

## 論文の内容の要旨

論文題目            酵素リガンド複合体の NMR 解析  
                          ーユビキチン結合酵素とミリスチン酸転移酵素への応用

氏名                 三 浦   隆 昭

本論分は、1) 多次元 NMR によるヒトユビキチン結合酵素 2b (HsUbc2b) の溶液構造決定ならびに化学シフトマッピング法を用いた HsUbc2b とユビキチンの結合領域の決定、2) transferred NOE (trNOE) 法による *Candida albicans* ミリスチン酸転移酵素選択的阻害剤の酵素結合コンホメーション決定、の 2 部から構成される。

1) 多次元 NMR によるヒトユビキチン結合酵素 2b (HsUbc2b) の溶液構造決定ならびに化学シフトマッピング法を用いた HsUbc2b とユビキチンの結合領域の決定

### <ユビキチン結合酵素>

ユビキチン結合酵素 (Ubc, E2) は、真核細胞において選択的タンパク質分解シグナルとして重要な機能を持つユビキチン化に関わる酵素群の一つである。E2 は、そのユビキチン結合システイン残基とユビキチン分子 C 末端のグリシン残基間にチオエステル結合を生成して、ユビキチンリガーゼの作用により標的タンパク質にユビキチン分子を転移する。ヒトユビキチン結合酵素 2b (HsUbc2b, 152aa) は、16 種知られるヒトユビキチン結合酵素の一つで、ラットを使った筋萎縮性の抗悪疫質モデルにおいてこの酵素の mRNA レベルが増幅していることから、ユビキチン化に

よる骨格筋の代謝昂進原因分子としての可能性が疑われている。ユビキチン結合酵素については、これまでに7つのホモログの X 線結晶構造が報告されており、また、ユビキチンについても X 線ならびに NMR により立体構造が決定されている。しかしながら、HsUbc2b の 3 次元構造ならびにユビキチン-ユビキチン結合酵素複合体に関する構造化学的な情報の発表はなかった。

#### <ヒトユビキチン結合酵素 2b の溶液構造決定>

HsUbc2b の立体構造を多次元溶液 NMR 法により決定した。NOE 帰属には、スイス連邦工科大学で新たに開発された NOE 自動帰属プログラム CANDID を用いた。構造計算はプログラム DYANA で行い、得られた構造をさらに AMBER 力場を用いてプログラム OPALp によりエネルギー最小化を行った。構造計算には、NOE 自動帰属プログラムより得られた 1475 の NOE に由来する距離制限情報、70 の水素結合情報、ならびに 286 の 2 面角制限情報を用いた。得られた 20 の最終構造はよく収束し、残基 4-148 についての RMSD 値は、主鎖、側鎖重原子それぞれに対し 0.69 Å、1.39 Å であった。HsUbc2b は、4つの $\alpha$ ヘリックスおよび4つの $\beta$ ストランドからなる反平行 $\beta$ -シートを有する $\alpha/\beta$ 型のコンホメーションを取っており、ユビキチン結合システイン残基は、第4 $\beta$ ストランドと第2 $\alpha$ ヘリックス間を繋ぐ部分のほぼ中心に位置する (図 1)。また、このシステイン残基上に、2つのループが張り出して浅い溝を形成しているが、 $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$ -NOESY 測定から一方のループ (Gln115-Pro121) の運動性が高いことが分かった。このループの運動性が、ユビキチンとの相互作用に必要である可能性が考えられる。

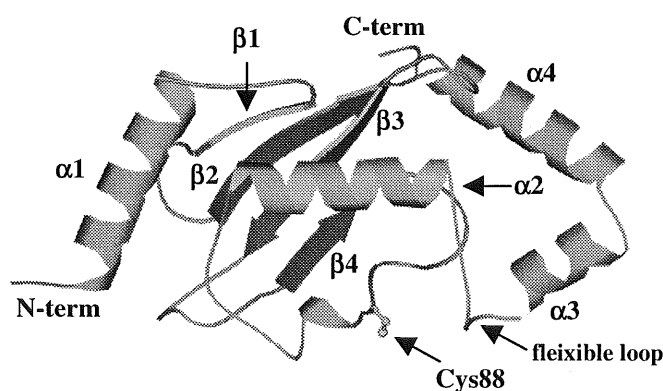


図 1. HsUbc2b-NMR 構造  
図中、2 次構造、N-,C-末端、活性部位および flexible ループの位置を示した。

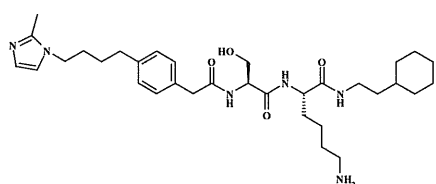
#### <化学シフトマッピング法を用いた HsUbc2b とユビキチンの結合領域の決定>

