

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 奥田 傑

グラム陰性細菌である大腸菌の外膜と内膜には N 末端のシステイン残基が脂質で修飾されたリポ蛋白質が約 90 種類存在している。外膜局在化シグナルを持つリポ蛋白質は内膜上で成熟体となり、内膜に存在する ABC トランスポーター LolCDE 複合体によって認識され、ATP の加水分解エネルギーを利用して LolA と 1 : 1 の水溶性複合体を形成し、内膜から遊離する。LolA との複合体となった外膜リポ蛋白質はペリプラズム空間を横断した後、親和性の差によりエネルギー非依存的に外膜リポ蛋白質受容体 LolB へと受け渡され、LolB の働きにより外膜に組み込まれる。内膜局在化シグナルを持つリポ蛋白質は LolCDE による認識を回避するため、内膜に局在する。本研究は、LolA と LolB の結晶構造の比較により、機能に重要であると推測される LolA の C 末端領域の役割を解析し、続いて、LolA に部位特異的に光架橋性の分子を導入し、*in vivo* で各因子との相互作用を解析したものである。

1. LolA の C 末端欠失変異体の機能解析

LolA と LolB は結晶構造解析の結果、互いの一次構造の相同性は低いにも関わらず、立体構造はよく似ている。LolA の C 末端には、LolB には存在しない短いヘリックス (3_{10} ヘリックス) と平行 β -ストランド ($\beta 12$) を含むループ領域が存在しており、C 末端領域の構造上の違いが両因子の機能の違いに寄与していると推測される。 $\beta 12$ と 3_{10} ヘリックスを欠失させた変異体のリポ蛋白質遊離活性、受け渡し活性は共に低下しており、C 末端領域の重要性が明らかになった。さらに、LolA の C 末端領域はリポ蛋白質との安定な複合体を形成するために重要な役割を果たしていることが示された。

2. *In vivo* 光架橋法による Lol 因子間の相互作用解析

Lol システムによるリポ蛋白質の輸送機構は、これまでに変異体の機能解析や結晶構造の解析から進められ、それぞれの因子の作動機構は、かなり詳細に明らかになっている。しかし、リポ蛋白質の受け渡し反応を引き起こす LolCDE と LolA、LolA と LolB 間にどのような相互作用があるかは全く不明である。このごく一過的な Lol 因子間の相互作用を解析するため、*in vivo* での光架橋反応を用いて LolA を中心とした Lol 因子間の相互作用を解析した。

光感受性化合物 pBPA (p-benzoyl phenylalanine) を任意の位置に導入したアンバーコドンに対応して挿入するため、古細菌由来のサプレッサー tRNA とアミノアシル tRNA 合成酵素を大腸菌に導入し、任意の残基をアンバーコドン (TAG) に変換した LolA 変異体を発現させた。さらにこの株に、LolA との相互作用を解析したい蛋白質 (LolCDE、または可溶性にした LolB 変異体 mLolB-his) を発現させるプラスミドを導入し、LolA 変異体と同時に過剰発現させた。この菌体に 365 nm の UV 光を照射することにより、光架橋反応を行なった。また基質である外膜リポ蛋白質 Pal を過剰発現させた。光架橋反応産物は、SDS-PAGE、Western blotting により検出した。

架橋実験の結果、LolA の疎水性キャビティの入り口部分に存在する残基が、LolC や LolB との相互作用に重要な領域であることが明らかになった。すなわち LolA のこの領域が、LolCDE からのリポ蛋白質の受け取りと LolB へのリポ蛋白質の受け渡しの両方に関わっていると考えられる。LolA が、細胞質に存在する LolD と架橋されないのは予想通りだが、興味深いことに LolC と配列上相同性があり、膜配向性もよく似た LolE とは架橋されなかった。この結果は、これまでに解明されていない LolC と LolE の機能の違いを示していると考えられる。

Pal と架橋した部位は、LolB や LolC と架橋した部位に加えて、LolA のキャビティの内部の残基に及んだ。この結果は、LolA はキャビティの内部にリポ蛋白質の一部を包み込むようにして輸送しているという、これまで考えられてきたモデルを支持している。

以上、本論文は、LolA を中心としてこれまでに未知の因子間相互作用と LolA の C 末端領域の役割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。