

氏名	うえ ぐち ち はる 上 口 智 治
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 1328 号
学位授与の日付	平 成 3 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	大腸菌生細胞を用いたタンパク質膜透過機構の解析

論文調査委員 (主査) 教授 伊藤維昭 教授 鈴木仁美 教授 郷 信広

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質が生体膜を透過する過程は、分泌タンパク質や膜タンパク質の生合成にともなう細胞内での局在化の基本となる反応である。この反応には、タンパク質分子中に担われる局在化情報（シグナル配列）とともに、細胞に備わるいくつかの蛋白因子が関与する。大腸菌においては、遺伝学的解析により数種類の分泌関連遺伝子（sec 遺伝子）が同定されており、その中には膜内在性蛋白をコードするものが4種類含まれている。これらの遺伝子産物の作用機構を解明することが急務とされているが、一方では分泌機構に関与する遺伝子がさらに存在するものかどうかを調べることも重要である。

本論文の第一部においては、細胞内でのタンパク質膜透過過程をいくつかのステップに分けて考察することを可能とするため、膜透過中間体が蓄積する条件を見いだしたことを報告している。温度感受性分泌欠損変異株 secY あるいは secA では、許容条件下（30℃）においても膜透過反応に遅延がみられることに注目した。パルスチェイス標識と細胞分画によって、ペリプラスム空間に分泌されるべきタンパク質の一つマルトース結合タンパク質（MBP）の生合成直後の局在性を調べたところ、従来知られていなかった膜透過途上の中間体分子を検出することに成功した。この中間体（processed immature form と命名）においては、シグナルペプチドは切断されているが分子全体としては未だペリプラスムに放出されておらず、MBP 特有の蛋白分解酵素耐性の構造をとっていない。膜透過途上にあると考えられる中間体分子のペリプラスムへの移行は、エネルギー（プロトン駆動力）に依存して起こった。これらの結果から、膜透過過程が初期フェーズ、後期フェーズに分けられることを提唱した。初期フェーズでは前駆体分子の膜結合からシグナルペプチド切断部位のペリプラスム側への移行が起こり、後期フェーズではタンパク質本体大部分の膜横断がプロトン駆動力と secY, secA 遺伝子産物の補助のもとに起こるがシグナルペプチドは関与しないことを示唆した。

第二部においては分泌関連遺伝子同定の新しい試みとして、温度感受性 sec 変異に対するマルチコピーサブレッサーの系統的分離・同定を行った。大腸菌染色体から作成した遺伝子ライブラリーを secY24 変

異株に導入し、*htpG*, *msyA*, *msyB* の 3 種類の遺伝子産物の増加が高温における分泌欠損を回復させることを示した。*HtpG* は熱ショックタンパク質 Hsp90 相同体をコードしており、従来大腸菌では機能不明であったこのタンパク質が分子シャペロン機能によって変異遺伝子産物の機能を補助していること、*msyA* は中性ヒストン類似タンパク質 H-NS をコードしており分泌関連遺伝子の発現制御を介して間接的に分泌過程に影響していること、*msyB* は従来報告の無い新しい遺伝子でありその産物である酸性タンパク質が *secY* タンパク質と相互作用をもつものである可能性を、それぞれ指摘した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、タンパク質の膜透過という複雑な細胞反応をとりあげ、生細胞における生合成後の分泌タンパク質の消長をパルスチェイス標識、細胞分画、及び変異株などを組み合わせて追求すること、また、反応系に関与する因子の遺伝子を同定することの二つのアプローチによって分子機構解明のための基礎知識を得ようとしたものである。

タンパク質膜透過機構の内、前駆体分子の折り畳みを制御する機構については *secB* 遺伝子産物を中心とした、また前駆体の膜への誘導機構については *secA* 遺伝子産物を中心とした研究の進展がみられるが、タンパク質のような巨大分子がどの様にして膜の障壁を通過することができるのかという本質的な問題点については大部分未解決である。この問題を解明するためには、タンパク質が膜を横断する過程をいくつかのサブステップに分けることが必要であり、とりわけ膜透過途上にある中間体分子を検出し、その存在状態を詳しく調べることが有効である。

本論文は、この点について次の新しい知見を得ておりこの分野の進展に寄与するところが大きい。すなわち、シグナルペプチドが切断されているが未だ膜透過の途上にあるマルトース結合タンパク質分子 (processed immature form) の存在を *sec* 変異株を用いることにより初めて明らかにした。これに基づき、膜透過過程を初期と後期の 2 フェーズに分類し、後期フェーズはシグナルペプチドの関与なしに起こり得ることを示唆した。さらに、後期フェーズにはプロトン駆動力および *secY*, *secA* 両遺伝子の機能が必要であることを示した。このような知見は、最近明らかにされつつある試験管内反応での結果と合致しており、それらを生体内反応と結びつける上でも意義が深い。

本論文の第二部においては、マルチコピーサプレッサーの分離と言う大腸菌分泌系の遺伝解析では従来行われなかった方法を実行したことが評価される。この結果 3 種類の遺伝子のコピー数の増加が分泌機構に影響を及ぼし得ることを示した。*HtpG* に関しては、この熱ショックタンパク質の機能についての手掛かりを初めて提供した。*msyA* に関しては、最近種々の遺伝子発現系に影響を与える蛋白因子として注目を集めている H-NS について、その量的増加がもたらす効果の例を初めて明らかにした。*msyB* は新しい遺伝子の記載としてそれ自体に意義があるが、その機能がなんらかの機構で *secY* タンパク質の分泌促進機能を補助するものであることを明らかにしたことは、タンパク質膜透過機構の研究に寄与するものである。これらの遺伝子産物の作用機構についてなされた考察は、生化学的実験により検証される必要があるが、細胞レベルでのタンパク質分泌機構の全体像を知る上で重要な知見となるものと考えられる。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試

問した結果，合格と認めた。