

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	三本鎖 β -ヘリックス蛋白質の構造・性状解析と人工三本鎖 β -ヘリックスの均一性向上の試み
Title(English)	Structure and properties of three-stranded β -helical proteins and approaches to obtain homogeneous artificial three-stranded β -helical polypeptides
著者(和文)	内田一也
Author(English)	Kazuya Uchida
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9485号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:有坂 文雄,中村 聡,三原 久和,和地 正明,田口 英樹
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9485号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名		内田 一也	
論文審査 審査員		氏 名	職 名		氏 名	職 名
	主査	有坂 文雄	教授	審査員	田口 英樹	教授
	審査員	中村 聡	教授			
		三原 久和	教授			
		和地 正明	教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は英語で書かれ、「Structure and properties of three-stranded β -helical proteins and approaches to obtain homogeneous artificial three-stranded β -helical polypeptides」と題し、5章から構成されている。

第1章「General introduction」では、蛋白質の高次構造がアミノ酸配列により規定されており、蛋白質構造を理解するには階層構造を考えるのが有効であると述べている。二次構造では特に β 構造をもつ構造モチーフに多様性があり、 β バレル、 β サンドイッチや近年報告された β スパイラル、 β プロペラ、1本/3本鎖 β ヘリックスのような新規の β 構造が見いだされていることを述べている。また、T4 ファージのテイルリゾチーム複合体 gp27-gp5 は3本鎖 β ヘリックスを含むC末端ドメインをもち、尾管先端に位置し、収縮に伴って細胞膜を貫通するが、最近発見された細菌の6型分泌系のVgrG蛋白質も同様に、菌体内に存在する収縮性器官の先端に位置して毒素を送り込む相手の細胞に穴を開けることを述べている。上記 β ヘリックスドメインにはいずれも8残基からなる繰り返し構造があり、一次構造に多様性があり、その多様性が β ヘリックスのトポロジーに影響を与えていると考えられると述べている。本論文の目的の一つは一次構造の多様性とトポロジーの相関関係を導くことであり、もう一つの目的は、 β ヘリックス構造を利用した長さの厳密に制御できる蛋白質の精製法の確立であることを述べている。

第2章「Structure and properties of VgrG proteins from *Escherichia coli* 0157 and CFT073」では、6型分泌系の概略を述べ、病原性大腸菌0157とCFT073のVgrG蛋白質につき、3本鎖 β ヘリックスが期待されるC末端部分の繰り返し配列の多様性について述べている。また、両大腸菌の計6種類のVgrG蛋白質の発現系の構築、大量発現における凝集体形成の問題、当該問題を解決するためのSlyD融合蛋白質の発現について述べている。最終的には0157のVgrG1トリプシン耐性C末端断片についてセレンメチオニン誘導体の結晶を作成し、Se原子の異常散乱を利用した短波長異常散乱法で位相を決定し、構造解析に成功したことを述べている。その結果、同蛋白質はintertwined型ではなく、逆平行 β シートが3つ集まって三角柱を形成していることが分かったと述べている。VXGまたはVGXから始まる8残基の繰り返し構造がintertwined型の3本鎖 β ヘリックスを形成するか、逆平行 β シートからなる3角柱を構成するかはアミノ酸配列に依るはずであるが、これを明らかにするために、構造既知の逆平行及びintertwined型3本鎖 β ヘリックスについて構造に基づくアミノ酸配列のアライメントを行い、同時に両3本鎖 β ヘリックスについて立体障害のために存在できないと思われるアミノ酸のリストを作成している。その結果、逆平行及びintertwined型3本鎖 β ヘリックスは、「異なるアミノ酸配列の好み」をもち、「異なるアミノ酸の制限」を受けることを見だし、この経験を元に3本鎖 β ヘリックスのトポロジーをアミノ酸配列から予測するプロトコルを作成している。

第3章「Crystallization and X-ray diffraction analysis of gp5 from bacteriophage KVP40」では、KVP40 ファージのgp5の結晶化とX線結晶構造解析を行った結果を述べている。KVP40 ファージは海水から単離され、shizo T-even ファージに属し、gp5のC末端ドメインの β ヘリックス領域ではT4gp5と比べて若干不規則性があり、7-8アミノ酸残基の挿入が4回存在し、VGXに加えてVXQモチーフが存在していると述べている。このドメインにつき、発現ベクターの構築、精製法の確立、結晶化条件の検討、最適化を行い、クライオ溶液の条件を検討後、回折実験を行っている。その結果、2種類の形の結晶（六角形と菱形）が得られ、菱形の結晶から2.59Åの分解能のX線回折データセットが得られたと述べている。しかし、繰り返し構造の故に分子置換法では位相を決定することが出来なかったが、このgp5のアミノ酸配列に第3章で得られた3本鎖 β ヘリックスのトポロジーの予測法を適用した結果、このドメインはintertwined型の β ヘリックスを形成すると予想されたと述べている。

第4章「Approaches to obtain homogeneous artificial three-stranded β -helical polypeptides」では、T4 ファージテイルリゾチーム gp5 のC末端ドメインの3本鎖 β ヘリックス構造を応用するために、繰り返し構造を6つ含む48残基を構造単位とする人工3本鎖 β 構造を構築している。凝集を防ぐためにN末端にSlyD、C末端にfoldonを融合して β ヘリックスの末端を介した会合の抑制を試みた結果、凝集を完全に防ぐことは出来なかったものの、これをトリプシン処理することによって3量体ダイマーをほぼ均一になるまで精製することができたことを述べている。

第5章「Concluding remarks and future perspectives」では、第2章から第4章の内容について総括し、今後の展望を述べている。

これを要するに、本研究で得られた3本鎖 β ヘリックス構造に関する知見は蛋白質立体構造構築原理の解明に重要な知見をもたらし、工学上ならびに工業上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として十分価値があるものと認められる。