Osaka University Knowledge Archive

Title	Solution NMR using paramagnetic relaxation enhancement for the structure determination of loop-rich protein prepared with cold-shock vector containing GST tag
Author(s)	片岡, 沙織
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/50468
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

様式3

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　片岡　沙織　）	
論文題名	Solution NMR using paramagnetic relaxation enhancement for the structure determination of loop-rich protein prepared with cold-shock vector containing GST tag 常磁性緩和効果を用いた溶液NMRによる、GSTタグ付きコールドショック・ベクターで調製したループリッチ蛋白質の立体構造決定法

論文内容の要旨

ループリッチ蛋白質は、長いループやループ領域を多く含んだ蛋白質である。ループは、主鎖の方向の決定に関与しており、蛋白質のコンフォメーションの形成に重要な役割を果たしている。また、生体内では、ループの表面は、通常、溶媒(可溶性画分)に向かって突出しており、リガンド結合など、蛋白質の機能上、重要な役割を担っている。しかし、ループリッチ蛋白質の立体構造決定は、発現系の構築および立体構造の精密化の問題により、非常に困難である。本研究では、可溶性ループリッチ蛋白質を対象として、溶液NMR を用いた立体構造決定法の確立を行った。

まず、ループ領域を多く含む蛋白質は、組換え蛋白質を用いた蛋白質発現が困難であり、蛋白質が発現しても不溶性蛋白質となる事が多い。しかし、ループリッチ 蛋白質の立体構造を決定し、機能構造の解明に導く為には、リフォールディング操作が不要な可溶性蛋白質を発現させることが重要となる。本研究では、同位体標識が可能な大腸菌発現系であるGST タグ付きコールドショック・ベクターを用いることで、ループリッチ 蛋白質の発現を低温で誘導し、さらに可溶性タグであるGST と共発現させることにより、可溶性ループリッチ蛋白質の産生に成功した。これにより、溶液NMR の測定に適した試料の調製に成功した。

次に、溶媒中のループ 領域はフレキシブルであることが多く、数種類のコンフォメーションをとる場合があり、ループリッチ蛋白質の立体構造解析では、NMR信号の原子への帰属率の低さが問題になる。その場合、NMR分析では核スピン間双極子結合由来のNOE信号の帰属による核間距離情報の収集が困難になり、構造決定に至らないことが多い。本研究で用いた試料においても、主鎖アミド基の窒素核および水素核では94%の帰属に成功したが、側鎖炭素核で80%、側鎖水素核で82% の帰属率であり、側鎖においては十分に帰属することができなかった。その結果、NOEから得られた核間距離情報はアミノ酸残基あたり5個程度と不十分であり、NOE由来の距離情報だけでは構造の精度が低く、立体構造を決定することはできなかった。そこで、本研究では、常磁性有機ラジカル化合物のMTSLをジスルフィド結合で蛋白質に部位特異的に導入して蛋白質を電子スピン標識し、MTSLの不対電子による常磁性緩和効果（PRE）から標識電子と核間距離制限情報を得ることを試みた。NOEでは核スピンに起因する5 Å以下の距離情報が得られるのに対して、PRE では、核スピンと比較して大きな磁気モーメントを持つ電子スピンに起因する15～24Åの距離情報を得ることができる。本研究では、最終的にNOEに加え、9種類の電子スピン標識体から得たPRE 距離制限情報を用いることで、精度でループリッチ蛋白質の立体構造を決定することに成功した。つまり、可溶性ループリッチ蛋白質の構造決定において、NOE由来の距離情報だけでなく、PRE由来の距離情報も併用する事により、立体構造を収束させ、精密化させることに成功した。

今回確立したこれらの立体構造決定法は、これまで構造決定が困難であったループが豊富な可溶性蛋白質の構造決定を可能にし、蛋白質の機能解明に大きく貢献すると考える。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　片岡　沙織　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	藤原　敏道
	副 査	教授	上田　貴洋
	副 査	教授	水谷　泰久

論文審査の結果の要旨

ループリッチ蛋白質は、長いループやループ領域を多く含んだ蛋白質である。ループは、主鎖の方向の決定に関与しており、蛋白質の構造形成に重要な役割を果たしている。また、生体内では、ループの表面の残基は、溶媒に向かって突出しており、リガンドや蛋白質との選択的な結合など機能上重要な役割を担っている。しかし、ループリッチ蛋白質の立体構造決定は、試料調製のための発現系の構築および立体構造の精密化が一般に困難である。そこで、本論文において申請者は、可溶性ループリッチ蛋白質を対象として、溶液 NMR を用いた立体構造決定法の確立を行った。

はじめに、ループ領域を多く含む蛋白質は、蛋白質発現が困難であり、蛋白質が発現しても不溶性蛋白質となることが多い。しかし、ループリッチ蛋白質の立体構造を決定するためには、リフォールディング操作が不要な可溶性蛋白質を発現させることが望まれる。申請者は、同位体標識が可能な大腸菌発現系であるGSTタグ付きコールドショック・ベクターを用いることで、発現を低温で誘導し、さらに可溶性タグであるGSTと共発現させることにより、可溶性蛋白質の産生に成功した。これにより、溶液NMRの測定に適した試料の調製を行った。

次に、溶媒中のループ領域はフレキシブルで数種類のコンフォメーションをとる場合があり、このためループリッチ蛋白質の NMR 構造解析では、NMR 信号の原子への帰属率の低さが問題になる。この問題で、NMR 分析では核スピン間双極子結合由来の NOE 信号の帰属による核間距離情報の収集が困難になり、構造決定に至らないことが多い。本研究で用いた試料においても、主鎖アミド基の窒素核および水素核では 94%の帰属に成功したが、側鎖炭素核で 80%、側鎖水素核で 82%の帰属率であり、側鎖においては十分に帰属することができなかった。その結果、NOE から得られた核間距離情報はアミノ酸残基あたり 10 個程度と不十分であり、核間距離情報だけでは十分な精度で立体構造を決定できなかった。そこで、申請者は、常磁性有機ラジカル化合物の MTSL をジスルフィド結合で蛋白質に部位特異的に導入して蛋白質を電子スピン標識し、MTSL の不対電子による常磁性緩和効果（PRE）から標識電子と核間距離制限情報を得ることを試みた。NOE では核スピンに起因する 5Å以下の距離情報が得られるのに対して、PRE では、核スピンと比較して大きな磁気モーメントを持つ電子スピンに起因する 15～24Åの距離情報を得ることができる。本論文においては、最終的に、NOE に加え 9 種類の電子スピン標識体から得た PRE による距離制限情報を用いることで、ループリッチ蛋白質の立体構造を決定することに成功した。つまり、可溶性ループリッチ蛋白質の構造決定において、NOE 由来の距離情報だけでなく、PRE 由来の距離情報も併用する事により、立体構造を精密化させられることを明らかにした。

以上のように、申請者の論文は、ループリッチ蛋白質の立体構造決定のための NMR 解析法を発展させた。この成果は今後、これまで立体構造解析が困難であったループリッチ蛋白質の立体構造解明や、生物学的に重要な未解明の蛋白質の機能解析を行う上で有用な方法となる。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。