The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Purification and Characterization of Recombinant Human Prostacyclin Synthase
Author(s)	和田, 将幸
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45260
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

【42】

氏　　名	和　田　将　幸（わだ　まさ　ゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　１８４７０　号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学　位　論　文　名	Purification and Characterization of Recombinant Human Prostacyclin Synthase **（組み換えヒト・プロスタサイクリン合成酵素の精製と特徴）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　谷口　直之 （副査） 教　授　木下タロウ　　教　授　岡本　光弘

論　文　内　容　の　要　旨

〔目的〕

プロスタサイクリンは血小板凝集抑制、血管平滑筋の弛緩や細胞増殖の抑制など循環器系の制御に関わる重要な脂質メディエーターであり、シクロオキシゲナーゼによりアラキドン酸から産生されるプロスタグランジン (PG) H_2 を基質としてプロスタサイクリン合成酵素（PGIS）により生合成される。PGIS は分子量約 57 kDa の膜蛋白質で、シトクロム P450 に属するヘム蛋白質であるが、ヒト酵素蛋白質の詳細な性質は明らかでない。最近、PGIS が血管機能の恒常性維持に重要であることが本酵素欠損マウスの解析により明らかになり、また、臨床分野では原発性肺高血圧症や閉塞性動脈硬化症の治療に本酵素遺伝子を用いた治療法の開発が注目されている。PGIS の反応機構と構造との関連が明らかになり、ヒト酵素蛋白質の立体構造解析へ繋がれば、将来、遺伝子治療への利用が期待される本酵素の安定性をはじめとする改良が期待できる。

本研究では、ヒト PGIS 構造と機能の関連を明らかにすることをめざし、バキュロウイルス－昆虫細胞系で本酵素を過剰発現させて精製方法を確立し、本酵素の性質を生化学的に検討した。

〔方法ならびに成績〕

作製したヒト PGIS 組換えウイルスを用い Sf21 細胞へ感染後、 5 μg/ml ヘマチン含有培地で培養し、末端にタグを持たない天然型組換え酵素蛋白質を発現させた。酵素発現細胞（2×10^8 細胞）のミクロソーム画分を調製後、終濃度 0.5%コール酸ナトリウム、0.2%ルブロール PX、20%グリセロールを含むリン酸緩衝液（pH 7.5）で酵素を可溶化した。リン酸カルシウムゲル、DEAE-セファセル、ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにより、約 0.2 mg の精製標品を得た。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動及びイムノブロットにより、ほぼ均一標品を得たことが確認できた。基質である［1-^{14}C］PGH_2 を調製し、酵素と反応後に産生物を薄層クロマトグラフィーで分離し、バイオイメージアナライザー (BAS2500) を用いて酵素活性を測定した結果、精製酵素の比活性は約 7 μ mol/min/mg、PGH_2 に対する Km は 30 μ M、Vmax は 15 μ mol/min/mg であった。

一次構造上 P450 に属する PGIS の分光光学的性質を検討した結果、PGH_2 の基質アナログで、エンドペルオキシ

ドのうち、炭素 11 位の酸素原子のみを持つ誘導体 U46619 を用いた吸収差スペクトルは、酸素結合型基質差スペクトルを示した（吸収極大＝407 nm、吸収極小＝430 nm）。一方、炭素 9 位の酸素原子のみを有する U44069 では、Type I 型差スペクトル（吸収極大＝387 nm、吸収極小＝432 nm）を示し、本酵素は基質の炭素 11 位の酸素原子を特異的に認識することが示唆された。PGIS の反応を阻害する Tranylcypromine を用いた吸収差スペクトルでは、P450 が阻害剤と結合したときにみられる Type II 型差スペクトル（吸収極大＝434 nm、吸収極小＝412 nm）を示した。また酸化型吸収スペクトルは、低スピン型 P450 の特徴を示し（ソーレー帯＝420 nm、α帯＝570 nm、β帯＝538 nm）、EPR スペクトルでも P450 特異的な吸収を示した。しかしながら、一酸化炭素還元型差スペクトルは、P450 に特徴的な 450 nm への吸収ピークの移行を示さず、418 nm に吸収極大を示した。これは、モノオキシゲナーゼ活性を持つ P450 とは異なり、酵素反応においてヘム鉄の還元が必要でない PGIS の特有の性質と考えられる。一方、ヘムの第 5 配位子である 441 残基目のシステインをアラニンに置換した変異型酵素では、酵素活性とヘムとの結合能を失うことが明らかとなった。

〔総括〕

バキュロウイルス－昆虫細胞系でヒト PGIS を発現させ、リン酸カルシウムゲル、DEAE-セファセル、ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによりほぼ均一に精製し、高い比活性を持つ標品を得た。精製酵素の ESR スペクトルならびに基質アナログや阻害剤との吸収差スペクトルは P450 特有のものであり、基質認識の特異性が認められた。また、P450 の近位ヘム結合サイトとして保存されている Cys441 は、本酵素の活性ならびにヘムの結合/取り込みに重要と考えられた。一方、本酵素は一酸化炭素還元化状態において 450 nm 付近に吸収極大を持つ差スペクトルを示さず、これは酵素反応においてヘム鉄の還元化が必要でない PGIS の特有の性質と考えられた。今回確立した本酵素の精製法によりさらに大量の精製酵素を得て、ヒト PGIS の結晶構造解析を目指し、構造と触媒反応との関連を明らかにしたい。

論文審査の結果の要旨

プロスタサイクリンは血小板凝集抑制、血管平滑筋の弛緩や細胞増殖の抑制など循環器系の制御に関わる重要な脂質メディエーターで、シクロオキシゲナーゼによりアラキドン酸から産生されるプロスタグランジン（PG）H_2 を基質としてプロスタサイクリン合成酵素（PGIS）により生合成される。PGIS は膜蛋白質で、P450 に属するヘム蛋白質であるが、ヒト酵素蛋白質の詳細な性質は明らかでない。申請者は、バキュロウイルス－昆虫細胞系で末端にタグを持たない天然型のヒト PGIS を発現させ、高い比活性をもつ酵素の精製方法を確立した。精製酵素を用いたスペクトル解析により、ヒト PGIS は低スピン型 P450 で、基質の炭素 11 位の酸素原子を特異的に認識することを示した。一方、本酵素は一酸化炭素還元化状態において 450 nm 付近に吸収極大を示さず、これは還元反応が関与しない PGIS がもつ特有の性質であると考えられた。また、P450 のヘム結合サイトとして保存されている Cys441 は、本酵素の活性ならびにヘムの結合/取り込みに重要であることを明らかにした。PGIS は原発性肺高血圧や閉塞性動脈硬化症に対する遺伝子治療として注目されている酵素であり、本論文は、この酵素の構造の特徴と触媒反応の関連を明らかにしていくための基盤となる重要な研究成果として、学位に値するものと考えられる。