

平成23年 4月 6日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20370042
 研究課題名(和文)
 膜貫通型蛋白質マイクロゾーマルプロスタグランジンE₂合成酵素1のX線結晶構造解析
 研究課題名(英文) X-ray crystallographic analysis of microsomal prostaglandin E₂ synthase 1
 研究代表者
 吾郷 日出夫 (AGO HIDEO)
 独立行政法人理化学研究所・宮野構造生物物理研究室・専任研究員
 研究者番号： 70360477

研究成果の概要(和文)：ヒト由来膜タンパク質であるマイクロゾーマルプロスタグランジンE₂合成酵素1(mPGES1)を、X線結晶構造解析に供しうる質と量を満足するレベルで、分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*を使い組換え体として、生産精製することが可能になった。組換えヒト由来mPGES1は、二種類の結晶化条件で結晶を与えた。

研究成果の概要(英文)： Human membrane protein microsomal prostaglandin E₂ synthase 1 (mPGES1) was overexpressed using *Schizosaccharomyces pombe*. The purification method was established. The recombinant mPGES1 was free from the post-translational modification except for the deletion of the N-terminal methionine residue, and had a higher specific activity. The recombinant mPGES1 was crystallized in the two crystallization conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	11,000,000	3,300,000	14,300,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：アラキドン酸カスケード、膜タンパク質、X線結晶構造解析、プロスタグランジンE₂

1. 研究開始当初の背景

マイクロゾーマルプロスタグランジンE₂合成酵素1(mPGES1)は、プロスタグランジン(PG)H₂の異性をグルタチオン依存的に触

媒し、炎症、発熱、痛みの原因である内因性の生理活性脂質PGE₂を生合成する分子機能を持つ膜タンパク質である。関節リュウマチや変形性関節症を含む様々な炎症部位で発現が誘導されるプロス

タグランジン H₂ 合成酵素 (COX) 2 との機能的な共役が知られており (1)、病理生物学的には、炎症と痛み (1, 2, 3, 4)、リュウマチ (3, 4)、発熱 (5)、ある種の癌 (6, 7) などへの関与が報告されている。また、mPGES1 の組織での発現は、炎症性の刺激で誘導され、炎症活性があるグルココルチコイド (ステロイド) によって抑制される。これらの研究成果から、mPGES1 は、抗炎症薬開発と、一部のがんに対する抗がん剤開発の対象タンパク質として認識されている。また骨代謝やアルツハイマーとの関連でも盛んに研究が行われている。

PGE₂ 生合成を直接抑制できる、mPGES1 に作用する抗炎症薬の開発が、副作用の克服の観点から切望されている。関節リュウマチ、変形性関節症を含む、様々な炎症性疾患や、これらの疾患に伴う痛みの治療では、非ステロイド性の抗炎症剤 (NSAID) が用いられる。新たな NSAID の開発は副作用を克服する事で進められてきたが、まだ副作用のない NSAID は開発されていない。炎症部位で発現する COX2 と、恒常的に発現している COX1 の両方に作用する NSAID の副作用を克服するため開発された COX2 選択的 NSAID もまた、心血管系血栓性事象のリスクを高める副作用が知られている。COX の働きを調節するのではなく、直接 PGE₂ の生産を抑える NSAID の開発が望まれている。mPGES1 の構造研究は、PGE₂ 生合成機構の理解につながるだけでなく、創薬を通して、人類福祉に貢献する。

mPGES1 を含むヒト由来膜タンパク質の X 線結晶構造解析は、挑戦的な研究である。実際、現在でも立体構造が解明されたヒト由来膜タンパク質の種類は 20 に満たない。この理由の一つには、異種生物を使った組み換えヒト由来膜タンパク質生産の困難さがある。ヒト由来タンパク質は、生体試料の入手の難しさから、一部の例外的なタンパク質を除けば、異種生物を使った組換えタンパク質として生産する必要がある。しかし、水という生物種間で共通の環境に存在する水溶性タンパク質と異なり、生物種間で組成が異なる細胞膜中で安定に存在する膜タンパク質を、異種生物の細胞膜中に、X 線結晶構造解析で要求される質と量を満足するレベルで生産する方法は、確立されてはいない。ヒト由来 mPGES1 の構造研究では、失活させることなく組換え mPGES1 を可溶化、精製し、これを結晶化する技術を構築することが大きな課題の一つであった。

(1) Murakami, M. *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 32783-32793.

