

(続紙 1)

京都大学	博 士 (理 学)	氏名	土 井 崇 嗣
論文題目	固体 NMR を用いた生体分子の複合体構造解析		
(論文内容の要旨) 本論文で申請者は、リガンドとの結合あるいは自己集合により複合体を形成し、凝集してしまう生体分子として、アルツハイマー病の原因物質であると考えられているアミロイド β タンパクおよび、マンノースを特異的に認識するプラディミシン A に着目し、固体 NMR 法と同位体標識を組み合わせて用い局所構造解析を行った。また、後者の Ca 結合位置の測定に必要な新しい固体 NMR 法の開発も行った。 1. アミロイド β タンパク ($A\beta$) のプロトフィブリルの構造研究 42 残基の $A\beta$ ($A\beta 42$) はアルツハイマー病患者の脳に特異的に観察される老人斑の主要な構成成分であり、分子間平行 β シート構造を形成してフィブリルとして沈積する。$A\beta$ はアルツハイマー病発症に重要な役割を果たしていると考えられているが、神経細胞毒性の強い凝集中間体であるプロトフィブリルの構造に関する知見は少なかった。申請者は、プロトフィブリルもフィブリル同様の分子間平行 β シート構造を形成しているかどうかを実験的に検討するために、21 番目のアラニン残基の C=O または $C\alpha$ を ^{13}C 標識した $A\beta 42$ を化学合成し、プロトフィブリルを作製し、C=O/$C\alpha$ 間の ^{13}C-^{13}C 磁化交換を回転共鳴法を適用して測定した。その結果、プロトフィブリルは C=O/$C\alpha$ 間の磁化交換を観測することができなかった。よってプロトフィブリルは分子間平行 β シート構造を形成していないことが明らかになった。これにより、$A\beta 42$ の凝集のきっかけとなる駆動力は分子間平行 β シート構造の形成ではないことが示された。これまでに $A\beta$ は分子内で逆平行 β シート構造を形成していることが報告されている。したがって本研究の結果により、プロトフィブリルからフィブリルへと成長する際に、分子内逆平行 β シート構造が分子間平行 β シート構造へと変化し、$A\beta$ 分子同士が近接することで堅牢なフィブリル構造が形成されることを示唆することが出来た。 2. プラディミシン A (PRM-A) のマンノース認識機構の研究 PRM-A は水溶液中において Ca^{2+} の存在する条件下で、D-マンノース (Man) のみと選択的に結合して凝集する。真菌やヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、自身の表面に Man 糖鎖を多数持つ。PRM-A はそのユニークな Man 結合能を活かして Man 糖鎖に結合することで、抗真菌活性および抗 HIV 活性を示す。また低分子化合物による水溶液中での高い Man 選択性は、人工の糖結合分子では実現されていないため、Man を結合した PRM-A 複合体の立体構造を解析することで、新奇な HIV 特効薬の創製や人工の Man 結合分子の設計に資することができる。 申請者は、複数の ^{13}C 同位体標識パターンを持つ PRM-A と Man の複合体を作製し、それらの試料において ^{13}C-^{13}C の非選択的 2 極子相関測定を行い、PRM-A の MAN 認識部位			

(続紙 2)

がアラニン部位および芳香環部位であることを特定した。結合部位の特定後、さらに個別 ^{13}C 標識 Man を用いることで、PRM-A のアラニン部位に対して Man は 3 位の炭素原子において最も近接し、次いで 2 位・4 位の炭素原子が近接していることを特定し、PRM-A と Man の立体構造モデルを組み立てた。PRM-A は糖を認識して複合体を形成する際に、糖分子の 2 位・3 位・4 位の水酸基の立体構造を認識することにより、Man のみを選択的に結合するものと考えられる。

続いて PRM-A 複合体中において、NMR の感度が極端に悪い Ca^{2+} の位置を決めるために、PRM-A の選択的な Man 結合能を保存し、かつ NMR の感度が良い金属イオンとして Cd^{2+} を用いることを考えた。通常 Cd NMR ではわずかな感度の利得により ^{113}Cd が多く用いられてきたが、申請者は NMR の特性から $^{111}\text{Cd}^{2+}$ を選択し、複数の ^{13}C 同位体標識パターンを持つ PRM-A との複合体を作製した。これらの試料を用いて、PRM-A 分子の ^{13}C と $^{111}\text{Cd}^{2+}$ 間の距離を周波数選択 REDOR 法を用いて測定した。その結果、PRM-A のアラニン部位であると言われていた従来の説とは異なり、芳香環部位、特にアントラキノン部位が金属結合部位であることを示した。さらに Man を同時に結合した状態および Man を結合していない状態のいずれにおいても、結合部位の ^{13}C と $^{111}\text{Cd}^{2+}$ との距離を $3.5 \pm 0.2 \text{ \AA}$ と求めることに成功した。この結果は PRM-A と Man の複合体モデル構造と矛盾しない、すなわち PRM-A は Ca^{2+} (Cd^{2+}) を介することによって Man と結合すると考えられる。これらの結果は Ca^{2+} (Cd^{2+}) 存在下での PRM-A の特異的な Man 認識機構の解明に大きく寄与している。

(論文審査の結果の要旨)

本論文で、申請者はアミロイドβタンパクのフィブリル前駆体の構造研究に21番目のアラニン残基に着目し、そのC=OまたはCαを¹³C標識したAβ42を化学合成し、回転共鳴法を選択的な¹³C-¹³C距離測定法として用いることで、フィブリル前駆体においては分子間平行βシート構造が形成されていないことを分光学的に示した。真菌活性および抗HIV活性を示すプラディミシンAに対しては、プラディミシンAやマンノースのさまざまな炭素を¹³C標識し、非選択的な¹³C-¹³C距離測定法であるDARR法を用いることで、複数の¹³C-¹³C距離を得て、複合体におけるプラディミシンAとマンノースの相対的な配置を決定した。さらに、複合体形成に必須なCaの位置に対しては、そのNMRが困難なことから¹¹¹Cdを用いて、選択的な¹¹¹Cd-¹³C距離測定を適用している。本論文で示された研究は、長距離秩序を持たない生体分子複合体の局所構造を決定する手法として有用であり、その内容は学位論文として十分なものである。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものとして認める。また、平成29年1月18日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降