

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 理 学 )	氏名	王 静
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>NMR studies on the structure and function relationships of proteins by using artificial structural perturbations</p> <p>( 構造摂動を利用した NMR によるタンパク質の構造機能相関研究 )</p>			
論文審査担当者			
主 査	教 授	楯 真一	
審査委員	教 授	井出 博	
審査委員	教 授	泉 俊輔	
審査委員	副主任研究員	Shang-Te Hsu (台湾中央研究院)	
〔論文審査の要旨〕			
<p>タンパク質の立体構造と機能との相関は、タンパク質の結晶構造をもとに研究されてきている。このような研究では、高分解能結晶構造をもとにタンパク質の機能発現機構を推定する。しかし、タンパク質は溶液中で構造揺らぎをもつために、静的な立体構造にもとづく考察だけではタンパク質の機能制御機構を明らかにすることはできない。タンパク質の立体構造と動的構造の双方の解析が必要である。</p> <p>申請者・王静は、タンパク質の立体構造とその動的構造がどのようにタンパク質の機能制御に関わるかを明らかにするために、タンパク質の機能に直接関わらない位置にあるアミノ酸残基に対して変異あるいは化学修飾を加えることで生じるタンパク質の機能変調と、タンパク質立体構造および動的構造の変化の相関から、タンパク質の機能制御機構解明を進める研究を行った。とくに、結晶構造解析では明らかにできないタンパク質の動的構造のタンパク質機能制御への関わりについて NMR を駆使して解析した。</p> <p>本研究では2つの異なる機能と構造をもつタンパク質を対象として、以下に示す成果を得た。</p> <p>細胞核内でクロマチン構造形成に関与するタンパク質である HMGB1 は、死滅した細胞から細胞外に放出されることで、近傍の細胞に対して細胞が死滅する外部刺激が与えられたことを知らせる役割 (アラミン) をすることが知られている。細胞外に放出された HMGB1 タンパク質の N 末端ドメインにある2つのシステイン残基は細胞外では酸化され、細胞表層にある受容体への親和性が変化するなどの明らかな機能変調が生じることが知られている。本研究では、HMGB1 の N 末端ドメインの2つのシステインが酸化されることにより形成される分子内ジスルフィド結合が誘導する分子構造変化と、その動的構造変化を明らかにした。</p> <p>酸化状態にある HMGB1 の N 末端ドメインは、ジスルフィド結合部から離れた位置にあるループ部にアロステリック構造変化を誘導した。さらに、ループ部の構造揺らぎにも</p>			

変化が観測された。酸化によるジスルフィド結合形成が HMGB1 の DNA あるいは細胞膜状にある受容体タンパク質との分子間総合作用のためのインターフェース部にあたるループ部の立体構造と動的構造に変化を与えることが細胞外に放出された HMGB1 がアラミンとしての機能する上で必要であることを明らかにした。

Pin1 タンパク質はリン酸化された Ser/Thr-Pro (pSer/pThr-Pro)モチーフ特異的に Pro のペプチド結合を異性化する酵素である。Ser/Thr-Pro モチーフは高頻度にリン酸化修飾をうけ、リン酸化を介した細胞内シグナル伝達に関わる。Pin1 タンパク質は、リン酸化された Ser/Thr-Pro モチーフに対してさらにペプチド結合の異性化を行うことでリン酸化を介した信号伝達系における構造依存的な信号制御を実現する。Pin1 タンパク質の生物学的な重要性は明らかであるが、その酵素反応機構はほとんど解明されていない。本研究では、活性部位近傍にあるアミノ酸 Cys113 を Ser および Ala に置換する変異を導入することで、活性部位にある水素結合ネットワークの動的構造が変化することを明らかにした。

Pro 異性化反応機構については分子動力学計算により C113 の側鎖硫黄原子に対して、基質結合にともなって水素付加が生じることが起点となり、活性部位における水素結合ネットワークの再編成が生じることが異性化促進に関わるとされている。本研究では、C113 の側鎖の水素付加状態変化を模した C113S 変異と、C113 の側鎖に存在する S を失った状態を模した C113A 変異を用いて、C113 の状態変化がどのように水素結合ネットワーク摂動につながるかを解析した。

解析の結果、C113S および C113A のいずれの場合においても活性部位にあるヒスチジン間で形成されている水素結合ネットワークが切断されることが示された。特に C113 位置にある負電荷(S)が失われた状態では、活性部位に存在するヒスチジンが野生型では生じないイミダゾリウム状態となり、そのことが大きな活性低下につながっていた。

以上の解析を通して、この研究では C113 の側鎖の状態変化が活性部位における水素結合ネットワークの動的構造制御に大きな影響を与えることを明らかにし、Pin1 の活性制御における水素結合ネットワークの動的構造変化の重要性を明確に示した。

本研究を通して、申請者・王静は、タンパク質活性に直接関わらない部位に対する構造摂動を通して、従来のタンパク質構造機能相関研究では困難であった、タンパク質の動的構造の機能制御機構への関わりを明らかにすることに成功した。

以上、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ものと認める。

公表論文

1. Allosteric breakage to the hydrogen bond within the dual-histidine motif in the active site of human Pin1 PPIase  
Jing Wang, Naoya Tochio, Ryosuke Kawasaki, Yu Tamari, Xu Ning, Jun-ichi Uewaki, Naoko Utsunomiya-Tate, and Shin-ichi Tate  
*Biochemistry*, 54, 5242-5253 (2015).
2. Redox-sensitive structural change in the A-domain of HMGB1 and its implication for the cisplatin modified DNA  
Jing Wang, Naoya Tochio, Aya Takeuchi, Jun-ichi Uewaki, Naohiro Kobayashi, and Shin-ichi Tate  
*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441, 701-706 (2013).

参考論文

1. The C113D mutation in human Pin1 causes allosteric structural change in the phosphate binding pocket of the PPIase domain through the tug of war in the dual-histidine motif  
Ning Xu, Naoya Tochio, Jing Wang, Yu Tamari, Jun-ichi Uewaki, Naoko Utsunomiya-Tate, Kazuhiko Igarashi, Takuma Shiraki, Naohiro Kobayashi, and Shin-ichi Tate  
*Biochemistry*, 53, 5568-5578 (2014).