

# 博士論文審査報告書

氏名	西出 旭 (ニシデ アキラ)
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	博理第 1 0 1 号
学授与報告番号	甲第 2 9 7 号
学位授与年月日	平成 2 9 年 3 月 2 2 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 1 項該当
論文題目	赤痢菌エフェクターによるNF- $\kappa$ Bを介した炎症応答抑制機構の構造学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 阪口 雅郎 (副査) 教授 水島 恒裕 (副査) 教授 樋口 芳樹 (副査) 教授 橋本 博 (静岡県立大学大学院薬学研究科)

## 1. 論文内容の要旨

赤痢菌は粘膜上皮細胞を介して感染・定着し炎症性下痢を引き起こす病原体であり、III型分泌装置を通じてエフェクターと呼ばれる病原因子を宿主細胞に分泌し、宿主の持つ防御機構を妨げることで感染を拡大している。Outer Surface Protein I (OspI)は赤痢菌感染時に分泌されるエフェクタータンパク質のひとつであり、TNF- $\alpha$  Receptor Associated Factor 6 (TRAF6)を介した転写因子 Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)の活性化を阻害し、急性炎症応答の回避に関与している。また、OspIは宿主のユビキチン結合酵素 Ubc13のグルタミン残基側鎖を脱アミド化しグルタミン酸へと修飾することによって、NF- $\kappa$ Bの活性化に必要なUbc13によるTRAF6の自己ユビキチン化を阻害している。これまでに野生型OspI単独状態の結晶構造は報告されていたが、その構造は活性部位のシステインがジスルフィド結合を形成した不活性型であり、OspIによる基質認識や脱アミド化反応の機構は未解明であった。そこで、グルタミン側鎖の脱アミド化という新規なユビキチン経路阻害機構の解明をめざし、ジスルフィド結合を形成しないOspI変異体の単独状態およびOspI C62A-Ubc13複合体の立体構造の決定と機能解析を行った。

OspI変異体の構造解析からはOspIの活性型状態を示唆する構造が明らかとなり、触媒反応における活性3残基 (Cys62、His145、Asp160)の配置、オキシアニオンホールの役割を果たすと思われるアミノ酸 (Asn162)を同定した。また、OspI C62A-Ubc13複合体構造より、脱アミド化修飾を受けるUbc13のGln100の側鎖がOspIの活性中心に向かって配置していることが示された。複合体構造から明らかとなったOspIとUbc13の相互作用は電荷的な相補性と疎水的な分子表面によるものであり、相互作用に必要なアミノ酸が部位特異的な変異体タン

パク質を用いた相互作用と活性の解析から確認された。これまでに、Ubc13 と複合体を形成するタンパク質である TRAF6、CHIP、OTUB1 と Ubc13 の複合体構造が報告されている。これらタンパク質と Ubc13 との結合は疎水的な相互作用によるものであり、OspI は既知のものとは異なる様式により特異的に Ubc13 と相互作用していることが示された。TRAF6、CHIP、OTUB1 は Ubc13 とは別のユビキチン結合酵素 UbcH5 とも複合体を形成することが報告されている。また、赤痢菌エフェクター IpaH9.8 は宿主の UbcH5 と複合体を形成することにより機能し、赤痢の感染に寄与している。一方、OspI は UbcH5 と複合体を形成しないことが示されたことから、OspI は同じ赤痢菌エフェクターである IpaH9.8 の働きを妨げることなく宿主の防御経路を阻害するために適した立体構造を有していることが示唆された。

## 2. 論文審査結果

本論文では赤痢菌の感染に関わるエフェクター OspI の変異体および宿主内標的タンパク質 Ubc13 と OspI の複合体の立体構造を X 線結晶構造解析法により明らかにした。また、得られた立体構造情報に基づいた機能解析により OspI による宿主内標的タンパク質の特異的な認識機構を明らかにするとともに、赤痢菌感染における合理的な宿主の防御経路の阻害機構を提案した。赤痢菌エフェクターによる宿主の防御反応阻害機構の研究は、特効薬やワクチンのない細菌性赤痢の感染機構の理解や創薬において極めて重要であり、独自の反応機構により機能する OspI の X 線結晶構造解析および機能解析は赤痢菌の感染機構の研究を前進させたものである。

よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成29年1月24日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。