

審査の結果の要旨

氏名 小笠 広起

ユビキチン—酵母ユビキチン加水分解酵素複合体の動的構造平衡の解明と題する本論文は、ユビキチン C 末端加水分解酵素 YUH がユビキチンを認識する機構に関して、NMR で解析した成果を述べたものである。本論文は、全 5 章から構成されており、第 1 章に序論、第 2 章に実験材料および実験方法が記されている。第 3 章に実験結果がまとめられ、第 4 章では、実験結果に対する考察について述べている。第 5 章には、第 3 章で触れなかった実験結果の詳細や、補足的な実験の結果をまとめている。

第 3 章においては、まず、YUH と複合体を形成したユビキチンの NMR スペクトルを取得し、複合体における動的構造平衡を検出している。次に、緩和分散実験と NMR 滴定実験により、ユビキチンと YUH の複合体形成経路を明らかとしている。最後に、常磁性緩和促進効果 (PRE) を利用した実験を行って、複合体形成段階に生じる過渡的複合体の結合様式を明らかとしている。

ユビキチン C 末端加水分解酵素 YUH は、ユビキチン C 末端のカルボキシル基が形成したペプチド結合を切断する酵素である。ユビキチンの構造ドメイン領域を除去して、C 末端領域だけ残したペプチドが、ユビキチン加水分解酵素と結合する速度が著しく遅いことから、ユビキチン構造ドメイン領域が認識に重要であることが示されていた。しかし、活性中間体を模倣した複合体の結晶構造において、反応部位と離れた部位に結合するユビキチン構造ドメイン領域が、なぜ認識に重要であるか明らかでなかった。これに対し、本論文では、YUH と複合体を形成したユビキチンが二つの NMR シグナルを与えたことから、複合体の結晶構造と同じ結合様式と、それとは異なる結合状態が存在することを明らかとしている。それぞれの結合状態は、complex A, complex B と呼んでいた。次に、緩和分散実験と NMR 滴定実験から、これら状態間の交換における速度定数を決定し、非結合状態から complex B を介して complex A が形成される経路が、85 % 以上と主流な反応経路であることを明らかとしている。最後に、過剰量の均一 ^2H , ^{15}N 標識したユビキチンに対して、常磁性金属を修飾した YUH E16C 変異体を混合したサンプルで、転移 PRE 実験を行い、complex B における結合界面の同定を試みていた。転移 PRE 実験では、観測対象としたユビキチン各残基のアミドプロトンのうち、complex B において E16C に修飾した常磁性金属と近接した原子を、NMR シグナルの緩和速

度増大として検出した。その結果、ユビキチン C 末端 Leu73、Gly75、Gly76 に有意な緩和速度増大が観測され、常磁性金属と 5 Å 程度に近接していることを示していた。これらの残基は、複合体の結晶構造において 15 Å 以上離れていることから、complex B ではユビキチン C 末端が反応部位に入っていない状態であることを明らかとしていた。また、ユビキチン構造ドメイン領域 Lys48、Gln49、Leu50、Glu51、Asp52 にも有意な緩和速度増大が観測され、常磁性金属と近接していることを示していた。これらの残基は、複合体の結晶構造においても常磁性金属と近接していることから、complex B では、ユビキチン構造ドメイン領域は結晶構造と同様に結合していることを示していた。

第 4 章においては、非結合状態から complex B を介して、反応可能な complex A が形成されることの生理学的意義に関して議論している。ユビキチンと YUH の複合体の結晶構造において、YUH N 末端は、YUH の活性システインとユビキチン C 末端が結合できるように配置していた。一方、非結合状態のユビキチン加水分解酵素の結晶構造では、N 末端が活性システインをマスクしていた。以上より、N 末端が、基質以外の分子の反応部位への接近をブロックすることで、非特異的な分解を抑制していることが提唱されていた。本研究で明らかとなった complex B であれば、ユビキチン C 末端と YUH N 末端が近接したまま、多様なコンフォメーションの間を交換することが可能であり、結合に適した構造を効率よく選別できる。これにより、反応可能な complex A を、高い選択性で、効率よく形成できると提唱していた。

本研究では、これまで解析が困難であった、タンパク質-タンパク質複合体の形成段階に一過的に生じる相互作用に着目し、NMR を用いた構造生物学的解析の方法を確立した。その結果、ユビキチン加水分解酵素がユビキチン構造ドメイン領域を有する基質だけを効率よく認識する機構を提唱している。

以上、本研究の成果は、ユビキチン加水分解酵素の基質認識機構に対して新たな知見を加えるものであり、これを行った学位申請者は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。