

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 溪口 直弘

グラム陰性細菌の細胞表層には、N 末端のシステイン残基が脂質で修飾されたりポタンパク質が存在し、脂質部分で膜に結合している。大腸菌にはおよそ 90 種類のリポタンパク質が見いだされており、細胞表層の多彩な機能を担っている。リポタンパク質は内膜のペリプラズム側で前駆体から成熟体に変換され、+2 位がアスパラギン酸の場合は内膜に留まり、それ以外の残基を持つものは外膜へと輸送される。この選別と外膜への輸送は 5 種類の Lol 因子からなる Lol システムが触媒する。本論文は、内膜に存在しリポタンパク質の遊離を司る ABC トランスポーター LolCDE 複合体の反応機構を詳細に解析したものである。ATP 非存在下で精製することにより、外膜リポタンパク質を結合した LolCDE が精製できる。これは、ABC トランスポーターでは他に例がない。

基質結合型 LolCDE に ATP を加えると、1%のドデシルマルトシドによってリポタンパク質が解離する。これは、ヌクレオチド結合サブユニット LolD への ATP 結合が、膜サブユニット LolC/LolE とリポタンパク質間の疎水結合を弱めるためである。この解離に、ペリプラズムの分子シャペロン LolA は不要であった。一方、ドデシルマルトシド濃度が 0.01%の時は、ATP を加えてもリポタンパク質は LolCDE から解離しなかった。しかし、ここに LolA を加えると、リポタンパク質が解離した。LolA が存在しても、加水分解されないアナログ AMP-PNP や、Mg²⁺非存在下で ATP を加えた場合は解離しなかった。また、LolD の Walker B モチーフの変異によって ATP 加水分解が阻害されると、ATP を加えてもリポタンパク質は LolCDE から解離しなかった。さらに、解離したリポタンパク質は、LolA との複合体であること、この複合体を外膜と反応すると、受容体 LolB に依存したリポタンパク質の外膜組み込みが起きることを明らかにした。これらの結果から、0.01%ドデシルマルトシド存在下で観察される、ATP の加水分解と LolA に依存した基質結合型 LolCDE からのリポタンパク質解離は、*in vivo* でのリポタンパク質遊離反応の再現であることが明らかになった。すなわち、LolCDE 複合体は ABC トランスポーターであるが、プロテオリソソームに再構成しなくてもその反応を解析できることが示された。なお、1 分子の基質結合型 LolCDE には、1 分子のリポタンパク質が結合していることを見いだした。したがって、シングルサイクルのリポタンパク質遊離反応を解析する実験条件が確立された。

ABC トランスポーターの阻害剤であるバナジン酸は、リン酸のアナログとして作用し、ATP 加水分解の結果生じた ADP をヌクレオチド結合サブユニットにトラップすることが知られている。最近、バナジン酸がマルトース輸送性 ABC トランスポーターを遷移状態にとどめることが報告されている。LolCDE による触媒的なりポタンパク質遊離は、バナジン酸によって強く阻害されることが明らかになっている。LolCDE においても、1 mM のバナジン酸によって効率よく ADP がトラップされた。そこで、基質結合型 LolCDE に LolA、

ATP、1 mM のバナジン酸を加えて遊離反応を行わせたところ、シングルサイクルのリポタンパク質の遊離反応はバナジン酸によって阻害されなかった。さらに、LolA 非存在下で基質結合型 LolCDE に ATP とバナジン酸を加えて十分に阻害した後、LolA を加えたところ、リポタンパク質は LolCDE から LolA に受け渡された。すなわち、LolCDE は細胞質側で ATP を加水分解し、ペリプラズム側でそのエネルギーを用いてリポタンパク質を遊離させるが、この時、LolCDE には ADP とリン酸が結合した状態であることが示唆された。リポタンパク質と LolA が複合体を形成するときには、LolA の構造変化が必要であると推測されている。バナジン酸で遷移状態に保たれた LolCDE は、LolA の構造変化を引き起こす作用があると推測される。LolCDE からリン酸と ADP が解離する反応は、再びリポタンパク質を結合できる構造に復帰するために必要であると考えられる。

以上、本論文は ABC トランスポーター-LolCDE の反応機構を詳細に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。