



Title	Streptococcus pyogenesのヒアルロン酸分解酵素Hyla における構造生物学と分子系統学に基づく機能解析
Author(s)	東, 孝太郎
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/95991
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (東 孝太郎)	
論文題名	<i>Streptococcus pyogenes</i> のヒアルロン酸分解酵素HylAにおける構造生物学と分子系統学に基づく機能解析
論文内容の要旨	
<p>【研究目的】</p> <p><i>Streptococcus pyogenes</i> (化膿レンサ球菌) は咽頭炎などの非侵襲性感染症から、壊死性筋膜炎やレンサ球菌性毒素性ショック症候群といった致命的な侵襲性感染症まで様々な疾患を引き起こす。<i>S. pyogenes</i>は、主要な病原因子であるMタンパクをコードする<i>emm</i>遺伝子型に基づいて、現在少なくとも250の異なる型に分類されている。ほとんどの<i>emm</i>型株は、ヒアルロン酸莢膜を持つ一方で不活性型のヒアルロン酸分解酵素HylAを保有している。近年、<i>emm4</i>型および<i>emm22</i>型株が、ヒアルロン酸莢膜を持たず、活性型HylAを持つことが示された。また、化膿レンサ球菌種内におけるHylA活性の有無は、199番目の残基の1アミノ酸変異によって生じていることが明らかとなった。本研究では、<i>S. pyogenes</i>のHylAについて分子系統関係を検討し、結晶構造解析とタンパク質計算科学の手法を用いて、1残基変異がタンパク質の構造および機能に及ぼす影響を検討した。</p> <p>【方法および結果と考察】</p> <p>HylAの分子系統関係を明らかにするため、GenBankに登録されている<i>S. pyogenes</i>の完全ゲノムから<i>hylA</i>遺伝子を抽出した。また、tBLASTnにて配列検索を行い、近縁種のヒアルロン酸分解酵素の遺伝子配列を収集した。得られた配列について多重配列整列を行い、整列困難な領域を除去した後に分子進化モデルを選択した。進化モデルに基づき、ベイズ法による分子系統樹の作成を行った。分子系統樹から、近縁種の系統と<i>S. pyogenes</i>の系統が大きく分かれ、<i>S. pyogenes</i>種内で<i>hylA</i>遺伝子は異なる株間でも非常に系統的に近いことが示された。活性型である<i>emm4</i>型および<i>emm22</i>型のHylAは他の近縁種からの遺伝子水平伝播ではないこと、すなわち種の分化が生じた後に<i>hylA</i>遺伝子の多様化が生じたことが示唆された。</p> <p>次に、HylAの立体構造を明らかにするため、X線結晶構造解析を行った。<i>emm1</i>型化膿レンサ球菌5448株の<i>hylA</i>遺伝子配列を挿入した大腸菌から得られた組換えHylA (M1HylA) を結晶化した。得られた単結晶は高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリーBL1Aビームラインに持ち込み、回折実験を行った。位相決定を分子置換法にて行ったのち、構造精密化し、2.4 Åの分解能でM1HylAの新規立体構造の決定に成功した。Val199を含む$\alpha 4$ヘリックスと$\alpha 5$ヘリックスの間はdisorder領域であり、ホモログとの構造比較から、Val199は活性残基ではないがHylAの構造安定性を低下させ、活性中心の構造を変化させることで間接的に不活性化を引き起こしていることが示唆された。</p>	

この仮説を裏付けるため、M1HylAについて分子動力学シミュレーションを行った。大阪大学の大規模計算機システムSQUID上で、GROMACSプログラムにて100 nsのシミュレーションを実行した。Root Mean Square Fluctuation解析の結果、柔軟性の高い領域はM1HylA結晶構造のdisorder領域と一致し、Root Mean Square Deviation解析の結果、Val199を含むドメインは他のドメインよりも揺らぎが大きいことが示された。したがって、分子動力学シミュレーションにおいて結晶構造解析から得られた仮説と矛盾しない結果が得られたことより、Val199が構造不安定性の原因である可能性を示した。

M1HylAは活性残基の安定性が低下しヒアルロン酸分解活性が失われていることが示唆されたが、ヒアルロン酸と結合する能力を保持している可能性が考えられた。このことを検証するため、AutoDock Vinaを用いたドッキングシミュレーションを行った。M1HylAの結晶構造、emm4型の活性型HylAの予測構造、ならびに分子置換モデルである肺炎球菌のHyl (ILOH) の結晶構造のそれぞれについて6糖単位のヒアルロン酸断片との分子間相互作用を検討したところ、M1HylAとヒアルロン酸は結合可能であることを示唆する複合体構造のモデルと結合エネルギーが得られた。

【結論】

本研究では、*S. pyogenes*のHylAについて分子系統学と構造生物学の手法を組み合わせ、機能解析を試みた。グラム陽性細菌の持つヒアルロン酸分解酵素群とHylAの分子系統関係を明らかにし、未解明であったHylAの立体構造を報告した。今まで報告されている相同分子および不活性化変異体の構造とは異なる新たな不活性化機構を発見し、計算科学によって仮説を立証した。本研究の成果は今後の創薬研究に大いに寄与する基盤になると考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (東 孝 太 郎)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	川端 重忠
	副 査	教授	野田 健司
	副 査	准教授	久保庭 雅恵
	副 査	講師	大嶋 淳
論文審査の結果の要旨			
<p><i>Streptococcus pyogenes</i> は非侵襲性から侵襲性まで様々な疾患を引き起こす病原細菌である。本研究では、<i>S. pyogenes</i> の HylA の分子系統関係や新規立体構造を解明し、計算科学を組み合わせることで、構造と機能の関係を詳細に明らかにした。分子系統解析から、<i>S. pyogenes</i> の HylA は進化の過程でヒアルロン酸分解活性を失い、1 塩基の自然突然変異によってアミノ酸 1 残基変異が生じ、活性型変異体が生じたことが示唆された。また、構造生物学に基づく解析から、不活性型 HylA は近縁種の相同分子と比較し、活性中心外の 1 残基変異により活性中心の二次構造が大きく変化し、ヒアルロン酸分解活性が消失していることが明らかとなった。一方で、結合部位を構成する残基は構造的に保存され、糖鎖結合能を有している可能性が示された。これらの情報は、創薬を行う際の基盤となると考えられる。よって、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p>			