

氏 名 Methanee HIRANYAKORN

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2261 号

学位授与の日付 2021年9月 28日

学位授与の要件 物理科学研究科 機能分子科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Characterization of conformational dynamics of Lys48-linked
ubiquitin chains as design frameworks for creating
allosterically controllable multidomain proteins

論文審査委員 主 査 青野 重利
構造分子科学専攻 教授
加藤 晃一
機能分子科学専攻 教授
古賀 信康
構造分子科学専攻 准教授
西村 勝之
機能分子科学専攻 准教授
平岡 秀一
東京大学 大学院総合文化研究科 教授

(Form 3)

Summary of Doctoral Thesis

Methanee HIRANYAKORN

Characterization of conformational dynamics of Lys48-linked ubiquitin chains as design frameworks for creating allosterically controllable multidomain proteins

Sophisticated protein functions are, in many cases, mediated through the cooperative interplay between two or more domains. Proteins with a modular architecture of multiple domains connected by linkers often exhibit diversity in relative positions of the individual domains organized through weak and even transient inter-domain interactions. Moreover, it is suggested that the motion, orientation, and interaction of these domains could be regulated and affected by various environmental factors in cell, including pH, temperature, oxidative stress, and molecular crowding. Therefore, in order to extend our understanding of the working mechanisms of multidomain proteins in living systems, the quantitative characterization of their conformational interchanges in solution is necessary.

Polymeric ubiquitin (Ub) chains, in which several Ub proteins are connected through specific isopeptide bonds, are known to play regulatory roles in various cellular processes, including cell cycle progression, DNA repair, transcriptional regulation, and apoptosis. The Ub chains conjugated by different linkages carry distinct biological information in the form of a “Ub code” that is read out by specific Ub-interacting proteins. The Lys48-linked Ub chain serves as a tag for protein degradation by the 26S proteasome and interacts with the related proteasomal proteins through a hydrophobic surface. According to the crystal structures, Lys48-linked Ub chains often exhibit closed conformations, in which the hydrophobic patches are shielded due to Ub-Ub interactions in chains. On the other hand, our previous NMR study enabled the characterization of the conformational interchange of the native form of Lys48-linked diUb (n-diUb) between the open and closed conformations, based on conventional chemical shift data.

In this study, I thus extended our previous work by characterizing conformational interconversions of the native forms of Lys48-linked triUb (n-triUb) and tetraUb (n-tetraUb) chains in solution. Firstly, I successfully optimized the protocol of ubiquitylation reaction *in vitro* and prepared a series of Lys48-linked Ub chains with uniform isotope labeling in native and cyclic forms, and carried out NMR studies for characterizing their conformational dynamics. In contrast to n-diUb, I found that n-triUb and n-tetraUb exhibited multiple peaks for many residues, suggesting differences in the local environment among the Ub units. I performed the spectral assignments using a series of n-triUb and n-tetraUb analogs, in which a specific Ub unit was isotopically labeled, and thereby found that each Ub unit in these Ub chains experienced a dynamic

transition in the moderately fast exchange between the open and closed states on the relevant NMR timescale. Furthermore, under this condition, the comparative NMR analyses using monomeric Ub and cyclic diUb as reference molecules enabled the quantification of populations of the open and closed states for each Ub unit of the native Ub chains. My NMR data indicated that the most distal Ub unit in the Ub chains is the most apt to expose its hydrophobic surface, suggesting its preferential involvement in interactions with the Ub-recognizing proteins.

To explain the higher open-state propensity of the distal Ub units in n-triUb and n-tetraUb, I considered the possible end effects attributed to the distal and proximal end of the Ub chain. I found that the amino acid substitutions at position 48 in the distal Ub of the Ub chain remotely affected the solvent exposure of the hydrophobic surfaces of the other Ub units through the competitive sharing of the hydrophobic surfaces among the Ub units. Thus, the mutational effect at the most distal Ub is allosterically transmitted to the remaining Ub units in a chain-reaction manner.

These results suggested that the Lys48-linked Ub chains may offer unique design frameworks for creating allosterically controllable multidomain proteins. For proof of this concept, I attempted to design artificial multidomain proteins based on the Lys48-linked diUb. I could construct environmentally responsive biosensing probes, in which Förster resonance energy transfer is enhanced in the closed state of Lys48-linked diUb. Furthermore, I designed cyclic multidomain proteins in which diUb is conjugated with another multidomain protein for controlling their domain rearrangements in environment-responsive manners.

This study provided a quantitative view of conformational interconversions of the Lys48-linked Ub chains in solution, offering new strategies for probing and manipulating the conformational dynamics of multidomain proteins.

