

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	HOU XUENI
論文題目	Analysis of conformational space sampled by domain reorientation in linear diubiquitin by paramagnetic NMR (常磁性 NMR による直鎖ジユビキチンのコンフォメーション空間の解析)		
(論文内容の要旨) <p>細胞内の様々な事象の調節に関わるユビキチン化には複数の様式がある。直鎖型 ( 或いはMet1型 ) のポリユビキチン化は、ユビキチンのアミノ末端とカルボキシ末端を介して形成されたポリユビキチン鎖が基質タンパク質に付加される様式であり、主に免疫や炎症の制御に関わるシグナル伝達経路で重要な役割を果たす。ユビキチン鎖の役割は特定のタンパク質との選択的な相互作用の媒介、すなわち分子認識である。直鎖型ユビキチン鎖と、そのターゲットタンパク質の複合体の結晶構造は複数報告されているものの、直鎖型ユビキチン鎖は多様なコンフォメーションを取りうるうえに、鎖中に複数の結合部位を有するため、その分子認識機構は複雑で、十分には解明されていない。本研究では、主に常磁性NMR分光法を用いて、直鎖型ジユビキチンが水溶液中で取りうるコンフォメーション空間を解析し、ターゲットタンパク質との結合様式を調べた。</p> <p>信頼性の高いNMRデータを得るために、ジユビキチンのうち、一方のユビキチンのみを<sup>15</sup>Nで選択的に標識した試料を、直鎖型ポリユビキチン鎖合成酵素を用いた酵素反応によって調製した。さらに、ジユビキチン内の特定の amino 酸残基をシステインに置換し、その側鎖に特殊な配位子を繋ぎ、ここにランタノイド金属ツリウム (Tm) を配位させた。この試料のNMRスペクトルを取得し、ツリウムの常磁性に起因するアミド<sup>1</sup>H と<sup>15</sup>N核の化学シフト変化 (PCS: pseudo contact shift) を解析し、アミド<sup>1</sup>H、<sup>15</sup>N、それぞれとツリウム間の距離を算出した。さらに、ツリウムの常磁性に起因するジユビキチン分子の磁場中での弱い配向に伴う<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N核間の残余双極子結合も解析し、各 amino 酸残基の<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N結合ベクトル間の相対角度を算出した。ジユビキチンの複数の位置にツリウムを導入することで、分子全体に渡ってこれら構造データを取得し、得られた距離や角度情報に基づきジユビキチンが水溶液中でとりうるコンフォメーション集団を推定した。溶液中では、ジユビキチン中の二つのユビキチンは互いに殆ど接触せず、定まった相対配置 (コンフォメーション) はないと考えられていたが、解析の結果、いくつかの相対配置が高頻度に現われていることがわかった。さらに、塩強度を変化させたり、amino 酸変異を導入して解析を行なうことで、高頻度に現われるコンフォメーションの物理化学的特徴を明らかにした。ジユビキチンを含む複合体の結晶構造と上記で得たコンフォメーション集団の比較、および結合親和性の測定結果などから、ジユビキチンは、結合するターゲットによってコンフォメーション選択機構と誘導適合機構を使い分けていることを提案した。また、ターゲットタンパク質と複合体を形成したジユビキチンについても常磁性NMRの測定・解析を行なった。その結果、複合体中においても、ジユビキチンのコンフォメーションは完全には固定されておらず、比較的大きなドメイン間揺らぎが存在することが明らかになった。以上の様に、本研究によって、直鎖ユビキチン鎖の分子機構について多くの重要な洞察が得られた。</p>			

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

直鎖型ポリユビキチン化は、免疫応答を調節するシグナル伝達経路などで見られる翻訳後修飾で、関連するタンパク質間の相互作用を制御している。ユビキチン化には複数のパターンが知られているが、直鎖型ユビキチンの特徴は、よく研究されているLys48型ユビキチン鎖とは大きく異なり、鎖中における隣接ユビキチン間の接触が乏しいことである。隣接ユビキチン間の相対的配置が固定されないため、溶液中では多様なコンフォメーションをとると考えられており、実際、直鎖型ユビキチン鎖は様々なコンフォメーションで異なるターゲットタンパク質に結合し、複合体を形成する。しかし、その構造多様性が広く認知されている一方で、溶液中でのジユビキチンのコンフォメーション分布の実態、すなわち、多数のコンフォメーションが均等に出現するのか、或いは、比較的少数のコンフォメーションが優先的に出現するのか、などについては殆どわかっていなかった。直鎖ユビキチン鎖がとりうるコンフォメーション集団の実態を詳細に把握することは、ターゲットとなるタンパク質への選択的結合がどのように実現されるかを理解するうえで不可欠である。申請者は、直鎖型ポリユビキチンの最小単位である直鎖型ジユビキチンをモデルとし、溶液NMRを利用してジユビキチンのコンフォメーション分布を推定し、他の生化学実験と合わせることで、ジユビキチンの分子認識様式とコンフォメーション分布の関係について重要な洞察を得ている。

具体的には、第2章では、NMR解析のための試料作成やデータ解析手法に関する種々の検討と最適化を行ない、溶液中のジユビキチンのコンフォメーション集団を推定した。第3章では、NMRデータに含まれる誤差やデータの不足が、最終的に得られるコンフォメーション集団にどのような影響を及ぼすかを検証し、さらに、塩強度やアミノ酸置換がコンフォメーション集団に及ぼす影響も調べた。それらの結果から二種のターゲットタンパク質について、ジユビキチンとの結合反応機構を提案している。第4章では、ジユビキチンとターゲットタンパク質の複合体について同様の測定を行ない、複合体中におけるジユビキチンのコンフォメーションを解析した。

申請者は、選択的に<sup>15</sup>N標識した試料を作成することで、NMR信号の帰属の信頼性を大きく向上させ、従来にない規模で精度の高い構造データの取得に成功している。そのため、最終的に得られたコンフォメーション空間の信頼性は高い。申請者が明らかにしたコンフォメーション分布の偏りは、ターゲットタンパク質との結合反応を理解する上できわめて重要な情報である。さらに、申請者は、頻出するコンフォメーションの詳細な解析と結合親和性の差異を考察することで、コンフォメーション分布が、ターゲットタンパク質への結合機構（コンフォメーション選択、誘導適合等）を反映しているということを提唱するに至った。

本研究で得られた成果や用いられた方法論は直鎖型ユビキチン鎖の理解だけでなく、他の様々なタンパク質の溶液中での状態や生化学反応の理解に資するものであり、今後の構造生物学の発展に大きく貢献するものと期待される。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和3年6月29日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 年 月 日以降