

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570153

研究課題名(和文) ヘリックスの構造変化が不可欠な活性型プロスタグランジンE2合成酵素1の構造研究

研究課題名(英文) Crystal structure determination of microsomal prostaglandin E2 synthase 1 with the open active site.

研究代表者

吾郷 日出夫(Ago, Hideo)

独立行政法人理化学研究所・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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性脂質メディエータを産生するプロスタグランジンE2合成酵素を脂質二重膜を模した環境で結晶化し、X線結晶構造解析に使用できる結晶を得た。また、同じタンパク質ファミリーに属し、構造既知のロイコトリエンC4合成酵素の活性部位をターゲットとした阻害剤スクリーニングで得られた候補化合物の中から、MPGES1の酵素活性を抑制する有機低分子を見出した。これらの結果から、MPGES1の分子機能を探る実験を行うことが可能になった。

研究成果の概要(英文)：Human membrane protein MPGES1, which is a responsible protein for biosynthesis of prostaglandin E2 as a proinflammatory lipid mediator, was crystallized in a lipidic meso crystallization method. MPGES1 in the lipidic meso phase could be a structure more similar to a structure in cell membrane due to the similarity between the structures of the lipidic meso phase and cell membrane. The inhibitors for MPGES1 were found out from the candidates from the in silico screening targeted to the active site of leukotriene C4 synthase belonging in the same protein family with MPGES1. These results will contribute the elucidation of the structure basis of molecular functions of MPGES1.

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：膜タンパク質 X線結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質 MPGES1 は、炎症、発熱、痛みの原因である内因性の生理活性脂質 PGE<sub>2</sub> を生合成する。そのアミノ酸配列の相同性から、2007 年に我々が構造解析に成功した膜タンパク質 LTC<sub>4</sub>S を含む Membrane associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG)ファミリーに属す。MPGES1 の発現は、炎症性の刺激、たとえばインターロイキン 1 $\beta$  やリポポリサッカライドで誘導され、抗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。癌、関節リュウマチ、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、MPGES1 と MPGES1 の基質 PGH<sub>2</sub> を生産するプロスタグランジン H<sub>2</sub> 合成酵素 2(COX2)は、共役して PGE<sub>2</sub> を患部で生合成している。

MPGES1 は、癌の発症と炎症性疾患の病態に関わっている。炎症組織で発現が誘導される COX2 と MPGES1 が、共役して生合成する PGE<sub>2</sub> は、癌細胞の増殖と生き残りに関与する。PGE<sub>2</sub> 存在下の癌細胞は、より早く増殖し、アポトーシスが抑制され、より高い移動能と浸潤能を獲得し、免疫抑制作用のある細胞を利用して免疫細胞からの攻撃を免れる。実際 MPGES1 のノックアウトマウスは、癌の成長が抑制される。さらに PGE<sub>2</sub> は、炎症と痛み、リュウマチ、発熱などで、主要な役割を担っている。これらの研究成果から、MPGES1 は、抗がん剤開発と抗炎症薬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。

MPGES1 を作用タンパク質とする、抗炎症薬の開発が切望されている。関節リュウマチ、変形性関節症を含む炎症性疾患と、その痛みの治療に、非ステロイド性抗炎症剤 (NSAID) が用いられる。消化管の潰瘍や出血など NSAID の重い副作用は、COX2 選択的 NSAID の開発で克服されたかに見えたが、大腸癌抑制効果に関する長期試験で、心筋梗塞などの発症率を高める別の副作用が、COX2 選択的 NSAID に見つかった。これは COX2 の選択的阻害が、血栓溶解を促すプロスタサイクリンの生産抑制を起こすためである。炎症性の情報伝達物質である PGE<sub>2</sub> の生産を、直接抑える抗炎症薬の開発は、患者の生活の質を格段に高める。

MPGES1 が関わる癌の浸潤と転移は、癌研究の最先端である。癌細胞の組織への浸潤や転移をコントロールする手段を確立することで、外科手術による根治治療がより容易になる。MPGES1 の阻害剤は、MPGES1 が関与する癌の増殖、浸潤、宿主免疫からの回避の分子機構を明らかにする強力なプロ

ブである。

本研究は、ヒト疾病に直接関わるヒト由来膜タンパク質の立体構造研究を押し進めるという点において、構造生物学的観点また医学薬学的観点からも、極めて特徴的で独創的な取り組みである。研究開始当初、ヒト由来膜タンパク質の構造生物学は黎明期にあり、立体構造決定に至ったヒト由来膜タンパク質は 15 種程しかなかった。MPGES1 は、活性部位が閉じた不活性型の構造のみ知られていたが、基質 PGH<sub>2</sub> から PGE<sub>2</sub> への異性を触媒する活性型構造は知られていなかった。

