



Title	プロスタグランジンD合成酵素の立体構造決定とリガンド認識様式の解明
Author(s)	島本, 茂
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57959
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

[2]

氏名	島本茂
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第23745号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学位論文名	プロスタグランジンD合成酵素の立体構造決定とリガンド認識様式の解明 (Structural Studies of the Ligand Recognition Mechanism of Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase)
論文審査委員	(主査) 准教授 大久保忠恭 (副査) 教授 宇野公之 教授 小比賀聰 教授 藤岡弘道

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、哺乳動物の脳脊髄液中の約10%を占める主要蛋白質である。L-PGDSは、グルタチオンなどのSH基を持つ還元剤存在下でプロスタグランジンH₂ (PGH₂)からプロスタグランジンD₂ (PGD₂)への異性化反応を触媒し、また、生成物のPGD₂とも結合する。このことからL-PGDSは細胞内でPGD₂を合成し、PGD₂に結合したまま脳脊髄液中に分泌され輸送すると考えられている。L-PGDSによって產生されるPGD₂は、内因性睡眠誘発物質であり、自然な睡眠を誘発する。よって、L-PGDSの酵素としての機能の解明は、従来の睡眠薬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。

また、アミノ酸配列の相同意検索より、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、 β バレルの内部でレチノイドのような細

長い形態の疎水性低分子と結合する。ほとんどのリポカリンファミリー蛋白質はそれぞれ固有のリガンドへの特異性を持ち、解離定数 $K_d = 1 \mu\text{M}$ 程度で結合することが知られている。しかし、L-PGDSは、酵素反応の基質であるPGH₂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、ビリベルビンやアミロイド β ペプチドとも強く結合する($K_d = 20 \sim 150 \text{ nM}$)ことが報告されている。このようにL-PGDSは、リポカリンファミリー蛋白質の中でも際立って広いリガンド選択性を有しており、生体内の様々な場所でPGD₂やレチノイドなどの脂溶性生理活性物質の輸送蛋白質、あるいは、ビリルビンやビリベルビンなどの組織障害性脂溶性物質の補足蛋白質(スカベンジャー)として働くと考えられている。さらに、アミロイド β ペプチドなどの凝集性物質のシャペロンとして働く可能性も示唆されており、新たな創薬ターゲットとして注目されている。

以上のように、L-PGDSは複数の機能を併せ持つ多機能蛋白質であり、その役割は、睡眠調節や脳脊髄液中(中枢神経系)の恒常性の維持など、生命活動に非常に重要な部分を担っている。これらの知見は、L-PGDSについて数多くの生化学的研究が行われてきた結果得られたものである。しかし、どのようにして、L-PGDSがそれらの機能(酵素活性、疎水性低分子認識)を発揮しているのか、また、それぞれの機能は互いの作用を干渉しないのかに関してはほとんど解明されていなかった。これらの疑問を解決することは、L-PGDSの機能に着目した創薬を実現する上で、最も重要で欠かすことができないことがある。本研究では、これらの疑問に対して、構造生物学的な視点から解明を行い、以下の挙げる成果を得た。

まず、大腸菌を用いたL-PGDSの大量発現系・精製系を構築し、NMRを用いて溶液中の遊離型L-PGDSの立体構造決定を行った。今回のNMR研究において、マウスL-PGDSのシグナルペプチドである1-24残基目までを除き、さら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用いた。このL-PGDS変異体(Cys89,186Ala)は、野生型のL-PGDSと比べて酵素活性および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、さらに野生型より長期間安定であるためNMR試料として適していた。同位体標識されたL-PGDSについて、pH 6.5のリン酸緩衝液(50 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 85 % 及び重水15 %)の条件下でNMR測定を行った。NMRによって得られた情報から、遊離型L-PGDSの溶液構造を決定し、L-PGDSが一般的なリポカリンファミリー蛋白質に比べて、大きなcavityを持つことを明らかにした。L-PGDSのこの特徴が、様々な形態・大きさを持つ疎水性リガンドのcavity内部への進入を可能にしていることを示した。さらに、基質PGH₂とレチノイド酸についてNMRによるリガンドタイローション実験、および、ソフトウェアAutoDockによるリガンドドッキングモデルの作成を行い、そのcavity内部にリガンドによって異なる結合部位を持つことが明らかとなった。このことは、L-PGDSが酵素反応と疎水性低分子輸送を異なる部位で行っていることを示唆している。

次に、NMRを用いて、L-PGDSと基質安定誘導体U-46619の複合体溶液構造を決定し、初めてL-PGDSの基質認識の原子レベルでの情報を得ることができた。まず、基質であるPGH₂は、L-PGDSのcavity上部に結合し、反応を受けるペルオキシド基がCys65から求核攻撃を受ける可能性を示した。また、基質の結合に伴い、L-PGDSが構造変化を起こし、それによって、基質を厳密に固定していることを明らかにした。これらの情報を基に、詳細な基質認識モデルおよび酵素反応モデルを提唱した。さらに、U-46619の結合によって起きる構造変化(open-closed)は、他の疎水性リガンド結合のときに観察されていた、「L-PGDSの分子サイズが小さくなる」現象と同様であることをX線小角散乱法によって明らかにした。このことから、L-PGDSは、様々な形態・大きさの疎水性リガンドに自らの構造を適応させるという、他のリポカリンファミリー蛋白質に見られない機能を持つことが示された。L-PGDSの「広いリガンド選択性」と「リガンドとの強い結合」という特徴を説明するリガンド捕捉機構を明らかにした。

本研究により、L-PGDSの原子レベルでの構造や機能の理解を飛躍的に進ませることができた。これらの知見は、今後、生体内におけるL-PGDSの機能の調節の助けとなると共に、L-PGDSを利用した創薬に大きく貢献するだろう。

論文審査の結果の要旨

本研究で申請者はプロスタグランジン(PG)H₂から内因性睡眠誘発物質であるPGD₂への異性化反応を触媒するリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素(L-PGDS)の構造生物学及び分子生物学研究を行い、リガンド認識機構と反応機構を解明した。L-PGDSは睡眠に関与するのみならず、脂溶性生理活性物質の輸送蛋白質、組織障害性脂溶性物質の補足蛋白質およびアミロイド β ペプチドなどの凝集性物質のシャペロンとして働く多機能蛋白質であり、創薬ターゲットとして注目されている。しかし、L-PGDSの立体構造は決定されておらず様々なリガンドとの相互作用機構の解明はほとんど行われていなかった。そこで申請者はNMR法を用いて溶液中のL-PGDSの立体構造を決定し、変異体蛋白質の活性評価によりリガンド結合部位を同定した。その結果、L-PGDSが分子中心に大きなcavityを持つことを初めて明らかにし、様々な形態・大きさを持つ疎水性リガンドがL-PGDSに結合する仕組

きなcavityを持つことを初めて明らかにし、様々な形状・大きさを持つ疎水性リガンドがL-PGDSに結合する仕組みを解明した。さらに、cavity内部にリガンドによって異なる結合部位を持つことが示され、酵素反応と疎水性分子輸送を異なる部位で行っていることを明らかとした。また、PGH₂の安定誘導体U-46619との複合体構造も決定し、X線小角散乱の結果と併せてリガンド結合によるL-PGDSの立体構造変化を初めて明らかにした。複合体中では基質PGH₂のペルオキシド基と求核攻撃を行うCys65が近接していることを見出し、PGH₂からPGD₂への異性化反応の反応機構のモデルを提案することに成功した。

上記成果はL-PGDSの関与する医薬品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（薬学）の学位論文として相応しいものと認める。