

論文審査の要旨

| | | | |
|---|----------------|----|-------|
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (理 学) | 氏名 | 上脇 隼一 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第①・2項該当 | | |
| 論文題目 | | | |
| <p>Studies on the structure and function relationships of the unstructured regions in protein</p> <p>(タンパク質に内在する非構造領域の構造機能相関に関する研究)</p> | | | |
| 論文審査担当者 | | | |
| | 主 査 | 教授 | 楯 真一 |
| | 審査委員 | 教授 | 中田 聡 |
| | 審査委員 | 教授 | 泉 俊輔 |
| 〔論文審査の要旨〕 | | | |
| <p>生体内反応の担い手であるタンパク質が示す高度に効率的・選択的な反応制御機構の解明は、生化学における中心的課題である。タンパク質のX線結晶構造が初めて解かれてから 50 年以上の間、多くの研究者は、タンパク質の精密な立体構造に基づいてこの機構解明を目指し「構造生物学」という独立した研究分野を構築した。構造生物学は、タンパク質立体構造データにもとづいて、タンパク質分子が持つ特定の立体構造がその機能を制御するという「構造機能相関」という概念を確立した。しかし、ヒトの全ゲノム配列が明らかとなり、その配列情報を解析した結果、ヒトの細胞中に存在する全タンパク質は 30%~50%程度の割合で安定な立体構造をとり得ない領域を含むことが明らかになった。さらに、ヒト以外の生物の全ゲノム解析が進むにつれて、高等生物であるほど安定な立体構造をとり得ない領域を含む割合が増大していることが示された。以上のような背景から、従来の構造生物学の基本概念とされたタンパク質の構造機能相関という概念に対して、安定な立体構造を持たない部分が高度なタンパク質の機能制御に関わる可能性が指摘され、ポストゲノム配列解析後の重要な生物化学の研究対象となってきた。本研究は、タンパク質中に存在する安定な構造を持たない構造柔軟部位が持つ構造特性を、核磁気共鳴分光法 (NMR) により解析し、安定な立体構造を持たない部位が示す新たな特性を明らかにすることを目的とした。さらに、NMR 構造解析から明らかにした構造特性に伴う機能上の意味についても、生化学的に検証した。</p> <p>研究対象としたヒストンシャペロンタンパク質 HMGB2 は、2つの DNA 結合ドメインがリンカーと呼ばれる柔軟な構造部により結びつけられた全体構造を持つ。研究室では、過去にそれぞれの DNA 結合ドメイン立体構造を NMR により明らかにしているが、個別のドメイン構造解析を進めるなかで、N 末端側の DNA 結合ドメイン(box A)の C 末端部に存在する Tyr 残基の欠損が boxA 中の 3 番目のα-helix 構造の配向を変化させることをみ</p> | | | |

いだした。アミノ酸配列の特徴および、核スピン緩和解析から、この Tyr 残基を含む末端部には安定な構造が存在しないことが分かった。しかし、NOE スペクトルを用い ^1H 核間距離解析および、系統的なリンカー部のアミノ酸変異と NMR シグナル変化の相関から、この Tyr 残基の芳香環部と boxA の N 末端部が分子内で過渡的に相互作用することで 3 番目の α -helix 構造の配向を規定することが分かった。この相互作用には、Tyr の芳香環と N 末端部残基のアルキル側鎖の間で形成される複数の CH- π 相互作用が関わることで NMR 立体構造から明らかになった。以上の解析から、過渡的に形成される弱い CH- π 相互作用が、構造柔軟なリンカー部がとり得る構造アンサンブルに摂動を与え、その結果リンカーを含む boxA の C 末端部がとり得る平均構造を変化させることが分かった。

本研究ではさらに、C 末端部の Tyr を介したリンカー部の過渡的相互作用が 2 つドメインの溶液内での相対配向をも規定することを明らかにした。この解析は、研究室で独自に開発したタンパク質の磁場に対する分子配向テンソルを決定する技術(DIORITE)を用いて初めて可能になった。上記の変異体のうち、最も大きなリンカー構造変化を示す Y78G 変異体と、野生体を対象として DIORITE 法によるドメイン間配向解析を行った。さらに、X 線小角散乱(SAXS)を併用して、Y78G 変異体、野生体のドメイン配向ダイナミクス解析を行った。DIORITE 法によるドメイン間配向情報と、SAXS から得られる分子回転半径異方性情報の 2 つの異なる構造制約を同時に満たす HMGB2 の全体構造を決定する分子動力学計算法を開発した。この計算法を用いて、溶液中での HMGB2 の平均全体構造を明らかにした。野生体全体の構造は、2 つのドメインが伸びた構造を維持しようとする性質を持つのに対して、Y78G 変異体では 2 つのドメインが、最大 58 度の伏角のドメイン間相対配向変化を示す大きなドメイン運動を持つことを明らかにした。従来の NMR 構造解析では、HMGB2 のように柔軟なリンカーでドメインがつながったタンパク質では、溶液中で特定のドメイン相対配向を維持することなく、全くランダムな配向を持つとされた。しかし、新たに開発した研究手法を用いた今回の構造解析では、構造柔軟部の弱い過渡的な相互作用が、分子全体の形態を規定する働きをもつことを明らかにした。

野生型で優先的に形成される全体構造の機能上の意味を明らかにする目的で、単独では環状になり得ない短い DNA 断片を使い HMGB2 添加による DNA 環化実験を行った。リンカー部の変異により、ドメイン間配向に大きな運動性が誘導された Y78G 変異体 HMGB2 では、野生体に比べて DNA 環化効率がやや低下していることが示された。野生型では、2 つのドメインが特定の配向を優先的に維持されるため、2 つのドメインの協同的な DNA 結合を促進すると考えられる。このことから、安定な構造を保持しない柔軟な構造部が、弱い相互作用を介して特定のドメイン配向に偏りを誘導することによりタンパク質の機能を促進することが分かった。

以上、本論文で示された知見は、従来のタンパク質の構造機能相関の基本概念に修正を加える重要な意味を持つ。審査の結果、本論文の著者は博士(理学)の学位を授与される十分な資格があると認める。

公表論文

- (1) “Preferential domain orientation of HMGB2 determined by the weak intramolecular interactions mediated by the interdomain linker”

Jun-ichi Uewaki, Hironari Kamikubo, Jun-ichi Kurita, Noriteru Hiroguchi, Hiroshi Moriuchi, Michiteru Yoshida, Mikio Kataoka, Naoko Ustunomiya-Tate, and Shin-ichi Tate

Chemical Physics 419 (2013) 212-223.