(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	ZHU MENGSHAN
論文題目	Identification and characterization of proteins involved in extracellular membrane vesicle production of <i>Shewanella vesiculosa</i> HM13 (<i>Shewanella vesiculosa</i> HM13 の細胞外膜小胞生産に関与するタンパク質の同定と特性解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>細菌が生産する細胞外膜小胞は、細胞間コミュニケーション、栄養素獲得、自己防御などの重要な生理機能を担っている。また、ワクチンやドラッグデリバリー担体などとしての応用も期待されている。これらの生理機能の発現機構を理解し、応用面の開発を促進する上で、膜小胞生産機構を明らかにすることは重要であるものの、その分子基盤の詳細は明らかにされていない。アジ腸管由来グラム陰性細菌 <i>Shewanella vesiculosa</i> HM13 は細胞表層からの出芽によって著量の細胞外膜小胞を生産し、膜小胞生産機構の解析や、膜小胞を利用した物質生産系の構築に適した性質を有する。本研究は、本菌の細胞外膜小胞生産に関与するタンパク質の同定と特性解析を行い、その生産機構の一端を明らかにするとともに、膜小胞生産性を向上させる手法を提示したものであり、その内容は以下のように要約される。</p>			
1. 外膜-ペプチドグリカン架橋形成関連タンパク質が膜小胞生産に及ぼす影響			
<p>グラム陰性細菌の細胞表層には細胞膜 (内膜) の外側にペプチドグリカン層 (PG) と外膜があり、外膜は主要リポタンパク質 Lpp などにより PG と架橋されている。したがって、外膜からの出芽によって生成する細胞外膜小胞の生産性は、外膜と PG の架橋を弱めることで向上することが期待された。<i>S. vesiculosa</i> HM13 の Lpp、及び Lpp と PG の架橋形成反応を触媒するトランスペプチダーゼ Ldt の遺伝子を破壊したところ、いずれの場合も単位菌体量当たりの膜小胞生産性が親株に対して約 2.5 倍に上昇した。これらの遺伝子を発現プラスミドによって相補したところ膜小胞生産性は低下した。Lpp 欠損株や Ldt 欠損株によって生産された膜小胞の大きさや形態は親株が生産する膜小胞と顕著な違いが無く、膜小胞生産量の増加に伴い、膜小胞の主要積荷タンパク質 P49 の単位菌体量当たりの分泌量は約 2 倍に上昇した。これらの結果から、外膜-PG の架橋を弱めることが本菌の膜小胞生産性を向上させることが示された。</p>			
2. 膜小胞に存在するタンパク質の網羅的同定と機能解析			
<p><i>S. vesiculosa</i> HM13 の膜小胞の機能と形成機構を明らかにする上で、膜小胞に存在するタンパク質を明らかにすることは重要と考えられる。そこで、本菌の膜小胞のプロテオーム解析を行った。本菌の P49 欠損株と親株について、培養上清から超遠心分離とゲル濾過によって高度に精製した膜小胞を解析に供したところ、それぞれ 211 種と 130 種のタンパク質が同定された。P49 欠損株でより多くのタンパク質が同定されたのは、膜小胞に大量に含まれる P49 を欠損させることによって、微量のタンパク質の同定が容易になったことによるものと考えられる。同定されたタンパク質の</p>			

局在性を SOSUI_{GramN} で推定した結果、外膜タンパク質（総タンパク質に対し、P49 欠損株で 33%、親株で 34%）とペリプラズムタンパク質（総タンパク質に対し、P49 欠損株で 25%、親株で 21%）が多く存在することが示された。一方、同定されたタンパク質の機能を配列相同性などに基づいて推定した結果、TonB 依存性受容体、ポリリン、ABC トランスポーターなどの膜輸送体タンパク質や、YaeT 前駆体、NlpB、多糖排出体などの細胞壁や莢膜に関連するタンパク質が多く含まれることが見いだされた。これらの内、細胞表層構造形成への関与が示唆されるリポタンパク質など 10 種のタンパク質について遺伝子破壊実験を行い、機能を解析した。その結果、PG 合成酵素の活性化能を有する LpoA と LpoB のホモログの遺伝子破壊によって膜小胞生産性がそれぞれ 2.7 倍と 14.1 倍に上昇することが示され、これらの膜小胞生産への関与が示唆された。

