

学 位 論 文 題 名

NMR studies of tandem repeats with high flexibility in prion proteins

(プリオン蛋白質に存在する高い運動性を持った
タンデムリピートの構造：NMR 法を用いた構造研究)

学位論文内容の要旨

プリオンタンパク質(PrP)は、主に脳・神経繊維で発現する。正常な PrP の立体構造が変化して生じる変異型 PrP が、クロイツフェルト・ヤコブ病、スクレイピー、狂牛病などの致死性の脳症を引き起こすという仮説が広く受け入れられている。

PrP は約 200 残基からなり、glycosyl phosphatidyl inositol アンカーで膜に結合している細胞外タンパク質である。哺乳類 PrP の N 末端側には、8 残基 PHGG(G/S)WGQ が 5 回繰り返したタンデムリピートが存在し、鳥類 PrP の N 末端側にも 6 残基 PHNPGY が 9 回繰り返したタンデムリピートが存在する。これらのタンデムリピートは哺乳類の間及び鳥類の間ではよく保存されており何らかの生理的機能を果たしていると推測される。最近、哺乳類 PrP のタンデムリピート領域に銅イオン(II)が結合すること、また銅イオン(II)の還元を行うことが報告された。さらに SOD 活性を有することが報告された。

マウス、ハムスター、ヒト、ウシの PrP に対する NMR 法を用いた構造解析によると、C 末端側の約 100 残基は 3 本の α -ヘリックスと β -シートからなるグロビュールなドメインを形成している。一方、タンデムリピートを含む N 末端側の約 100 残基は非常に運動性に富み、ランダムコイルであると考えられている。しかしタンデムリピート領域では NMR スペクトルが重なるため距離および角度情報が得られておらず、ランダムコイルを示す直接的な実験事実はない。また鳥類の PrP に対しては構造解析がなされていない。そこで、本研究では、タンデムリピートの詳細な構造情報を得るために、リピート数が少ないモデルペプチドを合成し、その NMR 構造解析を行った。

以下に記す哺乳類 PrP のモデルペプチド L1、L2 と鳥類 PrP のモデルペプチド A1、A3 を合成した。

L1: C¹R²Q³P⁴H⁵G⁶G⁷S⁸W⁹G¹⁰Q¹¹R¹²D¹³C¹⁴

L2: C¹R²Q³P⁴H⁵G⁶G⁷G⁸W⁹G¹⁰Q¹¹P¹²H¹³G¹⁴G¹⁵G¹⁶W¹⁷G¹⁸Q¹⁹R²⁰D²¹C²²

A1: H¹N²P³G⁴Y⁵P⁶H⁷N⁸

A3: R¹Q²P³G⁴Y⁵P⁶H⁷N⁸P⁹G¹⁰Y¹¹P¹²H¹³N¹⁴P¹⁵G¹⁶Y¹⁷P¹⁸H¹⁹N²⁰

L1 と L2 は親水性を上昇させるために親水性の残基を両端に付加した。また、取り得る立体構造の数を減少させることを期待して、ジスルフィド結合により L1 と L2 の環状化ペプチド (C1、C2) も合成した。

NMR 測定には、JEOL の 500MHz と 600MHz の装置を用いた。プロトンのケミカルシフトの帰属および距離、角度情報を得るために DQF-COSY、TOCSY、NOESY を用いた。測定は構造の安定化を考慮して 5℃ の低温で行った。また、分子動力学による構造計算にはプログラム X-PLOR を用いた。分子モデリング法による構造予測はプログラム MMS を用いた。

哺乳類 PrP のモデルペプチド L1、L2 では、PHGG(G/S)WGQ 単位配列由来のプロトンのケミカルシフトを完全に帰属できた。L1 において、H5 の β プロトンと W9 の芳香環の間に NOE が観測され、これらの側鎖が近接することが示された。さらに、Q11 におけるアミドプロトンのケミカルシフトの温度係数が低く、W9 の CH₂ と Q11 の NH の間、G10 の NH と Q11 の NH の間に NOE が観測された。NMR 法で得られた構造情報を用いて L1 の構造計算を行った。その結果、HGGSW で His のイミダゾール環と Trp の芳香環が近接するループと SWGQ で β -ターン構造を形成していた。L2 で得られた構造情報は L1 の結果と矛盾しなかった。

