

論文審査の結果の要旨

氏名 松林 英明

本論文は6章からなり、第1章の「序説」では研究の背景と問題点について、第2章の「方法」では実験材料や実験手法について、第3章の「結果」は実験結果とその解釈について、第4章の「考察」では本論文で得た知見についての総括的な議論と将来展望について述べられている。また、第5章、第6章ではそれぞれ参考文献と謝辞が記載されている。

第1章の「序説」においては、まず、膜タンパク質を調製する方法としての無細胞翻訳系の有用性と研究の背景を説明し、次に、これまでの無細胞翻訳系での膜タンパク質合成の問題点として、脂質膜への膜タンパク質の再構成が自発的膜挿入に基づいていることから、合成できる膜タンパク質に制約があることに言及している。そして、この課題に対する解決方策として、細胞の膜タンパク質合成装置である Sec トランスロコンを利用して無細胞翻訳系を拡張させる方法を挙げている。さらに、Sec トランスロコンの構造や機能を説明したうえで、大腸菌の SecYEG トランスロコンの生合成機構の未解明な点についても言及している。最後に、上記の背景に基づいた研究目的として、SecYEG の生合成過程で必要になる因子を再構築型の無細胞翻訳系でボトムアップに解析することと、無細胞翻訳系内に SecYEG トランスロコンを再構築し、受容体のような細胞外ドメインを持つ膜タンパク質などについても合成が可能な膜タンパク質合成系を構築することが設定されている。

第3章の「結果」においては、まず、第1節から第4節で、無細胞系内で合成した SecYEG が自発的にリポソームの脂質膜に膜挿入し、複合体を形成することを、Flotation 法や Blue Native PAGE を用いた実験から示している。第5節では、pOmpA の膜透過活性と SecA の ATPase 加水分解活性から、合成した SecYEG の機能を評価し、Blue Native PAGE 上で複合体が観察される条件で膜透過活性が見られることと、合成した SecYEG の活性が大腸菌から精製した SecYEG の活性と同等であることを示している。以上の結果をもとに、無細胞翻訳系内で SecYEG を合成することが可能であり、SecYEG の複合体形成の過程には、他のタンパク質の働きが必要ないことを明らかにしている。続いて、第6節では、pOmpA の膜透過活性と SecA の ATPase 活性の測定を指標に、無細胞翻訳系で合成した SecY の変異体の評価を行い、*in vivo* の実験では明らかにならなかった変異体の特性を同定することに成功しており、精製の難しい膜タンパク質について再構成系での機能解析を可能にする手法として無細胞翻訳系が有用であることを示している。第7節と第8節では、親水的ドメインを持つ膜タンパク質である YidC と LepB を基質として SecYEG が膜タンパク質を膜挿入する活性を評価しており、SecYEG の合成に

よってこれまでの無細胞翻訳系では合成が難しかったタイプの膜タンパク質についてもトポロジーを制御した合成が可能になることを実験的に示している。また、第9節では、SecYEGの複合体形成と機能発現における脂質組成の影響について解析し、SecYEGの活性が脂質環境に依存することと、大腸菌のSecYEGの活性を促進する糖脂質(MPIase)と同じ分子がsoybean脂質の中に存在する可能性を示唆する結果を示している。さらに、第10節から第15節では、蛍光1分子観察系に対する無細胞翻訳系の応用性を議論し、実際に無細胞翻訳系で合成し蛍光標識したSecYEの脂質膜上での動きを全反射顕微鏡で直接観察することに成功している。なお、第9節は岩手大学西山賢一研究室との共同研究、第12、14、15節は東京大学野地博行研究室との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上から、本論文では、これまでの無細胞翻訳系における膜タンパク質合成の課題に対して、「Secトランスロコンの利用」という解決方策を立て、実際にSecYEGの構築によって無細胞翻訳系を拡張し、これまで合成が難しかったタイプの膜タンパク質の合成が可能になることを実験的に示している。また、無細胞翻訳系が膜タンパク質の機能解析や蛍光1分子観察に有用であるという応用例を示すに至っている。さらに、本論文は、SecYEGの生合成の機構においても、少なくとも*in vitro*の実験系においては他の膜タンパク質の働きを必要としないという新規の知見を与えるものである。したがって、論文提出者に対して、博士(医科学)の学位を授与できるものと認める。

以上 1929 字