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

2016 年

# 博士学位論文

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)

大阪大学大学院薬学研究科
創成薬学専攻　高分子化学分野

秦 殊斌

# 目次

略語一覧 ..... 1
序論 ..... 2
本論 ..... 10
第一章　L-PGDS と NADPH の相互作用解析 ..... 10
第一節　背景 ..... 10
第二節　結果 ..... 12
第一項　L-PGDS と NADPH との相互作用の熱力学的評価 ..... 12
第二項　L-PGDS と NADPH との NMR 滴定結合実験 ..... 17
第三節　考察 ..... 23
第一項　L-PGDS と NADPH との結合領域の考察 ..... 23
第二項　リガンド結合モデル ..... 24
第三項　L-PGDS と NADPH との相互作用の生理学意義 ..... 26
第二章　L-PGDS と基質誘導体の複合体の構造解析 ..... 27
第一節　背景 ..... 27
第二節　結果 ..... 28
第一項　L-PGDS と U-46619 複合体の結晶構造決定 ..... 28
第二項　L-PGDS と U-46619 複合体の全体構造 ..... 31
第三節　考察 ..... 34
第一項　L-PGDS 立体構造の比較 ..... 34
第二項　L-PGDS の基質進入過程のモデル構築 ..... 37
結語 ..... 41
謝辞 ..... 42
実験の部 ..... 43
付録 ..... 48
参考文献 ..... 52
主論文 ..... 57

# 略語一覧

| | |
|---|---|
| L-PGDS | lipocalin-type prostaglandin D synthase |
| $PGH_2$ | prostaglandin $H_2$ |
| $PGD_2$ | prostaglandin $D_2$ |
| COX | cyclooxygenase |
| GSH | glutathione |
| ROS | reactive oxygen species |
| NOX | NADPH oxidase |
| ITC | isothermal titration calorimetry |
| NMR | nuclear magnetic resonance |
| $\Delta H$ | enthalpy change |
| $K_d$ | dissociation constant |
| $n_{bs}$ | binding stoichiometry |
| $\Delta G$ | Gibbs free energy change |
| $\Delta S$ | entropy change |
| CSP | chemical shift perturbation |
| HSQC | heteronuclear single quantum coherence |
| HADDOCK | high ambiguity driven biomolecular docking |

# 序論

哺乳類の脳内において、睡眠調節に深く関与している蛋白質としてリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素(L-PGDS)が知られている[1]。L-PGDS は哺乳動物の中枢神経系に高発現し、ヒト脳脊髄液中において血清アルブミンに次いで 2 番目に多く存在する蛋白質であり(**Fig. 1A**)、脳脊髄液中の蛋白質の約 10%を占める[2-4]。L-PGDS は、SH 基を持つ化合物の存在下で、アラキドン酸由来のプロスタグランジン $H_2$ ($PGH_2$)から睡眠誘発物質であるプロスタグランジン $D_2$ ($PGD_2$)への異性化反応を触媒し(**Fig. 1B**)、さらに、通常の酵素と異なり生成物の $PGD_2$ とも結合する[5]。L-PGDS の基質である $PGH_2$ は，細胞内の小胞体膜の膜タンパク質であるシクロオキシゲナーゼ(COX)により合成され，水溶液中で容易に分解されるので、細胞外へ分泌された後の L-PGDS が $PGD_2$ の生合成反応を触媒する可能性は低いと考えられている。くも膜において、L-PGDS は、$PGH_2$ を産生する COX 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、生体内で低溶解度の $PGD_2$ に結合したまま脳脊髄液中

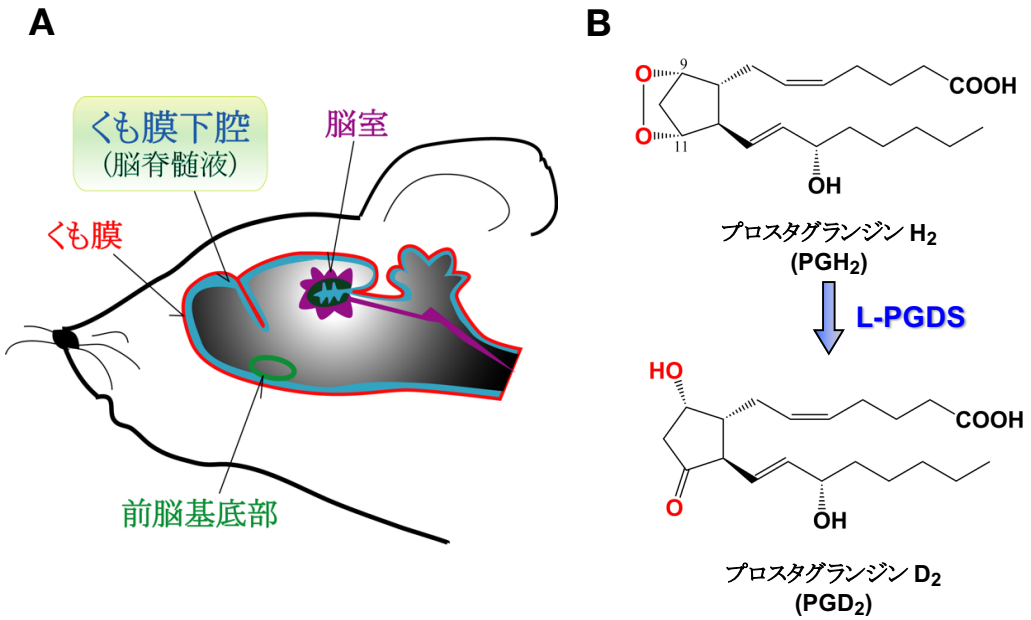



**Figure 1.** (A) 哺乳類脳の模式図。L-PGDS は、くも膜(赤色)で活発に産生され、くも膜下腔の脳脊髄液中(水色)に分泌される。(B) L-PGDS が触媒する異性化反応。$PGH_2$(上)から睡眠誘発物質である $PGD_2$(下)を産生する。

に分泌され、脳内の $PGD_2$ レセプターへと輸送すると考えられている[5]。これらのことから、L-PGDS は、脳内において $PGD_2$ を生成し、輸送することで睡眠調節に大きく関与しており、L-PGDS の酵素としての機能の解明は、従来のものより副作用の少ない睡眠導入薬の開発に繋がると考えられる。

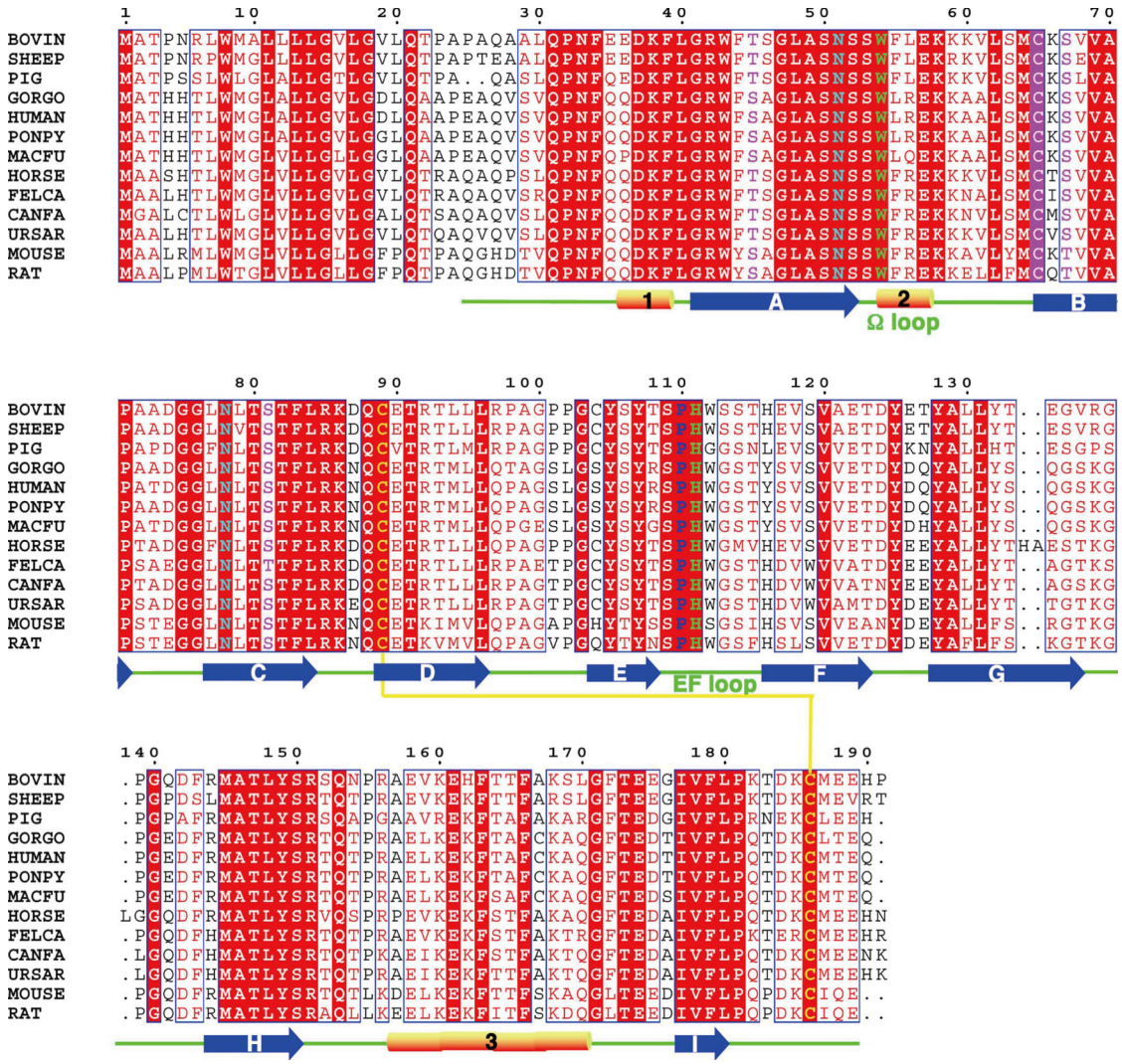



**Figure 2. L-PGDSの配列アラインメント。**L-PGDSの二次構造は下に示している。蛋白質のβ-ストランドを青色、α-ヘリックスを橙色で示している。酵素活性中心Cys65は紫色で示し、分子内ジスルフィド結合は黄色で示している。

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。現在までに 100 種類以上のリポカリン蛋白質が同定されているが、ほとんどは疎水性低分子の輸送に関与している[6]。L-PGDS は酵素として最初に同定されたリポカリンである。L-PGDS は 189 個のアミノ酸より構成されており、分子内に 3 個の Cys 残基(Cys65, Cys89, Cys186)を持っている(**Fig. 2**)。そのうち Cys89 と Cys186 は β バレルの外側でジスルフィド結合を形成している。この分子内ジスルフィド結合はほとんどのリポカリンファミリー蛋白質で保存されており、リポカリン蛋白質の立体構造の安定化に寄与している。一方で、Cys65 は L-PGDS のみに見出される Cys 残基であり、Cys65 を Ala に置換すると L-PGDS の酵素活性が完全に消失することから、Cys65 が酵素活性に必須の残基であることが明らかになっている[7]。L-PGDS の種による酵素活性の違いを解析したところ、魚類では酵素活性を持たず、両生類や鳥類では酵素活性を保存しているが、哺乳類と比較して、その酵素活性が非常に低いことがわかっている[8,9]。以上のことから、L-PGDS は、Cys65 の獲得により、リポカリンファミリーの中で唯一、輸送蛋白質から酵素蛋白質へと進化したと考えられている[7,10]。

L-PGDS のもう一つの機能として、様々な疎水性低分子と結合できることが明らかになっている。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(**Fig. 3B**)、β バレルの内部でレチノイド(**Fig. 3C**)などの細長い形状の疎水性低分子と特異的に結合する[11-13]。しかし、*in vitro* 研究により、L-PGDS は $PGH_2$ や $PGD_2$ だけでなく、分子の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、ビリベルジン(**Fig. 3C**)などとも強く結合することが報告されている($K_d$ = 30-180 nM)[14,15]。したがって、L-PGDS は、$PGD_2$ 合成酵素として機能すると同時に、各種の体液において脂溶性低分子化合物の結合と輸送を行う多機能蛋白質であると考えられている。

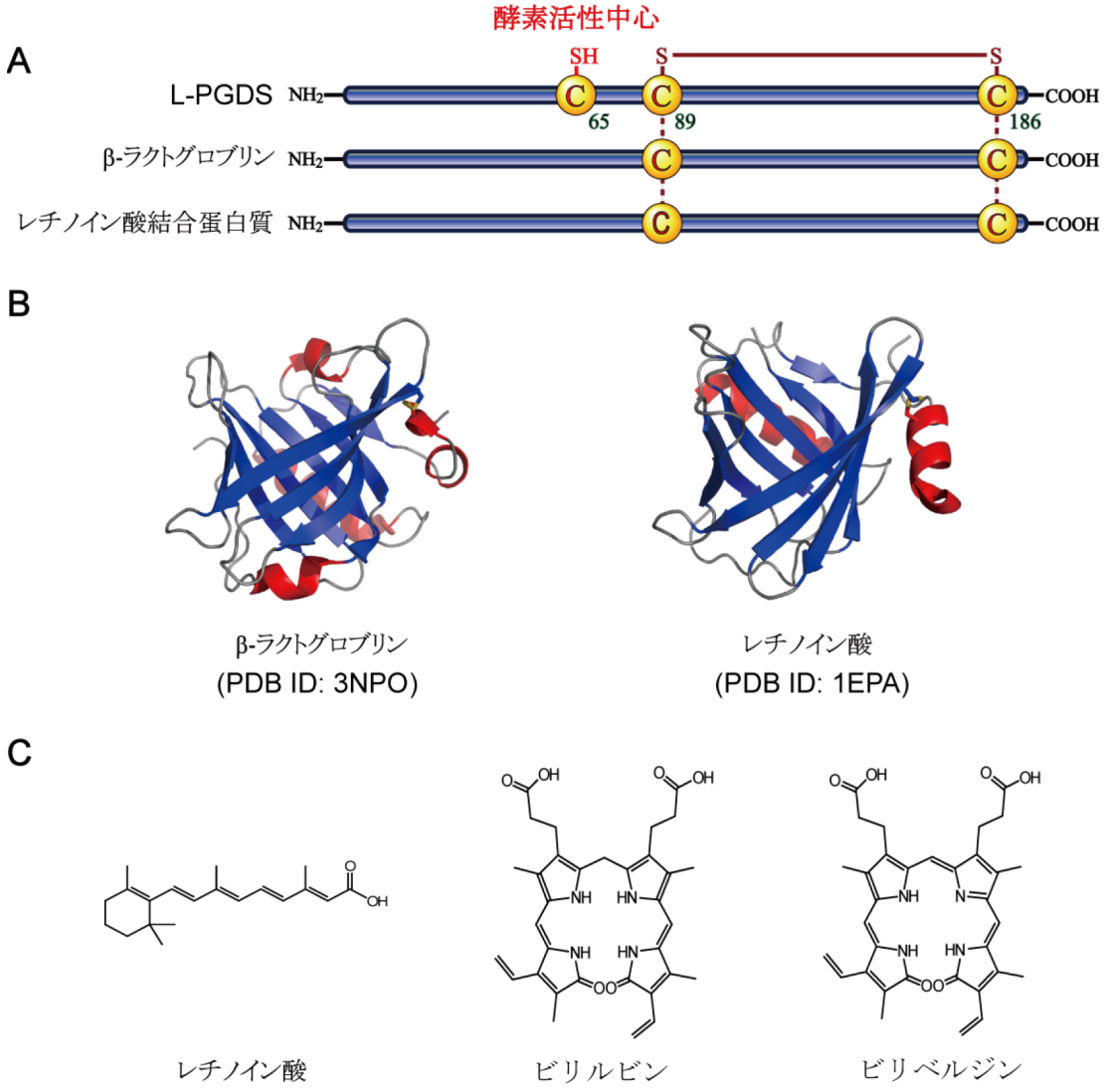



**Figure 3.** (A)リポカリンファミリー蛋白質のCys残基の比較。(B)L-PGDSと代表的なリポカリンファミリー蛋白質の構造。蛋白質のβ-ストランドを青色、α-ヘリックスを赤色で表示した。一般的にリポカリンファミリー蛋白質は、8本のβ-ストランドより成るβバレル構造をとり、バレル内部の空洞(cavity)に疎水性リガンドが結合する。(C)レチノイン酸、ビリルビンおよびビリベルジンの化学構造式。

