博士（理　学）　小　椋　賢　治

学位論文題名

New techniques for protein NMR spectroscopy: development and application

（タンパク質NMR分光の新しい測定法，開発と応用）

学位論文内容の要旨

近年，核磁気共鳴分光法（NMR）によるタンパク質の立体構造決定が広く行われるようになっている．この分野の発展の要因としては，遺伝子工学を応用した試料の大量調製および安定同位体（主に^{13}Cおよび^{15}N）の導入，NMR分光計の高性能化，およびNMR測定パルス系列の開発，の３つが挙げられる．そのうち，パルス系列の開発は，この分野をリードする最先端の研究機関にて行われている．新しいパルス系列を開発する意義は，これまで得られなかったNMR相互作用を測定可能にし，そのことによりタンパク質の立体構造や動的な性質についての，いわば埋もれていた情報を抽出することにほかならない．

申請者は，タンパク質の立体構造を解析するためのNMR測定法を２種開発した（第１章および第２章）．さらにそれらを利用して，実際に２種のタンパク質にて詳細な立体構造解析をおこなった（第３章および第４章）．

第１章　広帯域反転および再結像パルスを用いた^{13}C再結像多次元^{13}C編集パルス系列の開発

多次元^{13}C編集パルス系列はタンパク質の構造解析において重要な位置を占めている．しかし，これまでに提案されている手法にはいくつかの問題点が存在した．主要な問題点は，^{13}C編集パルス系列を設計する際に，^{13}Cはそのシグナルの周波数帯域が広く全領域を均一に観測するためには周波数オフセットの影響の大きい180°パルス個数をできるだけ少なくしなければならない点である．そのために，H_2O溶媒中における測定では溶媒由来の不要な信号を効率的に消去できない，などの制約があった．

申請者は，周波数オフセットの影響の小さい，整形パルス２種（反転用および再結像用）を多次元^{13}C編集パルス系列に導入する改良をおこなった．このパルス系列は，^{13}Cの全領域を均一に観測でき，かつ溶媒由来の不要信号を効率的に消去できるなどの利点がある．このパルス系列を，増殖因子受容体結合タンパク質２（Grb2）のN末端側のSrc相同性領域3（SH3）ドメインとSon of sevenless（Sos）由来のリガンドペプチドの複合体試料にてデモンストレーションし，その有効性を確認した．

第２章　パルス磁場勾配と広帯域反転パルスに基づく，同位体フィルターパルス系列の改良

^{13}Cおよび^{15}Nにて均一に同位体ラベルされたタンパク質に，同位体ラベルされていないリガンド分子が結合し複合体を形成している場合，通常のNMR測定法を利用すると，タンパク質

由来とリガンド分子由来のすべてのNMR信号が検出され，その結果NMRスペクトルは非常に複雑となり，スペクトル解析は困難となる．同位体フィルター法を利用すると，同位体ラベルされていないリガンド分子由来の信号のみを選択的に検出できるので，その結果，NMRスペクトルは単純化し，リガンド分子の立体構造やタンパク質のリガンド結合部位の情報を容易に得ることができる．しかし，これまでに提案されている同位体フィルターパルス系列は芳香環炭素領域と脂肪族炭素領域を同時にカバーすることができない欠点があった．

申請者は，この欠点を克服するため，パルス磁場勾配（PFG）とハイパボリックセカント型に整形したパルスを利用した，新しい同位体フィルターパルス系列を開発した．さらにこの同位体フィルターパルス系列を二次元および三次元NMR測定法に適用した．

これらのパルス系列をGrb2のN末端側SH3ドメインとSos由来のリガンドペプチドの複合体試料にてデモンストレーションした．その結果，リガンドペプチドのスペクトル解析が容易であり，さらに分子間の相互作用解析に有効であることを確認した．

第３章　ヒト酸性線維芽細胞増殖因子の溶液中での立体構造とヘパリン由来オリゴ糖との相互作用

線維芽細胞増殖因子（FGF）は細胞外マトリクスにてヘパリンあるいはヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合して多量体として存在しており，その状態でFGF受容体と結合できる．

申請者は，ヒト酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）にて一連の多次元NMRスペクトルを測定し，それに基づく水素原子間距離情報からディスタンスジオメトリー計算をおこないaFGFの溶液中での立体構造を決定した．aFGFの溶液中での立体構造はすでに報告されている塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）のそれとよく一致していることがわかった．

