

# 博士論文

高圧力 NMR 法によるユビキチンの構造揺らぎに関する研究

(Conformational fluctuation of ubiquitin studied by high-pressure NMR spectroscopy)

2014 年 9 月

立命館大学大学院理工学研究科  
総合理工学専攻博士課程後期課程

北沢 創一郎

立命館大学審査博士論文

論文題目:

高圧力 NMR 法によるユビキチンの構造揺らぎに関する研究  
Conformational fluctuation of ubiquitin studied by high-pressure  
NMR spectroscopy

2014 年 9 月

September, 2014

立命館大学大学院理工学研究科

総合理工学専攻博士課程後期課程

Doctoral Program In INTEGRATED  
Graduate School of Science and Engineering  
Ritsumeikan University

氏名 北沢 創一郎

氏名 Soichiro Kitazawa

指導教員：加藤 稔教授 / 北原 亮准教授

Supervisor : Professor Minoru Kato / Associate Professor Ryo  
kitahara

## 目次

1 章 緒言 .....	4
1-1. タンパク質の構造揺らぎと機能 .....	4
1-2. 高圧力 NMR 法 .....	6
1-3. ユビキチンの構造揺らぎ .....	8
1-4. 参考文献 .....	12
2 章 N <sub>2</sub> 状態を模倣した Q41N 変異体の合理的設計と性質 .....	15
2-1. 緒言 .....	15
2-2. 実験方法 .....	16
2-2-1. 試料調製 .....	16
2-2-2. NMR の測定と解析 .....	17
2-2-3. Cleanex-PM 測定 .....	18
2-2-4. UIM 滴定実験の解離定数の解析 .....	18
2-2-5. 熱力学的解析 .....	19
2-3. 結果 .....	20
2-4. 考察 .....	36
2-4-1. 圧力とアミノ酸変異による効果 .....	36
2-4-2. 高エネルギー状態の構造的な特徴 .....	37
2-4-3. ユビキチンの分子認識メカニズム .....	39
2-4-4. まとめ .....	40
2-5. 参考文献 .....	41
3 章 ユビキチン準安定構造 N <sub>2</sub> の 1 気圧と 2500 気圧における立体構造解析 .....	43
3-1. 緒言 .....	43
3-2. 実験方法 .....	43
3-2-1. 試料調製 .....	43
3-2-2. NMR の測定と構造計算 .....	43
3-3. 結果と考察 .....	44
3-4. 参考文献 .....	58
4 章 まとめ .....	60
謝辞 .....	62

# 1 章 緒言

## 1-1. タンパク質の構造揺らぎと機能

タンパク質は 20 種類のアミノ酸で形成されるポリペプチド鎖である。一本鎖のタンパク質は、一般的に残基間の非共有結合(van der Waals 力、水素結合、静電相互作用、疎水性相互作用)と共有結合(ジスルフィド結合)によって折りたたまれ、自由エネルギー的に最も安定な立体構造(いわゆる天然構造)を形成する。タンパク質の立体構造は、X 線結晶構造解析や核磁気共鳴法などにより原子座標決定がされている。2014 年には、約 10 万件の立体構造が蛋白質構造データバンク(Protein Data Bank: <http://pdj.org/>)に登録されている。タンパク質の特異的な立体構造は、タンパク質と標的の複合体の原子座標決定によって、機能発現に重要な働きがあることがわかっている<sup>1-5</sup>。しかし、水溶液中でのタンパク質の立体構造は、天然構造で常に存在しているわけではなく、それより自由エネルギー的に不利な状態(高エネルギー状態)との間に化学平衡が成り立っており、天然状態から変性状態の幅広い構造空間を揺らいでいる。タンパク質の構造揺らぎは、分子認識などの機能発現やアミロイドなどのミスフォールディング病に重要な働きがあるといわれている(Fig. 1.1)<sup>6-15</sup>。例えば、高エネルギー状態が機能に関わる例としてジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR)がある。DHFR は、活性中心が closed 型と occluded 型、open 型の 3 つの構造を持つことが、NMR スピン緩和解析からわかっている<sup>6-7</sup>。反応の変化に伴いこれら 3 つのコンホメーションの分布率が変化するが、最も安定構造に対し他の 2 つのコンホメーションの分布率は低く、立体構造解析は困難である。一般的にはこのような高エネルギー状態は存在確率が低く、分光学的に捉えることは困難であるため、その立体構造や機能的意義はよくわかっていない点が多い。本研究では、ユビキチンの高エネルギー状態を模倣した変異体を合理的に設計し、高圧力 NMR 法により精密な立体構造と機能発現機構を明らかにすることを目的とする。

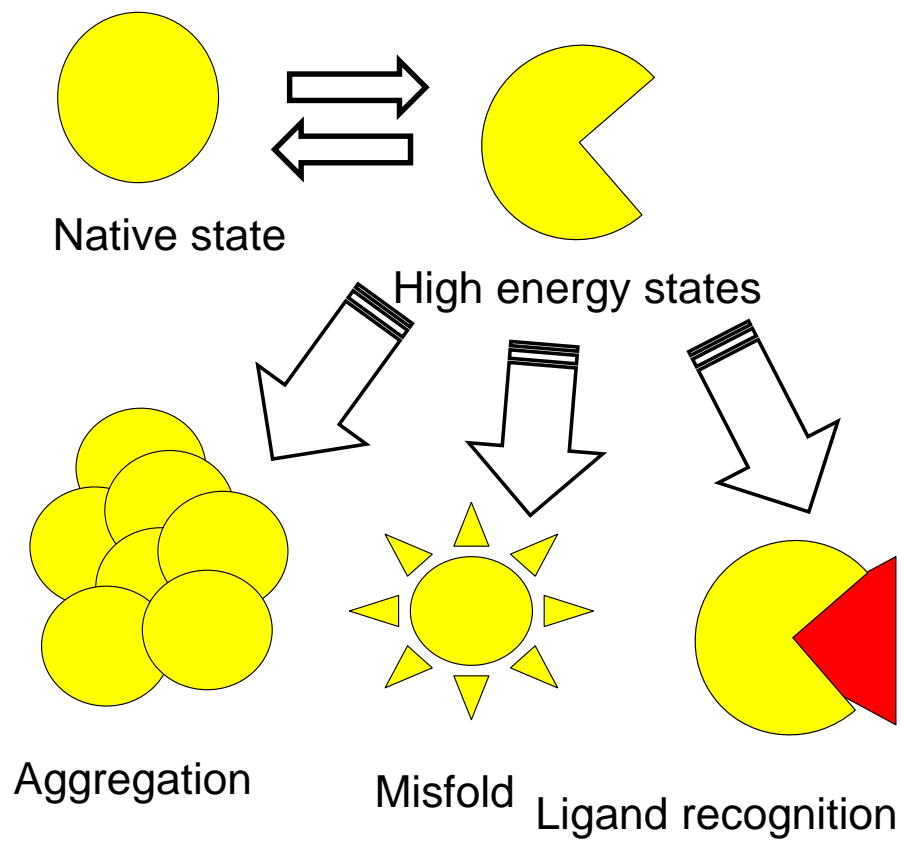


Fig. 1.1 生体内のさまざまなイベントに関わるタンパク質の構造揺らぎ

## 1-2. 高圧力 NMR 法

高圧力下で核磁気共鳴(NMR)測定を行うことで、高圧力 NMR 法は、分布率の小さい高エネルギー状態を原子分解能で捉えることのできる強力な方法である<sup>16,17</sup>。タンパク質の立体構造や分子構造の揺らぎは、温度、圧力、溶媒条件によって摂動を受ける。そのうち圧力摂動は、部分モル体積が小さい状態を安定化する。タンパク質水溶液に圧力を加えると、タンパク質の二面角などに変化が見られ、体積が小さい状態が安定化される。状態間のギブズ自由エネルギー差 $\Delta G$ と平衡定数 $K$ の関係式と $\Delta G$ を圧力について一次項までテイラー展開した式が①式である。

$$\Delta G = -RT\ln K = \Delta G^\circ + \Delta V^\circ(p - p_0) \cdots \textcircled{1}$$

$R$ は気体定数、 $T$ は熱力学温度、 $\Delta V$ は状態間の体積差、 $p$ は圧力である。 $\Delta V^\circ$ 状態間の部分モル体積差である。タンパク質は、一般的に構造の秩序性が失われるほど、天然状態で存在する内部の空隙が表面に露出し、部分モル体積が小さくなるため、加圧により状態間の体積差に応じて、高エネルギー状態が安定化される。NMR法は、タンパク質のフォールディング研究でよく使用される蛍光スペクトルや赤外吸収スペクトルなどに比べ空間分解能が高く、原子分解能で解析を行うことができ、ほかの分光器と比べて情報量が非常に多い。多次元 NMR 法が基礎にある近代の NMR 法は、立体構造だけではなく、分子構造の揺らぎや安定性に関わる様々な情報を得ることができる。耐圧セル方式で行われる高圧力 NMR 法(Fig.1.2)では、検出器内に設置した耐圧セルにステンレスチューブにつながったハンドポンプにより、加圧して測定を行う。NMR 分光器には手を加えないため、最先端の NMR 機器を用いたあらゆる NMR 測定が可能である。そのため、距離情報(NOE)や J カップリング、残余双極子相互作用 (RDC)による結合角度の測定に基づく、立体構造研究とスピン緩和解析による分子構造のダイナミクス研究が可能である。水溶液中でのタンパク質のこれらの情報は他の手法で得ることは難しく、高圧力 NMR 法は高エネルギー状態の研究において非常に強力な方法である。

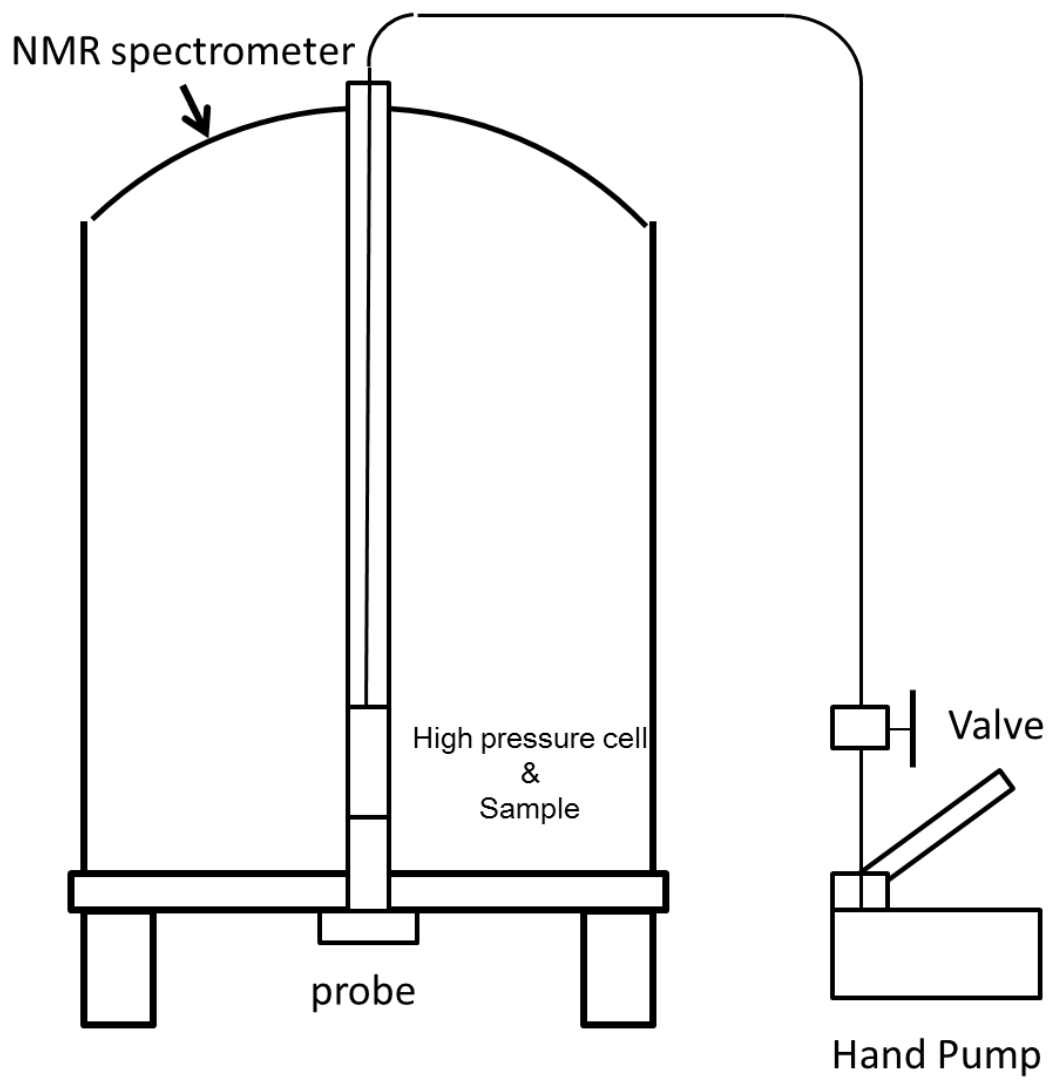


Fig. 1.2. 耐圧セルを用いた高圧力 NMR 法のシステム

### 1-3. ユビキチンの構造揺らぎ

ユビキチンは、76 残基の小さなタンパク質で、NMR 解析でよく使われるモデルタンパク質の一つである。ユビキチンは、真核生物でアミノ酸配列が高度に保存されていることが知られている。その一方、原核生物には存在しない。その小ささとは裏腹にユビキチンは、多様な生体反応に関わっている。例えば、分解のターゲットとなるタンパク質の翻訳後修飾を行い ATP 依存的なタンパク質の分解に関わる。他にもシグナル伝達、DNA の修復など<sup>18,19</sup>に関わっていることが知られている。この機能は、ターゲットに結合したユビキチン同士との結合様式の違いによって決まることが知られている。ユビキチンには 7 つの Lys 残基があり、ポリユビキチンを形成するとき、これらの Lys とユビキチン C 末端の Gly が結合する。この時、どの Lys 残基に結合するかにより、その後の機能が変わる。例えば、Lys48 を介したポリユビキチン鎖が結合したタンパク質は、プロテアソームに運ばれ、ATP 依存的なタンパク質の分解が行われる。これは生体内で不要となったタンパク質を分解する役割がある。ポリユビキチン鎖の形成機構は、はじめにユビキチンとユビキチン活性化酵素 E1 が複合体を形成する。次にユビキチン結合酵素 E2 と、ユビキチン転移酵素 E3 によって C 末端部分が標的のタンパク質もしくは標的と結合状態にあるポリユビキチン鎖と結合する。ポリユビキチン化された標的タンパク質は、プロテアソームに輸送され、分解される<sup>20</sup>。2004 年に「ユビキチンを介したタンパク質分解の発見」の功績により、Aaron Ciechanover、Irwin A. Rose、Avram Hershko の 3 人がノーベル化学賞を受賞している。Lys48 以外にも例えば Lys63 を介したポリユビキチン鎖は、シグナル伝達とエンドサイトーシスと膜タンパク質の輸送と DNA の修復に関わっている<sup>20</sup>。さらにはモノユビキチン化されたユビキチンはクロマチンが調整する転写に関わっている<sup>20</sup>。

ユビキチンの立体構造を Fig.1.3 に示す。ユビキチンの立体構造は、2 つの平行  $\beta$ -sheet( $\beta_1$ :1-7,  $\beta_5$ :64-72)、3 つの逆平行  $\beta$ -sheet( $\beta$ -sheet 2:10-17、 $\beta$ -sheet 3:40-45、 $\beta$ -sheet 4:48-50)、 $\alpha_1$ -helix( $\alpha_1$ -helix:23-34)、 $3_{10}$ -helix ( $\alpha_2$ -helix:56-59)及びループで構成されている。



ユビキチンと相互作用を行うタンパク質(脱ユビキチン化酵素 DUB、ユビキチン相互作用モチーフ UIM など)は、L8、I44、V70 を中心とした共通の疎水性パッチで相互作用することが、ユビキチンとリガンドの構造解析<sup>21-27</sup>などから知られている。

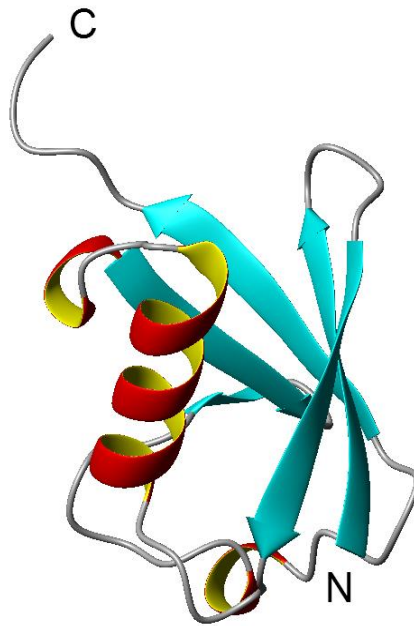


Fig. 1.3. ユビキチン野生型の結晶構造(PDBID:1UBQ)  
 $\alpha$ -helix を赤色、 $\beta$ -strand を青色で示す。

NMR 法によるスピン緩和測定と原子間距離情報に基づいて、動的な構造アンサンブルの解析 (dynamic-ensemble refinement DER<sup>28</sup>、ensemble refinement with orientational restraints EROS<sup>29</sup>、refinement for native proteins using a single alignment tensor ERNST<sup>30</sup>)が行われている。構造アンサンブルの解析は、水溶液中におけるタンパク質の構造変化を原子分解能で理解するための強力な手法である。DER はオーダーパラメーターと NOEs によって、ピコ秒からナノ秒で揺らぐ構造アンサンブルを再構成する。EROS と ERNST は、残余双極子相互作用(RDC)と核オーバーハウザー効果 NOEs によって、ピコ

秒から数十マイクロ秒で揺らぐ構造アンサンブルを再構成する。これらの解析によってユビキチンは L8、I44、V70 の疎水性パッチを囲む  $\beta_1$ - $\beta_2$  間のループと  $\beta_3$ - $\beta_4$  間のループが、構造的に揺らいでおり、タンパク質の認識に重要<sup>21-27</sup>であることがわかっている。

高圧力 NMR 法によれば、ユビキチンの天然構造( $N_1$ )と準安定構造( $N_2$ )と局所変性構造 I と変性状態 U は、水溶液中で Fig. 1.5 のような平衡状態で存在することが知られている<sup>30,31</sup>。 $N_2$  構造は、3000 気圧下で座標決定がされている<sup>30</sup>。30 気圧で  $N_1$  は約 85%、 $N_2$  は約 15% 存在し、3000 気圧では  $N_1$  は約 23%、 $N_2$  は 77% 存在することが分かっている。 $N_2$  状態では R42 と V70 をつなぐ 2 つの水素結合が弱まっており  $\alpha_1$ -helix の配向が変わり、疎水性コアが部分的に水溶液中に露出する<sup>30,31</sup>。ほかにも、C 末端アミノ酸残基(アミノ酸残基 70-76 残基)に構造上の大きな違いが表れる。また、局所変性構造 I は 8、33-42 番が局所的に変性している構造である<sup>30,32</sup>。これらユビキチンの高エネルギー状態は、E1-E2-E3 カスケード反応を有するホモログ群で保存されていることが知られている<sup>31,32</sup>。さらに  $N_2$  構造、I 構造で構造が変化している部位は、E1 や E2 との相互作用部位である<sup>33-38</sup>。これらの点から  $N_2$  構造が E1 との相互作用に重要な働きをしていることが示唆されている<sup>30,32</sup>。しかし、高エネルギー状態がどのように分子認識と関わっているかは、いまだわかってはいない。ほかの問題点として、 $N_2$  状態の立体構造解析に使われたキャピラリー型耐圧セルの感度が低く、二次元 NOESY スペクトルで解析されているため精度が悪い<sup>30,31</sup> ことと、 $N_2$  状態の存在確率が、77%と低いことなどが挙げられる<sup>30-32</sup>。

