



Title	Synthetic Study of Membrane Protein Based on Ligation Chemistry
Author(s)	佐藤, 毅
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/947">https://hdl.handle.net/11094/947</a>
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	佐藤 毅
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 18399 号
学位授与年月日	平成 16 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	Synthetic Study of Membrane Protein Based on Ligation Chemistry (ライゲーション法を用いた膜蛋白質の合成化学的研究)
論文審査委員	(主査) 教授 相本 三郎 (副査) 教授 村田 通雄 教授 関口 清俊

### 論文内容の要旨

ライゲーション法は化学的あるいは生物学的手法によって調製したペプチド断片を合成ブロックとし、それらを縮合することにより長鎖ペプチドを調製する方法である。このライゲーション法は蛋白質の合成に適用され、その構造や機能の解析が行われている。しかし、可溶性蛋白質の調製においては数々の成功例があるものの、合成ブロックの調製や精製法、縮合反応条件の設定、目的物の確認法など、膜蛋白質の合成にライゲーション法を適用するには解決すべき多くの課題が残されていた。そこで、ライゲーション法に基づく膜蛋白質の合成法を開発すべく本研究を開始した。

1) **F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase subunit c の合成** 複数の膜貫通部位を有する蛋白質の化学合成の最初の試みとして、二回膜貫通型蛋白質である F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP 合成酵素サブユニット c (79 残基) の合成法について検討を行った。まず、精製が困難であるとされる膜貫通部位を有するペプチドの効果的な精製条件について検討し、得られた合成ブロックを用いて、ライゲーション法の一つであるチオエステル法を用いることによりサブユニット c の合成に成功した。

2) **チオール基の新規保護基の探索** 長鎖ペプチドの合成にはチオエステル法とネイティブケミカルライゲーション (NCL) 法が用いられているが、用いる化学反応が異なることから、1つのペプチドの合成に2つの方法を用いることはできなかった。すなわち、チオエステル法では任意の部位でペプチド結合を形成させることができるという利点がある反面、アミノ基とチオール基は保護して合成を進めなければならない。一方、NCL 法では側鎖に保護基を一切導入することなくペプチド結合の形成が可能である反面、-X-Cys-の部位で縮合させなければならない。そこで、NCL 法を用いた後、チオエステル法で合成を進めていくことを念頭に置き、容易に導入でき、銀イオン存在下で安定で、しかも穏和な条件下で除去できるチオール基の保護基の探索を行った。その結果、チオール基を有するペプチドを中性の水溶液中で Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub> と混合するだけで導入でき、DTT などのチオールで処理することにより容易に除去できる SSO<sub>3</sub><sup>-</sup> 基がこれらの要求を満たすことが明らかとなった

3) **ORL1(251-370)の合成** 先に得られた知見をもとに、G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) である Opioid receptor like 1 (ORL1) の合成を通して、膜蛋白質の化学的合成法の確立に向けて研究を行った。GPCR は 7 回膜貫通型蛋白質として知られているが、今回はその 6、7 番目さらに C 末端側細胞内部位を含むフラグメント、ORL1 (251-370) を合成のターゲットとした。SSO<sub>3</sub><sup>-</sup> 基を合成ブロックにおける側鎖チオール基の保護基として用いることにより、NCL

法とチオエステル法を組み合わせることで目的物である ORL1 (251-370) の合成に成功した。以上より、合成化学的には未開発の分野であった、膜蛋白質についてその合成法を示すことができた。本研究にて見いだされた知見は、膜蛋白質の合成化学的調製において基礎となりうるものであり、これは当初の目的にかなうものである。

### 論文審査の結果の要旨

膜蛋白質は、生体膜を介した物質の移送や情報の伝達、エネルギーの生産など生命活動の維持に重要な役割を担っている。しかし、生体中での個々の蛋白質の存在量はごくわずかであり、しかも生物学的手法での試料の調製も困難であるため、可溶性蛋白質に比べ膜蛋白質の分子化学的研究は遅れている。本論文は、このような状況を打開するために行った膜蛋白質の化学的調製法についての研究成果を述べたものである。

第1章では、複数の膜貫通部位を有する蛋白質の化学合成の初めての試みとして、二回膜貫通型蛋白質である  $F_1F_0$  ATP 合成酵素サブユニット c の合成法について論じ、膜貫通型ペプチドの効果的精製法、膜蛋白質合成におけるチオエステル法の反応条件を明らかにした。第2章では、現在一般的に用いられているチオエステル法とネイティブケミカルライゲーション法という異なる原理に基づくライゲーション法を組み合わせることを可能とするための要件について論じ、それを実現するためのシステイン残基の保護基、導入法について詳細な条件を明らかにした。さらに第3章、第4章では、G 蛋白質共役型受容体である Opioid receptor like 1 の6番目の膜貫通ドメインから C 末端までのセグメントに相当する ORL1 (251-370) の合成戦略について論じ、1、2章で得られた知見を応用することにより目的物が得られることを明らかにした。

以上のように、本論文では、膜蛋白質の新規合成戦略を開発するとともに、開発した方法の有用性も実証しており、博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。