

論文審査の結果の要旨

氏名 車 兪 澈

本論文は、膜タンパク質に特化した無細胞系の構築について述べられている。ポストシーケンス時代を迎えた現在、生命現象の多くを担う様々なタンパク質の立体構造や生体内での分子機能を網羅的に解析するプロテオミクスに大きな注目が注がれている。そんな中、無細胞タンパク質合成系はその汎用性の高さと迅速な操作性から、プロテオミクス解析のための有効ツールとしてその期待が高い。しかし全タンパク質の約三割を占めるとされる膜タンパク質は、実験上の困難さからプロテオミクス研究における大きなボトルネックとなっている。膜タンパク質は細胞活性を維持させる上で重要な役割を担うものが多いだけでなく、創薬の分野においても有効なターゲットとされているが、現在の所活性のある膜タンパク質を容易に合成し、機能解析を自在に行える理想的な系は、*in vivo*、*in vitro* 共に確立されていない。このような背景を踏まえ著者は、リボソームによる膜タンパク質の合成と、機能発現の場である膜への局在化を一系内で共存させる事で、これらの問題を克服する無細胞系の構築を行っている。

本論文で述べられている無細胞系は、*Shimizu* 等の開発した新規無細胞タンパク質合成系 **PURESYSTEM** を基盤として構築されている。この **PURESYSTEM** は転写・翻訳反応に必要な全ての因子を発現・精製し、至適緩衝液中に再構成したタンパク質合成系である。そのため従来までの無細胞系とは異なり、細胞抽出液は全く含んでおらず、系内の因子が全て認知できる点で今までに無い特徴と優位性を持っている。著者はこの **PURESYSTEM** に膜局在化のための諸因子や、局在場所である膜標品を導入し、生体内で行われているようなタンパク質の膜局在化を再構築することで膜タンパク質解析に理想的な無細胞系を考案した。この膜タンパク質に特化した無細胞合成系は、膜タンパク質に関する詳細な解析を可能にする基礎研究のツールとして極めて有効である。特に膜へのターゲティング過程を解析する上では、系内に翻訳以降のプロセスに関わると考えられる因子を投入し局在化の経過を観察するといったアプローチが可能になる。また人工的に膜タンパク質を生産するためのツールとしても大きな期待が持てる手法である。

本系を構築するための方法として著者は、最も研究の進んでいる二つの膜局在過程を、システム構築のためのモデルとしている。一つは **SecA/SecB** 依存的な膜透過過程である。これは外膜構成タンパク質や、ペリプラズム領域存在タンパク質などの局在化によく見られる過程で、脂質二重膜を完全に透過する、いわゆる膜分泌型タンパク質の局在化を促す過程である。もう一つの過程は **SRP (Signal Recognition Particle)** と、**SR (SRP receptor)** 依存的な膜挿入過程である。これは、膜挿入型タンパク質の局在化に見られる過程である。一般に **SecA/SecB** 依存的な膜透過は翻訳と共役しない **post-translational** として、また **SRP/SR** 依存的な膜挿入は翻訳と共役した **co-translational** として起こるとされている。

論文の構成はまず序論から始められている。ここではプロテオミクス研究における本系の重要性と系構築のアプローチについて述べられている。材料と方法の項では、**PURESYSTEM** に投入された膜輸送に必要な諸因子の精製、膜画分の調製、また実際のア

ッセイ方法について述べられている。結果の項では、系内で合成された膜タンパク質の可溶化率とシャペロン依存的な外膜タンパク質の可溶化率の変化について、詳しい検証が行われている。その後、SecA/SecB 依存的なタンパク質の膜分泌反応、また SRP/SR 依存的なタンパク質の膜挿入反応を最小因子のみを用いて、再構築する事に成功している。さらには、両因子依存的なタンパク質の膜挿入と、生体を模倣するような膜分泌、膜挿入反応を一系内で共存させる試みも行っている。ここで得られた結果は、現在までに報告されている見解と完全に一致しているため、信頼性の高いものであるといえる。最後に、結果を総括した考察と今後見込まれる展望についても述べている。

本システムを構築する上での筆者のアプローチは、翻訳と膜局在化を共存させることによって最小因子のみから膜タンパク質を合成することである。精製因子による機能の再構築は、その機能に必要な最小限の因子を同定する決定的な実験であるという観点に基づき、タンパク質の合成と膜局在化に関わる必須因子のみを用いた無細胞膜・分泌タンパク質合成システムの構築を行った。本研究で構築された無細胞合成系は、膜タンパク質解析において非常に有効なツールとなる事が期待されるばかりではなく、プロテオーム解析における大きなプラットフォームとして位置づけとなるであろう。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。