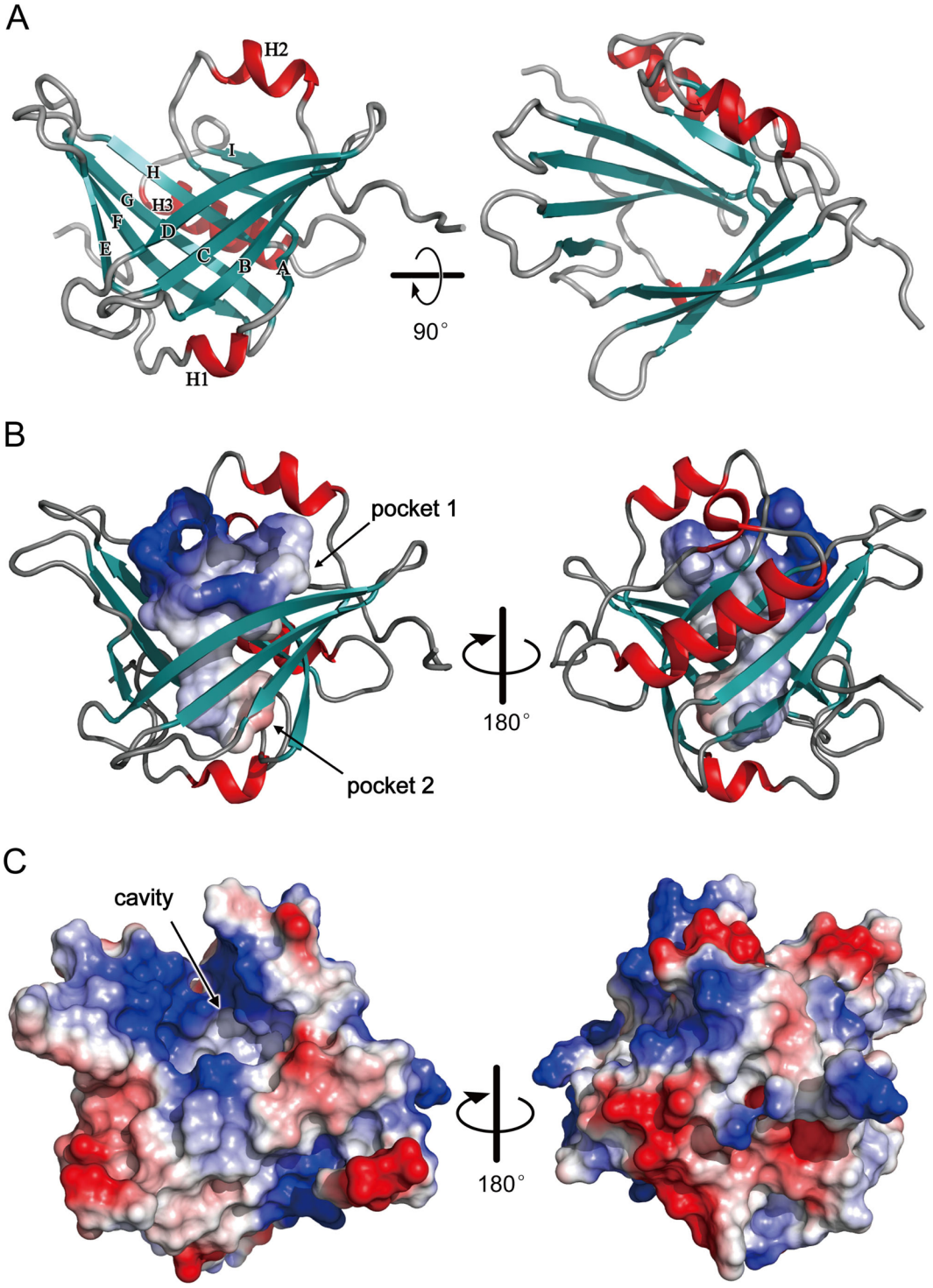



**Figure 4.** (A) L-PGDS の立体構造の模式図 (左: side view, 右: top view)。β-ストランドを青色、α-ヘリックスを赤色、ループ領域を灰色で表示している。8 本の β-ストランドより成るバレル構造を持つ、典型的なリポカリンフォールドを形成している。(B) L-PGDS の cavity の静電ポテンシャル図。L-PGDS の cavity は、二つに分岐した形状を持っている。比較的親水的な cavity 上部を pocket 1、疎水的な cavity 底部を pocket 2 と呼んでいる。(C) L-PGDS の表面静電ポテンシャル図。正電荷の領域を青色で、負電荷の領域を赤色で、電荷のない領域を灰色で表示している。

多次元核磁気共鳴法および X 線結晶構造解析を用いた構造生物学的研究により、L-PGDS も、リポカリンファミリー蛋白質に特有である 8 本の β-ストランドが樽状に配置して形成される β バレル構造を形成していると報告されている(**Fig. 4A**)。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(**Fig. 4B**) [15,16]。この大きな cavity はレチノイドやビリルビン、ビリベルジンを収納することが可能であるため、L-PGDS は際立って広いリガンド選択性を示すと考えられる。最近の研究で、L-PGDS が動脈瘤性くも膜下出血の患者の脳脊髄液において、細胞傷害性を持つヘムの不要代謝産物であるビリベルジンを捕捉することが報告されている[17]。さらに、生体内においては、L-PGDS が沈着性のアミロイド β ペプチドと高い親和性で結合し($K_d$ = 20 nM)、アミロイド β ペプチドのミスフォールディングを防いで凝集体形成を阻害することが報告されている[18]。L-PGDS はアルツハイマー病患者とアルツハイマー病モデルマウスの双方の老人斑に局在している。このように L-PGDS と疎水性低分子の相互作用は、*in vitro*, *in vivo* の系で広く研究されている。

L−PGDS より産生された $PGD_2$ は、生体内に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(**Fig. 5**)。$PGD_2$ の異性化に関与する主要な代謝酵素は NADPH 依存性 11-ケト還元酵素であることが明らかになっている。NADPH 依存性 11-ケト還元酵素は、生物活性を持つ 9α-11β プロスタグランジン $F_2$ (9α-11β-$PGF_2$)の産生を触媒する[19]。$PGD_2$ の代謝産物 9α-11β-$PGF_2$ は、血小板凝集抑制作用、血管および気管支平滑筋収縮作用、免疫細胞の化学誘引を誘導することが明らかになっている[20]。したがって、NADPH は、9α-11β-$PGF_2$ の生成を触媒する補酵素として、生体内において $PGD_2$ の濃度調節やアレルギーなどの疾患に影響を与えると考えられている。さらに、NADPH と同様の細胞内還元剤であるグルタチオン(GSH)の存在下で、L-PGDS の $PGH_2$ から $PGD_2$ への異性化反応を触媒する酵素活性が増加することが報告されている[9]。これらのことから、NADPH は L-PGDS と結合して $PGD_2$ の産出をフィードバック制御している可能性が考えられた。しかし、L-PGDS が疎水性低分子輸送タンパク質ファミリーに属しているため、L-PGDS と NADPH のような親水性低分子との相互作用研

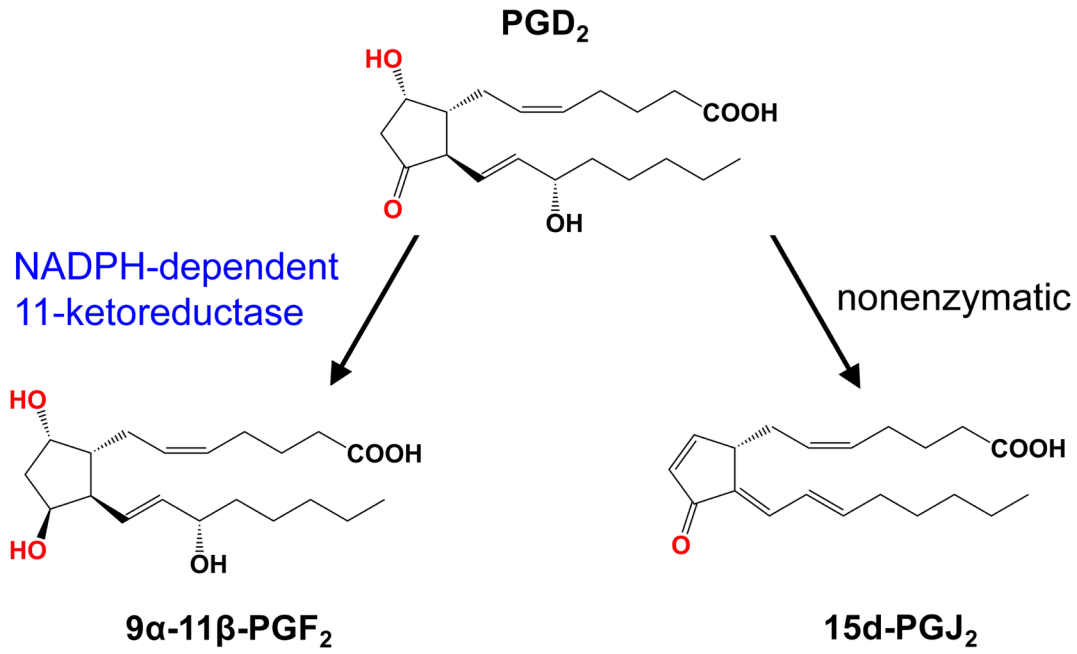



**Figure 5. $PGD_2$ 主要な代謝経路**。$PGD_2$ は NADPH 依存性 11-ケト還元酵素により 9α-11β-PGF2α (左下)に代謝される。また、$PGD_2$ は溶液中で非酵素的に脱水を受けて、15d-$PGJ_2$ (右下)になる。

究はこれまでに報告されていない。

一方、L-PGDS の反応機構を解明するために、著者の属する研究室では、核磁気共鳴法(NMR)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[15, 30]、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、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。

第一章では、L-PGDS と NADPH の相互作用について等温滴定熱量測定(ITC)と NMR を用いて研究した。比較のため、$NADP^+$、NADH、$NAD^+$の測定も行った。さらに、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、L-PGDS と強く結合した NADPH に対してはドッキングモデルを構築した。

第二章では、L-PGDS と基質の安定誘導体である U-46619 の複合体の立体構造は、X 線結晶構造解析法を用いて決定した。得られた複合体構造中の U-46619 の位置は触媒残基である Cys65 からは離れていたため、L-PGDS には cavity 内部に基質と結合できる複数の部位があると考えられた。今回の複合体構造は基質が進入する過程の中間体と仮定して、進入過程のモデルを提案した。

# 本論

## 第一章　L-PGDS と NADPH の相互作用解析

### 第一節　背景

序論に述べたように、NADPH は、NADPH 依存性 11-ケト還元酵素の補酵素として、生体内において $PGD_2$ の不活性化過程に関与することが明らかになっている。さらに、還元剤である GSH は、L-PGDS の酵素活性を有意に増加することから[9]、細胞内の還元剤である NADPH も、L-PGDS の酵素活性に関与する可能性が考えられる。

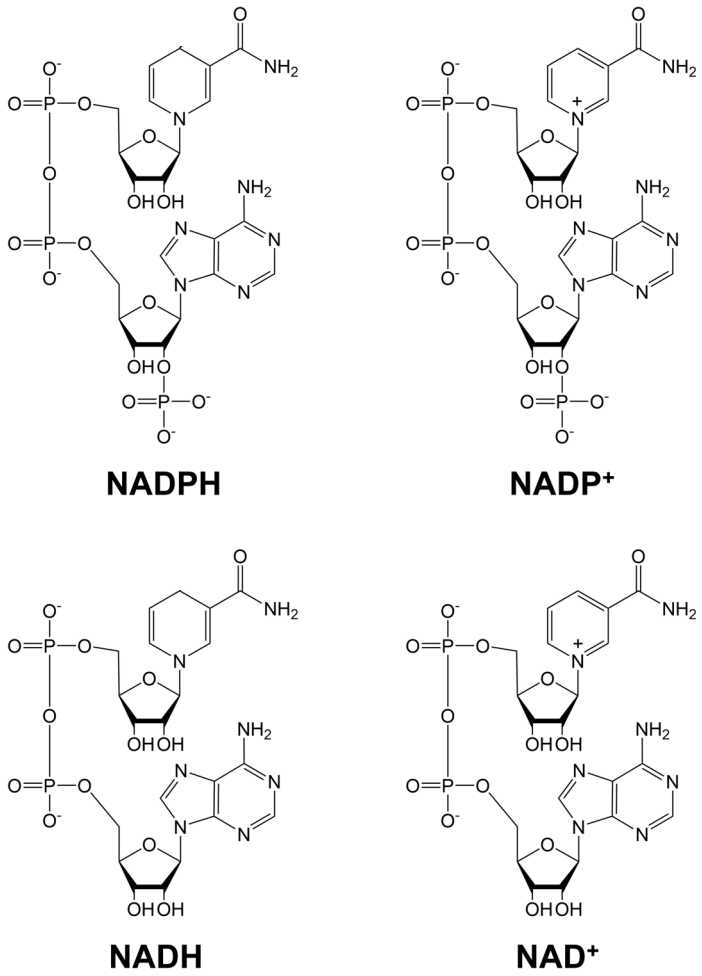



**Figure 6.** NADPH、$NADP^+$、NADH および $NAD^+$の化学構造式。

NADPH は生体内の様々な酵素の補酵素として、生体成分の生合成に必要な酸化還元作用の役割を持ち、光合成、脂肪酸、ステロイドの生合成、薬物や糖質、脂質の代謝に作用し、その他の重要な酸化還元反応に関係していることが明らかになっている[21]。また、NADPH はニコチンアミド補酵素と呼ばれている。ニコチンアミド補酵素は、還元型 NADPH および酸化型 $NADP^+$、還元型 NADH および酸化型 $NAD^+$の 4 種類の分子である**(Fig. 6)**。

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。L-PGDS は、パーキンソン病リスク因子と構造的に類似しているパラコートにより誘導されるアポトーシスに対して、神経細胞を保護することが示されている[22]。また最近の研究で、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[23]。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と考えられている[24]。NADPH は、NOX の基質として ROS の産出に関与しており、種々の疾患において影響を及ぼしていると考えられる[21]。

$$\mathrm{NADPH} + 2\mathrm{O}_2 \leftrightarrow \mathrm{NADP}^+ + 2\mathrm{O}_2^{\bullet -} + \mathrm{H}^+$$

これらの研究から、L-PGDS は NADPH と関連して生体内での様々な生理作用を発揮していると考えられる。しかし、L-PGDS と NADPH との相互作用についての研究は報告されていない。そこで、本研究では、ROS の過剰産生により誘発される神経細胞死から L-PGDS が果たす保護作用の分子メカニズムを解明するために、熱力学的および構造生物学的な視点から、L-PGDS と NOX の基質である NADPH との相互作用解析を行った。比較のため等温滴定熱量測定(ITC)を用いて、NADPH、$NADP^+$、NADH および $NAD^+$と L-PGDS の結合実験の熱力学パラメータおよび解離定数($K_d$)も決定した。

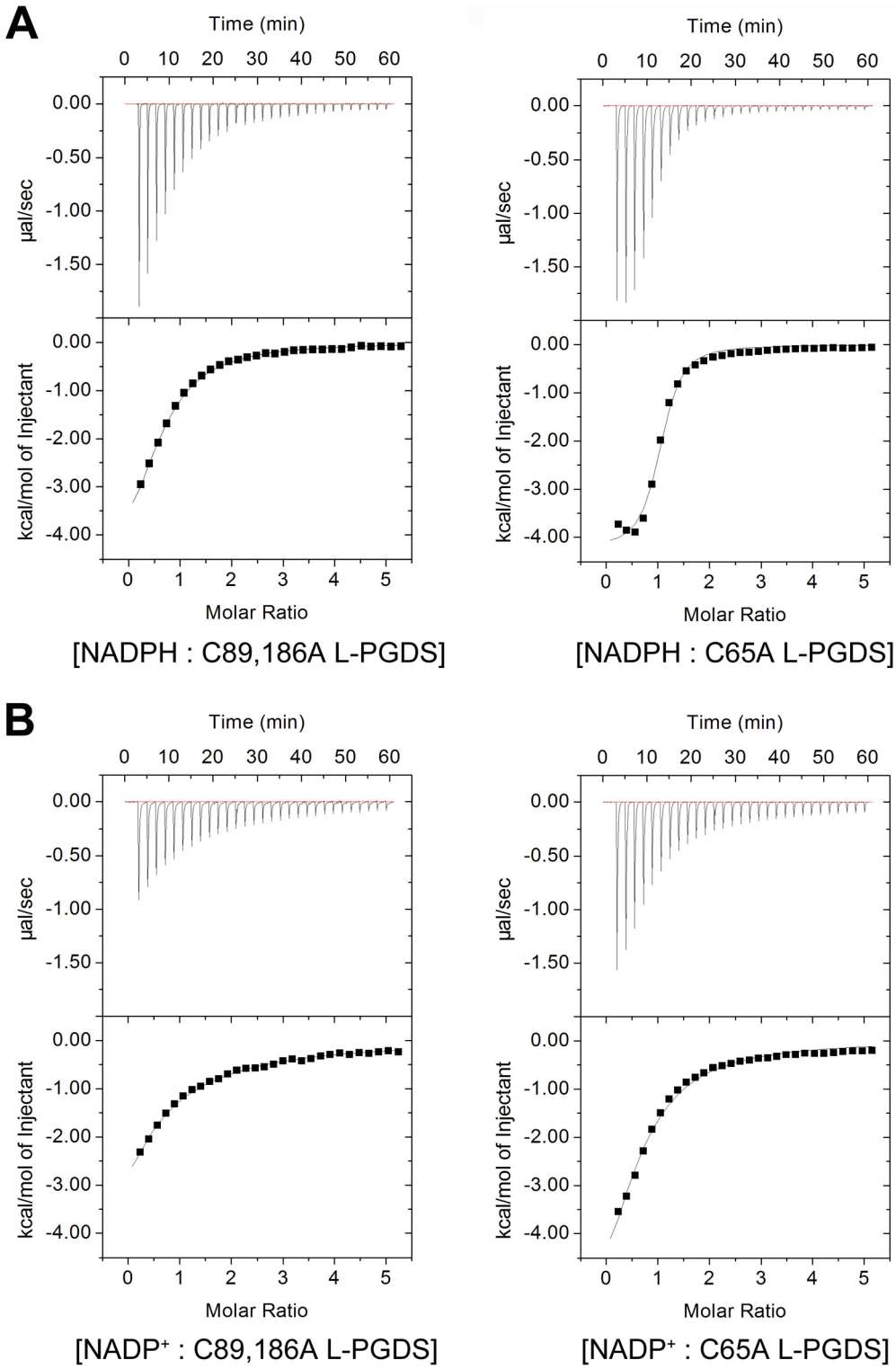
# 第二節　結果

## 第一項　L-PGDS と NADPH との相互作用の熱力学的評価

序論に述べたように、野生型 L-PGDS は、アミノ酸配列の特徴として、3 個の Cys 残基(Cys65, Cys89, Cys186)を持ち、Cys89 と Cys186 は β バレルの外側でジスルフィド結合を形成している。しかし、野生型 L-PGDS は長時間静置すると、分子内ジスルフィド結合を形成していない Cys65 により間違ったジスルフィド結合の形成が起きて沈殿するため、長期使用ができない[7]。これまでの L-PGDS 変異体の研究から、Cys89 と Cys186 を Ala に置換した変異体の Cys89,186Ala L-PGDS および Cys65 を Ala に置換した変異体の Cys65Ala L-PGDS は、酵素活性および疎水性低分子結合活性が野生型と比べて大きく変化しないことが示されている[7,15,16]。したがって、Cys89,186Ala L-PGDS および Cys65Ala L-PGDS を今回の ITC および NMR 研究に用いた。

