



Title	Structural analysis of biological ligands by high resolution solid-state NMR
Author(s)	戸所, 泰人
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47703
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	戸 所	と	やす	と
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)			
学 位 記 番 号	第 2 0 6 7 5 号			
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 9 月 27 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	Structural analysis of biological ligands by high resolution solid-state NMR (高分解能固体 NMR による生物リガンドの構造解析)			
論 文 審 査 委 員	(主査)			
	教 授 阿久津秀雄			
	(副査)			
	教 授 相本 三郎	教 授 後藤 祐児	助教授 藤原 敏道	

論 文 内 容 の 要 旨

今日、蛋白質の構造決定において X 線結晶解析や溶液 NMR 法といった方法がよく用いられている。しかし、ほとんどが可溶性蛋白質で、全蛋白質の約 3 割、創薬のターゲットとしては 7 割にも及ぶ膜蛋白質の構造決定に非常に遅れている。それは、膜蛋白質の発現、精製の困難さに加え、X 線構造解析においては結晶化、溶液 NMR 法では可溶化あるいは分子量が大きくなることによる測定の難しさが障害となっている。そこで、X 線、溶液 NMR 構造解析では決定しにくい脂質二重膜に結合したペプチド、巨大蛋白質に結合したヌクレオチドについて、高分解能固体 NMR 法を用いて構造解析を行なった。

スズメバチの毒液から抽出されたアミノ酸 14 残基からなる両親媒性ペプチド、マストパラン X (MP-X) について、シグナル帰属と構造解析を行なった。MP-X は生体膜上の G タンパク質を活性化する。その活性化機構はレセプターによるものと似通っており、MP-X はレセプターのよい低分子モデルとなると考えている。大腸菌を用いて生合成した ^{13}C 、 ^{15}N 均一同位体標識 MP-X を擬似膜内環境であるメタノール溶媒中から固化し、固体試料とした。この MP-X について、残基内の C-C、N-C $^{\alpha}$ C $^{\beta}$ 、C'-C $^{\alpha}$ -C $^{\beta}$ 相関、残基間の C $^{\alpha}$ -C $^{\alpha}$ 、N-C $^{\alpha}$ 、N-C'-C $^{\alpha}$ 相関の 2 次元あるいは 3 次元 NMR 法を用いて ^{13}C 、 ^{15}N を完全に帰属した。その化学シフト値から TALOS により二面角を予測し、二次構造を解析した。

リン脂質二重膜と強く結合した MP-X の構造を、化学シフト値からの予測した二面角と正確に測定した距離の 2 種類の情報から決定した。MP-X は膜結合状態で G 蛋白質活性化能が向上することが報告されており、膜結合状態の構造を知ることは重要である。MP-X を DPPC・DPPG からなるリン脂質二重膜に結合させたものを固体 NMR 測定試料とした。前述の 2 次元あるいは 3 次元 NMR 法を用いて ^{13}C 、 ^{15}N を完全に帰属した。 ^{13}C 選択標識 2 種類および ^{13}C 、 ^{15}N 選択標識 3 種類の MP-X をペプチド固相合成し、その核間距離を測定した。 ^{13}C - ^{13}C 間については回転共鳴法 (RR) を、 ^{13}C - ^{15}N 間について回転エコー二重共鳴法 (REDOR) を用いて核間距離を求めた。以上得られた 5 つの距離と 26 の角度を用いて CYANA で構造計算を行い、膜結合の MP-X の構造を決定した。膜結合 MP-X は溶液 NMR により得られた構造とよく似た Trp3 から C 末端の Leu14 まで α ヘリックス構造をとり、N 末端が伸びた構造をとることがわかった。

好熱性細菌 PS-3 の $F_1(TF_1)\beta$ サブユニットに結合した『基質としての ATP』の構造を決定した。 F_1F_0 -ATP 合成酵素の膜表在性ドメイン (F_1) は、ATP の合成・分解の触媒活性中心をもち、さらに、その F_1 部分は、それ単独で強い ATP 加水分解活性をもっている。複合体中の ATP の糖環内とアデニン内の ^{13}C - ^{13}C 相関および ^{15}N - ^{13}C 相関を観測することで、 ^{13}C 、 ^{15}N 完全標識した ATP の ^{13}C および ^{15}N シグナルを自己完結的に帰属することができた。その化学シフト値から複合体中の ATP の糖環の構造、 $\text{C}4'-\text{C}5'$ 周りのねじれ角が予測できた。また、リン酸基の 3 つの ^{31}P もすべて帰属し、リン酸基のねじれ角もわかった。 $\text{C}8-\text{C}5'$ の距離を RR 法により測定することで、グリコシル結合回りの配向もわかった。これらの情報から $TF_1\beta$ サブユニットに結合した ATP の構造を Xplor-NIH を用いて求めた。アデニン、糖環の構造は MF_1 結晶中の β サブユニットに結合した AMP-PNP とほぼ同一な構造をとっていた。リン酸基については、より伸びた構造をとり、 P^γ が求核的な水に近づいていた。

固体 NMR について高分解能を実現する多次元 NMR 法を開発した。そして、その方法を応用することで、溶液 NMR や X 線構造解析では得られなかった 2 種類の巨大分子に結合した基質の構造を解析することができた。この方法は X 線構造解析や溶液 NMR が苦手としている膜蛋白質や繊維状蛋白質などにも応用でき、生物学的に重要な構造情報も得ることができる。固体 NMR は対象について感度以外に分子量の上限などの制約がない。今後、さらに大きな分子に結合した基質あるいは巨大な分子自身の構造解析などへの応用を期待できる。

論文審査の結果の要旨

本学位論文では X 線、溶液 NMR 構造解析では取り扱いが困難な脂質二重膜に結合したペプチド、巨大蛋白質に結合したヌクレオチドについて、高分解能固体 NMR 法を用いて構造解析を行なっている。スズメバチの毒液から抽出されたマストバラン X (MP-X) は生体膜上の G タンパク質を活性化する。その活性化機構はレセプターによるものと似通っており、MP-X はレセプターのよい低分子モデルとなると考えている。本学位論文では大腸菌を用いて生合成した ^{13}C 、 ^{15}N 均一同位体標識 MP-X、および選択的同位体標識 MP-X について固体およびリン脂質二重膜と強く結合した状態での構造を固体高分解能 NMR で解析し、後者についてはその精密構造を決定した。これは MP-X による G 蛋白質活性化機構解明への重要な一歩である。さらに、申請者は受容体リガンドのモデルとして ATP 合成酵素 $F_1\beta$ サブユニットに結合した ATP の構造を固体高分解能 NMR により決定した。これは結晶構造で知られていた ATP アナログの構造とは異なり、より活性状態に近い構造であることが示唆された。 β サブユニットは分子量 5 万 2 千の大きな蛋白質であり、このよう蛋白質に結合したリガンドの構造決定が生物学的に大きなインパクトを持つ結果につながることを示した。

この研究の結果は生物学的にも重要な貢献であると同時に、これを通して開発された生物リガンドの構造解析法は今後膜受容体の研究や G 蛋白質活性化メカニズムの研究に重要な貢献をするものである。よって、本論文は理学博士の学位論文として十分な価値があるものと認める。