

学 位 論 文 題 名

Structures of Flexible Domains Having Repetitive Sequences in Proteins As Revealed by Nuclear Magnetic Resonance

(反復配列を持つフレキシブルドメインの NMR による立体構造研究)

学位論文内容の要旨

RNA ポリメラーゼ II 最大サブユニットの C 末端ドメイン(CTD)にはチロシン-セリン-プロリン-トレオニン-セリン-プロリン-セリン (YSPTSPS) のヘプタペプチドが 17 回から 52 回が連続して繰り返すリピート配列 (タンデムリピート) が存在する。このようなタンデムリピートが、全蛋白質の 5 % に存在することが知られてきている。さまざまなタンデムリピートは、リガンドとの相互作用により蛋白質の機能発現に関与している。また、ハンチントン病にみられるように、リピート数の増減がヒトの病気の発症にも直接関与している。

一般に CTD のように多くのオリゴペプチドのタンデムリピートは、グリシン、セリン、プロリンなどの比較的小さなアミノ酸を豊富に含むため、非常にフレキシブルである。このフレキシビリティは、通常の核磁気共鳴法 (NMR) や X 線結晶構造解析の適用を困難にする。NMR 測定においては、それぞれの繰り返し単位配列からの NMR 信号が互いに重なり易いためそのシグナルを区別するのが難しくなり、連鎖帰属をほとんど不可能にする。また、フレキシビリティは、溶液中において複数のコンフォマーをとる可能性を大きくする。したがって、これまで原子座標レベルでのオリゴペプチド・タンデムリピートの立体構造はほとんど知られていない。

この状況を打破すべく、本研究では NMR によるフレキシブル・タンデムリピートの構造解析のために、次の戦略をとった。(1) リピート数の少ない合成オリゴペプチドを用いる。

(2) フレキシビリティを減少させることを期待して、環状化ペプチドも用いる。(3) 一般にタンデムリピートは完全に同じリピート配列が繰り返さない、そこで、詳細な配列解析を行い、保存性のよい配列あるいは安定な構造がとりやすいと思われる部分配列を選択する。

(4) NMR の微小な信号を精度よく検出する GOESY 法を用いる。本研究では、3 種類の蛋白質、RNA ポリメラーゼ II の最大サブユニット、植物グリシンリッチ RNA 結合蛋白質、氷核蛋白質のタンデムリピートを測定対象とした。

RNA ポリメラーゼ II 最大サブユニットの C 末端ドメイン(CTD): RNA ポリメラーゼ II 最大サブユニットの CTD に存在する YSPTSPS のタンデムリピートは、真核生物間でよく保存されており、生体内においてリン酸化されることで転写の開始と伸長が制御されていることが示されている。N,C 末端に Cys 残基を付加し S-S 結合を形成させた 2 種類の環状化ペプチド

1: cyclo-(C¹R²D³Y⁴S⁵P⁶T⁷S⁸P⁹S¹⁰Y¹¹S¹²R¹³D¹⁴C¹⁵)

2: cyclo-(C¹R²D³Y⁴S⁵P⁶T⁷S⁸P⁹S¹⁰Y¹¹S¹²P¹³T¹⁴S¹⁵P¹⁶N¹⁷Y¹⁸S¹⁹R²⁰D²¹C²²)

を合成し、水溶液の NMR 測定を行った。アミドプロトンの温度依存性、α プロトンの化学

シフトのランダムコイル値からのずれ、アミド-アミド間の NOE、スピン結合定数 $^3J_{\text{HN}\alpha}$ の結果は、SPTS および SPSY 配列は β ターン構造をとることを示した。ペプチド 1 の構造計算は、SPTS はタイプ I の β ターンであることを示唆した。また、ペプチド 2 において SPTS の β ターンは、SPSY のそれよりも安定であることが示された。この差は、セリンのリン酸化に影響を与えることが示唆される。

