The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	DETERMINATION OF THREE-DIMENSIONAL STRUCTURES OF POLYPEPTIDE IN SOLUTION BY 1H-NMR AND DISTANCE GEOMETRY
Author(s)	大久保, 忠恭
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1204
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【6】

氏名・(本籍)	大久保　忠　恭（おおくぼ　ただ　やす）
学位の種類	理　学　博　士
学位記番号	第　8332　号
学位授与の日付	昭和63年9月26日
学位授与の要件	理学研究科無機及び物理化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**^{1}H－NMRとディスタンスジオメトリー法を用いた溶液中のポリペプチドの三次元構造の決定**
論文審査委員	(主査) 教　授　京極　好正 (副査) 教　授　千原　秀昭　　教　授　桑田　敬治

論文内容の要旨

溶液中でのポリペプチドの構造を知る事は，その機能を理解する上で不可欠である。本研究は，^{1}H－NMR測定より得られるNOEのデーターとディスタンスジオメトリー法を組み合わせたポリペプチドの溶液中での新しい立体構造決定法の確立とその応用を目的としている。

第一章では本方法を耐熱性エンテロトキシンの14残基よりなる合成短鎖ペプチドアナログ（STh［6－19］）に適用し構造決定を行った。2次元NMR法のCOSYとNOESYを測定し連続帰属法によりN末端2ケのCys残基を除く全てのピークの帰属を行った。この帰属をもとにNOESYスペクトルよりNOEを同定し，DADAS法により溶液構造を得た。NOEの強度を距離の制限に翻訳する際に分子内運動を考慮して3つの方法を試みたが，得られた構造の収束具合と与えられた制限を満たす度合を比較した結果，NOEに対して5Aの閾値を設定する方法が妥当であることを明らかにした。STh［6－19］）の溶液構造は9番目から19番目の残基の間が3個のターン構造よりなる円柱状の構造に収束した。これは溶液中でポリペプチドの構造が決定された最初の例である。第二章では13残基よりなる神経毒コノトキシンGIの溶液構造を決定しその構造活性相関を追求した。2次元スペクトルの分解能の向上のため純位相2次元NMR法を導入し，観測可能な全てのピークの帰属を行った。コノトキシンGIの構造は11番目のTyr残基を中心としたC末端部分の構造が違う二種類の構造に収束した。そのうち一種類のコンホーマは芳香環と正電荷の配置が他の神経毒で活性発現に必須であると考えられている配置と一致し，コノトキシンGIが同様の活性発現機構を有する可能性が示された。第3章では現在使われている3つの代表的なディスタンスジオメトリーのプログラムDISGEO，DADAS，CHARMMの同一の入力データーによる比較検討を行い各方法の信頼性と限界を調べた。入力データーはコノ

トキシンＧＩのＮＯＥデーターと74残基の蛋白質テンダミスタットのＸ線構造より作り出した疑似ＮＯＥデータを用いた。得られた結果から各方法とも与えられた距離の制限を同程度に満たす能力のある事が示された。しかし，複雑な構造をした分子に対してＣＨＡＲＭＭ法は局所極小の問題から実用的でないことを明らかにした。またＤＩＳＧＥＯ構造が許容構造の全てを網羅していないことも明らかにした。

論文の審査結果の要旨

蛋白質の働きを理解するには，立体構造の情報を欠くことはできない。従来蛋白質の立体構造の情報はＸ線結晶解析の結果のみによっていた。しかし，活性を示すのは溶液やそれに近い状態であるので，溶液中の蛋白質の立体構造を決めることが望まれる。大久保君は高分解能ＮＭＲの解析で得られる蛋白質分子中のプロトン間の距離の情報をもとにしてディスタンスジオメトリー法を適用して立体構造を組み立てる方法を開発し，これを生理活性ペプチド・エンテロトキシンアナログとコノトキシンＧＩに適用した。

構造決定の手順は２次元ＮＭＲを測定してスピンスピン相互作用のパターンと核オーバーハウザー効果（ＮＯＥ）の現れ方を利用して，観測されるプロトンシグナルを各残基の各プロトンに帰属する。次にこのＮＯＥを原子間距離に換算する。この際原子間距離が固定されている場合と，揺れ動いて平均的なＮＯＥを見ている場合とに分けてＮＯＥと距離の換算を行うことを工夫した。得られた距離の情報を許容される原子間距離の上限に置き換え，下限は，原子半径の和とする範囲内で許される構造を求めた。そのためにはある段階での構造の原子間距離と実験的に求めた距離の差の２乗和をターゲット関数として，２面角を変えながらそれを最小にするという方法をとった。何個かの任意の初期構造から出発して大体同じ構造に収束するのを見届けその中で最もファンデルワールス半径の接触が無理のない構造を一番尤もらしい構造とした。データーの互いのバラツキの程度は平均二乗偏差で示される。

さらにこの方法の妥当性を検討するためにＸ線解析で構造の決められたアミノ酸残基数74の蛋白質の構造にＨの位置を仮想的に置き，非結合距離の情報を400個与えてどの程度Ｘ線解析の構造を再限するか試みた。その結果３種の提出された手法の中では彼の方法が一番平均的に真の構造のまわりにばらつき，系統的な誤差が少ないことを示した。

以上大久保君の研究はＮＭＲのデータから溶液中の小蛋白質の立体構造を決めるという手法を開発しその妥当性を検討した点は今後の蛋白質の構造，機能の研究に与える影響は大きく理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。