

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	朴 貞河
論文題目	Studies of cold-inducible inner membrane proteins of a psychrotrophic bacterium, <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 (低温菌 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 の低温誘導性内膜タンパク質の研究)		
(論文内容の要旨)			
南極海水から単離された低温菌 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 は 4℃から 25℃で良好に生育するグラム陰性細菌である。グラム陰性細菌は、リポ多糖とリン脂質からなる非対称の外膜と、リン脂質二重膜で構成される内膜の 2 つの細胞膜構造を有しており、それぞれの膜には呼吸や ATP 生産、物質輸送を支える重要なタンパク質が多数存在する。一般に内膜タンパク質の含量は外膜タンパク質の含量に比べて少なく、内外膜が混在した状態で内膜タンパク質を解析することには困難が伴う。本論文は、<i>S. livingstonensis</i> Ac10 の内外膜分離法を確立することによって内膜のプロテオーム解析を可能にし、低温環境適応に関与する内膜タンパク質を見いだしたものである。また、高度不飽和脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸 (EPA) を含有するリン脂質との相互作用が機能発現に重要と考えられる内膜タンパク質を同定したものである。それらの成果は以下のように要約される。			
1. <i>S. livingstonensis</i> Ac10 の内膜と外膜を分離する方法を確立した。本菌の内外膜は、<i>Escherichia coli</i> など、他のグラム陰性細菌の内外膜分離に用いられる方法では分離されなかった。内外膜の密度差が小さいことが一因と考えられた。ショ糖密度勾配遠心分離の条件を詳細に検討することにより内外膜の分離精製法を確立し、内膜と外膜を構成する膜タンパク質と脂質の分析を可能にした。本菌の低温環境適応に重要な EPA は外膜と内膜の両方に存在することを見いだした。			
2. <i>S. livingstonensis</i> Ac10 の低温環境適応に関与する内膜タンパク質を網羅的に解析するために、4℃と 18℃で培養した <i>S. livingstonensis</i> Ac10 から内膜画分を分離し、プロテオーム解析に供した。その結果、52 個のタンパク質が同定された。その中には、これまで内膜における機能が報告されていないタンパク質群（Tpr、PspA、EpsE、DacC、NprA など）が含まれていた。また、膜ストレスに応答しストレスシグナルの伝達や膜安定性に関わるタンパク質（AtoS、PspA）、細胞骨格タンパク質（MreB）、膜タンパク質の輸送や挿入に関わるタンパク質（FtsY）、外膜タンパク質のフォールディングや外膜への輸送に関わるタンパク質（DegP、SurA）など、低温での生産量が増加する 8 種の内膜結合性タンパク質を同定した。低温環境適応における低温誘導性内膜タンパク質の生理的役割を解析するために、それぞれの遺伝子破壊株を作製し、低温での生育速度への影響を解析した。その結果、<i>ftsY</i> 遺伝子破壊株と <i>sdhA</i> 遺伝子破壊株では培養温度に関係なく生育速度が低下することが見いだされた。一方、<i>pspA</i> 遺伝子破壊株と <i>mreB</i> 遺伝子破壊株は、低温でのみ生育能が低下することがわかった。<i>PspA</i> による細胞膜の安定化、および <i>MreB</i> の関与する細胞分裂、細胞骨格形成が、本菌の低温での生育に重要であるものと考えられた。			

3. 蛍光標識した PspA を細胞内で発現させる実験により、本タンパク質が *S. livingstonensis* Ac10 の野生株では細胞の極に局在するのに対し、EPA 欠損株では細胞内に散在することを見いだした。一方、精製した PspA をリポソームに添加する実験により、PspA のリポソームに対する結合力が EPA 含有リン脂質存在下で低下することを見いだした。以上のことから、EPA 含有リン脂質は PspA の局在性を制御しているものと考えられた。

4. *S. livingstonensis* Ac10 において、EPA の欠損による低温での生育速度の低下や細胞分裂障害は、2% から 5% の NaCl を培地に添加することで見られなくなった。NaCl の添加によって誘導生産されるタンパク質群が EPA の欠損による影響を抑制する機能を有している可能性が考えられた。膜タンパク質の網羅的解析により、NaCl 添加培地で生育した EPA 欠損株では、低温誘導性内膜タンパク質の一つとして同定された FtsY の生産量が 3 倍に増加していたことを見いだした。EPA 欠損株に *ftsY* を高発現するベクターを導入したところ、低温での生育速度の低下や細胞分裂不全が見られなくなった。FtsY の適切な機能発現に EPA が関与しており、EPA 欠損による FtsY の機能不全が、FtsY の高発現によって補われたものと考えられた。

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。

(論文審査の結果の要旨)

Shewanella 属細菌は極地や深海、陸上の土壌や淡水域など地球上のさまざまな環境に生息し、生理的多様性をもつ微生物群として知られている。環境浄化などへの生物工学的利用も期待される有用微生物として、それらの多様な環境適応機構が注目されているが、環境適応に関与するタンパク質など、分子レベルでの理解は不十分である。本論文は、南極海水由来の *S. livingstonensis* Ac10 の低温環境適応に関与する内膜タンパク質の網羅的同定と、それらのタンパク質とリン脂質の相互作用を解析したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. *S. livingstonensis* Ac10 はグラム陰性細菌であり内膜と外膜の二種類の膜を有するが、これらの膜を分離する方法を確立した。内膜タンパク質の含量は外膜タンパク質の含量に比べて少なく、内外膜が混在した状態では内膜タンパク質を解析することが難しい。本研究は内膜に存在するタンパク質の同定や機能解析を可能にした点で意義がある。
2. 分離した内膜画分を用いて低温誘導性内膜タンパク質の網羅的同定を行った。本菌の低温適応機構を解析するための基盤となる知見を与えるものであり評価に値する。また、同定されたタンパク質のうち、PspA と MreB が低温での生育に重要であることを遺伝子破壊実験により明らかにした。低温適応に関与する新しいタンパク質を見いだした点で意義深い。
3. 低温適応に関与する PspA の細胞内局在性が EPA 含有リン脂質によって制御されることを見いだした。EPA 含有リン脂質の新しい機能を見いだしたものであり、高く評価される。
4. EPA 欠損による生育速度の低下が、FtsY の高発現によって抑制されることを見いだした。FtsY の機能発現に EPA 含有リン脂質が関与することを示唆する結果であり、EPA の生理機能の一端を明らかにしたものとして特筆に値する。

以上のように本論文は、低温環境に生息する *Shewanella* 属細菌の低温環境適応機構の一端を明らかにするとともに、細胞膜に存在する EPA 含有リン脂質の新しい機能を見いだしたものであり、分子微生物科学、生化学、脂質生物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24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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開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