

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22550152

研究課題名（和文）

ヒト由来PGD合成酵素の金属イオンによる活性化機構解明のための中性子線構造解析

研究課題名（英文）

Neutron structure analysis of human PGD synthase for elucidation of the reaction mechanism activated by metal ions

研究代表者

井上 豪 (INOUE TSUYOSHI)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20263204

研究成果の概要（和文）：アレルギーや炎症の媒介物質であるプロスタグランジン (PG) D₂ は、補酵素グルタチオン(GSH)存在下、造血器型プロスタグランジン (PG) D 合成酵素 (H-PGDS) の働きによって産生される。以前、Ca, およびMg イオンの働きによって活性化される分子メカニズムをX線構造解析によって解明したが、これを中性子線解析法によって解明する目的で大規模結晶の育成研究に取り組んだ結果、0.5 mm³程度の高品質結晶が得られることが判明した。

研究成果の概要（英文）：Prostaglandin D₂ (PGD₂) is an allergic and inflammatory mediator produced by hematopoietic PGDS (H-PGDS) in the presence of glutathione (GSH). Previously, we found that Ca²⁺ and Mg²⁺ activated the enzyme activity and uncovered the activation mechanism by the X-ray crystal structures of the Ca²⁺- and Mg²⁺-bound forms of human H-PGDS at high resolution. In this study, we performed the crystallization of H-PGDS to reveal the protonation state by neutron diffraction and obtained the crystals with maximum size of 0.5 mm³ with high quality.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：構造生物化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：中性子線解析 金属イオン 酵素活性化機構

1. 研究開始当初の背景

造血器型PGD合成酵素 (H-PGDS) は、シク

ロオキゲナーゼ(COX)により産生したPGH₂をPGD₂に特異的に異性化する。PGD₂の受容体

(DP受容体)のノックアウトマウスではアレルギー反応が軽減し(Matsuoka, T. et al., *Science*, 2000)、ヒト型 PGD 合成酵素-大量発現トランスジェニックマウスではアレルギー反応が増悪する(Fujitani, Y. et al., *J. Immunol.*, 2002)。COXより下流のH-PGDSが抗アレルギー剤開発の新規標的の1つとして期待されている。

ヒト由来酵素は、アミノ酸数 198、分子量 23.3 kD で、2 量体で存在する。 σ 型グルタチオン S 転移酵素(GST)に分類され、グルタチオン(GSH)依存的($K_m=300\mu\text{M}$)に異性化反応を担う(Urade, Y. et al., *J. Biol. Chem.*, 1987)。

我々は、ヒト由来酵素を解析し、2 量体の中心に結合した Mg^{2+} により GSH の K_m 値が約 4 倍向上する事実を発見し、金属イオン活性化機構を提唱した(Inoue, T. et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2003)。しかし、2 量体あたり 2 分子存在する GSH をチオラート化して活性化する際のヘテロ性など、GSH のチオラート化機構の詳細は未解決のままであった。

一方、阻害剤複合体の構造解析(Inoue, T. et al., *J. Biochem.*, 2004, Aritake, K. et al., *J. Biol. Chem.*, 2006, 特開 2003-144145, 特開 2004-002248, 特開 2004-51600)により、筋ジストロフィーのモデル動物(ビーグル犬)に対して有効で、筋肉の破壊に伴う PGD_2 産生の減少により病気の進行を抑制する薬剤の開発に寄与したが、より強力で無害な延命薬の開発が望まれている。

2. 研究の目的

2 量体で機能するヒト由来 H-PGDS の中心の Mg^{2+} が補酵素 GSH のチオラート化を促進する構造を直接観測するため、①高純度サンプルの大量精製と大型結晶の育成、②J-PARC における中性子線回折データの集積と中性子線解析、③活性化 GSH のヘテロ構造の解析→詳細な GST の反応機

構解明を行う。

蛋白質結晶の中性子線回折は非常に弱く、1mm 角以上の大型結晶を育成するため、X 線構造の報告が既に 60,000 件を超えるのに対し、中性子線解析の成功例はわずか 33 種類(2009 年 10 月現在)と極端に少ない。一方、2 量体で機能するヒト由来 H-PGDS の中心金属イオンが水素結合ネットワークを介して 2 分子の補酵素グルタチオン(GSH)をチオラート化する活性化機構が予測されたが(Inoue, T. et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2003)、実験的な直接観測には至っておらず、2 分子の GSH のヘテロ性などは未解明のままである。

本研究では、成功例の少ない中性子線解析によりヒト由来 H-PGDS に存在する GSH 分子のチオラート化を直接観察し、GST 蛋白質に共通の反応機構を詳細に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

