

令和元年6月6日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18868

研究課題名(和文) 睡眠誘発物質合成酵素L-PGDSの基質認識と生成物放出のメカニズムの解明

研究課題名(英文) substrate-induced product-release mechanism of L-PGDS

研究代表者

島本 茂 (SHIMAMOTO, SHIGERU)

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：00610487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000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)は睡眠物質(PGD2)を合成する酵素であり、睡眠中枢を活性化することで哺乳類の睡眠導入や概日サイクル(体内時計)調節に関与している。従って、L-PGDSをターゲットとした創薬は新規作用機序を持つ睡眠調節薬の開発につながる。本研究では、L-PGDSの分子内部にある2つの基質結合部位の同定とさらにそれぞれの結合部位がどのようにプロスタグランジンの認識に関与するかを明らかにした。また、熱力学的パラメータの取得より、それぞれの結合部位の相互作用の特徴付けを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

L-PGDSの酵素反応モデルで、基質・生成物が2分子結合することは全く考慮されてこなかった。本研究では、1)従来のモデルにない新しい概念(2つの結合サイト・生成物放出)を加えた新規酵素反応モデルが構築し、これまで着目されていなかった親和性の低い結合サイトでの基質認識が生成物の産生速度に影響を与えることを示した。2)L-PGDSの活性中心のみをターゲットにした阻害剤の効果が弱い原因を解明し、さらに、新規結合部位における基質や生成物側の認識に重要な部位の同定とタンパク質側の認識に関与するアミノ酸を同定した。これらの情報は、新たに生成物放出メカニズムをターゲットとした新規薬剤の開発につながるだろう。

研究成果の概要(英文)：Lipocalin-type prostaglandin (PG) D synthase (L-PGDS) belongs to the lipocalin superfamily which consists of transporter proteins for lipophilic ligands in the extracellular space, and is known as the PGD<sub>2</sub>-synthesizing enzyme responsible for the sleep regulation. The binding affinity and stoichiometry to each ligand were analyzed by isothermal titration calorimetry (ITC), and the binding region for each ligand on L-PGDS was estimated by NMR titration experiment. The ITC results showed that PGD<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> bound to L-PGDS with a stoichiometry of 2 to 1 but PGE<sub>2</sub> with a stoichiometry of 1 to 1. In addition, the NMR experiments indicated that PGD<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> bound to both the catalytic site containing the Cys65 and non-catalytic site of L-PGDS, while PGE<sub>2</sub> bound to only the non-catalytic site.

研究分野：熱力学、構造生物学

キーワード：プロスタグランジンD<sub>2</sub> 等温滴定型熱測定 酵素活性測定 構造解析 PGDS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) は睡眠物質 (PGD<sub>2</sub>) を合成する酵素であり、睡眠中枢を活性化することで哺乳類の睡眠導入や概日サイクル (体内時計) 調節に関与している。現存する睡眠薬の殆どは GABA 受容体をターゲットとするもの (睡眠中枢抑制系の抑制) だが、L-PGDS はそれとは異なる睡眠調節系に位置している。従って、L-PGDS をターゲットとした創薬は新規作用機序を持つ睡眠調節薬の開発につながる。さらに、従来の睡眠薬のような睡眠導入効果だけでなく、近年問題になっている体内時計混乱の治療につながる可能性もあり、L-PGDS の睡眠調節系の解明は根本的な睡眠障害治療の鍵を握っている。

しかし、L-PGDS の性質上、非常に単離・精製が難しいため、分子レベル・原子レベルでの機能解明は遅れている。特に L-PGDS と基質や生成物との複合体の立体構造情報は詳細には決定されておらず、その結合・遊離のメカニズムに関して不明な部分が多い。一方、酵素阻害剤の開発も試みられており、申請者らは L-PGDS 選択的阻害剤 AT-56 を見出し、*in vivo* 実験から概日サイクル調節の可能性を示した。AT-56 を皮切りにいくつか L-PGDS 阻害剤が報告されている。しかし、AT-56 を含めそれらの阻害活性は非常に弱いという問題がある。