## 2. 研究の目的

癌や炎症性疾患の発症に直接関わる、活性型 MPGES1 の活性部位の構造を X 線結晶構造解析で解明し、PGE<sub>2</sub> 生合成を担う完全な構造基盤の提供が、構造生物学的観点での本研究の目的であった。医学薬学的観点では、我々誰もが罹りうる疾病の分子病理生物学的理解と、治療法開発の一助となることが、本研究の目的であった。今までにない作用機構によって、副作用が格段に少ない抗癌剤や抗炎症剤の創薬基盤の提供につながるからである。MPGES1 阻害剤は、癌の増殖、組織浸潤と転移の制御による、新たな治療の可能性を癌患者に示すと考えられる。また MPGES1 阻害剤は、NSAID の重篤な副作用を克服し、患者の生活の質を高める事が期待されている。

## 3. 研究の方法

課題を達成する上で、高分解能まで X 線を回折する結晶を作る条件を検討する事が不可欠である。そのための試料として、本研究課題の開始以前に構築した分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を異種宿主とする発現系を使い、組換え MPGES1 を発現した。ガラスビーズを用いた細胞破碎と破碎上清の超遠心で MPGES1 を含む膜画分を調整した。膜画分は、膜タンパク質精製の定法に従い界面活性剤で可溶化し、カラム精製によって、結晶化で用いる MPGES1 を得た。これらの過程で、良好な MPGES1 の結晶を得るため、(1) 精製方法の改良、(2) *in meso* 結晶化、(3) 阻害剤探索について検討を行った。

## 4. 研究成果

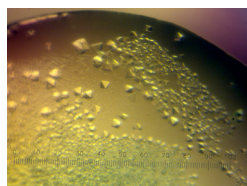
### (1) 精製方法の改良

本研究開始以前のカラム精製では、S-ヘキシルグルタチオンアガロースゲルと TALON によるアフィニティー精製、ゲルろ過精製の順で精製を行っていた。この精製法で、SDS ゲル電気泳動で MPGES1 が単一バンドとなる純度まで精製可能であった。しかし、精製サン

プルは、260 nm と 280 nm の紫外吸収の比 ( $A_{260/280}$ ) が 0.6 以上と大きく、発色団をもつ夾雑物もしくは、限外濾過膜を使った濃縮による界面活性剤ミセルの存在が懸念された。 $A_{260/280}$  が安定して 0.55 程度となるよう精製法を検討し、精製の最終に陽イオン交換カラムを追加した。この結果、結晶化直前の濃縮試料の  $A_{260/280}$  が、0.55 から 0.57 ほどで安定した。

溶液中で構造の均一性のより高い MPGES1 を使用することが、良好な結晶を得る上で重要である。MPGES1 の精製試料を Blue Native PAGE で分析すると、66 kDa と 240 kDa の 2 つの分子量の位置に泳動バンドが見られ、ゲルろ過カラムから結晶化に至る過程で、MPGES1 が会合している

可能性があった。添加物を検討する中で、グルタミン酸とアルギニンを含む系で精製した試料で、これまでとは外形の異なる結晶が成長した (図 1)。この結晶の空間群は  $P2_12_12_1$ 、格子定数は  $a = 142.8 \text{ \AA}$ ,  $b = 143.0 \text{ \AA}$   $c = 142.8 \text{ \AA}$  であった。溶媒含量は、非対称単位に含まれる MPGES1 の三量体が 4 つの時 0.6 であった。回折強度の異方性は小さいが、回折分解能  $9 \text{ \AA}$  程度であった。



(図 1) 結晶化条件は、28% (w/v) PEG600, 0.05 M HEPES-NaOH(pH7.8), 0.001M  $ZnSO_4$ .

## (2) *in meso* 結晶化

生体膜から界面活性剤で可溶化した膜タンパク質は、一般的に生体膜中に比べ不安定である。この不安定さが高品質の結晶を作る上での問題の一つである。この問題を軽減する方法として、界面活性剤存在下で可溶化・精製した膜タンパク質を、脂質二重膜を模倣した脂質のキュービック相に再構成し、これを結晶化に供する方法 (*in meso* 結晶化) がある。MPGES1 でこの *in meso* 結晶化を行った。

結晶を得る上で重要であった点は、モノオレインのキュービック相にドデシルマルトシド存在下で精製した MPGES1 を再構成するとき、一度、ドデシルマルトシドからデシルマルトースネオペンチルグリコールに界面活性剤を交換してから、固体のモノオレインと混合する事であった。精製では始めに上記

(1) に従い、ドデシルマルトシドを使い、S-ヘキシルグルタチオンアガロースゲル、TALON、ゲルろ過、陽イオン交換樹脂の順で精製を進めた。0.01 % (w/v) のデシルマルトースネオペンチルグリコール (CMC:  $\approx 0.0034 \%$  (in  $H_2O$ )) を加えた陽イオン交換樹脂の溶出液を、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$  で一晩静置し、次いでデシルマルトースネオペンチルグリコールを含む溶液で平衡化したゲルろ過カラムで最終の精製を行った。40 ミリグラム程度に濃縮した MPGES1 水溶液とモノオレインを、重量

