阻害する優性欠損変異体であった。

α ヘリックス構成残基の一つである Ile93 を親水的な Asp や Glu に置換すると LolA は機能を失い、大腸菌の生育を支持できない。一方、側鎖の小さい Gly に置換した I93G 変異体は、優性欠損変異体となった。また、I93G を過剰発現させた大腸菌のペリプラズムにはリポ蛋白質が蓄積していた。ペリプラズムにリポ蛋白質を蓄積する優性欠損変異体は取得されておらず、*in vitro*における詳細な機能解析を行った。

精製した I93G 変異体は、野生型より約 1.5 倍強い遊離活性を有していた。一方、リポ蛋白質を LolB に受け渡す活性は野生型の約 25%であった。リポ蛋白質の遊離競合実験の結果、野生型と I93G が共存したとき、遊離したリポ蛋白質の全てが I93G と複合体を形成していた。すなわち、I93G はリポ蛋白質との親和性が高くなり、過剰発現させるとリポ蛋白質のほぼ全てが I93G-リポ蛋白質複合体となることが示唆された。以上の解析結果により、LolA の α ヘリックスがリポ蛋白質との親和性を調節し、LolCDE 複合体からリポ蛋白質の遊離および LolB への受け渡しを効率よく進行させるために重要な役割を担っていることが示唆された。

α ヘリックスの重要性をさらに詳細に解析するために、Ile93 および Ile93 と疎水結合を形成している Phe140 を標的として Cys 変異体を構築した。I93C および F140C は、LolA として単独で発現させても大腸菌の生育は阻害されなかった。一方、I93C/F140C は優性欠損変異体として大腸菌の生育を強く阻害した。しかし、この生育阻害は、培地に還元剤を添加することにより解消した。このことから、I93C/F140C が分子内で S-S 結合を形成し、 α ヘリックスが固定されると優性欠損変異体の性質を持つと考えられる。精製した I93C/F140C を酸化剤または還元剤で処理した後、LolCDE 複合体を再構成したプロテオリポソームにおいてリポ蛋白質の遊離活性を調べた。その結果、還元型 I93C/F140C は野生型と同じ活性を示した。一方、酸化型は野生型の約 20%しか活性を有していなかった。さらに、長さが異なる 3 種の SH 基特異的架橋剤で Cys 間を架橋したところ、長さが短くなればなるほど LolA の遊離活性は低下した。これらの結果から、リポ蛋白質の結合には α ヘリックスが大きく構造変化することが重要であることが示唆された。

以上、本論文は結晶構造に基づいた LolA の機能解析を行うことにより、リポ蛋白質結合機構

の一端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。