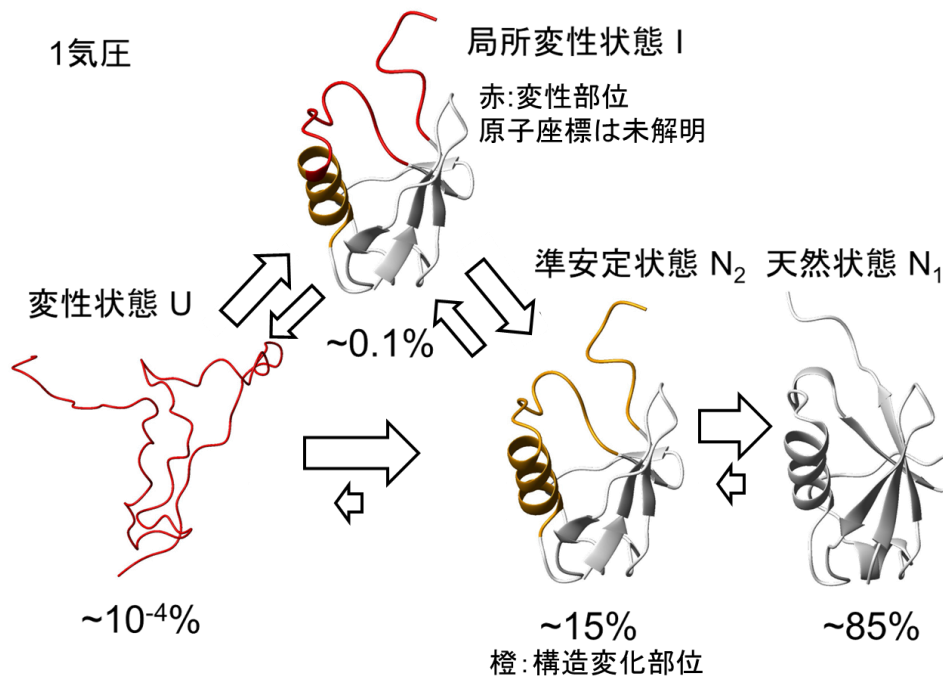


Fig. 1.4. 高圧力 NMR 法によって明らかになったユビキチンの構造揺らぎ<sup>40</sup>

黄色: N<sub>2</sub> 状態で N<sub>1</sub> 状態と比べ配向に変化が見られた部位

赤色: 変性状態にあるアミノ酸残基

本論文では、先行研究より高精度かつ高感度で、十分に N<sub>2</sub> 状態の存在確率が高い条件で座標決定を行い N<sub>2</sub> 状態の意義を明らかにした。耐圧セルの改善により、耐圧性を高めることは重要であるが、3000 気圧以上では局所変性状態 I や完全変性状態 U などの準安定状態 N<sub>2</sub> 以外の高エネルギー状態の分布率も増加するため、準安定状態 N<sub>2</sub> の選択的な安定化は困難である。2 章では、準安定状態 N<sub>2</sub> の選択的な安定化のために、N<sub>2</sub> 状態を模倣した変異体を作製し、ダイナミクスと安定性の検証を行った。3 章では、高圧力 NMR 法により N<sub>2</sub> 状態が安定化した変異体の解析を行い N<sub>2</sub> 状態が 97% 分布している状態で座標決定を行った。この立体構造をもとに N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub> 状態転移と標的との結合機構の関係について検証を行った。4 章では、2 章と 3 章の結果についてまとめ、ユビキチン N<sub>2</sub> 状態の機能的意義を明らかにした。

#### 1-4. 参考文献

1. Schwartz TW and Sakmar TP (2011) *Nature*, **477**, 540-541.
2. Chung KY, Rasmussen SGF, Liu T, Li S, DeVree BT, Chae PS, Calinski D, Kobilka BK, Woods VL and Sunahara RK (2011) *Nature*, **477**, 611-615.
3. Rasmussen SGF, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah STA, Lyons J, Caffrey M, H.Gellman S, Steyaert J, Skiniotis G, Weis W, Sunahara RK and Kobilka B (2011) *Nature*, **477** 549-555.
4. Umena Y, Kawakami K, Shen JR and Kamiya N (2011) *Nature*, **473**, 55-60.
5. Payandeh J, Scheuer T, Zheng N and Catterall WA (2011) *Nature*, **475**, 353-358.
6. Boehr DD, McElheny D, Dyson HJ and Wright PE (2006) *Science*, **313**, 1638-1642.
7. Bhabha G, Lee J, Ekiert DC, Gam J, Wilson IA, Dyson HJ, Benkovic SJ and Wright PE (2011) **332**, 234-238.
8. Bouvignies G, Vallurupalli P, Hansen DF, Correia BE, Lange O, Bah A, Vernon RM, Dahlquist FW, Baker D and Kay LE (2011) *Nature*, **477**, 111-117.
9. Keramisanou D, Biris N, Gelis I, Sianidis G, Karamanou S, Economou A and Kalodimos CG (2006) *Nat. Struct. Mol.Biol.*, **13**, 594-602.
10. Tzeng SR and Kalodimos CG (2009) *Nature*, **462**, 368-372.
11. Popovych N, Sun S, Ebricht RF and Kalodimos CG (2006) *Nat. Struct. Mol.Biol.*, **13**, 831-838.
12. Tzeng SR and Kalodimos CG (2012) *Nature*, **488**, 236-240.
13. Yanagi K, Sakurai K, Yoshimura Y, Konuma T, Lee YH, Sugase K, Ikegami T, Naiki H and Goto Y (2012) *J. Mol. Biol.* **422**, 390-402.
14. Koshland DE (1958) *Proc Natl Acad Sci*, **44**, 98-104.

15. Boehr DD, Nussinov R and Wright PE (2009) *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 789-796.
16. Kamatari Y, Kitahara R, Yamada H, Yokoyama S and Akasaka K (2004) *Methods*, **34**, 133-143.
17. Li H and Akasaka, K (2006) *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 331-345.
18. Salomons FA, Ács K and Dantuma NP (2010) *Cell Res.*, **316**, 1289-1295.
19. Jackson SE (2006) *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 1845-1853.
20. Hochstrasser M (2009) *Nature*, **458**, 422-429.
21. Sgourakis NG, Patel, MM, Garcia AE, Makhatadze GI and McCallum SA (2010) *J. Mol. Biol.* **396**, 1128-1144.
22. Swanson KA, Kang RS, Stamenova SD, Hicke L and Radhakrishnan I (2003) *EMBO J.* **22**, 4597-4606.
23. Katherine S. Hamilton, Michael J. Ellison, Kathryn R. Barber, R. Scott Williams, John T. McKenna SH, Ptak C, Glover M and Gary S. Shaw (2001) *Structure*, **9**, 897-904.
24. Hong YH, Ahn HC, Lim J, Kim HM, Ji HY, Lee S, Kim JH, Park EY, Song HK and Lee BJ (2012) *FEBS Lett.*, **583**, 287-292.
25. Swanson KA, Kang RS, Stamenova SD, Hicke L and Radhakrishnan I (2003) *EMBO J.* **22**, 4597-4606.
26. Fujiwara K, Tenno T, Sugasawa K, Jee JG, Ohki I, Kojima C, Tochio H, Hiroaki H, Hanaoka F and Shirakawa M (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 4760-4767.
27. Sgourakis NG, Patel MM, Garcia AE, Makhatadze GI and McCallum SA (2010) *J. Mol. Biol.* **396**, 1128-1144.
28. Lindorff-Larsen K, Best RB, DePristo MA, Dobson CM and Vendruscolo M (2005) *Nature*, **433**, 128-132.

29. Lange OF, Lakomek NA, Fares C, Schröder GF, Walter KFA, Becker S, Meiler J, Grubmüller H, Griesinger C and de Groot BL (2008) *Science*, **320**, 1471-1475.
30. Fenwick RB, Esteban-Martin S, Richter B, Lee D, Walter KFA., Milovanovic D, Becker S, Lakomek NA, Griesinger C and Salvatella X (2011) *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10336-10339.
31. Kitahara R, Yokoyama S and Akasaka K (2005) *J. Mol. Biol.* **347**, 277-285.
32. Kitahara R, Okuno A, Kato M, Taniguchi Y, Yokoyama S and Akasaka K (2006) *Magn. Reson. Chem.* **44**, 108-113.
33. Kitahara R, Yamaguchi Y, Sakata E, Kasuya T, Tanaka K, Kato K, Yokoyama S and Akasaka K (2006) *J. Mol. Biol.* **363**, 395-404.
34. Kitahara R, Zhao C, Saito K, Koshihara S, Ioune M, Kigawa T, Yokoyama S and Akasaka K (2006) *Biochemistry*, **47**, 30-39.
35. Fenwick RB., Esteban-Martin S, Richter B, Lee D, Walter KFA., Milovanovic D, Becker S, Lakomek NA, Griesinger C and Salvatella X (2011) *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10336-10339.
36. Page RC, Pruneda JN, Amick J, Klevit RE and Misra S (2012) *Biochemistry* , **51**, 4175-4187.
37. Lee I and Schindelin H (2008) *Cell*, **134**, 268-278.
38. Olsen SK and Lima CD (2013) *Mol. Cell.*, **49**, 884-896.
39. 北原亮, 横山茂之, 赤坂一之 (2006) *分光研究* **55**, 10-20.

## 2章 N<sub>2</sub>状態を模倣した Q41N 変異体の合理的設計と性質

### 2-1. 緒言

1.3 で、ユビキチンの機能、構造、ダイナミクスは、様々な生化学的、生物物理学的手法により研究<sup>1-8</sup>が進められているが、高エネルギー状態の 1 気圧下における研究は、まだ進んでいないことを示した。これの最大の問題は、1 気圧において、高エネルギー状態のみを存在させることが、野生型ではできないためである。そこで、高圧力下で変化した相互作用部位を特定し、アミノ酸変異によってそれを模倣することにより、高エネルギー状態と類似した立体構造をもつ変異体を作製できるか試みた。我々は 30 気圧下の N<sub>1</sub> 状態の立体構造と 3000 気圧下における N<sub>2</sub> 状態の立体構造比較を行い、N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub> 状態転移に関わる 2 つの重要な相互作用を発見した(Fig.1.1)。

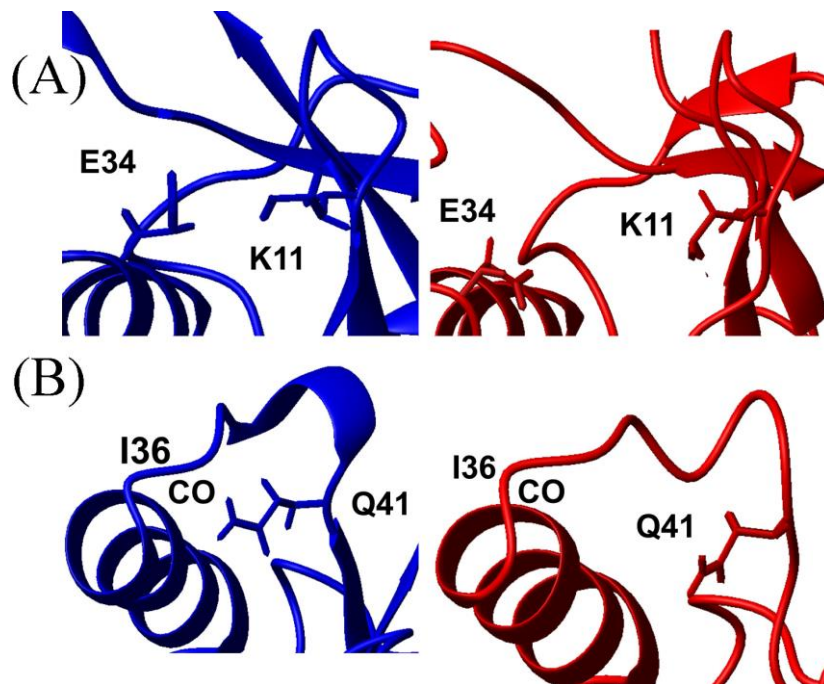


Fig. 2.1. 高圧力下で切断されている相互作用

30 気圧下の立体構造(PDB: 1v80)を青色で、3000 気圧下の立体構造を赤色で示す。

(A)K11, E34 間の塩橋周辺、(B)I36 カルボニル基と Q41 水素結合周辺である。

これら二つの相互作用が高圧力下で切断されている。

一つは、K11 と E34 の間にある塩橋である。もう一つは I36 の主鎖のカルボニル基と Q41 の側鎖のアミノ基との間にある水素結合である。特に I36 と Q41 はユビキチンホモログ群で進化的に保存されているアミノ酸残基である<sup>9</sup>。アミノ酸置換法により、我々はこれら 2 つの相互作用を切断、もしくは減弱する変異体 (K11A、E34A、Q41A、Q41N) を作製した。K11A、E34A は高圧力下で切断されている K11-E34 間の塩橋を切断した変異体である。同様に Q41A は、I36 のカルボニル基と Q41 のアミノ基間の水素結合を切断した変異体である。Q41N は、Q41→N のアミノ酸置換により、水素結合を減弱した変異体である。

## 2-2. 実験方法

### 2-2-1. 試料調製

ユビキチン野生型と全ての変異体は、*Escherichia coli* の BL21(DE)株に形質転換を行い、安定同位体を用いた最少培地により発現した。超音波破碎後、上澄みを 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4.5 で透析を行った。その後、陽イオン交換クロマトグラフィー(SP Sepharose: GE health care)およびゲル濾過クロマトグラフィー(Sephadex G-50: GE health care)で精製を行った。陽イオン交換クロマトグラフィーでは 400 mM 酢酸アンモニウムを含む、20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4.5 で溶出を行った。

NMR で使用した蛋白質の濃度は 1-2 mM であった。緩衝液は 7% D<sub>2</sub>O を含む 20 mM d-TrisHCl pH 7.2、298 K で行った。Vps27 のユビキチン相互作用モチーフ (UIM)は、Vps27 の 256-278 の領域の配列を用いた 24 残基のペプチドである。配列は YPEDEEELIRKAIELSLKESRNSA であり、P2-A24 が Vps27 配列である。サンプルは、Fmoc アミノ酸を用いて、固相合成法により合成した。その後、逆相クロマトグラフィーで精製を行い。紫外可視分光光度計によって濃度を決定した。



## 2-2-2. NMR の測定と解析

NMR のアミノ酸残基の帰属に関わる測定は、すべて 298 K で DRX-600 ( $^1\text{H}$ : 600 MHz) spectrometer (BrukerBioSpin Co.) を使用した。野生型と Q41N の帰属は、 $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  二重標識されたタンパク質により、CBCA(CO)NH、HNCACB、HNCA、HN(CO)CA、HNCO、HN(CA)CO、HBHACONH、HCC(CO)NH、(H)CC(CO)NH、HCCH-TOCSY、CCH-TOCSY<sup>10</sup>、 $^{15}\text{N}$  edit TOCSY-HSQC、 $^{15}\text{N}$  edit NOESY-HSQC、 $^{13}\text{C}$  edit NOESY-HSQC で帰属を行った。K11A、E34A、Q41A の HSQC スペクトルの帰属は、 $^{15}\text{N}$  ラベルされたサンプルを使用し、 $^{15}\text{N}$  edit NOESY-HSQC および  $^{15}\text{N}$  edit TOCSY-HSQC 実験に基づいて、野生型及び Q41N の信号帰属を参照して行った。 $^1\text{H}$  化学シフトのリファレンスには DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid) のメチル基のシグナルを使用した。データは全て TOPSPIN 1.1 (BrukerBioSpin Co.) と NMR Pipe<sup>11</sup> で処理を行った。シグナルの帰属と解析には NMRView<sup>12</sup> と KIJIRA<sup>13</sup> を利用した。高圧力 NMR の測定は、 $^{15}\text{N}$  標識されたユビキチンで行い、野生型の測定については DRX500 (BrukerBioSpin Co., 500.13 MHz、理化学研究所播磨研究所) とハンドメイドのキャピラリー型耐圧セル<sup>14</sup> を、Q41N の測定には DRX600 (BrukerBioSpin Co.,  $^1\text{H}$ : 600.23 MHz) または Avance III (BrukerBioSpin Co.,  $^1\text{H}$ : 800 MHz) とセラミックタイプの耐圧セル (Daedalus Innovations)<sup>15</sup> を用いて行った。

$^{15}\text{N}$  緩和解析は、 $^{15}\text{N}$  標識されたユビキチンを使用し、298 K と 278 K において、DRX-600 spectrometer (BrukerBioSpin Co.,  $^1\text{H}$ : 600.23 MHz) と Avance III (BrukerBioSpin Co.,  $^1\text{H}$ : 950.33 MHz) を使用し、使用したパルスシーケンスの選択と解析は文献<sup>16</sup> を参考にを行った。ユビキチンのモデルフリー解析は、Model Free 4.15<sup>17</sup> と FAST-Modelfree<sup>18</sup> プログラムを使用し、軸対称性のタンブリングモデル (axially symmetric molecular tumbling) によって行った。 $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  の結合長と  $^{15}\text{N}$  化学シフト異方性は 1.02 Å と -170 ppm を使用した。

### 2-2-3. Cleanex-PM 測定

Cleanex-PM は水とアミド水素が交換している残基を観測する方法である<sup>19</sup>。全ての測定は <sup>15</sup>N 標識されたユビキチンを使用し、298 K において DRX-600 spectrometer (BrukerBio Spin Co.) を使用した。測定の混合時間  $\tau_m$  は 5、10、15、20、25、50、100 ms で行った。水-アミド水素の交換反応の解析は式(1)で示される。

$$\frac{I}{I_0} = k / (R_{1A} + k - R_{1B}) \times (\exp(-R_{1B} \times \tau_m) - \exp(-\tau_m(R_{1A} + k))) \dots (1)$$

$k$  は疑一次水アミド水素交換反応に対応する交換速度定数である。 $R_{1A}$  は Cleanex と縦緩和速度の複合関数であり、 $R_{1B}$  は水の縦緩和速度であり、 $0.6 \text{ s}^{-1}$  を使用した<sup>19</sup>。

$I_0$  は Fast-HSQC 測定の信号強度を使用した。信号強度  $I$  の変化を混合時間  $\tau_m$  に対してプロットし、式(1)にフィットし  $k$  および  $R_{1A}$  を得た。

### 2-2-4. UIM 滴定実験の解離定数の解析

UIM 滴下実験における、UIM 結合状態の分布率  $P$  は、化学シフトの変化量  $\Delta\delta$ 、100%UIM 結合状態における化学シフトの変化量  $\Delta\delta_{max}$ 、 $M$  は測定条件における UIM とユビキチンの割合  $[UIM]/[UB]$ 、 $A=Kd/[Ub]$  として、(2)式と(3)式のように表すことができる。解離定数  $K_d$  は、これらの式を用いて Origin 7.0 によって  $A$  を共通のパラメータとして、 $\Delta\delta_{max}$  を個別のパラメータとしてフィッティングと解析<sup>20</sup>を行った。

$$P = \frac{\{1 + M + A - [(1 + M + A)^2 - 4M]^{0.5}\}}{2} \dots (2)$$

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{max} P \dots (3)$$

### 2-2-5. 熱力学的解析

N<sub>1</sub> 状態と N<sub>2</sub> 状態の分布率が 100%の状態の時の化学シフトを  $\delta_{N_1}$ 、 $\delta_{N_2}$  とすると、観測された化学シフト  $\delta$ 、N<sub>1</sub> 状態の化学シフト  $\delta_{N_1}$ 、N<sub>2</sub> 状態の化学シフト  $\delta_{N_2}$  を用いて、平衡定数  $K$  は式(4)のようにあらわされる。

$$K = \frac{\delta_{N_1} - \delta}{\delta - \delta_{N_2}} \cdot \cdot \cdot (4)$$