L-PGDS と NADPH、$NADP^+$、NADH および $NAD^+$の結合親和性、結合比および結合エネルギーを明らかにするために、ITC を用いた相互作用解析を行った。各滴定の発生熱量をリガンドとタンパク質のモル比に対してプロットすることにより、熱量プロット**(Fig. 7)**、熱力学パラメータおよび解離定数($K_d$)が得られた**(Table 1)**。

L-PGDS 溶液(0.2 mM)にニコチンアミド補酵素溶液(5 mM)を滴定したところ、すべての結合で負のピークが観測され、$n_{bs}$ の値から結合比 1:1 の発熱反応であることが明らかになった。Cys89,186Ala L-PGDS の熱力学パラメータおよび解離定数($K_d$)を算出したところ、NADPH では解離定数($K_d$) 47 μM、ギブズ自由エネルギー変化($\Delta G$) –5.9 kcal/mol、エンタルピー変化($\Delta H$) –4.5 kcal/mol、エントロピー項($-T\Delta S$) –1.4 kcal/mol であった。そこで、$\Delta H$ と$-T\Delta S$ 値は共に負の値であることから、NADPH と L-PGDS の結合反応では、$\Delta H$ と$-T\Delta S$ ともに結合に有利に働いていた。また、$NADP^+$では、$K_d$ 370 μM、$\Delta G$–4.7 kcal/mol となり、結合に有利な $\Delta H$ (–5.8 kcal/mol)および結合に不利な$-T\Delta S$ (1.1 kcal/mol)が観測され、$NADP^+$と L-PGDS 結合反応がエンタルピー駆動型であることがわかった。さら


A
Time (min)
0 10 20 30 40 50 60
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
µal/sec
0.00
-1.00
-2.00
-3.00
-4.00
kcal/mol of Injectant
0 1 2 3 4 5
Molar Ratio
[NADPH : C89,186A L-PGDS]
[NADPH : C65A L-PGDS]
B
[NADP+ : C89,186A L-PGDS]
[NADP+ : C65A L-PGDS]

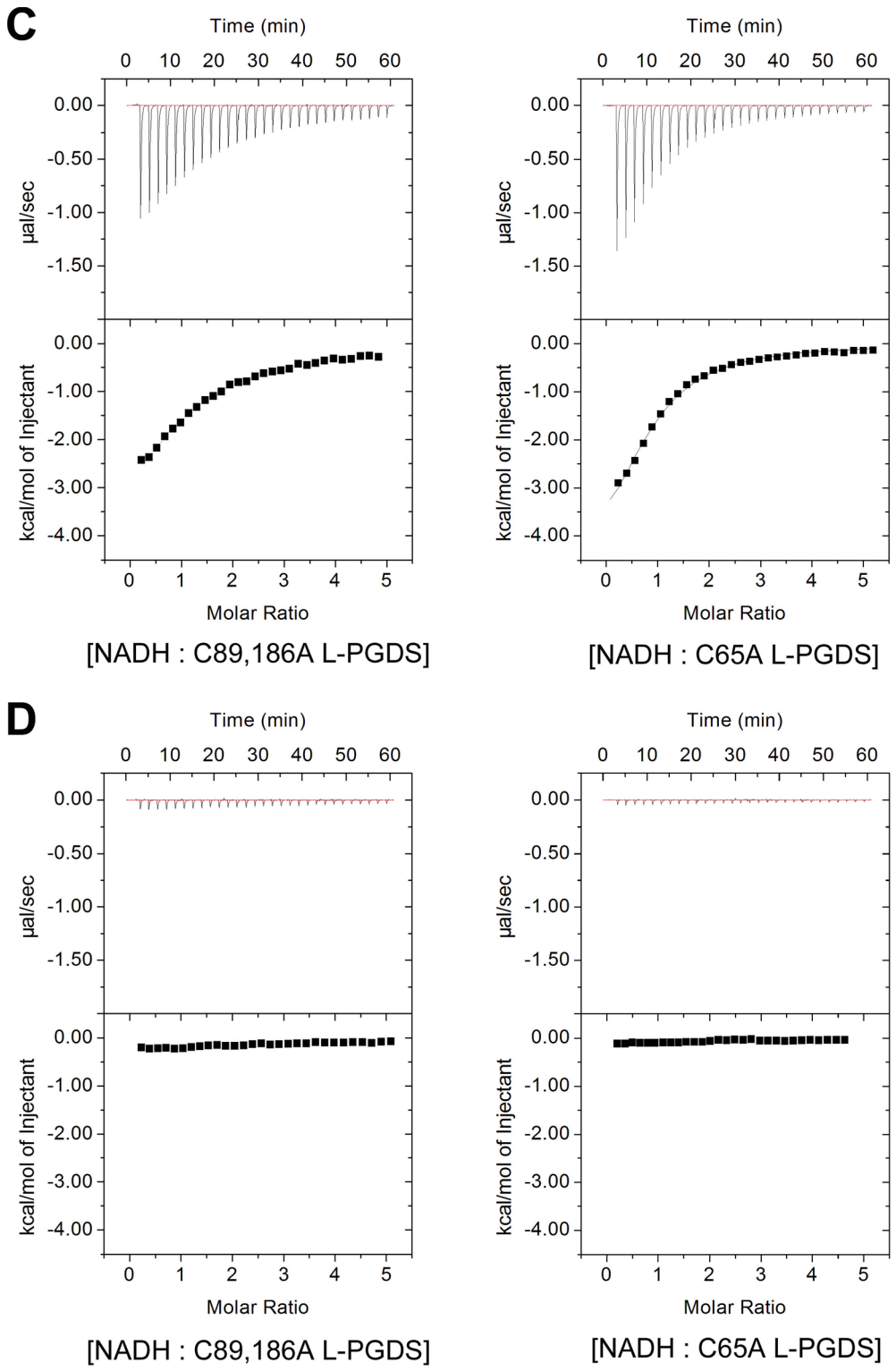



**Figure 7.** Cys89,186Ala L-PGDS(左)および Cys65Ala L-PGDS(右)と NADPH(A)、$NADP^+$(B)、NADH(C)、および $NAD^+$(D)の ITC 結合滴定プロファイル。上：発熱プロファイル；下：結合等温線。カーブフィッティングは one-site モデルを使用した。

**Table 1. L-PGDS とニコチンアミド補酵素の結合実験の熱力学パラメータ**

| | Ligands | XlogP [a] | $n_{bs}$ [b] | $K_d$ (μM) | $\Delta G$ (kcal/mol) | $\Delta H$ (kcal/mol) | $-T\Delta S$ (kcal/mol) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cys89,186Ala | NADPH | –1.13 | 1.0 ± 0.1 | 47 ± 6 | –5.9 ± 0.1 | –4.5 ± 0.3 | –1.4 ± 0.4 |
| | $NADP^+$ | –0.78 | 0.9 ± 0.1 | 370 ± 40 | –4.7 ± 0.1 | –5.8 ± 0.6 | 1.1 ± 0.7 |
| | NADH | –1.45 | 0.8 ± 0.2 | 320 ± 70 | –4.8 ± 0.1 | –6.2 ± 0.7 | 1.4 ± 0.8 |
| | $NAD^+$ | –1.20 | n.d.[c] | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| Cys65Ala | NADPH | | 1.0 ± 0.0 | 20 ± 2 | –6.8 ± 0.1 | –4.0 ± 0.4 | –2.8 ± 0.3 |
| | $NADP^+$ | | 0.7 ± 0.0 | 210 ± 25 | –5.4 ± 0.1 | –7.9 ± 1.2 | 2.5 ± 1.3 |
| | NADH | | 0.7 ± 0.2 | 210 ± 3 | –5.4 ± 0.0 | –6.4 ± 1.3 | 1.0 ± 1.3 |
| | $NAD^+$ | | n.d.[c] | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |

[a] 各リガンドの疎水性を示す XlogP 値は ALOGPS 2.1 プログラムを用いて計算した[25]。
[b] $n_{bs}$ は結合比である。
[c] 確認できなかった。

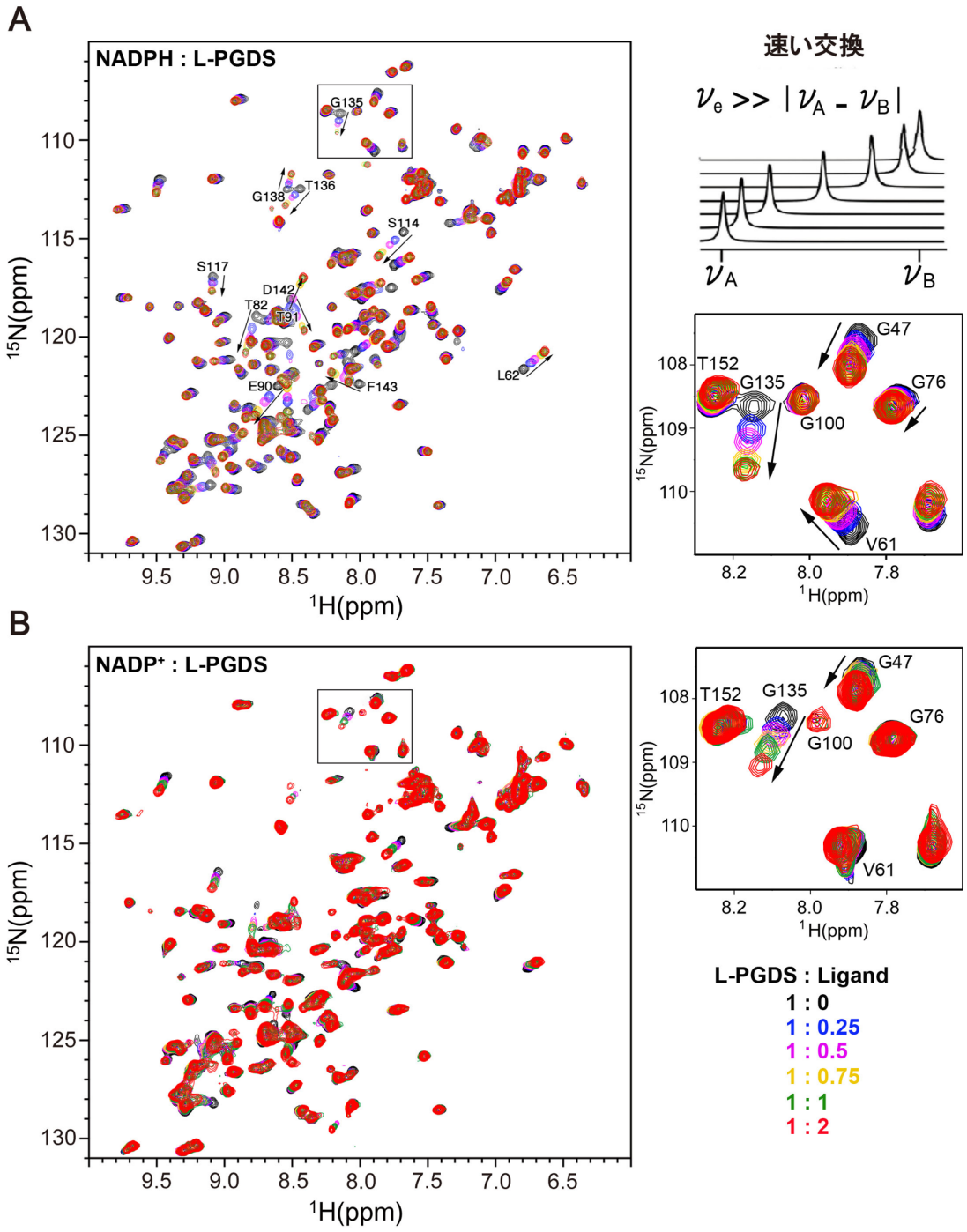
に、NADH では、$K_d$ 320 μM、$\Delta G$–4.8 kcal/mol であった。NADH と L-PGDS の結合親和性は $NADP^+$と同程度であるが、NADPH と比べて低下していた。$\Delta H$ と–$T\Delta S$ 値はそれぞれ –6.2 kcal/mol および 1.4 kcal/mol であり、結合反応がエンタルピー駆動型であることがわかった。一方、$NAD^+$では、結合が非常に弱いことから信頼できる熱力学パラメータが算出できなかった。

また、ジスルフィド結合の有無によってリガンド結合に影響がないかを調べるため、Cys65Ala L-PGDS と 4 種類のニコチンアミド補酵素の ITC 結合実験も行った。Cys65Ala L-PGDS の場合、NADPH との結合では解離定数($K_d$) 20 μM、ギブズ自由エネルギー変化($\Delta G$) –6.8 kcal/mol、エンタルピー変化($\Delta H$) –4.0 kcal/mol、エントロピー項(–$T\Delta S$) –2.8 kcal/mol であった。$NADP^+$では、$K_d$ 210 μM、$\Delta G$ –5.4 kcal/mol となり、結合に有利な $\Delta H$ (–7.9 kcal/mol)および結合に不利な–$T\Delta S$ (2.5 kcal/mol)が観測され、$NADP^+$と L-PGDS の結合がエンタルピー駆動型であることがわかった。さらに、NADH では、$K_d$ 210 μM、$\Delta G$–5.4 kcal/mol であった。NADH と Cys65Ala L-PGDS の結合親和性は $NADP^+$と同じであるが、NADPH と比べて低下していた。$\Delta H$ と–$T\Delta S$ 値はそれぞれ –6.4 kcal/mol および 1.0 kcal/mol であった。一方、$NAD^+$は、結合が非常に弱いため信頼できる熱力学パラメータを算出できなかった。以上の結果から、ジスルフィド結合の有無に関わらず、L-PGDS とニコチンアミド補酵素との相互作用には大きな影響がないことが分かった。化学構造の違いを考慮すると、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 の高い結合親和性に寄与すると考えられた。また、疎水性リガンドとの結合と比較すると、特に $NADP^+$と NADH の結合は弱く非特異的な結合の可能性が示された。

## 第二項　L-PGDS と NADPH との NMR 滴定結合実験

L-PGDS の NADPH 結合部位を同定するために、NMR 滴定実験を行った。この実験では、均一な $^{15}$N ラベル蛋白質を用い，$^{1}$H-$^{15}$N HSQC スペクトルを測定した。低分子化合物が蛋白質と複合体を形成した場合、相互作用部位近傍において磁気的環境が変化するため複合体形成前と比べて化学シフト値が変動する。このため NMR スペクトルを比較することで、化学シフトの変化から相互作用に関与するアミノ酸残基の同定ができる。

リガンドの濃度が増加すると顕著な化学シフト値の変動が観察された。多数のクロスピークが移動した(**Fig. 8**)。また、NMR シグナルの変化の様子から、L-PGDS と NADPH、$NADP^+$、NADH、および $NAD^+$の結合反応は速い交換過程であることが明らかになった。蛋白質中にあるピークの遊離状態 A の化学シフトを$\nu_A$、複合体形成状態 B の化学シフトを$\nu_B$と表し、交換速度を$\nu_e$とする。A↔B のような交換状態にあれば、化学シフト差｜$\nu_A - \nu_B$｜と交換速度$\nu_e$の関係によって(**Fig. 8A**)、ピークの化学シフト値や強度が変化する。速い交換過程の場合、滴されるに従って信号がフリーの位置から複合体の位置に向かって直線的に移動していくので、ピークの帰属が容易である。


A
NADPH : L-PGDS
G135
T136
G138
S114
S117
D142
T82
I91
E90
F143
L62
$^{15}$N(ppm)
$^{1}$H(ppm)
速い交換
$\nu_e >> |\nu_A - \nu_B|$
$\nu_A$
$\nu_B$
G47
T152
G135
G76
G100
V61
B
NADP$^+$ : L-PGDS
L-PGDS : Ligand
1 : 0
1 : 0.25
1 : 0.5
1 : 0.75
1 : 1
1 : 2

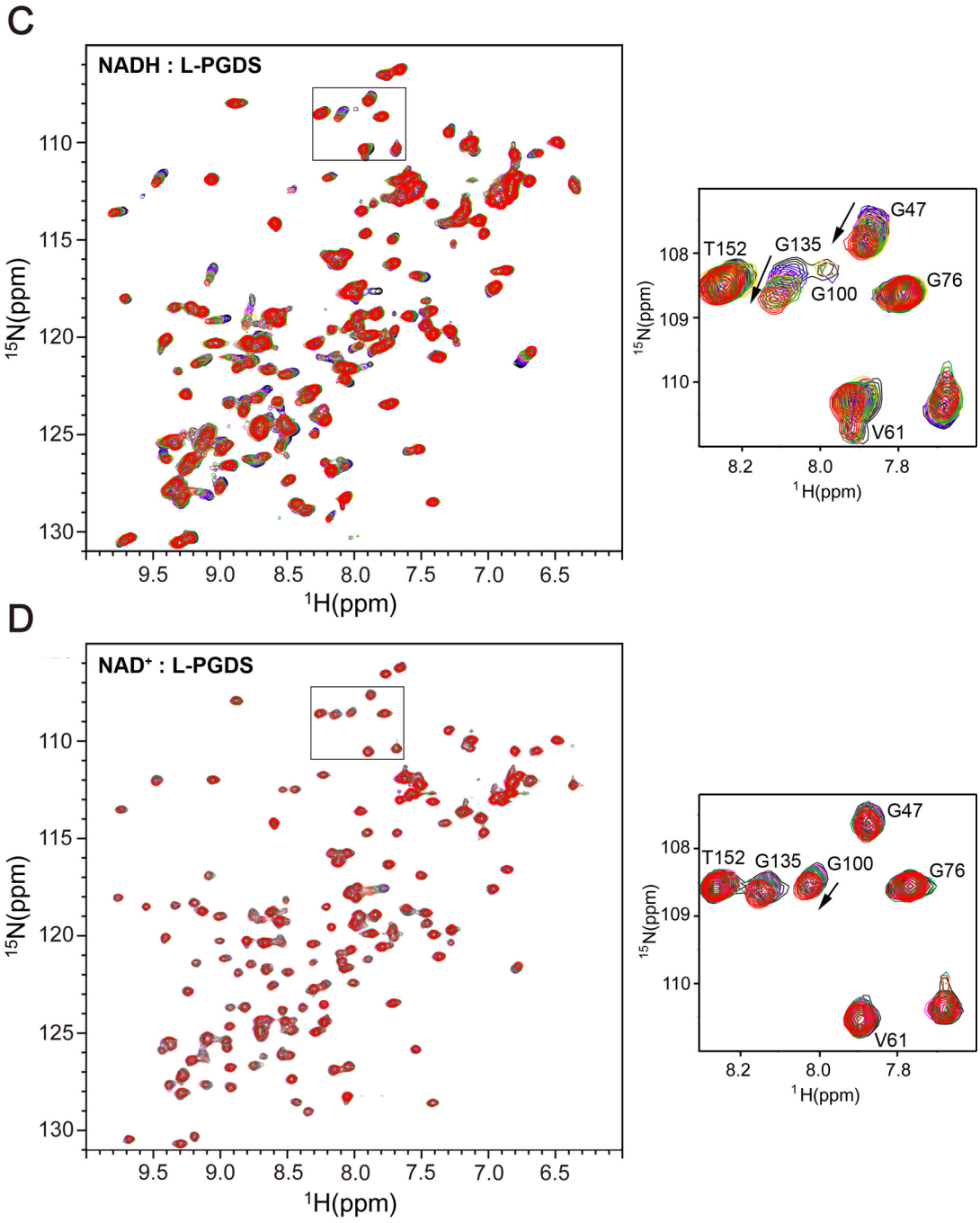



**Figure 8.** L-PGDS に対して NADPH (A)、NADP$^{+}$(B)、NADH(C)、および NAD$^{+}$(D)を滴下した $^{1}$H-$^{15}$N HSQC スペクトル。L-PGDS とリガンドの濃度比が 1:0(黒色)、1:0.25(青色)、1:0.5(紫色)、1:0.75(橙色)、1:1(緑色)、1:2(赤色)を示す。

