The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Protein Structure Modeling using Chemical Shifts and Residual Dipolar Coupling Homology, in the Context of an Integrated Software System for Spectral Processing and Analysis
Author(s)	Frank, Delaglio
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43250
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

【8】

氏　　名	Frank（フランク）　Delaglio（デラグリオ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学 位 記 番 号	第　16589　号
学位授与年月日	平成13年11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	Protein Structure Modeling using Chemical Shifts and Residual Dipolar Coupling Homology, in the Context of an Integrated Software System for Spectral Processing and Analysis （化学シフトと残余双極子結合の相同性を利用したタンパク質構造モデリングシステムの開発…NMR スペクトル処理・解析ソフトウェアへの統合にむけて）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　小林　祐次 （副査） 教　授　高木　達也　　教　授　中村　春木　　教　授　阿久津秀雄

論 文 内 容 の 要 旨

本論文では全く新しいNMRを用いたタンパク質の構造計算法について述べる。これは、プロテインデータバンクに登録されている立体構造のフラグメントから、対象タンパク質において観測された残余双極子カップリング値と化学シフト値をもっともよく再現するフラグメントを検索し、それらを用いて全体の構造を構築することができるという考えに基づいている。この方法は主鎖のϕ角およびψ角の予測、配向テンソルの見積り、構造相同性検索等、様々な応用が可能である。ユビキチンへの適用結果では、NOE等の距離情報を全く用いることなく結晶構造との主鎖のRMSDが1.5Å以内である構造が得られた。また本法は隣接残基間NOEや水素結合といった容易に得られる情報と組み合わせて用いることもできる。本法は先に著者らが開発したTALOSシステムを土台としている。TALOSは標的タンパク質の化学シフトをデータベースに収められた20個のタンパク質の高分解能立体構造及び化学シフトと比較することによって、そのタンパク質の主鎖二面角を予測するプログラムである。

本研究はNMRを用いた構造決定の全段階について完全かつ簡便で強力なソフトウエアシステムを開発するための研究の一環である。開発したソフトウエアは現在までに500以上の生体高分子の構造解析に用いられている。初期のNMRによるタンパク質の構造解析は、2D-NOESYスペクトルから出来るだけ多くの近接プロトン間距離情報を収集することに頼っていた。これはJカップリング、化学シフトといったNOE以外の構造情報を追加することによって補強されてきた。ここで大切なのは、これらの方法論的な進歩は対応する計算方法、ソフトウエアの進歩無しでは実現しなかったということである。本論文では生体高分子を対象とした多次元NMR法の発展と、それに伴って生じた解析上の問題をとりあげ、それらの問題に対応するために著者が開発したいくつかのソフトウエアについて述べる。以下に章ごとの要約を示す。

第1章ではNMRPipeシステムについて述べる。これは本研究で開発した全てのソフトウエアの基盤となるものである。NMRPipeはUNIX上でのデータ処理・表示・解析のためのツール群であり、ルーチン的な処理と研究を指向した多次元処理の両方に対応するよう設計した。また将来予想される拡張に備えたものとした。本システムはUNIXのパイプ機能を用いて実装されている。これは並行して実行されているプログラム間でのデータの受け渡しを可能としている。ある一連の処理において、スペクトルデータは、フーリエ変換やリニアプレディクションといった個々の処理を担当するプログラムが連結されたパイプラインを流れる。このようなパイプライン型のシステムにはいくつかの大きな利点がある。それらは高い柔軟性、処理速度、異なるデータフォーマットへの対応、プログラムの

開発と保守の容易さ、マルチプロセッサー及びネットワーク上での分散処理が可能であること、などである。またTcl/Tkスクリプティング言語の使用によってNMRPipeシステムをカスタマイズする手法や、様々なNMRデータに対して対話的あるいは自動的な処理システムを構築する手段について記述した。