(2) Uematsu, S. *et al.* (2002) *J. Immunol.* **168**, 5811-5816.

(3) Trebino, C.E. *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 9044-9049.

(4) Kamei, D. *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 33684-33695.

(5) Engblom, D. *et al.* (2003) *Nat. Neurosci.* **6**, 1137-1138.

(6) Rocco, A. *et al.* (2006) *Ann. Oncol.* **17** (supplement 7), vii103-vii108.

(7) Oshima, H. *et al.* (2004) *EMBO J.* **23**, 1669-1678.

2. 研究の目的

PGE₂ の生合成に関する構造基盤を明らかにし、関節リュウマチやがんの発症機構の理解を分子レベルで深めるとともに、mPGES1 を作用タンパク質とする、新たな薬理プロファイルを持つ、NSAID 開発の創薬基盤を提供する。mPGES1 は、構造生物学的にも非常に興味深い研究対象である。mPGES1 の基質である PGH₂ は、9 位と 11 位の炭素が二つの酸素で架橋された 9, 11-エンドパーオキシド基を持つアラキドン酸代謝産物である。水溶液中では、9, 11-エンドパーオキシド基の開環によって、9 位と 11 位にそれぞれ水酸基とカルボニル基を持つ PGD₂ と、水酸基とカルボニル基の位置が入れ代わった PGE₂ が一定の割合で自発的に生成する。PGD₂ が生成する副反応を抑制しつつ COX2 と mPGES1 の間で PGH₂ を受け渡す何らかの分子システムの存在と、この分子システムを構成する mPGES1 は、COX2 との直接的な相互作用の可能性も含めた、構造上の特徴を備えていると推定される。平成 20 年に報告された、不活性型 mPGES1 の二次元結晶構造は、活性発現時に活性部位の構造変化が必須であることを示唆した (8)。活性型 mPGES1 の高分解能構造解析は報告されておらず、PGE₂ 生合成の構造基盤は十分理解されていない。活性型 mPGES1 の構造解析を含む、包括的な mPGES1 の構造研究による PGE₂ 生合成の構造基盤の解明は、mPGES1 の分子機能の深い理解に欠かせないだけでなく、mPGES1 が関わる関節リュウマチやがんなどの発症機構の分子レベルでの理解と治療法解明につながると期待される。組換えヒト由来膜タンパク質 mPGES1 の構造研究に不可欠な、異種生物による生産、効率的な可溶化と精製、結晶化技術の発展を図り、X 線結晶構造解析を通して PGE₂ 生合成の分子機構の解明に取り組む。

(8) Jegerschöld, C. *et al.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 11110-11115.

3. 研究の方法

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) を発現の為に異種生物として用い、質と量の双方で、X 線結晶構造解析を満足する高いレベルの mPGES1 を生産した。既存のタンパク質の構造解析では、*S. pombe* がタンパク質発現の為に異種生物として選択されることは稀である。報告書作成時点でも、プロテインデータバンクに登録されている生体高分子座標の中で、*S. pombe* を発現の異種生物として用いたのは、ヒト由来膜タンパク質ロイコトリエン C₄ 合成酵素についての我々の研究結果のみである。我々は、*S. pombe* を使って、

活性を持つヒト由来膜タンパク質を大量に発現する技術を持っており(9)、これを応用し、質と量の双方で、X線結晶構造解析を満足する高いレベルの mPGES1 を生産した。また、構造の均一化に寄与する目的で変異体 mPGES1 を作った。

S. pombe の細胞膜中に発現した mPGES1 を失活させることなく、可溶化・精製するため、リガンドアフィニティー樹脂、固定化金属イオンアフィニティー樹脂、ゲル濾過カラムを組み合わせ、精製系を構築した。ポリペプチド鎖の化学的な精製度は SDS ゲル電気泳動で確認した。また、N 末アミノ酸配列分析、MALDI 質量分析計を使い、翻訳後修飾の有無を検討した。化学的な精製度に加え、精製試料の性状のインデックスとして、ゲル濾過カラムによる可溶性 mPGES1 の単分散性、波長 280nm と 260nm の吸光度比等を用いた。逆相 HPLC を使い酵素活性を定量した。

結晶化は、界面活性剤ミセルで可溶化した mPGES1 に加え、Bicelle 共存下の mPGES1 の両方で行った。

(9) Ago, H. *et al.* (2007) *Nature* **448**, 609-612.

