The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Study on structure and releasing mechanism of Neocarzinostatin.
Author(s)	髙島, 浩幸
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46537
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【6】

氏　　名	髙　島　浩　幸（たかしま　ひろゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　１９６８１　号
学位授与年月日	平成 17 年４月 15 日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学　位　論　文　名	Study on structure and releasing mechanism of Neocarzinostatin. （ネオカルチノスタチンの構造と解離機構の研究）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　小林　祐次 （副査） 教　授　今西　　武　　教　授　高木　達也　　教　授　土井　健史

論　文　内　容　の　要　旨

ネオカルチノスタチン（NCS）は、放線菌が産生する抗生物質であり、強い細胞致死活性を有することが知られている。NCS は、in-vitro での DNA 切断活性を持つ低分子性化合物（NCS クロモフォア、分子量 659）とその運搬タンパク質（113 残基、分子量 11,000）との複合体として存在する。NCS クロモフォアは、二本のアセチレン結合、二重結合、および、エポキシ結合を含む特異な構造により、化学的に極めて不安定であり、生理的条件下でも容易にラジカルを発生することが知られている。NCS タンパク質部分は、極めて強い結合（Kd＝～10^{-10} M）によりクロモフォアを安定化しつつ、細胞膜、核膜を貫通し DNA の近傍で放出するという生物活性を持つものと考えられている。こういった複合体としての一連の活性発現メカニズムの理解には三次元構造の解析が不可欠である。NCS タンパク質は、クロモフォア以外にも様々な分子を結合することが知られており、タンパク質としては比較的小さな分子量を持ち安定性も高いことから、生体内での低分子薬剤運搬体としての応用も検討されている。さらに、タンパク質による基質の分子認識のモデルとしても知られており、我々の研究成果は、それらの研究にも広く貢献できるものと考えられる。

我々は、まず、安定同位体ラベルを行わないままプロトン一種核による二次元 NMR 法を用いてホロ体 NCS の構造解析に着手した（学位論文第一章）。その結果、７本鎖の β-シートからなる β-バレル構造が決定された。クロモフォアとの分子間 NOE は、β-バレルの内側の β-シートとの間に集中していたことから、これがクロモフォアの結合部位であることがわかった。クロモフォアは疎水性コアを形成する側鎖と β-シートの間のポケット状のくぼみに結合しており、NOE の詳細な解析からその立体配位も明らかになった。ポケットの中の疎水性コアは、Trp 39、Leu 45 および Phe 52 の側鎖から形成されていた。また、β-バレルの外側には内側のシートに直交するよう長く張り出したループ構造があり、この先端の Phe 78 の側鎖がクロモフォアの活性中心であるエンジイン環に蓋をするように位置していた。その後、X 線結晶解析により、結晶中のホロ体 NCS の三次元構造が決定され、我々の NMR の結果と同じ構造的知見が確認された。アポ体 NCS の結晶構造もほぼ同時期に決定され、アポ体とホロ体の NCS タンパク質部分が結晶中において極めて類似した構造を持つことがわかった。

これら一連の三次元構造解析の中で疎水性相互作用を主とするクロモフォアの安定化についての構造的知見は積み重ねられたものの、活性発現の上で重要なクロモフォア結合と解離のメカニズムは不明のままだった。非常に強い複合体の結合常数から考えると、結晶構造で観測されたクロモフォア結合前後の三次元構造の差の小ささは一つの謎

である。プロトン一種核二次元 NMR 法のみによって得られた溶液中の三次元構造の精度は低く、結晶中の構造およびアポ体との構造の詳細な比較はできなかった。特に、解離メカニズムとの関与が示唆されたループ構造の精度が低かった。その一方で、クロモフォア結合と解離メカニズムへの関心は高く、アポ体 NCS の NMR を主とした幾つかの構造解析結果が報告されている。これらの中には、結晶構造の結果に反して、アポ体とホロ体の三次元構造および運動性の違いを示唆するものもある。

我々は次のステップとして、多核多次元 NMR 法による溶液中の NCS 構造の精密化を行った（学位論文第二章）。多核多次元 NMR 法の測定のために、我々は、NCS 産生菌である放線菌、*Streptomyces carzinostaticus*、そのもので安定同位体ラベルを行った。さらに、我々は、分散コンピューティングの適用で、膨大な数の初期構造（10,000 個以上）から出発し、構造的自由度を網羅的に評価することで、精度の高い三次元構造を決定する計算手法を開発した（学位論文第三章）。そして、クロモフォアの結合と解離に関与すると考えられる幾つかの興味深い構造的知見が得られた。

