



Title	Solid-State High Resolution NMR Study on Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptides Bound to Phospholipid Membranes
Author(s)	小見, 伸泰
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48767
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	こ 小 見 のぶ やす 伸 泰
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 7 6 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科化学専攻
学 位 論 文 名	Solid-State High Resolution NMR Study on Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptides Bound to Phospholipid Membranes (リン脂質膜結合脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチドの固体高分解能 NMR 解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 中村 春木 (副査) 教 授 江口 太郎 教 授 水谷 泰久 招聘教授 阿久津秀雄

論 文 内 容 の 要 旨

導入

脳下垂体はホルモン分泌により恒常性を制御する組織で、視床下部は下垂体からのホルモン分泌を促進するホルモンを放出している。脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド (PACAP) はこのホルモンにあたる。PACAP 受容体は人やその他の生物の多くの組織に存在しており、効果も多岐にわたるので生理機能の制御に重要な役割を果たしていると考えられている。近年 NOE と呼ばれる手法で受容体や DPC ミセルに結合した PACAP の構造が解析され、その結果を基に、PACAP は脂質膜に結合した状態を経て受容体に認識されるというモデルが提唱された。これにより脂質膜に結合した安定な PACAP の構造を知ることが重要であるとわかる。しかし、膜や受容体に結合したペプチドは良質の結晶を得ることができず X 線回折による構造解析は困難である。溶液 NMR でも作用する側の受容体分子量の制限により受容体に結合した状態の測定が困難であった。この問題を解決するためには固体 NMR による解析が適切である。実際、我々の研究室では固体 NMR を用いた生体分子の構造決定を行っている。PACAP は比較的分子量が小さく同位体標識すれば膜に結合した状態を直接に固体 NMR でも観測できると期待される。本学位論文ではこのような状況を踏まえ固体 NMR を用い脂質膜結合 PACAP の二次構造解析を行った。

実験

固体高分解能スペクトルの測定には 2 つの異なる核間で磁化移動を行わせる CP 法、静磁場に対して 57.4° 傾け回転させ試料内の磁気異方性等を取り除く MAS 法、MAS の回転に同期させたラジオ波照射により磁化を移動させる DARR、SPC5、RFDR 法を併せて用いた。経験的データベースに基づく構造予測ソフト TALOS を用いて、固体 NMR で帰属した信号の値からペプチドのとりコンフォメーションを予測した。

結果

PACAP21 および PACAP27 の残基内 ^{13}C - ^{13}C 相関スペクトルから側鎖の化学構造に因る経験的データをもとにアミノ酸毎に帰属を行った。図 1a、1b はそれぞれ PACAP27、PACAP21 の残基内相関スペクトルである。次に残基間 ^{13}C - ^{15}N 、 ^{13}C - ^{13}C 相関スペクトルを測定して連鎖帰属を行った。

帰属した化学シフト値を基に TALOS で予測した結果 N 末端付近に構造の乱れがあるが PACAP は全長にわたり β

構造をとっていることが明らかになった。逆に構造から化学シフト値を予測したシミュレーションスペクトルと残基間 ^{13}C - ^{13}C 相関スペクトルが一致することも確かめた。

また、PACAP27 と脂質膜の結合していることを確かめるため COXSHD 測定を行った。その結果脂質の親水性、疎水性部分共にペプチドへの磁化移動を確認した。特に脂質疎水性部分からの磁化移動で PACAP 疎水性残基側鎖のシグナルが増加していたため PACAP27 は中性脂質膜と疎水相互作用で結

合していることが分かった。脂質膜に結合した状態の PACAP21 及び PACAP27 は全長にわたり β 構造をとっているが、ペプチド単体で β 構造をとるとは考えにくい。サンプル中の脂質に吸着したペプチド量も溶液 NMR 条件下に比べて過剰であるのでペプチド同士の相互作用により β 構造が形成されている可能性がある。

これを調べるため脂質に対しペプチド量を減らした試料を調製し測定した。ここでは共鳴線が先鋭化したピークも観測された。しかし、ペプチドがコンフォメーション変化を起こしたと思われるシフトは観測されなかった。このことから希釈したサンプルではペプチドの会合が起こりにくく強制的なペプチド間相互作用が取り除かれたといえる。したがって、膜結合 PACAP の β 構造は本来の状態を反映している。長距離磁化移動測定では 6.5 Å 以内に 4-7 又は 4-19 残基の相関ピークが観測された。PACAP は全長にわたり β 構造をとっているためこれは分子間の相関に由来すると結論した。

考察

PACAP の固体 NMR スペクトルの線幅は比較的広いため予測された構造に対する線幅の影響を調べた。入力に用いた値に線幅分増減させた値で構造予測を行ったがヘリックス構造であるという予測が優勢にはならなかった。PACAP21 は全長にわたり β 構造をとり両末端同士の相関ピークが観測されたことから少なくとも 2 量体で逆平行の β 構造をとっていると説明できる。PACAP27 の膜結合構造はミセル結合構造とは異なる。したがって PACAP は相互作用する相手によりコンフォメーションを変化させたことが示された。

論文審査の結果の要旨

学位申請者は、脂質膜に結合した脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド (PACAP) の構造を固体高分解能 NMR により解析した。PACAP は脳下垂体ホルモンで、その受容体はヒトなどの高等生物の多くの組織に存在して生理機能の制御に重要な役割を果たしている。PACAP の受容体への結合には、生体膜が関与しているとのモデルが提出されている。したがって、受容体による認識においては膜結合構造が重要であるが、結晶化が困難なためこれを決定するのは難しかった。研究には、 ^{13}C 、 ^{15}N 標識した 21 残基 (PACAP21) および 27 残基 (PACAP27) のペプチドを用いた。重水素化脂質膜に結合したこれらのペプチドのほとんどのシグナルの帰属に成功し、それを基に二面角を推定した。この結果と脂質/PACAP27 間の磁化移動の解析より、このペプチドが脂質膜上で延びた構造をとり、疎水アミノ酸の側鎖を膜中に挿入して結合していることが明らかになった。これらのペプチドはミセル中や受容体との結合状態では α -ヘリックスを取ることが知られており、相互作用の相手が変わると全く異なる構造をとるユニークな性質を持つことが示された。

本研究はホルモンペプチド PACAP が膜上では延びた構造をとることを示し、相互作用の相手によって構造を大きく変化させるという新しい知見を与えた。この成果はホルモンペプチドの機能解明に大きく寄与するものであり、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。

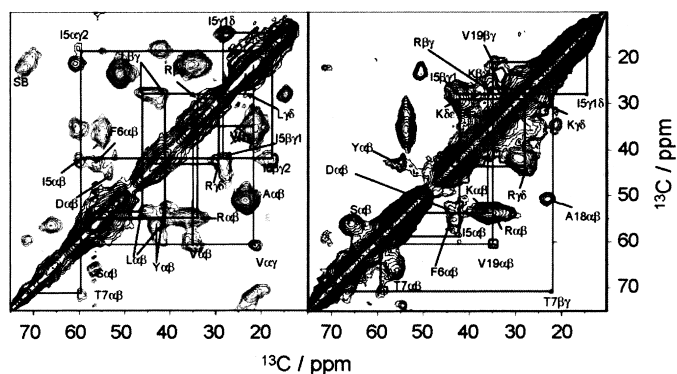


図 1 a PACAP27

図 1 b PACAP21