植物グリシンリッチ RNA 結合蛋白質のグリシンリッチ領域： 植物グリシンリッチ RNA 結合蛋白質 (GRRBP) は、N 末端側にある RNA 認識モチーフと C 末端側の約 100 残基からなるグリシンリッチ領域からなる。さまざまな生物種の 41 個の GRRBP の比較配列解析は、グリシンリッチ領域は $\text{Tyr}-(\text{Xaa})_h-(\text{Arg})_k-(\text{Xaa})_l$ [h, k, l は 1 から 10 までの整数、Xaa は主に Gly が占める] のリピート配列から構成されていることを示した。

グリシンリッチ領域において、高い頻度で現われる部分配列の次の 2 種類のペプチド

3: $\text{H-G}^1\text{G}^2\text{Y}^3\text{G}^4\text{G}^5\text{G}^6\text{R}^7\text{R}^8\text{D}^9\text{G}^{10}\text{-OH}$

4: $\text{H-G}^1\text{G}^2\text{R}^3\text{R}^4\text{D}^5\text{G}^6\text{G}^7\text{Y}^8\text{G}^9\text{G}^{10}\text{-OH}$

を合成し、円偏光二色性 (CD) と NMR 測定を行った。両ペプチドの遠紫外 CD スペクトルは、226nm 付近に正のバンドを示した。これは、Tyr 側鎖がランダムコイルではないことを示す。NMR によるアルギニンとアスパラギン酸のプロトンの pH 滴定の結果は、Arg (i) と Asp (i+2) の側鎖同士が $\text{H-N}^{\epsilon}\cdots\text{O}=\text{C}^{\gamma}$ 形式の水素結合を形成していることを示した。GOESY 法により、Tyr 芳香環プロトンと Arg の側鎖プロトンとの間に NOE が観測された。以上の結果から、Tyr(i) と Arg(i±4 または i±5)、Arg (i) と Asp (i+2) の間に側鎖間の相互作用があることが明らかにされ、ループ構造の存在が示唆された。

氷核蛋白質のセントラルドメイン： 氷核蛋白質は氷核細菌によって産出される水の凍結を促進する蛋白質であり、AGYGSTxT の配列が 100 回以上も繰り返している。このタンデムリピートの立体構造が氷結晶のテンプレートとして働き、氷形成に寄与すると考えられている。10 種類の氷核蛋白質の比較配列解析から、このタンデムリピートは 3 つのドメインに分類されることが示された。

配列解析の結果にもとづき、*Xanthomonas campestris* の氷核蛋白質のタンデムリピートの部分配列に相当する 17 残基からなる 2 種類のオリゴペプチド

5: $\text{Ac-D}^1\text{S}^2\text{S}^3\text{L}^4\text{T}^5\text{A}^6\text{G}^7\text{Y}^8\text{G}^9\text{S}^{10}\text{T}^{11}\text{Q}^{12}\text{T}^{13}\text{A}^{14}\text{R}^{15}\text{K}^{16}\text{G}^{17}\text{-NH}_2$

6: $\text{Ac-Q}^1\text{T}^2\text{A}^3\text{R}^4\text{K}^5\text{G}^6\text{S}^7\text{D}^8\text{L}^9\text{T}^{10}\text{T}^{11}\text{G}^{12}\text{Y}^{13}\text{G}^{14}\text{S}^{15}\text{T}^{16}\text{S}^{17}\text{-NH}_2$

を合成し、NMR 測定を行った。両ペプチドにおいて、Tyr の芳香環と近傍の Leu, Thr, Ala といった残基のメチル基との間に NOE が観測された。また、興味深いことに、ペプチド 6 においては、Gln1 と Thr16、Ala3 と Tyr13、Ala3 または Arg4 と Thr16 の間に NOE が観測された。