まず、以前に行ったプロトン一種核二次元 NMR 法の結果との大きな差は、ループ部分の構造の収束に見られた。β 鎖どうしを結んでいるループ部分が、その構成要素であるターン構造も含めて全て決定された。我々は、^{13}C-NMR の緩和時間を測定し、その収束の良さを裏付けることで構造の精度を実証した。そして、幾つかのループで結晶構造との間にターン構造の差があることがわかった。また、NCS の溶媒表面部分に位置しこれまでクロモフォア結合の安定化への寄与があまり議論されてこなかったアミノ糖部分が 3 本の爪のようなループ（Loop 39-45、75-84 および 98-107）によって溶液中においてしっかりと固定されていることがわかり、構造の安定化に大きな役割を持っていることが推測された。一方、結晶中の構造では、このアミノ糖部分を挟み込むループの構造が溶液構造に比べて緩くなっていることがわかった。

溶液中と結晶中の構造の違いは、Pro 49 を含み結合部位の端に位置する短く張り出したループ構造の違いに顕著に現れており、さらにこのループの違いは、Asp 51 および Arg 70 の側鎖の水素結合のスイッチによって引き起こされていることがわかった。また、クロモフォアのアミノ糖部分を固定している 3 本のループのうち 2 本が結合部位の外側にある疎水性コアによって安定化されていることと、結晶構造との比較でこの部分にも構造の違いがあることがわかり、それが結晶中でのループの B 因子の高さに関係していることが示唆された。

そこで、下記のような三状態間の平衡を仮定することで、溶液と結晶の構造の差を説明し、同時に強い複合体の結合常数と結晶でのホロ体とアポ体の構造の差の小ささを説明することができた。結晶のホロ体 NCS は、結晶化の条件により、クロモフォア解離の中間体の構造（open ホロ体 NCS）を反映していると考えられる。

$$\underset{(=\text{溶液構造})}{\text{ホロ体 NCS}} \underset{k_{open}}{\overset{k_{close}}{\rightleftharpoons}} \underset{(=\text{結晶構造})}{\text{open ホロ体 NCS}} \underset{k_{release}}{\overset{k_{bind}}{\rightleftharpoons}} \text{アポ体 NCS}+\text{クロモフォア} \qquad (1)$$

これは、ホロ体 NCS の結晶がクロモフォア解離を引き起こす条件下で得られ、それゆえ、アポ体との二量体として結晶化していることとも一致している。また、アミノ糖部分を挟み込んでいるループ構造の変化は、上に述べた水素結合のスイッチに起因することとそれに塩基性の側鎖 Arg 70 と Arg 71 を活性中心とするターゲット DNA との相互作用が関与している可能性があることを示した。

論文審査の結果の要旨

放線菌が産出する抗腫瘍性抗生物質であるネオカルチノスタチン（Neocarzinostatin、NCS）は、非常に不安定な低分子クロモフォアと蛋白質が 10^{-10} M といった解離定数を持つ強固な複合体を形成している。高島浩幸君は NCS のホロ体の溶液構造を ^{1}H の二次元 NMR 測定とディスタンスジオメトリー法により決定し、活性中心であるエンジイン環をはじめ、反応性に富むクロモフォアを、NCS が水溶液中でどのように蛋白質部分により保護しているかを示した。次に、放線菌を安定同位体培地で培養することに成功し、多核多次元に供する安定同位体で標識された NCS を得た。それと並行してディスタンスジオメトリー法を再検討し、分散コンピューティングの適用により、膨大な数

の初期構造から十分広い構造空間を探索することにより、初期構造に依らない精度の良い蛋白質の三次構造を決定できることを見出した。まず 21 残基の生理活性ペプチドであるエンドセリンの系に適用して、この手法の妥当性を示した。次に、高島君が開発したこの手法を用いて、安定同位体で標識された NCS の構造を再検討した結果、一般に解析が困難で、溶液中では決まった構造をとらないと考えられるループ部分について、詳細な構造情報を得ることが出来た。この情報により、NCS がその安定な複合体から、標的分子である DNA 近傍でクロモフォアを放出するメカニズムを解き明かすことに成功した。以上のように高島君の本論文は、合理的薬物設計への一つの大きな道筋をつけたものであり、博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認められる。