

博士學位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第43号

2017年9月

京都産業大学

は し が き

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日文部省令第 9 号）第 8 条の規定による公表を目的とし、平成 29 年 9 月 16 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位番号に付した甲は学位規則第 4 条第 1 項によるもの（いわゆる課程博士）であり、乙は同条第 2 項によるもの（いわゆる論文博士）である。

目 次

課程博士

1. Waraphan	<small>ワラファン</small> トニ-ティ Toniti	[博士 (生物工学)] …	1
-------------	---	---------------	---

氏名（本籍）	Waraphan Toniti (タイ)
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工第28号
学位授与年月日	平成29年9月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	Structural and Functional Studies of <i>Clostridium perfringens</i> Iota-like Enterotoxin (CPILE)
論文審査委員	主 査 津下 英明 教授 副 査 黒坂 光 教授 " 横山 謙 教授

論文内容の要旨

この論文は新たに発見された食中毒関連毒素の構造と機能について研究を行ったものである。ウェルシュ菌による食中毒はエントロトキシン（CPE）という毒素によって引き起こされる。しかしながら、近年日本で発生した数件の食中毒は、CPE欠損のウェルシュ菌によるものであることが疑われた。新たな原因毒素としてbinary毒素が見つかり *C. perfringens* iota-like enterotoxin (CPILE) と命名された。ウェルシュ菌のIota毒素 (Ia) との類似性から、CPILEはCPILE-a (アクチン特異的なADP-リボシル化毒素) とCPILE-b (CPILE-aを細胞内に輸送する透過装置) からなると考えられる。今回申請者は、CPILE-aの結晶構造を3種類の状態で、つまり基質なし・NAD⁺複合体 (本来のADP-リボシル化の基質)・NADH複合体、各々で明らかにした。さらに点変異体の解析を行い、ADPリボシル化の基質であるアクチンとの結合に関わるアミノ酸を特定した。論文は下記の6章から構成されている。

1章：CPILE-aの結晶化と構造解析

アミノ酸配列の類似性から、立体構造もIaと類似した構造が得られると予想されたが、幾つかの大きな構造の違いが見つかった。特にCPILE-aはIaにはない2つのExtra Protruding Loop (PT-IとPT-II) を持つことがわかった。

2章：NAD⁺複合体とNADH複合体の構造解析

apo-CPILE-a結晶にNAD⁺およびNADHをソーキングすることでその構造を得た。Iaと比較するとNAD結合部位の構成アミノ酸に大きな変化はなく、また立体構造に大きな差はないが、活性部位が非常に狭いことがわかった。

3章：NAD glycohydrolase活性の解析

アクチンがない時IaはNAD glycohydrolase (NADase)の活性を持つ。しかしながら、CPILE-aのこの活性は非常に弱く、ほぼないことが明らかになった。さらにアクチンを加えた時のNADaseの活性を解析したところ、CPILE-aではIaでは見られない分解産物が得られた。現時点でこの産物が何かは同定できていない。

4章：CPILE-aとIaのアクチン結合部位の点変異体解析

Iaと基質タンパクのアクチンとの複合体との結晶構造から、CPILE-a-actin複合体のモデルを構築し、アクチン結合部位と思われるアミノ酸の変異体を作成して、その役割を検討した。この結果から、CPILE-aは β/γ アクチンに対するADP-リボシル化活性は、 α アクチンに対する活性のわずか36%であり、ボツリヌス菌の酵素C2-IIが β/γ アクチンしかADPリボシル化しないこととは対照的であることがわかった。またIaは2つのドメインからなり、C末端ドメインにNAD⁺が結合し、この周りの5つのループ(N末端ドメインのloop-I、C末端ドメインのloop-II~V: loop-Vには基質アミノ酸Arg177の認識に関わるARTT-loopの2つのGluも存在する)がアクチンとの結合に関与していることがわかっていたが、CPILE-aでは、loop-II~IVと領域外のPT-Iの変異体も α アクチンとの結合すなわち活性に影響することがわかった。

5章：I222結晶でE49R点変異体はADPリボシル化されるか？

I222結晶において、隣の分子が近接し、もしE49Rの変異体結晶であれば、このArgが基質アクチンのR177のミミックとなりADPリボシル化されるかもしれないとの仮説から、E49R点変異体作成、この結晶化(I222)、結晶へのNADソーキングを行い、X線構造解析を行った。結果は、残念ながらADPリボシル化はされなかった。

