

氏名(本籍)	ふく だ こう いち 福田耕一(京都府)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第2276号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Crystallographic Study on C-type Lectin-like Proteins from Snake Venom (蛇毒由来C型レクチン様タンパク質に関する結晶学的研究)
主査	筑波大学併任教授 薬学博士 水野 洋 (農業生物資源研究所)
副査	筑波大学教授 理学博士 宗 像 英 輔
副査	筑波大学教授 農学博士 祥 雲 弘 文
副査	筑波大学助教授 農学博士 田 仲 可 昌
副査	明治薬科大学教授 理学博士 森 田 隆 司

論文の内容の要旨

糖鎖を特異的に結合する蛋白質はレクチンと呼ばれているが、その中でカルシウムに依存して糖鎖に結合するものがC型レクチンである。現在、C型レクチンはその構造様式の違いにより7つのグループに分類され、蛇毒由来のC型レクチン様蛋白質は、第7グループに属している。今までに、数多くのC型レクチン様タンパク質が蛇毒から単離されており、そのほとんどはC型レクチンの糖鎖認識ドメインのヘテロ2量体である。これら一連の蛋白質は、ホモ2量体のレクチン以外は本来の機能であるレクチン活性は示さず、血液凝固阻害、血小板凝集の惹起あるいは阻害などの機能を持っている。これらの機能を立体構造の面から明らかにするために、今までに、血液凝固阻害活性を示し、血液凝固IX因子及びX因子に結合する蛋白質、血液凝固IX因子に結合する蛋白質についてX線構造解析が行われてきた。しかし、血小板凝集に惹起あるいは阻害など抗血液凝固活性以外の機能をもつ蛋白質の立体構造は未だ明らかにされていない。本論文は、これらの機能をもつ蛋白質の立体構造解明のために、一連のC型レクチン様蛋白質の結晶作製及びX線構造解析を行った。

結晶作製に用いた蛋白質試料は、ガラクトース結合レクチン(RSL)、血小板上の糖蛋白質に結合し、血小板の凝集を惹起するロドサイチン、血小板凝集を阻害するフラボセチンA、von Willebrand因子に結合し、血小板凝集を促進するビチセチン等であり、いずれも蒸気拡散法に従って、結晶の作製に成功した。これらの結晶のX線データは、高エネルギー加速器研究機構のシンクロトロン放射光施設を利用して測定し、それぞれの蛋白質結晶の格子定数、空間群などの結晶学的データを明らかにした。この中で、最も分解能が高く2.5Å分解能までの良質なX線データが得られたフラボセチンAについてX線構造解析を行い、最終的に結晶学的R因子を20.6%まで精密化した立体構造を得ることができた。その結果、フラボセチンAはアミノ酸135残基からなる α 鎖と125残基からなる β 鎖がジスルフィド結合によって結ばれたC型レクチン様ヘテロ2量体が4個集まった8量体構造であることが判った。4個のヘテロ2量体は、それぞれ結晶学的な4回軸によって関係づけられ、その間は新たに見つかったジスルフィドによって結合したユニークな環状オリゴマーであることが明らかになった。

この蛋白質は、血小板上の糖蛋白質(GP1b)に結合することが知られているが、その結合部位について他の2

つの同族蛋白質とのアミノ酸配列の相同性などを手がかりにして予測を行った。それによると、GP1b結合部位の候補としては β 鎖上の表面に露出した数種の親水性アミノ酸残基からなる2つのパッチ領域であることを明らかにした。また、フラボセチンAのGP1bに対する高い親和性はヘテロ2量体の4量化に伴う協調作用であることを推量した。

審査の結果の要旨

一つの構造未知の蛋白質の立体構造をX線解析の手法によって明らかにすることは容易なことではない。X線解析を行うには良質で且つ大きな結晶をつくらなければならない。少なくとも、0.2mm程度の大きさの結晶が必要であり、しかも、そのX線データは高分解能が要求される。構造解析は、蛋白質それぞれに難問が控え、一つ一つ着実にクリアしていかなければならない。このためには、X線結晶学のみならず、コンピュータ科学、生化学、物理化学などの十分な知識や、高度な技術を必要とする。

福田耕一氏は、蛇毒由来のC型レクチン様蛋白質を材料とし、その構造と機能を明らかにするためにX線構造解析を行った。まず、結晶化であるが、一連の蛋白質一つ一つについて数多くの結晶化条件を検討し、その結果、4種類の蛋白質の結晶化に成功し、それぞれの結晶学的データを明らかにした。この中で、最も複雑な構造をもつと思われるフラボセチンAは、2.5 Å分解能のX線データが得られたので、X線構造解析に着手した。この蛋白質は、血小板上の糖蛋白質(GP1b)に結合し、血小板凝集を阻害するため、血小板凝集機構を調べる上において重要であり、また、GP1b結合蛋白質の中で今までに立体構造が明らかにされたものはない等価値の高い蛋白質である。構造解析には、SGI社のワークステーションをフル活用し、解析ソフトウェアとしてはCCP4, XPLOR等を駆使し、最終的に、2.5 Å分解能において結晶学的R因子20.6%まで精密化した構造を決定することが出来た。この蛋白質の全立体構造のデータはプロテインデータバンク(PDB)に登録した。また、得られた立体構造から、フラボセチンAがもつGP1b結合機能について詳細に議論し、GP1b結合部位の候補としては β 鎖上の表面に露出した数種の親水性アミノ酸残基からなる2つのパッチ領域であると結論づけた。

よって、著者は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。