さらに圧力に対するギブズ自由エネルギーの差  $\Delta G_p$  は、状態間の部分モル体積差  $\Delta V^\circ$  を用いて、式(5)のように表すことができる。 $p_0$  は Q41N の解析では 1 気圧とした。

$$\Delta G_p = -RT \ln K = \Delta G^\circ + \Delta V^\circ(p - p_0) \cdot \cdot \cdot (5)$$

式(4),(5)から化学シフトの圧力依存性は式(6)のようにあらわすことができる

$$\delta = \frac{\delta_{N_1} + \delta_{N_2} \exp\left[-\frac{\Delta G^\circ + \Delta V^\circ(p - p_0)}{RT}\right]}{1 + \exp\left[-\frac{\Delta G^\circ + \Delta V^\circ(p - p_0)}{RT}\right]} \cdot \cdot \cdot (6)$$

熱力学解析のためには <sup>15</sup>N 標識された野生型と Q41N のサンプルを用いて、各圧力における化学シフトを観測した。圧力に対して化学シフトをプロットし、 $\Delta G^\circ$ 、 $\Delta V^\circ$  を共通のパラメータとして、 $\delta_{N_1}$  と  $\delta_{N_2}$  を残基ごとのパラメータとして熱力学量を求めた。N<sub>1</sub> 状態と N<sub>2</sub> 状態の部分モル体積の差は、Q41N のアミノ酸変異によってほとんど変化しないと仮定し、Q41N の解析では、 $\Delta V^\circ$  は野生型と同じ値を用いた。

### 2-3. 結果

Fig. 2.2 に、 $^{15}\text{N}$  標識されたユビキチンの野生型と変異体 K11A、E34A、Q41A、Q41N の  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを示す。

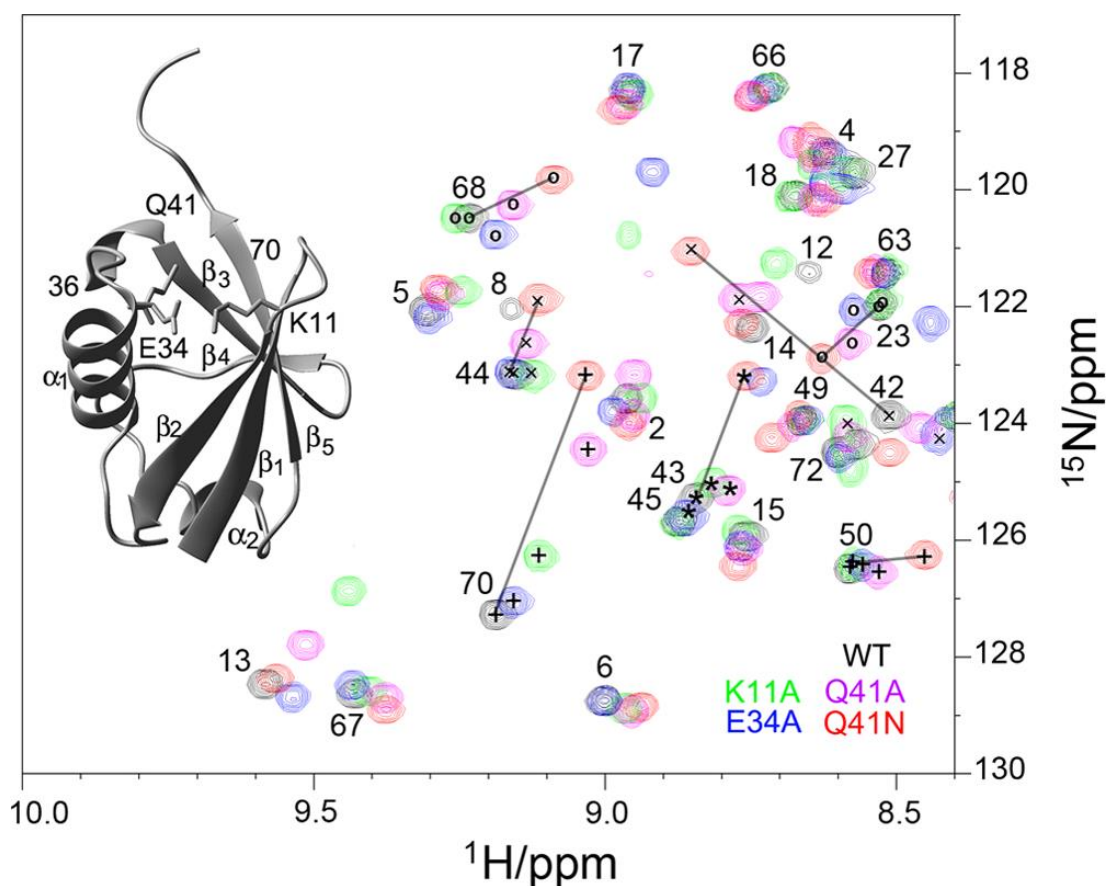


Fig. 2.2. ユビキチン野生型と変異体(K11A、緑; E34A、青; Q41A、紫; Q41N、赤)の  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル

実験は 1-1.5 mM のタンパク質濃度で 20 mM Tris-HCl 7%  $\text{D}_2\text{O}$  pH 7.2 で 298 K で行われた。信号の帰属は野生型のスペクトルをもとに  $^{15}\text{N}$ -edited TOCSY-HSQC と NOESY-HSQC によって行った。大きく化学シフトが変化したアミノ酸残基の信号を 23 (o)、42 (x)、44 (x)、45 (\*), 50 (+)、68 (o)、70 (+) で示す。直線で同じ WT と Q41N の同じ残基を結んだ。アミノ酸変異による信号の変化は、直線的である。

野生型との化学シフト差は、多くのアミノ酸残基で  $\text{K11A} \sim \text{E34A} < \text{Q41A} < \text{Q41N}$  となっている (Fig. 2.2)。化学シフトは立体構造の変化をしめすことから、最も大きな化学シフト変化が見られた Q41N は、最も大きな構造変化をしていると期待される。

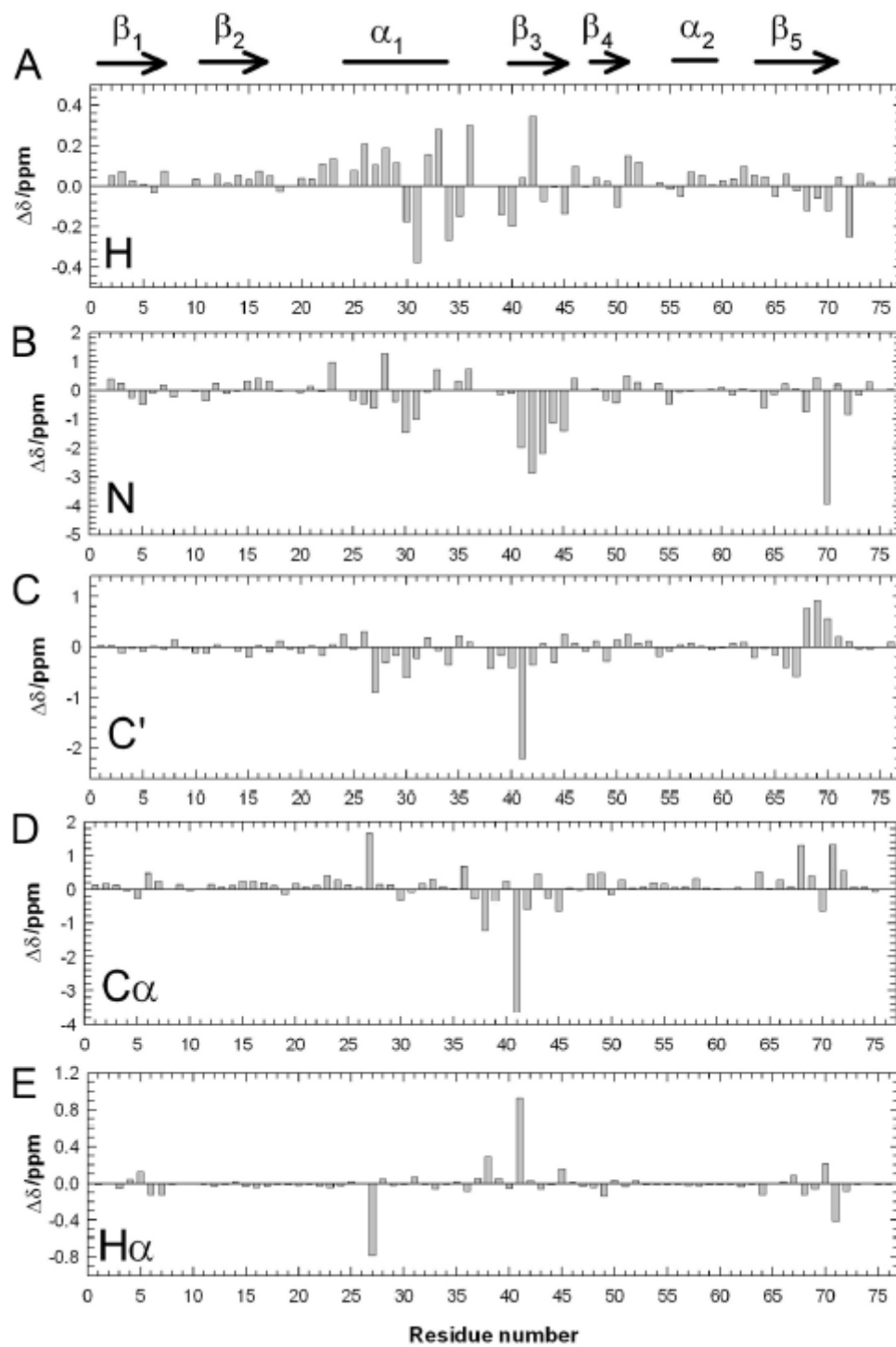


Fig. 2.3. 野生型と Q41N の化学シフト( $\Delta\delta$ ) (A) amide  $^1\text{H}$ 、(B) amide  $^{15}\text{N}$ 、(C)  $^{13}\text{C}$ 、(D)  $^{13}\text{C}\alpha$ 、(E)  $^1\text{H}\alpha$

Q41N と野生型の化学シフト( $H_N$ ,  $N_H$ ,  $C\alpha$ ,  $H\alpha$ ,  $C'$ )の差を Fig. 2.3 に示す。大きな化学シフトの差が観測されたのは、 $\alpha_1$ -helix と  $\alpha_1$ - $\beta_3$ 間のループ、 $\beta_3$ -strand、C 末端  $\beta_5$ -strand である。特に大きな化学シフト変化を示したのは、アミノ酸置換部位である 41 の周辺を除けば、27、30、70 と 71 のアミノ酸残基である。特に  $NH$ 、 $C\alpha$ 、 $H\alpha$ 、 $C'$ の化学シフト変化は主鎖の二面角に敏感であり、主鎖の構造変化を反映する。化学シフト変化は、NMR 観測時間より速い構造の揺らぎがある場合、その存在比に応じた加重平均の値をとる。

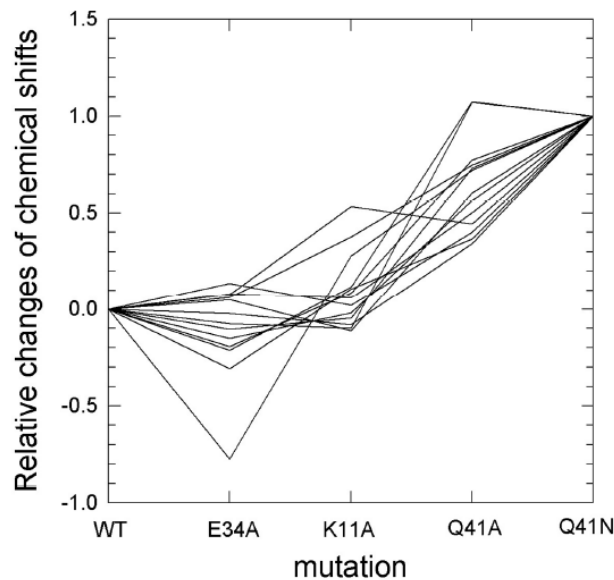


Fig. 2.4. 野生型を 0、Q41N を 1 としたときの変異に対する  $^{15}N$  化学シフトの相対的变化。化学シフト変化の大きい 23、27、28、33、36、43-46、68-70、72 残基を表示した。

Fig. 2.4 は変異により大きな化学シフト変化が観測された領域のアミノ酸の相対的な化学シフト変化を示している。各変異により化学シフト変化量の割合が類似していることから、アミノ酸変異によって、変異体間で共通の高エネルギー状態が安定化したことを意味する。

先行研究において、293 K のユビキチン野生型は、30 bar から 3 kbar へ圧力を変化させることによって、N<sub>1</sub> から N<sub>2</sub> への構造転移をすることがわかっている<sup>2,6</sup>。アミノ酸変異 (Q41N と野生型)による化学シフト差と、圧力摂動(野生型, 30 bar と 3 kbar)による化学シフト差の間には相関が存在した(Fig. 2.5)。これはアミノ酸変異によって、圧力摂動と同様に N<sub>2</sub> 状態の分布率の増加したことを示唆する<sup>4,6</sup>。

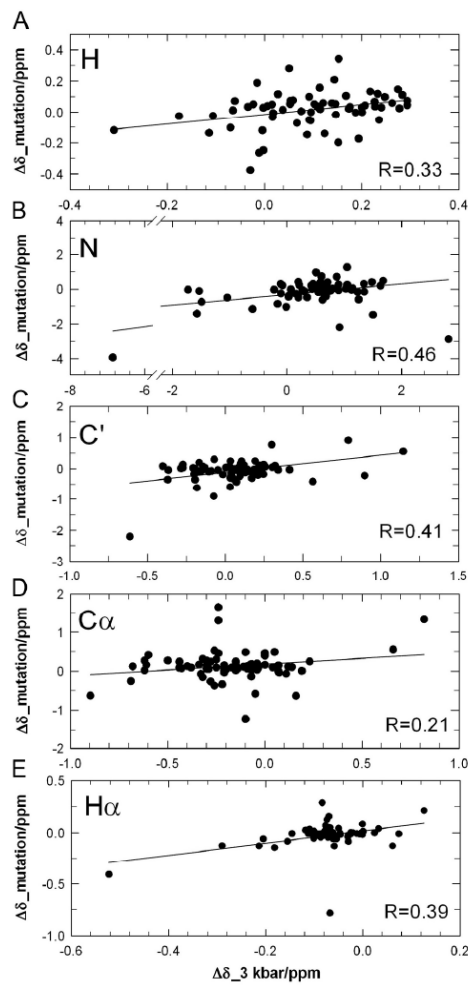


Fig. 2.5. アミノ酸置換 (Q41→N41)と野生型の圧力摂動(1 bar→3 kbar)による化学シフト変化の関係。(A) amide  $^1\text{H}$ 、(B) amide  $^{15}\text{N}$ 、(C)  $^{13}\text{C}'$ 、(D)  $^{13}\text{C}\alpha$ 、(E)  $^1\text{H}\alpha$  を示す。すべて 66-72 のデータ数を使用し、相関係数  $R$  を算出した。

我々は高圧力 NMR 法により、野生型と Q41N の N<sub>2</sub> 状態の熱力学的解析を行った。Fig. 2.6 に、野生型(A)と Q41N(B)の高圧力 NMR 法による各圧力の HSQC スペクトルの重ね合わせを示す。高圧力 NMR の測定は、250 気圧刻みで野生型は 3000 気圧まで、Q41N は 2500 気圧まで行った。野生型の 7、8、33、42、70 などの残基の <sup>1</sup>H と <sup>15</sup>N の化学シフトは、圧力に対して、シグモイド状に変化を示した(Fig. 2.7 A,B)。

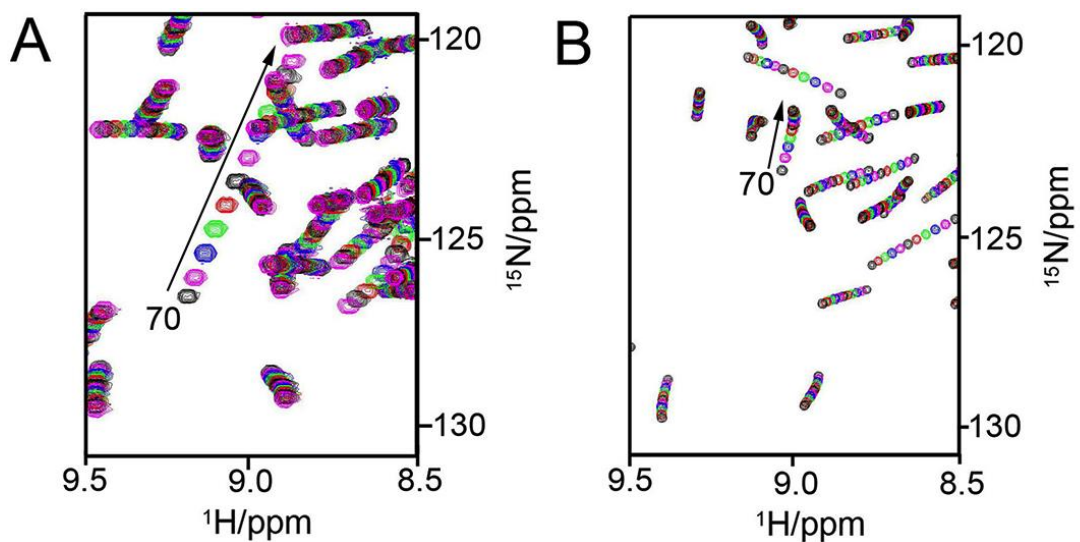


Fig. 2.6. (A)野生型および(B)Q41N 変異体の HSQC スペクトルの圧力変化  
野生型は 30 bar から 3000 bar まで測定した。Q41N 変異体は 1 bar から 2500 bar まで測定した。V70 の化学シフト変化を矢印で示す。



