

審査結果の要旨

氏名 五十嵐 俊介

多ドメインタンパク質におけるドメイン間近接残基対およびドメイン間相対配置を明らかとする NMR 手法の確立を目的とした本論文は、当研究室において開発した交差飽和法(CS 法)およびアミノ酸選択的 CS 法(ASCS 法)を応用し、ドメイン間 ASCS 法を確立したものである。本論文は 6 つの章からなり、第 1 章において序論を述べている。第 2 章において本手法に必要となるアミノ酸選択的 ^1H 標識法について述べ、第 3 章においてドメイン間 ASCS 法の確立について、第 4 章において立体構造が未知である系にドメイン間 ASCS 法を適用したことを述べている。第 5 章において総括を述べ、第 6 章において実験材料および方法について述べている。

第 2 章において、本手法に必要となるアミノ酸選択的 ^1H 標識が可能であるアミノ酸について調べている。各アミノ酸を選択的 ^1H 標識したタンパク質について、NMR 法を用いて安定同位体標識の選択性や、 ^1H 取り込みの効率を定量的に解析している。これらの結果より、選択 ^1H 標識に適しているアミノ酸、適していないアミノ酸を分類している。

第 3 章において、まず、本研究に用いる HisJ の調製を行い、性状解析や NMR シグナルの帰属を行っている。続いて、第 2 章にて適用可能であると明らかにしたアミノ酸を用いてドメイン間 ASCS 法を立体構造が明らかであり、二つのドメインを有する holoHisJ に適用し、交差飽和源からの距離と交差飽和の大きさが相関するか否かを調べている。その結果、交差飽和源に近接する残基ほど、大きな交差飽和減少が観測されることを明らかとしている。一方で、5 Å 以上離れたアミドプロトンには顕著な交差飽和が生じないことを明らかとしている。これらのことから、本手法を適用することにより、相手ドメインに近接するアミドプロトンを明らかにできるという結論を導き出している。さらに、明らかとしたドメイン間近接残基情報から、ドメイン間の相対配置を決定できるか否かを検証している。holoHisJ における各ドメインを剛体として扱い、交差飽和源となるアミノ酸と交差飽和を受けたアミノ酸の相対配置および、各ドメインを結びつける hinge 領域が相補的となるドメインの相対配置を探索した結果、結晶構造に相当する相対配置を決定することができている。これらのことから、本手法を適用することにより、多ドメインタンパク質においてドメイン間近接残基対およびドメイン相対配置を決定できると結論付けている。

第 4 章において、第 3 章にて確立したドメイン間 ASCS 法を立体構造が未知である apoHisJ に適用し、apoHisJ におけるドメイン間の残基対距離情報およびドメイン間の相対配置に関する情報を得ている。これらから考えられる apoHisJ のドメイン相対配置は、apoHisJ が histidine を結合する際に効率的な立体構造であり、本手法により明

らかとした情報は生化学的な背景に矛盾せず、妥当であると結論している。

既存の多ドメインタンパク質におけるドメイン間相対配置の決定法と比較して、本手法は 10 万程度の分子量まで適用可能であり、試料調製が容易であることや、本来の立体構造を保ったまま解析できるという点において優れている。

以上、本研究の成果は、多ドメインタンパク質におけるドメイン間相対配置の決定方法において新たな糸口を提示するものであり、これを行った学位申請者は博士（薬学）の学位を得るにふさわしいと判断した。