

論文内容の要旨

申請者氏名 野村 誠

Nuclear magnetic resonance (NMR) is one of the most powerful tools for the structural studies of biological macromolecules. Here a novel method is developed to obtain the structural information of the protein using a paramagnetic metal. The paramagnetic metal chelate complex Cu^{2+} -iminodiacetic acid (Cu^{2+} -IDA) was mixed with ubiquitin, a small globular protein. Quantitative analyses of ^1H and ^{15}N chemical shift changes and line broadenings induced by the paramagnetic effects indicated that Cu^{2+} -IDA was localized to a histidine residue (His68) on the ubiquitin surface. The distances between the backbone amide proton and the Cu^{2+} relaxation center were evaluated from the proton transverse relaxation rates enhanced by the paramagnetic effect. These correlated well with the distances calculated from the crystal structure up to 20 Å. Here, I show that a Cu^{2+} -IDA is the first paramagnetic reagent that specifically localizes to a histidine residue on the protein surface and gives the long-range distance information which is useful for the structure determination of proteins.

The structure of the trinucleotide disease related DNA oligomers with its recognition drugs was studied. The NMR structure of the CGG/CGG triad DNA complexed with naphthyridine carbame dimer (NC) was determined by the complete relaxation matrix calculation approach. The binding stoichiometry of NC to the CGG/CGG triad was exclusively 2:1, and two NC intercalated to the CGG/CGG triad. The four chromophores of NC formed hydrogen bonds with the guanine in the CGG/CGG triad, and were stacking each others. Two cytosine bases in the CGG/CGG triad were flipping out. The residual dipolar couplings (RDCs) of the DNA bases and the NC chromophores confirmed the flipping out of these two cytosine bases and revealed the non-flexible nature. The 1-ns molecular dynamics (MD) simulations by AMBER8 showed these two flipped cytosine bases interacted with the hydrophobic surfaces consisting of the alkyl linkers and chromophores of NC and DNA bases. This new type stacking interaction can stabilize the flipped out structure. Comparison with the structures of naphthyridine azaquinolone (NA) complexed with the CAG/CAG triads revealed the common mechanisms of the recognition. This information is useful for the drug design to enhance the specificity and affinity to the CAG/CAG, CGG/CGG, and other CXG/CXG triads.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 野村 誠

NMR による生体高分子の立体構造決定では、5 Å以内の水素核間で観測される NOE を用い、多数の短距離情報を集積することにより全体構造を構築する。近年の NMR 構造決定技術の発展により高分解能構造が迅速に得られるようになってきたが、短距離情報を用いるという技術的制約のために、全体構造が構造決定作業の最終段階でしか見ることができないことや、長い棒状の分子の立体構造決定が困難であるということが問題点として指摘されている。これらを克服する手法の1つが 20 Å程度の長距離情報が得られる常磁性金属緩和法であり、主に金属タンパク質で用いられてきた。金属タンパク質以外のタンパク質に適用する場合、特殊なタグや化学修飾を付す必要があり、その利用は制限される。そこで申請者は特殊な操作を必要としない汎用性の高い常磁性金属緩和法を開発し、長距離構造情報を取得することを研究目的とした。

常磁性金属緩和法では長距離情報は常磁性金属のもつ電子スピンと観測している核スピンの間で生じる磁気緩和情報から得られる。そこで常磁性金属をタンパク質に固定化する必要が生じる。本論文ではユビキチンをモデルタンパク質として用い、Mn や Gd などの常磁性金属およびそれら常磁性金属キレート錯体との相互作用を NMR 測定によって網羅的に解析した。ほぼ全ての常磁性金属がユビキチン表面に複数の結合部位を持っていたが、唯一、例外的に銅イミノ二酢酸錯体 (Cu-IDA) がタンパク質の表面に存在するヒスチジン残基近傍に局在することを発見した。次にこの局在がヒスチジン残基との相互作用に基づくものであるかどうかを確認するために、NMR 法と電子スピン共鳴法 (EPR) を用いて解析したところ、ユビキチンと Cu-IDA が 1:1 で結合していること、ユビキチン表面にあるヒスチジン残基のイミダゾール環の窒素原子が Cu 原子に平面 4 配位で直接配位結合していることが明らかになった。最終的に、Cu-IDA の有無によるユビキチンの緩和時間の差から、Cu-IDA を起点とする最長 20 Å、精度 3.5 Å の距離情報を得ることに成功した。この手法が膜タンパク質をはじめとする多くのタンパク質に適用可能であることを示し、新規の長距離情報収集技術を確立した。

また申請者はトリプレットリピート DNA を認識する一群の薬剤とその結合サイトである DNA との複合体の NMR 構造解析に成功した。DNA の安定同位体標識技術や分子動力学法、RDC 法などを駆使し、一群の薬剤が DNA と人工塩基対を形成していること、余分となった DNA 塩基をフリップアウトさせていること、フリップアウトした塩基が DNA の主溝に沿ってスタッキングする新しい安定化機構を有することなどを明らかにした。

以上のように、本論文は新規 NMR 技術の開発だけでなく、トリプレットリピート認識薬剤に関する新規知見を提供するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。