

博士学位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第51号

2023年3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、令和5年3月19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.	<small>キュウマ</small> 久間 <small>アンナ</small> 杏那	[博士 (物理学)]	1
2.	<small>ミタライ</small> 御手洗 <small>ショウ</small> 彰	[博士 (先端情報学)]	4
3.	<small>ヤマダ</small> 山田 <small>トモヒト</small> 等仁	[博士 (生命科学)]	9
4.	<small>タネムラ</small> 種村 <small>ヒロキ</small> 裕幸	[博士 (生命科学)]	12

氏名（本籍）	山田 等仁（京都）
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	甲生 第5号
学位授与年月日	令和5年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	二成分毒素の複合体構造および酵素成分の膜孔透過機構の解明
論文審査委員	主 査 津下 英明 教授
	副 査 遠藤 斗志也 客員教授
	〃 横山 謙 教授

論文内容の要旨

【背景と目的】

一度形成されたタンパク質の三次構造は、ほとんどの場合、ほどけることはない。しかしながら、ある種の細菌の二成分毒素は、一度形成されたタンパク質毒素（酵素成分）をほどいて宿主の細胞内に膜透過させる装置を持つ。本学位論文は、二成分毒素の複合体構造および酵素成分の膜透過機構について研究したものである。

腸内の常在細菌である *Clostridium perfringens*（ウェルシュ菌）や *Clostridioides difficile*（ディフィシル菌）は様々な毒素を持つことが知られている。特に、この2つの細菌は、共通の毒素として、二成分毒素を持つ。どちらの二成分毒素も、宿主細胞内でアクチンのADPリボシル化を行う酵素ユニット（Ia/CDTa）と酵素成分を細胞内に輸送するタンパク質膜透過装置（Ib/CDTb膜孔）からなる。酵素サブユニットの構造は、X線結晶構造解析により、その構造と機能はわかっていたが、タンパク質膜透過装置の構造と機能については不明であった。この論文は一連の研究により、二成分毒素複合体の高分解能の構造をクライオ電子顕微鏡で明らかにし、その酵素成分の膜透過機構の最初の様子を明らかにしたものである。

【結果と考察】

学位申請者は、最初にウェルシュ菌の二成分毒素であるイオタ毒素のタンパク質膜透過装置の精製に取り組んだ。しかし、通常のプロテアーゼによる活性化条件では、オリゴマー化の効率が悪く、ほとんどはモノマーのままであった。その後、エタノールを加えた条件で、オリゴマー化効率が上がることを見出し、界面活性剤 LMNG を用いて可溶化したサンプルを用いてクライオ電子顕微鏡解析を行い、二成分毒素で初めての複合体 (Ia が結合した Ib 膜孔) の高分解能構造を報告した (Nature Structural & Molecular Biology 2020 12(10):e0186392.)。このイオタ毒素の発表と同じ時期に、米国の2つのグループが、デフィシル菌の二成分毒素 CDT の CDTb 膜孔ダブルヘプタマーの構造を明らかにした。この構造は、膜に孔を開ける部分が隠されており、機能するように思えない。このことから、学位申請者は、イオタ毒素と同様の精製方法を用いて、すなわち界面活性剤 LMNG を用いて可溶化したサンプルを用いてクライオ電子顕微鏡解析を行い、CDTb 膜孔(ヘプタマー) に CDTa が結合した高分解能構造とその膜透過機構の最初の様子を明らかにした (Nature communications 2022 13(1):6119.)。

本研究は、(1) これまで分子レベルでの研究がほとんど進められていなかったウェルシュ菌とデフィシル菌の二成分毒素のタンパク質膜透過装置に注目して、その構造を明らかにした。(2) 酵素成分とタンパク質膜透過装置の複合体の構造を明らかにした。さらに(3) 2つの二成分毒素でタンパク質の膜透過の共通の基盤があることを明らかにした。

論文審査結果の要旨

本博士論文は2部の構成からなり (1) ウェルシュ菌が産生する二成分毒素のイオタ毒素の複合体構造の解明と (2) デフィシル菌 が産生する二成分毒素 CDT の複合体構造の解明からなる。

この2つの異なる複合体の構造解析から、わかってきたことは、(1) 7つのプロトマーが集まり、約 100 Å の β バレルシステムを持つ膜孔を形成する。(2) 膜孔には酵素成分が1分子結合する。

(3) その結合には酵素成分の N 末端ドメインが関与する。(4) 酵素成分は、膜孔結合により、その N 末端がほどけ、その先の電子顕微鏡マップは膜孔の最狭窄部位 ϕ クランプに続いていた。

(5) 一方、酵素成分との結合には膜孔の NS(X)-loop が関わる。このループはアポ体では二状態のコンフォメーションをとるが、酵素成分が結合することにより、いくつかのプロトマーで二状態のコンフォメーションに偏りが生まれる。生化学解析により NS(X)-loop は酵素成分との結合に関与することを明らかにしたが、透過に関与するかどうかは今後の明らかにすべき課題である。最も重要な点は、二成分毒素それぞれ成分の結合によりタンパク質膜透過機構の最初の様子：酵素成分の N 末端がほどける様子が捉えられたことである。特に CDTa 結合 CDTb 膜孔(ヘプタマー) では、3D variability 解析により、複合体中で、インタクトの CDTa が結合した状態 (Folded) と N 末端がほどけた状態 (Unfolded) をそれぞれ分けて構造精密化することに成功している。

予備調査における主査及び2名の副査の協議において、本研究は、(1) これまで分子レベルでの

研究がほとんど進められていなかったウェルシュ菌とディフィシル菌の二成分毒素のタンパク質膜透過装置に注目して、その構造を明らかにした事(2) 酵素成分とタンパク質膜透過装置の複合体構造を明らかにした事(3) 2つの二成分毒素でタンパク質の膜透過の共通の基盤が存在することを明らかにしたことは、学術的な意義があると結論した。また、研究課題の新規性、作業仮説の設定の仕方、実験方法の妥当性、結果の解釈や考察などについて大きな問題はないと判断された。

本研究により得られた知見は、二成分毒素のみならず、タンパク質膜透過機構の基礎の理解に資する。そして本論文に関する内容は、何れもハイインパクトな国際専門雑誌に掲載されている。主査、副査の博士論文調査委員による論文審査の結果、研究課題に新規性が認められること、作業仮説や実験方法に妥当性があること、そして、結果の解釈や考察が適切に導かれていることから、本論文は博士学位論文としてふさわしいものであると認められた。また、令和5年2月14日に開催された公聴会では、発表内容は論理的かつ明瞭にまとめられており、質疑応答に対しても的確に回答されていた。よって、申請者は当該分野に関する学力において、博士の学位に相応しい資格を有していることが確認された。

以上より、本論文は、博士（生命科学）の学位を授与されるに値するものと認められる。