

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790055

研究課題名(和文)プロスタグランジンD合成酵素の分子内S-S結合形成による睡眠誘発物質放出機構の解明

研究課題名(英文)Product release mechanism of Lipocalin-type Prostaglandin D synthase

研究代表者

島本 茂 (SHIMAMOTO, Shigeru)

近畿大学・理工学部・助教

研究者番号：00610487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素(L-PGDS)は、睡眠調節薬開発のターゲットとして多くの研究が為されてきたが、生成物(PGD2)の放出過程のメカニズムは明らかになっていない。本研究では、L-PGDSのPGD2認識・放出機構を熱力学および構造生物学的に明らかにした。まず、従来考えられていたL-PGDSと基質/生成物の1:1相互作用モデルとは異なる、1:2結合モデルで相互作用することが明らかにした。また、活性中心のCys65が、生成物PGD2との相互作用にも非常に重要な役割を果たしていることが示された。さらに、得られた構造情報から基質の結合に重要な2つの領域を同定した。

研究成果の概要(英文)：Lipocalin-type Prostaglandin D synthase (L-PGDS) catalyzes the isomerization of prostaglandin H₂ (PGH₂) to produce prostaglandin D₂ (PGD₂), which acts as a potent endogenous somnogen in the brain. A number of studies of L-PGDS, as a drug target for sleep disorders, have been reported in attempts to understand its catalytic mechanism, and several substrate recognition models of L-PGDS have been proposed. However, details of the mechanism by which L-PGDS recognizes its substrates and products are obscure, since essential information, such as its binding affinity and stoichiometry, of the interactions between L-PGDS and its substrates and products remains unclear. Therefore, we carried out ITC and NMR experiments to characterize the binding properties. The results of the ITC and NMR measurements revealed that both the substrate and the product bind to L-PGDS in a stoichiometry of 2 to 1 and two binding sites, namely a high and a low affinity binding site, are present.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素 プロスタグランジンD₂ NMR ITC

1. 研究開始当初の背景

人が健康を維持する上で最も重要な機能の一つである“睡眠”。しかし、近年の快眠グッズや睡眠改善薬などの需要の高まりにも現れているが、日本では約5人に1人が睡眠に問題を抱えている。睡眠障害は、不安やストレスといった精神的要因により起こされるが、最近では、東日本大震災の被災者の4割以上の方が睡眠障害に陥っていると厚生労働省が発表し、大きな問題として取り上げている。国外では、アメリカやオーストラリアなどの調査研究によって、睡眠障害が、健康面だけでなく教育や経済など、社会全体に大きな損失を招くことが報告されている。まさに、睡眠に関する問題は、高度社会における最大の問題の一つであり、睡眠障害の治療および眠気の予防に繋がる睡眠メカニズムの解明は、人々の健康と安全のために欠くことはできない。

哺乳類の脳内で、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。L-PGDSは、クモ膜細胞で活発に産生され、グルタチオンなどのSH基を持つ還元剤存在下でPGH₂から強力な内因性睡眠誘発物質PGD₂への異性化反応を触媒する酵素である。L-PGDSの産生するPGD₂は、現在多用されているベンゾジアゼピン系などの睡眠薬と異なり、自然な睡眠を誘発する。L-PGDS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。さらに、L-PGDSの阻害剤は、覚醒維持薬(眠気覚まし)としての効果が得られると考えられる。

また、L-PGDSは、生成物を輸送する機能を兼ね備えた他に類を見ない“輸送体型酵素”である。従って、その機能を理解するには、酵素反応機構だけでなく、目的地でどのように生成物を渡すのかという生成物放出機構を明らかにする必要がある。L-PGDSとPGD₂の親和性は、PGD₂と受容体の親和性と同等であり、その受け渡しは大きな謎であったが、L-PGDSの生成物PGD₂の放出に関しては全く考慮されてこなかった。申請者は、Cys変異体L-PGDSでは、PGD₂との親和性が低下することを見出し、SS結合形成によるPGD₂放出機構の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、L-PGDSのPGD₂認識機構と放出機構を熱力学および構造生物学的に明らかにしていくことを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、L-PGDSのSS結合形成に伴うPGD₂放出機構の解明を行う。その為に、SS結合を持つ野生型とSS結合を持たないC89A/C186A変異体L-PGDS、また、SS結合を持つが活性中心Cys65がAlaに置換されたC65A変異体L-PGDSそれぞれのPGD₂

