

氏名(本籍)	おお さわ まさ のり 大 澤 匡 範 (茨城県)		
学位の種類	博 士 (学 術)		
学位記番号	博 甲 第 2,053 号		
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	STRUCTURAL STUDIES ON CALMODULIN MOLECULAR RECOGNITION PROCESSES (カルモデュリンの分子認識機構に関する構造学的研究)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	宗 像 英 輔
副 査	筑波大学教授	農学博士	田 仲 可 昌
副 査	筑波大学教授	Ph. D.	多比良 和 誠
副 査	筑波大学教授	農学博士	馬 場 忠

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

カルモデュリン (CaM) は真核細胞に普遍的に存在する148アミノ酸からなる酸性蛋白質である。細胞内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 濃度が上昇すると CaM は  $\text{Ca}^{2+}$  と結合し、この  $\text{Ca}^{2+}$  結合型 CaM ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) が標的酵素を活性化することにより様々な生理現象を調節する。CaM の標的酵素は30種類以上知られているが、それらの CaM 結合部位のアミノ酸配列には明確な相同性は見られない。本研究は、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  と標的酵素の CaM 結合配列を有するペプチド (標的ペプチド) との複合体、および阻害剤との複合体の立体構造を主に核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを用いて解析することにより、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  の分子認識の多様性について考察することを目的に行ったものである。

$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  依存性蛋白質リン酸化酵素活性化キナーゼ (CaMKK) の  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  結合部位のアミノ酸配列は、これまでに標的ペプチドと  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  との複合体の立体構造が報告されているミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) および  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  依存性蛋白質リン酸化酵素 II (CaMKII) と明確な相同性が見られない。そこで、NMR を用いて  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  と CaM-KK の標的ペプチドとの複合体の立体構造を解析した。その結果、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  複合体中で、CaM-KK の標的ペプチドは N 末端側の  $\alpha$ -ヘリックスとそれに続くヘアピン状ループを形成しており、これまでに解析されている MLCK および CaMKII との複合体とは異なる構造をとっていることを明らかにした。また、ペプチドの結合の向きは MLCK および CaMKII 複合体と逆であり、主に静電的相互作用により結合の向きが決定されることを示した。

次に CaM 阻害剤の一つである W-7 の  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  への結合様式および  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  の分子認識の多様性を明らかにすることを目的として、NMR による  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -W-7 複合体の立体構造解析を行った。その結果、W-7 は  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  の各ドメインの疎水性ポケットに1分子ずつ結合しており、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  の疎水性アミノ酸側鎖と W-7 のクロロナフタレンの間の相互作用が主として複合体を安定化していることを示した。W-7 との相互作用により最も顕著に化学シフトが変化しているのは、各ドメインの疎水性ポケットに4個ずつ存在する Met の側鎖である。コンフォメーションの柔軟性が高く、電子密度の高い硫黄原子を側鎖に有する Met が疎水性ポケットに集中していることで、このポケットは様々な疎水性分子と結合する性質をもつと考えられる。

さらに X 線小角散乱により、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -W-7 複合体は水溶液中で球状構造をとることを示した。W-7 添加時の NMR スペクトルの変化から、この球状構造はドメインリンカーが折れ曲がることによることを明らかにした。

Ca<sup>2+</sup>/CaM-W-7複合体の立体構造上の知見を基に、W-7の末端のアミノ基ともう1分子のW-7の末端のアミノ基とをリンカーを介して共有結合で結んだ新規CaM阻害剤をデザインした。そこでリンカーの構造の異なる一連の化合物の合成およびアッセイを行い、W-7より75倍阻害活性の高い化合物が得られた。2つの化合物についてCa<sup>2+</sup>/CaMとの相互作用をNMRなどを用いて検討した。

以上の結果から、Ca<sup>2+</sup>/CaMの分子認識の多様性について以下の結論を導いた。Ca<sup>2+</sup>/CaMは水溶液中で疎水性ポケットの局所的な相互作用により伸びた構造から球状構造へと変化し、標的ペプチドを包み込む。疎水性ポケットにはMetが4個ずつあり、様々な分子を受容できる。また、Ca<sup>2+</sup>/CaMと標的ペプチドとの分子間の相互作用は、両ドメインの相対配置を調節することにより最適化される。その結果として、最適な標的ペプチドのコンフォメーションが誘導され、Ca<sup>2+</sup>/CaMへの結合の向き、結合に関与する配列の長さにも多様性をもたらす。このような機構により、Ca<sup>2+</sup>/CaMはアミノ酸配列上相同性の低い多数の領域を認識する。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、カルシウム結合型カルモデュリン (Ca<sup>2+</sup>/CaM) のもつ標的酵素あるいは阻害剤認識の多様性を、主にNMRを用いて明らかにすることを目的として行ったものである。

Ca<sup>2+</sup>/CaM依存性蛋白質リン酸化酵素活性化キナーゼ (CaMKK) のCaM結合部位由来ペプチドとCa<sup>2+</sup>/CaMとの複合体の立体構造解析では、Ca<sup>2+</sup>/CaMの新たな分子認識様式を見出した。特に、CaMKKペプチドのCa<sup>2+</sup>/CaMへの結合の向きは既知の複合体とは逆であることを明らかにし、結合の向きが静電的相互作用により決定されていることを提唱したことは、構造未知のCa<sup>2+</sup>/CaM結合配列とCa<sup>2+</sup>/CaMとの相互作用を予測する上で重要な発見である。また、CaM阻害剤の一つであるW-7との複合体の立体構造解析では、CaMの各ドメインの中心にある疎水性ポケットにW-7が結合することを明らかにし、中でも各疎水性ポケットに4個ずつ存在するMetが、疎水性ポケットでの分子認識の多様性に重要な役割を果たしていることを示した。X線小角散乱による解析では、W-7の結合によりCaMは球状構造をとることが示され、垂鈴型から球状構造へのCaMの大きな構造変化がW-7のような低分子化合物で引き起こされている点が大変興味深い。さらに、Ca<sup>2+</sup>/CaM-W-7複合体の立体構造に基づく新規CaM阻害剤のデザインは、今後のStructure-Based Drug Designの方法論として広く活用されることが期待できる。本論文により、Ca<sup>2+</sup>/CaMの分子認識について立体構造的基盤を与えたことは非常に意義深いものである。

よって、著者は博士(学術)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。