



Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy to Pharmaceutical and Agricultural Research

Kanaori, Kenji

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

1996-09-18

(Date of Publication)

2012-07-06

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2070

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3129833>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002070>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	かな おり けん じ 金 折 賢 二	(高知県)
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	
学位記番号	博ろ第44号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成8年9月18日	
学位論文題目	Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy to Pharmaceutical and Agricultural Research (核磁気共鳴分光法の医農薬研究への応用)	
審 査 委 員	主査 教授 赤 坂 一 之	
	教授 土 屋 禎 三	教授 山 村 公 明
	教授 相 蘭 泰 生	教授 橋 秀 樹

論 文 内 容 の 要 旨

核磁気共鳴 (NMR) 分光法は現在、医薬や農薬などの研究開発において、様々な生物学的な問題を原子レベルで解析することのできる手法として広く用いられている。特にこの10年の生体高分子の三次元構造解析へのNMRの応用はめざましく、溶液中のタンパク質や、核酸の高次構造をX線結晶解析と同等の精度で決定することが可能となった(1)。それ故、現在の医農薬の開発においてNMRは、主に生体高分子の構造決定のツールとして捉えられている。しかしながら、三次元構造決定が不可能である対象物も多く、それらに対して、NMRが有効な問題解決の手段として用いられているとは言い難い。NMRで解析が難しい対象物の性質としては、次に挙げるようなものが考えられる。

- 1 微量なサンプルしか得られない
- 2 分子量が3万以上
- 3 容易に会合する

本論文では、そのような通常のNMRによる精密立体構造解析が困難な系に対しても有効にNMRを応用することが可能であり、それに基づいてそれらの生理活性を明らかにできることを示す。以下に各章の要旨を述べる。

ペプチドの会合・沈殿は、近年、バイオメディカルな問題、例えば、ダウン症や、アルツハイマー症(2)(3)などの原因の一つと考えられ、そのメカニズムの解明が重要な課題となっている。また、タンパク質の大量発現系を構築する際に、細胞内での目的タンパク質の不可逆的会合といった、バイオテクノロジー的な視点からも注目されている。従来、ペプチドの会合・繊維化の研究といえば、電子顕微鏡や、近紫外分光 (UV) により濁り度の測定、極薄セルを用いた円二色分光 (CD) または、フーリエ赤外分光法 (FTIR) によるものであった(5)(6)。これらの方法では、ペプチドの会合についてマクロな情報は得られるが、ミクロの情報、即ち、ペプチドの、どの領域が、どの様な相互作用によって会合に関与しているのかといった情報は得ることはできない。第一章では、ヒトカルシトニン (hCT) が水溶液中で会合・繊維化するメカニズムを、その会合過程に、高感度600MHz NMRを用いて二次元スペクトルを連続的に測定することによって明らかにしたものである。カルシトニンは

カルシウムーリン代謝に重要な役割を果たしている32残基のペプチドホルモンであり、骨粗鬆症の薬剤として用いられている。hCTは水溶液中で容易に会合し、不溶性の繊維として沈殿することが知られており(4)、静脈注射による患者への投与の際にシリンジ中でゲル状態になることが治療上の問題となっている。最近、hCTの繊維化が分光学的手法(電子顕微鏡, UV, CD, 蛍光, FTIR)により研究され(5)、hCTの繊維化は二段階核形成機構(6)に従うことや、繊維形成時に α -ヘリックスと β -シート構造をとることも示されたが、繊維化しにくいhCTの誘導体開発のためには残基レベル、原子レベルの情報が不可欠であった。

NMRの結果は、繊維化の初期過程において、まず最初にN末端(Cys¹-Pro²³)領域が繊維の核形成に関与し、次いで繊維の成長段階において、ゆっくりとC末端領域(Gln²⁴-Pro³²)が関与していくことを示した。さらに、二次元NMRスペクトルの時間変化を詳しく解析すると、N末端領域の残基のなかでもCys¹、Leu^{4, 9}、Met⁸、Tyr¹²、Asp¹⁵、Phe^{16, 19, 22}らの疎水性残基が繊維化に関与していることが明らかとなった。これらの残基はすべて両親媒性ヘリックスの疎水性側に存在する残基であることから、N末端領域の疎水性残基の分子間相互作用により分子が会合し、繊維の核が形成することが示唆された。また、繊維形成条件下と非形成条件下のhCTのアミドプロトンの重水素への交換速度を比較すると、幾つかの残基について繊維形成条件下の方が遅く、分子間相互作用による水素結合の形成が示唆された。結論として、hCTの繊維化は、N末端部分の疎水性残基間の相互作用によって開始し、C末端部分がそれに続く。この会合分子は水素結合によって安定化されており、これが核となって繊維が成長していくと示唆された。

