



Title	Study of Protein Structure and Dynamics Using Solution NMR
Author(s)	小沼, 剛
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58026
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	小 沼 剛
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 5 9 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科高分子科学専攻
学 位 論 文 名	Study of Protein Structure and Dynamics Using Solution NMR (溶液NMRを用いた蛋白質の構造と動態の研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 後藤 祐児 (副査) 教 授 奥山 健二 教 授 佐藤 尚弘

論 文 内 容 の 要 旨

蛋白質はDNAにコードされた遺伝子情報から転写そして翻訳を介してそれぞれのアミノ酸配列をもつポリペプチド鎖に翻訳される。紐状の一次構造は折り畳み反応を通じて天然の特異的な三次構造を形成し、固有の機能を発揮する。一方で、蛋白質は変性状態や折り畳み中間体から間違った折り畳み反応をすることがある。これはアミロイド線維として知られる超分子複合体の形成につながる。本研究では、透析アミロイドーシスの原因蛋白質であるβ2 ミクログロブリン(β2m)のアミロイド線維形成について実験を行った。加えて、蛋白質が機能を発揮する時に重要となる基質との相互作用について、輸送蛋白質と考えられているβラクトグロブリン (βLG) を対象に研究を行った。

β2m のアミロイド線維形成機構を明らかにするために伸長反応に着目した。伸長反応は酵素反応速度論のアナロジーで説明できると考え、伸長反応途中にβ2m はシードと複合体を形成し、特有の構造を持つと予想した。そこでその中間体の存在と構造を明らかにするために、前定常状態条件下つまりシード・モノマー複合体が蓄積する存在で、水素/重水素 (H/D) 交換法と NMR を組み合わせて実験を行った。方法としては、線維伸長反応と H/D 交換反応を同時に開始する競合 H/D 交換行い、さらにはクエンチト・フロー装置を用いてパルスラベル H/D 交換も行った。それぞれの方法で H/D 交換した

サンプルは凍結乾燥後、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、¹H-¹⁵N HSQC 測定を行った。ピーク強度からプロトン占有率を計算し、定量的および定性的な解析を行った。その結果から線維伸長反応における中間体の存在を確認した。またシード・モノマー複合体において中間体は構造を全く形成していないことがわかった。さらにβ2m の線維伸長モデルを提案し、中間体の役割について議論した。ここで用いた手法は様々な蛋白質のアミロイド線維形成の研究に応用可能であり、線維伸長を速度論的に解析することにおいてとても有用な方法である。

続いて、βLG の基質特異性の低い結合機構解明するために、主に NMR を用いて実験を行った。βLG はほとんどの哺乳類のミルクに含まれている蛋白質で、脂肪酸やレチノール、コレステロールなど様々な種類の疎水性低分子化合物と結合する。実験ではモデル基質としてパルミチン酸 (PA) を用いた。NMR の化学シフト解析から、βLG のバレル底部にある疎水性アミノ酸残基が PA と相互作用していることがわかった。また緩和解析から、PA 結合に伴いβLG のバレルの開口部の運動性の増加を確認した。以上の結果から、形の異なる様々な基質分子と結合するためには、基質認識部位が柔軟性と疎水性を有することが必要だと結論づけた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

蛋白質はフォールディングして特異的な三次構造を形成し、固有の機能を発揮する。他方、蛋白質がミスフォールディングすると、アミロイド線維と呼ばれる規則的な凝集体を形成して、アミロイド病を発症する。本研究ではアミロイド線維形成機構の解明を目指して、蛋白質の構造変化やダイナミクスに焦点をあてた研究を行った。また、蛋白質が機能を発揮する時に重要となるリガンドとの相互作用についても研究を行った。

透析アミロイドーシスの原因蛋白質であるβ2ミクログロブリンを材料として、アミロイド線維反応の中間体を、水素/重水素交換とNMRを組み合わせた実験によって解析した。その結果、中間体は水素/重水素交換反応から保護されていないことから、大きく崩れた立体構造をとっていることを明らかにし、その意義を議論した。続いて、牛乳に多く含まれるβラクトグロブリンを材料として、そのリガンド結合機構をNMRによって解析した。そして、βラクトグロブリンは、柔軟なリガンド認識部位を有することによって、さまざまなリガンドと結合することを明らかにした。

本論文は、NMRによってアミロイド形成中間体の構造とダイナミクスを残基レベルで調べた初めての論文であり、さらにβラクトグロブリンのリガンド結合機構についても新たな機構を提唱した。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。