

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鄭海

本論文は、好中球走化性因子 LECT2 の様々な生理活性の基盤となる構造と生化学的機能を解明することを目的とし、高圧巻き戻しによる大量調製法の確立（第2章）、X線結晶構造解析（第3章）、メタロエンドペプチダーゼ活性の評価及び結合ペプチドの探索といった機能解析（第4章）、関節リウマチに関与する一塩基多型 SNP（V58I 変異）が構造及びダイナミクスに及ぼす影響の解析（第5章）について述べている。

第1章は序論として、LECT2に関するこれまでの先行研究についてまとめている。まず、LECT2 が好中球走化性因子として最初に同定された経緯、配列的な特徴、脊椎動物における保存性を説明し、次にケモカイン活性以外のLECT2が関与する生理活性について説明している。LECT2は151残基からなる塩基性タンパク質として合成されるが、N末端の18アミノ酸からなるシグナルペプチドが切り離され、133残基からなる成熟型タンパク質として細胞外に分泌されて機能する。また、3対のジスルフィド結合をもつ一次構造上の特徴が明らかにされている。LECT2は、細胞の増殖、炎症、免疫調節と発癌に関与する多機能なタンパク質であり、それらの基盤となるLECT2の構造と生化学的機能の解明がこれら生理活性を理解する上で重要であることを述べている。一方、慢性関節リウマチ患者においては、疾病の重篤度が高い患者ほどLECT2の58番目のVal残基がIle残基に置換されている割合が高いことが示されている。このため、V58I変異がLECT2の構造とダイナミクスに与える影響を調べ、SNPと構造多型との関連を明らかにすることを目指している。

第2章では、大腸菌発現系を用いた LECT2 の発現、ならびに高圧巻き戻し法を用いた大量調製と精製について述べ、LECT2 の大量調製における高圧巻き戻し法の有効性について論じている。タンパク質の立体構造解析には大量の試料が必要であるが、大腸菌を用いて可溶性画分に得られた LECT2 の収量は非常に少なかった。そこで 200 MPa の高圧処理により LECT2 の封入体からの巻き戻しを行ない、高収量で LECT2 を得るための調製系を確立した。また、NMR 測定により、巻き戻し LECT2 は可溶性発現 LECT2 と全く同じフォールドであること、Zn(II)が LECT2 の立体構造に影響を与えることを明らかにした。さらに、LECT2 のケモカイン活性を測定し、可溶性発現及び巻き戻し LECT2 のケモカイン活性が同等であることも示した。LECT2 は Zn(II)結合タンパク質であるが、ZnCl₂の添加はケモカイン活性を亢進しないことから、LECT2 のケモカイン活性は Zn(II)に依存しないと考察している。

第3章では、LECT2 の X線結晶構造解析について述べ、構造的な特徴を論じている。LECT2 の立体構造を 1.94 Å で決定することに成功し、分子中央に活性部位と推定される深いクレ

フトを有することを明らかにした。クレフトは 6 本鎖からなる逆平行 β -シートとその周辺の 4 つのループから形成され、H35、D39、H120、水分子が Zn(II) に 4 配位で結合していることを示した。また、LECT2 の構造は M23 ファミリーメタロエンドペプチダーゼの構造と類似しているが、クレフトの壁を形成している 4 つのループは LECT2 において異なることを明らかにした。特に、ループ 1' は LECT2 に独特のジスルフィド結合を形成し、クレフトの一端を遮るように配置していると考察している。さらに、M23 ファミリーメタロエンドペプチダーゼの触媒残基として保存されている His 残基が LECT2 では Tyr 残基 (Y86) に置換されていることを見出している。

第 4 章では、LECT2 のメタロエンドペプチダーゼ活性の評価と LECT2 結合ペプチドの探索について述べ、LECT2 の立体構造に基づいてそれら活性との相関を論じている。メタロエンドペプチダーゼ活性について、LECT2 は M23 ファミリーメタロエンドペプチダーゼの基質である pentaglycine に対して活性をもたないことを示した。活性をもたない理由の一つとして第 3 章で見出された His 残基の置換に注目して Y86H 変異体での活性を評価し、Y86H 置換で活性が回復しないことを示した。この結果より、もう 1 つの顕著な構造的な違いとして見出されたループ 1' がメタロエンドペプチダーゼ活性に重要な影響を有し、ループ 1' は活性部位への基質ペプチドの結合を妨害する可能性を考察している。LECT2 結合ペプチドの探索については、12 アミノ酸残基からなるペプチドのフェージディスプレイ法を用いて、N 末端の GYPD 配列を同定した。免疫関連受容体 T-cell receptor delta chain と prolectin は、N-末端に GYPD シーケンスを含むことから、LECT2 とこれら免疫関連受容体との相互作用の可能性を示した。

第 5 章では、関節リウマチに関与する一塩基多型 SNP (V58I 変異) が構造及びダイナミクスに及ぼす影響について論じている。X 線結晶構造解析により LECT2 V58I 変異体の立体構造を分解能 1.59 Å で決定し、野生型と構造比較を行なっている。その結果、両者の構造には全く違いがないことを明らかにした。一方、LECT2 および V58I 変異体の NMR 解析により、LECT2 のダイナミクスにおける違いを考察している。緩和速度 R_1 、 R_2 、と NOE において変化が見出され、特に R_2 の変化が最も顕著であった。 R_2 、NOE で変化が観測された残基はクレフト上に位置しており、変異によるダイナミクスと活性との間に何らかの相関がある可能性を示した。

以上、本研究は LECT2 及び V58I 変異体の構造と機能の相関を明らかにしただけでなく、LECT2 の免疫調節機能及び V58I 変異と慢性関節リウマチの重篤度との連関を解明する重要な手がかりを提供するものであり、得られた知見は学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。