

(論文内容の要旨)

細胞表面は、細胞形態の維持のみならず、物質、エネルギー、情報の受容と輸送に重要な役割を担っており、その構造（形態）と機能は、細胞の恒常性維持のために厳密に制御されている。従って、個々の微細な局所的性状を除いて、細胞表面に巨大な構造的・機能的変動が生起することは微生物学の予想を超えた現象として位置づけることができる。

土壌より分離された *Sphingomonas* 属細菌 A1 株の細胞表面は、多数の膜状分子で覆われている。A1 株は、細胞外に高分子多糖アルギン酸が存在すると、細胞表面の膜状分子を再編成させて巨大（ミクロンサイズ）な分子器官「体腔」を形成し、それと連動した ABC トランスポーターによりアルギン酸を直接細胞内に取り込む。体腔に相当する部位では、細胞膜が細胞質側に陥入し、そこにアルギン酸が濃縮される。そのため、体腔はエンドサイトーシスに類似した構造と機能を示す。体腔の形成は自在であり、細胞外のアルギン酸が消失すると体腔も閉じる。

本研究では、微生物学の歴史の中で初めて見出された細胞表面に巨大な孔「体腔」を形成する細菌（A1 株）を対象に、細胞表面構造のダイナミクス（動的構造と流動性）及びそれを誘起する細胞表面分子の構造と機能を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、プロテオーム解析により、アルギン酸特異的に誘導発現する A1 株の細胞表面タンパク質を特定した。二次元電気泳動を用いたディファレンシャル解析により、8 種類の細胞表面（外膜）タンパク質 [p1~p4、TonB 依存外膜トランスポーター；p5 と p6、フラジェリン；p7、機能不明リポタンパク質；p8、顆粒結合タンパク質（ホモロジー解析による推定）] が、体腔形成細胞で顕著に発現することを見出した。これらタンパク質の遺伝子破壊株を作製し、そのアルギン酸培地での増殖能を調べた結果、p5 と p7 以外の各遺伝子破壊株はアルギン酸培地で有意な生育遅延を示した。従って、アルギン酸特異的に外膜に発現した少なくとも 6 種類のタンパク質 (p1~p4、p6、p8) はアルギン酸の取り込みに関与することが示唆された。

p1~p4 は、互いに類似した一次構造を有し、グラム陰性細菌の外膜に局在する β バレル構造の TonB 依存トランスポーターと相同性を示した。これまでに、鉄イオン (Fe^{3+}) -シデロフォアを基質とする TonB 依存トランスポーターの存在が明らかにされている。アルギン酸は鉄イオンを強力にキレートするため、p1~p4 がアルギン酸をシデロフォアとして鉄イオンを取り込むトランスポーターである可能性が示された。

第 2 章では、鞭毛を形成しない A1 株の細胞表面にアルギン酸存在下で誘導発現するフラジェリンホモログ p5 と p6 の機能と局在性を明らかにした。p6 遺伝子の破壊により、細胞表面は膜構造から網目構造に変化し、体腔の形成も不完全になる。このことから、p6 は細胞表面における膜構造の構築と体腔の形成に関与していることが示唆された。抗 p5 抗体を用いた免疫電顕観察により、p5 は細胞表面に均一に分布することが分かった。p5 はアルギン酸結合能を有し（結合至適 pH 4.0）、その解離定数は $K_d = \sim 10^{-9} \text{ M}$ と算出された。また、大腸菌フラジェリン FliC もアルギン酸結合能を有することを示した。nM レベルの解離定数を示すタンパク質には、シグナル伝達に関与するレセプターが知られている。従って、A1 株のフラジェリンホモログは鞭毛形成に関与せず、シグナル伝達に関わるアルギン酸レセプターとして機能することが示唆された。