#### 2. 研究の目的

L-PGDS は、PGD<sub>2</sub> の“合成”および“輸送”という、睡眠誘発物質の包括的な管理を担う他に類を見ない輸送体型酵素である。L-PGDS の酵素反応モデルで、基質・生成物が 2 分子結合することは全く考慮されてこなかった。本研究は、以下の 3 つの点で学術的に重要である。

- 1) 従来のモデルにない新しい概念 (2 つの結合サイト・生成物放出) を加えた新規酵素反応モデルが構築でき、L-PGDS による睡眠調節メカニズムの解明につながる。
- 2) L-PGDS の活性中心のみをターゲットにした阻害剤の効果が弱い原因を解明し、新たに生成物放出メカニズムをターゲットとした新規薬剤の開発につながる。

#### 3. 研究の方法

- 1) L-PGDS の基質・生成物の結合サイトのマッピング | L-PGDS に基質、生成物およびその他のプロスタグランジンを滴下し、NMR シグナルの変化を観察することで結合サイトを同定した。均一に同位体ラベル (<sup>13</sup>C または <sup>15</sup>N) した L-PGDS に基質または生成物を滴下すると、その結合に伴い結合サイトの原子の磁気的環境の変化がシグナルの変化として観察できる。この原理を利用して、site-2 の領域を L-PGDS の立体構造上にマッピングし、site-2 に位置するアミノ酸を明らかにした。
- 2) 基質・生成物との相互作用および酵素反応に関与するアミノ酸残基の特定 | site-2 に位置するアミノ酸を Ala 等に置換した L-PGDS 変異体を遺伝子操作によって作製する。site-1 に位置するアミノ酸の変異体に関しては既にあるものを用い、必要に応じて随時追加で変異体作製した。作製した変異体 L-PGDS を用いて、ITC 測定によって L-PGDS 変異体と基質・生成物の相互作用解析を行い、野生型と比較することで、結合に直接関与するアミノ酸を特定した。
- 3) L-PGDS と基質 PGH<sub>2</sub> と生成物 PGD<sub>2</sub> の複合体構造解析 | i) NMR により L-PGDS と生成物の 1:1 存在下で生成物 1 分子結合型の構造解析を行った。ii) X 線結晶構造解析により L-PGDS に対して基質・生成物過剰存在下で 2 分子結合型の構造解析を行った。

#### 4. 研究成果

- 1) L-PGDS の基質・生成物の結合サイトのマッピング  
15N ラベル化された L-PGDS に基質、生成物およびその他のプロスタグランジンを滴下し、NMR シグナルの変化を観察することで、L-PGDS 内のプロスタグランジン結合部位を同定した。活性中心 Cys65 が存在する結合部位 site-1 に加えて、AB-loop, EF-loop, GH-loop の先端側にある領域が第二の結合部位 site-2 であることを明らかにした。また、site-1 のみ、または site-2 のみに結合していることが示唆されるプロスタグランジン (site-2 のみ結合するのは PGE<sub>2</sub> の可能性が高い) を見出した。さらに、site-2 におけるプロスタグランジン認識に関わるアミノ酸として Ser52, His111, Trp112, Phe143 など (他 6 残基) をピックアップし、Ala 変異体の作製を行った。

2-1) 基質・生成物との相互作用および酵素反応に関与するアミノ酸残基の特定 | site-2 に位置するアミノ酸を Ala 等に置換した 10 種類の L-PGDS 変異体を遺伝子操作によって作製した。site-1 に位置するアミノ酸の変異体に関しては既にあるものを用いた。作製した変異体 L-PGDS を用いて、ITC 測定によって L-PGDS 変異体と基質・生成物の相互作用解析を行い、野生型と比較することで、結合に直接関与するアミノ酸を特定した。活性中心を含む site-1 に関しては、Cys65 以外で Ala 置換によって劇的に結合が消失するものが存在しなかった。ここで、ITC から得られる熱力学的データ解析から、site-1 はどのプロスタグランジンに対してもエントロピー