4. 研究成果

S. pombe を使った発現系を構築し、X線結晶構造解析で使用するに足る量と質で、N 末の 6 残基を欠損した活性型ヒト由来 mPGES1 の生産と精製が可能になった。*S. pombe* は、N 末の 6 残基を欠損し、C 末に 8 残基のヒスチジン残基を付加したヒト由来 mPGES1 の遺伝子を組み込んだ pESP ベクターで形質転換した。N 末アミノ酸配列解析と、MALDI-TOF 質量分析から、全長 mPGES1 を *S. pombe* で発現させると、全体のおよそ三分の一の mPGES1 が、N 末から 6 番目のロイシン残基の直後で加水分解され、試料が不均一になる事が判った(図1)。これを避けるため、N 末欠損体を発現した。N 末欠損体の MALDI-TOF 質量分析では、分子量 17565 となり、計算上の分子量 17562.5 とほぼ一致した。N 末欠損体は、初めのメチオニンが欠損する以外の翻訳後修飾を受けていないと判断された。

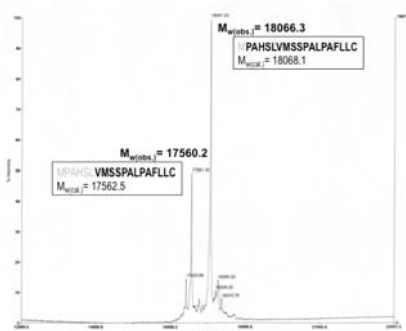


図1 *S. pombe* で発現した全長ヒト由来 mPGES1 の MALDI-TOF-MS と N 末アミノ酸配列解析。黒四角で囲った中に、実測したアミノ酸配列を太字で記し、各々の分子量の計算値を付記した。

mPGES1 の精製は、*S*-hexyl-glutathione をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー、TALON cobalt、Superdex200 の順で精製した(図2)。

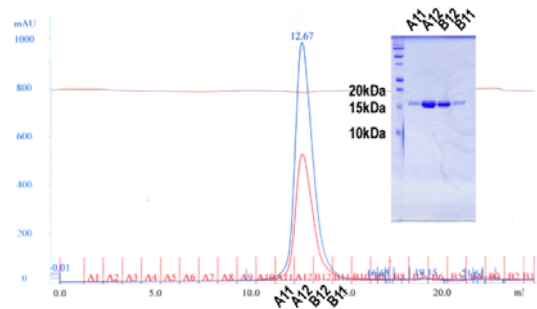


図2 Superdex200 の溶出プロファイルと SDS ゲル電気泳動。

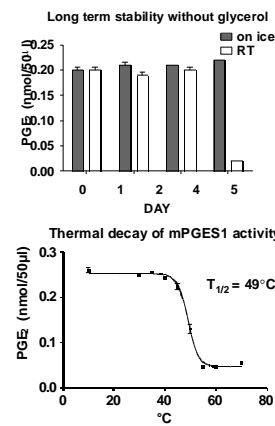


図3 mPGES1 の安定性評価

その後、結晶化直前に、PD-10 でグリセロールを含まない溶液に置換した(20mM MES-NaOH (pH6.5), 1mM DTT, 5mM GSH, 0.03% (w/v)

dodecyl-maltoside, 0.15M NaCl)。この溶液中で、mPGES1 は数日間、はじめの酵素活性を維持する。また、この酵素の活性が 5 分間の熱処理で半分になる温度 ($T_{1/2}$) は 49°C であった(図

3)。酵素の速度論的解析で求めた k_{cat} 、 K_m は $105 \pm 11 \text{ s}^{-1}$ 、 $2.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$ で、 k_{cat} は天然型と同程度 (k_{cat} $50 \pm 6 \text{ s}^{-1}$) であった。一方 K_m は、天然型 ($160 \pm 4 \mu\text{M}$) に比べ、2 桁小さな値であった(10)。 $T_{1/2}$ は、1.9Å 分解能で結晶構造を決定できた LTC₄ よりが 9°C 低いものの、酵素活性は既報の天然型 mPGES1 より高く、また、低温に保つことで相当期間活性を維持出来るので、結晶化に耐えうる試料であると判断した。

(10) Pettersson, P.L. (2005) *Methods Enzymol.* **401**, 147-161.