既にヒト由来 H-PGDS の X 線構造解析を成功させており(Inoue, T. et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*(2003), Inoue, T. et al., *J. Biochem.*(2004), Aritake, K. et al., *J. Biol. Chem.*(2006))、酵素の大量発現、精製、および結晶化に関するノウハウは蓄積されてはいたが、大型結晶育成に関しては、宇宙空間を利用した高品質結晶を行った際のノウハウがあった程度で、中性子線回折用の 1.0 mm^3 を超える大型結晶を種結晶化で植え継ぎながら育成する方法を検討した。そのための高純度サンプルの精製および結晶化から開始した。

4. 研究成果

2 年目以降で日本原子力研究所の中性子炉での照射実験を目指し、種結晶化も含め進めていたが、研究 1 年目の年度末に東日本大震災が発生し、その影響で中性子炉も運転が

ストップした。中性子線回折の実験ができなくなったため、大型結晶を調製しても、そのまま放置した状態だと結晶の劣化も激しく、活性中心のグルタチオン (GSH) が自然酸化されるとともに結晶の品質も下がることから、中性子線回折による活性化機構の解明という本題の課題解決が非常に困難となった。そこで来るべき日に備えて、種々のプロスタグランジン合成酵素の結晶化および構造解析に着手し、大型結晶育成が可能かどうかの判断を行うこととした。

(1) ヒト由来 H-PGDS の大型結晶育成

①Native の結晶化および活性化に重要な Tyr8 についての変異体 Y8F の両方で大型結晶を育成し、Native と Y8F に結合した補酵素 GSH のチオールのプロトン化状態を確認することは非常に重要であり、両方について微結晶を作製し、その結晶を種 (シード) として種結晶化法による大型結晶化を試みた。

表 1. 種結晶取得のための H-PGDS の結晶化条件

手法	ハンギングドロップ蒸気拡散法		
温度 (°C)	20		
Buffer	Tris-HCl 100mM (pH 8.4)		
		Drop	Reservoir
沈殿	PEG6000 (%)	16	17
添加	MgCl ₂ (mM)	2.5	5
	Dithiothreitol	5	10
	Glutathione	5	10
	dioxane (%)	1	2
	蛋白 濃度 (mg/mL)	13	

下の図は、上記の結晶化条件で育成した、Y8F 変異体の結晶 (左) であり、これを 1 回目種結晶化法を試した際の結晶 (中)、および、2 回目に種結晶化法を試した際の結晶 (右) の写真である。



図 1. H-PGDS の Y8F 変異体の結晶写真

いずれも中性子線に耐えうるようなサイズには至らず、播磨 SPring-8 の 44XU における X 線回折実験で 1.7 Å 分解能程度であった。これらをさらに大型化すると、結晶のモザイク性が一気に高くなるため、1 回の種結晶化で大型化を進める方法を試した。しかし、最大で $0.3 \times 0.4 \times 1.1 \text{ mm}^3$ を超える良質の結晶は得られたものの、さらに大型の結晶を育成させることは出来なかった。

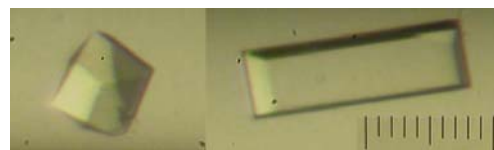


図 2. 種結晶化法によって得られた H-PGDS の結晶。長さ方向で 1 cm を超えるものも得られた (右)。

今回、Native および Y8F 変異体について、1 回の種結晶化による方法では中性子線構造解析用に 1 mm^3 を超える大型で高品質の結晶を育成することは出来なかったが、このことは何度も高純度サンプルの精製を繰り返し行っても同一であった。本質的に、環境変化に弱い結晶であり、2 度、3 度と種結晶化を試みると、結晶品質を低下させることに繋がった。

一方、以前、これらの方法で大型化した結晶からの高分解能データ (native 結晶; 1.28 Å 分解能) の収集に成功しており、共同研究者らによってマキシマムエントロピー (MEM) 法による構造精密化が進められたところ、これまでに見られなかった水和構造が明らかとなった (*in preparation*)。しかし、活性中心のチオラートは放射光による X 線損傷によって酸化されており、本来の活性型の構造ではなかった。強い X 線照射下でのデータ収集を避けながら高分解能データを収集するか、中性子線回折による構造解析が必要であ

