

Structural studies on protein domains of unknown function

(機能未知タンパク質ドメインの立体構造解析)

学位論文内容の要旨

タンパク質の多くは、生体内で固有の立体構造を形成しその機能を発揮している。したがって、立体構造情報は機能と密接に関係しているため、タンパク質の機能解明において、立体構造情報は非常に重要である。しかし、タンパク質は数百ときに千を超える残基からなり、実際に全長タンパク質を用いて研究することは難しいことが多い。このような大きなタンパク質はドメインと呼ばれる単位から構成されており、切り出されたドメインは全長のタンパク質のもつ機能・構造を保持していることも多い。このため、多くのドメインの立体構造・機能を知ることはポストゲノム研究において非常に重要である。

ポストゲノム時代になった今日、従来の分子生物学的なアプローチのほかに、配列解析を中心としたバイオインフォマティクスが盛んに行われてきている。これは、似たような配列をもつタンパク質ドメインは、生体中で似たような機能・構造をもつことが多い、という経験的知見から、配列の特徴を拠りどころに未知のタンパク質の機能・構造を予測しようというアプローチである。しかしながら、特に既知のタンパク質との配列相同性の低い場合では、配列情報のみからでは間違ったタンパク質ドメインの機能・構造を導いたり、十分信頼度のある予測は不可能であったりする。このような場合、実験的に決めた立体構造を用いることで、飛躍的に精度の高い分子機能情報を得ることが可能である。

本研究では、配列情報だけでは知見の乏しかった以下に示す4つのドメインに対し、ハイスループット立体構造決定法を用いて、実際にその構造を得ることで、これらの分子機能に関して新たな知見を得ることに成功した。

①マウス microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase 3 (MARK3)の kinase associated domain 1 (KA1 ドメイン): 機能・構造未知であった KA1 ドメインの長さの異なる2つのコンストラクトの構造を決定することで、安定な構造をとるのに不可欠な領域を決め、その領域が酵母にいたるまで保存されていることを見出し、KA1 ドメインの正確なドメイン境界を示した。さらに、得られた構造と配列保存性を比較することで塩基性残基に囲まれた疎水性の溝を機能部位と推定し、MARK3 中のキナーゼドメインに続く保存された酸性領域と相互作用することで、自己抑制的な調整を行っているかと予測した。②ヒト lysine-specific demethylase 1 (LSD1) の SWIRM ドメイン (SWI3p, Rsc8p and Moira から命名された): 近年 DNA の脱メチル化を担っていることが報告された LSD1 の中には、SWIRM と呼ばれる機能・構造未知であったドメインが存在する。SWIRM ドメインの立体構造を決定し、その構造が helix turn helix (HTH) モチーフをもつ新しい立体構造であることを示した。他の典型的な HTH モチーフをもつドメインの立体構造との比較及びド

メインファミリー内での配列保存性を考慮することで、分子表面の疎水性の大きなクレフトが分子機能上重要であることが示唆された。この発見を元に、この疎水性クレフトと histone 3 の tail 領域との結合モデルをたて、実際にこの結合を阻害するような変異を加えることで、結合が失われることを示した。③マウス hepatoma-derived growth factor-related protein-3 の PWWP ドメイン (保存された Pro-Trp-Trp-Pro motif から命名された): PWWP ドメインの構造を決定し、その分子表面に疎水性キャビティーを発見した。同様の位置にキャビティーをもつ Tudor ドメイン、chromo ドメイン、MBT ドメインと PWWP との構造・進化的関連を示唆し、これらのドメインと同様の結合機構でクロマチンと結合することを提唱した。また、本 PWWP ドメインのキャビティーは既知の構造を元にしたホモロジーモデリングでは予測不可能であった。④マウス GCN2 の RWD ドメイン(RING finger and WD repeat containing protein から命名): 機能・構造未知であった RWD ドメインの構造を決定し、構造上特徴的な triple β turn 構造をとることを発見した。この構造は YPXXXXP モチーフによって形成されており、この領域に変異を導入し、NMR 法および円二色性の実験から、この配列が安定な構造を得るため不可欠であることを示した。また triple β turn 構造および配列が様々な生物種のユビキチン結合酵素 (E2) でも見られることを発見した。このことから RWD ドメインと E2 が共通の祖先をもつこと、RWD ドメインを含むタンパク質がユビキチンネットワークに関連していることを提唱した。

