The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Crystallographic Studies on Human BST-1/CD157 with ADP-ribosyl Cyclase and NAD Glycohydrolase Activities
Author(s)	片山, 寿美枝
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44512
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

氏　　名　片山　寿美枝（かたやま　すみえ）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　17276　号

学位授与年月日　平成14年9月17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　Crystallographic Studies on Human BST-1/CD157 with ADP-ribosyl Cyclase and NAD Glycohydrolase Activities.
（ADP-ribosyl cyclase 活性と NAD glycohydrolase 活性をもつヒト BST-1/CD157 の結晶構造解析）

論文審査委員　（主査）
教　授　平野　俊夫

（副査）
教　授　谷口　直之　　教　授　宮坂　昌之

論文内容の要旨

［目的］

BST-1/CD157 は CD38、*Aplysia* ADP-ribosyl cyclase のホモログであり、細胞外に NAD を基質として cyclic ADP ribose と ADP ribose を産生する酵素活性を、さらに cyclic ADP ribose から ADP ribose を産生する酵素活性を持つ。また、抗体刺激により細胞内でリン酸化される蛋白質が検出されるなど、シグナル伝達に関与するレセプターとして機能することが明らかになっている。我々は、一つの蛋白質がいくつかの酵素反応を引き起こすことに興味をもち、なかでも、産生物の一つである cyclic ADP ribose が Ca 放出に関与するセカンドメッセンジャーとして働くことから、これらの酵素反応の触媒機構の解明を試みた。

［方法ならびに成績］

1.CD157（リガンドフリー）の結晶構造解析

精製された CD157 を、10 mg/ml まで濃縮し、結晶化はハンギングドロップ法により硫酸アンモニウム、硫酸亜鉛を含むクエン酸バッファーを用いて、293 K の条件下で行った。データ測定は、X線によるダメージを防ぐため、結晶を glycerol を含むバッファーに浸し、100 K のクライオ気流中で行った。その結果、高分解能側が 2.5 Åまでのデータを集めることができた。強度データの処理はプログラム DENZO/SCALEPACK を用いて行い、非対称単位中に２分子存在することが分かった。構造は多重同型置換法と、異常分散効果により決定された。重原子置換体の作製にはプラチナ、オスミウムそしてセレンが用いられ、プログラム SHARP を使って位相計算を行った。結晶中のセレンの位置から非結晶学的対称性平均化を行うことでさらに位相が改善され、プログラム QUANTA98 を用いてモデルを作製した。モデルの精密化はプログラム CNS を用いて行われ、最終的にモデルの信頼度因子（R-free）が 25%の構造を決定した。

2.CD157 と基質アナログ（Nicotinamide、NMN、ATPγS、ethenoNAD、ethenoNADP）との複合体の結晶構造解析

CD157 と NMN、ATPγS、ethenoNAD、ethenoNADP との各複合体の結晶化はリガンドフリー時とほぼ同様の条件下で行い、Nicotinamide との複合体の結晶化は PEG 4 K を含むクエン酸バッファーを用いて、293 K の条件下で行った。データ測定は、リガンドフリー時と同様、各結晶を glycerol 又はグルコースを含むバッファーに浸し、100 K のクライオ気流中で行った。その結果、高分解能側が 2.1～3.0 Åまでのデータを集めることができた。データ処理はプログラム DENZO/SCALEPACK を用いて行い、それらの構造は、リガンドフリー時の構造をサーチモデルとして、分子置換法により解析された。モデルの精密化はプログラム CNS を用いて行われ、最終的にモデルの信頼度因子（R-free）が 23.2～25.8%の構造を決定した。

［総括］

CD157 のリガンドフリーの構造と基質アナログとの複合体構造から基質認識部位を同定することができただけでなく、触媒機構を推察することができた。それらの構造から、CD157 のもつすべての酵素反応は、オキソカルベニウムイオン中間体を介して進行することが推察された。CD157 は二量体構造をしており、そのサブユニットは２つのドメインからなる。ドメイン間にはクレフト構造が存在し、基質である NAD はそのクレフト内にある Trp 77、Trp 140、Glu 178 によって、主に認識されると思われる。また、Trp 77、Glu 178 は S_N1 型反応の反応中間体を安定化し、Trp 140 はアデニン環と相互作用することで cyclase 反応において重要な役割をもつと思われる。さらに、これらのアミノ酸残基は cyclase family 間で保存されているため、cyclase family のあいだで共通の酵素反応機構が解明されたと言える。

論文審査の結果の要旨

BST-1/CD157 は CD38、*Aplysia* ADP-ribosyl cyclase のホモログであり、細胞外に NAD を基質として cyclic ADP ribose と ADP ribose を産生する酵素活性と cyclic ADP ribose から ADP ribose を産生する酵素活性を持ち、IP3 受容体を介さない細胞内 Ca 放出に関与する分子として注目を集めている。また、抗体による架橋刺激により細胞内でリン酸化される蛋白質が検出されるなど、シグナル伝達に関与するレセプターとして機能することが示唆されている。本論文では、CD157 の酵素活性の触媒機構を解明するために結晶構造解析を行った。

ヒト CD157 の細胞外領域を昆虫細胞-バキュロウイルスの系を用いて発現させ、精製、濃縮を行い、結晶化を試みたが成功しなかった。SDS-PAGE 解析を行った結果、分子の不均一性を示したので、部分的に糖鎖を欠損した変異体を作製し、各変異体について ADP-ribosyl cyclase 活性と ADPR hydrolase 活性を調べ、Asp 160 に付加される糖だけを残した変異体が、不均一性がなく、かつ、それらの酵素活性を保持していることを明らかにした。この変異体を用いて結晶化に成功し、構造解析を行った。

まずリガンドフリー型での構造を多重同型置換法によって決定した結果、２つのドメインから成る二量体構造をとっていることを明らかにした。次に、基質アナログ（Nicotinamide、NMN、ATPγS、ethenoNAD、ethenoNADP）との複合体の構造を、リガンドフリー型の構造をサーチモデルとして、分子置換法により解析した。これら一連の構造解析から、基質結合様式と酵素反応の触媒機構を明らかにした。即ち、基質である NAD は、クレフト内にある Trp 77、Trp 140、Glu 178 によって、主に認識され、Trp 77、Glu 178 は S_N1 型反応によって生じる反応中間体を安定化し、Trp 140 は cyclase 反応でアデニン環を呼び寄せる役割があることを明らかにした。さらに、これらのアミノ酸残基は cyclase family 間で保存されていることから、本論文により cyclase family で共通の酵素反応機構が明らかとなった。

以上の研究は学位の授与に値すると考えられる。