ることが判明した。

(2) マウス由来 PGFS の X線構造解析

プロスタグランジン (PG) $F_{2\alpha}$ は子宮平滑筋の収縮を担う生理活性物質であり、陣痛促進剤としても広く臨床利用されている。ヒト由来 Aldo-Keto Reductase (AKR) 1B1、マウス由来 AKR1B3、マウス由来 AKR1B7 は、いずれも NADPH 存在下で PGH_2 を還元し、 $PGF_{2\alpha}$ を合成するという PGFS 活性を有している。しかし、AKR1B1 および AKR1B3 は、NADPH 非存在下において基質 PGH_2 を PGD_2 に変換する活性を有し、この活性が AKR1B7 にはないことが判明した。AKR1B1、1B3、1B7 の三者のアミノ酸配列相同性は非常に高い (AKR1B1-1B3: 86%、1B1-1B7: 72%、1B3-1B7: 70%) にも関わらず、このような活性に違いが見られた原因については未解明であった。なお、これまでに、AKR1B1 の構造解析が知られているものの、AKR1B3、AKR1B7 の構造が未解明であり、これらの構造解析を進めるとともに、PGDS 活性の違いについて議論を行った。

まず、AKR1B3 および AKR1B7 の発現プラスミドを大腸菌に形質転換し、発現培養と精製の過程を経て、高純度の精製サンプルを調製した。結晶化条件の検討を行った結果、AKR1B3 については PEG3350 を、AKR1B7 については PEG monomethylether5000 を沈殿剤とする結晶化条件で、高品質結晶を得ることができた。これらの結晶を用いて X線回折強度データ収集を行った。AKR1B3 に関しては放射光科学研究施設 Photon Factory BL-17A ビームラインにおいて分解能 2.0 Å にて、AKR1B7 に関しては大型放射光施設 SPring-8 BL44XU ビームラインにおいて分解能 1.6 Å にてデータ収集を完了し、AKR1B1 の立体構造をモデル分子とした分子置換法によって位相決定を行い、構造精密化を終了

(AKR1B3; R 値 24.5%, R_{free} 値 29.5%, AKR1B7; R 値 15.2%, R_{free} 値 21.3%) した。

得られた新規構造と、既知の AKR1B1 の構造との比較を行ったところ、 C_{α} 炭素原子の rmsd は、AKR1B7 について、NADPH の非存在で PGDS 活性を有しない理由について考察した。

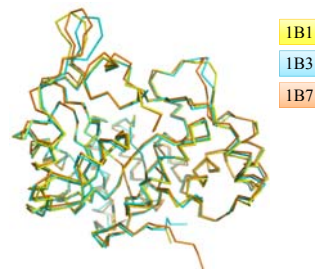


図3. AKR1B1, 1B3, 1B7の構造の重ねあわせ (左) と活性中心の構造 (右)

また、活性中心の構造はほぼ同一であったが、Trp111 の構造に違いが見られ、その原因は AKR1B1 および AKR1B3 では Trp111 の後方に存在する残基が Thr114 で保存されている一方で、これが AKR1B7 では Gln114 に変異し、Trp111 の側鎖の窒素原子と水素結合をすることによって Trp111 の残基の配向を変化させていた (図4)。

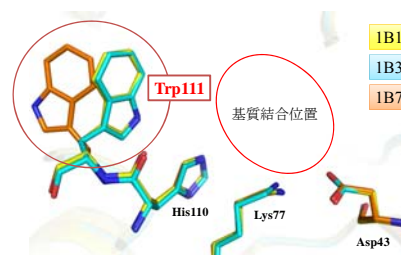


図4. AKR1B1, 1B3, 1B7の活性中心の構造の違い。

この違いは、NADPH の非存在下で、AKR1B1 と AKR1B3 では、Trp111 が基質 PGH_2 の結合サイト側に側鎖の窒素原子を配置し、ペルオキシド酸素を固定することによって、His110 が塩基として作用することができ、 PGD_2 へと異性化できるのに対して、AKR1B7 では、Trp111 が基質 PGH_2 を固定できず、His110 が塩基として作用することができな

くなるため、PGDS 活性を保持することができない、ということが判明した。

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 22 件)

