

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04343

研究課題名(和文)脂質性情報伝達物質を産生する膜タンパク質の脂溶性分子認識機構の解明

研究課題名(英文)Structure basis of lipophilic ligand binding of membrane protein involving in lipid mediator biosynthesis

研究代表者

吾郷 日出夫(Ago, Hideo)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・専任研究員

研究者番号：70360477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：親水性のグルタチオンと脂溶性リガンドから生体内局所環境の調節に与る生理活性脂質を生成する膜タンパク質の脂溶性リガンド認識機構に関する研究を行った。グルタチオンの認識機構に比べ脂溶性リガンドの認識機構の構造研究は進んでいなかった。本研究では脂溶性リガンドとこれらの膜タンパク質の複合体化に、界面活性剤存在下で結晶化した結晶に脂溶性リガンドを浸漬する従来法に加え、脂溶性リガンドを溶かした脂質メソ相を利用する方法を使った。また大きさが小さくなりがちな脂質メソ相で成長する結晶のデータ測定を支援する目的で、微結晶を分散した高粘稠媒体をカプトンフィルムに薄く展開する方法の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Structure basis of lipophilic ligand recognition of human membrane proteins involving in lipid mediator biosynthesis was the subject of this study. The membrane proteins utilize hydrophilic GSH and lipophilic arachidonic acid metabolites. In comparison to GSH whose binding architecture was elucidated in detail by X-ray crystallography, limited information about lipophilic ligand was available. This study used two methods to get the lipophilic ligand / protein complex, one was the soaking method on the crystals grown in surfo and the other was the co-crystallization in meso. In addition to making lipophilic ligand / protein complex, a method spreading thinly a highly viscous vehicle in which a large number of micro-crystals were dispersed was developed. Crystal overlap along X-ray beam causes the double hit which makes the diffraction image unavailable. The thin spreading reduces the crystal overlap; thus, resulting in the efficient data collection from micro crystals.

研究分野：Synchrotron structural biology

キーワード：Protein crystallography membrane protein lipid mediator

1. 研究開始当初の背景

ロイコトリエン C₄ 合成酵素 (LTC₄S) やマイクロゾーマルプロスタグランジン E₂ 合成酵素 1 (mPGES1) が産生する脂質性情報伝達物質ロイコトリエン (LT) C₄ やプロスタグランジン (PG) E₂ は、その強い生理活性で、組織の局所環境の調節に与る。その一方で病気やその症状の原因にもなる。LTC₄ とその代謝物は、花粉症やハウスダストに対するアレルギー症状の原因物質であり¹、PGE₂ は発熱、炎症、癌、A 型インフルエンザウイルス感染症の重症化などに関与する^{2,3}。このように我々の健康と深く関わりがある事から、アラキドン酸カスケードの脂質性情報伝達物質代謝の構造生物学研究は、世界中で精力的に行われてきた (図 1)。

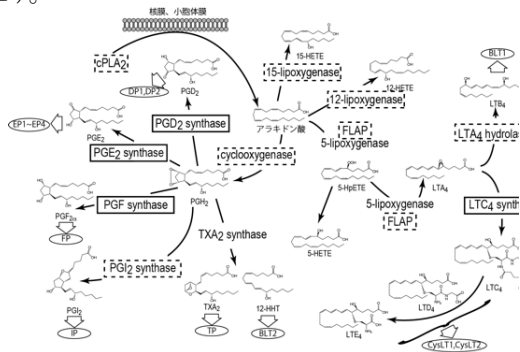


図 1 アラキドン酸カスケード。代謝酵素を四角で囲んだ。実線は日本の研究者が、破線は海外の研究者が構造を解析した事を示す。各々の脂質メディエーターの GPCR 型受容体を、白抜き矢印の先の楕円で囲んだ。主要な代謝酵素の中では、トロンボキサン合成酵素の構造が未解明である。多くの GPCR 型受容体の構造解析は今後の課題として残されている。

本研究で取り扱う LTC₄S と mPGES1 は、基質もしくは補因子として働くグルタチオン (GSH) とアラキドン酸から作られる脂溶性基質の反応を触媒する膜タンパク質である。これまでの研究で、水溶性分子 GSH の認識と活性化の仕組みの詳細が明らかにされている⁴⁻⁸。一方、酵素活性に関連する脂溶性分子の認識機構は未解明であった。