第2章ではスペクトルを用いた計測の一例について述べる。これはスペクトル処理、表示および解析手法の組み合わせであり、NMRPipeシステムの理想的な利用例である。ここでは通常のCOSYスペクトルにおいて、マルチプレットピークをフィッティングすることによってプロトン間のカップリングを決定できることを示すことができた。この手法の頑強性と簡便性は、フィッティングにおいてピーク強度が独立変数ではないことによっており、たとえマルチプレットが分離していないピークからでも正確なカップリングを求めることが可能となった。

第3章ではタンパク質主鎖の二面角を化学シフトから定量的に予測する手法について述べる。これは高分解能のX線結晶構造が得られている20個のタンパク質の$^{13}C\alpha$, $^{13}C\beta$, $^{13}C'$, $^{1}H\alpha$および^{15}Nの化学シフトデータベースを利用する。プログラムTALOSではデータベースを検索し、2次構造によるケミカルシフトのずれ値とアミノ酸配列の双方ともが目的配列のそれらと近い3残基からなるフラグメントを10個抽出するように設計した。既に構造が決定されているタンパク質についてのテスト結果では、TALOSの出力値と構造から得られた主鎖の二面角とのRMSDは15度であった。TALOSはあるタンパク質についてその約65%の残基について主鎖の二面角を予想することができ、予想値が大きく間違っているのはその中のわずか3%であった。ここでは更にTALOS法を発展させ、データベースを用いてタンパク質の主鎖二面角の値から逆に化学シフトを与える関数を作り出すことができた。これは2次構造に基づいて化学シフトを予測するために使うことができる。

第4章ではタンパク質主鎖の立体構造を決定する新手法と、それをユビキチンに適用した例について述べる。希薄な液晶相で弱く配向したタンパク質分子では、核間ベクトルの方向に関する情報を与える双極子カップリングを多く観測することができる。まず第一段階として、観測された双極子カップリング及び化学シフト値を再現できるようなフラグメントをプロテインデータバンク中から検索する。これによって目的タンパク質中の対応するフラグメントと主鎖の二面角のRMSDが10-12度程度であり構造相同性が良いフラグメントが得られる。続いてそれらを初期構造とした最小化法によって双極子カップリングの全ての予測値と実測値が一致するように構造を改良する。ユビキチンの場合、二つの異なる液晶相で測定した双極子カップリングのデータセットが利用でき、その結果NOE、水素結合等の距離情報を全く用いることなく結晶構造との主鎖のRMSDが1.5Å以内である構造を得ることができた。

論文審査の結果の要旨

蛋白質のNMRによる構造決定は初期には核オーバーハウザー効果（NOE）と呼ばれる双極子－双極子相互作用から得られる近接したプロトン間の距離情報を用いて行なわれてきた。その後、スピン－スピン結合定数や化学シフトといったNOE以外の距離情報を構造計算に取りこむようになった。本論文ではUNIX上でのデータ処理、表示、解析のためのツール群をパイプライン型のシステムに統合し、NMRデータに対して対話的あるいは自動的な処理システムNMRpipeを構築した。次にそのシステムの応用例としてCOSYシステムのマルチプレットピークからプロトン間スピン－スピン結合定数を決定する方法を示した。さらに蛋白質の主鎖二面角を化学シフトから予測する手法を提唱し、プログラムTALOSを構築した。これらに加え、全く新しい蛋白質の構造計算法としてプロテインデータバンクに登録されている立体構造のフラグメントから、対象とする蛋白質において観測される残余双極子カップリング値と化学シフト値を再現するフラグメントを検索し、それらを用いて全体の構造を構築する手法を提唱した。この手法を実現するために残余双極子カップリングを多く観測できる希薄な液晶相により蛋白質を配向させることを提案した。この手法により従来のNOEなどから得た近距離の制限に対し、構造決定に非常に有効な長距離の制限を加えることを可能とした。本論文でユビキチンを用いて、以上の手法の有用性を実証した。これらのDelaglio君の研究結果は既に世界的に広く実用に供され蛋白質科学に大きく貢献していて、博士（薬学）の博士論文として価値あるものと認める。