

(様式 5)

指導教員 承認印	
-------------	--

平成 年 月 日

学位（博士）論文の和文要旨

論文提出者	工学府博士後期課程 生命工学 専攻 平成 26 年度入学 学籍番号 14831101 氏名 奥下 慶子 印
主指導教員 氏 名	朝倉 哲郎 教授
論 文 題 目	Structural Analysis of Crystalline Fraction of <i>Bombyx mori</i> Silk Fibroin by using Advanced Solid State NMR (最新の固体 NMR 手法を用いた家蚕絹フィブロイン結晶部の構造解析)
<p>本論文では、家蚕絹フィブロインのうち、全体の約 55%を占める結晶部配列のみを α-chymotrypsin 処理により分離された結晶部試料 (Cp フラクション) について、固体高分解能 ^{13}C NMR 法を駆使した構造解析手法の構築を行った。この結晶部配列は、Ser を含んだ Ala-Gly 繰り返し配列部のことを差し、絹糸中においては β-sheet 結晶相を主に担う構造領域である。特に、本論文では分子の局所的な化学的環境の指標となる化学シフトによる解析のみならず、磁気双極子相互作用に由来したスピン拡散を利用した解析を行い原子間及び構造ドメイン間の距離的な評価のため、緩和時間測定・緩和行列を用いた解析の開発を行い、適用した。</p> <p>第 1 章「緒言」では、家蚕絹フィブロインの構造と不均一構造を解析するための固体 NMR の手法について述べた。家蚕絹は多分野への応用が期待され、物性再現のためには、構造に関する知見が不可欠である。これまで、糸の形態などのマクロな構造に関しては、多くの知見が得られており、アミノ酸配列についても明らかにされている。一方、家蚕絹フィブロインの結晶構造 (Silk II 型構造) やナノスケールのもルフォロジーの詳細については、依然として明らかになっていない。本論文では、主要配列部の試料である Cp フラクションの Silk II 型詳細構造を明らかにするための解析手法の構築を行うことを述べた。特に、不均一な高分子構造解析で実績のある固体 ^{13}C NMR の同種核間スピン拡散を利用した手法を紹介し、これらを組み合わせた解析手法を構築することを述べた。</p> <p>第 2 章「家蚕絹 Cp-fraction の Silk II 型構造における ^{13}C NMR ピークの各ドメインへの帰属」では、Cp フラクションの Silk II 型構造解析の第一歩として、化学シフトの利用による二次構造の決定を行った。Cp フラクションの基本配列は、$(\text{Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly})_n$</p>	

であり、Silk II 型構造中では 2 つの β -sheet 構造と秩序性の低い Distorted β -turn の構造で構成されている。Ala の側鎖炭素については 1 次元スペクトルにおいて化学シフトが明確に分離検出されるため、2 次構造に関する帰属もなされている。しかし、3 次以上の立体的な構造を議論するためには、側鎖を有するもう一つの残基である Ser に関する詳細帰属が重要である。本章では、炭素核についての 2 次元同核種相関 NMR 法を用いて、Ser について 4 種類の化学シフトを検出した。本研究室で用いられてきた化学シフトマップと Ala 側鎖ピークにおける相対ピーク強度との傾向比較から、4 種類の Ser ピークは 3 種類の β -sheet とランダムコイルと帰属された。

第 3 章「 β -シートドメインの 3 次元的なパッキング構造評価のための定量的解析手法の検討ー構造既知である逆平行 β -シート構造を持つアラニン 4 量体による検討」では、3 次構造のパッキングも含めた構造解析において実績のある ^{13}C - ^{13}C 同種核相関 NMR ピークのビルドアップカーブ解析についての基礎検討を、3 次元的な構造座標が既知である逆平行 β -シート Ala4 量体(AP- β -Ala₄)を用いて行った。本章において、既存法である Proton Driven Spin Diffusion (PDS) 法と、測定感度が改良された手法として知られる ^1H - ^{13}C Dipolar-assisted Rotational Resonance (DARR) 法の解析結果を比較・検討を行い、距離のみを考慮したビルドアップカーブの再現には DARR 法がより適していることが実験的に示された。また、ビルドアップカーブ解析における構造の一致を判断するための許容誤差を決定した。さらに、より長距離の相互作用を反映する混合時間後半でのビルドアップカーブ強度の再現には、炭素核のスピン-格子緩和時間の項が必要であることが実験的に示された。

第 4 章「化学シフトが一致する候補構造を仮定した ^{13}C - ^{13}C DARR ビルドアップカーブ解析の応用と Silk II 型構造を取る家蚕絹 Cp フラクシンのための手法開発」では、本研究室の (AG)₁₅ モデルペプチドの研究で提案された 2 種類の分子間配置の異なる β -sheet 構造について、前章で検討した DARR のビルドアップカーブ解析を適用した。生体由来試料である Cp フラクシンにおいては、単純化された (AG)_n モデルペプチドの場合とは異なり、配列中に Ser 残基が存在するため、炭素間の有効距離の組み合わせの複雑化や ^{13}C 核によるラベル化率の違いが生じ、ビルドアップカーブの再現に影響を与えることが示された。検討後、最終的に得られたビルドアップカーブの解析結果では、許容誤差範囲に匹敵する実験値との一致が示されたが、完全な一致のために 2 つの β -sheet 間の位置関係について考慮する必要性の有ることが示唆された。

第 5 章「家蚕絹 Cp フラクシンの Silk II 型構造中における β -シートドメインのモデリングのための考察」では、第 2 章よりも長距離の炭素核間相関が検出される条件で 2 次元同核種相関 NMR 測定を行い、第 4 章で課題とされた β -sheet ドメイン間の近接について議論された。さらに、 ^1H 核の緩和時間の結果を組み合わせることで、Cp フラクシン中に含まれる秩序性の低い領域も含めた階層的なドメインサイズについても検討した。また、水中で試料を測定することにより、 β -sheet 結晶相中における 2 種類の β -sheet 相の分布状態についても議論した。

第 6 章「結論」では、論文全体の総括し、各章の結論と意義についてまとめた。