2. 研究の目的

LTC₄S と mPGES1 が、脂溶性分子を認識し選択的に結合する仕組みを明らかにし、触媒機能の全容の正確な理解に役立てる。脂溶性基質の認識機構に関しては、GSH 結合部位近傍のクレフトに結合する界面活性剤のアルキル鎖を脂溶性基質に見立てて、脂溶性基質の結合部位や認識機構が論じられているにすぎない^{5,6}。この議論には、LTA₄ や PGH₂ の不飽和結合をもつ炭素鎖を、取りうるコンフォメーションや高さにおいて異なる飽和アルキル鎖で代用している難しさがある。さらに、2014 年に報告された LTC₄S の基質認識に関する計算機実験では、LTA₄ の疎水的な炭素鎖が細胞質側に伸びているというこれまでの議論とは

全く異なる結合様式も報告されている⁸。これ迄に私たちが見いだした LTC₄S の酵素活性阻害能を有する脂溶性有機合成低分子の計算機で予測した結合モデルでも、前述の LTA₄ の結合部位と推定される疎水的なクレフトが近くにあるにも関わらず、その疎水性置換基は、細胞質側の疎水的な浅い窪みに結合している⁹。このように、LTC₄S と相互作用し、その酵素活性に関係する脂溶性分子の認識様式は明らかではなかった。mPGES1 でも、脂溶性基質やその類似分子との複合構造解析は報告されていなかった。LTC₄S と mPGES1 が、脂溶性分子を認識し選択的に結合する仕組みを明らかにすることは、触媒機能の全容の正確な理解に役立つと同時に、阻害能を示す脂溶性有機合成低分子化合物の構造最適化への応用も期待できる。

3. 研究の方法

脂溶性分子とタンパク質を複合体化する場として脂質メソ相を想定し、脂質メソ相での結晶化条件の探索と最適化を行う。安定なタンパク質の保持に寄与し結晶化で有利であると共に、脂溶性分子を高濃度で保持出来るので、膜タンパク質と脂溶性分子の相互作用を研究する環境として優れている脂質メソ相で結晶を得る。次いで、高分解能構造解析に役立つ大型結晶と高輝度マイクロビームの相乗効果を狙うため、結晶化条件の最適化で結晶の大型化を図る。LTC₄S と mPGES1 との相互作用を観察する脂溶性分子の脂質メソ相への溶解は、脂質メソ相の結晶化にコレステロールを取り入れた既報の方法によって行う¹⁰。脂質メソ相を使った結晶化と脂溶性分子との複合体結晶の調製に合わせ、界面活性剤を使用した結晶化条件改良と浸漬法による複合体化実験も行う。結晶の回折実験では結晶の大きさに応じて適切なビームラインを選択する。また脂質メソ相に埋もれた微小結晶から高い S/N 比の回折像を撮影するため、静電分注器と広面積試料ホルダーの利用に関する検討も行う。

4. 研究成果

脂質メソ相での結晶化条件の探索と最適化では mPGES1 に結合してその酵素活性に影響を与える化合物や金属イオン、結晶化で用いる沈殿剤の種類等を検討し、ビームタイムの確保がより容易なベンディングマグネットを光源とするビームラインで測定可能な大きさまでは至らなかったものの、これまでの細い柱状もしくは一辺数ミクロンの立方体の結晶に比べ、六角板状で面積のより大きな結晶を得た (図 2)。結晶の大きさは強く沈殿剤濃度に依存し、0.2 % (v/v) 程度ポリエチレングリコール濃度が上下するだけで、結晶の数が増え大きさが小さくなる。

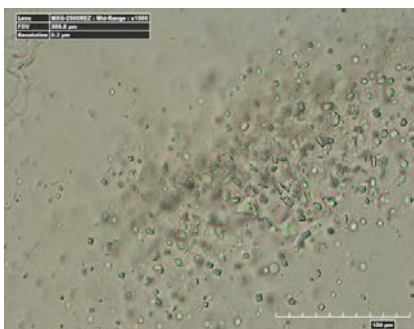


図2 脂質メソ相中で成長した mPGES1 の結晶。ポリエチレングリコール 300 を沈殿剤、塩化カドミウムと塩化マグネシウムを添加物とし、MES 緩衝液の pH は 6.8。

mPGES1 を再構成するモノオレインへの脂溶性化合物の混入はこれ迄のところ結晶の大きさの面では好ましくない結果を与えた。

脂質メソ相を使った結晶化に並行して、界面活性剤存在下で得られる大型結晶を利用し脂溶性リガンドとの複合体構造解析を実施した。界面活性剤で可溶化した mPGES1 をチオシアン酸ナトリウム存在下で結晶化すると、大きさ 0.2 mm 角程度で、ベンディングマグネットを光源とするビームラインの 1 秒露光で X 線回折像を撮影したとき、 $CC_{0.5} \geq 0.5$ を指標とした判断で 2 Å 台前半の分解能程度の回折強度データを収集可能な結晶を与えることを本研究期間に見出した (図 3)。