本研究が示すように、ハイスループット立体構造決定法を用いて構造を決定し、得られた立体構造情報をもとに、より正確な配列解析を行うことは、特に既知の情報が乏しい場合において有効である。このようにして得られた知見はインフォマティクスの研究により、例えばシステムバイオロジーなど一層広い生化学的な理解への飛躍のきっかけとなるであろう。

学位論文審査の要旨

主査	教授	河野	敬一
副査	教授	田中	勲
副査	教授	出村	誠
副査	助教授	姚	関

学位論文題名

Structural studies on protein domains of unknown function

(機能未知タンパク質ドメインの立体構造解析)

NMRによるタンパク質の立体構造決定は、分子量2万を超えるものは困難であり、5万がほぼ上限である。この分子量の制限にもかかわらずNMR法はタンパク質の立体構造を溶液状態で決定でき、また分子間相互作用や運動性の解析に優れている。このため、巨大タンパク質についてその一部分(ドメイン)を切り出し、構造機能の解析を行うことは非常に重要な手法である。NMRによる機能未知のタンパク質の立体構造解析において、機能ドメインの推定は重要なステップであるが、試行錯誤によるしかないのが現状である。本研究では、機能未知タンパク質の予想される機能ドメインを発見させ、構造解析を行っているが、構造決定に至るには多数のコンストラクトを構築する必要があった。その中で構造決定できたものが、正しい機能ドメインであることが推定された。パイオインフォーマティクスはこの種の予測を迅速に行うことができるが、精度の面でまだ十分とは言えず、構造ゲノム学からの申請者の手法は労力を要するが、機能ドメインを推定する有力な方法であることを示した。

申請者は、配列情報だけでは知見の乏しかった以下に示す4つのドメインに対し、ハイスループット立体構造決定法を用いて、実際にその構造を得ることで、これらの分子機能に関して新たな知見を得ることに成功した。

①マウス microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase 3 (MARK3)の kinase associated domain 1 (KA1)ドメイン：機能・構造未知であった KA1 ドメインの長さの異なる2つのコンストラクトの構造を決定することで、安定な構造をとるために不可欠な領域を同定し、その領域が酵母にいたるまで保存されていることを見出し、KA1 ドメインの正確なドメイン境界を示した。さらに、得られた構造と配列保存性から、機能部位を推定し、作用メカニズムについても提案した。

②ヒト lysine-specific demethylase 1 (LSD1) の SWIRM(SWI3p, Rsc8p and Moira)ドメイン：申請者は SWIRM ドメインの立体構造を決定し、その構造が helix turn helix (HTH) モチーフをもつ新しい立体構造であることを示した。また、立体構造の比較及び配列保存性から機能上重要な部位を推定し、変異実験を行うことで、実験的に機能部位を証明した。

③マウス hepatoma-derived growth factor-related protein-3 の PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro)ドメイン：申請者は PWWP ドメインの構造を決定し、その分子表面に疎水性キャビティーを発見した。さらに他のドメインとの比

較から、クロマチンとの結合機構を提唱した。④マウス GCN2 の RWD (RING finger and WD repeat containing protein) ドメイン: 申請者は機能・構造未知であった RWD ドメインの構造を決定し、構造上特徴的な triple β turn 構造をとることを発見した。この領域に変異を導入し、この配列が安定な構造を得るため不可欠であることを示した。また構造の比較と配列類似性から、作用機構を提唱した。

申請者は理化学研究所ゲノムサイエンスセンターにおけるハイスループット立体構造解析システムの構築に貢献しており、このシステムを用いて多数のタンパク質の構造を決定し、得られた立体構造情報をもとに、より正確な配列解析を行うことが可能であることを示した。一連の申請者の研究は、構造ゲノミックスの今後の進路を示すものであると言えよう。

学位論文の公開発表の質疑応答では、申請者は自らの経験や過去の論文内容を引用し、豊富な知識に基づいて質問に明快に回答した。

よって、申請者は北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認める。