

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	釜阪 紘平
論文題目	Studies on the Transport Mechanism and Physiological Roles of a Cargo Protein of Extracellular Membrane Vesicles from <i>Shewanella vesiculosa</i> HM13 ( <i>Shewanella vesiculosa</i> HM13の細胞外膜小胞積荷タンパク質の輸送機構と生理的役割に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>細菌は、細胞外膜小胞 (EMV) と呼ばれる直径 20-250 nm 程度の膜に覆われた球状の粒子を細胞外に分泌する。EMV は、細胞間コミュニケーションや病原性発現、バイオフィーム形成といった多様な生理機能に関与する。一方、EMV をプラットフォームとするワクチンや薬物送達系、異種タンパク質分泌生産系の開発が注目されている。これらの生理機能の発現機構解明や応用開発を進める上で、EMV の積荷タンパク質の機能や、その EMV への輸送機構を明らかにすることは重要であるが、それらに関する知見はきわめて限定的である。本研究は膜小胞高生産性のグラム陰性細菌 <i>Shewanella vesiculosa</i> HM13 の EMV の主要積荷タンパク質 P49 について、EMV への輸送機構と生理機能の解明に取り組んだものであり、その内容は以下のように要約される。</p>			
1. P49 の EMV への輸送における P49 遺伝子周辺遺伝子群の機能解析			
<p>P49 は <i>S. vesiculosa</i> HM13 の EMV の主要積荷タンパク質であり、外来タンパク質を EMV に輸送する際のキャリアとしてその有用性が期待されている。本菌の全ゲノム解析の結果、P49 遺伝子近傍の遺伝子群が、グラム陰性細菌のタンパク質外膜透過装置である II 型分泌装置 (T2SS) のサブユニットのホモログ (GspE2、GspF2、GspK2、GspD2) や、グリセロホスホジエステルのホスホジエステラーゼ、リポオリゴ糖ホスホエタノールアミントランスフェラーゼ、細胞表層多糖生合成に関与するフリッパーゼ、ニトロレダクターゼのホモログ (それぞれ GdpD、LptA、Wzx、NfnB) をコードすることが見いだされた。P49 の EMV への輸送にこれらの遺伝子群が関与するか調べるため、これらの破壊株を作製した。各遺伝子破壊株から細胞画分、EMV 画分、EMV を除去した上清画分 (PVF) を調製し、P49 の局在性を解析した結果、T2SS のサブユニットホモログを欠損した株では、P49 は主に細胞画分に見いだされた。一方、GdpD、LptA、Wzx、NfnB の各遺伝子破壊株では、P49 は主に PVF に局在していた。以上の結果から、P49 は T2SS 様分泌装置によって細胞外に輸送され、GdpD、LptA、Wzx、NfnB 依存的に生成する EMV 表層成分との相互作用を介して EMV に積み込まれるものと考えられた。</p>			
2. EMV 表層多糖が関与する P49 の EMV への輸送機構の解明			
<p>P49 の EMV への積み込みに関与することが示された Wzx は、リポ多糖 (LPS) の O 抗原多糖や細胞外多糖 (EPS) の生合成において、内膜内葉で合成された多糖前</p>			

駆体をペリプラズム側に輸送するフリッパーゼのホモログである。 *S. vesiculosa* HM13 の LPS には O 抗原多糖が見いだされなかったことから、Wzx は O 抗原多糖の合成には関与しないと考えられた。一方、本菌の EPS を解析した結果、EMV 画分に Wzx 依存的に合成される EPS が存在することが明らかとなった。また、GdpD と LptA も本 EPS の合成に必要であることが遺伝子破壊実験によって示された。次に、EMV と精製 P49 の結合性を *in vitro* で評価した。P49 欠損株由来の EMV と精製 P49 を *in vitro* でインキュベートした結果、P49 が EMV に結合することが示された。EMV への結合に伴って P49 の二次構造が変化して  $\beta$  シート構造が増加することが明らかとなり、また、P49 が結合した EMV の電子顕微鏡観察では、EMV の外周部に P49 を含むと考えられる粒子状構造が観察された。一方、EPS 非生産性の Wzx、GdpD、LptA の各遺伝子破壊株より調製した EMV には P49 は結合しなかった。以上から、P49 は EMV 表層に存在する EPS との相互作用を介して EMV に結合するものと考えられた。NfnB 遺伝子破壊株については EPS の生産が見られたが、本株から調製した EMV に P49 は結合しなかった。これらの結果から、NfnB は P49 との相互作用に必要な EPS の部分構造の生成に関与すると考えられた。

### 3. P49 の生理機能解析

上述のように、P49 は EMV 表層多糖との相互作用を介して EMV に結合するタンパク質であると考えられた。EMV 表層における P49 の機能解明を目的に、野生株および P49 欠損株から調製した EMV をナノ粒子トラッキング解析に供した。その結果、野生株由来の EMV については直径約 72 nm の付近に単一の主要ピークが検出された。このピークは EMV 単量体に由来していると考えられた。一方、P49 欠損株由来の EMV については、単量体と考えられる粒子のピークに加えて複数の EMV の会合体に由来すると考えられるピークも検出された。P49 欠損株由来の EMV に精製 P49 を *in vitro* で添加することで会合体と考えられるピークが消失し、野生株の EMV の粒度分布に類似した単一の主要なピークが検出された。この結果から、P49 は EMV の表層多糖に結合することで、EMV の凝集を抑制しているものと考えられた。P49 は EMV の分散性を高めることで、EMV の表面積を増加させるとともに、細胞から離れた標的への EMV の長距離送達を可能にしていると考えられる。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

細菌が生産する細胞外膜小胞 (EMV) は、細胞間コミュニケーションや病原性発現などにおいて、生理的に重要な多くの役割を担っている。また、ワクチン生産への利用など、応用面でも大きな注目を集めている。これらの生理機能の発現機構を明らかにし、応用開発を進める上で、EMV 局在性タンパク質の生理機能や EMV への輸送機構を明らかにすることは重要である。本論文は、EMV 高生産性のグラム陰性細菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 の EMV の主要積荷タンパク質 P49 について、その生理機能と EMV への輸送機構を解析したものであり、評価すべき点として以下の3点が挙げられる。

1. P49 遺伝子近傍の遺伝子群の網羅的破壊実験により、II 型分泌装置に類似した分泌装置によって細胞外に輸送された P49 が、EMV 表層成分との相互作用を介して EMV に積み込まれることを示す結果を得た。P49 の EMV への輸送機構モデルを提示した成果として意義深い。
2. *S. vesiculosa* HM13 の EMV 画分に、P49 遺伝子近傍の遺伝子群に依存して生合成される多糖が存在することを見いだした。精製 P49 を *in vitro* で EMV に積み込む実験系を構築し、この系を利用することで、P49 が EMV 表層多糖と相互作用することで EMV に積み込まれることを示した。EMV へのタンパク質輸送の新しいメカニズムを見いだした成果として高く評価される。
3. EMV 表層に存在する P49 が、EMV の自己会合を抑制し、分散状態を保持する機能を有することを明らかにした。EMV 積荷タンパク質の新しい生理機能を見いだした成果として注目される。

以上のように、本論文は、EMV 高生産性細菌 *S. vesiculosa* HM13 の EMV 主要積荷タンパク質について、その生理機能と EMV への輸送機構を明らかにしたものであり、分子微生物科学、微生物生理学、応用微生物学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和4年2月9日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）