

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所 属 (主指導教官)	生体高分子構造学 (箱嶋 敏雄 教授)		
氏 名	三島 正規	提 出	平成 13 年 1 月 9 日
題 目	Direct Observation of Hydrogen Bonds and NMR Structural Analyses of Nucleotide-Binding Proteins  (NMRを用いたヌクレオチド結合蛋白質における水素結合の直接観測と立体構造解析)		

要旨

Hydrogen bonds play key important roles for stabilizing biomolecular structure and for recognition in biomolecules. Recently, the presence of scalar couplings between atoms in donor and acceptor groups of a N-H---O=C hydrogen bond in proteins were reported. These findings provide powerful tools for direct identification of hydrogen bonds in proteins by heteronuclear NMR.

However, these scalar couplings across hydrogen bonds are very small, less than 1 Hz. Therefore, the detection of hydrogen bonds is difficult, suffering from low sensitivity in the experiments. Despite this difficulty, I was able to observe hydrogen bonds through scalar couplings in a protein whose structure was unknown, and demonstrated that the obtained information could facilitate the structural determination.

I have determined the solution structure of hMTH1 (18 kDa) using the direct determination method of hydrogen bonds. hMTH1, a repair enzyme, is a pyrophosphohydrolase which hydrolyses oxidized nucleoside triphosphates (8-oxo-dGTP and 2-OH-dATP) to yield its monophosphate form, and thus prevents misincorporation of the oxidized nucleoside into genome DNA. These oxidized DNA precursors have potentials to produce alternations in DNA by GC-AT conversions, which are thought to be related a wide variety of physiological phenomena. In addition, from chemical point of view, the molecular recognition of hMTH1 is

intriguing, because the structure alternation on nucleotides caused by oxidation is much smaller than other modifications, such as a thymine dimer formation caused by ultra-violet irradiation. I was interested in the mechanism how the protein recognizes such a small chemical modification.

To clarify structural basis for molecular recognition and enzymatic reaction of proteins, tools for detailed analyses of interaction between proteins and substrates/ligands are indispensable. In particular, protein-phosphate interaction is of special importance as many protein ligands contain phosphate groups. Nevertheless, using currently available NMR techniques, information concerning interactions between proteins and phosphates of ligands is difficult to be obtained, due to rareness of protons in the vicinity of phosphates. Development of the tool has been one of principal aims of this study. I have developed a novel NMR technique, "HNPO", which allows direct identification of intermolecular hydrogen bonds formed between amide groups in protein and phosphates. Although this novel technique is a logical extension of a previously reported method for detection of intra-molecular hydrogen bonds in proteins, this is the first technique to identify unambiguously donor and acceptor groups of N-H---O=P hydrogen bonds. A series of experiments were also designed for measurements of the magnitude of the scalar coupling constants between  $^{15}\text{N}$  and  $^{31}\text{P}$ , and between  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$ . I will discuss structure-function relationship of hMTH1 and the methodological development in my thesis.

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 三島 正規

平成13年1月9日に提出された論文は、研究核磁気共鳴（NMR）法による溶液中でのヒト修復酵素 hMTH1 の立体構造の決定、水素結合の水素供与基と水素受容基の間にあるスカラーカップリングを検知することでのヌクレオチド結合蛋白質における水素結合の直接観測の手法の開発とその適用を記述している。

申請者は蛋白質精製や同位体ラベル試料の調製といった生化学的手法と NMR スペクトルの解析を併用して、hMTH1 の構造解析を行った。その結果、hMTH1 は7本のβシートと2本のαヘリックスからなるα+βフォールドの立体構造をとること、この構造は類縁の修復酵素と類似構造をもつこと、構造決定に際してβシート間やαヘリックス内の主鎖間の水素結合がスカラーカップリングにより直接観測できること、ヌクレオチド結合蛋白質として低分子量G蛋白質 Ras を用いて GTP のリン酸基との水素結合をスカラーカップリングにより直接観測できることを示した。

申請者はほぼ単独で、hMTH1 の試料調整、NMR による立体構造決定、相互作用解析などの一連の実験を行った。立体構造決定と得られた構造に対する評価・解析は緻密、かつ正確に行われ、溶液中の立体構造解析として十分な分解能が得られおり、申請者が生化学、構造生物学の手法と専門的知識を修得していると判断できる。更に、リン酸基への水素結合を直接観測するスカラーカップリング法を開発し、それが有効であることを示したことにより、より高度な NMR 解析の専門的知識を修得していると見なせる。

また、論文全般におりて、記述も水準に達していると判断された。

以上のように、本論文は遺伝子修復研究の構造生物学に貴重な基礎データを提供するとともに、NMR による構造研究に新しい手法を導入したもので、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。