

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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 本 克 己 <small>やま もと かつ み</small>
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 7 0 7 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づ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。