第3章では、リポタンパク質と相同性を示す p7 と顆粒結合タンパク質と相同性を示す p8 の特性を明らかにした。グラム陰性細菌のリポタンパク質は、N 末端にあるリポボックス依存的な脂肪酸残基で外膜と相互作用し、C 末端でペプチドグリカン層と相互作用している。しかし、p7 にはリポボックスが存在せず、アルギン酸で培養した A1 株細胞より精製した p7 は脂肪酸残基を含まない単純タンパク質であった。ゲノム解析により多数のリポタンパク質がアサインメントされているが、本結果はその脂質結合性を精査する必要があることを示唆した。また、p7 はアルギン酸に対する結合性と解離性を示すが ($K_d = 10^{-8} \text{ M}$)、その結合至適 pH は 7.4 であった。p8 は、アルギン酸及びアルギン酸顆粒に対して可逆的に結合することを示した ($K_d = \sim 10^{-7} \text{ M}$)。

上記の結果に基づいて、A1 株における細胞表層の新規な構造と機能を提唱した。細胞表層に発現するフラジェリンホモログはレセプターとして機能し、細胞外のアルギン酸を認識/結合することにより、体腔の形成を促すためのシグナルを発信する。従って、フラジェリンホモログをアルギン酸取り込みと代謝のためのトリガー分子 (アルギン酸センサー) として位置づけることができる。フラジェリンホモログ (p5 と p6) は体腔形成を促し、アルギン酸結合タンパク質 (p7 と p8) が細胞外のアルギン酸を体腔に濃縮した後に、TonB 依存外膜トランスポーター (p1~p4) がアルギン酸をペリプラズムに輸送する。

氏 名

何 金山

(論文審査の結果の要旨)

Sphingomonas 属細菌 A1株 (グラム陰性) は、細胞表層の襞状分子を再編成させて、小胞状構造体である体腔を形成する。体腔は細胞外アルギン酸を細胞表層に濃縮する機能を有し、濃縮されたアルギン酸は体腔と連動した内膜局在性の ABC トランスポーターにより細胞質に輸送される。細胞膜の陥入によって生じる体腔は、細胞膜のダイナミクス (動的構造と流動性) 並びに細胞表層の機能を理解する上で重要であり、真核細胞におけるエンドサイトーシスのモデルとして捉えることもできる。

本論文は、細胞表層に孔「体腔」を形成する A1株を対象に、微生物の形態形成制御、タンパク質とその集合体の動的機能発現機構、及び高分子物質の輸送と処理に関わる斬新な分子装置の実体を明らかにした一連の研究をまとめたものである。評価すべき点は、以下の通りである。

1. A1 株の外膜限定プロテオミクスにより、体腔形成細胞に発現する 8 種類の細胞表層タンパク質 (p1~p8) を見出した。
2. p1~p4 は β バレル構造が外膜に埋もれた形で存在し、体腔に濃縮されたアルギン酸をペリプラズムに輸送する TonB 依存トランスポーターとして機能することを示唆した。
3. 鞭毛を形成しない A1 株のフラジェリンホモログ p5 と p6 は、細胞表層に局在し強力なアルギン酸結合能 ($K_d = 10^{-9}$ M、至適 pH 4.0) を示す。また、その遺伝子破壊株では、細胞表層が襞状から網目状になり、体腔の形成も不完全になる。これらのことから、A1 株のフラジェリンホモログは鞭毛形成に関与せず、体腔の形成を制御するアルギン酸レセプターとして機能することを明らかにした。
4. p7 はリポタンパク質と相同性を示すが、リポボックスをもたず分子内に脂質を含まない。p7 もアルギン酸結合能 ($K_d = 10^{-8}$ M) を示すが、その至適 pH は 7.4 である。p8 は、アルギン酸並びに金属イオン-アルギン酸複合体と結合する ($K_d = 10^{-7}$ M)。p7 と p8 のアルギン酸結合能は解離可能なレベル (μ M レベル) であることから、両タンパク質は体腔におけるアルギン酸濃縮関連タンパク質として機能することを明らかにした。

以上のように、本論文は、微生物学の歴史の中で初めて見出された体腔形成細菌を対象に、細胞表層構造と機能に関わるタンパク質を同定すると共に、リポタンパク質の分類と機能、並びにフラジェリンの機能と局在性及び分子進化に関して新たな概念を提出するものであり、微生物学、細胞生物学、分子系統学、分子進化学、及び生物機能変換学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、平成 21 年 7 月 21 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。