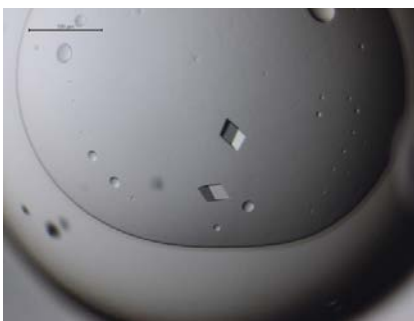


図3 界面活性剤存在下で成長した mPGES1 結晶。結晶化溶液に 0.2 M 程度のチオシアン酸ナトリウムを添加すると X 線回折の分解能が向上する。

ω -3 脂肪酸やその誘導体、MK886 を含む活性阻害物質を浸漬した本結晶の回折強度データ収集を進めた。 ω -3 脂肪酸の濃度の高い溶液に浸漬した結晶の中には、電子密度の広がり浸漬した ω -3 脂肪酸の全長を収めるには小さいものの、膜貫通領域の表面に ω -3 脂肪酸のシス型二重結合が連続する特徴と矛盾しない形状の電子密度分布が見られるものがあった (図 4)。この電子密度分布が見られた位置は、膜貫通 α ヘリックス 1 番 ($\alpha 1$) と 3 番 ($\alpha 3$) の脂質二重膜の疎水コアに面した疎水的表面上にある。 ω -3 脂肪酸を浸漬していない結晶では、連続した広がりのある電子密度は見られず、孤立した広がり欠ける電子

密度分布がタンパク質の疎水的な表面から 4 Å 程度離れて存在していることから、この領域には界面活性剤のアルキル鎖が弱く結合していると考えられる。またプロテインデータバンクに登録されている 15 個の mPGES1 の X 線結晶構造座標でも、この場所に界面活性剤のアルキル鎖などの広がりのある分子を置いているものはない。これらの点は、ここで観察された電子密度が ω -3 脂肪酸の浸漬によって導入された分子に由来する可能性を示唆している。

結晶学的構造精密化後 (R_{free} : 23.0 %, 分解能: 2.3 Å) の ω -3 脂肪酸を想定した原子モデル (図 4 中の緑) から $\alpha 1$ 並びに $\alpha 3$ の疎水表面を作る原子までの最短距離はほとんどが 4 Å 台前半であった。 $\alpha 1$ と $\alpha 3$ のカルボニル末端で脂質二重膜貫通領域から親水領域の繋ぎ目に当たる部分に結晶化で用いる界面活性剤オクチルグルコシド (OG) が結合している。OG のアルキル鎖の炭素原子と $\alpha 1$ 並びに $\alpha 3$ の疎水表面の原子の間の最短距離も概ね 4 Å 台前半であり、 ω -3 脂肪酸の炭素鎖と考えられる領域も界面活性剤の炭素鎖と同じ疎水相互作用で mPGES1 の膜貫通領域に結合していると考えられる。

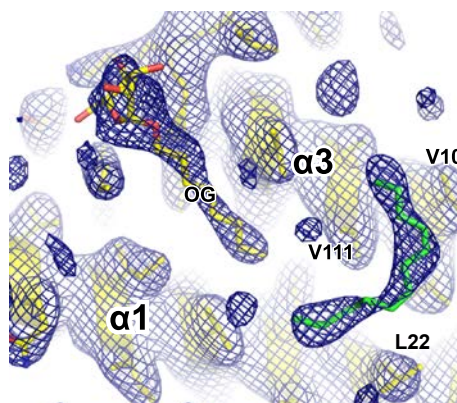


図 4 α ヘリックス 1 と 3 の疎水的な膜貫通領域表面の電子密度分布図。 ω -3 脂肪酸のシス型二重結合の形状と矛盾しない形状の電子密度分布の中に ω -3 脂肪酸のモデル (緑色) を配置している。

