

氏 名	こ ばやし のぶ お 生 小 林 伸 生
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 1821 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	Recognition of Adenine and Guanine Bases in Mononucleotide-Binding Proteins (モノヌクレオチド結合蛋白質におけるアデニン塩基とグアニン塩 基の認識)

論文調査委員	(主 査) 教 授 郷 信 広 教 授 加 藤 重 樹 講 師 白 石 英 秋
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

蛋白質は生体内でそれぞれ特有の機能を発揮する精密な分子機械である。その空間上の確に配置された原子や原子団により、そのような機能を発揮することが可能となっている。すなわち蛋白質の機能メカニズムを理解するには、その立体構造に関する理解が不可欠である。

申請者は、共通分子(モノヌクレオチド中のアデニン塩基とグアニン塩基)の認識を司る部分について蛋白質立体構造の比較と分類を行った。アデニンとグアニンはともにプリン環を骨格に持つ分子構造上類似した塩基である。これら2つの塩基を結合している蛋白質の部分構造のデータベース解析から、その結合様式を明らかにすることがこの研究の目的である。

この部分構造比較を行うために、申請者は蛋白質-リガンド複合体構造中の、リガンド分子を取り囲む原子(surrounding atom, SA)の空間配置を比較する計算機手法を開発した。このSAの決定に、ドローネ分割という、幾何学的な空間分割方法を利用している。そして次に異なる複合体、蛋白質Aと蛋白質B、とのSAの空間配置の類似性を評価する。

蛋白質立体構造データベース・PDB(Protein Data Bank)にある、アデニンとグアニンモノヌクレオチドを結合する蛋白質の立体構造すべてのペアに対してこの方法を適用した。その結果申請者は、ある2つの蛋白質、cAMP-dependent protein kinase(cAPKと略す)とD-Ala:D-Ala ligase(DD-ligaseと略す)とでは、全体構造が異なるにも関わらずそのadenine結合部分構造が共通であることを発見した。この共通部分構造は、連続する4残基からなるセグメントと、アミノ酸配列上離れた3残基により構成されていた。特に4残基セグメントは、その主鎖部分の構造類似性が高く、またその主鎖部分でアデニン塩基を水素結合により認識していた。さらに、cAPKとDD-Ligaseのそれぞれと全体構造が類似する他の蛋白質でもこの4残基セグメントの主鎖構造が保持されていた。これらの蛋白質では、その立体構造にモノヌクレオチドを結合していない。このアデニン認識部分に対応する部分構造の高い類似性は、モノヌクレ

オチド結合部分の明らかでない蛋白質も同じ部位でそれを結合する可能性を強く示唆する結果である。また、この4残基セグメントは構造はよく類似しているが、そのアミノ酸配列の共通性は低く、配列解析からは共通部分であるとみなすことはできない。構造を調べることにより初めてその共通性が明らかとなったという意味で、「配列モチーフ」に対する「構造モチーフ」と言える。申請者は、これら2種の蛋白質は、ATPを認識するためにこの構造に収斂進化したものであると考えている。

グアニン塩基結合部位の構造比較から申請者は、すべてのグアニン結合蛋白質に保存された原子配置のパターンを見つけた。その原子配置はグアニン特有の原子(N1, N2, O6)との水素結合位置にちょうど対応していた。そのパターンは、A) 2つの酸素原子による水素結合、B) 1つのカルボニル酸素原子によるbifurcated(二また)水素結合、の2パターンであった。また、それぞれのパターンで結合する蛋白質を詳細に調べた結果、A)の水素結合パターンはグアニンを強固に結合するためのもの、B)の水素結合パターンはグアニンとヒポキサンチン(グアニンのN2アミノ基がない塩基)の両方を結合できるためのものであると思われる。

グアニン結合部位に見られた共通性に対し、アデニン結合部位には共通に配置された原子は全く見られなかった。グアニンと分子構造上異なる、識別に重要だと思われるN1とN6にさえ共通性はなく、そこに水素結合の相手が全く存在しない結合部位が37のデータ中14もあった。つまりアデニンを結合する際、アデニン特有の原子を認識する必要はないことになる。これにより、共通性のない多様なアデニン結合様式が明らかとなった。