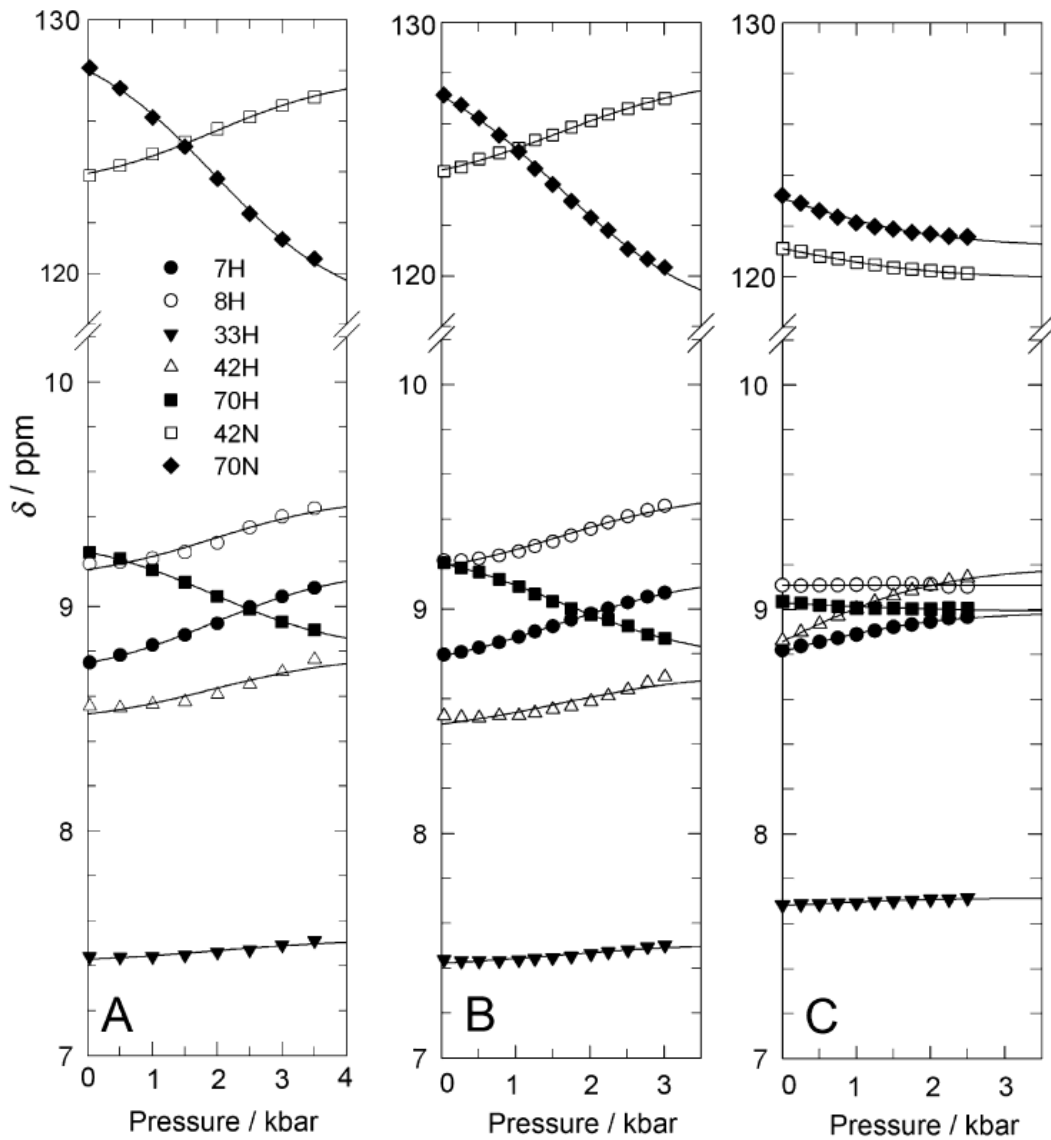


Fig. 2.7. 圧力摂動に対する7、8、33、42、70アミノ酸残基の化学シフト変化  
 (A) 野生型ユビキチン pH 4.7、293 K.<sup>16</sup> (B) 野生型ユビキチン pH 7.2、298 K. (C)  
 Q41Nユビキチン変異体 pH 7.2、298 K.  $\Delta G^\circ$ 、 $\Delta V^\ddagger$ を共通のパラメータとしてフィット  
 した結果を曲線で示す。

N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub> の状態転移によるギブズ自由エネルギーの差  $\Delta G^\circ$  と状態転移における部分モル体積の差  $\Delta V^\circ$  を共通のパラメータとして、圧力に対する化学シフトのプロットから値を見積もった (Table 2.1)(実験方法 熱力学的解析を参照)。

Table 2.1. 高圧力 NMR 法によるユビキチン野生型および Q41N 変異体の N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub> 構造転移に伴う熱力学的パラメータと化学シフト

		WT pH4.7, 293 K		WT pH7.2 298 K		Q41N pH7.2 298 K	
$\Delta G^\circ$ (kJ/mol)		3.9	± 0.16	3.4	± 0.13	-2.2	± 0.3
$\Delta V^\circ$ (ml/mol)		-22.7	± 0.9	-24.7	± 0.8	-24.7	- <sup>a</sup>
7H	$\delta_{N1}$	8.65	± 0.03	8.70	± 0.02	8.40	± 0.07
	$\delta_{N2}$	9.16	± 0.03	9.13	± 0.02	8.97	± 0.01
8H	$\delta_{N1}$	9.09	± 0.03	9.10	± 0.02	9.10	± 0.05
	$\delta_{N2}$	9.48	± 0.02	9.50	± 0.02	9.11	± 0.01
33H	$\delta_{N1}$	7.41	± 0.02	7.40	± 0.02	7.60	± 0.05
	$\delta_{N2}$	7.51	± 0.02	7.51	± 0.02	7.71	± 0.01
42H	$\delta_{N1}$	8.47	± 0.03	8.42	± 0.02	8.07	± 0.10
	$\delta_{N2}$	8.77	± 0.02	8.78	± 0.02	9.16	± 0.01
70H	$\delta_{N1}$	9.34	± 0.03	9.32	± 0.02	9.12	± 0.05
	$\delta_{N2}$	8.81	± 0.03	8.79	± 0.02	9.00	± 0.01
42N	$\delta_{N1}$	123.09	± 0.08	123.23	± 0.07	123.91	± 0.3
	$\delta_{N2}$	127.69	± 0.07	127.68	± 0.06	120.03	± 0.01
70N	$\delta_{N1}$	130.12	± 0.18	129.42	± 0.17	127.66	± 0.50
	$\delta_{N2}$	118.69	± 0.17	118.52	± 0.13	121.34	± 0.01

<sup>a</sup> For the analysis of Q41N, the  $\Delta V$  value of WT at pH 7.2 (-24.7 ml/mol) is used , as a constant.

pH 7.2、298 Kにおける野生型の $\Delta G^\circ$ は、 $3.4 \pm 0.1$  kJ/mol、 $\Delta V^\circ$ は、 $-24.8 \pm 0.8$  kJ/molと見積もることができた。これは、先行研究である pH4.7、293 K のデータを同様の方法で再解析したものとほとんど変わらなかった。Q41N の圧力に対する化学シフト変化を Fig. 2.7 C に示す。Q41N の化学シフトは、野生型と比べ変化量が小さいが非線形な変化を示した。これはアミノ酸変異によって N<sub>2</sub> 状態の分布率が 1 気圧に置いて既に増加していることを示唆している。そのため、圧力に対する化学シフト変化のプロットは、野生型のシグモイド変化の後半部分に対応すると考えた。Q41N でも N<sub>1</sub> と N<sub>2</sub> の状態間の $\Delta V^\circ$ は、野生型のそれと同じと仮定すると、 $\Delta G^\circ$ は $-2.2 \pm 0.3$  kJ/mol と見積もることができた。また Q41N 変異体は、1 気圧下において N<sub>2</sub> 状態の分布率が 71%まで増加していることが明らかとなった。ただし、Q41N においては、転移の一部しか観測されていないため、 $\Delta V^\circ$ を変数とした解析では良好な値が得られなかった。

<sup>15</sup>N 緩和解析により、Q41N の構造変化を測定した。Fig. 2.8 A、B に <sup>15</sup>N 緩和速度解析の結果を示す。マイクロ秒からミリ秒の構造変化を反映する <sup>15</sup>N 横緩和速度  $R_2$  は野生型 (A) と Q41N (B) で大きな違いが見られた。野生型は、23、25、70 を除き、タンパク質全体で、おおそ一定の値を有している。2 状態(a、b)の化学交換がある場合、 $R_2$  値は式(7)のようにあらわすことができる。

$$R_2 = R_{2,a}^0 + R_{2,b}^0 + R_{ex}, R_{ex} = \frac{\Delta\omega^2 p_a p_b}{k_{ex}} \dots (7)$$

$R_{2,a}^0$ 、 $R_{2,b}^0$  はそれぞれ状態 A、B が有する固有の横緩和速度であり、 $R_{ex}$  は化学交換による緩和速度である。二状態の化学交換がある場合、 $R_{ex}$  は、その存在比  $p_a$   $p_b$  と構造間の立体構造の違いに由来する化学シフト差( $\Delta\omega$ )とその交換速度  $k_{ex}$  によってあらわすことができる。化学シフト差は磁場の強度に依存する値である。また、化学交換速度は、温度の低下によって遅くなる。そのため状態 a、b の存在比が温度や磁場によって変わらないとしても、 $R_{ex}$  は磁場と強度に依存することになる。そのため、温度、磁場強度に依存的する  $R_2$  値が局所的に増加することは、マイクロ秒からミリ秒の分子構造の揺らぎがあることを意

味する。

先行研究<sup>6</sup>において、野生型の 3000 気圧下では $\alpha_1$ -helix、 $\alpha_1$ - $\beta_3$ 間のループ、 $\beta_3$ -strandの部位に  $R_2$  値の増加が見られる (Fig. 2.8 E)。この  $R_2$  値の増加は、 $N_2$  状態の分布率の増加または状態転移速度の低下と考えられる。野生型では、1 気圧では温度、磁場強度の変化に対して、ポリペプチド全般でわずかな増加が見られた。これは  $R_{2,a^0}$ 、 $R_{2,b^0}$  に対するそれらの寄与と考えられる。一方で、 $R_2$  の局所的な増加はあまり観測されなかった。このことは野生型では、 $N_2$  状態の存在確率が小さく、化学交換の効果が比較的小さいことを意味する。それに対して、Q41N では低温度(278 K)、高磁場(950 MHz)で $\alpha_1$ -helix、 $\alpha_1$ - $\beta_3$ 間のループ、 $\beta_3$ -strand で  $R_2$  値の局所的な増加(Fig. 2.8 C、D)が見られた。Q41N における  $R_2$  値の増加は、アミノ酸変異により、高圧力下と同様に  $N_2$  状態の分布率が増加したことを意味する。温度の低下により、 $R_2$  値の増加が顕著見られたのは、状態転移の速度が低下し、 $R_{ex}$  の観測に適した状態転移速度になったためであると考えられる。

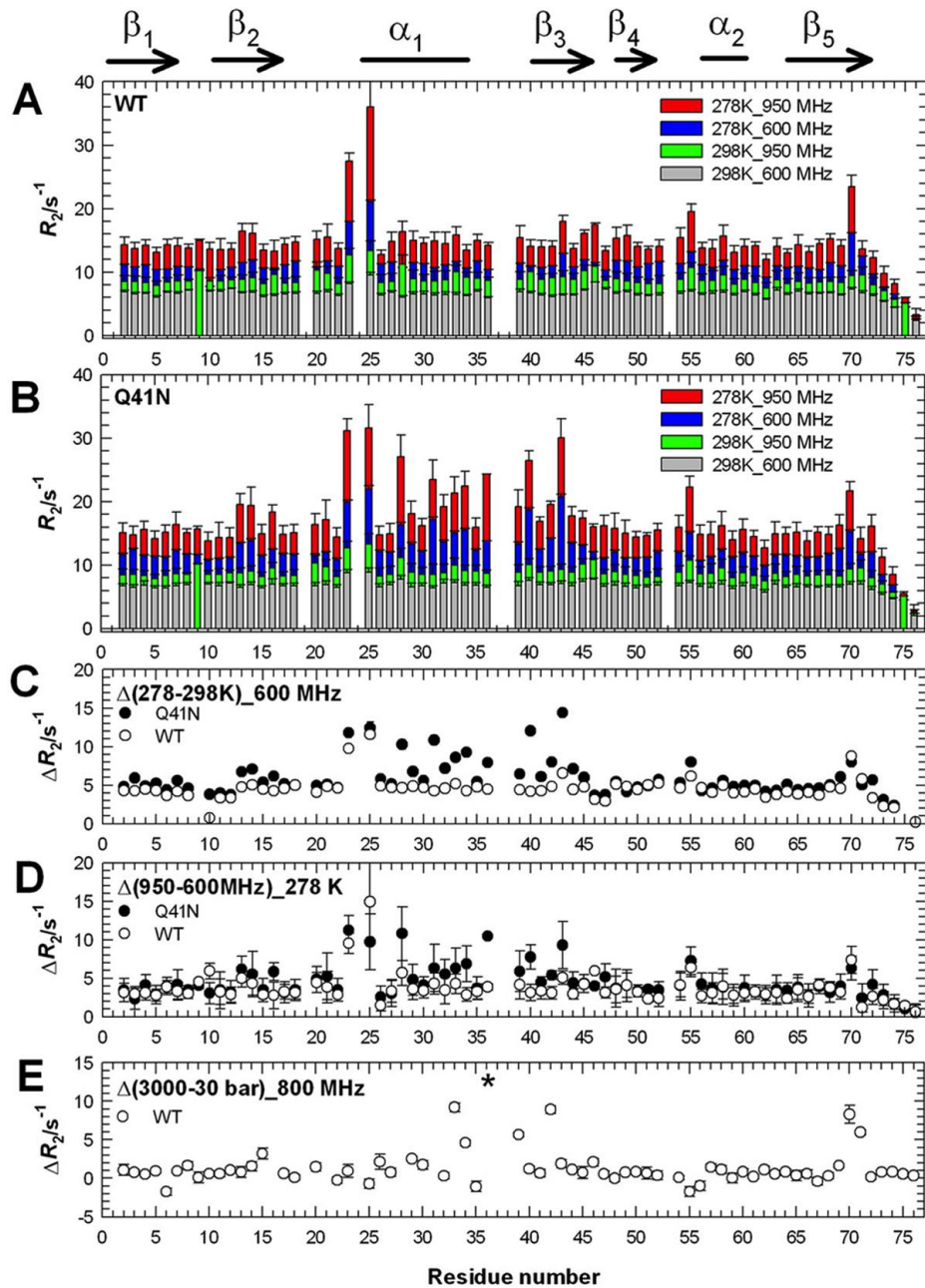


Fig. 2.8. (A) ユビキチン野生型および(B)Q41N変異体の横緩和速度( $R_2$ ) 解析結果( $^1\text{H}$  600.23 MHz 298 K 灰色; 278 K青色、 $^1\text{H}$  950.33 MHz 298 K 緑; 278 K 赤) 600 MHz NMRでは、緩和のための時間を20-280 ms間で10点、950 MHz NMRでは緩和のための時間を20-150 ms間で7点を測定した。19、37、38はプロリン残基であるため、24、53はピークが消失しているため測定できなかった。ユビキチン野生型 (○) とQ41N変異体(●)の異なった(C)温度(278 Kと298K)および(D)磁場( $^1\text{H}$  950 MHzと600 MHz)で測定した横緩和速度の差。(E)ユビキチン野生型の293 K、 $^1\text{H}$  800 MHzにおける3000 気圧と1気圧の横緩和速度の差。36番は信号が高圧力下において消失するため測定できなかった。また二次構造を図の上に示す。

さらなる詳細な解析のため、278 K、600 MHz における  $^{15}\text{N}$  緩和解析( $R_1$ 、 $R_2$ 、NOE)の結果を Fig. 2.9 A、B、C に示す。ナノ秒からピコ秒の状態転移を示す  $R_1$  と NOE は野生型と Q41N ではほとんど違いが見られなかった。

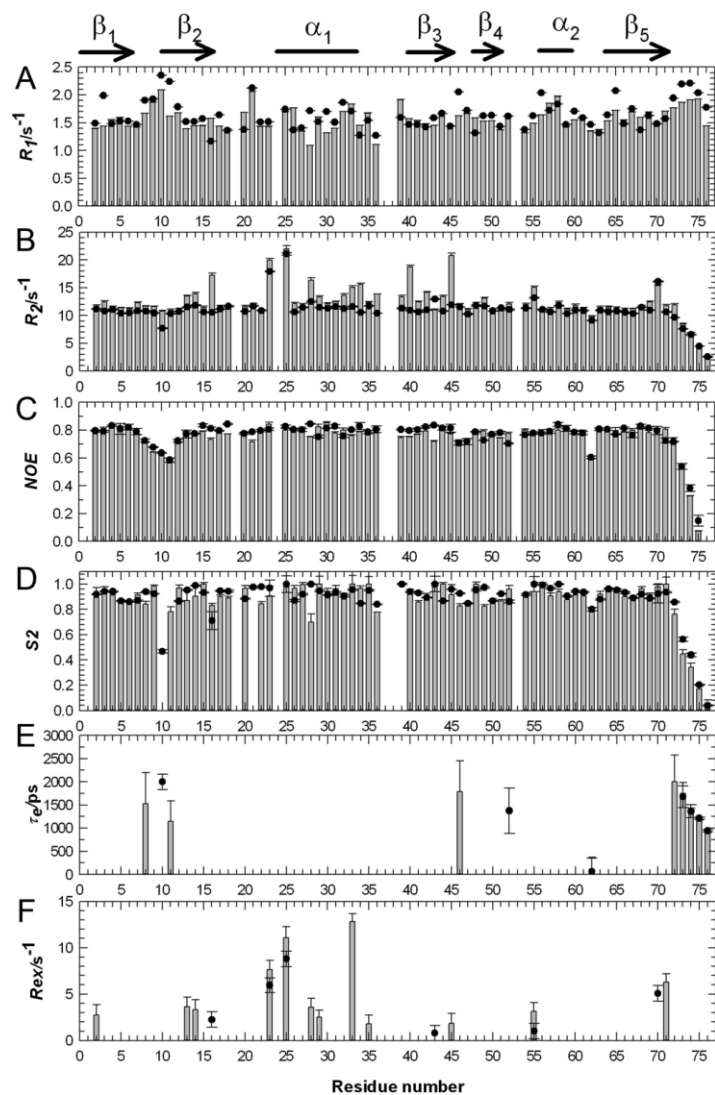


Fig. 2.9. ユビキチン野生型(●)とQ41N変異体(棒グラフ)の $^{15}\text{N}$ 緩和速度解析の結果 (pH 7.2, 278K)

全てのデータは $^1\text{H}$  600.23 MHz  $^{15}\text{N}$  60.83 MHzで測定した。(A)  $^{15}\text{N}$  縦緩和速度,  $R_1$ . (B)  $^{15}\text{N}$  横緩和速度,  $R_2$  (C) 異種核核オーバーハウザー効果,  $^{15}\text{N}$ -NOE. モデルフリー解析の結果(D) オーダーパラメータ  $S^2$ . (E) Internal correlation times,  $\tau_e$ . (F) 化学交換による  $^{15}\text{N}$  横緩和速度の寄与  $R_{ex}$ . モデルフリー解析は、ModelFree version 4.15とFAST-Modelfreeで解析を行い。axially symmetric molecular tumblingで解析を行った。回転相関時間は8.1 ns で行い。BMRB(11505)にデータを登録した。

Lipari と Szabo により<sup>17,18,21</sup>、<sup>15</sup>N 横緩和速度( $R_2$ )と <sup>15</sup>N 縦緩和速度 ( $R_1$ )と <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 異種核オーバーハウザー効果により、タンパク質の分子構造の揺らぎを解析する方法としてモデルフリー解析が提案されている。これは N-H 結合の単純な円錐状の運動 $\tau_e$ と構造変化による緩和速度への寄与  $R_{ex}$ を仮定(Fig. 2.10)<sup>17,18,21</sup>し、その分子構造の揺らぎを見積もる手法である。Fig. 2.10 中の N と H はそれぞれアミド窒素とアミド水素である。