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 Methanee HIRANYAKORN

論文題目 Characterization of conformational dynamics of Lys48-linked ubiquitin chains as design frameworks for creating allosterically controllable multidomain proteins

生体内におけるタンパク質の高度な機能は、多くの場合、2 つ以上のドメイン間の協調的な連携を通じて発揮されている。複数のドメインがリンカーで連結された多ドメインタンパク質では、それぞれのドメインの相対的な位置関係がダイナミックに変動し得る。さらに、こうした多ドメインタンパク質の動的構造は、pH や温度といった細胞内の様々な環境因子に影響され得る。そのため、生体内における多ドメインタンパク質の機能発現の分子メカニズムに関する理解を深めるためには、溶液中での分子構造の変化を定量的に評価することが必要である。本論文は、Lys48 結合型ユビキチン (Ub) 鎖をモデル系として動的構造研究を展開し、新規な多ドメインタンパク質の設計・創出に向けての基礎的検討を行った成果を記したものである。

第 1 章では、研究の背景と目的について以下の趣旨が述べられている。複数の Ub タンパク質がイソペプチド結合を介して連結したポリ Ub 鎖は標的タンパク質を修飾し、Ub 間の連結様式に応じて多様な細胞制御機能を発揮している。なかでも Lys48 結合型 Ub 鎖は、分子表面に露出した疎水性領域を介して様々なタンパク質と相互作用し、標的タンパク質の分解の目印として働いている。結晶構造によると、Lys48 結合型の Ub 鎖は、Ub ドメイン間の相互作用によって疎水性表面が遮られた閉じた構造をとることが多い。一方、出願者の所属する研究グループが以前に行った核磁気共鳴 (NMR) 研究では、Lys48 結合型 diUb は、疎水性面が溶媒に露出した開構造と遮蔽された閉構造の間の動的平衡状態にあることが見出されていた。

第 2 章では、出願者がこれまでの diUb の構造研究を発展させ、より複雑な Lys48 結合型 triUb および tetraUb 鎖の溶液中での構造動態を明らかにしたことが述べられている。まず、試験管内におけるユビキチン化反応のプロトコルを最適化し、安定同位体標識を施した一連の Lys48 結合型 Ub 鎖のネイティブ型と環状型を調製することに成功した。そして、それらの構造ダイナミクスを明らかにするために安定同位体標識技術を駆使した NMR 解析を行った。その結果、diUb とは対照的に、triUb と tetraUb では疎水表面に位置する残基が複数のピークを与えることを見出し、これに基づいて Ub ユニット間の局所環境の違いを探查することを着想した。これを実現するために、特定の Ub ユニットの安定同位体標識した triUb および tetraUb を用いてスペクトル解析を行い、これらの Ub 鎖を構成する個々の Ub ユニットが、開状態と閉状態の間を動的に遷移していることを明らかとした。さらに、単量体の Ub と環状型の diUb を参照分子とした比較 NMR 解析を行うことで、Ub 鎖の各 Ub ユニットの開状態と閉状態の割合を定量した。その結果、Ub 鎖のなかで標的タンパ

ク質から最も遠位にある Ub ユニットは、その疎水性表面が最も露出しやすいことが明らかとなり、Ub 鎖を認識するタンパク質との相互作用に優先的に関与している可能性が示された。さらに、最遠位に位置する Ub ユニットの Lys48 を他のアミノ酸に置換すると、当該 Ub ユニットのみならず、他の Ub ユニットの開状態と閉状態の割合にも影響を与えていることを見出した。このことは、Ub 鎖の構造動態を変異導入によってアロステリックに制御し得る可能性を示すものである。

続く第 3 章では、Ub を含む新規な多ドメインタンパク質の設計・創出の可能性を論じている。まず、Lys48 結合型 diUb の開構造と閉構造の遷移に伴って蛍光共鳴エネルギー移動の効率が変化するバイオセンサーを作出し、細胞内環境での応用可能性を検討している。さらに、Ub と他の多ドメインタンパク質を連結した人工分子を作出し、その動的構造を制御する可能性を探っている。

第 4 章では研究成果を総括するとともに、今後の研究の展望が述べられている。本研究は、Lys48 結合型ユビキチン鎖の溶液中での構造変換を定量的に明らかにし、多ドメインタンパク質の構造ダイナミクスを操作するための新しい戦略の基礎を示すものである。本研究を基盤とし、その成果をさらに発展させることで、細胞内で環境応答性を示すバイオセンサーの開発やアロステリック制御可能な多ドメインタンパク質の創出につながるものが展望としてまとめられている。

本研究を通じて得られた成果は、複雑な生命分子が高次機能を発現する分子基盤を与えるものであり、機能分子科学における高い学術的意義が認められる。出願者は主体的に研究に取り組み、本論文の成果は国際学術雑誌に報告されている。従って、本審査委員会は本論文が博士（理学）の授与に値すると全員一致で判断した。