親和性と相互作用の構造情報が必要である。しかし、野生型L-PGDSは、精製が困難なことがわかってきた。そこで、まず、(1)野生型L-PGDSの大量発現および精製法を検討した。続いて(2)ITCを用いて野生型、C65A変異体およびC89A/C186A変異体のL-PGDSとPGD₂の相互作用解析を行った。また、(3)NMRを用いて、野生型L-PGDSの構造決定を行った。その後、野生型、C65A変異体およびC89A/C186A変異体へのPGD₂滴下NMR実験を行い、相互作用部位の情報を得た。

4. 研究成果

(1) 野生型L-PGDSの大量発現および精製法の確立

物理化学的実験には、大量かつ高純度の蛋白質試料が必要になる為、まず、野生型(WT)L-PGDSの大量発現および精製法の検討を行った。L-PGDSは分子内に3個のCys残基を有しており、大腸菌発現系では、破壊による蛋白質の抽出の際に間違ったジスルフィド結合の形成が起こり、目的のL-PGDSが沈殿する問題があった。これまでの研究では、それを回避するために、CysをAlaに置換したC65A変異体およびC89A/C186A変異体が主に研究に用いられてきたが、本研究では、活性中心のCys65とジスルフィド結合を形成するCys89/Cys186の役割を詳細に明らかにするために野生型を得る必要があった。そこで、従来の精製法に改良を加え、大腸菌1L培養当たりにして約10倍(20mg protein/1L培養液)の高収量でWT L-PGDSを獲得する方法を確立できた。また、L-PGDSは精製の過程で大腸菌由来の疎水性低分子と強く結合してしまい、遊離型の状態を安定して取れないという問題があったが、陽イオンクロマトグラフィーの工程をさらに追加することで解決できた。また、質量分析(MALDI-TOF MASS)を用いた分析により、L-PGDSに結合してしまう大腸菌由来の低分子は分子量600程度であり、L-PGDSと共有結合している可能性が示唆された。

(2) ITCを用いた野生型、C65A変異体およびC89A/C186A変異体のL-PGDSとPGD₂の相互作用解析

等温滴定型熱測定(ITC)は、iTTC₂₀₀(GE healthcare)を用いて行った。サンプルセル側に300μM L-PGDSを200μL、シリンジ側に5mM リガンド(基質誘導体U-46619、生成物PGD₂)を40μL入れて、シリンジから1μLずつ40回滴下した。

本研究の準備実験の段階で、ジスルフィド結合が存在しない還元型モデルのCys89/Cys186変異体L-PGDSでは生成物PGD₂が2分子結合するが、ジスルフィド結合を有するC65A変異体L-PGDSでは1分子しか結合しない結果が出ていた。一方で、基質誘導体(U-46619)との結合は両者で大

きな違いがないことがわかってきた。そこで、研究開始当初、ジスルフィド結合の有無によって、基質結合には影響はないが、生成物の親和性が変化すると考えていた。即ち、野生型 L-PGDS では酸化型のジスルフィド結合を有する C65A 変異体と同様の結果になると予想していた。しかし、実際には野生型 (WT) の L-PGDS では、図 1 に示すように C89A/C186A 変異体と同様に、基質も生成物もいずれも 2 分子結合する結果が得られた。従来の研究では、表面プラズモン共鳴法 (SPR) によって L-PGDS と基質は 1:1 で結合すると報告されていたが、本研究の ITC によって得られた結果は、それとは異なるものとなった。SPR による実験では、弱い方の結合サイトとの相互作用のみが抽出された可能性がある (Shimamoto S., et al. *J. Biol. Chem.*, 2007)。

