

## 論文内容要旨

報告番号	乙 先 第 29 号	氏 名	川 口 遊 喜
学位論文題目	Exploring the structural factors related to function appearance of biomembrane-interacting factors 生体膜作用因子の機能発現に関わる構造要因の探索		
<p>内容要旨</p> <p>Biomembranes function as a reaction field for various physiological actions, and membrane disorders cause various illnesses. Therefore, an analysis of membrane-acting factors will provide useful information for disease prevention and therapy. A molecular simulation analysis for membrane-acting protein factors has been discussed, with a focus on the following membrane-associated protein factors: 1) The interaction profile of bacterial cytolysin with a cell membrane; 2) The molecular conversion of <i>Streptococcus anginosus</i> derived-SagA; 3) The cytolysis of snake (e.g. <i>Naja naja siamensis</i>, <i>Naja naja atra</i>, <i>Naja naja</i>) venom-derived cardiotoxins (CTs).</p> <p><u>1) Interactive Profiles of Bacterial Cytolysins</u></p> <p>Dipole moment of <i>Streptococcus intermedius</i> intermedilysin (ILY) 11mer region (1.731 debye) was significantly smaller than that of traditional cholesterol dependent cytolysins (CDCs), and the moment direction faced the intramolecular site crowded with other amino acid residues (type A). Dipole moment of <i>Arcanobacterium pyogenes</i> pyolysin (PLO) 11mer region (2.427 debye) was smaller than that of traditional CDCs, as well as that of the ILY moment, but it faced the outer side (type B). In traditional CDCs, 11mer region dipole moment intensity is in the range of 8.028 to 9.022 debye, and it faces the outer side of the cytolysin molecule (type C). <i>Gardnerella vaginalis</i> vaginolysin (VLY) (3.647 debye) and <i>Streptococcus mitis</i>-derived human platelet aggregation factor (Sm-hPAF) (8.540 debye) showed the fourth type of 11mer region dipole moment direction, facing downward and to the left, on the far side of the surface of the space (type D).</p> <p>The van der Waals energy of ILY with human CD59 (hCD59) was 234199 kcal/mol, significantly larger than that of VLY (433.3 kcal/mol), Sm-hPAF (351.9 kcal/mol) with hCD59. Hydrogen atom of Arg432 in ILY formed a hydrogen bond with the oxygen atom of Glu76 in hCD59. Expansion of positive electrostatic potential (ESP) field at ILY domain 4 and negative ESP field at lower area of hCD59 was observed. In interactive analysis of VLY with hCD59, two hydrogen bonds were observed. The</p>			

Lys447 and Arg419 of VLY domain 4 formed a hydrogen bond with Tyr62 and Glu76 of hCD59, respectively. A positive ESP field at VLY domain 4 and negative ESP field at a lower area of hCD59 were observed, as well as the interaction between ILY and hCD59. In Sm-hPAF domain 4, Lys403 and Arg375 formed a hydrogen bond with hCD59 Tyr62 and Glu76, respectively. Positive ESP field was observed at Sm-hPAF domain 4, and negative ESP field was observed at lower area of hCD59.

### 2) Molecular Analysis of *Streptococcus anginosus*-derived Saga Molecules

The differences of molecular features among Saga molecules from *Streptococcus anginosus* subsp. *anginosus* NCTC10713<sup>T</sup> (Saga1 and Saga2), and Saga from *S. pyogenes* MGAS5005 (SPySaga) were investigated especially for intramolecular heterocycle formation. In heterocycle-formed Saga1, the total energy decreased smoothly from the start of MD simulation at 100 ps and the energy average (1784.7 kcal/mol) was lower than that of pre-heterocycled Saga1. The total energy of heterocycle-formed Saga2 decreased within 100 ps of the start of simulation and the average (1538.0 kcal/mol) was lower than that of the pre-heterocycled Saga2 molecule. For SPySaga, the convergence of total energy indicates a similar tendency between pre- and post-heterocycle formation, but the total energy of post-heterocycle formation was lower than that before formation.

Before heterocycle formation, the border between leader peptide and propeptide was unclear. After heterocycle formation, the conformation of these Saga1, Saga2, SPySaga molecules was significantly changed. In Saga1 and Saga2, the leader peptide domain was enclosed in the inner part of the molecule. In SPySaga, the leader peptide domain was bundled with the propeptide domain. These results suggest that the heterocyclic structure is involved not only in the cytolytic activity of these molecules but also in the proper processing to convert them into their active form.

### 3) Molecular Feature of Cardiotoxin and Cardiotoxin-like Basic Protein

Molecular modeling of four CTs (CT-I, -II, -III, -IV) from *Naja naja siamensis* and three cardiotoxin-like basic proteins (CLBPs) from *Naja naja siamensis* (CLBP-si), *Naja naja atra* (CLBP-at) and *Naja naja* (CLBP-na) were performed based on *Naja mossambica mossambica* CT VII4 X-ray data (Protein data bank ID: 1CDT). CTs consist of 60 amino acid residues and 2 amino acid insertions (His<sup>4</sup> and Ala<sup>25</sup>) were detected in CLBPs. CTs expressed the cytotoxicity toward Fogh-Lund (FL) cells (ED<sub>50</sub> values: 5.4 (CT-I), 10.6 (CT-II), 16.1 (CT-III), 12.6 (CT-IV) µg/ml), but CLBPs had no cytotoxicity (>100 µg/ml).

