

博士學位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第 38 号

2015 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、平成 27 年 3 月 21 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 . 周 艷	〔博士（経済学）〕	1
2 . 佐藤 雅俊	〔博士（法律学）〕	5
3 . 新中 善晴	〔博士（物理学）〕	11
4 . 新崎 貴之	〔博士（物理学）〕	15
5 . <small>シーモントリー</small> SRIMONTRI <small>パイトゥーン</small> PAITOON	〔博士（生物工学）〕	19

論文博士

1 . 佐倉 正明	〔博士（生物工学）〕	25
2 . 鶴村 俊治	〔博士（生物工学）〕	29

氏名（本籍）	鶴村 俊治（広島県）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	乙工6号
学位授与年月日	平成27年3月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
論文題目	Structural and functional studies of causative factors for infectious diseases (感染症の原因となるタンパク質の構造生物学的研究)
論文審査委員	主 査 津下 英明 教授 副 査 黒坂 光 教授 " 本橋 健 教授

論文内容の要旨

「Structural and functional studies of causative factors for infectious diseases」(感染症の原因となるタンパク質の構造生物学的研究)とタイトルされたこの論文は次の3つの章からなっている。

(1) ピロリ菌のヒト発がん性因子 Tip の構造変化とこれに伴うヒト胃がんの発症機構
多くの日本人の胃の中に生育しているピロリ菌(微好気性桿菌)は、胃炎や胃潰瘍、さらに、胃がんの原因として注目されている。ピロリ菌による胃がん発症機構の解明は、胃がんの予防・治療に役立つと考えられる。菅沼等(埼玉がんセンター)は内因性発がんプロモーターである TNF-(サイトカイン)を強く誘導する新しい発がん因子の遺伝子をピロリ菌のゲノムに見出し、TNF-inducing protein (Tip)と命名した。ピロリ菌から分泌される Tip は、ピロリ菌特有のタンパク質で、細胞表面のヌクレオリンに結合して胃粘膜上皮細胞に取り込まれる。ヌクレオリンは元来核小体に多量に存在するタンパク質であるが、発がんの過程で細胞膜に移動したヌクレオリンと Tip が結合して、核内で NF- κ B を活性化、さらに、TNF- α を発現し、胃発がんが促進される。本博士論文では、Recombinant Tip (活性型 rTip、二量体)と N 末の 6 個アミノ酸を欠損する不活性型 Tip (rdel-Tip、単量体)を用いて研究をすすめた。この博士論文では、rdel-Tip のユニークな結晶構造を解明することに成功した。

(2) インフルエンザ A ウイルスの RNA ポリメラーゼの CAP スナッチング機構

インフルエンザ A ウイルスは、11 種類のタンパク質とそれらをコードする 8 本のマイナス一本鎖 RNA から構成されている。これらの RNA やタンパク質の宿主細胞内での増殖は、PA、PB1、PB2 の三種のサブユニットからなる RNA ポリメラーゼ複合体が担っている。各サブユニットの様々なドメインの構造解析が色々なグループで行われている。津下研究室では、PB2 の C 末端側のドメイン (3/3 領域 (535-759)) の構造を明らかにしており、この領域は病原性の強弱と種間の伝染性を決定する K627 を含んでいる (JBC (2009) 284, 6855-6860)。インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼはヒトの mRNA の Cap 構造を認識しここから 10 15 ベース下流で切り出し、これを template として転写を行う。PB2 ミドルドメインはヒトの mRNA の Cap 構造を認識するドメインであり、m(7)GTP との共結晶構造はフランスのグループにより解明されている。この博士論文では、活性部位とは関連しない分子表面のアミノ酸を変異させることでタンパク質結晶の質や形を向上することに成功し、さらにこの結晶から H1N1 型で初めて PB2 ミドルドメインと Cap 結合の構造を解析し、Cap 結合構造に関して以前報告された H3N2 型のものとは異なることを見いだした。

