OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素と低分子化合物との相互作用解析
Author(s)	秦, 殊斌
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56167
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名	（　秦　殊斌　）
論文題名	**リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素と低分子化合物との相互作用解析** **(Studies on the Interactions of Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase and Low Molecular Weight Ligands)**

論文内容の要旨

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素(L-PGDS)は、哺乳動物の中枢神経系で高発現しており、ヒト脳脊髄液中では血清アルブミンに次いで 2 番目に多く存在するタンパク質である。L-PGDS は、グルタチオン(GSH)などの SH 基を持つ還元剤存在下で、プロスタグランジン H2 (PGH_2)から睡眠誘発物質であるプロスタグランジン D2 (PGD_2)への異性化反応を触媒し、さらに、通常の酵素と異なり生成物である PGD_2 とも強く結合する。くも膜において、L-PGDS は PGH_2 を産生するシクロオキシゲナーゼ II と共局在していることから、L-PGDS は細胞内で PGD_2 を合成した後、PGD_2 を結合したまま脳脊髄液中に分泌され、脳内の PGD_2 レセプターへと PGD_2 を輸送すると考えられている。L-PGDS の酵素反応機構の解明により、自然な眠りに近い睡眠導入剤の開発につながると期待されている。

L-PGDS はリポカリンファミリーと呼ばれる疎水性低分子輸送蛋白質ファミリーに属している。一般的にリポカリンファミリー蛋白質は、リポカリンフォールドと呼ばれる 8 本の β-ストランドで構成される β バレル構造と分子側部に位置する長い α-ヘリックス構造を有しており、β バレルの内部で細長い形状の疎水性低分子と特異的に結合する。しかし、L-PGDS は、PGH_2 及び PGD_2 だけでなく、化学構造や形状・大きさが全く異なるレチノイドやビリルビン、ビリベルジンやアミロイド β ペプチドとも強く結合する(K_d = 30 ~ 290 nM)ことが示された。構造生物学的研究から、L-PGDS の β バレル内部には疎水性及び親水性の 2 つのポケット領域を含む他のリポカリンファミリー蛋白質では見られない大きな cavity が存在していることが示された。L-PGDS はこの大きな cavity に多様なリガンドを収納することが可能であることから、際立って広いリガンド選択性を示すと考えられている。

L−PGDS より産生された PGD_2 は、生体内で酵素的または非酵素的に異なるプロスタノイドに変換される。PGD_2 の異性化に関与する主要な代謝酵素である NADPH 依存性 11-ケト還元酵素は、PGD_2 から血小板凝集抑制作用、血管・気管支平滑筋収縮作用、免疫細胞の誘引作用などを持つ 9α-11β プロスタグランジン F_2 (9α-11β-PGF_2)を産生する。したがって、NADPH は、11-ケト還元酵素を介して生体内において PGD_2 の濃度調節に関与すると考えられている。さらに、還元剤である DTT や GSH などは、L-PGDS の酵素活性を有意に増加することから、細胞内の還元剤である NADPH が、L-PGDS の酵素活性自体に関与する可能性も考えられる。また、近年 L-PGDS は人体の中枢神経系に不要な物質のトランスポータあるいはスカベンジャーとして、様々な神経疾患に対する保護作用の役割が注目されている。最近の研究で、L-PGDS は、活性酸素種(ROS)の過剰産生により誘発される酸化ストレスによって引き起こされる神経細胞死から細胞を保護することが見出されている。活性酸素種(ROS)は、NADPH オキシダーゼ(NOX)により主に生産され、多くの生理学的および病態生理学的プロセスに関与する。その際 NADPH は、ROS を生成することにより種々の疾患において重要な役割を果たしている NOX の基質として機能している。この研究から、L-PGDS による細胞保護作用にも NADPH が関与している可能性が示唆されるが、その具体的なメカニズムは不明である。

著者の属する研究室では、核磁気共鳴法を用いて、遊離型 L-PGDS の溶液構造(PDB ID: 2E4J)および L-PGDS と基質安定誘導体である U-46619 複合体溶液構造(PDB ID: 2KTD)を決定し、両者の比較によって、リガンド結合に伴う cavity 上部の立体構造変化を明らかにしている。しかしながら、L-PGDS と NADPH のような親水性低分子との相互作用や、基質認識の中間状態については明らかになっていなかった。そこで本研究では、これらの疑問に対して、熱力学的および構造生物学的な視点から研究を行った。