ニコチンアミド補酵素の結合に伴う L-PGDS の各残基の $^{1}H$ と $^{15}N$ の化学シフト値の変化(CSP)をアミノ酸配列に対してグラフにした(**Fig. 9**)。標準偏差を σ として、リガンドの結合による L-PGDS の化学シフト値の変化が大きかった残基(CSP ≥ 2σ)、および中程度の変化があった残基(2σ ≥ CSP ≥ 1σ)を **Table 2** に示した。

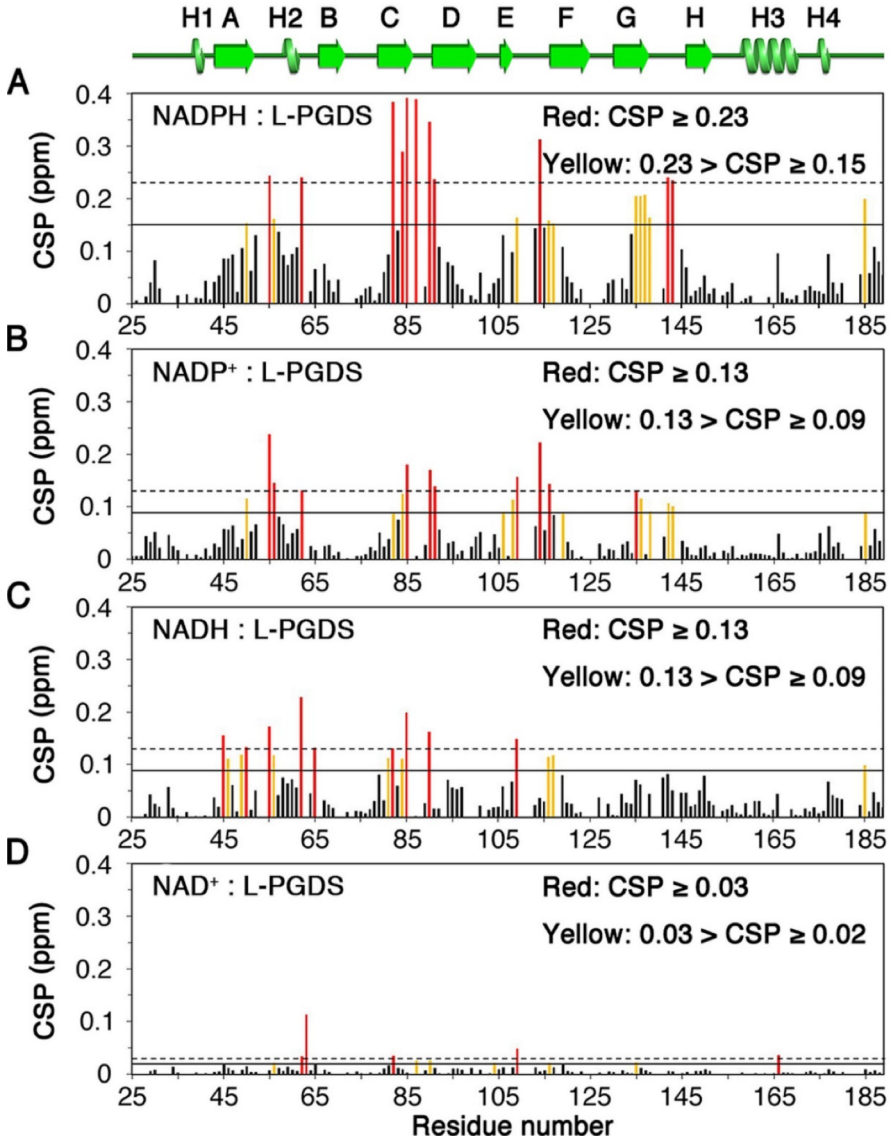



**Figure 9.** NADPH(A)、$NADP^{+}$(B)、NADH(C)、および $NAD^{+}$(D)の添加による L-PGDS 化学シフト値変化。横軸は、L-PGDS のアミノ酸番号、縦軸は化学シフト変化量(CSP)。$CSP = \{(\Delta\delta_H \times W_H)^2 + (\Delta\delta_N \times W_N)^2\}/2$ で変化量を計算した。大きな変化があった残基(CSP ≥ 2σ)を赤色で表示した。中程度の変化があった残基を黄色(2σ ≥ CSP ≥ 1σ)で表示した。$W_{HN} = 1.0$, $W_N = 0.2$ の値を用いた。化学シフト変化の標準偏差値(σ)を実線で、2σ の値を点線で示す。

**Table 2.** 化学シフト値が大きく変化した残基と中程度の変化があった残基

| Ligand | Residue number (CSP ≥ 2σ) | Residue number (2σ ≥ CSP ≥ 1σ) |
|---|---|---|
| NADPH | Phe55, Leu62, Thr82, Leu84, Arg85, Asn87, Glu90, Thr91, Ser114, Asp142, Phe143 | Ser50, Arg56, Ser109, His116, Ser117, Gly135, Thr136, Lys137, Gly138, Lys185 |
| $NADP^+$ | Phe55, Arg56, Leu62, Arg85, Glu90, Thr91, Ser109, Ser114, His116, Gly135 | Ser50, Thr82, Leu84, Thr106, Ser108, Ser119, Thr136, Gly138, Asp142, Phe143, Lys185 |
| NADH | Ser45, Ser50, Phe55, Leu62, Cys65, Thr82, Arg85, Glu90, Ser109 | Ala46, Ala49, Arg56, Ser81, Leu84, His116, Ser117, Lys185 |
| $NAD^+$ | Leu62, Tyr63, Thr82, Ser109, Phe166 | Arg56, Asn87, Glu90, His104, His116, Gly135 |

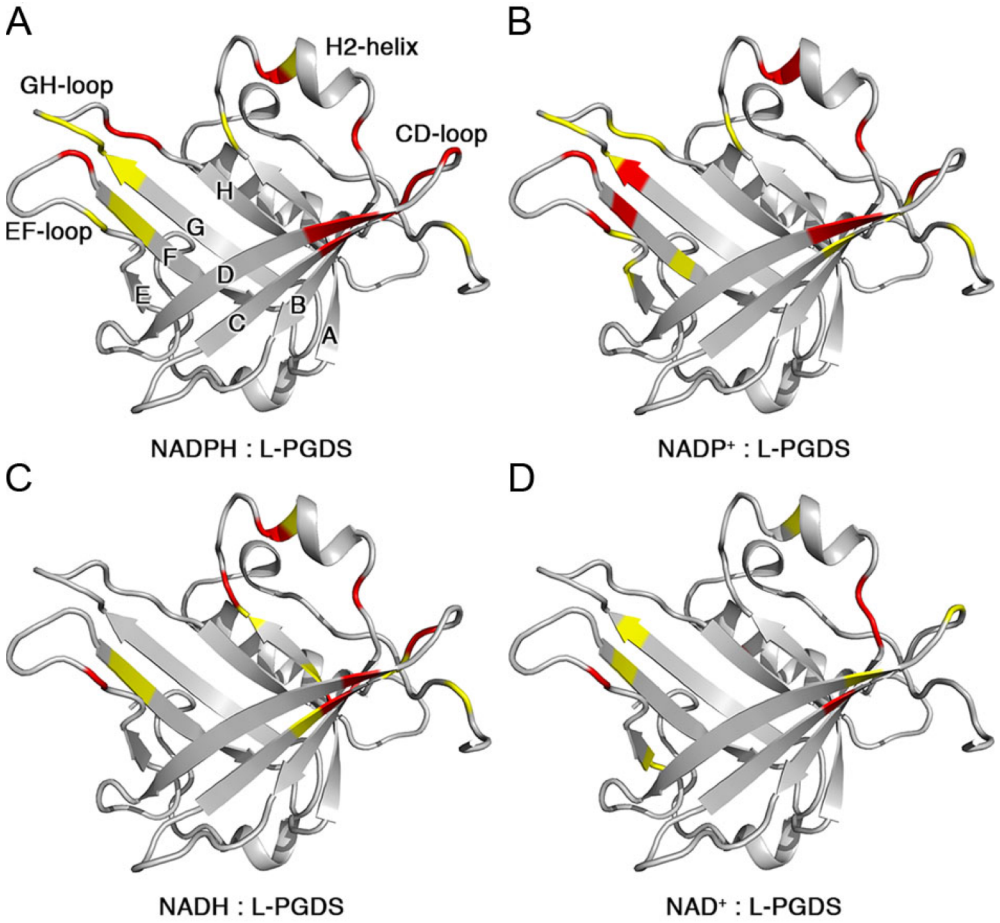



**Figure 10.** NADPH(A)、$NADP^+$(B)、NADH(C)、および $NAD^+$(D)の添加による L-PGDS 化学シフト値が大きく変化した残基(赤色)と中程度の変化があった残基(黄色)を L-PGDS の立体構造(PDB ID: 2E4J)上で示した。

さらに、大きな変化(CSP ≥ 2σ と 1σ)が観察された残基をそれぞれ L-PGDS の立体構造上にマッピングし、ニコチンアミド補酵素と L-PGDS との相互作用部位の同定を行った**(Fig. 10)**。NADPH の結合による化学シフト値の変化が大きかった残基は(CSP ≥ 0.23 ppm)、主に β-ストランド C, D、CD-ループ、EF-ループ、GH-ループ、および H2-ヘリックスに広く分布していた(**Fig. 10A**)。また、$NADP^+$では、化学シフト値の変化が大きかった残基は(CSP ≥ 0.13 ppm) NADPH と同様に、β-ストランド D, F, G、CD-ループ、EF-ループ、および H2-ヘリックスに分布していた**(Fig. 10B)**。したがって、推定された両者の結合領域が非常に類似していることから、NADPH と $NADP^+$では、類似の結合様式を持つ可能性が示された。さらに、NADH の結合による変化が大きかった残基は(CSP ≥ 0.13 ppm)は、β-ストランド A, B, C, D、CD-ループ、および H2-ヘリックスと酵素活性中心である Cys65 付近の β バレル上部に集中していた**(Fig. 10C)**。一方、$NAD^+$の添加の場合、β ストランド C および H2-ヘリックス上にある数個の残基を除けば、大きな化学シフト値の変化が観察されなかった**(Fig. 9D, Fig. 10D)**。以上の結果より、NADPH、$NADP^+$、NADH、および $NAD^+$は、L-PGDS の β バレル上部に結合していることが示された。

## 第三節　考察

### 第一項　L-PGDS と NADPH との結合領域の考察

ITC 測定した結果、L-PGDS は NADPH と強く、$NADP^+$および NADH と弱く結合することがわかった。NADPH に対する L-PGDS の $K_d$ は 47 μM であり、$NADP^+$の $K_d$ 370 μM と比較して約 8 倍高い結合親和性を有することが明らかになった**(Table 1)**。$NADP^+$では、ニコチンアミド環の窒素原子上に正電荷を含むため、ニコチンアミド環上の電荷分布は、NADPH と異なっている**(Fig. 6)**。また、L-PGDS の静電ポテンシャル図より、リガンドが結合する cavity の上部は正電荷を持つアミノ酸残基が多く比較的親水的な環境になっている**(Fig. 4B,C)** [15]。NADPH に比べて $NADP^+$が低い結合親和性を示した理由として、$NADP^+$のニコチンアミド環上の正電荷と結合 cavity の上部の正電荷を持つアミノ酸残基の間の静電反発があると考えられた[26]。一方、NADH と L-PGDS の $K_d$ は 320 μM であり、NADPH と L-PGDS の $K_d$ 47 μM と比較して約 7 倍弱い結合親和性を有することが明らかになった。NADH の化学構造は基本的には NADPH とほとんど同じであるが、アデノシンのヌクレオチドの 2'位はリン酸基ではなくヒドロキシル基である**(Fig. 6)**。L-PGDS の立体構造ではリガンド結合 cavity にいくつかの塩基性残基があるため、L-PGDS は NADPH の 2'-リボースリン酸基と結合することができると考えられる。

一方、**Fig. 9A, B** に示すように、L-PGDS は NADPH との結合によって、CD-ループの付近において $NADP^+$との結合より大きい化学シフト値の変化を観測された。これらの結果より、NADPH のニコチンアミド環は、CD ループの周囲の領域と相互作用すると考えられた。また、NADPH あるいは $NADP^+$では、NADH と比べて化学シフト値の変化が大きかった残基は、β-ストランド G, H および GH-ループの付近に位置していた**(Fig. 9A-C)**。これらの結果から、NADPH および $NADP^+$の 2'-リボースリン酸基は β-ストランド G, H および GH-ループの付近に認識されていることが示唆された。

## 第二項　リガンド結合モデル

NMR 滴定実験によるリガンド結合実験によって得られた結果から、NADPH は L-PGDS の cavity の上部に結合することが示された**(Fig. 10)**。そこで、より詳細な NADPH の結合様式を明らかにするため、ドッキングシミュレーションプログラム HADDOCK [27,28]を用いて、L-PGDS とリガンドのドッキングモデルの構築を行った。HADDOCK は、化学シフトの変化や変異体実験などにより得られた結合界面や相互作用残基対の情報を拘束条件に組み込むことができる剛体ドッキングプログラムである。HADDOCK から算出された 200 個の構造群を類似性に基づいてクラスター化し、各クラスターのうち、HADDOCK スコアが一番良好な結合モデルを **Fig. 11** に示した。得られた統計値を **Table 3** で示した。

**Table 3. L-PGDS と NADPH の結合モデルの統計値**

| | |
|---|---|
| HADDOCK score | –95.0 ± 6.6 |
| RMSD from the overall lowest-energy structure (Å) | 0.7 ± 0.1 |
| Van der Waals energy (kcal/mol) | –23.3 ± 8.8 |
| Electrostatic energy (kcal/mol) | –434.7 ± 58.4 |
| Desolvation energy (kcal/mol) | 8.8 ± 15.0 |
| Restraints violation energy (kcal/mol) | 112.4 ± 77.53 |
| Buried Surface Area ($Å^2$) | 936.7 ± 109.0 |
| Z-Score | –0.8 |

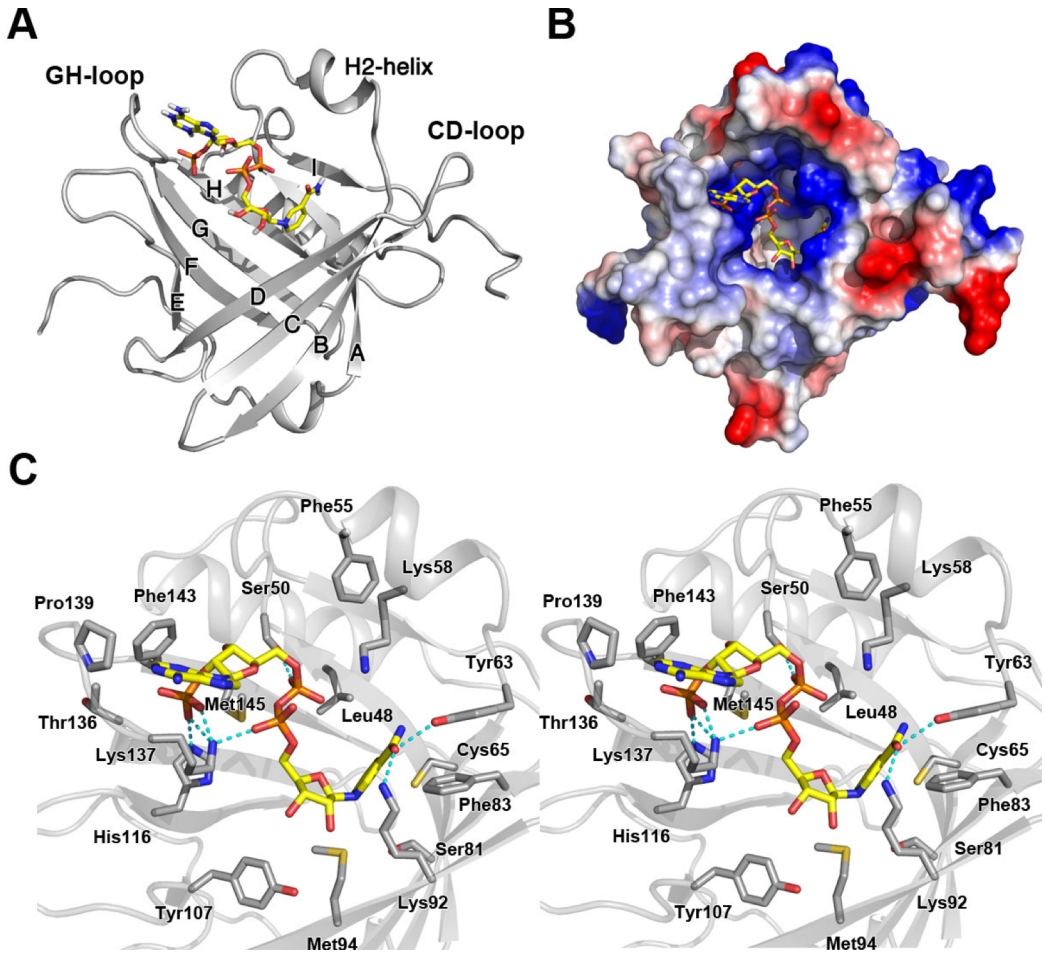



**Figure 11. NADPH と L-PGDS の結合ドッキングモデル。**NADPH を黄色のワイヤーモデルで示した。(A) NADPH は β バレル上部に結合していた。(B)L-PGDS の結合領域の表面静電ポテンシャル図。(C) NADPH との結合部位の詳細(交差法ステレオ図)。水素結合を水色の点線で示した。