芳香族アミノ酸の弱い相互作用による構造形成： ペプチド 3, 4, 5, 6 の YG(G/S)配列において、Tyr(i)から 2 残基離れた G/S (i+2)のアミドプロトンが、ランダムコイルの値と比較して大きく高磁場シフトすることが観測された。この高磁場シフトは、主鎖アミドプロトンと Tyr 側鎖芳香環との NH- π 相互作用によるものである。ペプチド 1, 2 においても、 β -ターンをとる SPTS 配列の Thr (i+2)と Ser (i+3)のアミドプロトンが高磁場シフトし、NH- π 相互作用の可能性がある。また、植物 GRRBP のタンデムリピートの NMR 結果は、Tyr (i) と Arg (i±4 または i±5) の側鎖間に相互作用が存在することを示した。この相互作用は、カチオン- π 相互作用に帰せられる。さらに、氷核蛋白質のタンデムリピートにおいて、Tyr 側鎖と Leu, Thr, Ala のメチル基との NOE が観測された。これらの NOE は、CH/ π 相互作用に帰せられる。以上の結果は、芳香族アミノ酸が関与する弱い相互作用が立体構造形成に大きな役割を果たしていることを示唆している。また、その相互作用はアミノ酸配列に依存すると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 河 野 敬 一

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

Structures of Flexible Domains Having Repetitive Sequences in Proteins As Revealed by Nuclear Magnetic Resonance

近年、膨大なゲノム情報を利用して数多くの蛋白質の立体構造を網羅的に明らかにしようとする構造ゲノム科学研究が盛んに行われている。これらの研究成果は、学術的な側面ばかりでなく、応用面すなわち高齢化社会に対応できるゲノム創薬（ゲノム関連情報に基づいた新薬の開発）やテーラーメイド医療（個人の遺伝的背景にあった薬の処方や治療）の早期実現、そして環境問題への貢献も期待されている。

これまで X 線結晶解析や核磁気共鳴 (NMR) によって立体構造が明らかにされてきた蛋白質の大部分は、酵素に代表されるように比較的固い立体構造を持った球状蛋白質である。一方、これまで明らかにされてきた膨大な数の蛋白質の一次構造の中には、フレキシブル、または決まった立体構造をとらないことが予想される蛋白質またはそのドメインも数多く見つかってきている。このようなフレキシブルな領域は、X 線結晶構造解析や NMR によるオーソドックスな手法では、立体構造に関する情報が得られないことが多い。このことはフレキシブルな領域を持つ蛋白質の機能を理解するうえで大きな障害となる。

本論文は、このようなフレキシブルであると考えられるアミノ酸配列のうち、オリゴペプチドの繰り返し構造から構成される配列領域を研究対象としている。著者はこのようなフレキシブルなリピート配列に対しては、配列解析に基づいて設計されたモデルペプチドを NMR 解析するというアプローチを提案しており、このアプローチによって RNA ポリメラーゼ II、植物グリシンリッチ RNA 結合蛋白質、氷核蛋白質が持つリピート配列の立体構造を調べている。

RNA ポリメラーゼ II に存在するリピート配列の研究においては、リピート配列を 1 つ及び 2 つ含む環状ペプチドを設計し、このモデルペプチドについて NMR 解析を行っている。そして既に報告されている鎖状モデルペプチドの実験結果と比較することで、リピート配列の構造的性質と環状化によるアーティファクトの効果をより詳細

に解析及び議論することを可能にしている。この解析の結果から、RNA ポリメラーゼ II のタンデムリピートがターン構造を持つことを示した。

植物グリシンリッチ RNA 結合蛋白質のリピート配列については、GOESY 法を利用することで極めて小さい NOE 信号を観測し、ループ構造の存在を示すことに成功している。この GOESY 法はこれまで蛋白質やペプチドの解析に利用されている例はほとんどなく、独自性が大きい。

氷核蛋白質のリピート配列においては、配列解析によって NMR 解析に適した配列をモデルペプチドとして選択することで、立体構造を決定する上で欠かせない NOE の帰属を可能にしている。またこれにより氷核蛋白質のリピート配列がらせん構造をとることも示唆している。この結果は氷核蛋白質の氷核活性のメカニズムを解明する基礎となりうると考えられる。

さらに本論文はこれまで得られたモデルペプチドの化学シフトを比較することで、これらのリピート配列で見られた構造の形成には芳香環が関与する弱い極性相互作用が重要な役割を果たしていることを示唆しており、新規性がある。

以上まとめると、本研究は、蛋白質のフレキシブルな領域について、立体構造及びそれを形成する相互作用に関する新知見を得たものであり、フレキシブルな蛋白質における構造生物学の発展に対して貢献するところ大なるものがある。

よって、著者は、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。