

## 審査の結果の要旨

氏名 石原 朋子

本研究は III 型分泌装置を介したエフェクタータンパク質の輸送メカニズムおよび III 型分泌装置の C リングの構造や機能を明らかにするため、C リングの構成成分と推測される Spa33 の III 型分泌装置における局在と役割および III 型分泌装置における Spa33 の C 末端領域の役割の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 赤痢菌の *spa33* 遺伝子欠失変異株を作製し、本変異株において形成される III 型分泌装置の構造と機能を解析した。その結果、本変異株は針部を欠いた不完全な III 型分泌装置を形成し、Ipa タンパク質の分泌が不能となることが示された。
2. Spa33 の菌体内局在を調べるために、生化学的解析および電子顕微鏡による観察を行った。その結果、Spa33 は赤痢菌の細胞質中の内膜近傍に局在し、基部の主要な構成成分である MxiG および MxiJ と結合することが示された。
3. Spa33 の III 型分泌装置における局在を詳細に調べるために、架橋試薬を用いて Spa33 の III 型分泌装置に対する結合を安定化した状態で、III 型分泌装置を精製して電子顕微鏡による解析を行った。その結果、基部の直下に巨大な構造体が認められた。その構造体について金コロイド染色法を用いて解析した結果、構成成分の 1 つとして Spa33 を含む III 型分泌装置の細胞質構造体であることが明らかになった。
4. III 型分泌装置を介したタンパク質の輸送、分泌における Spa33 の役割を解明するために、Spa33 と III 型分泌装置関連タンパク質の結合性を調べた。GST-プルダウンアッセイを用いた結合試験の結果、Spa33 は III 型分泌装置の ATPase である Spa47、針部の構成成分の輸送に必要な MxiK と MxiN、針の長さを一定に保つ“分子物差し”として働く Spa32、さらに数種類のエフェクタータンパク質およびそのシャペロンタンパク質と結合することが示された。
5. Spa33 の C 末端領域内において、Spa33 の相同性タンパク質（べん毛の FliN、サルモネラ属菌の SpaO、エルシニア属菌の YscQ、緑膿菌の HrcQ<sub>B</sub>）の間で

高度に保存されている 9 つのアミノ酸残基を各々 1 アミノ酸置換し、形成される III 型分泌装置の構造と機能に対する影響を調べた。その結果、3 つのアミノ酸残基のアミノ酸置換により、針部の形成および Ipa タンパク質の分泌が不能となることが示された。さらに、III 型分泌装置関連タンパク質との結合性を調べた結果、その 3 つのアミノ酸残基は MxiN (III 型分泌装置の針部の形成に必要) との結合に必須であることが示された。

6. 赤痢菌の III 型分泌装置関連タンパク質と Spa33 の相同性タンパク質の結合性を調べた結果、MxiG と SpaO の結合、赤痢菌の III 型分泌装置関連タンパク質と YscQ あるいは HrcQ<sub>B</sub> の結合が不能となることが示された。
7.  $\Delta spa33$  株に Spa33 の相同性タンパク質を発現させ、エフェクタータンパク質分泌能を調べた。その結果、エフェクタータンパク質の分泌は認められず、 $\Delta spa33$  株のエフェクタータンパク質の分泌不能は Spa33 の相同性タンパク質では回復しないと考えられた。

以上、本論文は III 型分泌装置を介した針部の構成成分やエフェクタータンパク質の輸送・分泌において、Spa33 が III 型分泌装置の細胞質構造体 (C リング) の構成成分の 1 つとして輸送・分泌すべき標的タンパク質の分子識別のために重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、III 型分泌装置の C リングの構造と機能に関して初めて詳細に解析が行われたものであり、III 型分泌装置による標的タンパク質の識別および輸送メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。