

氏名(本籍)	ほん だ きよ ふみ (東京都)		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	博 甲 第 1,331 号		
学位授与年月日	平成 7 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
審査研究科	生物科学研究科		
学位論文題目	Structural and Functional Analysis of A <i>Bacillus subtilis</i> Homologue of 54-kDa Subunit of Mammalian Singnal Recognition Particle (枯草菌における哺乳類 SRP 54 相同因子の構造と機能に関する遺伝生化学的研究)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	山 根 國 男
副 査	筑波大学教授	理学博士	柳 澤 嘉一郎
副 査	筑波大学教授	理学博士	平 林 民 雄
副 査	筑波大学助教授	農学博士	酒 井 慎 吾

論 文 の 要 旨

真核生物において、タンパク質分泌の初期過程は、シグナル認識粒子 (SRP) によって行われる。一方、原核生物においては、シグナルペプチドは SecA タンパク質によって認識される。このように、真核生物と原核生物とでは、タンパク質分泌の初期過程に関わる因子が異なっていると考えられてきた。ところが、近年、原核生物である大腸菌、枯草菌において、真核生物の SRP の構成成分と類似した分子の存在が明らかになってきた。

哺乳類の SRP 7 S RNA と構造的に類似した RNA 分子として、枯草菌には small cytoplasmic RNA (scRNA) が、大腸菌には 4.5 S RNA が存在している。さらに、大腸菌においては、SRP 54 (哺乳類 SRP 54-kDa サブユニット) と相同性を示すタンパク質として、P 48 (*ffh* 遺伝子産物) が同定されていた。本研究では、シグナルペプチドとの結合能、及び GTPase 活性を持つなど SRP の機能上重要である SRP 54 の枯草菌における相同因子の同定、及び構造と機能の解析を行った。

枯草菌 *ffh* 遺伝子をクローン化し、塩基配列を決定したところ、SRP 54 と 32.6%、大腸菌 P 48 と 53.9% の相同性を持つ、446 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。その構造的特徴を見てみると、枯草菌 Ffh は、3 つの GTP 結合モチーフを含むアミノ末端側 (G-ドメイン) と、メチオニンを多く含むカルボキシ末端側 (M-ドメイン) の 2 つのドメインから構成されており、SRP 54 と同様のドメイン構造を有していることが分かった。さらに、SRP 54 の M-ドメインには、両親媒性 α -ヘリックス構造が存在することが予測されているが、枯草菌 Ffh の M-ドメインにも、二次構造の予測上、3 つ

の両親媒性 α -ヘリックス構造 (H1, H2, H3) が存在していた。

次に、枯草菌 Ffh の菌体内での機能を調べるために、枯草菌 *ffh* 遺伝子の発現を IPTG で誘導できるような条件欠損変異株、DF 46株を作製した。DF 46株を IPTG 非存在下で培養した場合、培養開始から約 3 時間で増殖阻害を示し、6 時間後には増殖は完全に停止した。このときの菌の形態は、非常に不規則であり、伸長したり、螺旋状になるなど異常を示した。さらに、タンパク質分泌に対する影響を調べると、IPTG 非存在下で培養した場合には、分泌タンパク質である β -ラクタマーゼ及び α -アミラーゼの前駆体が菌体内に蓄積していた。このことから、枯草菌 Ffh は、菌体の正常な生育に必須の因子であり、また、タンパク質分泌に関与していることが明らかとなった。

枯草菌の全菌体抽出物について、枯草菌 Ffh 抗体で免疫沈降を行うと、scRNA が共沈してくることから、*in vivo* において、Ffh と scRNA は複合体を形成していることが示されていた。そこで、さらに、Ffh と scRNA の結合様式を明らかにするため、Ffh の scRNA 結合領域を同定した。様々な欠失を導入した変異 Ffh と *in vitro* で転写した scRNA との結合をゲル・シフト法により解析した結果、Ffh は SRP 54 と同様に、M-ドメインで scRNA と結合することが分かった。さらに、M-ドメイン中の 3 つの α -ヘリックス構造 (H1, H2, H3) について、(1)H1 領域は scRNA との結合に関与していないこと(2)H2 あるいは H3 のどちらか一方のみを欠失させた場合には、scRNA と結合はするが、結合力が弱まること(3)H2 と H3 の両方を欠失させると、scRNA との結合活性が完全に失われることが分かった。以上の結果から、Ffh の scRNA 結合に関与する領域は、H2 と H3 の両方に存在し、これら 2 つの領域は、協調して scRNA との結合に関与していると考えられた。しかし、この領域には既知の RNA 結合のコンセンサス配列が見られないことから、Ffh は新しいタイプの RNA 結合モチーフを含む可能性が示唆された。

さらに、scRNA との複合体形成により、Ffh のプロテアーゼ感受性が変化することが示された。この結果は、scRNA が Ffh の構造を変化あるいは安定化させることにより、Ffh の機能発現に重要な役割を果たしている可能性を示していると考えられた。

審 査 の 要 旨

タンパク質がその機能を十分に発揮するためには、正しい場所に局在化することが必須であり、タンパク質局在化機構を解明することは生物学上非常に重要である。本論文はそのような立場から、原核生物の中でも胞子形成など複雑な生命活動を営む枯草菌を用いて、タンパク質分泌に関与する Ffh 因子についてその構造及び機能に関して研究を行ったものである。

これまで、真核生物と原核生物とでは、異なった因子がタンパク質分泌に関与していると考えられてきたが、本研究は、原核生物においても真核生物型のタンパク質分泌装置が存在し、実際にタンパク質分泌に関与していることを示している。また、その構造的特徴について詳細な解析を行うことにより、構造と機能の相関についても考察している。これらの意味で本研究は、これまでの定説を覆し、新しい局面の発展をもたらす独創的な研究となっている。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。