

## 審査の結果の要旨

氏名 張 榮維

コリシンは、大腸菌やその近縁種が環境の変化に応答する SOS 機能によって誘導合成される細胞毒性を持ったタンパク質である。このように、微生物は、毒素を生産して他の細胞を殺すことで、生態的優位性を獲得している。コリシンに関しては古くから生化学的な研究が行われており、様々なタイプが報告されているが、コリシン D に関しては、その全体構造が明らかにされていなかったことから、根拠となる実験は主に生化学的データにもとづいており、多くの不明点が残されていた。本論文はコリシン D の全体の立体構造を決定することで、感受性菌の細胞膜の透過経路および個々のドメインの機能を明らかにすることと、細胞毒性の詳細を明らかにすることを主な目的としており、4 章から構成される。

第 1 章ではコリシン D 全長の立体構造の決定の試みについて述べている。コリシン D の全長タンパク質を用いて様々な条件で結晶化実験を行ったが、低分解能 (8.3 Å) の X 線回折を示す結晶しか得られなかった。全長コリシン D 結晶の分解能が低い理由の一つとして、分子全体が細長い構造をとるため、ドメイン配置が結晶格子内にコンパクトにおさまらないことが考えられた。そこで、コリシン B と高い相同性を示す N 末端側のドメイン (NTD: N-terminal domain) を欠失させることで、分解能が高い結晶が得られると考えられた。

第 2 章では、コリシン D の中央ドメイン (CD: central domain) と C 末端側の RNase ドメイン (CRD: C-terminal RNase domain) の結晶構造を決定し、これを用いて全長コリシン D の立体構造モデルを構築した結果について述べている。CD の立体構造を初めて決定したことにより、内膜透過に関わる因子と相互作用する領域の構造的特徴を明らかにした。また、全長コリシン D の構造を用いて、感受性菌への透過経路を推定した。コリシン D はヌクレアーゼ型コリシンであるため、活性ドメインである CRD 以外の領域は、NTD が感受性菌の外膜の透過に、CD が内膜の透過にそれぞれ関与することがすでに予想されていた。しかし、CD のアミノ酸配列を用いて検索してみたところ、他の既知タンパク質の中で 30%以上の配列同一性が見られるものがまったく存在していないことが分かった。すなわち、コリシン D の CD の結晶構造の解明は、他のコリシンや他のコリシン様バクテリオシンの研究では得られない、内膜透過に関する重要な知見が得られたということになる。CD の立体構造を用いた検索によると、その core fold は、グループ A およびグループ B コリシンの N 末端に存在して外膜透過を担う translocation

ドメインと似ていることが、本研究によって分かった。これらのドメインは共通のタンパク質を祖先に持ち、細菌の外膜及び内膜に存在する様々なタンパク質を「乗っ取る」ことで膜透過機能を持つように分子進化してきたと予想された。

第3章では、CRD と tRNA<sup>Arg</sup> の複合体結晶構造の解明の試みについて述べている。本研究の以前に、コリシン D の最小活性ドメインである ColD595 を用いて、基質 (tRNA<sup>Arg</sup><sub>ACG</sub>) およびアデニンデオキシ化基質アナログ (tRNA<sup>Arg</sup><sub>ACG</sub>dA) との共結晶化が試みられたが、結晶は得られていなかった。本研究では、複合体の結晶性を向上させるために、様々な工夫を試みた。結晶内の分子がパッキングしやすくなるよう、N 末端の長さを変化させたコリシン D を用いだけでなく、CRD の活性中心の変異体 (K610A および H611A とそれらの組み合わせ)、tRNA の 3' 末端を欠失あるいは化学修飾した基質アナログ、活性の最も低い基質 (tRNA<sup>Arg</sup><sub>CCU</sub>) などを用いて、それらの組み合わせにより、14 種類の条件を設定し、その全てで数百条件の結晶化スクリーニングを行った。そのうちいくつかの条件で結晶が得られたが、X線データ測定を行ったところ、いずれもコリシン D 単体の結晶であり、tRNA との複合体は得られなかった。その理由として、CRD の tRNA 切断活性が元々非常に高く、変異体や基質アナログを用いても結晶成長に要する時間での切断を完全に抑えることができなかったため、tRNA と安定した複合体構造を維持できなかったことが考えられた。

第4章では、CRD の活性により引き起こされるタンパク質合成の阻害が感受性菌に与える細胞死誘導について調べた実験結果について述べている。野生型および温度感受性コリシン D を用いて生育阻害活性を測定し、さらに LIVE/DEAD 染色法により感受性菌の経時的な生存率の変化を測定した結果、tRNA を切断された大腸菌は直ちに細胞死には至らず、一定時間は静菌的に生育を停止することが分かった。また、tmRNA (transfer-messenger RNA) の関連遺伝子 (*ssrA* および *smpB*) の欠損株を用いた実験により、CRD による静菌的生育停止の維持はリボソームレスキューシステム (*trans*-translation) に依存していることが明らかになった。

以上、本論文により明らかにした、コリシン D の感受性大腸菌への侵入経路および CRD が引き起こす細胞死誘導に関する知見は、他のコリシン様バクテリオシンの作用機構解明にも貢献できると期待できる。更に、大腸菌感染症に対する治療など、臨床方面への応用も期待されることから、これらの研究成果は学術上・応用上寄与するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。