

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 小口 友樹

グラム陰性菌である大腸菌の内膜と外膜には、N末端のシステイン残基が脂質で修飾されて膜にアンカーしているリポ蛋白質が約 90 種類存在している。外膜特異的リポ蛋白質は、内膜に存在する ABC トランスポーター LolCDE 複合体によって ATP 依存的に内膜から遊離させられ、リポ蛋白質特異的シャペロン LolA と 1:1 の水溶性複合体を形成する。ペリプラズム空間を横断した後、LolB へとエネルギー非依存的に受け渡され、その後 LolB によって外膜に挿入されることで局在化が完了する。LolA と LolB の構造はよく似ており、両者ともリポタンパク質が結合すると考えられる疎水的なキャビティと α -helix の蓋を有している。LolA の蓋の開閉には、43 番目の Arg 残基による水素結合の形成は重要と考えられている。実際この残基が Leu に変異した LolA (R43L) の X 線結晶構造は、野生型の LolA と同じ閉じた構造だけでなく、疎水的なキャビティが溶媒へと露出した開いた構造であった。本論文は、リポ蛋白質の結合部位であると推測される疎水的なキャビティの開閉をモニターする実験系を確立すると共に、キャビティの性質を解析したものである。

蛍光試薬 bis-ANS は蛋白質の疎水的な部位と相互作用すると蛍光強度が上昇する。LolA、LolA (R43L) に bis-ANS を加え蛍光強度の測定を行なった。LolA は bis-ANS の蛍光強度を増加しなかったが、LolA (R43L) は非常に強く蛍光強度を増加した。LolA の疎水的なキャビティは、ほとんどが閉じられているが、LolA (R43L) では開いていると推測された。

外膜リポ蛋白質 Pal と複合体を形成した LolA は、bis-ANS の蛍光強度が大きく増加した。一方、LolA (R43L)-Pal 複合体存在下の bis-ANS 蛍光強度は、LolA-Pal や LolA (R43L) に bis-ANS を加えた場合と同程度であった。LolA がリポ蛋白質と複合体を形成したときは、疎水的なキャビティは開いていると考えられる。

LolA は Lol システムにおいて一度リポ蛋白質と複合体を形成し、LolB へとリポ蛋白質を受け渡しフリーとなった後、繰り返しリポ蛋白質と複合体を形成すると考えられている。大腸菌スフェロプラストに LolA-Pal を加えたところ、リポ蛋白質の遊離は観察されなかったが、LolA-Pal に LolB の脂質修飾部分を除き可溶性となった LolB 変異体である mLolB を加え、Pal を mLolB に受け渡しフリーとなった LolA のみを精製したところ、リポ蛋白質遊離活性を有していた。また LolA-Pal より得られた LolA に bis-ANS を加えたところ、LolA-Pal を加えた場合よりも蛍光強度は大きく減少していた。以上の結果より、Lol システムにおいて LolA はリサイクルされていることが示唆された。mLolB と mLolB-Pal 複合体を精製し、bis-ANS の結合を調べ、mLolB のキャビティも Pal を結合すると開くことを明らかにした。これらの結果から、LolA と mLolB はどちらも基質であるリポ蛋白質の結合の有無で可逆的に閉じた構造と開いた構造をしていると考え

られる。

以上、本論文は、LolA と mLolB の疎水的キャビティの開閉がリポ蛋白質の結合によって引き起こされることを示したものであり、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。