(3) *Clostridium perfringens* イオタ毒素によるアルギニン特異的 ADP リボシル化機構

Ia はウェルシュ菌が分泌するモノ ADP リボシル化毒素であり、アクチンの Arg177 を特異的に ADP リボシル化する。ADP リボシル化の反応機構を知るには、毒素と基質タンパク質複合体の構造の解明が重要であり、2008 年 Ia とアクチンでの複合体構造が唯一、津下等により明らかにされている (PNAS 2008)。しかしながら、本来の基質である NAD⁺結合型および Ia-ADP リボシル化アクチンの複合体構造は明らかではなかった。それらの複合体の構造を得るべく結晶化条件や X 線回折実験の条件など試行錯誤を繰り返し、NAD⁺が結合していないアポ型 Ia-アクチン複合体結晶を得た。このアポ型 Ia-アクチン複合体結晶を基質溶液、抗凍結剤溶液に異なった条件で浸漬することで NAD⁺結合型 Ia-アクチンと Ia-ADP リボシル化アクチンの複合体結晶を作り分けることに成功し、高分解能の構造を明らかにした。ADP リボシル化反応の前後の構造から、ADP リボシル化の反応機構として "strain-alleviation (緊張と緩和) モデル" を提唱した。オキソカルベニウムイオンの 2 つの中間体を経てアクチン Arg177 への ADP リボシル化の修飾反応が起きると考えられる。

論文審査結果の要旨

1. 学位論文の評価

本論文は 3 章からなり、それぞれの章において、以下の点において重要な研究である。

1) この研究と相まって、海外のグループからいくつかの rTip、rdel-Tip の結晶構造が明らかになった。これらを合わせると pH により異なるダイマー構造を取ることが明らかになりつつある。この構造変化と TNF- α の誘導との相関はどうなっているのか、現在も研究は続いており興味

ある内容である。ヒト胃がんの発がん機構をピロリ菌の新しい発がん因子Tip の構造から解明しようとする基礎研究となった。

2) この論文で得られたCap結合の構造情報は、Cap結合ドメインを標的とした、タミフル、リレンザとは異なる作用機構を持ったインフルエンザのRNAポリメラーゼの新たな阻害剤創薬への重要な知見となる。

3) 初のADP リボシル化毒素 (ARTC) と基質タンパク質アクチン複合体構造を明らかにした。この博士論文で提唱した内容は米国科学アカデミー紀要 PNAS (2013 Feb 4) に採択された。また、米国科学アカデミー紀要で同論文に関連の Commentary として紹介され、毒素によるアクチンのADP リボシル化を発見した Klaus Aktories により次のようにコメントされた。「非常に面白い研究 (exciting study) で、鶴村等は異なるADP リボシル化の段階で iota 毒素と基質蛋白質であるアクチンとの複合体の構造を明らかにした。著者等の発見は、毒素が引き起こすADP リボシル化の理解だけでなく、様々に働く内在性のADP リボシル化酵素の分子反応の理解につながる事であり、画期的な発見である」

(The authors' findings are groundbreaking).

以上、3つの章にまとめられた内容はどれも感染症因子に構造生物学という手法で光を当て、将来的には薬剤の開発につながる重要な基礎研究となる。特に3章のIa-アクチンの研究は、感染症因子とホストタンパク質のアクチン複合体の構造であり、またADP リボシル化反応をスナップショットで捉えるという非常に独創性が高く、斬新な内容である。このように本論文は高い研究内容をもつものと判断される。

2. 研究業績

申請者は、すでに英文専門誌に論文13報を公表している。また、この博士論文関連の論文として、これらの成果は、英文誌4報 (ref1-4) にまとめられている。さらにIa-アクチンの研究は英語と日本語での review(ref 5,6) がそれぞれ発表されていることも付け加えておく。

- (1) Biochem Biophys Res Commun. (2009) Tsuge H, Tsurumura T, et al.
- (2) PLoS One. (2013) Tsurumura T, et al.
- (3) Acta Crystallogr F Struct Biol Commun. (2014) Tsurumura T, et al.
- (4) Proc Natl Acad Sci U S A. (2013) Tsurumura T, et al.
- (5) Curr Top Microbiol Immunol. (2014) Tsuge H, Tsurumura T. Review.
- (6) 日本放射光学会誌 「放射光」. (2014) Tsurumura T, Tsuge H. Review in Japanese.

また2011年国際結晶学会(Madrid)および2013年国際構造ゲノム会議(Sapporo)でのポスター発表を行っている。

3．総合判断

主査、副査の博士論文本調査委員による論文審査において、英語で提出された博士論文内容は論理的で良くまとめられており、十分に優秀な内容を持つことから、本調査委員全員一致で、博士論文に十分に値すると判定した。