

氏名(本籍)	武内桂吾(茨城県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第2,014号		
学位授与年月日	平成11年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当		
学位論文題目	Molecular and Biological Analyses of Presecretory Protein Recognition Mechanism and the Targeting Pathway in <i>Bacillus subtilis</i> (枯草菌における分泌タンパク質前駆体の認識とターゲッティング経路の分子生物学的解析)		
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	小 熊 讓
副査	筑波大学教授	農学博士	田 仲 可 昌
副査	筑波大学助教授	医学博士	中 山 和 久

## 論文の内容の要旨

新たに合成されたタンパク質は、細胞内外の適所へ輸送されて込めて十分な機能を発現する。細胞外へ輸送される分泌タンパク質はN末端にシグナルペプチドと呼ばれる配列を持つ前駆体として合成される。哺乳類ではシグナル認識粒子(SRP)が前駆体のシグナルペプチドを認識する。SRPは6種類のタンパク質と1種類のSRP 7S RNAからなる。SRP構成タンパク質の一つであるSRP54はN末端側のGTP結合領域を持つGドメインとC末端側のメチオニンに富むMドメインからなる。Mドメインは3箇所に両親媒性 $\alpha$ -ヘリックス(h1, h2, h3)を含みシグナルペプチドを認識する。一方、グラム陰性細菌である大腸菌では7種類のSec因子がタンパク質分泌に関与することが明らかになっている。SecBは新たに合成された分泌タンパク質前駆体を認識し、異常なフォールディングを妨げる分子シャペロンである。細胞膜付近には、SecBと分泌タンパク質前駆体を認識し、分泌タンパク質前駆体を膜内装置へ輸送するSecAが存在する。しかし近年、大腸菌においても哺乳類SRP54, SRP 7SRNAの相同因子であるFfhと4.5S RNAからなるSRPが存在していることが示されてきた。

グラム陽性細菌である枯草菌は大腸菌SecAEY相同因子であるSecAEY及びSRP54, 哺乳SRP 7S RNAの相同因子であるFfh, scRNAを持つ。しかし大腸菌SecBの相同因子は存在しない。枯草菌FfhはSRP54と同様にN末端側のGドメインとC末端側のMドメインから成る。枯草菌SecAEY及び枯草菌Ffh, scRNAはタンパク質の分泌に関与することが*in vivo*で示されてきた。しかし、枯草菌SecA, Ffhの分泌タンパク質前駆体認識能は確認されていなかったし、また枯草菌のタンパク質分泌におけるSec系因子とSRP系因子の関係は不明であった。

タンパク質分泌能の強い枯草菌における分泌タンパク質前駆体の認識機構及び細胞質膜へのターゲッティングの分子機構を解析する目的でN末端にさまざまなシグナルペプチドを持つ融合 $\beta$ -ラクタマーゼ前駆体と成熟体を人為的に作成し精製する方法を確立した。これらを基質として用いて、枯草菌Ffhが前駆体のみを認識することを化学架橋法、免疫沈降法で示した。さらに、枯草菌Ffhの部分欠損変異体を用いた免疫沈降実験でMドメイン中のh1-両親媒性 $\alpha$ -ヘリックスを含む領域が前駆体結合に必須であること、Ffhのh1領域の点突然変異体を用いた実験でh1の両親媒性の $\alpha$ -ヘリックス構造とその疎水面が前駆体結合に重要であることが分かった。

次に枯草菌SecAが各融合 $\beta$ -ラクタマーゼ前駆体を認識することを免疫沈降法で明らかにした上で、枯草菌Ffhの添加がSecAの前駆体認識能を15-30倍増加させることが分かった。FfhとSecAが相互作用することはリガンドアフィニティープロット法と2重免疫染色電子顕微鏡法で明らかにした。Ffhと前駆体を反応させ、SecA

を添加したところ前駆体がFfhからSecAへ10分で移行していることが分かった。以上のことからFfhが分泌タンパク質前駆体を第一段階で認識し、それをアンフォールディングな状態に保つ分子シャペロンとして機能しながら、第二段階として前駆体をSecAへと受渡すということが示唆された。

SRP54ファミリータンパク質中の分泌タンパク質前駆体認識部位を特定し、その分子機構を推定できたこと、また *in vitro* 系を利用してSec系因子とSRP系の因子を相互作用させ、前駆体をFfhからSecAに受け渡すことができたことは枯草菌を含めた真正細菌のタンパク質分泌機構における新しい発見であり、Sec系因子、SRP系因子を有する他の生物におけるタンパク質分泌機構を考える上で重要な発見であると考えられる。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

細胞内で合成されたタンパク質は細胞内外の適切な位置に局在化することで初めて機能を発現する。高度なタンパク質分泌能を持つグラム陽性細菌である枯草菌は孢子形成し細胞分化の最も単純なモデルである。枯草菌のタンパク質局在化機構の解析は細胞分化の研究で重要である。

本研究では枯草菌のタンパク質分泌機構を解析した。分泌タンパク質はN末端にシグナルペプチドを持つ前駆体として合成される。枯草菌はタンパク質分泌装置として真核生物で発見されたシグナル認識粒子の相同因子（SRP様粒子）と原核生物に特異的なSecAを持つ。SRP様粒子の構成成分Ffhの分泌タンパク質前駆体結合能とその結合様式及び、分泌タンパク質前駆体の細胞膜ターゲティング過程でのFfhとSecAの相互作用について解析した。その結果Ffhは自身の両親媒性 $\alpha$ -ヘリックス構造h1で分泌タンパク質前駆体を認識し、そのターゲティング過程においてFfhとSecAが一つの経路を構成していることが示された。本研究結果は真正細菌における新知見であり、新たなタンパク質分泌経路を発見したことにより先駆的な研究であると言える。

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。