また、尿素溶液中でhCTの繊維化が進行しないことを見だし、尿素中のhCTのNMRスペクトルを測定することにより、尿素とhCTの相互作用についても調べた。尿素存在下と非存在下の各残基のアミドプロトンとC α プロトンの化学シフトの変化を比較すると、N末端領域では大きく、C末端領域では小さかった。側鎖のプロトンについては尿素存在下と非存在下で化学シフトはほとんど変化しなかった。これらの実験事実は、尿素とペプチドの相互作用は弱く、尿素は主としてN末端領域と弱く相互作用することにより、hCTのモノマー状態を安定化し、会合を抑制していることを示唆している。しかしながら、hCTのN末端がカルバミド化すると、尿素溶液中でさえもhCTは速やかに会合した。カルバミド化により正電荷が失われN末端部分の疎水性が増したがために、尿素存在下でも分子会合が急速に進行したものと考えられる。カルバミド化されたhCTもN末端部分から会合することが二次元スペクトルから示された。これらのhCTの繊維化の研究により、N末端部の疎水性がhCTの繊維化の促進に重要な役割を果たしていることを意味しており、反対に、その部分の疎水性を減少させることで繊維化が抑えられることが示唆された。

第二章ではカドミウム-113 NMRを用いて、分子量10万のキャベツ由来の亜鉛金属酵素ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ(HDH)の生理活性における金属の役割を研究したものである。HDHは、ヒスチジン生合成の反応の最後の二段階の反応、すなわち、ヒスチジノールをヒスチジナルを経てヒスチジンへと酸化する反応を触媒する酸化還元酵素であり、補酵素としてNAD⁺を必要とする(7)。ヒスチジンの生合成を阻害することにより、植物の成長を止めることが期待できるため、HDHの阻害剤は、新規の除草剤の母核化合物の発見(リードジェネレーション)に繋がる可能性がある。HDHの構造情報は阻害剤をデザインするにおいて重要であるが、HDHは分子量が大きすぎるため、NMRによる精密立体構造解析は不可能であり、X線結晶解析による三次元構造もまだ報告されていない。

HDHはサブユニットあたり1個の亜鉛イオンを含んでおり、この亜鉛イオンを除くと酵素活性は失われる(8)。しかしHDHの反応における金属イオンの役割についてもほとんど解明されていない。

NMRによる金属酵素の研究においては、カドミウム-113 (^{113}Cd) をプローブとする手法が広く用いられてきた(9)。 ^{113}Cd NMRのケミカルシフトや線幅は、配位しているリガンドの種類、数、ジオメトリー、化学交換によって敏感に変化するため、 ^{113}Cd NMRを測定することにより、金属酵素内の金属結合部位について重要な知見を得ることができる。

HDHのアポ化酵素を準備し、カドミウムを加えてカドミウム置換HDH ($[\text{Cd}]\text{HDH}$) を精製し、活性を測定すると $[\text{Cd}]\text{HDH}$ は、 $[\text{Zn}]\text{HDH}$ と同程度の活性を示した。 ^{113}Cd (95%) で再構築したHDH ($[\text{Cd}]\text{HDH}$) の ^{113}Cd NMRのスペクトルは、110ppmに1本のシグナルを与えた。このシグナルの強度は活性と比例したことから110ppmのシグナルがHDHの金属結合部位に結合したカドミウム由来のシグナルであると結論づけられた。このケミカルシフト値は、N原子とO原子が配位していることを示しており、アミノ酸残基で言えば、ヒスチジンとアスパラギン酸・グルタミン酸の組み合わせであると考えられる。

$[\text{Cd}]\text{HDH}$ に基質であるヒスチジノールやヒスチジナルを加えると、複合体のシグナルは、それぞれ、210ppmと190ppmへ大きくシフトした。この結果は、HDHの金属イオンが活性部位に位置しており、反応に関与していることを示唆している。HDHの阻害剤として幾つかの化合物が報告されており、イミダゾール部分とアミノ基部分が結合に重要であると言われている(10)。基質及び、阻害剤の、どの部分が金属イオンと相互作用しているかを調べるため、イミダゾール、ヒスタミン、ヒスチジンなどの阻害剤とHDHの複合体の ^{113}Cd NMRを NAD^+ 存在下と非存在下において測定した。その結果、イミダゾール部分は、金属イオンと配位結合しているが、アミノ基部分は金属イオンと相互作用していないことが明らかになった。また、基質の水酸基や、アルデヒド基も金属イオンと相互作用していることが示唆された。 NAD^+ についてはHDHの複合体の ^{113}Cd NMRのシグナルはほとんど変化しないことから、 NAD^+ の結合が金属イオン結合部位に与える影響は小さいと結論づけられた。

溶液中にカドミウムイオンが過剰に存在すると、HDHの活性は上昇するが、更に過剰に加えると徐々に活性は低下した。この現象についても、カドミウムイオン存在下の $[\text{Cd}]\text{HDH}$ の ^{113}Cd NMRを測定することによって考察した。 ^{113}Cd NMRの結果より、過剰に加えたカドミウムイオンが酵素の活性部位以外の部位に結合することにより、活性部位のまわりの構造が変化し、少なくとも構造の異なる三種類のコンフォメーションをとることが明らかになった。また、金属結合部位まわりの構造の揺らぎが生じ、結合サイトにある金属イオンが溶液中の金属イオンと容易に交換することもわかった。過剰のカドミウムイオンによる活性上昇は活性部位付近の構造の変化により、生じたと考えられる。