mPGES1 への結合が示唆された ω -3 脂肪酸は酵素学的検討で mPGES1 の酵素活性を抑制することが報告されている¹¹。今回結合が示唆される部分は、mPGES1 の活性部位ではないことから、この部位が酵素活性に影響を与える ω -3 脂肪酸の結合であるとすれば、mPGES1 の分子構造の揺らぎに対する影響がその原因であるかもしれない。mPGES1 は OG を使った結晶化条件で、より長い炭素鎖とより嵩高いマルトース構造をもつドデシルマルトシド (DDM) を使用する結晶化条件に比べ、結晶の X 線回折能が向上する。結晶化で用いる試薬や阻害剤などのタンパク質への部位特異的結合が X 線回折能を向上させることがあり、複合体形成による分子の揺らぎの抑制による構造の均一性の向上がその理由とされている。

図4で示したように、mPGES1は $\alpha 1$ と $\alpha 3$ の間に炭素8個からなるOGの炭素鎖の長さと同補的な形状のOGを秩序良く結合する部位を持っている。OGを使った結晶化で得られた結晶のX線回折能が向上していたことから、 $\alpha 1$ と $\alpha 3$ の間の窪みへの分子の結合は、mPGES1の分子揺らぎの抑制に関わっている可能性がある。またOG存在下の予備的な実験で測定した比活性(数10 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) (未発表)は、DDM存在下(数100 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) (未発表)やTriton-X100存在下^{12,13}に比べ抑制された。 $\alpha 1$ と $\alpha 3$ の間の窪みへのOGの結合による分子揺らぎの抑制がmPGES1の酵素活性に影響を与えた可能性が示唆される。 $\omega-3$ 脂肪酸に由来する可能性のある電子密度は、mPGES1の $\alpha 1$ と $\alpha 3$ の間の窪みの近傍にあることから、 $\omega-3$ 脂肪酸の酵素活性阻害能はOGと類似した仕組みで実現されている可能性も示唆される。

mPGES1の $\alpha 1$ と $\alpha 3$ の間の窪みが酵素活性に影響を与える領域である可能性を示したが、より確かなものとするためにはさらに検討を進める必要がある。現時点では、 $\omega-3$ 脂肪酸の一部と推定される電子密度分布が電子密度図の中で観察されたに過ぎず、構造解析の分解能の面でも $\omega-3$ 脂肪酸以外の分子の結合を否定できるわけではない。また $\omega-3$ 脂肪酸の結合候補位置が、結晶のX線回折能の向上と酵素活性の抑制に関与するOGの特異的結合部位の近傍であったことから、 $\omega-3$ 脂肪酸による酵素活性の抑制も同様の仕組みで起こる可能性を提案したが、OGの炭素鎖と $\omega-3$ 脂肪酸の炭素鎖が競合する可能性を考えると、 $\omega-3$ 脂肪酸の結合位置が現在見られた位置であるかは必ずしも自明では無い。

本研究は脂質メソ相で析出する比較的小さい結晶を扱う必要があることから、粘稠な媒体中に分散した微結晶を扱う技術も検討した。

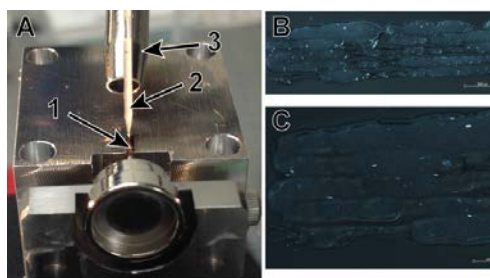


図5 静電分注器を使った微結晶のカプトン膜への塗布。A: 静電分注器の試料台周辺。(1) 試料ホルダーとして使用するカプトン薄膜、(2) 微結晶を分散した高粘稠媒体を収めたガラスノズル、(3) 調湿ガス吐出口。カプトン膜保持台とガラスノズル間の電位差とガラスノズルに繋がるシリンジポンプの加圧で粘稠媒体を薄膜として塗布する。B: カプトンフィルム(4x1 mm²)に塗布した微結晶を分散した高粘稠媒体の偏光顕微鏡写真。C: Bの左端の拡大図。白く見える粒子が微結晶(長さ約20 μm 、太さ約2 μm)。結晶密度は約 $1.7 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ 、面積あたりの結晶数は $0.014 \mu\text{m}^{-2}$ 。

