

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 川嶋 洋介

大腸菌の内膜には α ヘリックス型の膜貫通領域で膜に内在するタンパク質があり、外膜には β バレル型の外膜タンパク質がある。さらに、N末端のシステイン残基が脂質修飾されたリポタンパク質が、内膜と外膜の両方に存在している。これらの膜タンパク質は細胞質で合成された後、各種の局在機構によってそれぞれがあるべき場所に運ばれ局在する。内膜内在型のタンパク質以外は前駆体として合成され、局在化の過程で成熟体に変換される。本研究は、大腸菌の膜タンパク質の膜局在機構の解析を行ったものであり、二章よりなる。

第一章では内膜タンパク質の膜挿入を解析している。大腸菌の内膜タンパク質の膜挿入には、Sec トランスロコン、シグナル認識粒子(SRP)、YidC、膜電位などが関与する。これまでの *in vitro* 解析により、Pf3 ファージコートの変異体である 3L Pf3 コートはいずれにも依存せず、自発的に膜挿入するとされていた。一方、Sec 依存的に膜挿入する MtlA でもジアシルグリセロール(DAG)を含まないリポソームには、自発的に膜挿入することが明らかになった。そこで、3L Pf3 coat を基質膜タンパク質として DAG の自発的膜挿入抑制機構の解析を行った。

3L Pf3 コートタンパク質の大腸菌リン脂質のみからなるリポソームへの膜挿入は、1%程度の DAG によって自発的膜挿入が完全に抑制された。この抑制にリポソームの直径は影響しなかった。大腸菌には、自発的膜挿入を抑制する約 1.5%の DAG が含まれることを明らかにした。DAG 枯渇株の構築を試みたが、DAG 生成に関与する既知の遺伝子全てを破壊しても、含有率は野生株と変わらなかった。このことは、未知の DAG 生成系が存在することを示唆している。そこで、分離した内膜から *in vitro* で DAG を代謝させ枯渇させ、リポソームに再構成したところ、自発的膜挿入が起きることがわかった。

以上の結果から、3L Pf3 コートタンパク質も DAG によって自発的膜挿入が抑制されることが明らかとなった。また、内膜中の DAG 含量から、*in vivo* では自発的膜挿入は抑制されていると考えられる。

第二章では、 β バレル型の構造を持つ外膜リポタンパク質 CusC の外膜局在化機構について解析している。リポタンパク質は、内膜の LolCDE の作用でペリプラズムタンパク質 LolA と 1:1 の水溶性複合体を形成し、内膜から遊離する。LolA とともにペリプラズムを横断したリポタンパク質は、外膜リポタンパク質 LolB の作用で外膜へと組み込まれる。一方、 β バレル型外膜タンパク質は、内膜透過後ペリプラズムシャペロンの作用でペリプラズムを横断し、外膜に存在する Bam 複合体の作用で外膜に挿入されると考えられている。

CusC の+2 位をアスパラギン酸に置換すると内膜に局在するようになった。これは CusC

が LolCDE による選別を受けることを示している。内膜からの CusC の遊離は、LolA に依存していた。さらに、LolA と複合体を形成して遊離した CusC は、LolB によって外膜へ局在化した。これらの結果から、CusC が外膜に到達するためには、Lol システムが必要であることが示された。次に、CusC のシグナルペプチドを外膜タンパク質 OmpF のシグナルペプチドに置換し、脂質修飾が起こらない変異体 mCusC を構築した。mCusC の細胞内での局在を調べたところ、主にペリプラズムに局在することが明らかとなった。また、スフェロプラストから分泌させた mCusC を外膜と混ぜても mCusC はほとんど外膜には局在しなかった。以上の結果から、脂質修飾が CusC の外膜局在に重要であり、外膜到達後、Bam 複合体の作用でβバレル部分が外膜に挿入すると考えられる。

以上、本研究は膜タンパク質の大腸菌内膜、並ぶに外膜への挿入機構について新たな知見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。