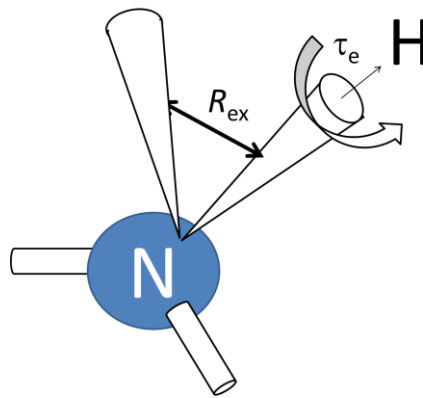


Fig. 2.10 Lipari と Szabo によるモデルフリー解析の図

その計算結果を Fig. 2.9 D、E、F に示す。ピコ秒からナノ秒の主鎖構造の規則性を示すオーダーパラメーター $S^2$ は、 $\alpha_1$ -hlex の真ん中である 28 番を除いてほとんど違いが見られなかった (Fig. 2.9 D)。ピコ秒からナノ秒の N-H 結合の分子振動である  $\tau_e$ は、構造が柔らかく外に露出している C 末端で一致が見られた (Fig. 2.9 E)。マイクロ秒からミリ秒の構造転移を反映する緩和速度  $R_{ex}$ は、Q41N では 13、14、23、25、28、29、33、71 など増加が見られる。さらに、これらの残基は高磁場、低温で  $R_2$  値に変化が見られた残基(Fig. 2.8)と一致しており、 $N_1$ - $N_2$  状態転移による  $R_{ex}$  への寄与と考えられる。

先行研究<sup>18</sup>において、野生型では圧力摂動により  $N_2$  状態の分布率が増加し状態転移速度が遅くなることにより、 $R_{ex}$  の増加が観測されている。Q41N の場合、アミノ酸置換による  $N_2$  状態の分布率の増加と低温にすることで状態転移速度が遅くなることで  $R_{ex}$  を観測することができた。ここから野生型と Q41N で状態転移速度は、おおよそ一致していると考えられる。

次に我々は、タンパク質の安定性を調べるために、水-アミド水素交換 NMR (CLEANEX-PM NMR)法<sup>19</sup>の解析を行った。CLEANEX-PM HSQC スペクトルと HSQC スペクトルの重ね合わせの図を Fig. 2.11 に示す。さらに CLEANEX-PM によって見積られた水-アミド水素交換速度定数の値を Fig. 2.12 A(野生型), Fig. 2.12 B(Q41N)に示す。CLEANEX-PM NMR 法は、水と交換しているアミド水素を観測する方法である。野生型で水とアミド水素の交換が観測された残基は、立体構造(PDB: 1d3z)によるとすべて外側にアミド水素が向いている残基である (Fig. 2.12 C)。Q41N は、それに加えて、31-33、35、40、41 番で水とアミド水素の交換が観測された。これらの残基は、 $\alpha_1$ -helix の終わり、 $\alpha_1$ - $\beta_3$  間のループ、 $\beta_3$ -strand の始まりにかけての領域であり (Fig. 2.12 D)、 $N_1$ - $N_2$  状態転移が生じている領域と一致する。高圧力 NMR 法<sup>2-6</sup>と高圧力分子動力学計算<sup>8</sup>によって、 $\alpha_1$ -helix、 $\alpha_1$ - $\beta_3$  間のループ、 $\beta_3$  strand、C 末端  $\beta_5$ -strand は、分子内空隙が構造変化することにより、水が浸入すると示唆されている。水-アミド水素交換が観測されたこれらの残基は、これらの結果を支持している。これらの結果から、Q41N は  $N_2$  状態の分布率が増加した影響によって、 $\alpha_1$ -helix の終わりから  $\beta_3$ -strand の始まりにかけての局所的に水-アミド水素交換反応が生じていることが示された。



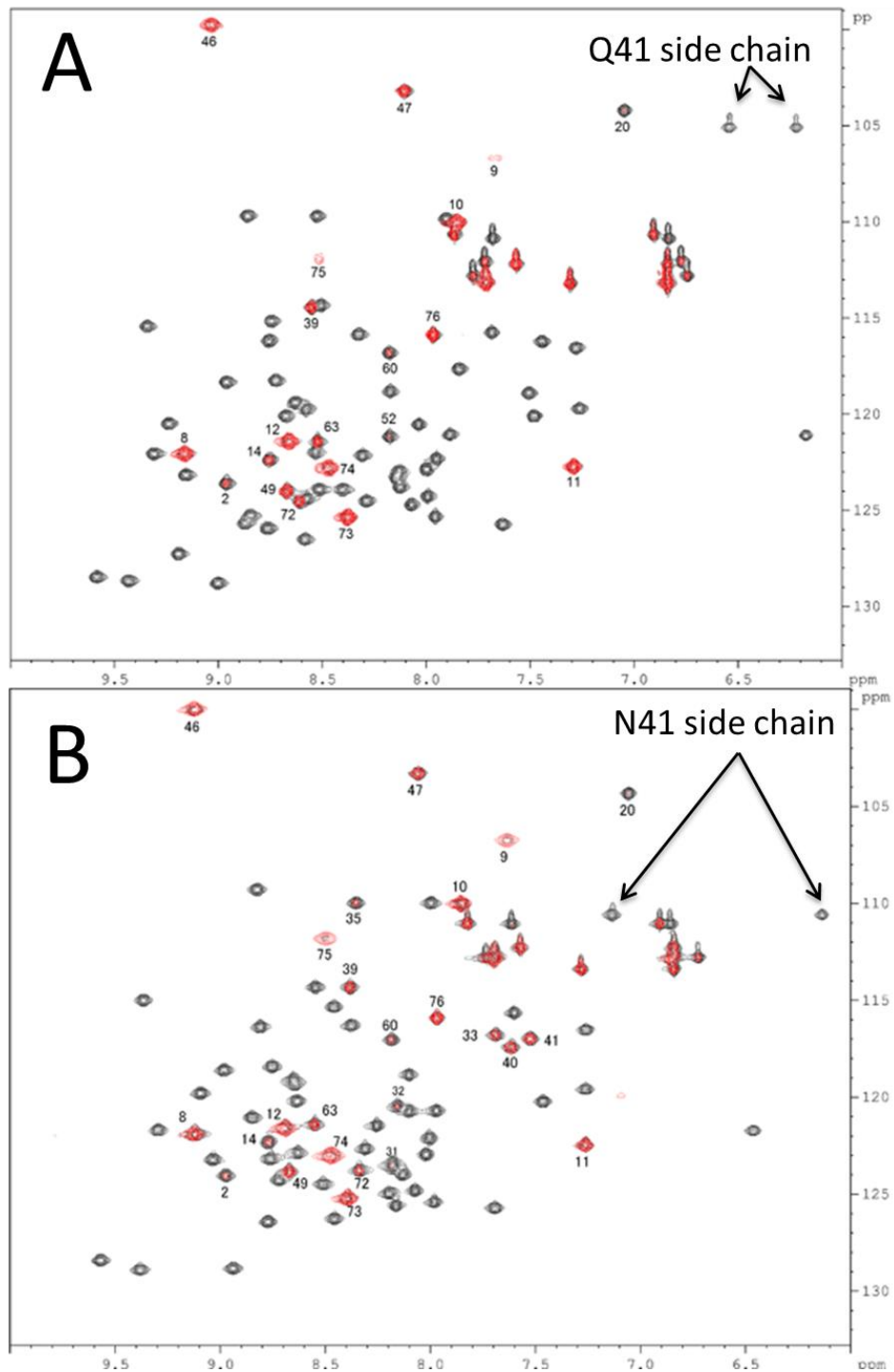


Fig. 2.11. (A)ユビキチン野生型と(B)Q41N 変異体の CLEANEX-PM-fastHSQC(赤)と fastHSQC(黒) スペクトル  
 残基番号は水・アミド水素交換反応が観測された残基について示した。

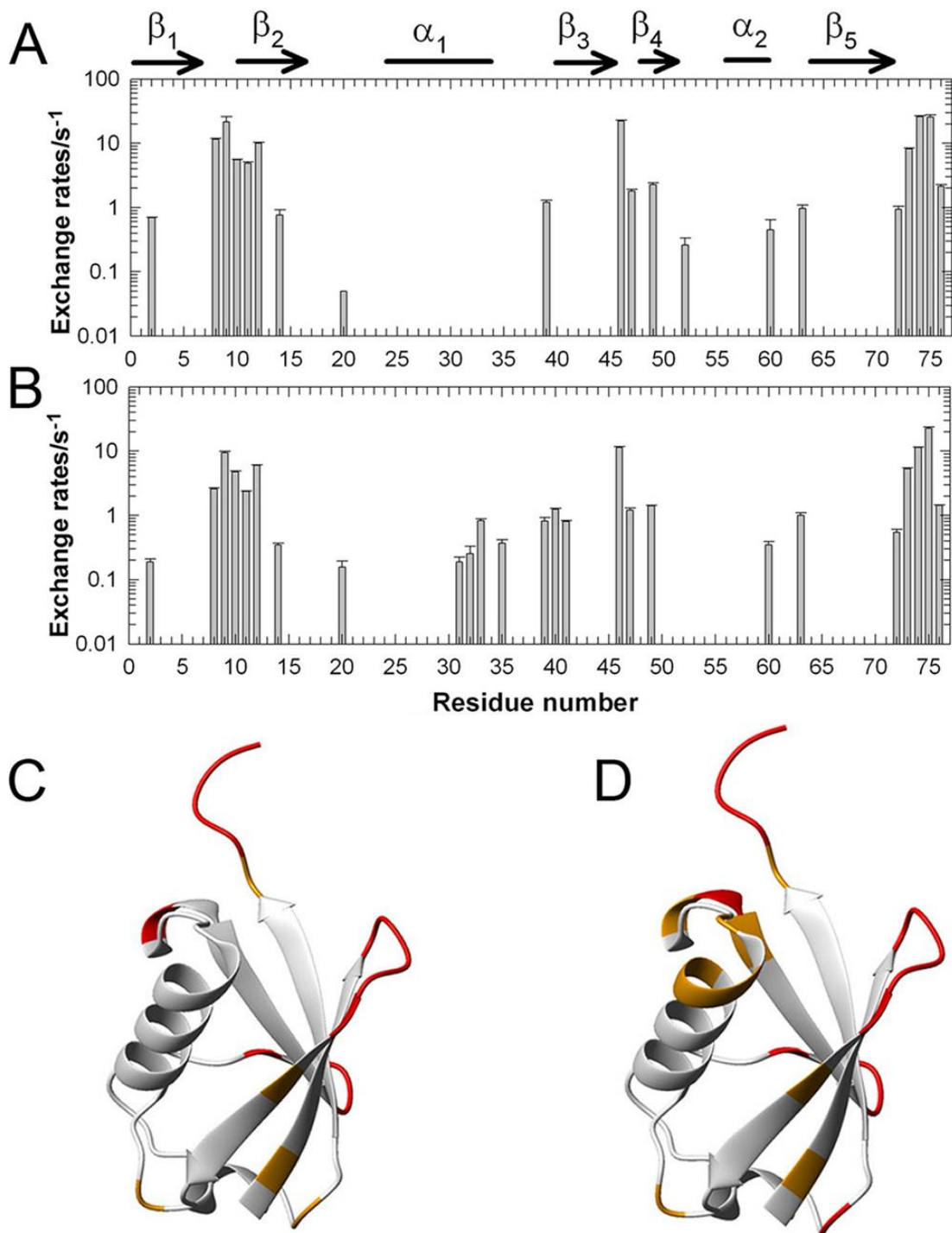


Fig. 2.12. (A)ユビキチン野生型と(B)Q41N 変異体の水-アミド水素交換速度定数 (C、D)水-アミド水素交換速度定数  $k$  が速い残基( $k > 1 \text{ s}^{-1}$ )を赤色、遅い残基( $1 \text{ s}^{-1} > k > 0.01 \text{ s}^{-1}$ )を橙で野生型ユビキチンの立体構造上(PDB: 1D3Z)に示す。(C:野生型、D:Q41N 変異体)

UIM は、ユビキチンと相互作用する Vps27 の相互作用部位(256-278)をモチーフとして設計された 24 残基のペプチドである。UIM は多くのタンパク質輸送に関わるタンパク質でみられる配列であり、Vps27 は UIM によってエンドサイトーシスと液胞タンパク質の機能発現に関与している<sup>20</sup>。その配列は YPEDEEELIRKAIELSLKESRNSA である。UIM はすでに遊離状態と複合体の立体構造とその解離定数( $K_d = 270 \mu\text{M}$ )が知られている<sup>20</sup>。UIM は、ユビキチンの共通の相互作用界面<sup>21,23</sup>である L8-I44-V70 の疎水性パッチで相互作用することが知られている。我々は滴定実験から UIM との相互作用界面にある残基(7、11、13、41、43、44、46-48、69-72)の化学シフト値の変化量を用いて、解離定数を求めた (Fig. 2.13、2-2-4 UIM 滴定実験の解離定数の解析を参照)。

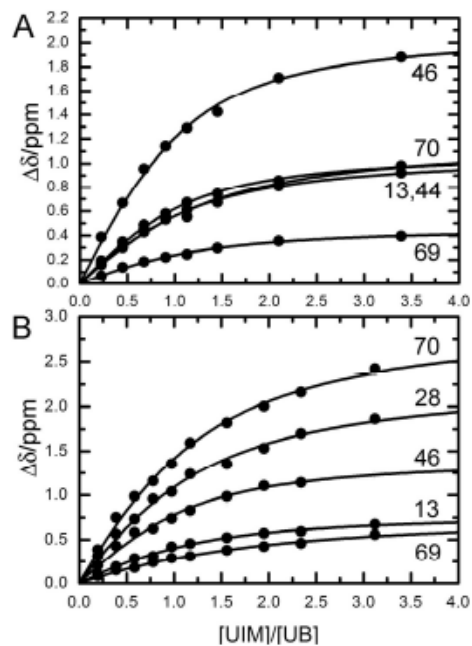


Fig. 2.13. 298 K における(A)ユビキチン野生型と(B)Q41N 変異体の UIM 滴定実験による  $^{15}\text{N}$  化学シフト変化  
 滴定実験はすべて 2 状態モデルで解析を行った。解離定数  $K_d$  の算出には 13 残基 (7、11、13、41、43、44、46、47、48、69、70、71、72)によって行った。

解離定数は野生型で  $210 \pm 11 \mu\text{M}$ 、Q41N  $230 \pm 30 \mu\text{M}$  となり、野生型と Q41N では、ほとんど違いが見られなかった。さらに UIM 結合状態(WT:UIM=1:3.4)と遊離状態の野生型と Q41N の  $^1\text{H}$  と  $^{15}\text{N}$  の化学シフト差を Fig. 2.14 に示す。

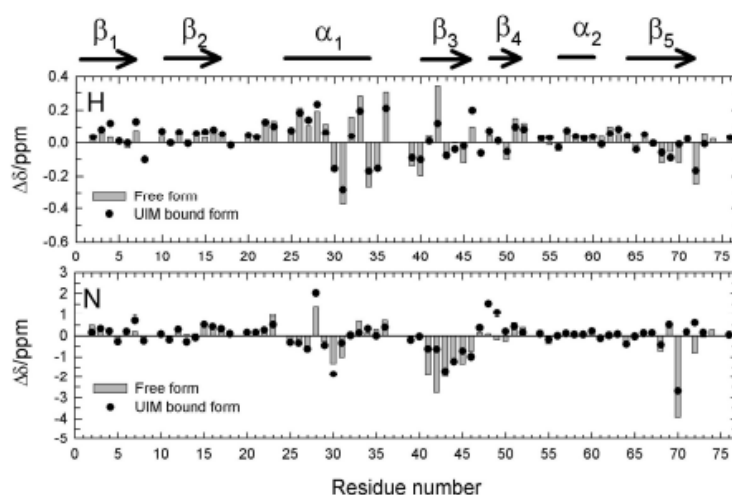


Fig. 2.14. UIM 結合状態(●)と遊離状態(棒グラフ)におけるユビキチン野生型と Q41N 変異体の化学シフト差  $\Delta\delta$ (上: アミド水素、下:アミド窒素)

UIM 結合状態は UB:UIM=1:3.4 で測定をし、その条件で約 75-80%のユビキチンが結合している。

UIM 結合状態と遊離状態では、ほとんど化学シフト差がみられなかった。これは、UIM 結合状態において、 $\text{N}_1\text{-N}_2$  状態転移が生じていない事を示し、UIM の結合による構造変化と  $\text{N}_1\text{-N}_2$  状態転移は互いに独立した分子運動であることが示された。

## 2-4. 考察

### 2-4-1. 圧力とアミノ酸変異による効果

今回、我々は、圧力摂動で見られた構造揺らぎをアミノ酸変異により再現することに成功した。例えば、Q41N の化学シフト変化は  $\alpha_1\text{-helix}$ 、 $\alpha_1\text{-}\beta_3$  間のループ、 $\beta_3\text{-strand}$ 、 $\beta_5\text{-strand}$  で観測された。この結果は加圧による野生型の化学シフト変化と一致している、これは先行研究<sup>4,6</sup>とも一致した。緩和解析や野生型の高圧力 NMR 実験の結果は、これらの領域で

分子構造が変化していることを示す。高圧力 NMR 法による熱力学的解析によれば、1 気圧で  $N_1:N_2$  は 29:71 になることが示された。

タンパク質への圧力摂動の寄与は、二状態間のギブズ自由エネルギーによって式(5)のように関連づけることができる。変性状態と天然状態の部分モル体積の差は、折りたたまれることによって形成された空隙の体積変化と水和量の変化によって決まる。一般的に折りたたまれた天然状態は、空隙を持つため最も部分モル体積が大きく、変性状態は最も部分モル体積が小さい。そのため、加圧により、部分モル体積の小さな変性構造が安定化される。

アミノ酸置換は、温度や圧力と全く違う効果を及ぼす。アミノ酸置換は、分子内相互作用変化させる。今回、我々が示した Q41→N のアミノ酸置換は、 $\alpha_1$ - $\beta_3$  間のループと  $\beta_3$ -strand 間に存在している I36 の主鎖のカルボニル基と Q41 の側鎖のアミノグループの距離を C-C 結合長分だけ短くする。このアミノ酸置換によって、 $\alpha_1$ -helix から  $\beta_3$ -strand の分子構造の変調を加え、 $N_1$  状態を選択的に不安定化させたため、相対的に  $N_2$  状態の分布率の増加を引き起こしたと考えられる。

#### 2-4-2. 高エネルギー状態の構造的な特徴

1 気圧下において、Q41N は  $N_2$  状態が 71% 存在する変異体である。Q41N は、野生型で存在する I36 の主鎖のカルボニル基と Q41 の側鎖のアミノ水素の間に存在する水素結合が弱まり、Q41N の  $\alpha_1$ - $\beta_3$  間のループと  $\beta_3$ -strand 間の距離が離れると考えられる。この水素結合は、ユビキチンファミリーの中で高い保存性がある水素結合である。Q41N は、この水素結合を不安定化させたため、N41 のアミノ基は野生型の Q41 のアミノ基より、溶媒へ露出していると考えられる。しかし、CLEANEX-PM の解析によれば、N41 のアミノ基で、水-アミノ水素交換反応が観測されなかった。N41 の側鎖はタンパク質内部に存在し、野生型の Q41 と同様にアミノ基が溶媒から保護されていると考えられる。MOLMOL によって、