また、これら塩基とのスタッキングにより結合の安定化に関与していると思われる原子団を調べたところ、ここでもアデニン結合部分における多様性が見られた。グアニンの場合は芳香環のみがスタッキングに関与していたのに対し、アデニンの場合は芳香環と同じ数の主鎖カルボニル基がアデニン環と平行に位置していた。これらカルボニル基はアデニン環と π 電子による相互作用ができるとと思われる配置であり、そのような相互作用をグアニン環よりアデニン環が好むようだ。ここでもアデニンの結合部位は多様であることが示された。

このようなアデニンとグアニンとでの結合様式の違いは、それらのdipole momentの大きさの違いにより説明される。より大きなdipole momentを持つグアニンを結合するには、それを緩和するために酸素原子との水素結合が必要なのであろう。

論文審査の結果の要旨

蛋白質の機能発揮メカニズムの理解には、立体構造の理解が不可欠である。蛋白質立体構造構築原理を理解するためのアプローチとして、一つの構造を物理化学的な観点から詳細に調べる方法(物理化学的アプローチ)とデータベースにある多くの構造を比較・分類することから重要な要素を抽出しようとする方法(博物学的アプローチ)とがある。近年の立体構造データベースの急激な充実に伴い、後者のアプローチが有効性を増してきている。

申請者は新しい試みとして、この博物学的アプローチを共通機能を発揮する部分構造に適用している。従来蛋白質の構造類似性から機能的類似性が議論されてきたが、申請論文の方法ではまず機能的類似部分

に焦点を絞った部分構造を対象にして研究を行っている。蛋白質の構造類似性と機能類似性との関係は構造の複雑さをどう表現するか、またそれらが必ずしも1対1に対応しないことなどの問題を含んでいる。申請者は機能を特定のリガンド結合に限定することで明確にし、そのために蛋白質がとる構造戦略を理解するアプローチにより、この問題にうまく対処している。

申請者が開発した特定分子を結合する部分構造比較法により、非常に異なる全体構造をとる蛋白質に共通のATP認識部分構造が発見された。しかもこの部分構造は、それぞれの蛋白質と全体構造が類似する蛋白質群においても共通に存在するものであることが明らかとなった。このように機能部分構造の比較・分類から共通する重要な部分を特定し、その重要性を他の全体構造類似蛋白質に一般化したことの意義は大きい。この方法を他のリガンド分子や部分構造に適用すれば、同様の重要部分が抽出できる可能性を強く示唆したからである。

また、アデニンモノヌクレオチドとグアニンモノヌクレオチドを結合している部分構造すべてを対象とした比較・分類から、アデニン塩基とグアニン塩基との結合様式の違いを明らかにした。アデニン塩基の結合部分では、全く水素結合なしに結合している部分構造があるなど非常に多様な結合様式が見られてのに対し、グアニン塩基の結合部分では、必ず水素結合部位に酸素原子による水素結合があり、決まった結合様式が観測された。申請者は、アデニン塩基とグアニン塩基との dipole moment の大きさの違いが原因であると述べている。大きな dipole moment をもつグアニン塩基は、それを結合するにはそれを緩和する酸素原子が決まった位置に必要であるが、小さな dipole moment をもつアデニン塩基ではそれが必要ではなく多様性が許されるのだと判断している。

以上のように、申請者は蛋白質によるモノヌクレオチド認識様式を立体構造のデータベース解析から明らかにした。よく似た分子構造をもつアデニン塩基とグアニン塩基を結合する様式に違いが見られたことは、それらの分子特性を考える新たな視点を与えたことは高く評価できる。これらの内容は、蛋白質立体構造理解に対する博物学的アプローチに新たな方向を切り開いたもので、その方向性・結果ともに生物物理学や蛋白質工学などの研究分野に重要な貢献をなしたものであると言える。

従って、本申請論文は博士（理学）の学位論文として十分な価値を有するものと認める。なお、主論文に報告されている研究業績を中心に、参考論文の内容、ならびにこれらに関連した研究分野について口頭試問を行った結果、合格と認めた。