比で 4:6 で混合し、キュービック相のモノオレイン中に MPGES1 を再構成した。モノオレインキュービック相に再構成した MPGES1 の 50 nL に対し約  $1 \mu\text{L}$  の沈殿剤溶液を添加し、

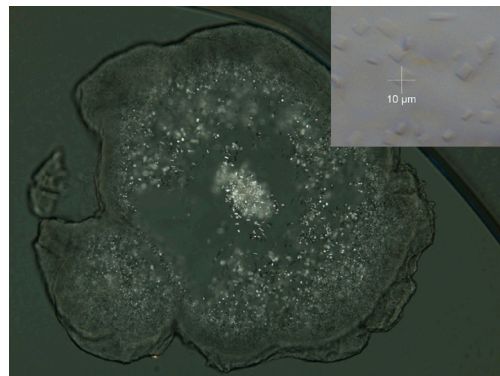


図 2 *in meso* 結晶化で成長した MPGES1 の結晶。右上のサブパネルは SPring-8/BL32XU で撮影した結晶の高倍率写真。

$20 \text{ }^\circ\text{C}$  で結晶化した。図 2 の写真に示すように、ほとんどの結晶の大きさは  $10 \mu\text{m}$  ほどであった。この結晶は SPring-8/BL32XU で行った常温 *in situ* X線回折実験で  $3.7 \text{ \AA}$  程度の回折点を与えた。

## (3) 阻害剤の探索

タンパク質のゆらぎを抑制する小分子が、タンパク質結晶の分解能向上に重要な役割を果たすことがある。また、MPGES1 の活性部位の構造は、電子顕微鏡による二次元結晶<sup>(1)</sup>と、2013 年にスウェーデンの研究グループによって決められた結晶構造<sup>(2)</sup>の間に違いがあり、活性部位に構造上のゆらぎがあることが懸念された。そこで、活性部位に結合する阻害剤を探索した。酵素阻害能は  $100 \mu\text{M}$  阻害剤存在下で MPGES1 に  $\text{PGH}_2$  を反応させて生じる  $\text{PGE}_2$  の量を、逆相カラムを使った HPLC で定量して求めた。阻害能を調べた化合物は、MPGES1 と同じタンパク質ファミリー MAPEG に属し、構造既知のロイコトリエン  $C_4$  合成酵素のグルタチオン結合部位を対象とした *in silico* スクリーニングで阻害活性を持つ可能性が示された低分子である<sup>(3)</sup>。この試験か

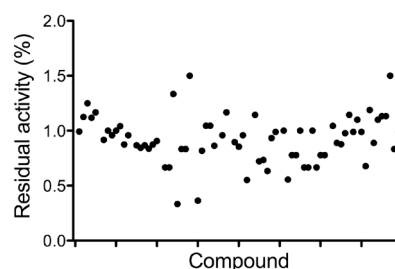


図 3 MPGES1 の阻害剤探索。各々の点は各々の化合物を添加した場合の MPGES1 の残存活性。

ら MPGES1 の酵素活性を 50 %以上抑制する化合物が二種類見つかった。

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

(2) Sjögren, T. *et al.* (2013) *Proc. Natl. Acad. USA* **110**, 3806-3811.

(3) Ago, H. *et al.* (2013) *J. Biochem.* **153**, 421-429.

まとめ 本研究課題によって、ヒト由来膜タンパク質 MPGES1 を、より生体膜に近いと考えられるモノオレインの二重膜中で結晶化させることが可能となった。この結晶は、界面活性剤存在下の結晶化に比べ、分解能に優れた結晶であった。また、MPGES1 の酵素活性を抑制する化合物が見出されたことから、この化合物を使い、MPGES1 との複合体構造解析等の機能と構造の相関を調べる足がかりが出来た。

## 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 1 件)

- ① Ago, H., Okimoto, N. Kanaoka, Y., Morimoto, G., Ukita, Y., Saino, H., Taiji, M., Miyano, M. A leukotriene C<sub>4</sub> synthase inhibitor with the backbone of 5-(5-methylene-4-oxo-4,5-dihydrothiazol-2-ylamino) isophthalic acid. 査読あり、Vol. 153, No. 5, 421-429, doi:10.1093/jb/mvt007.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Ago, H. "X-ray protein crystallography free from radiation damage at SACLA", The Sagamore XVII, 19th/Jul/2012 (Date, Hokkaido)

## 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・放射光科学総合研究センター・専任研究員

研究者番号：70360477

### (2) 連携研究者

齊野 廣道 (SAINO, Hiromichi)

青山学院大学・理工学部・助教

研究者番号:40525549