

# 博士論文審査報告書

氏名	菅 公秀 (か ともひで)
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	博理第100号
学位授与報告番号	甲第296号
学位授与年月日	平成29年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条1項
論文題目	新規フォールディングプローブを用いた生細胞内におけるタンパク質膜透過の定量解析とその応用
論文審査委員	(主査) 教授 吉田 秀郎 (副査) 教授 梅園 良彦 (副査) 教授 阪口 雅郎 (副査) 教授 秋山 芳展 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所)

## 1. 論文内容の要旨

膜タンパク質の生体膜への組み込みおよび選択的オルガネラ局在化は、細胞活動に必須である。これまでに、タンパク質のオルガネラ標的化、膜透過トンネルの形成、膜透過の駆動などに関連する因子が個別に明らかにされてきた。現在、細胞内での、これらの因子群の連携や、リボソームでの新生鎖の伸長と膜透過との共役に関する知見、透過トンネルにおける新生鎖の配列認識に関する知見などが求められている。本研究では、これらの課題にアプローチできる新規プローブを開発した。プローブは、セムリキ森林ウイルス (SFV) のカプシドプロテアーゼドメイン (CP) に EGFP レポーターを融合したもので、アミノ末端にオルガネラ標的化シグナルを融合し、培養細胞でそれぞれの膜での透過を解析した。その結果、CP-ドメインは細胞の小胞体内腔、ミトコンドリアマトリクス、小胞体膜上、いずれでも細胞質同様に活性を発揮し、直後のペプチド結合を切断し EGFP ドメインを遊離することが確認された。小胞体膜の透過系では、CP-ドメインは小胞体内腔に到達するまで活性を発揮しなかったことから、細胞内でもポリペプチド鎖の伸長と小胞体膜透過は強く共役すると結論された。ミトコンドリア輸入系では、疎水性セグメントを多数有する膜タンパク質 ABC 輸送体ですら伸長と透過の共役が小胞体ほど強くないことが明らかになった。さらに、小胞体膜透過が、新生鎖上の疎水性アミノ酸の数に応じて抑制されることや、正電荷アミノ酸によっても同様に抑制されることなどが培養細胞を用いて実証された。このプローブを用いて、出芽酵母の小胞体膜透過に関連する 60 個の遺伝子について解析をおこない、小胞体膜内在性因子のみならず、小胞体内腔の可溶性因子、細胞質の因子の欠損

によって小胞体膜透過トンネルが質的に変化することを見出した。以上のように、新規フォールディングプローブは新生タンパク質のオルガネラ膜透過前の存在状況および滞留時間の解析のみならず、これまで感知できなかったタンパク質輸送装置の質的変動を鋭敏に検出可能なことが実証された。

## 2. 論文審査結果

タンパク質のオルガネラ局在化は細胞の生命活動の根幹をなすシステムである。本論文では、自己切断活性をもつエンドプロテアーゼ CP を活用した新規タンパク質プローブ（フォールディングプローブ）を開発し、細胞内でのタンパク質の局在化における、ポリペプチド鎖の立体構造形成状況の評価を可能とした。これによって、リボソームでのポリペプチド鎖の伸長と膜透過との共役状況を鋭敏に評価でき、さらにオルガネラ膜での膜透過トンネルの質的な変動を簡便かつ鋭敏に検出できた。また、多様な人工配列を導入したモデルタンパク質の培養細胞における膜透過を、導入配列によらずに簡便に定量できるというこれまでにない利点を有することも示された。実際に細胞におけるオルガネラ膜透過に適応し、小胞体における膜透過はリボソームにおける伸長との共役がきわめて強いこと、ミトコンドリア輸入では伸長と透過が小胞体ほど強く共役していないことが明らかとなった。さらに、このプローブを駆使して、小胞体内腔因子による膜透過トンネルの機能制御の発見や、多様な因子がトンネルでの疎水性配列の透過に影響することなどの発見がなされた。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

また、平成29年1月26日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。