

論文審査の結果の要旨

報告番号	博（生）甲第182号	氏名	久松 啓伍
学位審査委員	主査 副査 副査 副査	畠山 智充 小田 達也 岩尾 正倫 郷田 秀一郎	
論文審査の結果の要旨 久松啓伍氏は、平成16年3月に長崎大学工学部応用化学科を卒業し、平成18年3月に同大学院生産科学研究科（博士前期課程）海洋生産科学専攻を修了して修士の学位を取得した。引き続き同年4月に同大学院生産科学研究科（博士後期課程）海洋生産科学専攻に入学、現在に至っている。 同氏は、この間、棘皮動物グミ（<i>Cucumaria echinata</i>）が産生する溶血性レクチンCEL-IIIの構造と機能の解明に取り組んできた。その結果をまとめ、平成20年12月に主論文「溶血性レクチンCEL-IIIの細胞膜孔形成機構に関する研究」を完成させ、審査付き論文3編を含む参考論文4編を添え、長崎大学大学院生産科学研究科教授会に博士（工学）の学位を申請した。 長崎大学大学院生産科学研究科教授会は、平成20年12月17日の定例教授会において論文内容の要旨を検討し、本論文を受理しても差し支えないものと認め、上記の通り審査委員会を選定した。委員は、主査を中心に論文内容を慎重審査し、公開論文発表会で発表させるとともに、口頭による最終試験の結果を平成21年2月18日の研究科教授会に報告した。 提出論文は、溶血性レクチンCEL-IIIが溶血活性を発現する際に、標的細胞表面で細胞膜孔を形成するメカニズムをタンパク質構造の動的な変化との関連から明らかにしたものである。CEL-IIIは、Ca^{2+}依存的に糖鎖と結合するCa^{2+}依存性糖結合タンパク質（レクチン）の一種であり、分子質量47.5 kDa、1本鎖のポリペプチドから成り、立体的構造上3つの構造単位（ドメイン-1、ドメイン-2、ドメイン-3）から構成されている。このうち、ドメイン-1/2は細胞表面糖鎖との結合を担うドメインであり、CEL-IIIが細胞表面に結合後、ドメイン-3を介して、細胞膜内で会合体（オリゴマー）から成る細胞膜孔（ポア）を形成することにより溶血活性や細胞毒性を発現する。このようなタンパク質の立体構造変化を伴う細胞膜孔形成は、細菌由来の膜孔形成毒素の発現機構と類似するものであるが、さらに、アルツハイマー病などのコンフォメーション病の発現機構とも共通するものである。本研究は、このようなCEL-IIIの膜孔形成機構を、ペプチド合成、遺伝子組換え技術、X線結晶構造解析等の手法を用いて分子レベルで明らかにすることを目的とした。 本研究では、まずCEL-IIIのドメイン-3に存在する2本のαヘリックスを含む領域が、疎水性の高い領域に相当することに着目し、このαヘリックス領域の配列を有する数種類のペプチドを化学合成し、その溶液中での立体構造ならびに細菌細胞膜に対する作用について検討した。その結果、αヘリックス領域の配列を有するペプチドは、水溶液中や人工脂質小胞（リボソーム）存在下ではむ			

しる自発的に β シート構造を形成することが明らかになった。さらに、これらのペプチドは、細菌細胞膜に作用し、チャネルを形成することによって膜の物質透過性を著しく高め、抗菌活性を発現することが示された。このことから、CEL-IIIの α ヘリックス領域は、水溶液に露出すると自発的に β シートへと構造を変えるとともに、細胞膜などの脂質膜と相互作用する性質を有することが明らかとなった。

次に、 α ヘリックス領域ペプチド及びCEL-IIIのドメイン3全体をグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) のC-末端に付加した融合タンパク質を大腸菌により発現させ、得られたタンパク質の性質について検討を行った。その結果、GST単独の場合は安定な2量体を形成するのに対して、いずれの融合タンパク質も分子量の大きなオリゴマーを形成することが判明した。このことから、オリゴマー化はドメイン-3のみならず、 α ヘリックス領域ペプチドのみでも引き起こされることが明らかになり、溶血過程においてもCEL-IIIのオリゴマー化に α ヘリックス領域が重要な役割を果たしているものと考えられた。

CEL-IIIの膜孔形成に基づく溶血活性発現機構をさらに詳細に検討するために、CEL-IIIの全領域を含む組換え型タンパク質 (rCEL-III) についても大腸菌により発現を行った。rCEL-IIIについては、ドメイン-3内の様々なアミノ酸残基の変異体を作製したところ、 α ヘリックス領域を不安定化したり、C-末端領域の構造形成に重要なアミノ酸を置換した際に、オリゴマー化や溶血活性が上昇する現象が認められ、これらの領域の不安定化がドメイン-3の立体構造変化を促進し、活性上昇につながったものと考えられた。一方、ドメイン-3の末端部に位置する正電荷を有するアルギニン残基を置換すると、溶血活性が著しく低下したことから、ドメイン-3は標的細胞膜上の負電荷を有するリン酸基と相互作用する可能性が示唆された。

CEL-IIIは細胞表面糖鎖と結合することが立体構造変化の引き金になることが考えられたことから、ドメイン-1/2に存在する5つの糖結合部位に位置するチロシンやトリプトファンなどの芳香族アミノ酸を置換することによって糖との結合性を低下させ、その溶血活性への影響を検討した。その結果、ドメイン-2内のサブドメイン2 α に存在する糖結合部位の結合低下が溶血活性の著しい低下を引き起こしたこと、またこの糖結合部位はドメイン-3の α ヘリックス領域に近接していることから、この部位に糖鎖が結合することがドメイン-3の立体構造変化の引き金になることが示唆された。ドメイン-1/2と糖との結合は、X線結晶構造解析によっても検討し、サブドメイン2 α の糖結合部位において、構造変化が比較的大きいことが確認された。

以上のように、本論文は様々な手法を用いて溶血性レクチンCEL-IIIの細胞膜孔形成機構を検討した結果、ドメイン-3の立体構造変化が細胞膜孔を形成するためのオリゴマー形成過程に非常に重要であることを、個々のアミノ酸残基の役割をもとに明らかにした。これらの成果は、CEL-IIIのみならず、細菌毒素やコンフォメーション病原因タンパク質等の関連タンパク質の作用機構解明に有益な情報を与えるとともに、生理活性タンパク質の構造と機能の理解を通じて、生命科学分野の発展に貢献するところ大であり、博士 (工学) の学位に値するものとして合格と判定した。