

## 審査の結果の要旨

氏名 小玉 優哉

NMR 分析と計算科学的手法に基づく分子間相互作用部位の迅速な解析法の開発と題する本論文は、NMR 分析および計算化学的手法を組み合わせ、タンパク質表面における分子間相互作用部位を迅速に同定する方法論を確立した成果について述べたものである。本論文は全 7 章から構成されており、第 1 章では序論が述べられ、第 2 章および第 3 章ではタンパク質—タンパク質間相互作用部位の解析法について、第 4 章ではタンパク質—低分子間相互作用部位の解析法についてまとめられ、第 5 章では本手法を応用し得られた新規の知見、第 6 章では総括および今後の展望、第 7 章では材料と方法が述べられている。

第 1 章では、分子間相互作用部位の同定において、NMR 分析を用いた既存の手法の課題が述べられている。既知のタンパク質立体構造情報を利用することで、一般に多くの時間と労力を要するシグナルの帰属を回避する手法が報告されているものの、大量のサンプルと多数の実験が必要なため依然として多くの時間と労力を要し、得られる結果には解析者の主観とアミノ酸選択的な観測に起因するバイアスが含まれることが指摘されている。また、適用可能な解析がタンパク質—タンパク質間相互作用のみであることが説明されている。

第 2 章では、まず既報の手法における課題の解決方法が提示されている。タンパク質中の  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  の化学シフト値が、各アミノ酸残基の部位ごとに特定の狭い範囲の値をとることが統計的に示され、それらが重ならないよう最適な組み合わせで選択的に標識した 1 サンプルのみを調製しリガンド滴定実験を行うことで、シグナル未帰属のまま、相互作用部位に存在するアミノ酸残基の種類と数が明らかとなることが示されている。また、相互作用に伴う化学シフト変化の大小を判定するための閾値の設定では、アミノ酸選択的な観測に起因するバイアスを除くため、アミノ酸残基種ごとに相互作用部位への存在傾向を基にした重み因子を設定し、各シグナルの化学シフト変化量の加重平均値を求め閾値とする解析法が提示されている。さらに、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  相関シグナルおよび  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  相関シグナルの同時観測と TROSY 法による高分解能分析を同時に実現する新たな NMR 実験用のパルスシーケンスが提示され、測定時間の短縮と高分子量タンパク質への適用を可能にしている。次に、酵母由来ユビキチン(Ub)および酵母由来ユビキチン加水分解酵素(UH)を用いた実験と解析により、これらの手法の有効性が示されている。

第 3 章では、まず、解析者の主観を排除した結果を迅速かつ簡便に得られるようにするため、実験結果から相互作用部位に存在するアミノ酸残基を選び出す手順を規定し、プログラム化している。そして、既知のタンパク質複合体構造を用いたシミュレーションおよび Ub-UH の相互作用系へ適用した結果から、プログラムの有効性が示されている。次に、Ub と UH について、本手法の結果を基に距離拘束条件を設定しドッキングシミュレーションを行うことで、高精度のタンパク質複合体モデル構造の構築に成功している。

第 4 章では、これまでに開発した手法を基に、タンパク質—低分子間相互作用部位の解析法を開発している。タンパク質—タンパク質間相互作用とはその様式が異なるため新たな手法を考案し、解析用のプログラムを開発している。手法の有効性は、既知のタンパク質—低分子複合体構造を

用いたシミュレーションの他、mitogen-activated protein kinase の 1 つ p38 $\alpha$  とその阻害剤 2-amino-3-benzyloxy pyridine を用いた実験と解析結果から示されている。

第 5 章では、既報の知見を基にデカン酸が p38 $\alpha$  のアロステリックエフェクターとして機能する可能性を予想し、本手法により相互作用部位の同定を試みている。結果、デカン酸が p38 $\alpha$  へ特異的に相互作用することを初めて明らかにし、その相互作用部位が、アロステリックサイトの可能性が議論されている MAP kinase insert region であることを強く示唆する結果が取得されている。

第 6 章では、今後の展望として、特にタンパク質-低分子複合体モデル構造の構築について述べられており、ドッキングシミュレーションで得られたモデル構造から予測される化学シフト変化と実験結果とのパターン類似性を指標にしたアプローチが議論されている。

本論文では、選択的標識を応用し、さらにシグナル未帰属の実験結果の新規解析法とプログラム、および新規 NMR パルスシーケンスを開発することで、これまででない迅速かつ簡便な分子間相互作用部位の同定法を確立した。さらに、本手法を適用し、p38 $\alpha$  とデカン酸の相互作用に関する新たな知見を与えた。したがって、本研究を行った学位申請者を、博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。