

審査の結果の要旨

氏名 田中耕路

本論文「Mechanism of the self-assembly of a pore forming toxin triggered by specific membranes (生体膜特異的な膜孔形成毒素の物性と作用機序)」は、蛋白質 FraC の研究を通して、生体膜を標的として攻撃する蛋白質の作用機序を分子レベルで記述している。蛋白質 FraC は Pore forming toxin (PFT)蛋白質群に属し、生体膜上で膜孔を形成する毒素である。本論文は4つの研究から構成されている。その4つとは(1) FraC の膜孔構造の解析、(2) FraC の膜孔形成機構の研究、(3) FraC による糖鎖認識機構の解明、(4) 水溶性構造・膜貫通構造間での双方向的な蛋白質構造変化の実現、である。以下にそれぞれの研究項目に対する評価を記す。

(1) FraC の膜孔構造の解析

PFT 膜孔構造は、蛋白質のみからなる構造あるいは蛋白質同士が直接相互作用していないトロイダル構造のいずれかをとると考えられてきた。本論文では、FraC 膜孔の新規単離手法を確立し、FraC 膜孔の結晶構造解析を行っている。FraC 膜孔は蛋白質および蛋白質同士の結合を媒介する脂質から構成された新規な膜孔構造(protein-lipid hybrid pore)を有することが明らかになった。さらに、脂質スフィンゴミエリンが特異的に膜孔構造を安定化させることが示され、PFT が膜結合に際してだけでなく、膜孔形成に際して膜特異性を有するという新たな知見が得られた。外来(後天)性膜蛋白質のアセンブリに脂質分子がアセンブリコファクターとして働くこと、またその際に脂質特異性があることは前例のない報告であり、近年の膜内在蛋白質に関する同様の知見の蓄積と共に、膜上(膜内)における蛋白質の自己組織化の理解を大きく前進させる発見である。

(2) FraC の膜孔形成機構の研究

これまで FraC のスフィンゴミエリン特異性は蛋白質の膜結合特異性に起因すると考えられていた。しかしながら本論文で、FraC は SM と同様に PC への結合能を有することが証明された。また、膜蛋白質の自己組織化に影響を与える生体膜の性質の解明は、生物物理学の重要な命題であった。本論文では FraC

の膜孔形成反応の熱力学的解析と膜孔形成速度の測定を行い、脂質膜のダイナミクス(脂質ドメインの形成・膜の相変化)が、**FraC** の自己組織化の際のエネルギー障壁を下げる触媒様の働きをすることを提案した。さらに、**PFT** がどのような分子機構や駆動力で構造変化しているのかという未解明の課題に対し、本論文では2量体の構造を基に**FraC** の反応中間体構造を予想し、蛋白質の多量体化に起因する立体障害が**FraC** の構造変化を誘起することを新規に提案した。

(3) **FraC** による糖鎖認識機構の解明

生体膜は脂質のみからなるものではなく、その表面には様々な蛋白質、糖鎖が存在する。そのため生体膜を標的とする蛋白質(ウイルス・毒素)には膜表面の蛋白質や糖鎖を受容体とするものが多く存在する。本論文では、脂質のみを受容体とすると考えられてきた**FraC** が糖鎖結合能を有することを証明し、酸性糖鎖に対してより強く結合することを明らかにした。また、**FraC** の糖鎖結合部位が脂質結合部位と重なっていることを示し、蛋白質による基質認識の二重特異性に関する知見を深めた。**FraC** による二重特異的基質認識機構の解明は、蛋白質の分子認識の理解に大きく貢献することが期待される。さらに、**FraC** とレクチンとの構造・機能類似性について議論し、蛋白質分子の収斂進化を研究する上で興味深いモデルをもたらした。

(4) 水溶性構造・膜貫通構造間での双方向的な蛋白質構造変化の実現

PFT の膜孔形成に代表される水溶性蛋白質の膜蛋白質への変化は、準安定構造から安定構造への変化なので不可逆な過程であると考えられてきた。本論文では、**FraC** 膜孔を可溶化する界面活性剤の交換によって、選択的に膜孔を水溶性単量体に構造変化させることを初めて達成した。本論文は、一般的にこれまで不可逆だと考えられてきた蛋白質のフォールディング・アセンブリ過程も、些細な環境の変化によって、双方向的に進行しうることを示唆している。またこの研究を通じて、界面活性剤によって膜蛋白質の不活性化の作用機序が異なることが提案され、今後の膜蛋白質研究の際の界面活性剤選択の指針となることが期待される。

以上の研究を通じて、本論文は蛋白質毒素の詳細な作用機序、および膜蛋白質の自己組織化が生体膜から受ける影響を解き明かし、当該分野の発展に大きく貢献した。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。