駆動の結合をする傾向にあり、即ち、疎水性相互作用が主な結合の駆動力になっていることを示している。従って、疎水性アミノ酸の一つである Ala に置換しても、相互作用に大きな影響を与えなかった事実と矛盾しない。第二の結合部位である site-2 に関しては、Ser52, His111, Trp112, Phe143 の変異体において、site-2 の結合の消失または親和性の低下を示した。ただし、Phe143 においては site-1 の結合にも変化を与えたことから、site-1 から site-2 にまたがって存在するアミノ酸であると考えられる。

2-2) site-1 および site-2 の結合に重要なプロスタグランジンの官能基の同定 | 当初予定していた基質と生成物以外のプロスタグランジンとの相互作用解析の結果から、プロスタグランジンの特定の部位を認識していることがわかった。まず、生成物である PGD2 と同様に site-1 と site-2 どちらでも認識されるものが PGF2 であり、site-2 でしか認識されないものが PGE2 であった。PGE2 に関しては、NMR から得られた結果と一致した。これらのプロスタグランジンの構造を比較すると、site-1 ではプロスタグランジンの五員環の官能基が認識に重要であり、また、site-2 では五員環の官能基は親和性に寄与するものの、致命的ではないことがわかり、現在、さらなるプロスタノイドとの相互作用解析で site-2 での結合に重要なプロスタグランジン側の部位を調査中である。

3-1) L-PGDS と基質 PGH2 との複合体構造解析 | 基質誘導体と L-PGDS の複合体の構造解析を NMR および X 線結晶構造解析で進めてきた。マウス L-PGDS およびヒト L-PGDS と基質誘導体の NMR 構造解析では、既に主鎖の帰属と側鎖の帰属が完了しており、構造計算に至っている。しかし、NOESY でのリガンドとタンパク質間の距離情報が十分得られておらず(10~30 程度)、更なる測定と解析が必要である。また、X 線結晶構造解析では、基質誘導体複合体の結晶構造は得られたが、結晶が針状で小さく、よい回折を得られていない為、現在更なるスクリーニングを進めている。

3-2) L-PGDS と基質 PGH2 との複合体構造解析 | 生成物と L-PGDS の複合体の構造解析を NMR および X 線結晶構造解析で進めてきた。マウス L-PGDS およびヒト L-PGDS と生成物の NMR 構造解析では、生成物が継時的に分解してしまい、複合体の状態が変化してしまう問題が出ている。条件検討の結果、主鎖の帰属までは完了しているが、測定時間が掛かる NOESY では PGD2 の分解が無視できない為、今後は PGD2 誘導体での検討も視野に入れている。一方で、X 線結晶構造解析では、状態の良い結晶が得られ、現在解析を進めている。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 14 件 )

- 1) Crystal structure of the dog allergen Can f 6 and structure-based implications of its cross-reactivity with the cat allergen Fel d 4. Yamamoto K, Ishibashi O, Sugiura K, Ubatani M, Sakaguchi M, Nakatsuji M, Shimamoto S, Noda M, Uchiyama S, Fukutomi Y, Nishimura S, Inui T., *Sci. Rep.*, 9(1), 1503 (2019) 査読有
- 2) Structural Analyses of an N-terminal Extracellular Domain of the Amyloid Precursor Protein. Mizuho Imamura, Shingo Kanemura, Masaki Okumura, Hiroshi Yamaguchi, Shigeru Shimamoto, and Yuji Hidaka, *Peptide Science* 2018, 23 (2019) 査読有
- 3) Structural Control and Functional Analysis of the Precursor Protein of the Atrial Natriuretic Peptide. Hayato Ueda, Shigeru Shimamoto, and Yuji Hidaka, *Peptide Science* 2018, 94 (2019) 査読有
- 4) Cloning and Functional Analysis of Digestive Enzyme Derived from *Nephila Clavata*. Tsubasa Tagawa, Teruki Hagiwara, Shigeru Shimamoto, and Yuji Hidaka, *Peptide Science* 2018, 101 (2019) 査読有
- 5) N-terminal HCV core protein fragment decreases 20S proteasome activity in the presence of PA28γ. Zheng Y, Shimamoto S, Maruno T, Kobayashi Y, Matsuura Y, Kawahara K, Yoshida T, Ohkubo T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 509(2), 590-595 (2019) 査読有
- 6) Structural Analyses of the Linker Region of the Amyloid precursor protein. Mizuho Imamura, Shingo Kanemura, Masaki Okumura, Shigeru Shimamoto, and Yuji Hidaka, *Peptide Science* 2017, 206-207 (2018) 査読有
- 7) Regulation of Disulfide-Coupled Folding of a *De Novo* Designed Protein. Saya Nishihara, Kosuke Toyama, Kenta Mori, Shigeru Shimamoto, and Yuji Hidaka, *Peptide Science* 2017, 208-209 (2018) 査読有
- 8) Molecular Evolution of L-PGDS: Substrate Recognition Mechanism of Medaka L-PGDS. Kimi Torii, Takahiro Maruno, Yuji Kobayashi, Yuji Hidaka, and Shigeru Shimamoto, *Peptide Science*