大腸菌を用いた L-PGDS の大量発現系・精製系を構築し、等温滴定熱量測定(ITC)を用いて L-PGDS と親水性低分

子である NADPH および NADH, $NADP^+$, NAD^+の 4 種類のニコチンアミド補酵素の結合実験の熱力学パラメータ、および解離定数(K_d)の決定を試みた。L-PGDS 溶液にそれぞれのニコチンアミド補酵素溶液を滴定したところ、NAD^+を除くすべての結合実験で負のピークが観測され、結合比(n)を算出したところ n=1 の発熱反応であることが明らかになった。得られた解離定数から、L-PGDS との結合親和性は、4 種類のリガンドの中で NADPH が一番強いことがわかった(K_d = 47 μM)。また、NADH の結合親和性は$NADP^+$と同程度で、NADPH と比べると約 7 分の 1 に低下していた。NAD^+では、結合が非常に弱く、明瞭なピークが観測されなかったため、熱力学パラメータの算出が困難であった。これらの結果から、2'-リボースリン酸基および還元型ニコチンアミド環が、L-PGDS と NADPH との結合において大きく寄与していることが示唆された。興味深いことに、NADPH と L-PGDS との解離定数（K_d=47 μM）は、NADPH と NADPH オキシダーゼの *in vitro* での解離定数（*K*d = 40 μM）とほぼ同じであることから、L-PGDS は NADPH に結合することにより、NADPH オキシダーゼが利用できる NADPH の濃度を低下させ、ROS の生成を減少させうる可能性が考えられた。本研究では、L-PGDS はレチノイン酸やビリルビンなどの疎水性低分子だけではなく、XlogP が負の値を持つ親水性低分子であるニコチンアミド補酵素とも結合することを初めて明らかにした。さらに、核磁気共鳴法(NMR)を用いた滴定実験によりリガンド結合部位の同定を行った。この結果、NADPH、$NADP^+$、および NADH は、L-PGDS の β バレル上部に結合していることが示された。より詳細な NADPH の結合様式を明らかにするため、ソフトウェア HADDOCK を用いて、NMR から得られた結果と合致するリガンドドッキングモデルの構築を行った。得られたドッキングモデルから、NADPH と L-PGDS との結合には静電相互作用が重要であることが示唆された。

また、L-PGDS の基質進入機構を明らかにするために、X 線結晶構造解析を用いて、L-PGDS と基質安定誘導体 U-46619 の複合体結晶構造を決定した。これまで、L-PGDS と基質 PGH_2 との複合体結晶構造解析が試みられてきたが、疎水性リガンドである PGH_2 が不溶性でかつ不安定であることから成功していなかった。しかし、U-46619 は PGH_2 の誘導体であり、L-PGDS によって異性化反応を起こさないため安定であり、構造解析に適していた。X 線結晶構造解析により、L-PGDS は U-46619 との結合によって、cavity の入り口に蓋をする、あるいは、U-46619 の形状に合わせるように構造を変化させていることがわかった。特に、H2-ヘリックスの Trp54 は、リガンドの結合に際して cavity の入り口を閉じており、顕著な構造変化が観測されていることから、L-PGDS の基質の結合および放出に重要な寄与をしていると考えられた。また、U-46619 は、L-PGDS のバレル上部に結合していたが、これまで報告されていた部位とは異なる位置に結合することを見出した。今回得られた L-PGDS/U-46619 複合体の立体構造において、異性化反応する基質のエンドペルオキシド基は、酵素活性中心領域(Cys65)から 9Å 以上離れていた。このため、今回得られた結合部位は酵素反応に直接関与する部位ではなく、基質結合の過程での中間体であると考えられた。そこで、本結果とこれまでの研究成果を踏まえて基質進入機構について新たなモデルを構築することができた。

本研究によって、L-PGDS の親水性低分子の結合様式および L-PGDS の原子レベルでの構造や機能について新たな知見が得られた。これらの知見は、今後、L-PGDS を利用した創薬に大きく貢献すると期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名（　秦　殊斌　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	大久保　忠恭
	副 査　教授	宇野　公之
	副 査　教授	小林　資正

論文審査の結果の要旨

本研究で申請者は、リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素(L-PGDS)と低分子化合物との相互作用を解明するため、等温滴定熱量測定(ITC)，NMR，X線結晶構造解析の手法を用いてL-PGDSとNADPH及び基質誘導体との結合様式を熱力学および構造生物学の視点から明らかにした。L-PGDSは哺乳動物の中枢神経系で高発現しており、アラキドン酸由来のPGH_2から睡眠誘発物質であるPGD2への異性化反応を触媒する酵素である。また、L-PGDSは脂溶性低分子輸送タンパク質ファミリーに属しており、化学構造や大きさが全く異なるレチノイドやビリルビンなどとも強く結合することが報告されている。申請者は、熱力学的および構造生物学的な視点からこれまでに解明されていなかったL-PGDSとNADPHとの相互作用およびL-PGDSと基質誘導体の複合体の立体構造に関する研究を行った。L-PGDSとNADPHの相互作用についてITCとNMRを用いて研究し、NADPHがL-PGDSと1:1の比で強く結合することが明らかとなった。NMRによる滴定実験を行い、化学シフト値の変化から結合部位の同定を行い、ドッキングモデルの構築に成功した。熱力学的パラメーターとの比較から静電相互作用がL-PGDSとNADPHの結合に重要な寄与をしていることを明らかにした。また、X線結晶構造解析法を用いてL-PGDSと基質安定誘導体との複合体の立体構造を決定することにも成功している。遊離型L-PGDSとの比較より、遊離型ではβバレルの上部が外側に開いたopen構造になっていたが、複合体では閉じるようなclose構造に変化していることが明らかになった。L-PGDSにはcavity内部に基質と結合できる複数の部位があることがわかり、申請者は基質が進入する過程のモデルを構築することに成功している。

上記成果はL-PGDSと低分子化合物の結合機構の構造的基盤を明らかにしたもので、特に親水性分子であるNADPHと強く結合することを明らかにし基質進入過程のモデル構築に成功したことの意義は大きく、睡眠関連疾患に対する治療法の開発に関して有用な知見を与えるものであると考えられ博士（薬科学）の学位論文として相応しいものと認める。