NADPH 結合ドッキングモデルにおいて、NADPH は L-PGDS の cavity 上部の親水的な pocket 1 に結合していた**(Fig. 11A)**。Cavity において NADPH の結合部位は、後述の基質誘導体の結合部位**(Fig. 15)**より浅い位置であった。また、L-PGDS の cavity 入り口の領域は、幾つかの正電荷を持つ残基 Lys58、Lys92、His116、Lys137 などが分布し正に荷電している表面を形成しており、NADPH のリン酸基の負電荷との相互作用に寄与していると考えられた**(Fig. 11B,C)**。NADPH の 2'-リボースリン酸基は、β ストランド F 上の His116 および GH-ループ

上の Lys137 といずれも約 2 Å で近接している。また、β ストランド D 上の Lys92 および Ω ループ上の Tyr63 は NADPH のニコチンアミド環と約 3 Å で近接しており、NADPH のニコチンアミド環の認識に関与している可能性が示された**(Fig. 11C)**。このモデルは、ITC と NMR 結合実験の結果とよく合っていた。さらに、**Table 3** より、結合モデルの静電エネルギーは–434.7 ± 58.4 kcal/mol で、ファンデルワールスおよび脱溶媒和エネルギーより大きいことから、静電エネルギーが L-PGDS と NADPH の相互作用を支配していることが示唆された。この結果は、ITC による L-PGDS と NADPH の結合反応がエンタルピー駆動型であること**(Table 1)**と一致していた。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**(Table 1)**。

## 第三項　L-PGDS と NADPH との相互作用の生理学意義

これまでの *in vitro* の系での研究から、L-PGDS が酸化ストレスに対する保護作用に関与していることが報告されている。特に、L-PGDS は、ROS を捕捉することによって神経細胞死から保護することが提案されている[23]。本研究では、等温滴定熱量測定(ITC)により NADPH と L-PGDS の結合を熱力学的評価した。興味深いことに、NADPH と L-PGDS の $K_d$ は 20~47 μM であり、NADPH と NADPH オキシダーゼの $K_d$ 40 μM と同等であることが明らかになった[29]。すなわち、L-PGDS は、NADPH に結合することにより、NADPH オキシダーゼによる ROS の生成を減少させることで、神経細胞を保護する可能性が示唆された。NADPH オキシダーゼの活性に対する L-PGDS の特定の役割を解明するために、*in vivo* におけるさらなる研究が必要である。

# 第二章　L-PGDS と基質誘導体の複合体の構造解析

## 第一節　背景

当研究室ではこれまで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 複合体溶液構造を決定している(PDB ID: 2KTD) (**Fig. 4**) [15,30]。遊離型 L-PGDS と L-PGDS/U-46616 複合体の立体構造を比較することによって、リガンド結合に伴い cavity 上部の構造変化が起こし、リガンドを包み込むような構造をとることが明らかになった。しかしながら、この様に大きく特徴的な cavity を持つ L-PGDS にどのようにリガンドが進入するのかに関しては明らかになっていなかった。一般的に酵素の触媒機構や基質結合機構を解明するためには、酵素と基質や生成物などとの複合体の構造解析が不可欠である。これまで、L-PGDS と基質 $PGH_2$ との複合体構造解析が試みられてきたが、疎水性リガンドが不溶性であることや複合体が化学的に不安定であるなどの理由から成功していなかった。酵素と基質との結晶化は、結晶中で反応が起こり、決定された構造には反応生成物が結合していたり、反応が進んで反応生成物が離脱し、何も同定できないということもあるので、そのような場合には基質アナログを結合させたり、変異を入れることで酵素の活性を欠失させて複合体を作製する方法も良く利用される。一方、$PGH_2$ の誘導体である U-46619 は、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(**Fig. 12**)。前章に述べたように、野生型 L-PGDS は、長期使用ができないことが確認されている。野生型 L-PGDS および Cys89,186Ala L-PGDS と U-46619 複合体の結晶化を行ったが、X 線構造解析に適した結晶は得られなかった。そこで、Cys65Ala L-PGDS と U-46619 複合体の結晶化を試みた。Cys65Ala L-PGDS は、野生型と疎水性低分子結合活性、および、立体構造に大きく変化しないことが示されている[7,15,16,31]。さらに、Cys65Ala L-PGDS は、野生型より長期間安定であるため[7]、X 線結晶化の試料として適していた。本研究において、申請者は Cys65Ala L-PGDS と U-46619 との複合体の結晶構造解析を行った。本結果とこれまでの研究成果を踏まえて上記のリガンド進入機構についてのモデルを報告する。

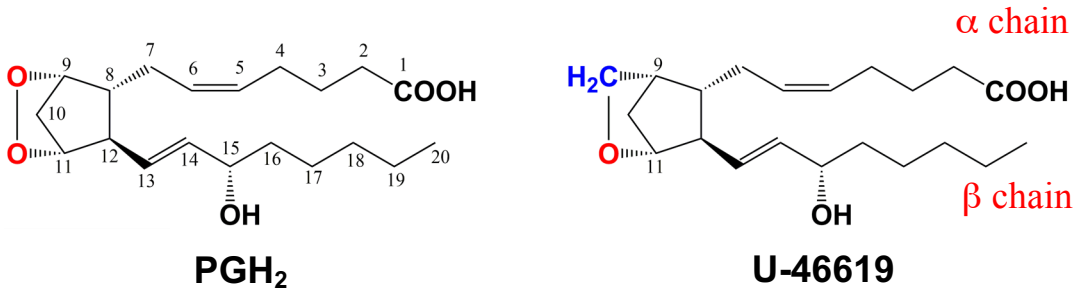



**Figure 12. $PGH_2$ (左)と U-46619(右)の化学構造。**U-46619 は、$PGH_2$ の 9 位の酸素原子(赤色)をメチレン基(青色)に置換したもので、それ以外の部分は、$PGH_2$ と同じである。

# 第二節　結果

## 第一項　L-PGDS と U-46619 複合体の結晶構造決定

申請者は、マウス L-PGDS の活性中心残基 Cys65 を Ala に置換した変異体を用いて、Cys65Ala L-PGDS と U-46619 との複合体の結晶化を行った。L-PGDS の大量発現および精製、Cys65Ala L-PGDS/U-46619 複合体の作成および結晶化の詳細は、実験項に記した。最終的に 0.05 mm×0.05 mm×0.2 mm の棒状の結晶が得られた**(Fig. 13 右上)**。得られた結晶について回折データの測定を行った結果、最高分解能 2.53 Å までの X 線回折データを得ることに成功した。回折像の一例を **Fig. 13** に示す。回折像の指数付けを行い、空間群は単斜晶系 *C*2、ユニットセルの各軸の値は $a$ = 65.423, $b$ = 44.948, $c$ = 104.797 Å と求まった。回折データ収集に関する統計値データは、**Table 4** に示した。

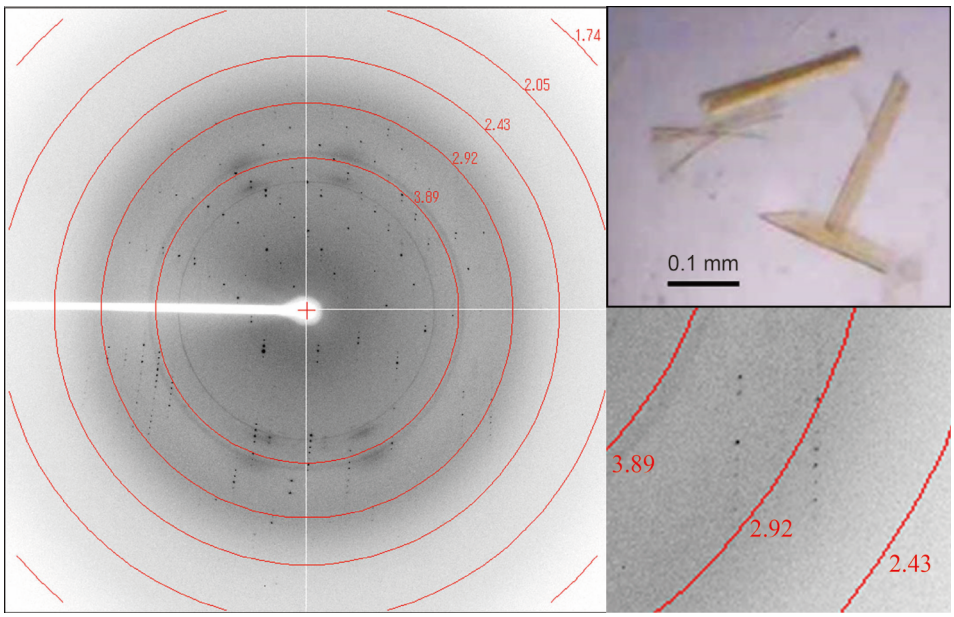



**Figure 13. Cys65Ala L-PGDS/U-46619 複合体の結晶と回折像の一例**

**Table 4**. 回折実験及び構造精密化に関わる統計値（括弧内は最外殻回折データの値を示す）

| | |
|---|---|
| Data Collection | |
| Beamline | SPring-8 BL38B1 |
| Wavelength (Å) | 1.00000 |
| Exposure time (s) | 15.0 |
| Oscillation width (º) | 1.0 |
| Resolution (Å) | 50.00-2.53 (2.57-2.53) |
| Space group | *C*2 |
| Unit-cell parameters (Å, º) | $a$ = 65.423, $b$ = 44.948, $c$ = 104.797, $\alpha = \gamma$ = 90.000, $\beta$ = 90.106 |
| Unique reflections | 10429 |
| $R_{merge}$ [a] | 0.054(0.388) |
| Completeness (%) | 99.7 (100.0) |
| Average I/σ (I) | 34.70 (4.27) |
| Redundancy | 3.7 (3.7) |
| Refinement | |
| Resolution range (Å) | 2.53(2.78-2.53) |
| $R_{factor}/R_{free}$ | 0.231/0.285 |
| Ramachandran plot | |
| Most favored regions (%) | 95.0 |
| Disallowed regions (%) | 0.0 |

[a] $R_{merge} = \sum_{hkl} \sum_i | I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle | / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $\langle I(hkl) \rangle$ is the average intensity of reflection *hkl* and symmetry-related reflections.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

分子置換法を用いて 165 残基中 153 残基のモデル構築に成功した。計算された電子密度マップにおいて、L-PGDS が有する特徴的な cavity の上部(pocket 1)に明瞭なリガンド U-46619 由来の電子密度が確認された**(Fig. 14)**。

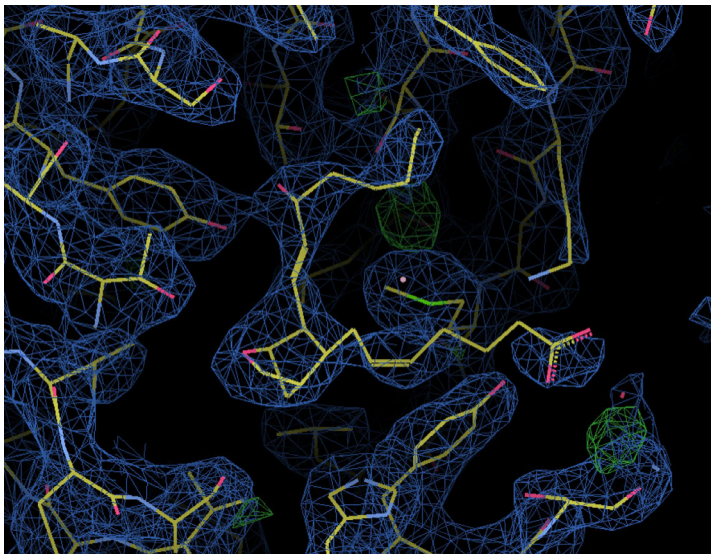


**Figure 14. U-46619 付近の $2F_o$-$F_c$ 電子密度マップ(1.0 σ)**

## 第二項　L-PGDS と U-46619 複合体の全体構造

得られた Cys65Ala L-PGDS と U-46619 複合体の全体構造を **Fig. 15** に示した。L-PGDS は、9 本の β-ストランド(A, 41-50; B, 65-71; C, 77-84; D, 89-98; E, 104-108; F, 115-124; G, 128-138; H, 141-150; I, 177-179)からなる β バレル構造、および 3 本の α ヘリックス(H1, 36-39; H2, 53-61; H3, 158-170)から構成されていた。β-ストランド D の N 末端に存在している Cys89 の側鎖は β バレルの外側に出ており、その付近には、L-PGDS の C 末端に近い Cys186 が位置していた。Cys89 と Cys186 は β バレルの外側でジスルフィド結合を形成していた**(Fig. 15A)**。また、酵素活性中心である Cys65 を置換した Ala65 は、β-ストランド B の N 末端に位置し、β バレルの内側に向いていた。得られた Cys65Ala L-PGDS/U-46619 複合体の結晶構造から、U-46619 はバレル上部の

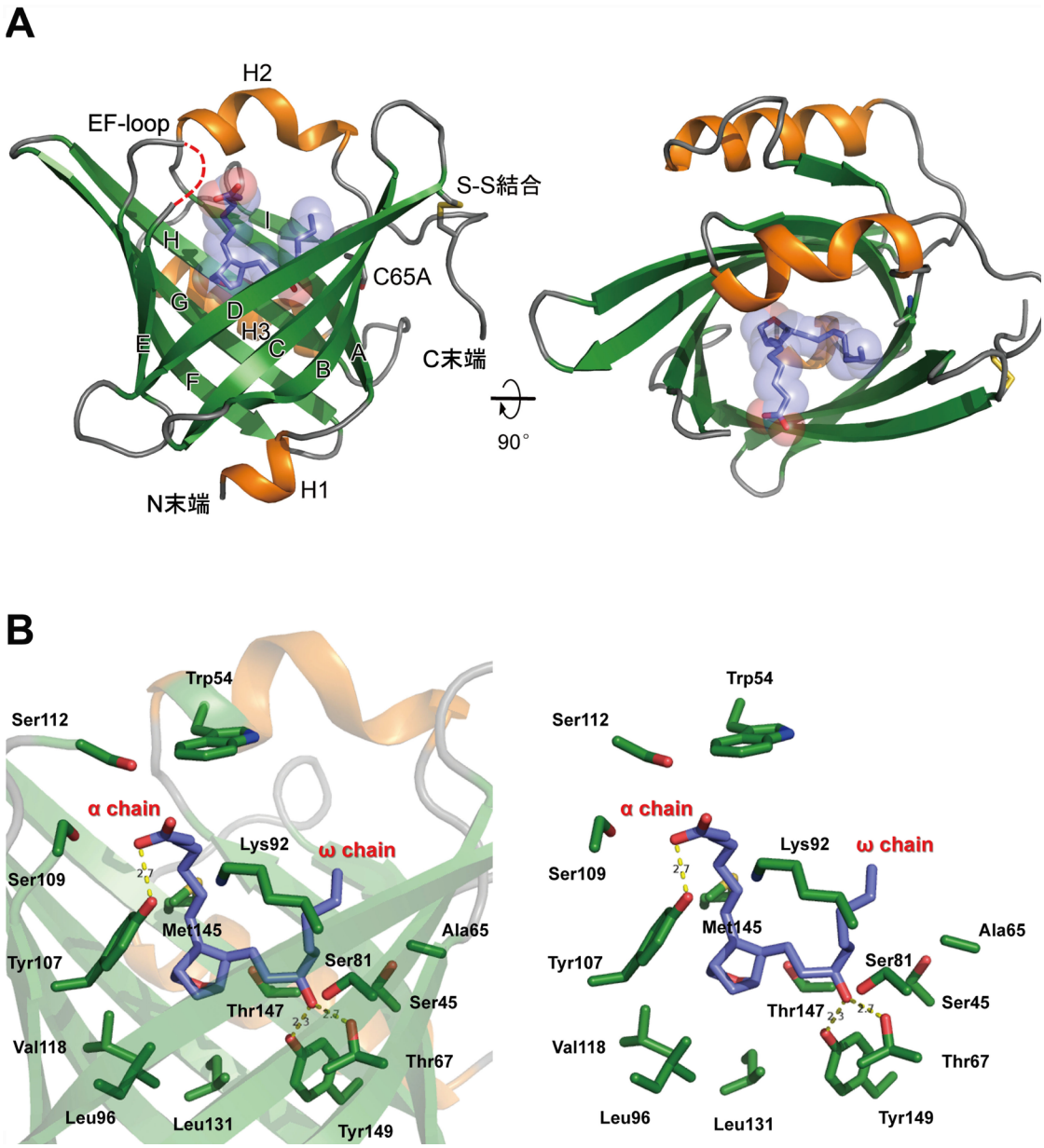



**Figure 15.** (A) Cys65Ala L-PGDS/U-46619 複合体の立体構造(左：side view; 右：top view)。β-ストランドを緑色、α-ヘリックスを橙色、ループ領域を灰色、U-46619を青色のボールとスティックで表示した。U-46619はβバレルの上部に結合していた。Alaで置換した酵素活性中心C65A およびジスルフィド結合(S-S)をスティックで示した。(B) U-46619結合部位の詳細。U-46619を青色で、アミノ酸残基の側鎖を緑色のスティックで示した。

pocket 1 に相当する領域に結合していることが明らかになった(**Fig. 15A**)。まず、U-46619 のカルボキシル基がある α 鎖は、EF-ループおよびバレル上部に存在する極性残基(Lys92, Tyr107, Ser109, Ser112)および芳香族残基(Trp54)に挟まれるように延びていた。そのうち、β-ストランド E 上の Tyr107 は、α 鎖末端のカルボキシル基と 2.7 Å の距離で接近していることから、Tyr107 が U-46619 の α 鎖末端のカルボキシル基と相互作用していることが示唆された。また、U-46619 の ω 鎖の周辺には、ヒドロキシル基を持つ極性残基(Ser45, Thr67, Ser81, Thr147, Tyr149)が集中しており、酵素活性中心である Cys65 を Ala に置換した残基 Ala65 も非常に近い位置にあった。ω 鎖の 15 位の親水性のヒドロキシル基も、2.7 Å と 2.3 Å の水素結合距離内でバレル内部の極性残基 Thr67、Tyr149 とそれぞれ非常に接近していることから、Thr67 および Tyr149 が 15 位のヒドロキシル基と相互作用していることが示唆された。さらに、U-46619 の五員環は、バレル内部に存在する非極性残基(Leu96, Val118, Leu131, Met145)で取り囲まれていた(**Fig. 15B**)。また、N 末端テール領域の 25 番～34 番の 10 残基(Gln25, Gly26, His27, Asp28, Thr29, Val30, Gln31, Pro32, Asn33, Phe34, Gln35)、および EF-ループに存在している Pro110 および His111 に対応する電子密度は低いため、これらの部位の構造決定はできなかった(**Fig. 15A**)。NMR による研究から、L-PGDS の N 末端および EF-ループは運動性が高く揺らいていることが示唆されていたため[15]、今回の結晶構造解析ではきれいな電子密度が観測されなかったと考えられる。