解析に供するユビキチン-HsUbc2b 複合体の調製には、HsUbc2b のユビキチン結合システイン残基をセリン残基に置換した変異体 HsUbc2b(C88S)を用い、化学的により安定な両タンパク質間のエステル結合複合体を調製した。また、両タンパク質のアミドグループにおける化学シフト変化は、ユビキチンまたは HsUbc2b(C88S)のいずれかについてのみ  $^{15}\text{N}$  ラベルされた 2 つの異なる複合体を調製して測定した。ユビキチンでは、HsUbc2b との相互作用は、主に C 末端 Val70-Gly76 および Lys48, Gln49 に見られた。一方、HsUbc2b では、化学シフト変化を示した残基は、活性部位近傍である第 2  $\alpha$ -ヘリックスおよび第 2 第 3  $\alpha$ -ヘリックス間に位置する flexible なループ部分に集中していた。また、HsUbc2b に対するユビキチンの滴定実験から、HsUbc2b が活性部位の裏側にあたる  $\beta$ -シート部分でユビキチン分子と非共有結合的な弱い相互作用をしていることが分かった。これら化学シフト変化に関して得られた知見を基にユビキチン-HsUbc2b 複合体モデルを構築した。ただし、複合体中でユビキチンと HsUbc2b 両者間で NMR シグナルの線幅が異なっていることから、これら 2 分子の複合体中における相対的な位置関係にはある程度の自由度があると考えられた。

#### 2) transferred NOE (trNOE) 法による *Candida albicans* ミリスチン酸転移酵素選択的阻害剤の酵素結合コンホメーション決定

抗真菌剤の新しい分子標的としての可能性が期待されている *Candida albicans* ミリスチン酸転移酵素 (CaNmt) に対する選択的阻害剤 Ro09-3472/000 誘導体の酵素結合構造を trNOE 法を用いて決定した。trNOE 法は、酵素を含む複合体全体の構造を決めずに低分子阻害剤の酵素結合コンホメーションを決定するのに有効な NMR 法であるが、観察された trNOE には、リガンドと酵素作用部位との特異的な結合から生じるものに加えて、非特異的な相互作用やスピン拡散効果からの寄与も含まれる場合があるので注意が必要である。ここでは、CaNmt の作用部位に高い親和性を持つ既知化合物 **1** (図 2) を用いて、Ro09-3472/000 誘導体と酵素間の特異的な結合を阻害し、化合物 **1** 添加前後で NMR 共鳴シグナルの線幅の変化を測定することにより、観察された trNOE が、酵素活性部位とテスト化合物との特異的な相互作用によるものであることを示すことができた。また同時にこれらの化合物に対し、ウシ血

清アルブミン (BSA) を用いて非特異的なタンパク質結合活性の可能性についても試験した。



1

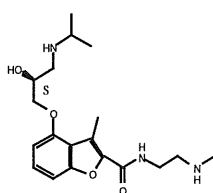


図 2. 化合物 1 ( $K_{i(app)} = 0.031 \pm 0.003 \mu\text{M}$ ; Devades *et al.* (1998) *J. Med. Chem.* 41, 996-1000 )および Ro09-4764/001 の化学構造式

試験した 6 つの Ro09-3472 誘導体のうち、Ro09-3700/001 (ラセミ体) およびそのエナンチオマーである Ro09-4764/001 (*S*, 図 2), Ro09-4765/001 (*R*) の 3 化合物は、CaNmt に対し特異的な結合を示し、かつ、BSA との相互作用は示さなかった。そこで、trNOE を選択フィルターとしてコンホメーション検索を行った結果、Ro09-4764/001 (図 2) について CaNmt 結合コンホメーションを決定することができた (図 3)。NMR 由来の Ro09-4764/001 酵素結合コンホメーションを、X 線結晶解析によって決定された 2 つの Ro09-4764/001 類縁体と比較した結果、これら 3 者はよく一致していることが分かった。

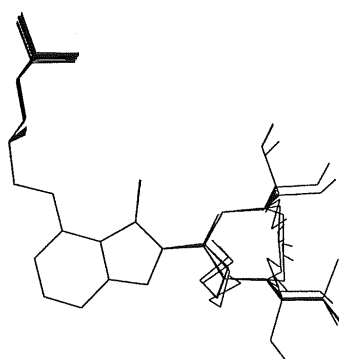


図 3. Ro09-4764/001 の CaNmt 結合コンホメーション NMR 構造 22 個の重ね合わせ 図に示した構造は、trNOE に由来する 14 の距離制限条件を用いて化合物のコンホメーションライブラリーから選択した。