

論文審査の要旨

| | | | |
|---|----------------|----|-----|
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (理 学) | 氏名 | 徐 宁 |
| 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>Structure biological study on the peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerization mechanism (プロリンペプチド結合異性化機構の構造生物学的研究)</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>細胞は、外部からの化学的・物理的な刺激に応じて、細胞内のタンパク質をリン酸化する応答を示す。外部刺激で誘導される細胞膜上の受容体タンパク質で生じるリン酸化を基点として、細胞内にある複数のタンパク質の間でリン酸化修飾を介したカスケード反応が生じる。リン酸化修飾のリレーによる細胞内でのタンパク質間相互作用は、最終的に細胞外からの刺激を核内の遺伝子制御につなげるシグナル伝達の役割をはたす。このシグナル伝達に関わる一群のタンパク質には、Ser/Thr-Pro というリン酸化修飾を受ける Ser/Thr について Pro が位置するジペプチド配列が共通して見出される。このジペプチド配列中の Pro のアミド結合は、通常のペプチド結合が <i>trans</i> 型構造をとるのとは異なり <i>cis</i> 型構造をとりやすい性質を持つ。この Pro ペプチド結合の <i>trans</i> から <i>cis</i> あるいはその逆となるペプチド構造の異性化速度はきわめて遅く、リン酸化カスケード反応中ではいずれかの構造に固定されていると考えられてきた。しかし、Ser/Thr-Pro の Ser あるいは Thr がリン酸化されることで、リン酸化されたジペプチドユニット特異的に <i>cis-trans</i> 構造異性化を促進する酵素 Pin1 が見付き、Pin1 がリン酸化部位の骨格構造を変化させることでリン酸化シグナル伝達経路を変調させることがわかってきた。実際 Pin1 タンパク質の細胞内で発現量の変化が、細胞分裂、細胞分化の異常につながり細胞のガン化を誘導することがわかっている。また、神経細胞においては Pin1 タンパク質の活性低下・発現低下がアルツハイマー病を誘導することも明らかになっている。しかし、Pin1 タンパク質がリン酸化された Ser/Thr-Pro ユニット中のペプチド結合異性化反応を促進する機構についてはほとんど理解されていない。本研究では、Pin1 タンパク質の異性化機構の解明を目指して、活性低下することが知られていた Pin1 変異体 (C113D アミノ酸置換体) と野生型との立体構造、動的構造の違いを明らかにすることを目的とした。</p> | | | |

NMR を用いることで C113D 変異体 Pin1 の異性化速度が、野生型に比べて約 70 分の 1 に低下していることを明らかにした。さらに、等温滴定型熱量計を用いることで C113D 変異体ではリン酸化ペプチドに対する親和性が大きく低下したことを見出し、C113D 変異体の活性低下の理由がリン酸基に対する結合能の低下が理由であることを明らかにした。アミノ酸変異を導入した部位と、リン酸基を認識する部位とはタンパク質立体構造上は大きく離れているため、C113D 変異がアロステリックにリン酸基結合部位の構造変化を誘導したと考えられた。実際に NMR により、野生型および C113D 変異体 Pin1 の立体構造を解くことで、このアロステリック構造変化が誘導されていることを確認した。

安定同位体により誘導される化学シフト変化（同位体効果）を使った独自の解析技術により Pin1 タンパク質の活性部位にある 2 つの His 残基間の水素結合強度が C113D 変異により変化することを明らかにした。活性部位の立体構造を維持するために重要である 2 つの His 残基の間の水素結合強度が低下することにより活性部位全体の構造安定性が低下することが予測された。NMR による核スピン緩和解析から、C113D 変異体では msec 時間域での構造揺らぎが明らかに大きくなっていること、さらに、2 次元 NMR スペクトルを用いた H/D 交換速度の解析からも C113D 変異体では活性部位の構造安定性が、明らかに低下していることが確認された。

上記の一連の構造解析の結果から、従来言われていた C113 側鎖チオールの求核攻撃による異性化反応機構は否定された。Pin1 活性部位に存在する水素結合ネットワークの機能上の重要性は、類縁タンパク質の結晶構造解析から示唆されていたが、本研究は活性部位における水素結合ネットワークが極めて微妙なバランスの上で構築されており、わずかな水素結合強度のバランスの変化で酵素活性が変調することを明らかにした。

以上、本論文の成果は、細胞内シグナル伝達制御の鍵となるタンパク質 Pin1 の構造機能相関に関して、従来の考えを変える新たな知見を加えた。また、NMR 分光法の特徴を縦横に駆使してタンパク質構造の動的構造特性と機能との相関を解明する研究手法は高いレベルにあり、この点においても本論文の特徴がある。したがって審査の結果、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) “The C113D mutation in human Pin1 causes allosteric structural changes in the phosphoate 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 Utsumomiya-Tate, Kazuhiko Igarashi, Takuma Shiraki, Naohiro Kobayashi, and Shin-ichi Tate

Biochemistry (2014) *53*(34), 5568-5578.