

## 論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨の公表

学位規則第 8 条に基づき、論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

○氏名	北沢 創一郎 (きたざわ そういちろう)
○学位の種類	博士 (理学)
○授与番号	甲 第 1004 号
○授与年月日	2014 年 9 月 25 日
○学位授与の要件	本学学位規程第 18 条第 1 項 学位規則第 4 条第 1 項
○学位論文の題名	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
○審査委員	(主査) 加藤 稔 (立命館大学薬学部教授) 北原 亮 (立命館大学薬学部准教授) 寺内 一姫 (立命館大学生命科学部准教授)

### <論文の内容の要旨>

タンパク質の立体構造は、最安定状態から変性状態の間を揺らいでいる。その最安定状態の立体構造は、X 線結晶構造解析や核磁気共鳴 (NMR) 法により解明されているが、最安定状態を逸脱し高いギブス自由エネルギーをもった状態 (高エネルギー状態) の立体構造や機能的意義はほとんど未解明である。これまでに、高エネルギー状態を原子分解能で研究できる手法として高圧力 NMR 法が開発されており、本手法を用いることによりタンパク質ユビキチンには、最安定状態と変性状態の間に少なくとも 2 つの高エネルギー状態が存在することが知られている。博士論文では、高感度耐圧セラミクスセルを用いた高圧力 NMR 手法とアミノ酸変異の組み合わせにより、高エネルギー状態 N<sub>2</sub> の分布率を 97% にまで高め、その高精度な立体構造解析に成功した。

野生型ユビキチンについて、N<sub>1</sub> 状態が支配的に存在する 30 気圧と N<sub>2</sub> 状態が 77% 存在する 3000 気圧下の立体構造を比較することにより、N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub> 状態の構造揺らぎを制御する相互作用を予測した。それら相互作用を減弱させるために変異体 K11A、E34A、Q41A、Q41N を作製した。その 1 つで I36-Q41 水素結合を減弱させた Q41N 変異体について、高圧力 NMR 測定に基づく化学シフト解析から、1 気圧下でも N<sub>2</sub> 状態が 71% 分布していることが分かった。N<sub>2</sub> 状態が多く分布した Q41N 変異体により、常温常圧下でその機能研究が可能となった。さらに Q41N を 2500 気圧に加圧することにより、N<sub>2</sub> 状態が 97% 分布することが分かった。この条件下で 3 次元 NMR 測定を行い、距離情報と主鎖二面角情報を高精度で収集し、立体構造解析を行った。先行研究に比べ、N<sub>2</sub> 状態の分布率が大幅に増幅している点、3 次元 NMR を用いており NMR 信号の分離が改善されていることから、得られた

N<sub>2</sub> 構造の解析精度は大幅に改善された。N<sub>2</sub> 構造は、ユビキチンがユビキチン活性化酵素 E1 と相互作用したときにとる構造と類似していたことから、ユビキチンと E1 の分子認識は、誘導適合型というよりは、E1 がユビキチン N<sub>2</sub> 状態と相互作用するコンフォメーション選択型であることが示唆された。

<論文審査の結果の要旨>

論文内容を踏まえ、本論文は以下の点で評価することができる。

高圧力 NMR 法という特徴的な手法を用い、タンパク質科学における重要なテーマの一つである「タンパク質がもつ構造揺らぎ」に関して、新規性と独創性に優れた下記の研究成果を得た。

- (1) ユビキチンの立体構造と構造揺らぎの研究に基づいて、アミノ酸変異という一般的な手法により、高エネルギー状態 N<sub>2</sub> を模倣した変異体 Q41N の作製に成功した。この変異体により、生理条件下での研究が可能となったため、高エネルギー状態の機能的意義を含め、ユビキチン研究分野への波及効果が期待できる。
- (2) 通常、高エネルギー状態のみを選択的に安定化することは困難であり、その立体構造研究は進んでいない。合理的なアミノ酸変異と圧力摂動の組み合わせにより、ユビキチンの高エネルギー状態 N<sub>2</sub> を 97%まで選択的に増加させ、NMR による立体構造解析に成功した。高圧力下での溶液中のタンパク質の立体構造解明は、原子間距離情報や主鎖二面角を用いた高精度なものとしては二例目であり独創性の高い研究成果である。
- (3) 高エネルギー状態の立体構造が、ユビキチンが相互作用酵素との複合体形成時にとるコンフォメーションと類似していることを発見した。この結果は、ユビキチンと酵素の分子認識機構についてコンフォメーション選択型であることを示唆した。

本論文の審査に関して、2014年7月25日(金)16時00分~17時00分イーストウイング6階生命科学部・薬学部演習室2において公聴会を開催し、申請者による論文要旨の説明の後、審査委員は学位申請者北沢創一郎に対する口頭試問を行った。各審査委員および公聴会参加者より、ユビキチンの E1 認識機構、変異体選択の合理性、創薬研究への展望などの質問がなされたが、いずれの質問に対しても申請者の回答は適切なものであった。よって、以上の論文審査と公聴会での口頭試問結果を踏まえ、本論文は博士の学位に値する論文であると判断した。

<試験または学力確認の結果の要旨>

本論文の主査および副査は、本論文提出者と本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在学期間中に、研究指導を通じ、日常的に研究討論を行ってきた。また、本論文提出後、主査および副査はそれぞれの立場から論文の内容について評価を行った。

本論文提出者は、本学学位規程第 18 条第 1 項該当者であり、論文内容および公聴会での質疑応答を通して、本論文提出者が十分な学識を有し、課程博士学位に相応しい学力を有していることを確認した。

以上の諸点を総合し、本論文提出者に対し、「博士（理学 立命館大学）」の学位を授与することを適当と判断する。