CT and CLBP molecules consist of one core region and three loops. A negative ESP field developed with the entire CT-I molecule. A negative ESP field was observed in CT-II, -III and -IV, similar to CT-I. On the other hand, a positive ESP field existed in the core region of the CLBP-si molecule, while a negative ESP field existed in the loop 1 and loop 2 regions. A similar ESP distribution was confirmed in the CLBP-at and -na molecules. A significant difference was observed in the distribution of ESP between CTs and CLBPs.

論文審査の結果の要旨

報告番号	乙 先 第 29 号	氏 名	川口 遊喜
審査委員	主査	宇都義浩	
	副査	松木 均	
	副査	長宗秀明	
<p>学位論文題目 Exploring the structural factors related to function appearance of biomembrane-interacting factors (生体膜作用因子の機能発現に関わる構造要因の探索)</p>			
<p>審査結果の要旨</p> <p>生体膜と相互作用して膜構造を修飾することで、膜孔形成、膜崩壊などを誘発するタンパク質性因子の構造を解析し膜作用特性について考察している。</p> <p>本論文は序論と総括を含む5つの章から構成されており、由来の異なる膜作用性タンパク質を題材として構造機能解析が行われている。序論である第1章では、本研究の背景と目的について述べられている。第2章の前半では、アンギノーサス群連鎖球菌が産生する細胞溶解毒素(サイトライシン)の膜反応特性について述べられている。膜コレステロールを受容体として膜作用を示す古典的なコレステロール依存性細胞溶解毒素(CDC)はドメイン1~4を有し、そのうち膜結合ドメイン4には高度に保存された11mer領域が存在する。パープリンゴリシンO(PFO)やストレプトリシO(SLO)などのCDCをはじめとして、ヒト特異的細胞溶解毒素インターメディリシン(ILY)、コレステロールに対する親和性がCDCと比較して特徴的なピオリシン(PLO)、流産の原因因子として疑われるバジノリシン(VLY)、小児川崎病の病原因子 <i>Streptococcus mitis</i> 由来ヒト血小板凝集因子(Sm-hPAF)の11mer領域についても、その特性を分子モデリングおよびMO解析などで検証し、膜構成分子などの外部因子との反応性が4種のタイプに分類されることを明らかにしている。第2章の後半では、ILYがヒト細胞へ働きかける際の受容体となるヒトCD59分子(hCD59)と相互作用する際の挙動をMM/MD解析から検証している。このとき同時に、VLYとhCD59およびSm-hPAFとhCD59との相互作用様式についても解析して、ILYとhCD59間の相互作用と比較することで、ILYとhCD59間に形成される1本の水素結合を基点としたILY-hCD59間の柔軟で効率的な作用調節について明らかにしている。第3章では、<i>Streptococcus anginosus</i> に由来する溶血性毒素(SLSホモログ)の一種であるSagA1, SagA2の分子内環状構造の形成が、活性型プ</p>			

ロペプチドへの変換および細胞溶解能の発現について果たす役割について検証している。SagA1, SagA2 は分子内にそれぞれ4カ所, 3カ所の環状構造を形成しうる部位を有している。これらの環形成候補部位が環状構造へと変換されることによるSagA分子の安定性を指標として, 優先的に環状構造が形成される部位を報告している。また, 分子内に5カ所の環状構造形成部位を有する *Streptococcus pyogenes* 由来 SagA (SPySagA) についても分子内環状構造形成の SagA 分子安定化に及ぼす影響を検証することを通して SagA1, SagA2, SPySagA分子内の環状構造形成の意義が明らかにしている。第4章では, コブラ科ヘビ (*Naja naja siamensis*, *Naja naja atra*, *Naja naja*) 毒由来の細胞溶解タンパク質であるカルジオトキシン (CT) の分子特性について解析を行っている。このとき CT とアミノ酸配列の相同性が高く, 高次構造も類似するカルジオトキシン様塩基性タンパク質 (CLBP) が細胞溶解活性を示さない要因を探っている。4種類の CT 分子 (CT-I, -II, -III, -IV) と3種類の CLBP 分子 (CLBP-si, -at, -na) の構造特性を分子モデリング, MM/MD 解析, MO 解析などから検証し, 静電ポテンシャルフィールドの分布状況が細胞膜との相互作用を規定していることを報告している。第5章では, 本研究で得られた成果を総括している。

以上本研究は, 審査付き論文3編として公表されたものであり, 本論文は博士(工学)の学位授与に値するものと判定する。

なお, 本論文の審査には, 友安俊文 准教授, 大倉一人 教授(鈴鹿医療科学大学大学院薬学研究科)の協力を得た。