図4 両親媒性界面活性剤 Fos-Choline-16 を添加剤として成長した mPGES1 結晶。

DDMで安定化したmPGES1の結晶化条件スクリーニングは、シッティングドロップ蒸気拡散法で行った。ポリエチレングリコール(PEG)400を沈殿剤とし、4°Cの結晶化条件で見つかった初期条件に対して、添加物等の条件検討を加えた。板状や柱状の結晶が、再

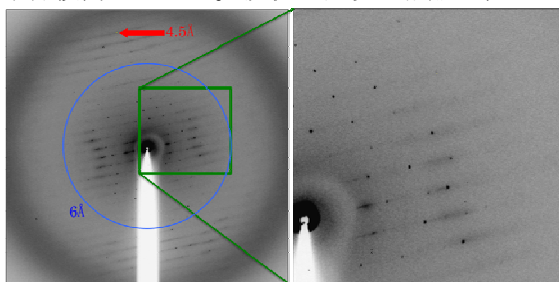


図5 PEG400を沈殿剤とする結晶のX線回折像。

現性よく成長した(図4)。PEG400を沈殿剤とする結晶は、4.5Å程度まで回折が観察された(図5)。

精製 mPGES1 を dimyristoyl phosphatidylcholine と CHAPS0 を使った Bicelle 共存下の結晶化も行った。図6に、2.2M リン酸アンモニウムを沈殿剤とする条件で成長した結晶の写真と回折像を示す。

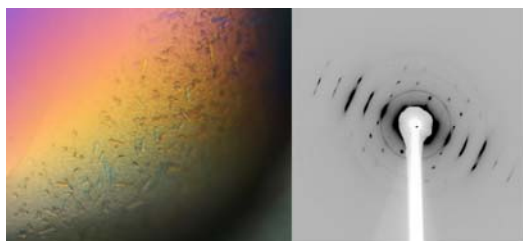


図6 Bicelle 共存下で成長した結晶と回折像。

本研究によって、結晶構造解析に供しうる質と量でヒト由来 mPGES1 を *S. pombe* を使って発現精製することが可能になった。結晶化実験では、ポリエチレングリコール400を沈殿剤とする低塩濃度の結晶化条件と、リン酸アンモニウムを沈殿剤とする高塩濃度の結晶化条件が見つかった。結晶改良をすすめることで、mPGES1 の X 線結晶構造解析による PGE₂ 生合成の分子基盤の解明ができる。

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2件)

- ① Saino, H., and Ago, H. (11名中3番目) *et al.*, The catalytic architecture of Leukotriene C₄ synthase with two arginine residues. *J. Biol. Chem.* In press, (2011), 査読あり。
- ② 吾郷日出夫、宮野雅司、システインロイコトリエン研究の新知見、日本結晶学会

誌、52、69-75、(2010)、査読なし。

[学会発表] (計4件)

- ① 齊野廣道、プロスタグランジン E₂ 合成酵素1の結晶化-結晶の改善、日本結晶学会平成22年度年会、2010年12月5日、吹田市。
- ② 吾郷日出夫、Synchrotron radiation structural biology of proteins functioning at biological membrane.、第27回内藤コンファレンス 生体膜ダイナミクスと脂質生物学[I]、2010年6月30日、札幌市。
- ③ 齊野廣道、The distinct role of two arginine residues in the leukotriene A₄-specific glutathione S-transferase activity of LTC₄ synthase.、Keystone symposia on molecular and cellular biology bioactive lipids biochemistry and diseases、2010年6月7日、京都市。
- ④ 吾郷日出夫、プロスタグランジンE₂ 合成酵素1の大量発現精製と結晶化、日本結晶学会平成21年度年会、2009年12月5日から6日、西宮市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吾郷 日出夫 (AGO HIDEO)

独立行政法人理化学研究所・宮野構造生物物理研究室・専任研究員
70360477

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者