# 第三節　考察

## 第一項　L-PGDS 立体構造の比較

まず、U-46619 の結合によって、L-PGDS 自体のどの部分の構造が変化しているかを調べるため、Cys65Ala L-PGDS/U-46619 複合体型構造と Cys65Ala L-PGDS 遊離型構造(PDB ID: 2RQ0) [32]を比較した。遊離型と複合体型の構造の重ね合わせ図**(Fig. 16A)**より、複合体型と遊離型では β バレル領域の構造は、ほとんど変化していないが、CD-ループ、EF-ループ、H2-ヘリックスおよび H3-ヘリックスの領域で構造が大きく異なっており、遊離型では β バレルの外側に開いた構造(open 型)になっており、一方で、複合体型では cavity への入り口を閉じるような構造(closed 型)に変化していることが明らかになった。このことは、表面構造モデル**(Fig. 16B)**を見てみるとさらに明白であり、L-PGDS は U-46619 の結合によって、EF-ループの構造変化とともに H2-ヘリックス上の Trp54 が cavity の入り口に蓋をするように変化していて、はまり込んだ基質分子が蛋白質外側に出ることができないことがわかった。Trp54 を Ala に置換することで、L-PGDS の酵素活性が、60%までに低下することが報告されている[16]。最近ヒト L-PGDS と脂肪酸の複合体結晶構造が報告されたが、Trp54 と EF-ループ上に存在している Trp112 は(マウスでは Ser112)脂肪酸の結合によって cavity の入り口を閉じて芳香族ブリッジを形成していた[33]。したがって、リポカリン蛋白質中に高度保存されている Trp54 は、疎水性 cavity の入り口にゲートとして働いており、基質だけでなく基質以外のリガンドの結合および放出に関与していると考えられる。

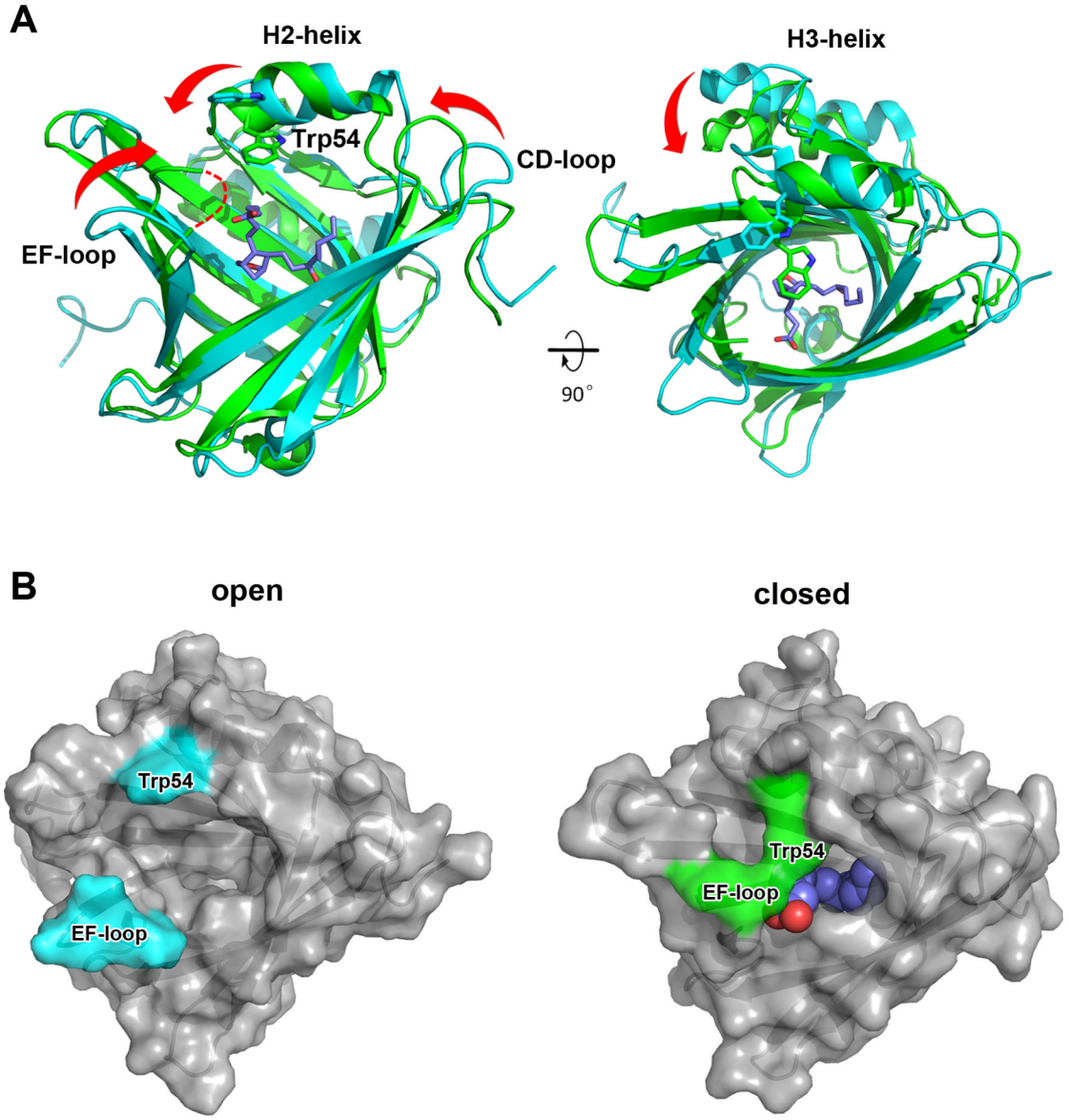



**Figure 16.** (A) L-PGDSの遊離型(水色) (PDB ID: 2RQ0)とU-46619複合体型(緑色)の立体構造の重ね合わせ図。H2-ヘリックス、H3-ヘリックス、CD-ループ、EF-ループの領域で大きな構造変化があった。(B) L-PGDSの遊離型(左)とU-46619 複合体型(右)の表面構造。EF-ループとTrp54領域を水色或は緑色で示した。U-46619は青色で示したように、ほとんど埋まるように結合していた。

さらに、Cys65Ala L-PGDS/U-46619 複合体構造と Cys89,186Ala L-PGDS/U-46619 複合体構造[30]を比較した。これらの構造の重ね合わせ図**(Fig. 17)**より、β バレル領域の構造はほとんど変化していないが、β-ストランド D の領域で構造が異なっており、Cys89,186Ala L-PGDS/U-46619 複合体構造では、β バレルの内側に閉じるような構造になっており、一方で、Cys65Ala L-PGDS/U-46619 複合体構造では β バレルの外側に開いた構造に変化していることが明らかになった。これは、β-ストランド D の N 末側の Cys89 と L-PGDS の C 末端に位置する Cys186 間にジスルフィド結合があるため、β-ストランド D が β バレルの外側に引きされたためと考えられた。また、U-46619 の結合領域は同じ β バレルの上部であったが、異なる様式で結合していた。Cys89,186Ala L-PGDS/U-46619 複合体構造において、U-46619 は、EF-ループではなく CD-ループの近傍に存在していた(site 2)。さらに、Cys89,186Ala L-PGDS/U-46619 複合体構造の U-46619 の五員環は、酵素活性中心である Cys65 に非常に近い場所に位置していた。一方、今回の Cys65Ala L-PGDS/U-46619 複合体構造では、五員環は、Cys65 領域から 9Å 以上離れていた(site 1)。

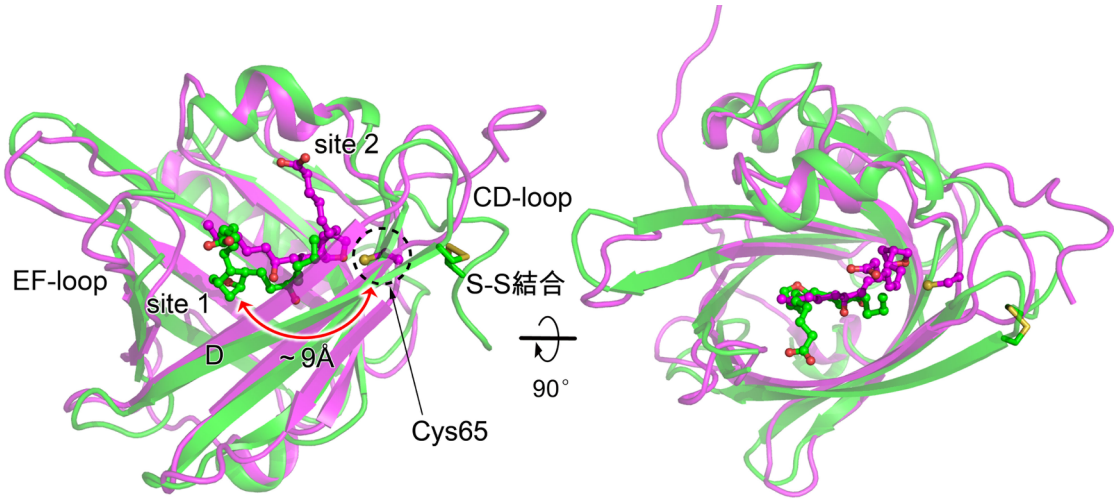



**Figure 17.** Cys65Ala L-PGDS/U-46619複合体型(緑色)とCys89,186Ala L-PGDS/U-46619複合体型(マゼンダ色)の立体構造の重ね合わせ図。βバレル内部のU-46619が対応する構造に同じ色で示した。

## 第二項　L-PGDS の基質進入過程のモデル構築

これまで、数多くの研究によって、Cys65Ala L-PGDS の立体構造はアミノ酸置換によって大きく変化しないことが示唆されている[31]。本研究で、複合体結晶化のリガンドとして用いた U-46619 は、9 位のメチレン基以外は完全に $PGH_2$ と同じ化学構造であり、酵素活性阻害様式も競合阻害である[15]。従って、L-PGDS/U-46619 複合体構造中の U-46619 の結合様式は、$PGH_2$ が L-PGDS に結合している状態と非常に近いと考えられる。研究室ではこれまで核磁気共鳴法(NMR)を用いて、酵素活性を持つ Cys89,186Ala L-PGDS と U-46619 複合体溶液構造(PDB ID: 2KTD)を決定している**(Fig. 17)** [30]。しかしながら、今回得られた Cys65Ala L-PGDS/U-46619 複合体構造中で U-46619 は、既に NMR で決定された Cys89,186Ala L-PGDS/U-46619 複合体の構造と同じく、βバレル内の cavity の上部の pocket 1 に結合していた。しかし、pocket 1 内部での結合位置は異なっていた**(Fig.17)**。今回得られた複合体の立体構造において、基質の酵素反応を受けるエンドペルオキシド基は、Ala に置換した Cys65Ala から 9Å 以上離れていることから、この結合部位は酵素反応に直接関与する部位ではないと考えられる。最近、共同研究先近畿大学理工学部の島本茂先生の研究グループは、等温滴定熱量測定（ITC）を用いて、L-PGDS と基質誘導体(U-46619)との結合比および結合活性を測定した。これらの結果、L-PGDS は U-46619 に対して 2 つの結合サイトを持つことを報告している(投稿準備中)。さらに、最近ヒト L-PGDS と $PGH_2$ の 11 位の酸素原子をメチレン基に置換した基質安定誘導体である U-44069 **(Fig. 18A)**複合体の結晶構造(PDB ID: 4IMO)が報告された[34]。U-44069 は、U-46619 と同様に L-PGDS の酵素活性を競合阻害することが報告されている[16]。また、L-PGDS と U-44069 或いは U-46619 の結合親和性は、ほぼ同じであることもわかっている[16]。したがって、基質誘導体のメチレン基の位置の違うことは、L-PGDS と基質誘導体の結合活性に大きな影響がないことが示している。この複合体構造において、U-44069 が cavity 入り口の H2-ヘリックスおよび GH-ループの近傍に位置していることが明らかになっている**(Fig. 18B)**。これらの結果を考慮して、今回

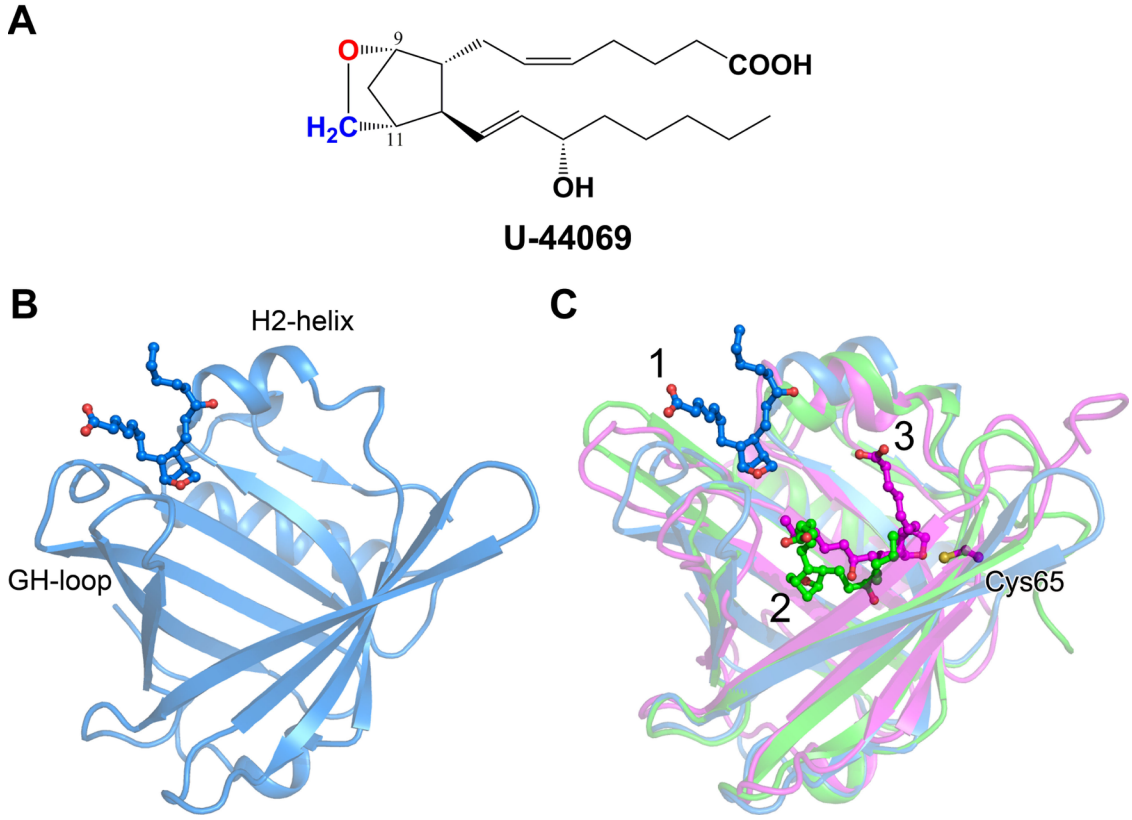



**Figure 18.** (A)基質安定誘導体U-44069の化学構造。(B)Wild-type L-PGDS/U-44069複合体構造。U-44069は青いスティックで示した。(C)1: Wild-type L-PGDS/U-44069複合体構造(青色)、2: Cys65Ala L-PGDS/U-46619複合体構造(緑色)、3: Cys89,186Ala L-PGDS/U-46619複合体構造(マゼンダ色)の重ね合わせ図。βバレル内部のリガンドが対応する構造に同じ色で示した。

の決定した Cys65Ala L-PGDS と U-46619 の複合体結晶構造は、基質結合の途中過程の中間体と仮定し、以下のモデルを構築した。

遊離型の L-PGDS は、cavity 入り口を大きく開いた状態(open 型)になっており、その入り口を形成する部分 H2-ヘリックス、CD-ループ、EF-ループは柔軟な構造を持っている。酵素反応初期において、まず、基質分子はその入り口を通って cavity 内部に進入する**(Fig. 19-1)**。その段階では、基質は一部が認識されているだけで、他の部分は十分に固定されておらず広い cavity 上部で比較的自由に動ける状態であると考えられる。続いて、H2-ヘリックス、CD-ループおよび EF-ループが基質の形状に合わせて、閉じた構造(closed 型)に変化し、

