

博士論文要旨

論文題名：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

立命館大学大学院理工学研究科
総合理工専攻博士課程後期課程

きたざわ そういちろう
北沢 創一郎

高圧力 NMR 法によって、ユビキチンは、準安定状態 N_2 と局所変性状態 I の 2 つの高ギブス自由エネルギー状態の存在が明らかにされており、天然状態 N_1 から変性状態 U までの広い構造空間において、それらが平衡状態にあることがわかっている。これらユビキチンの高エネルギー状態(N_2 , I)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から、機能的に重要な状態であると考えられる。しかし、高エネルギー状態の機能的な役割はよくわかってはいない。我々は、高圧力 NMR 法による立体構造とダイナミクス解析を基にした合理的なアミノ酸置換が高エネルギー状態の研究のための強力な手法であることを示した。先行研究において、ユビキチンの N_2 状態は 3000 気圧下で 77% 分布していることがわかっている。 N_2 状態を模倣した変異体を作製するために、我々は 3000 気圧下において I36 の主鎖のカルボニル基と Q41 の側鎖のアミド基の間にある水素結合と K11 の側鎖と E34 の側鎖間の塩橋が弱まっていることを発見した。我々は、それらの相互作用の形成を阻害するように設計した変異体(K11A, E34A, Q41N, Q41A)を作製した。変異体 Q41N は大気圧下で 71% の N_2 状態が分布している。また、以前に報告された N_2 構造は、存在率が 77% 以下の状態での構造解析であり構造情報に誤差を含んでいたが、本研究では N_2 状態が 97% 分布している 2500 気圧下において Q41N 変異体の立体構造を、水素原子間の距離情報 (核オーバーハウザー効果) をもとに決定した。この純粋な N_2 状態は、 α_1 -helix, α_1 - β_3 loop, β_3 -strand, C 末端 β_5 -strand で、野生型と比べ構造が変化していた。特に C 末端 β_5 -strand における特徴的な変化は、ユビキチンがユビキチン活性化酵素 E1 と複合体を形成する時の変化と一致している。この構造的な一致は、ユビキチンの E1 認識機構は、誘導適合(induced fit)モデルというよりは、構造アンサンブルに既に存在する構造から適した構造が選択されるという構造選択(conformational selection)モデルで説明できることを意味する。高圧力 NMR 法とアミノ酸変異を組み合わせた本手法は、高エネルギー状態研究のための強力な手法であることを示した。

Abstract of Doctoral Thesis

Title : Conformational fluctuation of ubiquitin studied by high-pressure NMR spectroscopy

Doctoral Program in Integrated Science and Engineering
Graduate School of Science and Engineering
Ritsumeikan University

きたざわ そういちろう
Kitazawa Soichiro

Ubiquitin exists in conformational equilibrium between basic folded (N_1), alternatively folded (N_2), locally disordered state (I), and unfolded states (U). Interestingly, high-energy states (N_2 and I) are evolutionary conserved between ubiquitin-homologous proteins having the E1-E2-E3 cascade reaction. However, the functional significance of high-energy states of ubiquitin is not clear. Here, we demonstrate that novel strategy of rational design of mutation based on the characteristics of the structure and dynamics of the protein from high-pressure NMR experiments is a powerful tool for functional study of high-energy states. In the previous study by Kitahara et al., it was revealed that a population of N_2 state of ubiquitin wild type (WT) is 77% at 3000 bar. Comparing the solution structures between N_1 and N_2 of the WT protein, we found two interactions that are likely to be involved in N_1 - N_2 conformational fluctuation. We make several ubiquitin variants, in which the interactions (K11A, E34A, Q41N, Q41A) are reduced or disrupted. We show that the N_2 state is 71% populated in Q41N variant at ambient pressure, furthermore 97% at 2500 bar. The solution structure of Q41N at 2500 bar is determined based on nuclear Overhauser effects. The “pure” N_2 state shows conformational changes at α_1 -helix, α_1 - β_3 loop, β_3 -strand, and C-terminal β_5 -strand. In particular, the C-terminal β_5 -strand of the N_2 state is significantly changed in orientation, compared to that of the N_1 state, which matches the changes seen upon binding of ubiquitin to ubiquitin-activating enzyme E1. Therefore, the recognition of E1 by ubiquitin is best explained by conformational selection rather than induced-fit motion. The novel strategy of high-pressure NMR experiments combined with a suitably chosen point mutation, used here, is generally applicable for proteins and has a potential to improve our understanding of the high-energy states.