Q41N の 2500 気圧下の立体構造(PDB: 2RD6, 3 章)をもとに水素結合の計算を行った。N41 は 20 構造中 5 構造で P37 のカルボニル基および Q40 のカルボキシル基と 2 つの水素結合を形成している。また、N41 は、20 構造中 8 構造で、どちらか一方と水素結合を形成していることが分かった。そのため、Q41N における N41 のアミノ基は、20 構造中合計 13 構造で 1 つ以上の水素結合を形成していることになる。また、Q41N の 2500 気圧下において、N41 アミノ基と P37HD 間に帰属される NOE と N41 アミノ基と Q40HB 間に帰属される弱い NOE が観測されていることから、N41 のアミノ基と P37 と Q40 の側鎖は隣接していると考えられる。そのため、N41 は P37 もしくは Q40 と水素結合を形成していることから、N41 のアミノ基が溶媒から保護されていると考えられる。その一方で、I36 と N41 周辺にある  $\alpha_1$ -helix と  $\beta_3$  strand で、水-アミド水素交換反応が観測された。これは  $N_1$ - $N_2$  状態転移によって、局所的に安定性が低下していることを意味する。

Q41N において、 $\alpha_1$ -helix 中央におけるマイクロ秒からミリ秒の分子構造の揺らぎを反映する  $R_2$  値は増加している。この分子構造の揺らぎによって、タンパク質のパッキングが弱まり、水がタンパク質内部へ浸入し、水-アミド水素交換反応が進行すると考えられる。水が蛋白質内部へ浸入することにより生じる相互作用の変化は、 $N_2$  状態を安定化させる。また、K11A、E34A より Q41A、Q41N のほうが  $N_2$  状態を安定化した。これは I36 の主鎖のカルボニル基と Q41 の側鎖のアミノ水素間に存在する水素結合のほうが、K11 と E34 間にある塩橋より、 $N_1$  状態を強く安定化させていることを意味する。水素結合の減弱という観点では、Q41A のほうが Q41N に比べ大きな効果が期待されたが、化学シフト変化や  $R_2$  解析からは、Q41N のほうが若干小さな変化となった。この結果についての明確な理由は無いが、A41 では分子内部の C 末端領域に存在する疎水性相互作用により  $N_1$  状態を安定化する効果が生じたのかもしれない。K11-E34 間にある塩橋は、もともとタンパク質表面に露出している塩橋として発見されたものである。その一方で、水溶液中では非常に弱く相互作用しているため<sup>24-26</sup>、野生型のユビキチンにとって、 $N_1$  状態の安定性に強く寄与する重要な相

相互作用ではないと考えられる。

### 2-4-3. ユビキチンの分子認識メカニズム

ユビキチンは、DNA の修復やクロマチンの再構造化や ATP 依存的なタンパク質の分解など、非常に多くの機能を有するタンパク質である<sup>27</sup>。これらの多くの場合で、ユビキチンは、ユビキチン活性化タンパク質 E1、ユビキチン結合タンパク質 E2、ユビキチン転移酵素 E3 を介して標的に結合する。NEDD8 や SUMO などユビキチンホモログ群でも同様のカスケードで標的に結合する。多くの場合、標的に結合したユビキチンは共通の疎水性パッチ(L8-I44-V70) で、相互作用するということがわかっている。しかし、I36 を活性中心として $\alpha_1$ -helix と $\beta_2$ -strand で標的タンパク質と結合することもある<sup>28,29</sup>。また、C 末端の $\beta_5$ -strand で標的と結合することもある<sup>47,48</sup>。ここで N<sub>2</sub> 状態の構造の揺らぎとタンパク質の機能発現の相関関係を解明するのは重要な問題である。

スピン緩和解析により、野生型の化学交換による  $R_2$  への寄与  $R_{ex}$  は、I23、N25、T55、V70 のアミノ酸残基で、観測される<sup>30,31</sup>。I23、N25、T55 は空間的に $\alpha_1$ -helix の N 末端の周辺に存在する。 $\alpha_1$ -helix の N 末端の残基である Gly24 は、Asp52 状態もしくは Gly53 と水素結合を形成する。この 2 つの状態は、化学平衡状態にあり、X 線結晶構造解析によって原子座標が決定されている<sup>32</sup>。ユビキチンは、Gly24-Asp52 が水素結合を形成した状態もしくは Gly24-Gly53 が水素結合を形成した状態の間を構造的に揺らいでいる。この構造的揺らぎの  $R_2$  への寄与が、野生型でみられる I23、N25、T55 残基の  $R_{ex}$  として観測されていると考えられる。N<sub>2</sub> 状態の存在確率の小さい野生型で観測されているこの構造揺らぎは、天然状態の構造アンサンブル内の揺らぎと位置づけられ、N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub> 状態転移とは関わりがないと考えられる。

#### 2-4-4. まとめ

高圧力 NMR 法で観測された蛋白質の構造および分子構造の揺らぎの特性に基づいた合理的なアミノ酸変異は、タンパク質の特定の状態を増幅するための新たな戦略である。我々は、このアプローチが、タンパク質の高エネルギー状態の構造や機能の研究において、強力な方法であることを示した。合理的に設計されたユビキチン Q41N は、1 気圧下で 71% 分布している変異体であり、加圧により N<sub>2</sub> 状態を増幅できることを示した。また、I36 のカルボニル基と Q41N の側鎖アミノ基の水素結合が N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub> 状態転移に重要であることを示した。



## 2-5. 参考文献

1. Lange OF, Lakomek NA, Fares C, Schroder GF, Walter KFA, Becke S, Meiler J, Grubmüller H, Griesinger C and de Groot BL (2008) *Science* **320**, 1471-1475.
2. Kitahara R, Yamada H and Akasaka K (2001) *Biochemistry* **40**, 13556-13563.
3. Kitahara R and Akasaka K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3167-3172.
4. Kitahara R, Yokoyama S and Akasaka K. (2005) *J. Mol. Biol.* **347**, 277-285.
5. Kitahara R, Yamaguchi Y, Sakata E, Kasuya T, Tanaka K, Kato K, Yokoyama S and Akasaka K. (2006) *J. Mol. Biol.* **363**, 395-404.
6. Kitahara R, Okuno A, Kato M, Taniguchi Y, Yokoyama S and Akasaka K (2006) *Magn. Reson. Chem.* No. MRC44 Spec. Issue, S108-S113.
7. Kitahara R, Zhao C, Saito K, Koshiha S, Ioune M, Kigawa T, Yokoyama S and Akasaka K. (2008) *Biochemistry* **47**, 30-39.
8. Imai T and Sugita Y (2010) *J. Phys. Chem. B* **114**, 2281-2286.
9. Kiel C and Serrano L (2006) *J. Mol. Biol.* **355**, 821-844.
10. Cavanagh J, Fairbrother WJ, Palmer AG and Skelton NJ (1996) *Protein NMR Spectroscopy: Principle and Practice*, Academic Press, San Diego.
11. Delaglio F, Grzesiek S., Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J and Bax A (1995) *J. Biomol. NMR* **6**, 277-293.
12. Johnson BA and Blevins RA. (1994) *J. Biomol. NMR* **4**, 603-614.
13. Kobayashi N, Iwahara J, Koshiha S, Tomizawa, T, Tochio N and Güntert P, *J. Biomol. NMR*, **39**, 31-52.
14. Akasaka K and Yamada H (2001) *Methods Enzymol.* **338**, 134-158.
15. Peterson RW, Nucci NV and Wand AJ (2011) *J. Magn. Reson.* **212**, 229-233.
16. Farrow NA, Muhandiram R, Singer AU, Pascal SM, Kay CM, Gish G, Shoelson SE,

- Pawson T, Forman-Kay JD and Kay LE (1994) *Biochemistry* **33**, 5984-6003.
17. Mandel AM, Akke M and Palmer AG (1995) *J. Mol. Biol.* **246**, 144-163.
  18. Cole R and Loria JP (2003) *J. Biomol. NMR* **26**, 203-213.
  19. Hwang TL, van Zijl PCM and Mori S. (1998) *J. Biomol. NMR* **11**,221-226.
  20. Swanson KA, Kang RS, Stamenova SD, Hicke L and Radhakrishnan I (2003) *EMBO J.* **22**, 4597-4606.
  21. Lipari G and Szabo A. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4546-4559.
  22. Sidhu A, Surolia A, Robertson AD and Sundd M (2011) *J. Mol. Biol.* **411**, 1037-1048
  23. Nucci NV, Pometun MS and Wand AJ (2011) *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 12326- 12329.
  24. Sundd M and Robertson AD. (2003) *J. Mol. Biol.* **332**, 927-936.
  25. Sundd M, Iverson N, Ibarra-Molero B, Sanchez-Ruiz JM and Robertson AD, (2002) *Biochemistry*, **41**, 7586-7596.
  26. George I. Makhatadze VV. Loladze D, Ermolenko N, Chen XF and Thomas ST (2003) *J. Mol. Biol.* **327**, 1135-1148.
  27. Wickliffe K, Williamson A, Jin LY and Rape M (2009) *Chem. Rev.* **109**, 1537-1548.
  28. Winget JM and Mayor T (2010) *Mol. Cell* **38**, 627-635.
  29. Sakata E, Satoh T, Yamamoto S, Yamaguchi Y, Yagi-Utsumi M, Kurimoto E, Tanaka K, Wakatsuki S and Kato K (2010) *Structure* **18**, 138-147.
  30. Massi F, Grey MJ and Palmer, A. G. (2005) *Protein Sci.* **14**, 735-742.
  31. Salvi N, Ulzega S, Ferrage F and Bodenhausen G (2012) *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 2481-2484.
  32. Wilton DJ, Tunnicliffe RB, Kamatari YO, Akasaka K and Williamson MP (2008) *Proteins* **71**, 1432-1440.

### 3章 ユビキチン準安定構造 N<sub>2</sub> の 1 気圧と 2500 気圧における立体構造解析

#### 3-1. 緒言

高圧力 NMR 法によって、ユビキチンは天然状態 N<sub>1</sub> と変性状態 U と 2 つの高エネルギー状態(準安定構造 N<sub>2</sub>、局所変性構造 I)の間に化学平衡が成り立っており、構造的に揺らいでいることが明らかにされている<sup>1-5</sup>。北原らは、3000 気圧下で 77% N<sub>2</sub> 状態が分布した野生型ユビキチンの立体構造を決定した。しかしながら、立体構造解析に使われたキャピラリー型耐圧セルの感度が低く、二次元 NOESY スペクトルで解析されているため、感度と精度に技術的な問題があった<sup>6</sup>。さらには N<sub>2</sub> 状態の分布率が、77%と十分に高くないことなどが問題点としてあげられている。そこで、圧力摂動の影響のない 298 K、1 気圧(N<sub>2</sub> 状態の分布率=71%)と、N<sub>2</sub> 状態の分布率が大きい 298 K、2500 気圧(N<sub>2</sub> 状態の分布率 = 97%)の条件で Q41N 変異体の原子座標を決定した。今回、我々が使った耐圧セルはキャピラリー型耐圧セル<sup>7</sup>より約 9 倍感度の良いセラミックスタイプの高感度耐圧セル<sup>8</sup>である。さらに三次元 NOESY-HSQC スペクトルをもとに解析を行った。分布率と感度の問題を解決し、精密な高エネルギー状態の座標決定に成功した。

#### 3-2. 実験方法

##### 3-2-1. 試料調製

ユビキチン野生型と全ての変異体は *Escherichia coli* によって発現し精製した (2 章 2-2-1. 試料調製を参照)。2.0 mM Q41N 変異体を 7% D<sub>2</sub>O を含む 20 mM d-TrisHCl pH 7.2 中で原子座標決定と帰属のための測定を行った。

##### 3-2-2. NMR の測定と構造計算

Q41N の信号帰属は、1 気圧下において三重共鳴 NMR 法により行った<sup>5,6</sup>。1 気圧において、立体構造計算に使う距離情報の収集は、<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N ラベルされた Q41N サンプルを用い

て、 $^{15}\text{N}$  edit NOESY-HSQC、 $^{13}\text{C}$  edit NOESY HSQC、 $^{13}\text{C}$  edit aromatic NOESY-HSQC によって行った。二面角の束縛条件としては、化学シフトから TALOS+<sup>10</sup> により二次構造を予測し、 $\alpha$ -helix と予測された残基を  $-200^\circ < \phi < -80^\circ$ 、 $40^\circ < \psi < 220^\circ$ 、 $\beta$ -strand と予測された残基を  $-120^\circ < \phi < -20^\circ$ 、 $-100^\circ < \psi < 0^\circ$  として計算条件に加えた。さらに  $^{15}\text{N}$  edit HNHA 測定<sup>11</sup> を行い  $^3J_{\text{HNHA}}$  カップリングの値から主鎖の  $\phi$  角の二面角角度制限 ( $^3J_{\text{HNHA}} > 8$ :  $-160^\circ < \phi < -80^\circ$ 、 $^3J_{\text{HNHA}} < 6$ :  $-90^\circ < \phi < -40^\circ$ ) を行った。さらに  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  残余双極子相互作用(RDC)の測定<sup>12</sup> から、主鎖 NH ベクトルの磁場配向情報を収集し、立体構造計算に用いた。RDC の測定<sup>12</sup> は 7 mg/ml の pf1 フェージを加えて測定を行った。構造計算における RDC の比重は 0.05(5%) として計算を行った。

2500 気圧下における信号帰属は、 $^{15}\text{N}$  edit HSQC、 $^{13}\text{C}$  edit HSQC、2D-H(N)CO 実験を 500 気圧毎に測定し、1 気圧の信号帰属からの連続的变化として決定した。 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  simultaneous edited NOESY HSQC (Mixing time 100 ms) を 298K, 2500 気圧で測定し、距離制限を計算に加えた。主鎖の二面角  $\phi$ 、 $\psi$  は、TALOS+<sup>10</sup> を使って、1 気圧下と同様の制限を与えた。

すべての立体構造決定は、CYANA 3.93<sup>13</sup> を用いて、NOESY の信号帰属を行った後、立体構造計算を行い、構造の精密化とエネルギー最適化を TIP3P の水モデルを用いて AMBER 11<sup>14</sup> によって行った。

### 3-3. 結果と考察

$\text{N}_2$  状態の分布率が増加した Q41N 変異体について、距離情報と角度情報から立体構造の決定を行った。Fig. 3.1 A に 1 気圧 298 K における Q41N の立体構造である。Table.3.1 に示すのが、解析および統計の結果である。この構造は  $\text{N}_1:\text{N}_2$  の分布率が 29:71 の時の平均構造であり、 $\text{N}_2$  状態が 100% 分布したときの立体構造ではない。しかし、構造計算ソフト (CYANA<sup>19</sup>) のアルゴリズムでは NOE の強度の $-6$  乗で二原子間の距離が決まり、もともと

信号強度の小さいマイナー状態である  $N_1$  の影響は小さく、信号強度の大きいメジャー状態である  $N_2$  状態の立体構造を、計算結果は十分に反映していると考えられる。また、常圧下であるため、圧力による構造圧縮の影響がない。Q41N (green)と野生型 の 30 bar の構造<sup>3</sup>( $N_1$ , blue)と野生型の 3 kbar の構造<sup>3</sup>( $N_2$ , red)を重ね合わせた図が Fig. 3.1 B である。Q41N の立体構造は $\alpha_1$ -helix と $\alpha_1$ - $\beta_3$  間のループ、C 末端 $\beta_5$ -strand の配向が  $N_1$  構造から変化している。しかし、ユビキチンの共通の相互作用部位である L8-I44-V70 の疎水性パッチはほとんど変化がない。

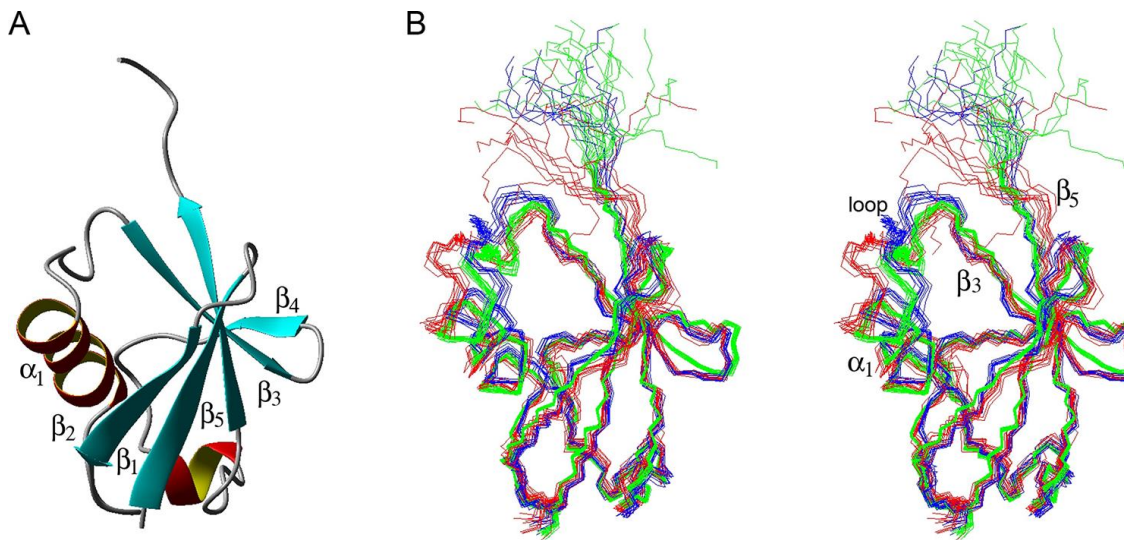


Fig. 3.1. 気圧 298 K における Q41N 変異体の立体構造

(A)リボンモデル。(B)Q41N の 20 個のエネルギーが低かった主鎖の立体構造(緑、PDB entry 2RSU)と 30 気圧におけるユビキチン野生型の 10 個の立体構造(青、PDB entry 1V80)、3000 気圧下におけるユビキチン野生型の 10 個の立体構造 (赤、PDB entry 1V81) の重ね合わせたステレオ図。分子構造は 1-23、45-70 残基で重ね合わせた。Q41N の立体構造は CYANA 3.93 で計算を行い、エネルギー最適化を AMBER11 で行った。

Table 3.1 1気圧、298 KにおけるQ41N変異体の立体構造計算の束縛条件と計算結果<sup>a</sup>

Restrains used in the structure calculation	
Number of distance constraints	1445
Number of $\phi$ angle constraints <sup>a</sup>	36
Number of $\phi$ and $\psi$ angle constraints <sup>b</sup>	80
Number of angle constraints by residual dipolar coupling constraints <sup>c</sup>	67
Residual violations in the CYANA calculation	
Target function values (Å)	3.99 ± 0.04
Number of van der Waals restraints violations <sup>d</sup>	3
Number of residual dipolar coupling restraints violations <sup>d</sup>	3
Residual violations after AMBER energy minimization	
Close contacts	1
Distance deviation > 0.2 Å (number of violations)	0.23 ± 0.02
RDC deviation ( Hz )	0.74 ± 0.33
Geometric statistics <sup>e</sup>	
average backbone atoms RMSD to mean (Å)	0.21
average heavy atoms RMSD to mean (Å)	0.65
Ramachandran analysis <sup>f</sup>	
most favored regions (%)	87.5
additional allowed regions (%)	12.5
disallowed regions (%)	0

20 structures with the lowest target function are selected out of 200 structures calculated with CYANA3.93 from randomized starting structures. Atomic coordinates and structure constraints are deposited in PDB (2RSU). Signal assignments are deposited in BMRB (accession code :11505). <sup>a</sup>Torsion angle constraints obtained from J-coupling constants by three dimensional HNHA experiment;  $-160^\circ < \phi < -80^\circ$  for  $J > 8\text{Hz}$  and  $-90^\circ < \psi < -40^\circ$  for  $J < 6\text{Hz}$ . <sup>b</sup>Torsion angle constraints from chemical shifts using the program TALOS plus:  $-120^\circ < \phi < -20^\circ$  and  $-100^\circ < \psi < 0^\circ$  for  $\beta$ -sheet,  $-200^\circ < \phi < -80^\circ$  and  $40^\circ < \psi < 220^\circ$  for  $\alpha$ -helix. <sup>c</sup><sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N residual dipolar couplings are used for the angle constraints with 0.5 Hz error. The weight of the RDC constraints in the CYANA calculation is set to be 0.05. <sup>d</sup>Constraints violated in > 6 structures. <sup>e</sup>RMSD for residues 1-70. <sup>f</sup>Ramachandran analysis for residues 1-74. Pro and Gly are not involved in the evaluation.

