

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 三 浦 隆 昭

本論文は、核磁気共鳴 (NMR) 分光法を用いた酵素リガンド複合体の解析に関するもので、3章よりなる。研究対象とした2種の酵素(ヒトユビキチン結合酵素 2b ならびに *Candida albicans* ミリスチン酸転移酵素)は、いずれも新規薬剤開発の標的分子として知られ、効率的かつ合理的な薬剤開発には、構造化学的な情報が必須である。そこで著者らは、これら2つの酵素リガンド複合体について、それぞれ化学シフトマッピング法および転移 NOE 法を応用して NMR 解析を行った。

第1章では序論として、まず本研究で用いられている2つの NMR 測定法の原理、次に本論文の構成について述べている。

第2章では、ヒトユビキチン結合酵素 2b (HsUbc2b, 152 aa) に関する解析が述べられている。ユビキチン結合酵素は、真核細胞中、選択的タンパク質分解シグナルとして機能するユビキチン化に関わる酵素群の一つであり、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複合体を形成する。ヒトユビキチン結合酵素 2b (HsUbc2b, 152aa) については、ラット悪液質モデルを用いた実験から、ユビキチン化による骨格筋の代謝昂進との関与が報告されており、HsUbc2b-ユビキチン複合体に関する構造化学的な情報は HsUbc2b を分子標的とした抗悪液質剤開発に有益と考えられた。本研究では、まず多核多次元 NMR 法を用いて HsUbc2b の 3次元溶液構造を決定した。NOE 帰属については、自動 NOE 帰属プログラム CANDID を用い、NMR によるタンパク質の構造決定において一般的にもっとも時間を要する NOE 帰属の過程を効率的に行うことができた。得られた構造は、類縁タンパク質の X 線構造と全般的によく一致することが示された。また、ユビキチン結合システイン残基上に張り出している2つのループのうち、一方について溶液中運動性が高いことを $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$ -NOE 測定から示すことができた。このループの運動性がユビキチンとの結合に必要な可能性が考えられる。

次に化学シフトマッピング法を用いて、HsUbc2b-ユビキチン複合体の結合領域を明らかにした。その際、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を用い、化学的により安定なエステル結合複合体を調製した。また、両タンパク質の主鎖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)のいずれか一方が  $^{15}\text{N}$  標識された2つの異なる標識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、活性部位近傍に位置する第2  $\alpha$ -ヘリックスおよび第2 第3  $\alpha$ -ヘリックス間に形成される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する情報を基にユビキチン-HsUbc2b 複合体モデルを構築した。ただ

し、複合体中、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 分子の相対的な位置関係にはある程度の自由度があることが示唆された。ユビキチン分子を標的タンパク質に転移させるというユビキチン結合酵素の機能から考えて、“固い”複合体を形成しないというこの観察結果は妥当であると著者は考察している。

第 3 章では、*Candida albicans* ミリスチン酸転移酵素 (CaNmt) の選択的阻害剤に関する転移 NOE (trNOE) 解析について述べた。CaNmt は、基質タンパク質 N 末端へのミリスチン酸付加反応を触媒する酵素で抗真菌剤の分子標的としての可能性が期待されている。trNOE は、酵素結合・解離の速い交換状態にあるリガンドについて、酵素結合構造を決定するのに有効な NMR 法である。ただし、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。本研究では、非特異的結合については、既知の CaNmt 選択的阻害剤を利用したリガンドの 1 次元  $^1\text{H}$ NMR の共鳴線幅測定、また、スピン拡散については trROE スペクトルの評価を行い、これらの影響を取り除くことに成功した。得られた trNOE を用いて決定した阻害剤の酵素結合構造は、その後、類縁化合物について決定された X 線酵素結合構造とよく一致した。

本研究は、細胞機能上重要なユビキチン化の過程を理解する上で鍵となる構造化学的情報を与えたものであり、また、trNOE の応用に際して一般的に問題となる点について解決法を提起するものである。さらに、これらの結果は、両分子を標的とした薬剤開発に有益な情報を与えるものであって、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。