6章：考察と最終的結論

ADPリボシル化酵素の基質タンパク質の認識(アクチンとの結合に何が必要か)と基質アミノ酸(Arg)の認識について考察を行っている。

論文審査結果の要旨

C. perfringens iota-like enterotoxin (CPILE) は発見されたばかりの毒素である。国立医薬品食品衛生研究所の鎌田らにより、この名前がつけられた。CPILE はウェルシュ菌由来のバイナリー毒素 *iota* 毒素に類似しており、CPLIE-a と CPLIE-b からなる。両者の混合により、腸管を用いた Fluid accumulating 活性が見られることから、エントロトキシン欠損株における食中毒の原因毒素と考えられる。しかしながら、構造を含めて、その分子の詳細な研究はない。この研究により CPILE-a の構造と機能についての理解が進み、Ia との類似と相違点が明らかになった。重要な構造の違いは、活性がある C ドメインにあり、2つの Extra Protruding Loop (PT-I と PT-II) を持つことが明らかにされた。また、この Extra Protruding Loop はアクチンの認識に関わると予想されたが、実際の変異体解析により、PT-I および NAD 結合部位の周りの loop-II~IV が重要であることを示した。Iota 毒素 Ia (アクチン特異的 ADP リボシル化毒素) は 2003 年に結晶構造と機能解析が行われ、さらにその基質であるアクチンとの高次複合体構造が知られている (Tsuge et al. JMB(2003), Tsuge et al. PNAS(2008))。Ia は、このグループの毒素では構造と機能の研究が一番進んでいるが、アクチン認識部位の詳細な点変異体の解析は行われていなかった。申請者の研究は、CPILE-a のみならず、Ia でも詳細な研究を行い、さらに α および β/γ アクチンでその認識が異なるかを詳細に調べた点で評価できる。

この結果は、主論文として PLOS ONE へ採択となったが、論文準備中に競合グループの構造 (apo-BECa と NADH-BECa) のみの論文が BBRC へ掲載された。申請者の論文は、構造だけでなく、変異体の解析までを含め、アクチン認識部位を特定しただけでなく、Ia との比較を詳細に行いその違いを明らかにした点が大きな違いであり、研究の質は高い。また当初は、NAD 結合部位の構造は CPILE-a と Ia で大きな違いはないと予想され、実際に構造解析の結果も、大きな差は見られなかった。しかしながら、十分な NADase 活性が見られる Ia と比べて CPILE-a は活性が見られなかった。さらにアクチン存在下で NADase 活性が見られるのではとの期待から、その活性を検討したところ、Ia とは明らかに異なる産物が生じた。その産物の同定を質量分析で試みたが、未だ同定に至っていない。面白い知見であり、今後の検証が望まれる。さらに、再度結晶構造を見直すことにより、その NAD 結合部位のクレフトは、Ia と比較して狭いことを見出した。この知見が NADase 活性の違いに関係あるか、さらなる検証が必要である。

また、主たる実験方法は X 線結晶構造解析で CPILE-a の構造を明らかにしたわけであるが、申請者は最初に分子置換法、セレンメチオニン導入での位相決定法を試みたが良い位相は得られず、最終的にシステインを導入した変異体を作成して、結晶に水銀あるいはプラチナをソーキングし、MAD (多波長異常分散法)、SAD (単波長異常分散法) で構造決定を行った。このように様々な方法に取り組んで、最終的に位相決定に成功したことは、博士の学位に相当すると考えられた。

予備調査においては、いくつかの事柄で、加筆・修正が必要であると指摘されたが、本審査の論文においては、これらの指摘に対して、適切な加筆・修正が行われていることが確認された。本学位論文は、新しい外毒素タンパク質の構造と機能に関する重要な知見を提唱しており、その内容を論理的に記述している。

さらに博士論文公聴会では、英語で発表を行い、バックグラウンドの説明、実験結果の説明、構造と活性に関する議論を論理的に適切に行った。また発表に続く質疑応答に対しても、的確な応答がなされた。

最終的に、申請者が持つ学術的な見識と専門知識は、いずれも高い水準にあると判断された。

したがって、調査委員は申請者を「博士の学位水準を満たしており合格」と判定した。