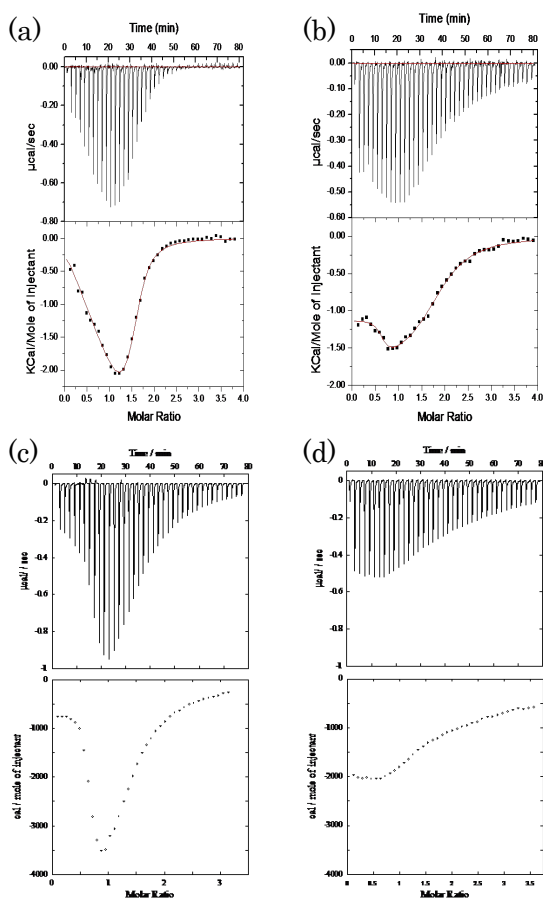


図 1. 野生型 L-PGDS (上) と C89A/C186A 変異体 (下) の基質誘導体 (左) および PGD₂ (右) の ITC 測定の結果

ITC では、滴定によって得られた結合熱をカーブフィッティングすることで、化学量論 (結合比) および解離定数 (K_d) を算出することができる。例えば、化学量論であれば、親和性が異なる結合サイトが 2 個あった場合、WT L-PGDS と U-46619 (図 1-a) のようにモル比が 1:1 と 1:2 のところにフィッティングカーブの変曲点を得られる。つまり、WT

L-PGDS と基質誘導体 (U-46619) は、強い結合サイト ($K_d=0.6 \mu\text{M}$) と弱い結合サイト ($K_d=6.0 \mu\text{M}$) で相互作用することが示された。C89A/C186A 変異体は、U-46619 と強い結合サイトの親和性は WT と同程度 ($K_d=0.6 \mu\text{M}$) で弱い方の結合サイトの親和性が WT と比べて低下していた ($K_d=20 \mu\text{M}$) (また、U-46619 の強い結合サイトと弱い結合サイトがそれぞれ L-PGDS の酵素反応サイトおよび非酵素反応サイトに対応していることを後述の NMR 滴定実験によって明らかにした) また、WT L-PGDS と PGD₂ でも、強い結合サイト ($K_d=0.6 \mu\text{M}$) と弱い結合サイト ($K_d=36 \mu\text{M}$) で相互作用することがわかった (図 1-b)。C89A/C186A 変異体は、PGD₂ と強い結合サイトの親和性は同程度 WT と ($K_d=0.6 \mu\text{M}$) で弱い方の結合サイトの親和性が低下していた ($K_d=60 \mu\text{M}$)。以上の結果から、ジスルフィド結合の有無によって、基質および生成物 PGD₂ との相互作用は、弱い結合サイトの親和性に多少影響する程度であることがわかった。

