The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Mapping of cyclosporin A binding sites in cyclophilin A by using synthetic peptides
Author(s)	山本, 克己
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40297
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 48 】

氏　　名	山本克己（やまもとかつみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　12707　号
学位授与年月日	平成 8 年 9 月 30 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	Mapping of cyclosporin A binding sites in cyclophilin A by using synthetic peptides （合成ペプチドをもちいるシクロフィリンAのシクロスポリンA結合部位のマッピング）
論文審査委員	（主査） 教授　米田　悦啓 （副査） 教授　谷口　直之　　教授　三木　直正

論文内容の要旨

［目的］ 生体内には免疫抑制剤シクロスポリンA（CsA）と特異的かつ高親和性で結合する一群のタンパク質が存在し，これらはシクロフィリン（CyP）と呼ばれている。CyP は細胞質タンパク質で，現在では CsA の細胞内レセプターと考えられており，CsA の薬理作用発現における CsA-CyP 複合体の形成の重要性が認識されてきた。この CsA-CyP 複合体については，その立体構造ならびに CyP 分子中の CsA 結合部位に関し，NMR および X-RAY 解析法をもちいた研究がいくつか報告されている。本研究では，抗体のエピトープ検索にもちいられるマルチピンペプチド合成法を応用し，ヒト CyPA 全分子にまたがる連続的なオクタペプチド157種を合成し，これらをもちいてヒト CyPA の CsA 結合部位を明らかにすることを目的とした。

［方法］ 合成の対象となるヒト CyPA アミノ酸配列に対応する部分ペプチドはアミノ酸 8 残基単位とし，Labsystems Epiguide synthesizer（Coselco Mimotopes Pty Ltd., Clayton, Australia）をもちいるマルチピン固相同時合成システムによりおこなった。すなわち，ヒト CyPA を構成する164残基のアミノ酸配列について 1 残基ずつずらした重複・連続する157種の N^{α}-アセチル化オクタペプチドを一枚のプレート上に固定したポリエチレンピン上で同時に合成した。各ピン上のペプチドの収量は30-100 nM であった。合成オクタペプチドと CsA の結合は ELISA 法に準じる方法で測定した。すなわち，各ピンに結合した157種の N^{α}-アセチル化オクタペプチドに CsA（4 ng/pin）を直接反応させ，ピンを洗浄後，ヒツジ抗 CsA 血清を添加し，オクタペプチドに結合した CsA と反応後，ペルオキシダーゼ標識ロバ抗ヒツジ IgG（H+L）血清，ついで *O*-フェニレンジアミンを添加，反応させ，492 nm における吸光度を測定した。

［成績］ ピン固定 N^{α}-アセチル化オクタペプチドと CsA の結合が ELISA 法に準じた本研究の方法により特異的に検出できることを確認した。作製した157種のオクタペプチドのうち43種について CsA との結合が確認され，その中35種のペプチドが特に強い CsA 結合能を示した。既報の NMR および X-RAY 解析法による CyPA-CsA 複合体の立体構造解析の結果は，CyPA 分子中13のアミノ酸残基が CsA との結合に関与することを示したが，その中，9 残基は本研究で示した CsA 結合能をもつ合成オクタペプチド中に含まれていた。一方，4 残基については，本研究において CsA 結合能を認めた合成オクタペプチドのいずれにも含まれていなかった。また逆に，CsA 結合能が検出された合成

オクタペプチドのうち，N端アミノ酸残基がGly-42～Ser-51，Ile-89～Leu-98，Val-127～Ile-138およびArg-144～Ala-159の領域内にあるオクタペプチドのアミノ酸配列中には，NMRおよびX-RAY解析法により結合に関与すると認められたいずれのアミノ酸残基も含まれておらず，本研究の結果はCyPA分子中のCsA結合部位に関する新しい知見を提供した。

[総括]　ヒトCyPA分子中のCsA結合部位の解析を目的として，まず，ヒトCyPAの全アミノ酸配列に対応し，1残基ずつずらした重複・連続する157種のN^{α}-アセチル化オクタペプチドをマルチピン固相同時合成システムにより合成した。ついで，これらペプチドのCsA結合能をELISA法に準じて測定する新しい方法を確立し，本法が，合成N^{α}-アセチル化オクタペプチドとCsAの結合を特異的に検出し得ることを証明した。さらに，NMRおよびX-RAY解析法における分子立体構造解析による結合部位推定法の結果と異なる新しい知見をえた。本研究の連続合成オクタペプチドをもちいるCyPA分子中のCsA結合部位の新しい解析法は，リガンド結合部位解析法として従来からもちいられてきたNMRおよびX-RAY解析法とは全く異なる手法であり，これらの解析法に対し，相補的に有効な方法であることを証明した。

論文審査の結果の要旨

本研究は，免疫抑制剤シクロスポリンA（CsA）の細胞内レセプターとされているヒトシクロフィリンA（hCyPA）分子中のCsA結合部位を，合成ペプチドを用いる免疫化学的手法を用いて解析したものである。すなわち，マルチピン固相同時合成システムにより作製したhCyPA全分子にまたがる連続的な157種のN^{α}-アセチル化オクタペプチドのCsAへの結合性を，新たに確立したELISA法に準じる方法を用いて直接的かつ特異的に調べることにより，hCyPAのCsA結合部位を解析した。

その結果，hCyPA分子中のCsA結合部位と推定される領域を明らかにするとともに，従来のX線およびNMR解析法による結合部位推定法とは異なる新しい知見を得た。さらに，本研究の連続合成オクタペプチドを用いるhCyPA分子中のCsA結合部位の解析法は，リガンド結合部位解析法として従来から用いられてきたX線およびNMR解析法とは全く異なる新しい手法であり，これらの方法に対し，相補的に有効な方法であることが証明された。以上より，本論文は学位の授与に値すると考えられる。