氏　名	佐　藤　隆　則（さとう　たかのり）
学位(専攻分野)	博　士　（学　術）
学位記番号	博　乙　第　34　号
学位授与の日付	平成 7 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	真核細胞のオルガネラ膜におけるアミノ酸及び蛋白の膜輸送に関する研究
審査委員	（主査）教授 牧野圭祐 教授 遠藤泰久　教授 宗川吉汪

論文内容の要旨

本論文は、真核細胞中のオルガネラの物質膜輸送に関する研究の結果を記載しており、特に細胞機能維持の基本物質であるアミノ酸ならびに蛋白がどのような機構で輸送されるかに関する基礎研究の結果を記載している。

第1章には、酵母液胞膜のアミノ酸輸送系に関する研究の結果がまとめられている。酵母細胞のオルガネラの一つである液胞内部には、種々の加水分解酵素、塩基性アミノ酸やポリ燐酸などの化合物が高濃度で蓄積されており、このオルガネラの生理的な機能を考える上では、アミノ酸等の輸送が重要な意味を持っている。1981年、酵母液胞膜小胞の精製法が確立され、液胞膜に H^+-ATPase が存在し、生じた膜ポテンシャルがアミノ酸やイオンの液胞膜輸送のエネルギーとなっている事が示された。しかし、液胞膜にどれだけのアミノ酸輸送系が存在しているかや輸送系の特性については未解明のまま残されていた。本研究では、酵母液胞膜小胞を精製し、反応速度論的方法によってアミノ酸輸送蛋白の性質（Kt 値や Vmax、至適 pK、能動輸送の場合にはその輸送エネルギー）を解明した。液胞膜のアミノ酸輸送に関して本研究で得られた研究結果は、(1)酵母液胞膜を介して 10 種類のアミノ酸が能動輸送される、(2) 7 つの独立した H^+ / アミノ酸対向輸送系が存在し、塩基性アミノ酸の輸送系としてはアルギニン特異的、アルギニン-リジン特異的、ヒスチジン特異的なシステムの 3 種類がある、(3)液胞内部に蓄積されたヒスチジンの化学ポテンシャルを利用してアルギニンを取り込む交換輸送システムが液胞膜に存在する、などまったく新規な事実であった。この様に酵母が液胞内部へアルギニンを蓄積するために、液胞膜に 3 種類もの異なった輸送システムを備えているという事を発見した。

細胞中における蛋白の膜輸送は、小胞体で顕著である。翻訳過程で生産された蛋白の小胞体への膜輸送は次のような機構で行われる。シグナルペプチド領域がシグナル識別粒子（signal recognition particle, SRP）に認識され結合すると、SRP がリボソームにまたがって存在しているために、蛋白合成が一時停止し、この SRP ―リボソーム複合体は小胞体膜上の SRP 受容体に選択的に結合する。ついで SRP がはずれ、リボソームが小胞体膜上に固定されて翻訳が再開される。蛋白はこうして小胞体膜から小胞体内腔へと翻訳されつつ輸送される。このような小胞体における蛋白の輸送に関しては、「蛋白の小胞体膜輸送やその後の修飾、立体構造形成はそのアミノ酸配列だけで決定されるのではなく、翻訳される別の蛋白との相互作用も関係するのではないか」という仮説をたて、これを立証するための研究材料として、日本脳炎ウイルスのエンベロープ（E）蛋白を選んだ。E 蛋白に対する抗体はウイルスを中和する活性があり、E 蛋白は防御抗原の中心であるとともに、赤血球凝集活性やレセプターとの結合活性など多くの機能を有する。また、E 蛋白に対するモノクローナル抗体を使って、そのエピトープが表現されたかどうかを指標

に発現蛋白の立体構造を調べる事ができる点も有利な材料である。さらに日本脳炎ウイルスの全cDNAもクローニングされている。そこで申請者は、組換えDNA技術によってE蛋白の一部を欠損させたり、あるいはE蛋白以外のウイルス蛋白をともに発現させた場合にE蛋白の膜輸送や立体構造がどう影響をうけるかを解析し、得られた結果を第2章および第3章にまとめた。詳細な研究の結果、E蛋白の膜輸送に関しては、(1)E蛋白がウイルス本来の抗原性を有するような構造を持つためにはE蛋白だけでなくprM（ウイルスのメンブレン蛋白の前駆体）蛋白も含めて発現させることが必要である、(2)E蛋白粒子の産生だけでなく日本脳炎ウイルスの構造蛋白のプロセッシングに、ウイルスの非構造蛋白であるNS3蛋白のプロテアーゼ作用が必要である、(3)E蛋白の一部分だけを発現させてもウイルス本来の抗原性は有しないし粒子も形成しないが、B型肝炎ウイルスの表面抗原（HBsAg）との融合蛋白として発現させると粒子形成し、エピトープの提示も改良される、という実験成果が得られた。この様に本研究によって、輸送される対象蛋白のアミノ酸配列が同じであっても他の蛋白の存在が、対象蛋白の産生量や立体構造形成に大きく影響を与えることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

佐藤隆則氏の博士論文について詳細な審査を行った。論文は、「真核細胞のオルガネラ膜におけるアミノ酸及び蛋白の膜輸送に関する研究」という課題であり、5編のレフリー付きの国際的に評価の高い欧文学術雑誌に報告されたものをまとめたものであるが、詳細かつ論理的に記述されている。本論文に記載された研究内容は、真核細胞中のオルガネラの物質膜輸送に関する研究の結果を記載しており、特に細胞機能維持の基本物質であるアミノ酸ならびに蛋白がどのような機構で輸送されるかに関する基礎研究の結果がまとめられている。アミノ酸の酵母液胞膜輸送に関しては、(1)10種類のアミノ酸が能動輸送される、(2)7つの独立したH^+／アミノ酸対向輸送系が存在し、塩基性アミノ酸の輸送系としてはアルギニン特異的、アルギニン-リジン特異的、ヒスチジン特異的なシステムの3種類がある、(3)液胞内部に蓄積されたヒスチジンの化学ポテンシャルを利用してアルギニンを取り込む交換輸送システムが液胞膜に存在する、などまったく新規な事実が明らかにされている。また、E蛋白の膜輸送に関しては、(1)E蛋白がウイルス本来の抗原性を有するような構造を持つためにはE蛋白だけでなくprM（ウイルスのメンブレン蛋白の前駆体）蛋白も含めて発現させることが必要である、(2)E蛋白粒子の産生だけでなく日本脳炎ウイルスの構造蛋白のプロセッシングに、ウイルスの非構造蛋白であるNS3蛋白のプロテアーゼ作用が必要である、(3)E蛋白の一部分だけを発現させてもウイルス本来の抗原性は有しないし粒子も形成しないが、B型肝炎ウイルスの表面抗原（HBsAg）との融合蛋白として発現させると粒子形成し、エプトープの提示も改良される、などの新規な事実を明らかにした。

以上、本論文には、真核細胞のオルガネラの膜を介したアミノ酸ならびに蛋白の輸送の基礎的研究の結果が、詳細かつ論理的に記述されている。記載内容は5編の国際的学術雑誌に報告されており、うち3編は申請者を筆頭著者として報告がなされており、本学の博士号（学術）を授与するに十分値するものと結論する。よって本審査委員会は、佐藤隆則氏の提出された学位申請論文が本学の学位を申請するのに十分な高い程度を持っていると結論する。