また、C65A 変異体 (ジスルフィド結合を有している) は、U-46619 との相互作用は WT L-PGDS と同様であった。しかし、PGD₂ との相互作用は、明らかに WT L-PGDS や C89A/C186A 変異体と異なっており、結合サイトは 1 つしかなくなっていることが示された ($K_d=160 \mu\text{M}$, 図 2)。このことから、活性中心の Cys65 が PGD₂ との相互作用に非常に重要な役割を担っていることが示された。(また、PGD₂ の強い結合サイトと弱い結合サイトがそれぞれ L-PGDS の酵素反応サイトおよび非酵素反応サイトに対応していることを後述の NMR 滴定実験によって明らかにした)

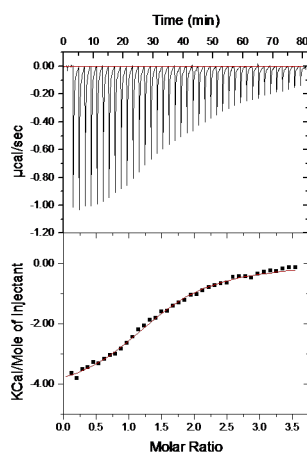


図 2. C65A 変異体 L-PGDS と PGD₂ の ITC 測定の結果

フィッティングカーブの変曲点は、モル比 1:1 のところにあり、PGD₂ との親和性は野生型における弱い結合サイトと同程度。

(3) NMR を用いた生成物 PGD₂ の結合領域の同定

まず、NMR 測定用に ¹³C, ¹⁵N ラベル化された WT L-PGDS を用いて、主鎖連鎖帰属と側鎖の帰属に必要なスペクトルを測定し、解析を行った。主鎖原子 (H_N , H_α , C_α) は 90% 帰属でき、側鎖も概ね (85% 程度) 帰属できた。さらに、¹³C-edited-NOESY, ¹⁵N-edited

NOESY を測定し、NOE 収集を行った。得られた NOE 情報から構造計算中である。

また、主鎖の帰属が完了した段階で基質誘導体 U-46619 および PGD₂ それぞれについて NMR 滴下実験を行い、結合領域を同定した。結果として、U-46619 および PGD₂ いずれも活性中心 Cys65 が位置する領域 (図 3, Site-1) にまず結合し、その後、活性中心と離れた EF-loop、GH-loop の領域 (図 3, Site-2) に結合することが明らかになった。

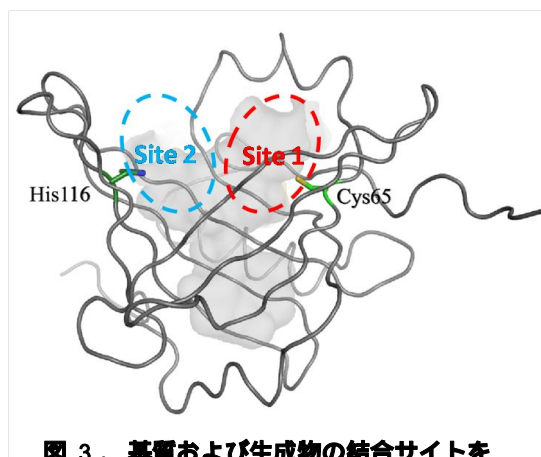


図 3. 基質および生成物の結合サイトを L-PGDS の立体構造上に示した模式図

ITC の結果と合わせると、基質も生成物も活性中心 Cys65 の位置する酵素活性サイトに強く結合すると考えられる。また、PGD₂ では特に Cys65 への Ala 変異の影響が大きいことから、結合の安定性に Cys65 が大きく寄与していると考えられる。

本研究によって、はじめて L-PGDS に対して生成物が結合することが示され、また、その親和性を明らかにした。また、基質も生成物も L-PGDS に対して 2 分子結合し、それぞれの結合サイトで親和性が異なることが明らかになった。活性中心 Cys65 が位置する結合サイトの親和性は基質および生成物それぞれに対して同程度であり、酵素反応はこの部位で起こると考えられる。一方で、非酵素反応部位での結合は、生成物の放出に参与している可能性がある。現在、基質誘導体や生成物を過剰量入れた状態での構造解析を行っており、非酵素反応部位の結合サイトの役割の解明を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