さらにaFGFにヘパリン由来オリゴ糖を結合させ，aFGFのNMR化学シフト値の変化を測定した．化学シフト値の変化の大きさから，ヘパリン結合部位を推定したところ，bFGFにおけるヘパリン結合部位と一致した．このことはaFGFがbFGFと共通のヘパリン認識機構を有していることを意味する．

第４章　Shc由来のリン酸化チロシンを含むペプチドと複合体を形成したGrb2のSH2ドメインの溶液中での立体構造

Src相同性領域２（SH2）ドメインはシグナル伝達に関与するタンパク質中に数多くのバリエーションとして発見されている機能モジュールであり，リン酸化チロシンを含むタンパク質配列を認識し結合することが知られている．SH2の種類により，その認識するタンパク質配列は多様である．

申請者はGrb2と，Grb2の主要なターゲットとして知られるSrc homology and collagen (Shc) 由来のリン酸化チロシンを含むペプチドの複合体の溶液中での立体構造をNMRを用いて決定した．その結果，リン酸化チロシン残基の認識機構については，他のSH2ドメインと同様に塩基性ポケットにて結合していることがわかった．しかし，リン酸化チロシン残基より後方の残基の認識については，他のSH2ドメインではペプチド鎖が直鎖状にSH2 ドメイン上に結合しているのに対して，Grb2 SH2ドメイン上ではペプチド鎖がターン構造を形成して結合していることがわかった．

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　引　地　邦　男
副　査　教　授　新　田　勝　利
副　査　教　授　矢　澤　道　生
副　査　教　授　堤　　　耀　廣（大学院工学研究科）

学位論文題名

New techniques for protein NMR spectroscopy: development and application

（タンパク質NMR分光の新しい測定法，開発と応用）

近年、核磁気共鳴分光法（NMR）によるタンパク質の立体構造決定が広く行われている。しかし、その多くはタンパク質単体の構造解析で、タンパク質がリガンドと相互作用している状態での構造の研究は少ない。

本論文は、タンパク質とリガンドの相互作用を研究するために新しいNMR測定法を開発し、それをヒト酸性線維芽細胞増殖因子とヘパリン由来オリゴ糖との相互作用、および、増殖因子受容体結合タンパク質2の SH2 ドメインとリン酸化チロシンを含むペプチドとの相互作用の研究に応用した結果をまとめたもので、４章からなる。

第１章では、広帯域反転および再結像パルスを用いた 13C 再結像多次元 13C 編集パルス系列の開発について述べている。周波数オフセットの影響の小さい、整形パルス２種（反転用および再結像用）を多次元 13C 編集パルス系列に導入する改良を行った。このパルス系列は、13C の全領域を均一に観測でき、かつ溶媒由来の不要信号を効率的に消去できるなどの利点がある。

第２章では、パルス磁場勾配と広帯域反転パルスに基づく同位体フィルターパルス系列の改良について述べている。これまでに提案されている同位体フィルターパルス系列は芳香環炭素領域と脂肪族炭素領域を同時にカバーすることができない欠点があった。申請者はこの欠点を克服するため、パルス磁場勾配とハイパボリックセカント型に整形したパルスを利用した新しい同位体フィルターパルス系列を開発した。さらにこの同位体フィルターパルス系列を二次元および三次元 NMR 測定法に適用した。

第３章では、ヒト酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）とヘパリン由来オリゴ糖との相互作用の研究に上述の測定法を利用した結果について述べている。aFGF にヘパリン由来オリゴ糖を結合させ、aFGF の NMR 化学シフト値の変化を測定した。化学シフト値の変化の大きさからヘパリン結合部位を推定したところ、すでに報告されている塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）におけるヘパリン結合部位と一

致した。このことから aFGF は bFGF と同様のヘパリン認識機構を持っていると結論した。

第４章では、増殖因子受容体結合タンパク質２（Grb2）の SH2 ドメインと、Grb2 の主要なターゲットとして知られる Src homology and collagen (Shc) 由来のリン酸化チロシンを含むペプチドとの相互作用を調べた。リン酸化チロシン残基の認識機構については、他の SH2 ドメインと同様に塩基性ポケットに結合していることがわかった。しかし、リン酸化チロシン残基より後方の残基の認識については、他の SH2 ドメインではペプチド鎖が直鎖状に SH2 ドメイン上に結合しているのに対して、Grb2 の SH2 ドメイン上ではペプチド鎖がターン構造を形成して結合していることを見出した。

本論文で述べられた測定法はタンパク質ーリガンド相互作用の研究に広く利用されるとともに、ここで述べられた相互作用の２つの例は、この方面の研究に有益な知見を与えるものと高く評価される。審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を得る充分な資格があると認めた。