



| | |
|--------------|---|
| Title | Development of Segmental Isotope Labeling Method for Protein NMR and Application to Inhibitor of Caspase-Activated DNase |
| Author(s) | 大友, 崇紀 |
| Citation | 大阪大学, 2001, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/42512 |
| 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

| | |
|------------|--|
| 氏名 | 大友 崇紀 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(理学) |
| 学位記番号 | 第 15978 号 |
| 学位授与年月日 | 平成13年3月23日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻 |
| 学位論文名 | Development of Segmental Isotope Labeling Method for Protein NMR and Application to Inhibitor of Caspase-Activated DNase (NMR のための蛋白質区分安定同位体標識法の開発および ICAD 蛋白質への応用) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 阿久津秀雄 |
| | (副査) 教授 後藤 祐児 教授 中村 春木 助教授 山崎 俊夫 |

論文内容の要旨

これまで蛋白質の NMR 解析では分子量の大きい蛋白質は難しいとされてきた。その理由としては、分子が大きくなるにつれ、その回転運動が遅くなるために横磁化の緩和が速くなることによりシグナルの線幅が広くなり、さらには観測できなくなることが最大の理由であった。この問題は蛋白質の重水素化や TROSY とよばれる新しい NMR 実験法により近年改善されてきた。しかし大きい蛋白質の解析にあたっては、さらにシグナルの重なりという問題がある。重なりによってそのシグナルの帰属が曖昧になったり、わからないといった状況であると解析が困難になる。筆者はこの問題を解決するため、スペクトル上の観測されるシグナルを減らし、確実にシグナルの帰属が可能となる方法を開発した。そのためには以下で述べるような方法で蛋白質のアミノ酸配列にそって、ある区分のみを NMR で観測可能な安定同位体で標識し、その試料をもちいて従来の NMR 実験をおこなうことがもっとも良い方法であると考えた。

蛋白質のある区分を標識するための方法として、インテインと呼ばれる蛋白質をもちいて異なる安定同位体で標識された目的の蛋白質の断片を試験管内で結合させた。インテインはある遺伝子の間に割り込む形で自身の遺伝子が挟まっており、転写、翻訳時にはそのホストの遺伝子産物に挟まつたままの形で蛋白質になる。インテインは翻訳後にホストの蛋白質から抜け出しが、このとき分断されていたホストの蛋白質をペプチド結合で結合させる活性をもっている。この活性を利用して目的蛋白質の断片を結合させる。

目的蛋白質とインテインを N、C 末端の二つの断片にわけ、その N 末端側のもの同士を融合させたものを融合蛋白質として発現させ、同様に作成した C 末端側の蛋白質と変性した状態で混合する。これをリフォールドさせ熱をかけることによってインテインの反応をおこさせて目的蛋白質を結合させた。断片の片方を安定同位体で標識しておくことによって目的蛋白質の片方の区分のみを標識することができる。実際この方法で標識した試料を NMR により測定するとシグナルの位置は一様に標識した試料のものと一致し、立体構造には変化がないことが確認された。また得られたスペクトルではシグナルの数が減少しておりはっきりとした帰属ができることが示された。

この方法が新規の蛋白質の構造解析において有用であることを示すため、331アミノ酸残基からなる ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) 蛋白質の構造解析に適用した。一様に標識した ICAD 蛋白質のスペクトルではシグナルの重なりが激しかったが、2つの区分に分けて標識することでスペクトルの質を改善することに成功し、従来の連鎖帰属とよばれる方法をもちいて効率よく主鎖原子の帰属を完了、さらに各原子核の化学シフト値をもちい

て2次構造を決定することに成功した。

このように本方法の優れているところは、本方法により作成した試料はNMRの全ての測定方法をそのまま適用できるところにあり、今後大きな蛋白質のNMRによる解析において効果を発揮することが期待できる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、蛋白質のNMRによる構造解析における問題点の一つであったNMRシグナルの重なりを解決する方法の開発を行い、その応用によりその有効性を確認したものである。目的の蛋白質を2つまたは3つの区分にわけ、それぞれをインテインと呼ばれる蛋白質を用いて、試験管内で結合させた。これにより分けられた区分のみをNMRで観測可能な安定同位体で標識しておくことにより最終的なNMR試料の1区分のみを観測できるようになった。この方法をICAD蛋白質の構造解析に利用し、これによって効率よく解析が可能であることを示した。

これら一連の研究は、NMRをもちいた蛋白質構造解析に新たな進展をもたらしたものである。よって、本論文は、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。