

京都大学	博士 (工学)	氏名	空田 知樹
論文題目	Studies on functional properties of cyclic Lys48-linked ubiquitin chains as signaling molecules (Lys48 結合型環状ユビキチン鎖のシグナル分子としての機能性に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、細胞内タンパク質である L y s 4 8 結合型環状ユビキチン鎖の分子認識および物性を、溶液 NMR 法などの物理化学的手法を用いて解析した結果をまとめたものである。本論文は序論ならびに結論を含む全五章から構成されている。</p> <p>第一章は序論であり、前半部分ではユビキチン (U b) およびその多重合体であるユビキチン鎖 (U b 鎖) が、タンパク質分解や免疫応答などの広範な細胞内反応を制御する機構について解説している。まず、U b の構造的・機能的な特徴を概説した後、U b による細胞内タンパク質の翻訳後修飾および U b 鎖の形成機構について記述している。続いて、U b および U b 鎖の U b 結合タンパク質との相互作用について構造学的に説明している。特に、U b 鎖の結合型に応じた立体構造の差異が、U b 結合タンパク質による特異的な分子認識に寄与することを解説している。後半では、近年明らかにされている U b 鎖の構造形態 (直鎖状・混合鎖・分岐鎖) に依存した細胞内機能制御を説明している。さらに、基質タンパク質に結合していない U b 鎖 (遊離鎖) の細胞恒常性維持における役割を解説している。</p> <p>第二章では、U b 鎖の環化が U b 結合タンパク質による認識に与える影響について述べている。L y s 4 8 結合型環状 U b 鎖は、直鎖状 (非環状) U b 鎖が酵素反応により環化されることで形成される。環化は非環状 U b 鎖上の U b 分子の運動を制限する効果があるが、U b 結合タンパク質による認識に影響があるのか明らかになっていない。本章では、L y s 4 8 結合型 U b 鎖を選択的に認識し U b 単量体へ切断する酵素である O T U B 1 に対する環状 U b 鎖の分子認識に関して詳細に解析を行なった。まず、リアルタイム NMR 法を用いて U b 鎖切断速度の定量解析を行なった結果、切断速度は環化により著しく減少し、環状構造は U b 鎖認識を抑制する効果があることが示された。一方、U b 鎖切断は抑制されていたものの、環状 U b 鎖はわずかに切断されており、環状 U b 鎖と O T U B 1 との弱い相互作用が示唆された。そこで、溶液 NMR 滴定実験による原子レベルの相互作用解析を行なった結果、環状 U b 鎖は O T U B 1 との相互作用に用いられる I l e 4 4 パッチを溶媒に露出するように構造変化を起こすことが示唆された。これらの結果から、環状 U b 鎖は非環状 U b 鎖とは異なる機構で U b 結合タンパク質と相互作用することが示され、細胞内において非環状 U b 鎖と異なる機能発現をすることが示唆された。</p> <p>第三章では、環状 U b 鎖の細胞内機能に関わる物性について述べている。一般的に、タンパク質の環化は構造安定性を上昇させるため、バイオ医薬品開発において、環化はタンパク質の失活を防ぐために用いられている。また、<i>Enterococcus faecalis</i> などの生物は体内で環状タンパク質を合成し、安定なシグナル分子として使用している。これまで、シングルドメインタンパク質の環化の影響はよく研究されている一方、マルチドメインタンパク質の環化の影響はあまりよくわかっていない。そこで、本章ではマルチドメインタンパク質である U b 鎖の環化による静的ならびに</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	空田 知樹
<p>動的構造物性への影響を調べた。シングルドメインタンパク質の環化と同様に、U b 鎖の環化は、タンパク質分解酵素に対する耐性、熱力学および動的構造安定性を上昇させることが明らかとなった。また、NMR 横緩和分散測定を行なったところ、U b 鎖上のナノ秒オーダーのU b 分子の開閉運動は、環化によりミリ秒オーダーまで遅くなることがわかった。この環化によるU b 分子の開閉運動の低速化は、粗視化分子動力学シミュレーションにおいても観測することができ、環状U b 鎖は一過的にI l e 4 4パッチを露出した高次構造を形成することが示された。この動的な構造変化はO T U B 1などのU b 結合タンパク質との弱い分子間相互作用に重要な役割を果たすことが示唆された。</p> <p>第四章では、環状U b 鎖とZ N F 2 1 6との特異的な分子間相互作用について述べている。細胞内タンパク質であるZ N F 2 1 6は、U b 結合ドメイン(A 2 0 Z n f)を介して、基質タンパク質に付加されたU b 鎖と相互作用し、ユビキチン-プロテアソーム経路による基質タンパク質の分解を促進する。A 2 0 Z n fは、U b 分子のA s p 5 8パッチを認識することが報告されているが、U b 鎖との相互作用様式はよく分かっていない。A s p 5 8パッチはI l e 4 4パッチと異なりU b 鎖の溶媒露出表面に位置するため、U b 結合タンパク質との相互作用において環化の影響を受けにくい。実際、質量分析により、細胞内に存在する環状U b 鎖は試験管内で調製したA 2 0 Z n fと相互作用することが示されている。本章では、まず、等温滴定型カロリメトリーによる定量的相互作用解析を行なったところ、環状U b 鎖は非環状U b 鎖と比べ、A 2 0 Z n fに強く結合することが明らかとなった。また、溶液NMR 滴定実験による原子レベルの相互作用界面の解析を行なった結果、環化に関わらず、U b 鎖のA s p 5 8パッチならびにU b 分子間のリンカー領域を介し、A 2 0 Z n fのN末端ループ領域と<math>\alpha</math>ヘリックスに相互作用することが示された。興味深いことに、非環状U b 鎖と比べ、環状U b 鎖はU b 分子の開閉運動が抑制されているため、環状U b 鎖のU b 分子間のリンカー領域とA 2 0 Z n fのN末端ループ領域の間でより広い分子表面を介して相互作用することが示唆された。さらに、異なる細胞種由来の細胞抽出液内における生物学的安定性を評価したところ、いずれの細胞種においても、環状U b 鎖内のU b 分子間のリンカーはほとんど切断を受けず、非環状U b 鎖と比べ、圧倒的に安定に細胞内で存在すると考えられる。これらの結果から、環状U b 鎖はA 2 0 Z n fを介してZ N F 2 1 6と細胞内で安定に相互作用する可能性がある。Z N F 2 1 6は筋萎縮時のタンパク質分解経路の制御に重要であり、環状U b 鎖は基質タンパク質に結合するC末端を有していないため、Z N F 2 1 6と安定的に相互作用することによってZ N F 2 1 6が関わるタンパク質分解を阻害する効果があると考えられる。</p> <p>第五章は結論であり、本論文で得られた成果について要約している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、細胞内タンパク質である L y s 4 8 結合型環状ユビキチン鎖の分子認識や物性を、溶液 NMR 法などの物理化学的手法を用いて解析した結果をまとめたものであり、得られた主な成果は次の通りである。

