

| | | | |
|---------|---|--------|--------|
| 氏名（本籍） | Herbert J. Santos | | |
| 学位の種類 | 博 士（ 生物科学 ） | | |
| 学位記番号 | 博 甲 第 | 7333 | 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 27 年 3 月 31 日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 | | |
| 審査研究科 | 生命環境科学研究科 | | |
| 学位論文題目 | Analysis of a Novel Mitosomal β -barrel Outer Membrane Protein in <i>Entamoeba histolytica</i> (赤痢アメーバの新規 β バレル型ミトソーム外膜タンパク質の解析) | | |
| 主査 | 筑波大学教授 | 学術博士 | 橋本 哲男 |
| 副査 | 筑波大学教授（連携大学院） | 博士（医学） | 野崎 智義 |
| 副査 | 筑波大学准教授 | 博士（理学） | 稲垣 祐司 |
| 副査 | 筑波大学准教授（連携大学院） | 博士（医学） | 永宗 喜三郎 |

論 文 の 要 旨

嫌気性の寄生原虫 *Entamoeba histolytica* (赤痢アメーバ) は宿主であるヒトの腸管に寄生し、アメーバ赤痢の原因となる病原体であり、毎年全世界で10 万人がアメーバ赤痢で死亡している。このため *E. histolytica* の医学的・公衆衛生学的重要性は高い。*E. histolytica* にはミトソームという退化型のミトコンドリアと考えられるオルガネラが存在する。ミトソームは典型的な好気的ミトコンドリアの機能をほとんど喪失しており、既知の唯一の機能は典型的なミトコンドリアにはない 硫酸還元経路であると考えられている。筆者は、高度に縮退し未だ不明な点の多いミトソームの機能とその進化を明らかにするために、ミトソームへの物質輸送に参与する膜タンパク質に注目した研究を行い、30kDaの新規 β バレル型膜タンパク質MBOMP30 (Mitosomal/(Mitochondrial) β barrel Outer Membrane Protein of 30kDa) を発見した。その構造、局在、機能に関する生化学的・分子細胞生物学的解析を行い、MBOMP30が*Entamoeba*属への進化の過程で獲得された独自の膜タンパク質であることを明らかにした。

β barrel Outer Membrane Protein (BOMP) の構造モチーフに注目した、*E. histolytica*ゲノムデータベースに対する*in silico* 解析の結果、複数のタンパク質が*E. histolytica*のBOMPと予測された。これらの中から、未知のタンパク質であり予測確率が最も高い、推定分子量約30kDaのタンパク質(EhMBOMP30)を選択して解析の対象とした。EhMBOMP30にはC末端 β シグナルと考えられるモチーフが存在したが、*Entamoeba*属の他種におけるホモログを除き公的データベース内のいかなる配列とも有意な類似度を示さなかった。EhMBOMP30を大量発現して精製し、円偏光二色性(CD)および遠紫外(far-UV)スペクトル解析を行った結果、EhMBOMP30が β シート構造を豊富に含むことが明らかとなり確かに β -バレル型タンパク質であると考えられた。遺伝子サイレンシング法によりEhMBOMP30をノックダウンすると、*E. histolytica* は全く生育できないことから、EhMBOMP30が生存に極めて重要な必須タンパク質であることが示された。免疫沈降法およびBlue Native ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いた解析から、EhMBOMP30は240kDa程度の複合体として存在する可能性が示唆された。免疫蛍光抗体法による細胞の

イメージング解析およびPercollを用いた密度勾配遠心による精製ミトソーム画分に対する免疫ブロット解析の結果から、EhMBOMP30のミトソームへの局在が示された。引き続き、炭酸ナトリウム処理による分画法、プロテアーゼKプロテクションアッセイ、免疫電子顕微鏡法を用いてミトソーム内部の局在を詳細に検討した結果、EhMBOMP30はミトソーム外膜に埋めこまれたタンパク質であることが明らかとなった。一方、 β シグナルの役割を明らかにするために、 β シグナルを削除したタンパク質による解析を行ったところ、 β シグナルを欠失してもEhMBOMP30のミトソームへの局在に影響を及ぼさないが、240kDa複合体の形成が阻害されるとの事実が明らかとなった。

これらの実験結果を踏まえて筆者は、*Entamoeba*属のMBOMP30は構造的にも機能的にも新規のBOMPであり、真核生物のMBOMPの7番目のクラスに位置付けられるものであるとの結論を下した。これにより、バクテリアの多種多様なBOMPの知見に比べ未知な点の多い真核生物のBOMPに関して、その多様性の一端を明らかにすることに貢献した。

審 査 の 要 旨

筆者は、配列の類似度解析のみによっては検出できない新たな β barrel型膜タンパク質(EhMBOMP30)を、構造モチーフに注目した解析によって検出し、その二次構造を実験的に検証するとともに、詳細な生化学的・分子細胞生物学的実験手法を用いて当該タンパク質の特徴づけを行った。困難と考えられる結晶構造解析以外のあらゆる手段を駆使して構造・機能解析に取り組み、生育に必須な新規ミトソーム膜タンパク質の存在を明確に示した点は生物科学の研究成果として高く評価できる。

筆者が示唆したように、真核生物のMBOMPはこれまでの知見を超えてはるかに多様である可能性が高く、今後、典型的なミトコンドリアを欠くさまざまな嫌気性真核生物でMBOMPを探索することがミトコンドリア関連オルガネラへの物質輸送のメカニズムとその進化を解明する上で必須である。筆者の研究は、そのようなアプローチの端緒を切り開いたパイオニア的なものと考えられ、生物科学の研究成果として高く評価できる。

平成27年2月6日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。