

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 宮本 重彦

---

細菌に広く存在するリポ蛋白質は、N末端のシステイン残基が脂質で修飾され外膜または内膜に結合する膜表在性の蛋白質である。大腸菌には約90種類のリポ蛋白質が存在し、細胞表層に存在する多様な機能を担っている。リポ蛋白質は前駆体として細胞質で合成され、内膜上で成熟体となる。その後リポ蛋白質はN末端のシステイン残基の次のアミノ酸残基(+2位)がAspのものは内膜に、Asp以外のものは外膜に局在する。外膜局在化シグナルをもつリポ蛋白質はABCトランスポーターLolCDEの働きにより内膜から遊離し、リポ蛋白質特異的シャペロンLolAと水溶性複合体を形成する。その後、受容体蛋白質LolBに受け渡され外膜に組み込まれる。一方、+2位がAspであるリポ蛋白質はLolCDEによる認識を回避するため内膜に留まる。+2位のAsp側鎖の負電荷が正電荷を持つホスファチジルエタノールアミン(PE)と静電的相互作用をするため、LolCDEの認識を回避すると考えられている。本研究は、リポ蛋白質の選別輸送機構を明らかにすることを目的として、LolCDEとリン脂質との相互作用を詳細に解析したものである。

LolCDE、外膜リポ蛋白質Pal、その+2位のSerをAspに置換した変異体Pal(D)を、大腸菌リン脂質およびカルジオリピン(CL)を用いてプロテオリポソームに再構成し、リン脂質と局在化シグナルの関係を調べた。大腸菌リン脂質を用いた場合、PalのみがLolAに依存して遊離した。一方、正電荷を持たないCLを用いてプロテオリポソームを作製した場合、Palに加えPal(D)も遊離した。CL-リポソームからのリポ蛋白質の遊離はMg濃度の増加に伴い著しく上昇した。Mg濃度が高い時にCLが形成するnon-bilayer構造が、リポ蛋白質遊離活性を促進することが示唆された。LolCDEのATPase活性は、基質となるリポ蛋白質により促進される。CL-リポソームでは、PalだけでなくPal(D)によってもATPase活性が促進された。これらの結果を総合すると、+2位のAspは正電荷のないCL-リポソームではLol回避シグナルとして機能しないことを示している。

生理的条件下でnon-bilayer構造をとるジアシルグリセロールやPEが、リポ蛋白質遊離活性に及ぼす影響を詳細に調べた。大腸菌リン脂質に5%のジアシルグリセロールを添加すると、Palの遊離のみが約2倍に上昇した。次に、Mg濃度が低い条件でCL-リポソーム中のPE含量を変化させPalとPal(D)の遊離を調べた。Palの遊離はPE含量の増加に伴い上昇した。一方、Pal(D)の遊離はPEが一定量以上になると抑制された。これらの結果から、non-bilayer lipidはLolCDEのリポ蛋白質遊離活性を促進することが明らかとなった。non-bilayer lipidはアシル基に比べ極性基が小さいため、リポソーム中の含量が増加すると膜の水平方向の圧力を変化させることが知られている。non-bilayer lipidはLolCDEの膜中での構造に影響を与え、活性を変化させると推測した。さらにPEは、内膜リポ蛋白質との静電的相互作用によりLol回避メカニズムに関与しているだけでなく、non-bilayer lipidとして

LolCDE の機能に影響を及ぼしていると考えられる。

PE を合成できない大腸菌では、リン脂質は CL と PG がそれぞれ約 50% である。しかし、PE 合成欠損株においてもリポ蛋白質の局在化に異常はなかった。そこで、PG が LolCDE の選別機構に影響しているかを解析した。CL-リポソーム中の PG 含量を増加すると、Pal の遊離に比べ Pal(D)の遊離がより顕著に抑制された。また、LolCDE の ATPase 活性も PG 含量の増加に伴い低下した。これらの結果から、PE 合成欠損株では PG が LolCDE の ATPase 活性を抑制することでリポ蛋白質の選別に寄与していると考えられる。

以上、本論文は、LolCDE によるリポ蛋白質選別と遊離の機能がリン脂質の組成によって強く影響を受けること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。