鳥類 PrP のモデルペプチド A1 において、プロトンのケミカルシフトの帰属をほぼ達成した。A1 では Y5 と P6 の間のペプチド結合がシスとトランスの 2 つの異性体を形成していることが分かった。Y5 のアミドプロトンの H-D 交換が他の残基より遅く、そのケミカルシフトの温度係数も低いことが分かった。さらに、P3 の CH₂ と Y5 の NH の間、G4 の NH と Y5 の NH の間に NOE が観測された。これらの結果は、NPGY で β ターン構造を形成していることを示した。A3 で得られた構造情報は A1 の結果と一致した。次に、NPGY での β ターン形成を条件として分子モデリング法を用いて構造予測を行った。その結果、HNPGY で His と Tyr の側鎖が近接するモデルが得られた。

以上の研究結果から、哺乳類と鳥類の PrP のタンデムリピートは、単位配列の長さやアミノ酸配列の違いにも関わらず、His と 4 残基離れた芳香環残基 (哺乳類 Trp/鳥類 Tyr) が近接する構造を形成することが分かった。このことから、これらのタンデムリピートは類似の生理的機能を持っていると思われる。他の研究者によるラマンや CD 等の実験結果を考慮すると、哺乳類 PrP のタンデムリピート PHGG(G/S)WGQ において見いだされた HGG(G/S)W でのループ構造と (G/S)WGQ での β ターン構造は、銅の結合及び還元を促進することが示唆される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 中 田 允 夫

副 査 教 授 新 田 勝 利

副 査 助 教 授 出 村 誠

副 査 教 授 松 嶋 範 男 (札幌医科大学保健医療学部)

学 位 論 文 題 名

NMR studies of tandem repeats with high flexibility in prion proteins

(プリオン蛋白質に存在する高い運動性を持った
タンデムリピートの構造：NMR 法を用いた構造研究)

プリオン蛋白質(PrP)は約 200 残基からなり、哺乳類では N 末端側に 8 残基 PHGG(G/S)WGQ が 5 回繰り返したタンデムリピートが存在する。又、鳥類の PrP の N 末端側にも 6 残基 PHNPGY が 9 回繰り返したタンデムリピートが存在する。これらのタンデムリピートは哺乳類の間でも、鳥類の間でもよく保存されており、生理的機能との関連が問題とされている。ヒト、ウシなどの PrP に対する NMR 測定により、C 末端側の約 100 残基の部分の構造は解析されたが、N 末端側のタンデムリピートに関しては NMR スペクトルが重なるために、構造に関する知見は得られていない。

申請者は、PrP の N 末端側のタンデムリピートの構造に関する詳細な情報を NMR 測定より得るために、哺乳類の PrP の繰り返し単位を 1 個含むモデルペプチド (L1) と 2 個含むモデルペプチド (L2) を合成した。同様に、鳥類の PrP の繰り返し単位を 1 個含むモデルペプチド (A1) と 2 個含むモデルペプチド (A2) を合成した。水への溶解性を増大させる目的で、これらのモデルペプチドの両端に親水性の残基を付加した。L1 と L2 の NMR 測定では、PHGG(G/S)WGQ 単位由来のプロトンの化学シフトを完全に帰属した。 α プロトンの化学シフトの実測値とランダムコイルでの値の差の挙動はヒトの PrP のタンデムリピートについて得られている化学シフトの差の挙動と類似した。His の β プロトンとそれから 4 残基離れた Trp の側鎖のプロトンとの間に NOE を観測した。Gln のアミドプロトンの化学シフトの温度係数は小さかった。NOE による距離情報を用いて L1 の構造計算を行なうと、HGG(G/S)W にループ構造、(G/S)WGQ に β ターン構造を見出した。これらの解析結果から哺乳類の PrP のタンデムリピートはランダムではなく繰り返し単位ごとに構造を形成することを推定した。モデルペプチド A1 と A2 についても同様な NMR 測定を行い、PHNPGY 単位において NPGY に β ターン構造を見出し、His と Tyr が近接した構造を予測

した。哺乳類のプリオン蛋白質は、その立体構造が変異するとクロイツフェルト・ヤコブ病や、狂牛病などの致死性の脳症を引き起こすと考えられており、申請者の N 末端側のタンデムリピートの構造に関する研究の意義は大きい。

よって申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。