

Title	Complete Assignment of Proton, Carbon 13, and Nitrogen 15 Resonance Peaks in Large Proteins with Three-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
Author(s)	山崎, 俊夫
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38444">https://hdl.handle.net/11094/38444</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏 名	山 崎 俊 夫
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 0 4 3 4 号
学位授与年月日	平成 4 年 10 月 6 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Complete Assignment of Proton, Carbon13, and Nitrogen15 Resonance Peaks in Large Proteins with Three-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (三次元核磁気共鳴法を用いた、高分子量タンパク質の $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 共鳴ピークの完全帰属)
論文審査委員	(主査) 教授 京極 好正 (副査) 教授 鈴木晋一郎 教授 桑田 敬治 助教授 中村 巨男

### 論 文 内 容 の 要 旨

NMR 分光法により、タンパク質中の原子核のそれぞれの環境および位置関係を独立に観測する事ができる。それによりタンパク質の構造決定、基質などとの相互作用の原子分解能での観測を行うことができる。しかしそれらは核磁気共鳴ピークをそれぞれの原子核に帰属することなしには得られない。

分子量、1万以下の低分子量のタンパク質では  $^1\text{H}$  の帰属法は確立している。分子量が大きくなると共鳴ピークの数が増すこと、線幅が増すこと等により、急激に困難になってくる。

近年の NMR 分光法の発展、主に異種核 3次元 NMR により、その限界が大幅に拡大された。異種核 3次元 NMR とは、従来の 2次元 NMR スペクトル上で重なり合っていて区別できない信号を、その注目する原子核に共有結合している炭素または窒素核の化学シフトでさらに展開して区別するものである。得られるスペクトルは 3次元周波数空間内のピークの集合である。

本論文では、その発展における筆者の貢献した部分とさらに全ての  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$  共鳴ピークの帰属への拡張について述べる。それらは 5つの独自に考案した実験法からなる。例として 155 残基からなるタンパク質 ribonuclease H (RNase H) の NMR 信号の帰属を行った。この酵素は RNA-DNA 二本鎖の RNA 鎖を切断する。

1,  $\alpha$  位の  $^1\text{H}$  は隣合う残基との結合情報を得るための重要な核である。従来の 2次元 NMR では残基内の結合情報を得るために TOCSY, 隣接残基間の結合情報を得るために NOESY と呼ばれる実験をする。これらの共鳴ピークの重なりを分解するために均一に  $^{13}\text{C}$  で標識されたタンパク質試料を用いて、 $\alpha$  位の炭素核の共鳴周波数で再分解することを目的に新しい実験法を開発した。それらを 3D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  HMQC-TOCSY および 3D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  HMQC-NOESY と呼ぶ。名前の意味は次元数, 展開する核種, 組み合わせられた 2次元 NMR のパルス列の名前である。

2, 隣接残基のアミド水素の間の結合情報 (距離が短いこと) も化学シフトの重なりでその情報がしばしば失われる。この場合 1つのアミド窒素による再展開では分離できない。

ここで新しい周波数軸, 2つのアミド窒素の化学シフトの差, を導入する。これを化学シフト差 3D  $^1\text{H}$ - $\delta^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HNQC-NOESY-HMQC と呼ぶ。この実験, 上記の 2つ, および既に発表されていた 3D  $^{15}\text{N}$  NMR の組み合わせに

よって、RNase Hの主鎖の原子核由来の共鳴ピークを全て帰属することに成功した。

- 3, メチレン基の対の陽子と $^{13}\text{C}$ 核の3つの化学シフトで展開する3次元 NMR を新しく考案した。これにより常にピークの線幅が広く、感度が悪く、重なり易いメチレン基の共鳴ピークが完全に同定されるようになった。3D HCH と呼ぶ。
- 4, 水素が付いてない原子の帰属のために、共有結合でつながれた3つの原子核の化学シフトで展開する3次元 NMR を側鎖の様々な場所に用いた。3D X-Y $^1\text{H}$  HSQC/HSQC と呼ぶ。ここで X および Y は $^{13}\text{C}$ または $^{15}\text{N}$ である。
- 5, 上記の特別な場合で両方とも $^{13}\text{C}$ の場合、別の新しい実験法が必要である。それは3D HQC/homoSQC と呼ばれる。上記3つと、既に発表されている炭化水素鎖をつなぐ実験法 3D HCCH-COSY, 3D HCCH-TOCSY の組み合わせにより、全ての種類の側鎖の原子核を帰属する方法を確立し、大部分の信号を帰属した。

この酵素は NMR で独立に観測できる2012の水素、炭素、窒素原子をもつ。この中で、1918の信号を帰属した。主鎖の帰属をもとに、水溶液中の構造決定、基質 (DNA-RNA),  $\text{Mg}^{2+}$  の結合部位の決定などが筆者と共同研究者によって行われた。

### 論文審査の結果の要旨

アミノ酸残基数が100個を越えるような蛋白質の構造を NMR で解析したいと思っても、シグナルの重りが激しく、どのシグナルかどの核に由来するかを決める帰属が行えない。山崎君はこの問題を、蛋白質を $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ で標識し、3次元 NMR を適用することで解決した。実例としてアミノ酸残基155から成るリボヌクレアーゼHに適用し、1962個の水素、炭素、窒素核のうち1918個のシグナルを同定した。このような手法の開発は溶液中の蛋白質の構造解析の適用できる範囲を著しく広げたものであり、博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。