

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 池谷 鉄兵

タンパク質が別のタンパク質を特異的に認識し、機能する過程は、生体内で見られる最も基本的な現象の一つである。このような過程で見られる分子間相互作用の高い特異性は、細胞内シグナル伝達タンパク質、膜受容体、酵素など多くのタンパク質で見ることができ、一般に、タンパク質間の相互作用は、複雑な高次構造と物理・化学的特性によって規定されると言われている。しかしながら、その特異性を立体化学的側面から厳密に解析できた例は少なく、十分に理解されていないのが現状である。申請者は、RNase 型コリシンを対象として、このような特異的な分子認識機構の解析を試みた。さらに NMR での異種タンパク質の複合体解析で常に問題となるタンパク質間の NOE シグナルの帰属手法を開発し、これらの結果を 8 章にまとめた。

第一章では、核磁気共鳴スペクトル法(NMR 法)について概説し、RNase 型コリシンの役割、および分子認識についてこれまでの知見をまとめ、本研究の意義について記している。

第二章では、コリシンタンパク質の精製手法、および材料について記している。

第三章では、NMR での構造解析において、コリシン複合体のような異種タンパク質で常に問題となるタンパク質間で現れる NOE シグナルの帰属法について述べている。分子間の NOE の帰属は、すべての原子が共有結合でつながっている分子内のシグナル帰属に比べて、自由度が大きく候補シグナルを絞り切れないため、一般に難解とされている。通常、このような複合体の系の場合、タンパク質間領域の同定に  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  および  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  を組み合わせたフィルター測定を行うが、この方法では感度が大幅に減少してしまい、必ずしも帰属には至らない。そこで、本研究では、相互作用にともなう化学シフト変化の解析や、単量体時の三次元構造情報等を組み合わせることにより、安定同位体フィルター測定に頼らずに結合面を区別する半自動的な手法を開発し、コリシン E6CRD-ImmE6 複合体の構造解析に応用した。また、近年報告されている構造最適化の手法を応用して、すでに決定されている ImmE6、ImmE6W47C に適用し、構造の正確さ、精密さの両面において向上が得られることを実証している。

第四章では、構造決定した E6-CRD の構造について詳細に述べている。E6-CRD は、6 本の  $\beta$  シートを主体とした構造であり、シート的一方の側には、短い  $\alpha$  ヘリックスを含むターン領域がみられた。E6-CRD の  $\beta$  シートは、逆平行  $\beta$  シートの形をとっているものの、ImmE6 と比べて、かなりねじれた形のシートを形成していた。変異体実験から示されている予想活性部位の側鎖は、いずれも  $\beta$  シート的一方の側を向いており、シート中央のストランドに位置していた。これらの活性部位は、分子表面モデルで見ると、他の部分と比べて、幾分くぼんだ領域に位置していた。これまで知られている RNase ではそのほとんどが、中心に位置する  $\beta$  シートとシート的一方の側にそれを支えるような  $\alpha$  ヘリックスが存在するフォールドをしていることが分かっており、コリシン E6 の構造も一般的な RNase と同

様のフォールドをとっていることが分かった。Imm との結合部位は、他の領域と比べて相対的にダイナミクスが大きいことが構造計算の結果から想定された。

第五章では、ImmE6 と ImmE6W47C の構造と X 線結晶構造解析より明らかにされている ImmE3、およびモデリングした ImmE4 の構造を比較している。ImmE3、ImmE4、ImmE6W47C の中心は、大きなポケットが形成されていたが、ImmE6 は、逆に凸状に盛り上がっているように形をしていた。ポケットの中心部には、2~3 残基の変異残基があり、この付近の残基が、Imm の特異性に何らかの影響を与えている可能性があると考えられた。

第六章では、構造決定した E6CRD-ImmE6 複合体の構造について詳細に述べている。E6CRD-ImmE6 複合体の構造は、E6-CRD、ImmE6 それぞれ単体の構造とほぼ同様な構造であり、大部分の領域はほとんど変化が見られなかった。変化の大きかった領域は、CRD の N 末端から 14-23 番目の領域で、単量体の構造では、この領域は安定な構造はほとんどとっていないと考えられたが、複合体の構造では ImmE6 と結合した形で非常に安定な構造をとっていた。また、B シートの最末端のストランドにおいても、単体の E6-CRD では、その他の領域と比べて収束が悪く、運動性は相対的に大きいと予想されたが、複合体の構造では収束の良い構造が得られた。この 2 つの領域はいずれも ImmE6 の結合面の一部であり、ImmE6 との結合によって、構造が安定化しているものと考えられた。CRD の予想活性部位の側鎖の位置を、複合体と単体の構造で比較すると、これらの構造はほとんど変化が見られなかった。

第七章では、3 種類の RNase 型コリシンの構造から、結合面のモデルを作成し、分子認識機構について述べている。CRD と Imm の結合は、2 つの結合領域からなっており、一方の結合面は、円状の結合をしていた。また、結合面に位置する変異アミノ酸は、円状の結合の半分の側に集中していた。そこで、分子認識機構を理解するために、この部位を中心とした結合面のモデルを提案した。このモデルでは、結合の安定性に対して正に働くアミノ酸の組み合わせを+1、安定性に負に働く組み合わせを-1、距離が離れているなどの理由から、正にも負にも働かないと予想される組み合わせを 0 とし、その合計を計算している。E4CRD-ImmE4Q74F の組み合わせを除くと、Imm による阻害活性が表れる組み合わせは、このモデルでの合計点が+1 点以上であることが分かる。したがって、阻害活性と結合面 B の 3 領域の組み合わせとの関係は、明らかであり、RNase 型コリシンの分子認識は、主にこの 3 つの領域の組み合わせによって決定されていると考えることができる。

第八章では、コリシン E6CRD、E6CRD-ImmE6 複合体の構造決定と ImmE6、ImmW47C の構造最適化を行い、コリシンと Imm との特異性における構造生物学的考察についてまとめている。また、複合体の構造決定の過程で、分子間の NOE シグナルの帰属手法を開発し、構造最適化の過程を提案したことについて概説し、今後の展望について述べている。

以上、本論文はコリシン E6-CRD、ImmE6、およびその複合体の構造解析を行い、NMR による構造解析で常に問題となる分子間の NOE の帰属法の開発を行ったものであり、特に RNase 型コリシンの分子認識機構と分子間 NOE の帰属法に関する新たな知見が得られた。これらの知見は、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値があるものと認めた。