以上、 ^{113}Cd NMRにより、HDHの触媒反応に金属イオンが直接関与していることが明らかとなり、金属イオンと相互作用している基質の部位の情報も得られた。これらの情報から、金属イオンと基質の複合体のモデルを考案し、モデルの金属イオンと官能基の距離を用いて金属結合性化合物などのデータベースを検索することによってHDH阻害剤の開発の手がかりとなりうる。

<文献>

- (1) Wüthrich, K., Wider, G., Wagner, G., & Braun, W. (1982) *J. Mol. Biol.* 155, 311-319.
- (2) Glenner, G. G., & Wong, C. W. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885-890.
- (3) Masters, C. L., Simmes, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., & Beyreuther, K. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4254-4249.

- (4) Sieber, P., Riniker, B., Brugger, M., Kamber, B., & Rittel, W. (1970) *Helv. Chim. Acta* 53, 2135-2150.
- (5) Arvinte, T., Cudd, A., and Drake, A. F. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 6415-6422.
- (6) Ferrone, F. A., Hofrichter, J., and Eaton, W. A. (1985) *J. Mol. Biol.* 183, 611-631.
- (7) Adams, E. (1955) *J. Biol. Chem.* 217, 25-344
- (8) Lee, S. Y., & Grubmeyer, C. T. (1987) *J. Bacteriol.* 169, 3938-3944.
- (9) Summers, M. F. (1988) *Coord. Chem. Rev.* 86, 43-134.
- (10) Grubmeyer, C. T., Insinga, S., Bhatia, M., and Moazami, N. (1989) *Biochemistry* 28, 8174-8180.

論文審査の結果の要旨

核磁気共鳴 (NMR) 分光法は現在、医薬や農薬などの研究開発において、様々な生物学的な問題を原子レベルで解析することのできる手法として広く用いられている。特に最近、生体高分子の三次元構造解析へのNMRの応用はめざましく、溶液中のタンパク質や、核酸の高次構造を、多次元NMR等の手法によってX線結晶解析と同等の精度で決定することが原理的には可能となった。しかしながら、現実には高分子量の蛋白質や分子会合性の強い系ではNMRによる三次元構造決定が不可能である場合が多く、そのような系に対してNMRが有効な問題解決の手段として用いられているとは言い難い。本論文では、そのような精密立体構造解析が困難な系に対しても、NMRが医薬や農薬などの研究開発に有効に応用できることを示したものである。

第一章では、骨粗鬆症の薬剤として用いられているヒトカルシトニン (hCT) の会合の機構解明を行った。カルシトニンはカルシウムーリン代謝に重要な役割を果たしている32残基のペプチドホルモンであり、骨粗鬆症の薬剤として用いられているが、水溶液中で容易に会合する性質をもつため、静脈注射による患者への投与の際にシリンジ内でゲル化することが問題となっている。本研究では、高感度の600MHz NMRを活用して、二次元NMRスペクトルを約5分置きに、連続的に測定するという新しい工夫によって、ヒトカルシトニンが水溶液中で会合・繊維化するメカニズムをアミノ酸残基レベル、原子レベルの分解能で明らかにしたものである。本研究の結果、カルシトニン繊維化の初期過程において、N末端領域の疎水性残基の分子間相互作用により分子の会合が起こり、次いでC末端部分が会合して会合体ができること、またこの会合分子は水素結合によって安定化され、これが核となってさらに繊維が成長していくと示唆された。またこの会合を抑えるウレアの効果などについても明らかにした。これらの結果はヒトカルシトニンについて、その会合を抑えるための指針を明らかにしたばかりでなく、一般にNMRが自然界に多く見られる蛋白質の会合の研究に有効であることを示したものである。

第二章では農薬開発の目的のため、酵素阻害剤の設計に役立つ構造情報をもたらしたものである。すなわち、ヒスチジン生合成は植物の生育にとって必須の過程であるが、申請者はキャベツ由来の亜鉛金属酵素ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ (HDH) について、それに含まれる亜鉛をNMR測定可能なカドミウム-113で置換し、カドミウム-113でNMRを用いて、この酵素の活性中心における金属の役割と金属周辺の構造を詳しく明らかにした。その結果、ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ (HDH) の触媒反応に金属イオンが直接関与していることが初めて明らかとなり、金属イオンと相互作用している基質部位の構造に関する情報も得られた。またこれらの情報に基づいて、金属イオンと

基質複合体の構造モデルを構築することができた。このモデルに従い、金属結合性化合物などのデータベースを検索することによって、農薬となるべきHDH阻害剤開発の手がかりとすることができた。本研究は、核磁気共鳴分光法（NMR）によるミクロな構造情報に基づいて医薬、農薬の開発を効率的に行うという、医農薬開発研究における新しい手法を提示したものであって、価値ある集積であると認める。よって学位申請者金折賢二氏は博士（理学）の学位を得る資格があると認める。