2017, 210-211 (2018) 査読有

- 9) Disulfide-Coupled Folding of Pro-Uroguanylin on Molecular Evolution. Kenta Mori, Kosuke Toyama, Saya Nishihara, Shigeru Shimamoto, and Yuji Hidaka, *Peptide Science* 2017, 214-215 (2018) 査読有
- 10) ITC Analysis of Ligand Binding to Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase Shimamoto S., and Maruno T., *Netsu Sokutei*, 44(3), 108-116 (2017) 査読有
- 11) Disulfide-Coupled Folding of pro-Uroguanylin on Molecular Evolution. Kenta Mori, Kosuke Toyama, Shigeru Shimamoto, and Yuji Hidaka, *Peptide Science* 2016, 103-104 (2017) 査読有
- 12) Activation Mechanism of Cocoonase. Nagisa Tajima, Shigeru Shimamoto, Mitsuhiro Miyazawa, and Yuji Hidaka, *Peptide Science* 2016, 105-106 (2017) 査読有
- 13) Preparation of an Orexin Precursor Protein Using an E. coli Expression System by Acid Treatment. Natsumi Mitsuoka, Shigeru Shimamoto, and Yuji Hidaka, *Peptide Science* 2016, 221-222 (2017) 査読有
- 14) Regulation of the Disulfide-Coupled Folding of de novo Designed Peptides by  $\alpha$ -Helix Formation. Saya Nishihara, Kosuke Toyama, Shigeru Shimamoto, Yuji Hidaka, *Peptide Science* 2016, 223-224 (2017) 査読有

〔学会発表〕(計 19 件)

- 1) Molecular recognition mechanism of Hematopoietic Prostaglandin D Synthase with GSH and Prostaglandin H<sub>2</sub>. Shigeru Shimamoto, Keisuke Asada, and Yuji Hidaka, *Biophysical Society 62nd Annual Meeting*, 2884-Pos, February 17-21, 2018. (サンフランシスコ, アメリカ)
- 2) Molecular Evolution of L-PGDS: Substrate Recognition Mechanism of Medaka L-PGDS. Kimi Torii, Takahiro Maruno, Yuji Kobayashi, Yuji Hidaka, and Shigeru Shimamoto, *Biophysical Society 62nd Annual Meeting*, 268-Pos, February 17-21, 2018. (サンフランシスコ, アメリカ)
- 3) Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase Possesses Two Binding Sites for its product. Shigeru Shimamoto, Yusuke Nakagawa, Yuta Nakahata, Takahiro Maruno, Yuji Kobayashi, Kosuke Aritake, Yoshihiro Urade, and Yuji Hidaka, *Biophysical Society 61st Annual Meeting*, 2433-Pos, February 11-15, 2017. (ニューオーリンズ, アメリカ)
- 4) Molecular recognition mechanism of Hematopoietic Prostaglandin D Synthase with cofactor and its substrate. Keisuke Asada, Shigeru Shimamoto, Tomohiro Oonoki, Takahiro Maruno, Yuji Kobayashi, Kosuke Aritake, Yoshihiro Urade, and Yuji Hidaka, *Biophysical Society 61st Annual Meeting*, 2434-Pos, February 11-15, 2017. (ニューオーリンズ, アメリカ)

その他、国際学会(ポスター6件)、国内学会(口頭1件、ポスター6件)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。