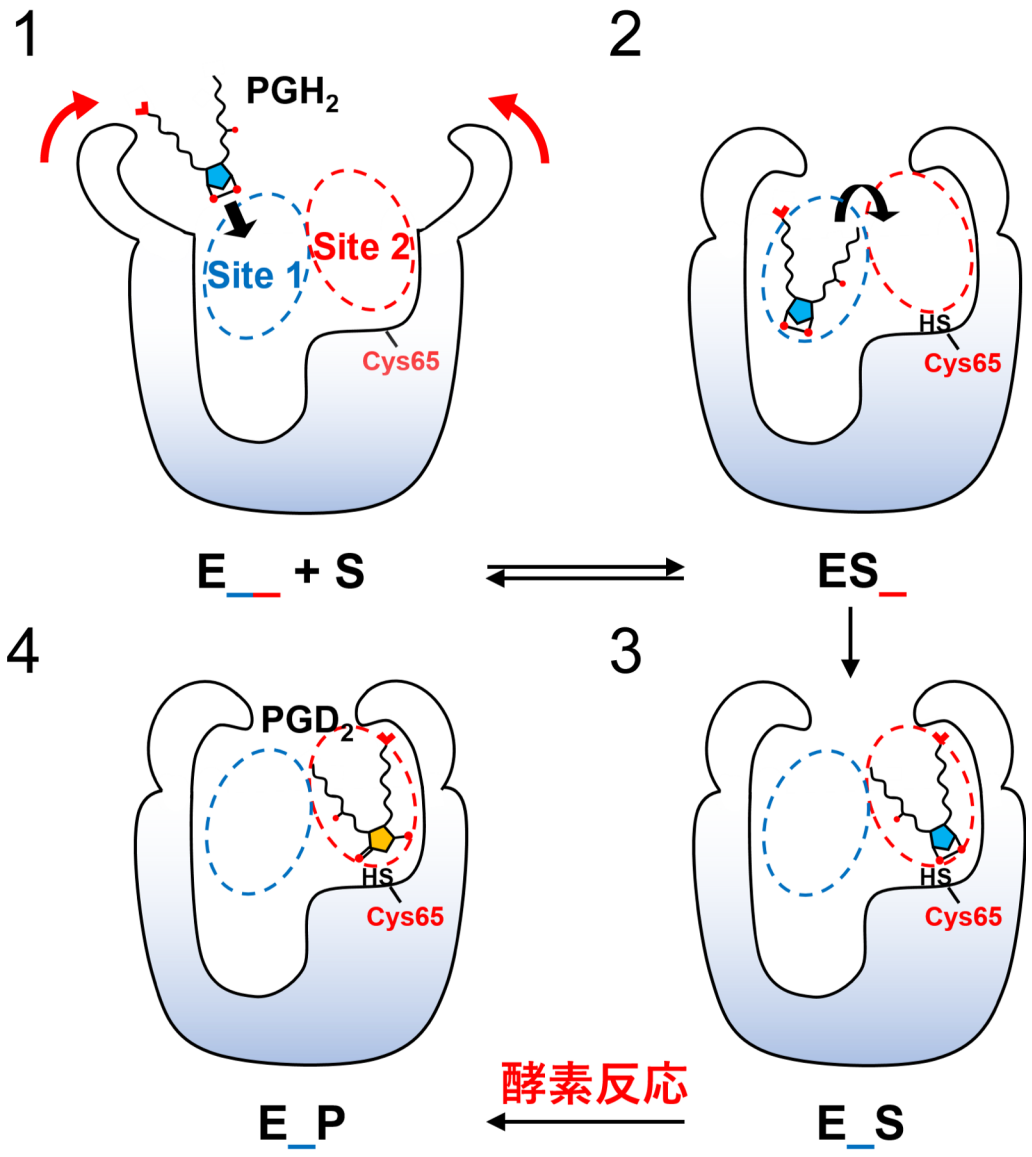



**Figure 19. L-PGDS の基質結合過程のモデル。**基質 $PGH_2$ を青色、生成物 $PGD_2$ を黄色で示した。Site 1 を青い点線で、site 2 を赤い点線で囲んだ。酵素反応式を各段階の下に示した。

L-PGDS が全体的にコンパクトな構造になる。それに伴い、基質の ω 鎖および五員環が β バレル内部において疎水性相互作用で挟まれ、site 1 に結合する(**Fig. 19-2**)。L-PGDS の基質 $PGH_2$ は、比較的柔軟な分子であり、α 鎖と ω 鎖は、五員環部位に対して、比較的自由に動き回ることができる。その後、基質の α 鎖が酵素活性中心 Cys65 に向いて移動し、水素結合および疎水性相互作用によって全体が site 2 に固定される(**Fig. 19-3**)。基質全体が固定されたとき、反応を受けるエンドペルオキシド基と酵素活性中心 Cys65 の相対的位置が決定し、それによって、チオレートアニオンによる求核攻撃が可能になる。酵素反応が終了すると基質 $PGH_2$ のペルオキシド基が開裂し、生成物 $PGD_2$ ができる(**Fig. 19-4)**。

# 結語

第一章において、ITC によるリガンド結合実験の結果から疎水性低分子輸送蛋白質ファミリーに属する L-PGDS が親水性低分子である NADPH などのニコチンアミド補酵素と結合することを明らかにした。この結果、初めて *in vitro* の系で L-PGDS が親水性低分子と結合することを示した。また、NMR によるリガンドタイトレーション実験の結果、および、ドッキングシミュレーションプログラム HADDOCK によるリガンドドッキングモデルの構築により、NADPH は L-PGDS の cavity 上部に結合していることが示された。さらに、NADPH に対する L-PGDS の結合親和性が NADPH と NADPH オキシダーゼの結合親和性と同等であることから、L-PGDS は NADPH に結合することにより、ROS の生成を減少させる可能性が示唆された。

次に、第二章において、L-PGDS と基質誘導体 U-46619 との複合体の結晶構造解析を行うことで、U-46619 の結合領域はβバレルの上部であったが、これまで報告されている部位とは異なる位置に結合していた。L-PGDS は、複数の基質認識部位を持つことが示唆された。そこで、今回決定した複合体構造は、基質結合の途中過程の中間体と仮定し、基質進入過程のモデルを構築した。

L-PGDS は、睡眠誘発物質 $PGD_2$ の産生による自然な睡眠の制御や脳脊髄液中の沈着性の高い疎水性低分子の除去や ROS の過剰産生により誘発される神経細胞死の保護作用による中枢神経系の恒常性の維持など、様々な生命現象に関わっている。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。

# 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導いただきました大阪大学大学院薬学研究科高分子化学分野 大久保忠恭教授、吉田卓也准教授、河原一樹助教に謹んで感謝の意を表します。研究期間を通じて多くの重要な御意見を頂きました近畿大学理工学部 島本茂助教、並びに、大阪大学工学研究科 小林祐次教授、丸野孝浩先生に深く感謝申し上げます。

筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構の裏出良博教授、有竹浩介准教授には、L-PGDS 大量発現系を構築するに当たってプラスミドを提供してくださいました。ここに深く感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり、有益なご指導を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 天然物化学分野 小林資正教授、並びに、大阪大学大学院薬学研究科 分子反応解析学分野 宇野公之教授に厚くお礼申し上げます。

多くの場面で御協力いただきました大阪大学大学院薬学研究科高分子化学分野の皆様に深く感謝を申し上げます。

また、修士課程 1 年間および博士後期課程 3 年間において特別研究奨励金を支給していただきました小林国際奨学財団に深く感謝いたします。

最後に、研究活動に理解を示し、長い学生生活の間ずっと見守ってくれた両親、夫・馬智峰に心より感謝いたします。

# 実験の部

## 材料

実験に使用した NADPH、$NADP^+$、NADH、および $NAD^+$は Nacalai Tesque 社より購入した。トロンビンは Sigma-Aldrich 社より購入した。U-46619 は Cayman Chemical 社より購入した。その他のすべての分析用試薬は Wako Pure Chemical 社および Nacalai Tesque 社より購入した。

## 方法

### *L-PGDS の大量発現および精製*

マウス L-PGDS のシグナルペプチドである 1-24 番残基を除き、さらに蛋白質分子間に間違ったジスルフィド結合の形成を避けるために、ジスルフィド結合を形成している Cys89,186 を Ala に置換した変異体を今回の ITC および NMR 研究に用いた。また、結晶化実験では、天然の Cys89-186 間ジスルフィド結合以外のジスルフィド結合の形成を避けるため 65 位の Cys を Ala で置換した変異体を用いた。これらの L-PGDS 変異体は、野生型の L-PGDS と比べて疎水性低分子結合活性が同程度であることが報告されており[15,16]、さらに野生型より長期間安定であるため実験試料として適していた。

マウス L-PGDS の cDNA は共同研究者である筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構（WPI-IIIS）の裏出良博教授によって単離され、GST(Glutathion S-transferase)-fusion 蛋白発現プラスミドである pGEX-2T(GE healthcare)に組み込まれた。このプラスミドを大腸菌 BL21(DE3) (Nippon Gene)のコンピテントセルに導入した後、大腸菌を LBA 培地にまき、12 時間 37 ℃でプレート培養した。ここで成長したコロニーを 1 mL の LBA 液体培地へ加え、37 ℃の恒温槽で 12 時間培養した。次にこの LBA 液体培地を LBA 液体培地 100 mL に移し 37 ℃で一晩培養した。さらにこれを LBA 液体培地 1 L へ移し 37 ℃で培養して、菌が対数増殖し $O.D._{660}$ が 0.6~0.8 となった時点で(約 3 時間後) IPTG による蛋白質発現誘導を行い、IPTG 添加後は $O.D._{660}$ = 1.5(約 4 時間後)になるまで培養してから集菌した。また、蛋白質を NMR で観測可能な $^{15}N$ 安定同位体

でラベルするために、大腸菌の培養において、$^{15}$N 塩化アンモニウムを窒素源とした M9 最小培地を使用した。

まず PBS 緩衝液 40 mL に菌体を懸濁させた後、この菌体懸濁溶液を超音波破砕し、その懸濁液を遠心分離(10,000 rpm, 30 min, 4 °C)し、上清画分を得た。この上清画分を 2 度フィルター(5.0 μm, 0.45 μm, MILLEX-HV, Millipore)処理し、GST アフィニティーカラム(Glutathion Sepharose 4B, GE healthcare)へ流した。その後 PBS 50 mL、界面活性剤入り PBS 50 mL でカラムを洗浄した。カラムにスロンビンを添加し、室温で 10 時間放置して GST 融合蛋白質から L-PGDS を遊離させた。その後カラムに PBS 40 mL を加え、L-PGDS を溶出させた。次にこの溶液を 1 mL まで濃縮し、フィルター処理(0.22 μm)後ゲルろ過を行った。ゲルろ過カラムは Superdex-75(GE healthcare)を用いた。ゲルろ過後、SDS-PAGE で単一バンドの L-PGDS を確認した。以上より、解析に十分な純度の高い遊離型 L-PGDS を得ることができた。

### *等温滴定熱量測定（ITC）*

MicroCal iTC$_{200}$ システム(GE Healthcare)を用いた熱量測定実験により、L-PGDS と NADPH、NADP$^+$、NADH、および NAD$^+$との相互作用解析を行った。測定に用いた蛋白質溶液の組成は、0.2 mM の L-PGDS を含む脱気した pH 8.0 の Tris-HCl 緩衝液(50 mM)とし、サンプルセルに充填した。NADPH、NADP$^+$、NADH、および NAD$^+$は同一の Tris-HCl 緩衝液にて最終濃度は 5 mM とし、それぞれを滴定シリンジに入れた。一連の測定では、1.3 μL のリガンド溶液を 120 秒毎に 29 回滴下することで結合に伴う発熱量を観察した。すべての測定温度は 25 ℃とした。また、滴定シリンジで高濃度に存在する試料が、サンプルセル内で希釈されることに伴って発生する希釈熱が、試料間の反応熱に加算される可能性がある。そこで、この希釈熱の寄与を補正するため、サンプルセル内に溶媒のみを充填させ、そこに滴定シリンジから、前述の滴定実験時と同一の試料を滴下する測定も行った。

測定終了後、得られたデータをデータ解析ソフト Origin 7.0 (Microcal Software)を用いて 1:1 結合モデルでフィッティングし、解離定数($K_d$)、結合比

($n$)およびエンタルピー変化($\Delta H$)を計算した。また、ギブズ自由エネルギー変化($\Delta G$)およびエントロピー変化($\Delta S$)は熱力学方程式(1)と(2)により計算した。

$$\Delta G = RT \ln K_d \quad (1)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

($R$ は気体定数、$T$ は熱力学温度)

得られた結合実験の熱力学パラメータは 3 回以上の測定の平均値であり、希釈熱を補正後 **Table 1** にそれぞれ示した。

### *NMR 滴定実験*

NMR 測定は Agilent Technologies 社製 INOVA 600 で行い、プローブは $^{1}H/^{13}C/^{15}N$ Z 軸 PFG 三重共鳴型を用いた。測定温度は 27.5 ℃とした。スペクトルの FT 処理は NMRPipe (NIH)を使用した[35]。NMR 測定によって得られたデータは、NMRView によって解析を行った[36]。

測定に用いた試料の溶媒組成は pH 7.0 の Tris-HCl 緩衝液(10 mM) 90%及び重水 10%でタンパク質濃度は 0.5 mM とした。ニコチンアミド補酵素は同一溶媒でリガンドの濃度は 5 mM とした。滴定実験は、L-PGDS 溶液に対し、4 つのリガンドをそれぞれ 1:0, 1:0.25, 1:0.5, 1:0.75, 1:1, 1:2 の濃度比となるように滴下していき、$^{1}H$-$^{15}N$ HSQC スペクトルを測定することで、リガンドの結合によってスペクトルが変化した残基を同定した。これらの残基の化学シフト摂動(CSP)は下記の方程式(3)により計算した。

$$\mathrm{CSP} = \sqrt{(\Delta\delta_{\mathrm{HN}} \times W_{\mathrm{HN}})^2 + (\Delta\delta_{\mathrm{N}} \times W_{\mathrm{N}})^2} \quad (3)$$

$\Delta\delta_{HN}$ と $\Delta\delta_{N}$ はそれぞれ、$^{1}H$ と $^{15}N$ の化学シフト摂動であった。重み係数は $W_{HN} = 1$、$W_{N} = 0.2$ とした。

本研究によって得られた L-PGDS/NADPH 複合体の帰属情報は、付録に **Table S1** として添付した。

### *ドッキングモデルの構築*

NADPH と L-PGDS との結合モデルの作成は、ドッキングシミュレーションプログラム HADDOCK 2.2 (High Ambiguity Driven biomolecular Docking)を実装した HADDOCK Web サーバーを用いた[27,28]。タンパク質のドッキング分子の初期構造は、蛋白質構造データバンク(PDB)に登録されている L-PGDS の溶液構造(PDB ID: 2KTD) [30]から作成した。また、NADPH の PDB ファイルは、オンライン PRODRG サーバーによって作成した[37]。次に NACCESS [38]を用いてアミノ酸残基の溶媒露出度(solvent accessibility)を計算した。L-PGDS の立体構造において、主鎖あるいは側鎖の溶媒露出度が 30% 以上で、化学シフトの変化が大きかった残基(CSP ≥ 0.15 ppm)を、“active”残基とした。また、“active”残基の隣接残基は“passive”残基として自動的に選択された。ドッキングの結合界面設定は“easy interface”を選択した。計算によって得られた 1000 個の剛体モデルのうち 200 個の最もエネルギーが低い構造を精密化した。このうち、最も良い HADDOCK スコアを持っているモデルを NADPH と L-PGDS の結合モデルとして選択し、得られたモデルから PROCHECK [39]により Ramachandran Plot を作成し立体化学的な妥当性を評価した。

### ***L-PGDS/U-46619 複合体の結晶化***

L-PGDS の濃度が 20、10、5 mg/mL になるように 5 mM Tris-HCl (pH8.0)緩衝液に溶解し、結晶化用サンプル溶液とした。各濃度の L-PGDS と $PGH_2$ 安定誘導体 U-46619 をモル比で 1:5 となるように調製した混合液を氷の上で 30 分置いて結晶化を行った。結晶化条件については、*Kumasaka* らが発表した遊離型 Cys65Ala L-PGDS 結晶構造(PDB ID: 2CZU, 2CZT) [16]の条件を参考に、結晶化条件の最適化を行った。最終的に、**Table 5** に示す条件において、L-PGDS/U-46619 複合体の結晶が得られた(**Fig. 13**)。

**Table 5. L-PGDS/U-46619 複合体の結晶化条件**

| | |
|---|---|
| 温度 | 20 ℃ |
| 手法 | ハンギングドロップ蒸気拡散法 |
| サンプル濃度 | 10 mg/mL |
| サンプル緩衝液 | 5 mM Tris-HCl pH8.0 |
| ドロップ容量 | サンプル溶液 1 μL +リザーバー溶液 1μL |
| リザーバー溶液 | 0.1 M Tris-HCl pH8.3 |
| | 2 M マロン酸二ナトリウム |
| | 14% 1,4-ジオキサン |

### *回折実験*

**Table 5** の条件で得られた L-PGDS/U-46619 複合体の結晶を、リザーバー溶液に 15%のグリセロールを追加した不凍液に移し、100K の窒素気流下にて回折測定を行った。大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL38B1 にて波長 1.00000 Å の X 線と Rigaku Jupiter 210cs CCD 検出器を用い、回折データの収集を行った。回折データの処理には、ソフトウェア *HKL*-2000 [40]を用いた。回折データ収集に関する統計値データは、**Table 4** に示した。

