

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18770096

研究課題名 (和文) ヒト脳由来環状化ヌクレオチドホスホジエステラーゼの構造機能解析

研究課題名 (英文) Crystal structure of 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase, CNPase from human brain.

研究代表者

阪本 泰光 (SAKAMOTO YASUMITSU)

岩手医科大学・薬学部・助手

研究者番号：00349036

研究成果の概要：

2005 年に我々が決定したヒト脳由来環状化ヌクレオチドホスホジエステラーゼの触媒フラグメント (CNP-CF) の立体構造を基にした基質候補の推定と基質認識及び反応機構の解明を行った。また、Kozlov らにより上記の立体構造をモデル構造にしたラット CNPase、金魚 RICH の立体構造が NMR により解明され、これらの立体構造との比較を通じて、基質認識について解析についても行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	360,000	3,960,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：CNPase、X線結晶構造解析、構造生物学

1. 研究開始当初の背景

ヒト脳由来環状化ヌクレオチドホスホジエステラーゼ (CNPase: 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase) は高等脊椎動物の中樞神経系の脳白質の膜構造に固く結合し、主に中樞神経系の髄鞘を形成する細胞であるオリゴデンドロサイトの細胞質に存在する酵素である。これまでに、CNPase 遺伝子をノックアウトしたマウスや CNPase を過剰発現させたマウスなどの実験結果から、中樞神経の維持機構に関与していることが示唆されている。また、CNPase はオリゴデンドロサイトに局在することから、オ

リゴデンドロサイトのマーカータンパク質として広く臨床検査、神経研究に用いられている。しかしながら、その生理学的役割については様々なアプローチが試みられているにもかかわらず不明な点が多く、疾患との関連では多発性硬化症との関連が示されており、CNP の分子レベルでの機構解明が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、CNPase の立体構造を明らかに

し、分子レベルで明らかにされる基質認識、反応機構を通じて生体内における CNPase の機能に関する知見を得ることを目的とした。また、疾患との関連から、特にヒトの CNPase を標的として立体構造解析を行うことが重要である。

X 線結晶構造解析により明らかにした CNP 触媒フラグメント (CNP-CF) の構造を基にしたドッキングシミュレーション及び膜結合ドメインを含む CNP 全長の X 線結晶構造解析を行い、基質認識、反応機構から CNPase の生体内での役割を解明する知見を得ることを目的とする。

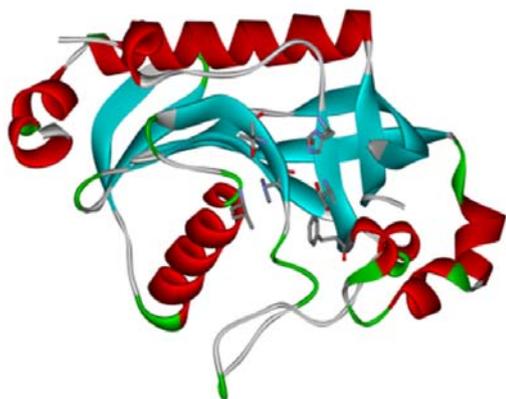
3. 研究の方法

CNP 全長の立体構造解析には X 線結晶構造解析を行い、基質認識機構、触媒機構の解明を目指して、CNP 触媒フラグメントと基質とのドッキングシミュレーションと、我々が解いた CNPase の結晶構造 (PDBID:1W0J)、この構造をモデル構造として解かれたラット CNPase の溶液構造、金魚 RICH の溶液構造を用いてこれまでに構造が解かれていない 5 種の CNPase のホモロジーモデリングを行った。

4. 研究成果

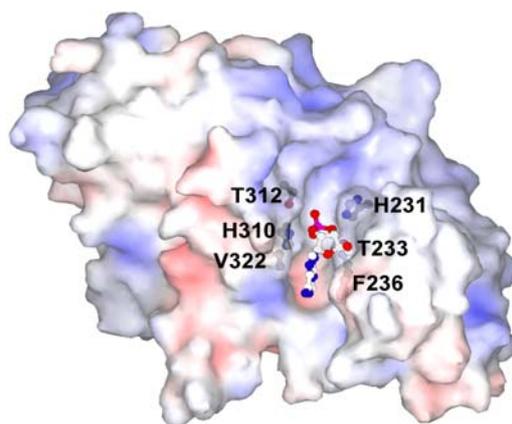
CNPase の立体構造から、2H ホスホジエステラーゼスーパーファミリーに属する酵素で保存されている HXTX モチーフの立体配置が明らかにされ、CNPase の触媒残基及び反応機構に関する知見を得ることができた。

(図 1 : CNP-CF の立体構造)



さらに、CNPase の立体構造を基にして、基質類似体 (2', 3' -cyclicAMP) とのドッキングシミュレーションを行った。その結果、疎水性アミノ酸残基である 236 番のフェニルアラニンと 322 番のバリン残基による疎水性相互作用が基質認識に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(図 2 : CNP-CF の立体構造に基質を結合させたモデル構造)