2章 Fig.2.3 で1気圧において Q41N と野生型で大きな化学シフト変化( $H_N$ 、 $N_H$ 、 $C\alpha$ 、 $H\alpha$ 、 $C'$ )が観測されたのは、 $\alpha_1$ -helix と $\alpha_1$ - $\beta_3$  間のループ、 $\beta_3$ -strand、C 末端  $\beta_5$ -strand のアミノ酸残基であることを示した。アミノ酸置換部位 Q41 の周辺を除けば、27、30、70 と71のアミノ酸残基で大きな化学シフト差が観測されている。 $N_H$ 、 $C\alpha$ 、 $H\alpha$ 、 $C'$ の化学シフト変化は主鎖の二面角に敏感であるため、これらの残基で大きな構造変化が観測されたと考えられ、立体構造の結果と定性的に一致している。

SHIFTX2<sup>14</sup>により Q41N の立体構造から化学シフトの逆計算を行った。Fig. 3.2 に逆計算の結果を示す。計算による化学シフトと実験的な化学シフトには強い相関がみられた(相関係数は、 $H_N$ は0.90、 $N_H$ は0.91、 $C'$ は0.87、 $C\alpha$ は0.99、 $H\alpha$ 0.94、 $C\beta$ は>0.99であった)。

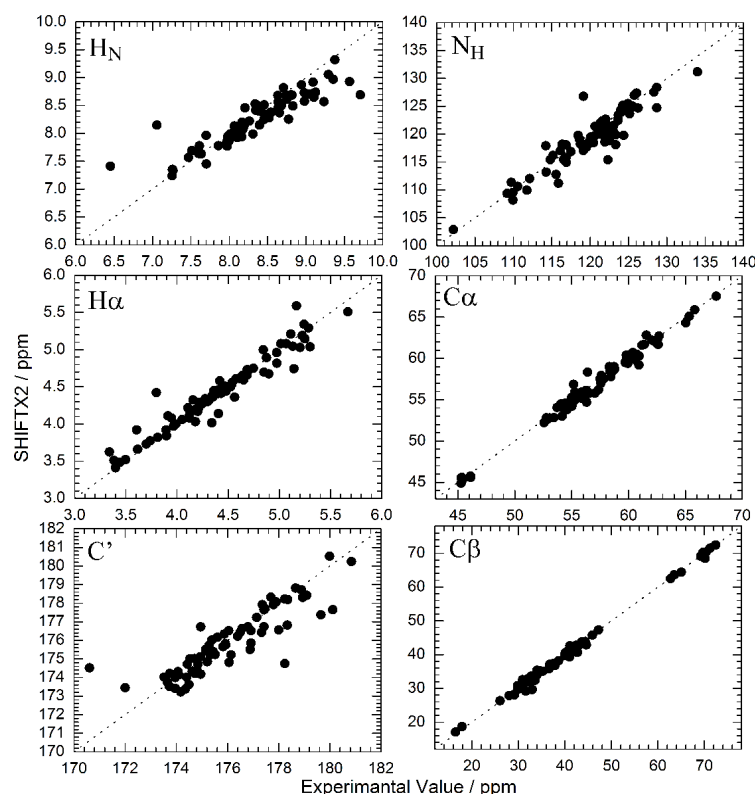


Fig. 3.2. 立体構造から SHIFTX2 を用いた化学シフトを逆計算した値と実験結果の相関  
縦軸: SHIFTX2 による逆計算の結果、横軸: 実験値

全ての化学シフトの計算は 1 気圧 298 K における Q41N の立体構造(PDB: 2RSU)をもとに SHIFTX2 version 1.07 を用いて計算を行った。SHIFTX2 と実験結果の相関係数は  $H_N$ : 0.90、 $N_H$ : 0.91、 $C'$ : 0.87、 $C\alpha$ : 0.99、 $H\alpha$ : 0.94、 $C\beta$ : >0.99 であった。

Q41N の構造的な特徴は、 $\alpha_1$ -helix の配向を除き、3 kbar における野生型の立体構造<sup>3</sup> と非常によく似ており、圧力および Q41→N アミノ酸置換によって分布率が増加する  $N_2$  構造は、同一であると考えられる。我々は Q41N の残余双極子相互作用 RDC によって NH ベクトルの磁場配向角度の解析を行った。RDC は配向剤中において僅かに生じた双極子カップリングから、タンパク質全体の配向と結合の角度を算出する方法である。Q41N の RDC 値をもとに野生型の 30 bar の構造( $N_1$ : PDB 1v80)と 3 kbar の構造( $N_2$ : PDB 1v81)から、タンパク質の配向と NH 結合の角度の計算を行い、タンパク質の立体構造と配向情報から RDC 値の逆計算を行った。Q41N の RDC 値をもとに Q41N の立体構造から逆計算した RDC



値は、23-43 のアミノ酸残基でずれが見られた。そのずれは N<sub>1</sub> 構造では平均 4.1 Hz、N<sub>2</sub> 構造では 2.5 Hz であった。そのため、Q41N は N<sub>1</sub> 構造より N<sub>2</sub> 構造に近い立体構造を有していることが示唆された。

ユビキチンの構造アンサンブルの解析は EROS<sup>15</sup>、ERNSR<sup>16</sup>、DER<sup>17</sup> などで行われている。DER は NOEs とオーダーパラメーターによって構造の精密化を行っており、ピコ秒からナノ秒の速い構造揺らぎを反映する。EROS と ERNST は NOEs と RDCs によって構造の精密化を行う解析である。RDCs は、ピコ秒から数十マイクロ秒の比較的遅い構造の揺らぎの情報を含んでいる。

これらの構造アンサンブルと野生型ユビキチンの立体構造と 1 気圧 Q41N の立体構造を用いて、主成分解析(PCA)を行った。PCA の結果を Fig. 3.3 に示す。Q41N の立体構造は、3 つの構造アンサンブル(EROS、ERNST、DER)より野生型の 3 kbar の構造に近いことがわかった。N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub> 状態転移は 1-10 μs の時間スケールで揺らいでおり、N<sub>2</sub> 状態は N<sub>1</sub> 状態の構造アンサンブルから逸脱した状態である<sup>15,16,17</sup>。PCA の結果から、疎水性パッチで相互作用したユビキチン-Vps27 UIM の複合体構造(1Q0W)は N<sub>1</sub> の構造アンサンブルに含まれた状態であるので、Q41N の立体構造は、UB-UIM 複合体とは異なっているということが分かった(Fig. 3.3)<sup>23,24</sup>。これは、UIM 結合に伴う構造変化と N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub> 状態の分子構造の変化が互いに異なることを示している。さらに N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub> 状態転移が疎水性パッチの構造変化にほとんど影響がないこと、野生型と Q41N の UIM に対する相互作用の強さにほとんど変化がないこと(2 章 Fig. 2.13)、野生型と Q41N の化学シフト差が、遊離状態と UIM 複合体状態でほとんど変化がないこと(2 章 Fig. 2.14)を説明することができる。

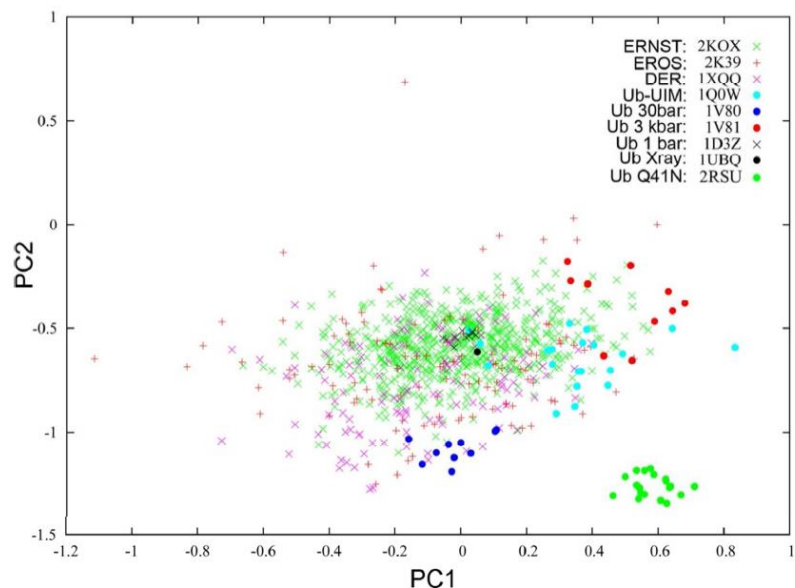


Fig. 3.3. ユビキチン野生型と 1 気圧における Q41N の立体構造の主成分解析の結果

×:ERNST 構造アンサンブル(2K0X)、+:EROS 構造アンサンブル(2K39)、×:DER 構造アンサンブル(1XQQ)、●:UB-UIM 複合体(1Q0W)、●:30 気圧におけるユビキチン(1v80)、●:3000 気圧におけるユビキチン(1v81)、×:1 気圧におけるユビキチンの NMR 構造(1d3z)、●:1 気圧におけるユビキチンの結晶構造(1UBQ)、●:1 気圧における Q41N(2RSU)

Q41N は、2500 気圧下において 97%の N<sub>2</sub> 状態が分布しており、N<sub>1</sub> 状態の影響がほとんど見られない純粋な N<sub>2</sub> 状態にある。我々は純粋な N<sub>2</sub> 状態の立体構造を決定するために、2500 気圧下における Q41N の立体構造計算を行った。立体構造計算は、1245 個の距離制限と 72 個の二面角の制限で行った(Table 3.2 Restraints used in the structure calculation)。エネルギー最適化された 20 個の構造の解析結果、主鎖の RMSD 値は、0.35Å と 1 気圧下において通常の NMR 試料管で決定される構造と同等の収束結果となった(Table 3.2 Geometric statistics)。また、ラマチャンドラプロット(Table 3.2 Ramachandran analysis)は既知の立体構造の統計的な二面角との比較解析から、得られた構造の統計的な妥当性を示す。2500 気圧における Q41N の立体構造を基に解析した結果、most favored

regions と additional allowed regions の和が 99%を超えているため、1 気圧下において通常の NMR 試料管で決定される構造と同等の精度といえる。

Table 3.2. 2500 気圧、298 K における Q41N 変異体の構造計算の束縛条件と計算結果<sup>a</sup>

Restrains used in the structure calculation <sup>b</sup>	
Number of distance constraints	1245
short range, $ i-j  \leq 1$	669
medium range, $1 <  i-j  < 5$	189
long range, $ i-j  \geq 5$	387
Number of $\phi$ angle constraints	36
Number of $\phi$ and $\psi$ angle constraints	80
Residual violations after AMBER energy minimization	
Close contacts	1
Geometric statistics <sup>c</sup>	
average backbone atoms RMSD to mean (Å)	0.35
average heavy atoms RMSD to mean (Å)	0.85
Ramachandran analysis <sup>d</sup>	
most favored regions (%)	83.2
additional allowed regions (%)	16

<sup>a</sup>20 structures with the lowest target function are selected out of 200 structures calculated with CYANA3.93 from randomized starting structures. <sup>b</sup>Backbone  $\phi$  and  $\psi$  angle constraints were obtained from the chemical shifts of C $\alpha$ , H $\alpha$ , H, N, and C' using the TALOS+ program: for  $\alpha$ -helix,  $-120^\circ < \phi < -20^\circ$  and  $-100^\circ < \psi < 0^\circ$ , and for  $\beta$ -sheet,  $-200^\circ < \phi < -80^\circ$  and  $40^\circ < \psi < 220^\circ$ . Energy minimization was performed in explicit water (TIP3P) at 2500 bar and 298K using AMBER11. Atomic coordinates and structural constraints are deposited as PDB entry 2RU6. Signal assignments are deposited as BMRB entry 11547. <sup>c</sup>RMSD for residues 1-70 are calculated by the program MOLMOL. <sup>d</sup>Ramachandran analysis was performed for residues 2-75 by the

ユビキチンの N<sub>1</sub> 状態 (野生型、1 気圧) と N<sub>2</sub> 状態 (Q41N、298 K、2500 気圧) の立体構造を比較したものが Fig. 3.4 である。

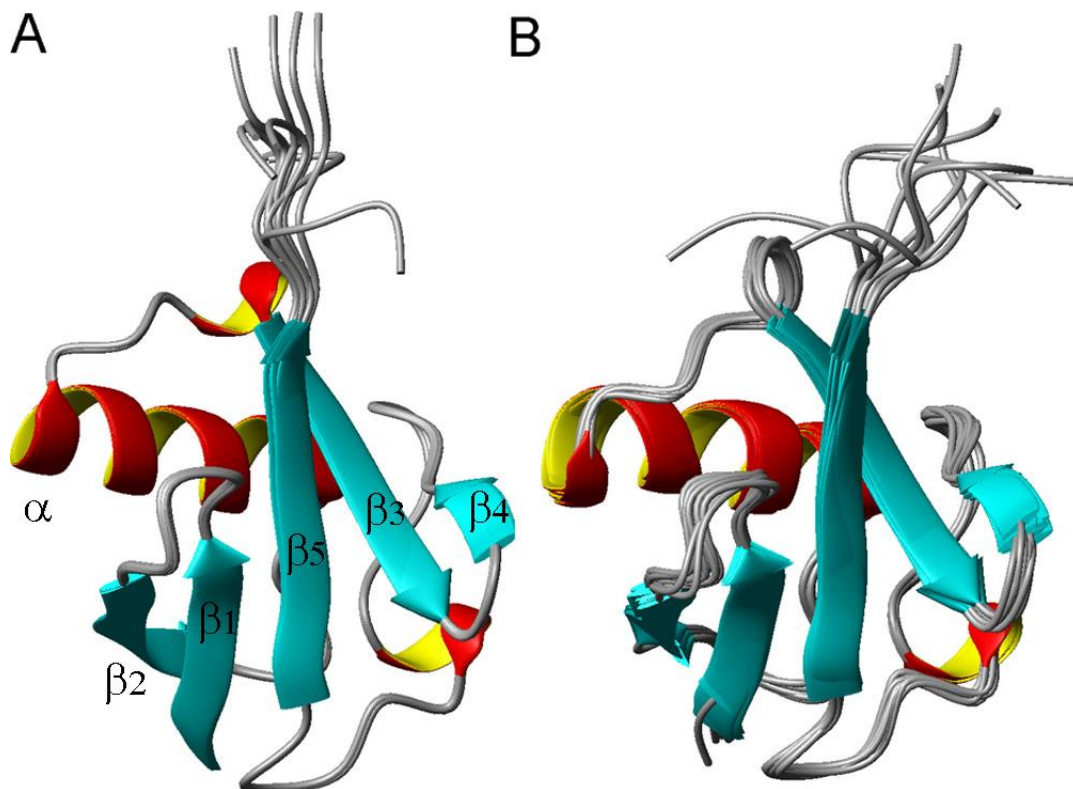


Fig. 3.4. (A)ユビキチン基底状態 N<sub>1</sub>(PDB: 1d3z)と(B)2500 気圧における Q41N 変異体 (PDB: 2RU6)の 10 個のエネルギー最適化された立体構造

N<sub>1</sub> 状態 (野生型、1 気圧)から N<sub>2</sub> 状態 (Q41N、298 K、2500 気圧)の C $\alpha$ の位置の変化を Fig. 3.5 (A)に示す。Fig. 3.5 (B)、(C)に N<sub>1</sub> と N<sub>2</sub> の二面角( $\phi$ ,  $\psi$ )を示す。純粋な N<sub>2</sub> 状態の立体構造は、1 気圧における Q41N の立体構造と同様に、野生型と比較すると C 末端  $\beta$ 5-strand (68 番以降の残基)の配向が大きな変化が見られ、それに伴い $\alpha$ -helix と $\alpha$ - $\beta$ 3 間のループ (33-41)に配向の変化が見られた。そしてこれらの領域で主鎖の二面角に変化が見られた。構造変化に伴う重要な二面角( $\phi$ ,  $\psi$ )の変化は、34-42 および 68-72 の領域でみられ、 $\sim 50^\circ$ くらいの変化が観測された。これ以外の領域は、D52 の $\psi$ 角と G53 の $\phi$ 角を除き二面角のずれは小さかった。先行研究で、高圧力下の野生型ユビキチンで観測された R42 の  $^1\text{H}$  と V70 の  $^{13}\text{C}'$  間の  $^3\text{J}(\text{HN}, \text{C}')$ 水素結合スカラーカップリングの測定に基づいて水素結合の減弱が観測されている<sup>18</sup>。高圧力下における C 末端 $\beta$ 5-strand の位置の変化は水素結合の

減弱を伴うと考えられ、 $N_1 \rightarrow N_2$  への状態変化と一致する。

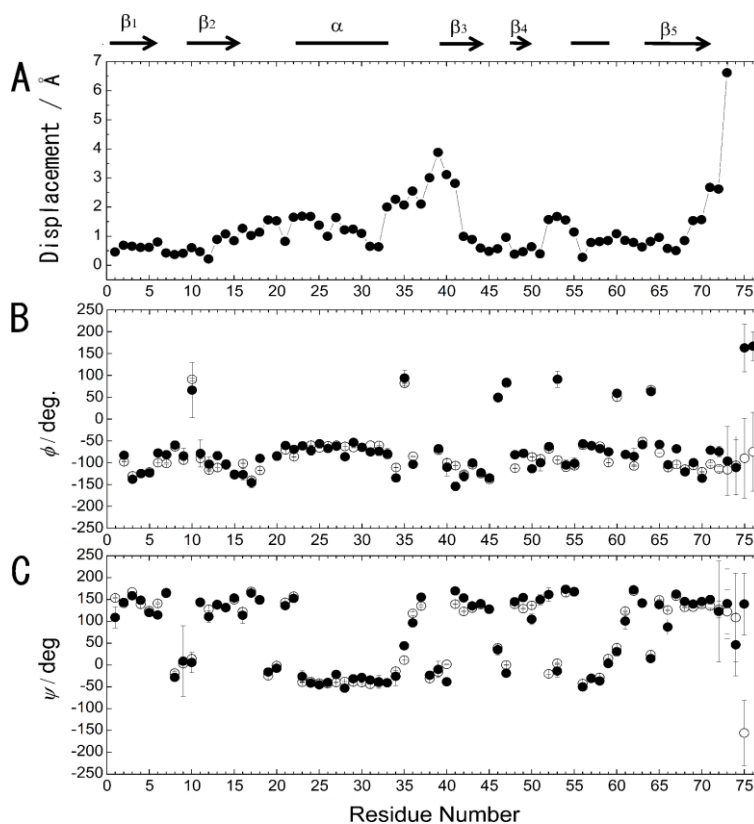


Fig. 3.5. ユビキチン野生型(○)と 2500 気圧下における Q41N 変異体(●)の(A)主鎖の  $C\alpha$ 間の原子間距離と(B、C)二面角  $\phi$ 、 $\psi$