3. 細胞外多糖合成酵素群が膜小胞生産に及ぼす影響

膜小胞生産に関与する遺伝子群の同定や膜小胞生産性を制御する手法の開発を目的として、*S. vesiculosa* HM13 のランダム変異株ライブラリーのスクリーニングにより、膜小胞生産性が変化した変異株を取得した。膜小胞生産性が親株の 10~20% に低下した 2 種の変異株について変異箇所を解析した結果、*hm3339* 内の異なる箇所が変異していることが見いだされた。配列相同性解析やタンパク質立体構造予測の結果、*hm3339* は多糖合成への関与が示唆されるグリコシルトランスフェラーゼファミリーのタンパク質をコードすることが推定された。また、本菌のゲノム上で *hm3339* の近傍に存在する *hm3337*、*hm3338*、*hm3340* も、それぞれグリコシルトランスフェラーゼと推定されるタンパク質をコードすることが見いだされた。これらの遺伝子の相同組換えによる破壊実験を行った結果、*hm3338* については破壊株が得られなかったが、他の 3 つの遺伝子の破壊株ではいずれも膜小胞の生産性が親株の 10% 以下に減少することが示された。*S. vesiculosa* HM13 では、細胞や膜小胞の表層に存在する細胞外多糖との相互作用によって P49 が細胞や膜小胞に結合していることが示されているが、これらのグリコシルトランスフェラーゼホモログ遺伝子破壊株では細胞や膜小胞への P49 の結合性が著しく低下し、P49 の大部分は膜小胞を除去した培養上清に存在することが示された。これらのうち *hm3339* の破壊株について更に解析を進めた結果、親株に比べて細胞外多糖が著しく減少していることが見いだされた。また、本遺伝子破壊株の電子顕微鏡観察では、細胞表層にバルーン状の大きな突出構造が観察された。これらの結果から、本菌の膜小胞生産への細胞外多糖の関与が示唆され、特に膜小胞を細胞表層から切り離す段階において細胞外多糖が重要な役割を担っているものと考えられた。

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)

細菌の細胞外膜小胞は細胞間情報伝達や栄養素獲得など、生理的に重要な多くの役割を担っている。また、ワクチンや薬物送達担体などとして有用であり、応用面でも大きな注目を集めている。これらの生理機能発現機構を理解し、応用開発を進める上で、膜小胞生産機構を明らかにすることは重要だが、その詳細は不明である。本論文は、膜小胞高生産性細菌 *S. vesiculosa* HM13 を用いて、膜小胞生産に関わるタンパク質の同定と特性解析を行い、膜小胞生産機構の一端を明らかにするとともに、膜小胞生産性を向上させる手法を示したものであり、評価すべき点として以下の3点が挙げられる。

1. 外膜と PG を架橋するリポタンパク質 Lpp や、その架橋の形成を触媒するトランスペプチダーゼ Ldt を欠損させることで、膜小胞生産性が約 2.5 倍に増加することを示した。外膜と PG の架橋を弱めることが本菌の膜小胞生産性を向上させる上で有効であることを示した研究成果として意義深い。
2. 本菌の膜小胞に存在するタンパク質の網羅的同定を行うとともに、それらのうち、PG 生合成酵素の活性化因子である LpoA と LpoB のホモログの欠損が膜小胞生産性を向上させることを明らかにした。膜小胞生産機構の一端を明らかにした成果として注目される。
3. 本菌の変異株ライブラリーのスクリーニングにより、膜小胞生産性が著しく低下した変異株を得た。さらに、その原因遺伝子並びにゲノム上で本遺伝子の周辺に存在する遺伝子群が、細胞外多糖の生合成に関与するグリコシルトランスフェラーゼのホモログをコードすることを見いだした。それらの破壊実験などにより、細胞外多糖が膜小胞生産に重要であることを示唆する結果を得た。膜小胞生産の新しい機構を提唱した成果として高く評価される。

以上のように、本論文は、細菌の細胞外膜小胞生産に関与するタンパク質の同定と機能解析を通して膜小胞生産機構の一端を明らかにするとともに、膜小胞生産性を向上させる方法を提示したものであり、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6年7月26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）