1. L y s 4 8 結合型の U b 鎖は、環状構造をとることにより U b 鎖切断酵素である O T U B 1 による分子認識が抑制されることを明らかにした。一方、環状 U b 鎖は O T U B 1 によりわずかに切断された。環状 U b 鎖は I 1 e 4 4 パッチを露出するような構造を形成することにより O T U B 1 と弱く相互作用するためであると示唆された。以上の結果から、環状 U b 鎖は非環状 U b 鎖と異なる機構で認識され、細胞内において非環状 U b 鎖と異なる機能発現をすることが示唆された。
2. U b 鎖の環化はタンパク質の構造安定性を上昇させることを定量的に明らかにした。さらに、溶液 NMR 法および粗視化分子動力学シミュレーションにより、環状 U b 鎖が一過的に I 1 e 4 4 パッチを露出する高次構造を形成することを観測した。環状 U b 鎖の動的構造変化は、U b 結合タンパク質と相互作用する上で重要な役割を担うことを示唆した。
3. 等温滴定型カロリメトリーおよび溶液 NMR 法を用いた相互作用解析から、環状 U b 鎖は非環状 U b 鎖と比べ、Z N F 2 1 6 の A 2 0 Z n f と強く相互作用することを明らかにした。U b 鎖の環化は鎖内の U b 分子の開閉運動を抑制するため、環状 U b 鎖は非環状 U b 鎖と比べ、より広い分子表面を介して A 2 0 Z n f と相互作用することが示唆された。さらに、生物学的安定性評価により、環状 U b 鎖は細胞内で極めて安定に存在することを明らかにした。以上の結果は、環状 U b 鎖は細胞内で Z N F 2 1 6 と安定に相互作用して Z N F 2 1 6 が関わるタンパク質分解に影響を与える可能性を示しており、今後の環状 U b 鎖の機能解析において重要な知見となると考えられる。

以上、本論文は、細胞内機能未知の L y s 4 8 結合型環状ユビキチン鎖のシグナル分子としての分子認識および物性を多角的な視点で解析したものであり、学術上重要である。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 6 年 2 月 2 2 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 1 4 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。