

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	横山文秋
論文題目	Studies on Production Mechanisms of Extracellular Membrane Vesicles of Cold-Adapted Bacteria (低温菌の細胞外膜小胞生産機構に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
細菌が細胞外に分泌する膜小胞は脂質膜で囲まれた直径 20-250 nm 程度のナノ粒子である。種々のタンパク質や核酸が内包され、グラム陰性細菌由来のものではその膜上にリポ多糖が存在する。膜小胞の生産性、構成成分、機能は、細菌種や生育環境によって大きく異なる。他の細菌や宿主との細胞間コミュニケーション、バクテリオファージに対する自己防御、高分子を分解することによる栄養獲得、毒素の運搬などへの関与が知られている。膜小胞は細胞とは異なるタンパク質組成を有しており、膜小胞への選択的なタンパク質輸送機構が存在すると考えられている。膜小胞生産機構の解明は、膜小胞を基盤とした細胞外物質生産系の開発などに寄与するものと期待されている。しかし、膜小胞生産を制御するメカニズムや、膜小胞への選択的なタンパク質輸送機構に関する知見はきわめて限定的である。本研究は、熱安定性の低いタンパク質の生産系などへの応用が期待される低温菌について、細胞外膜小胞生産機構を解析したものであり、その内容は以下のように要約される。			
1. 低温菌 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 が分泌する細胞外膜小胞の特性解析と膜リン脂質組成改変による膜小胞生産性の向上			
低温菌 <i>S. livingstonensis</i> Ac10 が分泌する膜小胞を単離し、形態や構成成分など種々の特性解析を行った。その結果、本菌の膜小胞の大部分は平均直径 110 nm の脂質二重層からなる単一の膜で囲まれた構造をもつことが明らかとなった。また、本菌の細胞膜に含まれるエイコサペンタエン酸 (EPA) 含有リン脂質や分岐鎖脂肪酸含有リン脂質を欠損させることで膜小胞の生産性が 3-5 倍程度向上することを見出した。さらに、EPA 欠損株では、低温誘導性外膜タンパク質である OmpC176 の膜小胞含有量が、野生株に比べて著しく増加することが示された。先行研究において、EPA 含有リン脂質による膜タンパク質フォールディング促進効果が示唆されていることから、EPA 欠損によってミスフォールドした OmpC176 を細胞外に排出する機構として膜小胞が機能している可能性が考えられた。これらの知見は膜小胞の生産性向上やタンパク質の膜小胞移行の効率化など、膜小胞を利用した物質生産系の開発に寄与するものと考えられる。			
2. 低温菌 <i>Shewanella vesiculosa</i> HM13 における膜小胞生産とバイオフィーム分散の制御機構解析			
膜小胞高生産性低温菌として分離された <i>S. vesiculosa</i> HM13 について、膜小胞の生産制御機構を解析した。膜小胞のプロテオーム解析で見出されたセンサータンパク質			

ホモログ HM1275 の遺伝子破壊株を作製し、その表現型解析を行った。その結果、野生株ではアミノ酸のリシン濃度依存的な膜小胞生産性向上が見られたのに対し、HM1275 の欠損株では同等の生産性向上は見られなかった。HM1275 が細胞外のリシン濃度を感知し、膜小胞生産を誘導するものと考えられた。一方、HM1275 はバイオフィーム分散関連タンパク質 BdlA と配列相同性を有するため、バイオフィーム分散への関与も調べた。リシン添加条件下での野生株のバイオフィーム形成量は HM1275 欠損株と比較して有意に少なかった。さらに、バイオフィーム中の細菌生存率を蛍光アッセイ法によって解析した結果、HM1275 欠損株のバイオフィームでは野生株に比べて死細胞が多いことが見出された。これらの結果から、生育環境に応答したバイオフィーム分散誘導に HM1275 が関与すること、また、これによりバイオフィーム中での細胞死が回避されることが示唆された。

3. トランスポゾンランダム変異による細胞外膜小胞生産関連遺伝子の探索

S. vesiculosa HM13 のゲノムにトランスポゾンによるランダム変異を導入した。得られた変異株ライブラリーの膜小胞生産性を、抗リポ多糖抗血清を用いたマルチドットブロッキング法などで定量した。その結果、野生株に比べて膜小胞生産性が顕著に低下した変異株が見出された。当該変異株においては、シクロプロパン脂肪酸含有リン脂質合成酵素ホモログの遺伝子がトランスポゾン挿入によって破壊されていた。本酵素は膜リン脂質の不飽和脂肪酸鎖をシクロプロパン脂肪酸鎖に変換する反応を触媒することが知られており、この変換反応が膜小胞の効率的な生産に寄与している可能性が考えられた。

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)

細菌が細胞外に分泌生産する膜小胞は細胞間コミュニケーションや自己防御、栄養獲得などにおいて重要な生理的役割を担っている。細胞外物質生産のプラットフォームとしての活用やワクチンとしての利用など、応用面でも注目を集めている。しかし、膜小胞生産の分子メカニズムに関する知見は乏しく、その理解に立脚した膜小胞の高度な利用法開発も難しいのが現状である。本論文は、細胞外膜小胞の生産制御について、特に熱安定性の低い物質の生産宿主等として有用な低温菌における分子メカニズム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. *S. livingstonensis* Ac10 が生産する膜小胞の特徴を明らかにするとともに、膜リン脂質組成の改変により膜小胞生産性が向上することや、特定の膜タンパク質の膜小胞中の含量が増加することを見出した。これは、膜小胞の生産性向上やタンパク質の膜小胞への移行促進をもたらす新しい手法として注目される。
2. *S. vesiculosa* HM13 において、センサータンパク質ホモログ HM1275 が外部環境中のアミノ酸のリシン濃度に応答した膜小胞生産誘導とバイオフィルム分散誘導に関与することを見出した。これは、膜小胞生産の制御機構の一端を解明したものとして評価できる。
3. トランスポゾンを用いて *S. vesiculosa* HM13 のランダム変異株ライブラリーを作製し、膜小胞生産性が低下した変異株を取得することに成功した。当該変異株の解析により、シクロプロパン脂肪酸含有リン脂質合成酵素ホモログが膜小胞生産に関与することを示唆する結果を得た。これは、膜小胞生産機構の解明に寄与する成果として意義深い。

以上のように、本論文は、細菌の細胞外膜小胞の生産に関与するタンパク質を同定するとともに、膜小胞生産性やタンパク質の膜小胞移行性を人為的に改変する新しい手法を提示したものであり、分子微生物科学、応用微生物学、細胞生化学の発展に寄与するところが多い。

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2年2月7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）