

# 内容の要旨及び審査結果の要旨

【書式 1 1】

平成 30 年 2 月 5 日

氏名（本籍）	青木 英莉子
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲 第 158 号
学位記の授与日	平成 30 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 創価大学大学院学則第 31 条第 2 項該当 創価大学学位規則第 3 条の 3 第 1 項該当
論文題目	三量体オートトランスポーターの構造形成機構に関する研究
論文審査機関	工学研究科委員会
論文審査委員	主査委員 理学博士 池口 雅道 印 委員 理学博士 青山 由利 印 委員 獣医学博士 高瀬 明 印

## <論文の内容の要旨>

グラム陰性菌の表面には病原性に関係する様々なタンパク質が存在するが、本研究の対象となっているのはインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) の産生するアドヘシンと呼ばれるタンパク質である。このタンパク質は 1000 残基にも及ぶ大きなタンパク質で、アミノ末端側に宿主の気管内壁に付着する機能を持ったドメイン、カルボキシル末端側にはインフルエンザ菌の外膜に埋没するドメインを持つ。このタンパク質を含め「オートトランスポーター」と呼ばれるタンパク質は、外膜に埋没するドメインが自己のアミノ末端側を細胞外に運ぶ役割をしていると考えられたためにその名を持っている。

提出された学位請求論文は、5 章から構成されており、第 1 章では膜タンパク質一般について解説した後に、オートトランスポーターに関して現在知られている知見を解説するとともに、本論文の研究対象であるアドヘシンというタンパク質についての知見を述べている。

第 2 章ではアドヘシンの膜透過ドメイン（以下、HiaT と略す）の大腸菌での大量発現系の構築について論述している。グラム陰性菌は内膜と外膜の二重の膜を持っており、外膜タンパク質は細胞質で合成された後に内膜を透過するためにシグナル配列を有している。ある種の外膜タンパク質ではあえてこのシグナル配列を持たせずに発現させると細胞質内に封入体が形成されるため、それを可溶化・リフォールディングすることで多量のタンパク質を精製しているが、本論文では、その方法は HiaT の場合は効果的ではないことを示している。また、このタンパク質の発現はプラスミドの不安定性を引き起こすため、発現誘導後、早期の集菌が必要なことも示している。

第 3 章では HiaT ならびにその短縮型である mHiaT の試験管内でのリアセンブリ反応を電気泳動、円二色性スペクトル、蛍光スペクトル、蛍光偏向解消などの物理化学的方法で追跡した実験結果について論述している。HiaT に比べると mHiaT の方は副反応が起こらずに単純化されること、3 量体である mHiaT が解離変性したサブユニットから 3 次反応で形成されることを示している。

第 4 章では HiaT、mHiaT の結晶構造の観察から、1077 番目のアルギニン残基側鎖が HiaT、mHiaT が形成する  $\beta$  バレル構造の中心部でお互いに近接している点に着目し、この残基のアセンブリにおける役割について検討している。アルギニン残基は側鎖先端のグアニド基部分に正電荷を持つため、その正電荷がお互いに近接した状況は静電反発の観点からは望ましくない構造と考えられる。申請者はこの一見不利な相互作用がアセンブリに重要ではないかと考え、その仮説

検証のための実験を行っている。具体的には、このアルギニンを立体的に類似した大きさを有し電荷を持たないメチオニンに置換した変異体と、アルギニンと同様に正電荷を持つリジンに置換した変異体を作製し、そのリアセンブリ反応を野生型と比較した。その結果、メチオニン変異体の場合にのみ、間違った構造を形成することが確認され、1077番目の位置における電荷間の反発が重要であることが立証されている。

第5章では総括として、本研究で見出された試験管内での知見が生体内でのアセンブリについてどのような示唆を与えるかを議論している。また本研究の対象以外でも生体内の多量体では、その接触部位にアルギニンの集合がしばしば観察される点に言及し、生体分子構築の一般原理としての静電反発の可能性を議論している。

#### <論文審査結果の要旨>

膜タンパク質ならびにその複合体の構造形成機構は、現在でも多くの謎が残された研究分野であり、その解明は病原菌の感染対策のためにも重要である。本論文はインフルエンザ菌アドヘシンの膜貫通ドメインに限定した研究成果を論述したものであるが、全長タンパク質の構造形成機構を解明するために重要な貢献をするものである。また本論文は生体分子構築の一般原理としての静電反発の重要性を示唆しており、分子設計の観点からも重要な知見であり、博士（工学）の学位論文として十分な価値を有するものと認める。

なお、本論文の一部は国際的な学術雑誌に下記の論文2編として掲載されている。

- 1) Electrostatic repulsion between unique arginine residues is essential for the efficient in vitro assembly of the transmembrane domain of a trimeric autotransporter  
Aoki, E., Sato, D., Fujiwara, K. & Ikeguchi, M.  
Biochemistry (2017) 56, 2139-2148
- 2) Optimization of *Haemophilus influenzae* adhesin transmembrane domain expression in *Escherichia coli*  
Aoki, E., Fujiwara, K., Shimizu, A., Takase-Yoden, S. & Ikeguchi, M.  
Protein Expr Purif. (2018) 145, 19-24

# 最終試験の結果の要旨

【書式12】

平成30年 2月5日

フリガナ 申請者氏名	アオキ エリコ 青木 英莉子	専攻名	生命情報工学専攻
審査委員会委員	主査委員	池口 雅道	印
	委員	青山 由利	印
	委員	高瀬 明	印

## 要旨

審査委員3名により、学位論文の内容および関連する学問分野に関して、口頭で試問を行った。その結果、専門分野に関する学力と研究能力を有することを確認できたので、最終試験の結果を合格とした。