ユビキチン野生型の立体構造は、NMR 構造(1d3z)で解析を行った。

二面角の計算は 10 個のエネルギー最適化された構造で行い。その標準偏差を誤差とした。

注意しなくてはならないのは、D52 の  $\psi$  角の値と G53 の  $\phi$  角の値が野生型 1 気圧の構造と異なっていることである。ただし、TALOS+の二面角予測とは一致している。D52 のカルボニル基と E24 のアミド基が水素結合を形成する状態と G53 のアミド基と E24 のカルボキシル基が水素結合を形成する状態は、化学平衡状態にあることが知られている<sup>19,20,21</sup>。ユビキチン野生型が D52-D24 間で水素結合を形成する場合、D52 の  $\psi$  角はおよそ  $-50^\circ$ 、G53 の  $\phi$  角は  $-100^\circ$  を取る(PDB: 1ubq, 1d3z)。一方で、G53-E24 間で水素結合を形成する場合、D52 の  $\psi$  角はおよそ  $148^\circ$ 、G53 の  $\phi$  角は  $98^\circ$  を取る<sup>21</sup>(PDB: 3ONS)。今回の構造解析では、

これらの部位で報告されている最安定な構造(PDB: 1d3z)ではなく、G53-E24 間が水素結合を形成したコンフォメーション(PDB: 3ONS)となったと考えられる。E24、G53 では1気圧下で HSQC 信号が観測されないため圧力効果を評価できないが、D52 では構造揺らぎの増加を示す加圧による  $R_2$  値の増加は観測されていない。そのため、D52、G53 の二面角の変化は、 $N_1$ - $N_2$  状態転移とは関係ないと考えられる。

化学シフトの変化は立体構造の変化を反映する。SHIFTX2<sup>14</sup>を用いて Q41N 2500 気圧の構造から化学シフトを計算した。実験で求められた化学シフトと SHIFTX2 から計算された化学シフトの値には高い相関性が見られた(相関係数  $R = 0.90(H_n)$ 、 $0.92(N_h)$ 、 $0.99(C_\alpha)$ 、 $0.94(H_\alpha)$ 、 $0.94(C')$ 、 $0.99(C_\beta)$ )。

Fig. 3.6 に示すのは、1 気圧における野生型の立体構造 (緑、PDBID:1d3z)と 2500 気圧下における Q41N の立体構造 (赤、PDBID:2RU6)とユビキチン-E1 複合体の立体構造(青、PDBID:3CMM)である。E1-ユビキチン複合体はユビキチンの C 末端が E1 と相互作用するために配向が変化している。このような変化は、ubiquitin associated protein(UBA)や ubiquitin interacting motif (UIM)などとの複合体では観測されない<sup>22,23</sup>。非常に面白いことに NEDD 8 も、E1 との複合体中で C 末端  $\beta_5$ -strand の配向の変化が観測されている(Fig. 3.7)。また、高圧力 NMR 法により、ユビキチンと同様の構造的特徴を有する  $N_2$  状態が保存されている。C 末端 $\beta_5$ -strand の構造変化を伴う  $N_1$ - $N_2$  状態転移は、E1-E2-E3 カスケードを有するホモログ群で進化的に保存されている<sup>24</sup>。そのため、ユビキチンと NEDD 8 の E1 分子認識機構は、誘導適合モデルというよりかは、C 末端  $\beta_5$ -strand の配向が変化した  $N_2$  が E1 と相互作用する構造選択モデルであると考えられる。

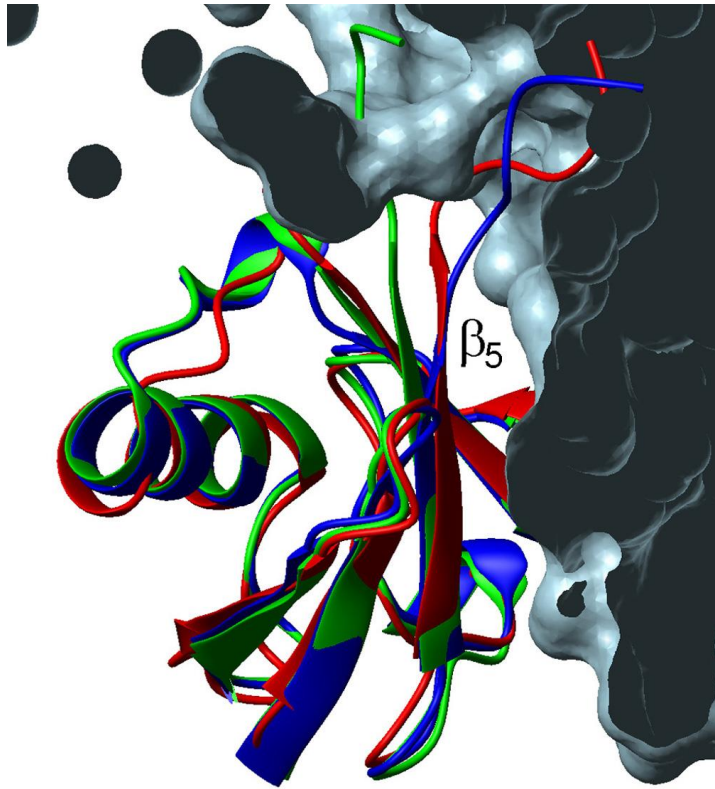


Fig. 3.6. ユビキチン野生型(緑、PDB: 1D3Z)と 2500 気圧下における Q41N 変異体 (赤、PDB: 2RU6)とユビキチン-ユビキチン活性化酵素 E1 の複合体(青、PDB: 3CMM)。

E1 は灰色で分子表面モデル、ユビキチンはリボンモデルで示した。

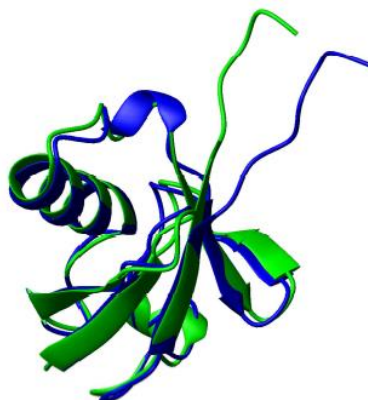


Fig.3.7. ユビキチン様タンパク質 NEDD 8 の遊離状態(緑)と NEDD 8-E1 複合体における NEDD 8(青)の立体構造

非常に興味深いことに、C 末端  $\beta_5$ -strand の構造変化は、L69S 変異体でも観測されている。L69S 変異体は  $^1\text{H}$  と  $^{15}\text{N}$  の化学シフトの変化が、圧力摂動や Q41N などの  $\text{N}_2$  状態の分布率が増加した状態と類似している<sup>24</sup>。例えば、V70 の  $^{15}\text{N}$  の化学シフトの大きな高磁場シフトや I36 の  $^1\text{H}$  の化学シフトの大きな低磁場シフトが、観測されている。

さらに興味深いことに 41 の Gln 残基や 69 の Leu 残基は、6 つのユビキチンサブファミリーグループのうち NEDD8 とユビキチンが含まれるグループで、アミノ酸の保存性が非常に高い<sup>23</sup>。Q41 の側鎖のアミノ基は I36 のカルボニル基と水素結合を形成している。そして L69 は I36 を含むユビキチンの疎水性コアを形成する様々な疎水性残基と疎水性相互作用を形成している。これらの疎水性相互作用を形成している残基は、サブグループで保存性が高く<sup>23</sup>、 $\text{N}_1$ - $\text{N}_2$  状態転移のバランスを正常に保つ役割があると考えられる。

$\text{N}_2$  状態の機能的な役割を解明するために、我々は野生型と Q41N 変異体の両方について、Vps27 のユビキチン相互作用モチーフ(UIM)との結合機能を 2 章において評価した。ユビキチンの野生型は、 $\text{N}_2$  状態が 20%、Q41N は  $\text{N}_2$  状態が 71% 分布している<sup>5</sup>。UIM はエンドサイトーシスおよび液胞タンパク質の選択の経路に関係していることが知られている。UB-UIM の複合体によれば、UIM は L8-I44-V70 の疎水性パッチを中心とする  $\beta_1$ -strand、 $\beta_3$ -strand、 $\beta_5$ -strand で相互作用することがわかっている。その解離定数  $K_d$  は、野生型が  $210 \pm 11 \mu\text{M}$ 、Q41N が  $230 \pm 30 \mu\text{M}$  であり、 $\text{N}_1$ - $\text{N}_2$  状態転移が UIM の結合にほとんど影響を及ぼさない(2 章 Fig. 2.13)。しかし、Haririnia らの L69S 変異体は Rpn10 と S5a の UIM に対して結合親和性が劣ることがわかっている<sup>24</sup>。これらの結果は、UB-UIM 複合体において、ユビキチンの立体構造は  $\text{N}_1$  状態に類似している点<sup>23</sup>から、C 末端  $\beta_5$ -strand の配向が変化する  $\text{N}_2$  状態は UIM との結合に好ましくない可能性もある。

Haririnia らは、L69S を唯一の ubiquitin 供給源として生育する酵母は高分子量のユビキチン化されたタンパク質の増加を示した<sup>24</sup>。これは、L69S 変異体を含む酵母において、ポリユビキチン化の速度が速くなり、過剰にポリユビキチン化された可能性を示すが、ポ



リユビキチン化されたタンパク質と他の細胞構成物との相互作用が正常に行われず、正常に代謝されなかったためとも考えられる。Q41N と L69S の立体構造は類似していることから、Q41N においても、L69S で見られた類似した結果が見られるかもしれない。ユビキチンは数多くの細胞機能において、重要な役割を果たしており、様々なユビキチンを標的とするタンパク質とそれに応じた相互作用機構によって機能を発現していると考えられる。例えば、L8-I44-V70 からなる疎水性パッチは UIM と UBA を含む数多くのタンパク質との相互作用に関与している。そのため、C 末端  $\beta_5$ -strand の配向が変化する N<sub>2</sub> 状態の存在確率が高すぎるとそれらとの相互作用を通じた細胞機能には問題が生じてしまう可能性があり、野生型では N<sub>2</sub> 状態を高エネルギー状態として存在させているのかもしれない。

N<sub>2</sub> 状態が 97% 分布した状態である 2500 気圧下の Q41N の原子座標を決定した。これはユビキチンの 1-10  $\mu$ s の時間スケールで生じている N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub> 状態転移を捉え、精密に原子座標決定に成功したことを意味する。さらに N<sub>2</sub> 状態が UB-E1 複合体中の UB と構造的な特徴が一致していることを発見した。E1-E2-E3 カスケードを介して翻訳後修飾される NEDD8 でも N<sub>2</sub> 状態が存在し、E1 との複合体形成に伴い N<sub>2</sub> 状態に似たコンホメーションをとる事から、E1 の分子認識のために N<sub>2</sub> 状態が準備されていることを示した。

#### 3-4. 参考文献

1. Kitahara R, Yamada H and Akasaka K (2001) *Biochemistry* **40**, 13556-13563.
2. Kitahara R and Akasaka K (2003) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3167-3172.
3. Kitahara R, Yokoyama S and Akasaka K (2005) *J. Mol. Biol.* **347**, 277-285.
4. Kitahara R, Okuno A, Kato M, Taniguchi Y, Yokoyama S and Akasaka K (2006) *Mag. Reson. Chem.* **44** Spec No, S108-113.
5. Kitazawa S, Kameda T, Yagi-Utsumi M, Sugase K, Baxter NJ, Kato K, Williamson MP and Kitahara R (2013) *Biochemistry* **52**, 1874-85.
6. Kitahara R, Yamaguchi Y, Sakata E, Kasuya T, Tanaka K, Kato K, Yokoyama S and Akasaka K (2006) *J. Mol. Biol.* **363**, 395-404.
7. Akasaka K and Yamada H (2001) *Methods Enzymol.* **338**, 134-158.
8. Peterson RW, Nucci NV and Wand AJ (2011) *J. Magn. Reson.* **212**, 229-233.
9. Cavanagh J, Fairbrother WJ, Palmer AG and Skelton NJ (1996) Academic press, San Diego, California.
10. Shen Y, Delaglio F, Cornilescu G and Bax A. (2009) *J. Biomol. NMR* **44**, 213-223.
11. Ottiger M, Delaglio F, Marquardt JL, Tjandra N and Bax A (1998) *J. Magn. Reson.* **134**, 365-369.
12. Zweckstetter M and Bax A (2001) *J. Biomol. NMR* **20**, 365-377.
13. Herrmann T, Güntert P and Wüthrich K (2002) *J. Mol. Biol.* **319**, 209-227.
14. Han B, Liu Y, Ginzinger SW and Wishart DS (2011) *J. Biomol. NMR* **50**, 43-57.
15. Lindorff-Larsen K, Best RB, DePristo MA, Dobson CM and Vendruscolo M (2005) *Nature* **433**, 128-132.
16. Lange OF, Lakomek NA, Farès C, Schröder GF, Walter KFA, Becker S, Meiler J, Grubmüller H, Griesinger C and de Groot BL (2008) *Science* **320**, 1471-1475.

17. Fenwick RB, Esteban-Martin S, Richter B, Lee D, Walter KFA, Milovanovic D, Becker S, Lakomek NA, Griesinger C and Salvatella X (2011) *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10336-10339.
18. Nisius L and Grzesiek S (2012), *Nature chemistry*, 4, 111-117.
19. Massi F, Grey MJ and Palmer AG (2005) *Protein Sci.* **14**, 735-742.
20. Salvi N, Ulzega S, Ferrage F and Bodenhausen G (2012) *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 2481-2484.
21. Huang KY, Amodeo GA, Tong LA and McDermott A (2011). *Protein Sci.* **20**, 630-639.
22. Swanson KA, Kang RS, Stamenova SD, Hicke L and Radhakrishnan I (2003) *EMBO J.* **22**, 4597-4606.
23. Kiel C and Serrano L (2006) *J. Mol. Biol.* **355**, 821-844.
24. Haririnia A, Verma R, Purohit N, Twarog MZ, Deshaies RJ, Bolon D and Fushman D (2008) *J. Mol. Biol.* **375**, 979-96.

## 4章 まとめ

生体高分子であるタンパク質は、一本鎖のポリペプチド鎖が、特異的な立体構造を形成することで生体内の役割を担っている。タンパク質の高エネルギー状態の立体構造と安定性を解析することは、その機能発現機構を知る新しいアプローチである。しかし、高エネルギー状態は分布率が低いことから分光学的に捉えることは困難である。核磁気共鳴(NMR)法はピコ秒から秒という広い時間スケールでの構造の揺らぎを原子分解能で調べることができる強力な手法である。特に高圧力 NMR 法は、加圧により高エネルギー状態の分布率を増加させ、高エネルギー状態の特性や原子座標決定を行える優れた方法である。高圧力 NMR 法によって、ユビキチンは天然状態  $N_1$  と変性状態  $U$  のほかに 2 つの高エネルギー状態(準安定状態  $N_2$ 、局所変性状態  $D$ )の間を構造的に揺らいでいることがわかっている。ユビキチンの高エネルギー状態は、ユビキチン活性化酵素  $E1$  と相互作用するユビキチンホモログ群でのみ保存されており、重要性が指摘されているがその構造や機能的意義に関する詳細は分かっていなかった。これを明らかにするために、野生型ユビキチンの 3000 気圧下の座標と 30 気圧下の座標を比較することで、 $N_1$ - $N_2$  状態転移を制御する重要な 2 つの相互作用を発見した。ひとつは  $K11$  と  $E34$  間にある静電相互作用で、もうひとつは  $I36$  のカルボニル基と  $Q41$  の側鎖の水素結合である。

2章でこれらの相互作用の  $N_1$ - $N_2$  状態転移における役割を検討した。これら相互作用を切断もしくは減弱した変異体である  $K11A$ 、 $E34A$ 、 $Q41N$ 、 $Q41A$  を作成した。変異に伴う化学シフト変化の大きさは  $K11A \approx E34A < Q41A < Q41N$  となった。最も大きい  $Q41N$  についてさらなる構造揺らぎ解析を行った。圧力摂動と変異による化学シフト変化には相関があり、 $\alpha_1$ -helix と  $\alpha_1$ - $\beta_3$  間のループ、C 末端  $\beta_5$ -strand で大きな化学シフトの変化が観測された。さらに  $Q41N$  変異体は 1 気圧下で 71%の  $N_2$  状態が分布していることが高圧力 NMR 法によってわかった。さらに野生型の 3000 気圧下と同様に、マイクロ秒からミリ秒の構造の揺らぎを反映する横緩和速度  $R_2$  値の増加が観測され、 $N_2$  状態の存在確率の増加が示され

た。

次に 3 章で Q41N 変異体について精密な座標の決定を行った。N<sub>2</sub> 状態が、71%分布している 298 K, 1 気圧下において、距離情報(NOE)と角度情報(RDC、TALOS+)によって立体構造を決定した。さらに高圧力 NMR 法によって、97%の N<sub>2</sub> 状態が分布した状態 298K、2500 気圧下で立体構造解析を行った。座標決定された純粋な N<sub>2</sub> 状態の立体構造は野生型と比較すると $\alpha_1$ -helix と $\alpha_1$ - $\beta_3$  間のループ、C 末端  $\beta_5$ -strand の配向が変化しており、特に C 末端  $\beta_5$ -strand が大きく変化していた。非常に面白いことに C 末端  $\beta_5$ -strand の配向の変化は、E1-ユビキチン複合体でみられる変化と類似している。これは E1 の分子認識機構に深くかかわりがあると考えられ、ユビキチンは C 末端  $\beta_5$ -strand の配向が変化した N<sub>2</sub> 状態を水溶液中で用意しており、E1 の分子認識機構は、誘導適合モデルというよりかは、N<sub>2</sub> 状態を認識している構造選択モデルであることが示唆された。

準安定構造 N<sub>2</sub> の明確な立体構造の決定のためには N<sub>2</sub> 状態を 100%に近い高い分布率にすることが求められる。合理的戦略によって設計された点アミノ酸置換と高圧力 NMR 法による高エネルギー状態の研究戦略は、他のタンパク質に適用が可能な一般性のある手法であり、今後、高エネルギー状態の構造研究が活性化されることが期待できる。高エネルギー状態の構造研究が進むことにより、高エネルギー状態を標的とした分子創薬研究なども進むかもしれない。また、高エネルギー状態は、タンパク質の分子認識などの機能発現だけではなく、アミロイドシスなどのミスフォールディング病などにも関わりがあるといわれている。本手法を用いることにより、これらの病気の解明などが進むかもしれない。今後、高エネルギー状態の構造研究は、発展と創薬研究などへの応用が期待できる。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始、御指導と助言をいただきました立命館大学薬学部薬学科 北原 亮 同学 准教授に心から深く感謝いたします。また、数多くの助言をいただいた谷口吉弘教授、澤村精治 教授、加藤 稔 教授に感謝します。

NMR の測定でお世話をしていただいた近畿大学 高圧蛋白質研究センター 赤坂一之センター長 前野 覚大博士、サントリー生物有機化学研究所 菅瀬 謙治博士、大阪大学 池上 貴久教授、小林 直宏博士に感謝いたします。

蛋白質のプラスミドの提供をしていただいた名古屋市立大学薬学部 加藤 晃一教授・矢木 真穂博士・平野 貴志君に感謝いたします。

ペプチド合成では千葉工業大学 今村 比呂志博士 瀬川 愛考さん(現・鹿児島県教諭)に手法等ご指導いただき感謝します。また合成の手伝いなどで同研究室 奥井 伸也君にお世話になりました。感謝いたします。

また、公私・修士研究ともにお世話いただき、時に適切な助言を頂いた藤本 和士助教授 秦 和澄博士、東京大学 榎原 朋子さん、京都大学 山置 佑大君 神庭 圭佑君、京都府立大学 稲葉 理美さん、立命館大学 生体物理化学研究室および溶液物理化学研究室の方々に感謝します。

最後につらい時を支え癒してくれた愛犬のクッキーに感謝いたします。