### *位相決定と構造精密化*

既に X 線結晶構造が報告されている遊離型 Cys65Ala L-PGDS の立体構造 (PDB ID: 2CZT) [16]を用い、プログラム MOLREP [41]により分子置換法で位相の決定を行った。得られた構造モデルについて、プログラム COOT [42]を用いた目視による $2F_o$-$F_c$ 電子密度マップに対するモデル修正、および PHENIX Program Suit のプログラム phenix refine [43]を用いた精密化と、手動による水分子のモデリングを行った。構造精密化とモデリングを繰り返し、最終的に $R_{factor}$ 値および $R_{free}$ 値が、0.231 および 0.285 である構造モデルを得た。得られた構造精密化に関わる統計値と電子密度は **Table 4** および **Fig. 14** に示す。

# 付録

**Table S1. L-PGDS/NADPH 複合体の化学シフト**

| 残基番号 | HN (ppm) | N (ppm) | 残基番号 | HN (ppm) | N (ppm) |
|---|---|---|---|---|---|
| Gln25 | 8.348 | 124.429 | Asn51 | 7.755 | 120.262 |
| Gly26 | 8.382 | 109.998 | Ser52 | 8.218 | 116.302 |
| His27 | 7.900 | 119.250 | Ser53 | - | - |
| Asp28 | 8.294 | 121.366 | Trp54 | - | - |
| Thr29 | 8.081 | 116.135 | Phe55 | 7.170 | 121.306 |
| Val30 | 7.693 | 119.354 | Arg56 | 7.842 | 117.247 |
| Gln31 | 8.460 | 127.207 | Glu57 | 7.631 | 115.949 |
| Pro32 | # | # | Lys58 | 7.585 | 117.131 |
| Asn33 | 8.698 | 120.418 | Lys59 | 7.477 | 118.454 |
| Phe34 | 7.969 | 118.969 | Ala60 | 7.930 | 117.705 |
| Gln35 | 7.425 | 128.568 | Val61 | 7.957 | 110.126 |
| Gln36 | 8.697 | 125.337 | Leu62 | 6.635 | 120.753 |
| Asp37 | 8.595 | 114.105 | Tyr63 | - | - |
| Lys38 | 6.855 | 116.577 | Met64 | 8.792 | 121.427 |
| Phe39 | 7.461 | 119.403 | Cys65 | 7.868 | 121.450 |
| Leu40 | 6.678 | 111.985 | Lys66 | - | - |
| Gly41 | 8.919 | 108.000 | Thr67 | 9.304 | 125.401 |
| Arg42 | 8.660 | 121.738 | Val68 | 8.957 | 126.583 |
| Trp43 | 9.220 | 130.430 | Val69 | 9.316 | 130.666 |
| Tyr44 | 9.710 | 118.024 | Ala70 | 9.301 | 133.987 |
| Ser45 | 9.058 | 119.291 | Pro71 | # | # |
| Ala46 | 8.810 | 126.418 | Ser72 | 8.043 | 117.833 |
| Gly47 | 7.896 | 108.068 | Thr73 | - | - |
| Leu48 | 9.097 | 125.067 | Glu74 | 8.199 | 118.484 |
| Ala49 | 8.841 | 124.124 | Gly75 | 7.758 | 106.520 |
| Ser50 | 7.198 | 113.853 | Gly76 | 7.784 | 108.679 |

| 残基番号 | HN (ppm) | N (ppm) | 残基番号 | HN (ppm) | N (ppm) |
|---|---|---|---|---|---|
| Leu77 | 8.340 | 120.532 | Tyr105 | 9.283 | 122.998 |
| Asn78 | 9.407 | 120.036 | Thr106 | 9.503 | 112.687 |
| Leu79 | 9.277 | 127.068 | Tyr107 | 8.805 | 120.538 |
| Thr80 | 8.897 | 121.615 | Ser108 | 8.197 | 120.983 |
| Ser81 | 9.472 | 126.310 | Ser109 | 9.065 | 126.891 |
| Thr82 | 8.845 | 120.815 | Pro110 | # | # |
| Phe83 | 8.861 | 124.899 | His111 | - | - |
| Leu84 | 8.545 | 122.366 | Ser112 | - | - |
| Arg85 | 8.584 | 124.062 | Gly113 | 7.941 | 111.276 |
| Lys86 | - | - | Ser114 | 7.866 | 115.910 |
| Asn87 | 8.650 | 113.470 | Ile115 | 8.276 | 123.217 |
| Gln88 | - | - | His116 | 9.257 | 127.782 |
| Ala89 | 8.511 | 126.137 | Ser117 | 9.093 | 117.702 |
| Glu90 | 8.781 | 124.001 | Val118 | - | - |
| Thr91 | 8.411 | 119.676 | Ser119 | 9.075 | 121.232 |
| Lys92 | 9.014 | 126.088 | Val120 | 8.523 | 124.782 |
| Ile93 | - | - | Val121 | 8.363 | 128.837 |
| Met94 | 8.992 | 127.671 | Glu122 | 7.169 | 113.559 |
| Val95 | 8.589 | 125.775 | Ala123 | 8.710 | 124.478 |
| Leu96 | 9.297 | 128.240 | Asn124 | - | - |
| Gln97 | 9.377 | 125.227 | Tyr125 | - | - |
| Pro98 | # | # | Asp126 | - | - |
| Ala99 | 8.137 | 126.919 | Glu127 | 7.969 | 118.825 |
| Gly100 | 8.016 | 108.550 | Tyr128 | 9.334 | 118.462 |
| Ala101 | 8.093 | 126.883 | Ala129 | 9.032 | 120.336 |
| Pro102 | # | # | Leu130 | 8.925 | 123.387 |
| Gly103 | 8.224 | 111.803 | Leu131 | 8.928 | 124.707 |
| His104 | 7.644 | 118.661 | Phe132 | 9.207 | 121.200 |

| 残基番号 | HN (ppm) | N (ppm) |
|---|---|---|
| Ser133 | 9.075 | 125.237 |
| Arg134 | 8.663 | 120.981 |
| Gly135 | 8.169 | 109.662 |
| Thr136 | 8.551 | 113.342 |
| Lys137 | 8.086 | 122.326 |
| Gly138 | 8.504 | 111.714 |
| Pro139 | # | # |
| Gly140 | - | - |
| Gln141 | 7.966 | 119.639 |
| Asp142 | 8.418 | 116.988 |
| Phe143 | 8.208 | 121.813 |
| Arg144 | - | - |
| Met145 | 8.574 | 122.149 |
| Ala146 | 9.795 | 132.415 |
| Thr147 | 9.191 | 118.226 |
| Leu148 | 8.401 | 128.539 |
| Tyr149 | 9.396 | 127.745 |
| Ser150 | 9.788 | 113.538 |
| Arg151 | 8.659 | 126.183 |
| Thr152 | 8.248 | 108.441 |
| Gln153 | 5.944 | 121.302 |
| Thr154 | 7.286 | 109.420 |
| Leu155 | 8.535 | 124.393 |
| Lys156 | 8.202 | 124.250 |
| Asp157 | 8.930 | 124.480 |
| Glu158 | 9.550 | 118.482 |
| Leu159 | 7.277 | 119.670 |
| Lys160 | 7.391 | 119.836 |

| 残基番号 | HN (ppm) | N (ppm) |
|---|---|---|
| Glu161 | 7.863 | 119.865 |
| Lys162 | 7.792 | 120.535 |
| Glu163 | 8.555 | 119.257 |
| Thr164 | 8.801 | 120.213 |
| Thr165 | 8.615 | 118.754 |
| Phe166 | 8.287 | 122.714 |
| Ser167 | 8.067 | 115.850 |
| Lys168 | 8.063 | 121.644 |
| Ala169 | 7.711 | 123.490 |
| Gln170 | 7.063 | 114.011 |
| Gly171 | 7.708 | 79.887 |
| Leu172 | 7.362 | 121.166 |
| Thr173 | 9.090 | 111.986 |
| Gly174 | 9.146 | 118.625 |
| Glu175 | 8.121 | 115.922 |
| Asp176 | 7.846 | 118.982 |
| Ile177 | 6.910 | 117.188 |
| Val178 | 9.233 | 126.182 |
| Phe179 | 8.686 | 124.907 |
| Leu180 | 7.499 | 125.818 |
| Pro181 | # | # |
| Gln182 | - | - |
| Pro183 | - | - |
| Asp184 | 8.168 | 119.787 |
| Lys185 | 7.878 | 120.092 |
| Ala186 | 8.224 | 123.782 |
| Ile187 | 8.089 | 119.627 |
| Gln188 | 8.307 | 125.292 |

| 残基番号 | HN (ppm) | N (ppm) |
| --- | --- | --- |
| Glu189 | 8.080 | 128.455 |

- correspond to non-available data due to weak peaks caused by signal broadening.

# correspond to proline residues.

# 参考文献


[1] O. Hayaishi, Invited Review: Molecular genetic studies on sleep-wake regulation, with special emphasis on the prostaglandin $D_2$ system, *J. Appl. Physiol.* 92 (2002) 863–868.

[2] J. Clausen, Proteins in normal cerebrospinal fluid not found in serum, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107 (1961) 170–172.

[3] Y. Urade, K. Kitahama, H. Ohishi, T. Kaneko, N. Mizuno, O. Hayaishi, Dominant expression of mRNA for prostaglandin D synthase in leptomeninges, choroid plexus, and oligodendrocytes of the adult rat brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 9070–9074.

[4] S. Xu, P. Venge, Lipocalins as biochemical markers of disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1482 (2000) 298–307.

[5] Y. Urade, N. Eguchi, O. Hayaishi, Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase as an Enzymic Lipocalin, *Lipocalins,* pp. 99-109 (2006).

[6] D.R. Flower, A.C. North, C.E. Sansom, The lipocalin protein family: structural and sequence overview, *Biochim. Biophys. Acta* 1482 (2000) 9–24.

[7] Y. Urade, T. Tanaka, N. Eguchi, M. Kikuchi, H. Kimura, H. Toh, et al., Structural and Functional Significance of Cysteine Residues of Glutathione-independent Prostaglandin D Synthase, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 1422–1428.

[8] K. Fujimori, T. Inui, N. Uodome, K. Kadoyama, K. Aritake, Y. Urade, Zebrafish and chicken lipocalin-type prostaglandin D synthase homologues: Conservation of mammalian gene structure and binding ability for lipophilic molecules, and difference in expression profile and enzyme activity, *Gene* 375 (2006) 14–25.

[9] D. Irikura, T. Inui, C.T. Beuckmann, K. Aritake, G. Schreiber, M. Miyano, et al., Characterization of a major secretory protein in the cane toad (Bufo marinus) choroid plexus as an amphibian lipocalin-type prostaglandin D synthase, *J. Biochem.* 141 (2007) 173–180.

[10] H. Toh, H. Kubodera, N. Nakajima, T. Sekiya, N. Eguchi, T. Tanaka, et al., Glutathione-independent prostaglandin D synthase as a lead molecule for designing new functional proteins, *Protein Eng.* 9 (1996) 1067–1082.

[11] F. Zsila, Z. Bikádi, M. Simonyi, Retinoic acid binding properties of the lipocalin member β-lactoglobulin studied by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modeling methods, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 1651–1660.

[12] D.H. Goetz, M.A. Holmes, N. Borregaard, M.E. Bluhm, K.N. Raymond, R.K. Strong, The neutrophil Lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition, *Mol. Cell* 10 (2002) 1033–1043.

[13] S. Schlehuber, A. Skerra, Lipocalins in drug discovery: From natural ligand-binding proteins to 'anticalins', *Drug Discov. Today.* 10 (2005) 23–33.

[14] C.T. Beuckmann, M. Aoyagi, I. Okazaki, T. Hiroike, H. Toh, O. Hayaishi, et al., Binding of biliverdin, bilirubin, and thyroid hormones to lipocalin-type prostaglandin D synthase , *Biochem.* 38 (1999) 8006–8013.

[15] S. Shimamoto, T. Yoshida, T. Inui, K. Gohda, Y. Kobayashi, K. Fujimori, et al., NMR solution structure of lipocalin-type prostaglandin D synthase, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 31373–31379.

[16] T. Kumasaka, K. Aritake, H. Ago, D. Irikura, T. Tsurumura, M. Yamamoto, et al., Structural Basis of the Catalytic Mechanism Operating in Open-Closed Conformers of Lipocalin Type Prostaglandin D Synthase, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 22344–22352.

[17] T. Inui, M. Mase, R. Shirota, M. Nagashima, T. Okada, Y. Urade, Lipocalin-type prostaglandin D synthase scavenges biliverdin in the cerebrospinal fluid of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34 (2014) 1558–1567.

[18] T. Kanekiyo, T. Ban, K. Aritake, Z.-L. Huang, W.-M. Qu, I. Okazaki, et al., Lipocalin-type prostaglandin D synthase/beta-trace is a major amyloid beta-chaperone in human cerebrospinal fluid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007) 6412–6417.

[19] P.K. Rangachari, P.A. Betti, Biological activity of metabolites of $PGD_2$ on canine proximal colon, *Am. J. Physiol.* 264 (1993) G886–G894.

[20] H. Sandig, D. Andrew, A.A. Barnes, I. Sabroe, J. Pease, 9α,11β-$PGF_2$ and its stereoisomer $PGF_{2\alpha}$ are novel agonists of the chemoattractant receptor, CRTH2, *FEBS Lett.* 580 (2005) 373–379.

[21] W. Ying, $NAD^+$/NADH and $NADP^+$/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences, Antioxid. Redox. Signal. 10 (2008) 179–206.

[22] K. Fujimori, A. Fukuhara, T. Inui, M. Allhorn, Prevention of paraquat-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells by lipocalin-type prostaglandin D synthase, *J. Neurochem.* 120 (2011) 279–291.

[23] A. Fukuhara, M. Yamada, K. Fujimori, Y. Miyamoto, T. Kusumoto, H. Nakajima, et al., Lipocalin-type prostaglandin D synthase protects against oxidative stress-induced neuronal cell death, *Biochem. J.* 443 (2012) 75–84.

[24] A. Popa-Wagner, S. Mitran, S. Sivanesan, E. Chang, A.-M. Buga, ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly, Oxid. *Med. Cell. Longev.* 2013 (2013) 1–14.

[25] I.V. Tetko, V.Y. Tanchuk, Application of Associative Neural Networks for Prediction of Lipophilicity in ALOGPS 2.1 Program, *J. Chem. Inf. Model.* 42 (2002) 1136–1145.

[26] D.A. Matthews, R.A. Alden, S.T. Freer, N. Xuong, J. Kraut, Dihydrofolate reductase from Lactobacillus casei. Stereochemistry of NADPH binding, *J. Biol Chem.* 254 (1979) 4144–4151.

[27] S.J. de Vries, M. van Dijk, A.M.J.J. Bonvin, The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 883–897.

[28] G.C.P. van Zundert, J.P.G.L.M. Rodrigues, M. Trellet, C. Schmitz, P.L. Kastritis, E. Karaca, et al., The HADDOCK2.2 web server: User-friendly integrative modeling of biomolecular complexes, *J. Mol. Biol.* (2015) 1–15.

[29] Y. Nisimoto, S. Motalebi, C.-H. Han, J.D. Lambeth, The p67 phox Activation Domain Regulates Electron Flow from NADPH to Flavin in Flavocytochromeb 558, *J. Biol Chem.* 274 (1999) 22999–23005.

[30] S. Shimamoto, H. Maruo, T. Yoshida, T. Ohkubo, 1H, 13C, and 15N resonance assignments of mouse lipocalin-type prostaglandin D synthase/substrate analog complex, *Biomol. NMR Assign.* 8 (2013) 129–132.

[31] J. Liu, C. Guo, Y. Yao, D. Lin, Effects of removing a conserved disulfide bond on the biological characteristics of rat lipocalin-type prostaglandin D synthase, *Biochimie.* 90 (2008) 1637–1646.

[32] Y. Miyamoto, S. Nishimura, K. Inoue, S. Shimamoto, T. Yoshida, A. Fukuhara, et al., Structural analysis of lipocalin-type prostaglandin D synthase complexed with biliverdin by small-angle X-ray scattering and multi-dimensional NMR, *J. Struct. Biol.* 169 (2010) 209–218.

[33] Y. Zhou, N. Shaw, Y. Li, Y. Zhao, R. Zhang, Z.-J. Liu, Structure-function analysis of human l-prostaglandin D synthase bound with fatty acid molecules, *FASEB J.* 24 (2010) 4668–4677.

[34] S.M. Lim, D. Chen, H. Teo, A. Roos, A.E. Jansson, T. Nyman, et al., Structural and dynamic insights into substrate binding and catalysis of human lipocalin prostaglandin D synthase, *J. Lipid Res.* 54 (2013) 1630–1643.

[35] F. Delaglio, S. Grzesiek, G.W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J. Biomol. NMR.* 6 (1995) 277–293.

[36] B.A. Johnson, R.A. Blevins, NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data, *J. Biomol. NMR.* 4 (1994) 603–614.

[37] A.W. Schüttelkopf, D.M.F. van Aalten, IUCr, PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein–ligand complexes, *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60 (2004) 1355–1363.

[38] S. J. Hubbard, M. Janet, Thornton. "Naccess." *Computer Program, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London* 2(1) (1993).

[39] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, IUCr, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291.

[40] Z. Otwinowski, M. Wladek, C. W. J. Charles, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. (1997) 307-326.

[41] A. Vagin, A. Teplyakov, Molecular replacement with MOLREP, *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*66 (2010) 22-25.

[42] P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot, *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 486-501.

[43] P.D. Adams, R.W. Grosse-Kunstleve, L.W. Hung, T.R. Ioerger, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, et al., PHENIX: building new software for automated

crystallographic structure determination, *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*58 (2002) 1948-1954.

# 主論文

1. Thermodynamic and NMR analyses of NADPH binding to lipocalin-type prostaglandin D synthase.
   **Qin Shubin**, Shimamoto Shigeru, Maruno Takahiro, Kobayashi Yuji, Kawahara Kazuki, Yoshida Takuya, & Ohkubo Tadayasu
   *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 468(1-2), 234-239 (2015).

2. Structural analysis of mouse lipocalin-type prostaglandin D synthase and substrate analog complex.
   **Qin Shubin**, Shimamoto Shigeru, Maruno Takahiro, Kobayashi Yuji, Oki Hiroya, Kawahara Kazuki, Yoshida Takuya, & Ohkubo Tadayasu
   *In preparation*