- (1)“Human hematopoietic prostaglandin D synthase inhibitor complex structures”, Y. Kado, Y. Okano, N. Okazaki, K. Aritake, N. Uodome, H. Matsumura, Y. Urade & T. Inoue, *J. Biochem.*, **151**, 447-455 (2012).
- (2)“Three-dimensional, non-invasive, cross-sectional imaging of protein crystals using ultrahigh resolution optical coherence tomography”, N. Nishizawa, S. Ishida, M. Hirose, S. Sugiyama, T. Inoue, Y. Mori, K. Itoh & H. Matsumura*, *Biomed. Opt. Express*, **3**, 735-740 (2012).
- (3)“Growth of protein crystals in hydrogels prevents osmotic shock”, S. Sugiyama, M. Maruyama, G. Sazaki, M. Hirose, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori & H. Matsumura*, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 5786-5789 (2012).
- (4)“Crystal structure of the superfamily 1 helicase from Tomato mosaic virus”, M. Nishikiori, S. Sugiyama, H. Xiang, M. Niiyama, K. Ishibashi, T. Inoue, M. Ishikawa, H. Matsumura & E. Katoh*, *J. Virol.*, **86**, 7565-7576 (2012).
- (5)“Effects of a forced solution flow on the step advancement on {110} faces of tetragonal lysozyme crystals: direct visualization of individual steps under a forced solution flow”, M. Maruyama, K. Hisato, G. Sazaki, S. Maki, Y. Takahashi, H. Yoshikawa, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami & Y. Mori, *Cryst. Growth Des.*, **12**, 2856-2863 (2012).
- (6)“The in silico screening and X-ray structure analysis of the inhibitor complex of Plasmodium falciparum orotidine 5'-monophosphate decarboxylase”, Y. Takashima, E. Mizohata, S. R. Krungkrai, Y. Fukunishi, T. Kinoshita, T. Sakata, H. Matsumura, J. Krungkrai, T. Horii & T. Inoue, *J. Biochem.*, **152**, 133-138 (2012).
- (7)“Crystal structure of the N-terminal domain of the yeast general corepressor Tup1p and its functional implications”, H. Matsumura*, N. Kusaka, T. Nakamura, N. Tanaka, K. Sagegami, K. Uegaki, T. Inoue & Y. Mukai, *J. Biol. Chem.*, **287**, 26528-26538 (2012).
- (8)“Crystal structure of rice Rubisco and implications for activation induced by positive effectors NADPH and 6-phosphogluconate”, H. Matsumura, E. Mizohata, H. Ishida, A. Kogami, T. Ueno, A. Makino, T. Inoue, A. Yokota, T. Mae & Y. Kai*, *J. Mol. Biol.*, **422**, 75-86 (2012).
- (9)“Spatially precise, soft microseeding of single protein crystals by femtosecond laser ablation”, H. Yoshikawa, Y. Hosokawa, R. Murai, G. Sazaki, T. Kitatani, H. Adachi, T. Inoue, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, S. Nakabayashi, Y. Mori & H. Matsumura, *Cryst. Growth Des.*, **12**, 4334-4339 (2012).
- (10)“Structural insight into the stereoselective production of PGF_{2α} by Old Yellow Enzyme from *Trypanosoma cruzi*”, N. Okamoto, K. Yamaguchi, E. Mizohata, K. Tokuoka, N. Uchiyama, S. Sugiyama, H. Matsumura, K. Inaka, Y. Urade, T. Inoue, *J. of Biochemistry*, **150**, 563-568 (2011).
- (11)“Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of mouse prostaglandin F_{2α} synthase, AKR1B3”, Y. Takashima, S. Hatanaka,

E. Mizohata, N. Nagata, Y. Fukunishi, H. Matsumura, Y. Urade, T. Inoue, *Acta Cryst.*, F67, 1630-1632 (2011).

〔学会発表〕（計 56 件）

①Y. Fukuda, T. Tamada, H. Takami, T. Inoue, M. Nojiri, “Atomic resolution structure of copper-containing nitrite reductase provides insights into common properties of type 2 copper-containing enzymes”, Asian Crystallographic Association (AsCA) 2012, 2012.12.2-5, Adelaide (Australia)

②Y. Takashima, E. Mizohata, K. Tokuoka, Y. Kusakari, T. Uchida, S. R. Krungkrai, H. Matsumura, J. Krungkrai, T. Horii, T. Inoue, “Structural basis enzymes in the pyrimidine biosynthetic pathway of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* for *in silico* drug design”, International Union of Crystallography, 2011.8.22-30, Madrid(Spain)

③ T. Inoue, H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, S. Murakami, Y. Mori, “Development of the new protein crystallization techniques and application for structural analysis of target Enzymes”, The 10th KIAS Conference on Protein Structure for structural and Function, Korea Institute for Advanced Study, Seoul, Korea

④H. Matsumura, K. Kakinouchi, N. Shimizu, S. Sugiyama, Y. Takahashi, M. Maruyama, R. Murai, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, “Novel Approach for Growth of High-Quality and Large Protein Crystals”, 13th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules, 2010.9.12-16, Dublin(Ireland).

⑤ S. Sugiyama, M. Hirose, R. Murai, Y. Takahashi, M. Maruyama, G. Sazaki, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, H. Matsumura, “Protein Crystallization in Agarose

Gel with High Strength”, 13th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules, 2010.9.12-16, Dublin(Ireland).

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 豪 (INOUE TSUYOSHI)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：20263204

(2) 研究分担者

松村 浩由 (MATSUMURA HIROYOSHI)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：30324809
溝端 栄一 (MIZOHATA EIICHI)
大阪大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：90571183