また、我々が構造決定しヒト CNPase 触媒フラグメントの構造をモデル構造として、ラットの CNPase (相同性 81%) と金魚の RICH (相同性 31%) の溶液構造が NMR により解かれた。

(Kozlov et al. *Febs J.* v274, 1600-9, 2007)

我々が構造決定したヒト CNPase の結晶構造 (PDBID:1W0J)、Kozlov らが決定したラット CNPase の溶液構造 (PDBID:2ILX)、金魚 CNPase のこれらの立体構造情報を利用したホモロジーモデリングの手法により、立体構造解析がされず、アミノ酸配列が公開されている 5 種 (*bovine* (相同性 90%)、*horse* (相同性 73%)、*pongo* (相同性 89%)、*mouse* (相同性 71%)、*salmon* (相同性 46%)) の CNPase の立体構造予測をホモロジーモデリングソフトウェア *biskit* (<http://biskit.pasteur.fr/>) により行った。(図 3 : モデル構造、結晶構造、溶液構造の重ね合わせ)



これらのモデル構造と実験的に決定した結晶構造、溶液構造比較解析を行った。構造アライメントの結果、2H ホスホジエステラーゼスーパーファミリーに存在する HXTX モチーフはモデル構造構造上と実験的に決定した構造上で同じ位置に保存されていることが分かった。しかしながら、ヒト CNPase の立体構造上から予測された基質認識における疎水性相互作用に関与すると考えられる V322 と F236 については、*salmon* 以外では立体構造上、完全に保存されていたが、*salmon* では *human* の V322 に相当するアミノ

酸 216 番がバリンではなく、グルタミンであった。同じ魚類の *goldfish* RICH では、他の種の CNPase と同様にバリンであったことから、基質特異性が異なる可能性がある。しかしながら同じ魚類である金魚では他の CNPase と同様にバリンが保存されており、*salmon* に特異的な変異であるのか、また、実際に基質特異性が異なるのか、形質にどのように影響を及ぼすのか今後の研究を進めるにあたり興味深い結果が得られた。(未発表)

また、触媒フラグメントのみならず、CNPase 全長の立体構造解明を行うため、全長の CNPase 遺伝子を導入した発現プラスミドを用いた発現系を導入したが、X 線結晶構造解析が可能な CNPase 全長の結晶は得られておらず、今後の課題である。

CNPase の機能に関しては長年もの間、不明であったが 2008 年に *in vivo* で、CNPase が tRNA のスプライシングに関与するという報告があり、本研究による成果が、CNPase による tRNA スプライシング機構の分子レベルでの解明に役立つと考えられる。

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 3 件)

Structural comparison analysis of 2H phosphodiesterase family proteins.

Nucleic Acids Symp. Ser.

51:447-448., 2007

Sakamoto Y, Tanaka N, Ichimiya T, Kurihara T, Nakamura T.K

査読なし

Crystal structure of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Plasmodium falciparum* complexed with a selective inhibitor.

Photon Factory Activity Report

PART B 24:216, 2006

Tanaka N, Kusakabe Y, Aoki K, Sakamoto Y, Tsunoda M, Kitagawa Y, Nakamura T.K

査読なし

Crystal Structures of Mouse Autocrine Motility Factor Complexed with Various Carbohydrate Phosphate

Photon Factory Activity Report

PART B 23:195, 2006

Tanaka N, Naba N, Shiraiwa K, Kusakabe Y,

Aoki K, Tsunoda M, Sakamoto Y, M, Kitagawa Y, Nakamura T.K
査読なし

[学会発表] (計 4 件)

ヒト由来環状化ヌクレオチドホスホジエステラーゼの立体構造

2009.3

第 26 回 PF シンポジウム

つくば

阪本泰光、田中信忠、一宮智美、野中孝昌、栗原正、中村和郎

Structural Comparison Studies For 2H Phosphoesterase Superfamily Proteins

2007.11

The 8th Conference of the Asian

Crystallographic Association

Taipei

Sakamoto Y, Tanaka N, Ichimiya T, Kurihara T, Nakamura T.K

Structural Comparison Analysis of 2H phosphodiesterase family proteins

2007.11

5th International Symposium on Nucleic

Acids Chemistry

Tokyo

Sakamoto Y, Tanaka N, Ichimiya T, Kurihara T, Nakamura T.K

医薬応用を目指した構造解析と構造機能解析支援のためのバイオインフォマティクス
2007.2

タンパク 3000 総合シンポジウム

東京

田中信忠、日下部吉男、阪本泰光、由良敬

[図書] (計 1 件)

看護学学習辞典 第 3 版 2008 学習研究社
相川直樹, 大橋優美子, 菅原スミ, 吉野肇
—阪本泰光他 (全 1698 ページ)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪本 泰光 (SAKAMOTO YASUMITSU)

岩手医科大学・薬学部・助手

研究者番号: 00349036