- 1) Chemical methods and approaches to the regioselective formation of multiple disulfide bonds. Shimamoto S., Katayama H., Okumura M., and Hidaka Y., *Curr. Protoc. Protein Sci.*, 76:28.8.1-28.8.28, 2014. 査読有
- 2) Chemical Assistance of Disulfide

Coupled Peptide and Protein Folding. Okumura M., Shimamoto S., and Hidaka Y., *Curr. Protoc. Protein Sci.*, 76:28.7.1-28.7.13, 2014. 査読有

- 3) ¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonance assignments of mouse lipocalin-type prostaglandin D synthase/substrate analog complex. Shimamoto S., Maruo H., Yoshida T., and Ohkubo T., *Biomol. NMR Assign.*, 8(1):129-132, 2014. 査読有
- 4) Folding of Peptides and Proteins: Role of Disulfide Bonds, Recent Developments. Hidaka Y., and Shimamoto S., *Biomol. Concepts*, 4(6):597-604, 2013. 査読有
- 5) Effects of positively charged redox molecules on disulfide-coupled protein folding. Okumura M., Shimamoto S., Nakanishi T., Yoshida Y., Konogami T., Maeda S., and Hidaka Y., *FEBS Lett.*, 586(21):3926-3930, 2012. 査読有
- 6) A chemical method for investigating disulfide-coupled peptide and protein folding. Okumura M., Shimamoto S., and Hidaka Y., *FEBS J.*, 279(13):2283-2295, 2012. 査読有
- 7) Drug delivery system for poorly water-soluble compounds using lipocalin-type prostaglandin D synthase. Fukuhara A., Nakajima H., Miyamoto Y., Inoue K., Kume S., Lee Y.H., Noda M., Uchiyama S., Shimamoto S., Nishimura S., Ohkubo T., Goto Y., Takeuchi T., and Inui T., *J. Control. Release*, 159(1):143-150, 2012. 査読有

その他：紀要(査読有)6件

[学会発表](計4件)

- 1) STRUCTURAL AND DYNAMIC ANALYSIS OF LIPOCALIN TYPE PROSTAGLANDIN D SYNTHASE IN ITS APO FORM AND SUBSTRATE ANALOG COMPLEX FORM. Shimamoto S., Ohkubo T., Aritake K., Urade Y., and Hidaka Y. *Biophysical Society 58th Annual Meeting* (2014), 262-Pos. (2014.2.15-19, San Francisco, California)
- 2) ANALYSES OF THE INTERACTION BETWEEN LIPOCALIN-TYPE PROSTAGLANDIN D SYNTHASE AND SUBSTRATE OR PRODUCT. Fukuda Y., Maruno T., Kobayashi Y., Ohkubo T., Aritake K., Urade Y., Hidaka Y., and Shimamoto S. *Society 58th Annual Meeting* (2014), 3422-Pos. (2014.2.15-19, San Francisco,

- California)
- 3) Analyses of the Interaction between Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase and Substrate or Product. Fukuda Y., Maruno T., Kobayashi Y., Ohkubo T., Aritake K., Urade Y., Hidaka Y., and Shimamoto S. *4th Asia-Pacific International Peptide Symposium* (2013), P-054. (2013.11.6-8, 大阪)
 - 4) リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素と基質・生成物の相互作用解析, 福田 裕太郎、島本 茂、丸野 孝浩、小林 祐次、大久保 忠恭、有竹 浩介、裏出 良博、日高 雄二, *第13回 日本蛋白質科学会* (2013), 1P-079. (2013.6.12-14, 鳥取)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

島本 茂 (SHIMAMOTO Shigeru)

近畿大学・理工学部・助教

研究者番号 : 00610487