この検討では浜松ナノテクノロジー社製の静電分注器を改造した機器を用いた。微結晶を分散する高粘稠媒体の種類に応じて最適化した運転パラメータを用い厚さ100 μm 弱で高粘稠媒体をカプトンフィルム上に塗布できる。厚さを制御して塗布することにより、X線光軸に沿った結晶の重なりを抑制でき、微結晶からのX線結晶回折像測定の効率の改善が期待できる。

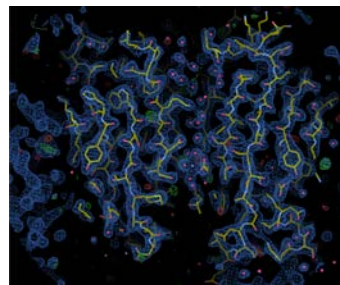


図6 静電分注器で分注した微結晶のX線回折強度データで解析したモデルタンパク質の2.2 Å分解能の構造(R_{free} : 0.23)。

図6にSPring-8/BL32XUの自動データ測定システムZoo¹⁴を使い42個の微結晶から測定したX線回折強度データを用い解析したモデルタンパク質の構造解析例を示す。高粘稠媒体の厚さをさらに薄くすることで、一層のサンプル消費量の抑制、バックグラウンド散乱の抑制による高シグナルノイズ比データの収集への貢献が期待される。

- 1 Kanaoka, Y. & Boyce, J. A. *Allergy, asthma & immunology research* **6**, 288-295 (2014).
- 2 Smith, W. L., Urade, Y. & Jakobsson, P. J. *Chem Rev* **111**, 5821-5865 (2011).
- 3 Coulombe, F. *et al. Immunity* **40**, 554-568, (2014).
- 4 Saino, H. *et al. The Journal of biological chemistry* **286**, 16392-16401 (2011).
- 5 Ago, H. *et al. Nature* **448**, 609-612 (2007).
- 6 Martinez Molina, D. *et al. Nature* **448**, 613-616 (2007).
- 7 Rinaldo-Matthis, A. *et al. Biochemistry*, doi:10.1021/bi201402s (2012).
- 8 MacDonald, C. A., Bushnell, E. A., Gauld, J. W. & Boyd, R. J. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **16**, 16284-16289 (2014).
- 9 Ago, H. *et al. Journal of biochemistry* **153**, 421-429 (2013).
- 10 Hanson, M. A. *et al. Structure* **16**, 897-905 (2008).
- 11 Quraishi, O., Mancini, J. A. & Riendeau, D. *Biochemical Pharmacology* **63**, 1183-1189 (2002).
- 12 Pettersson, P. L., Thoren, S. & Jakobsson, P. J. *Methods Enzymol* **401**, 147-161 (2005).
- 13 Thoren, S. *et al. The Journal of biological chemistry* **278**, 22199-22209 (2003).
- 14 Yamashita, K., Hirata, K. & Yamamoto, M. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **74**, 441-449 (2018).

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) Yamamoto, M.; Hirata, K.; Yamashita, K.; Hasegawa, K.; Ueno, G.; Ago, H.; Kumasaka, T., Protein microcrystallography using synchrotron radiation. *Iucrj* 4, 529-539, doi:10.1107/S2052252517008193 (2017). 査読あり。

(2) Hasegawa, K.; Yamashita, K.; Murai, T.; Nuemket, N.; Hirata, K.; Ueno, G.; Ago, H.; Nakatsu, T.; Kumasaka, T.; Yamamoto, M. Development of a dose-limiting data collection strategy for serial synchrotron rotation crystallography. *J Synchrotron Radiat* 24, 29-41, doi:10.1107/S1600577516016362 (2017). 査読あり。

[学会発表] (計1件)

(1) Yamamoto, M.; Ago, H.; Hirata, K.; Yamashita, K.; Ueno, G.; Kubo, M.; Baba, S.; Hasegawa, K.; Kumasaka, T.; Shimada, A.; Shinzawa-Itoh, K.; Tsukihara, T.; Yoshikawa, S.; Suga, M.; Akita, F.; Shen, J.-R. Fixed target serial crystallography at SACLA, American Crystallographic Association 67th Annual Meeting, 29/May/2017, New Orleans(米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吾郷 日出夫 (AGO, Hideo)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・専任研究員

研究者番号：70360477