

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580078

研究課題名(和文) 昆虫不妊化剤開発を指向したプロスタグランジン合成酵素の機能解析

研究課題名(英文) Characterization of prostaglandin-producing enzyme aiming for insect sterilization

## 研究代表者

山本 幸治 (Yamamoto, Koji)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00346834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：プロスタグランジン(PG)は、必須脂肪酸から生合成される生理活性物質である。昆虫をはじめとする無脊椎動物におけるPGに関する研究は、哺乳類と比較して少ない。本研究では、カイコ由来PG合成酵素(PGES)の構造と機能について調査した。PGES組換え酵素は、グルタチオン存在下にてPGEを合成した。PGESの全体構造を解析したところ、PGESはホモダイマーを形成していた。各モノマーは、9本のアルファヘリックスならびに4本のベータストランドより構成されていた。立体構造解析ならびに部位特異的のアミノ酸置換法によりTrp39そしてGln63はPGES活性発現に重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Prostaglandins (PGs) are synthesized from arachidonic acid and influence a variety of physiological and pathological processes in mammals. Knowledge on role and synthesis of PG in insect are limited, compared to mammals. In this study, we identified PG synthase of *Bombyx mori* (PGES) and found that PGES produces E-type of PG (PGE). Since we were interested in the active sites in PGES, we determined crystal structure of PGES. PGES exists as homodimer and each monomer contains 10 alpha-helices and 4 beta-strands. By using site-directed mutagenesis, we identified the amino acid residues (Trp39 and Gln63) involved in catalytic function.

研究分野：応用昆虫

キーワード：プロスタグランジン プロスタグランジン合成酵素

## 1. 研究開始当初の背景

プロスタグランジン (PG) は、必須脂肪酸 (アラキドン酸) から生合成される生理活性物質である。哺乳類において、筋収縮、血管拡張、発熱・痛覚の伝達等さまざまな生理機能の調節に関与している。一方、昆虫をはじめとする無脊椎動物における PG の代謝・合成に関する研究は、少ないのが現状である。最近、申請者らはカイコより PG 合成酵素を発見し、E 群の PG (PGE) を選択的に合成することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究において、カイコ PGE 合成酵素 (PGES) の基質反応様式、阻害機構そして立体構造解析など構造機能相関を調査する。以下にあげる項目を本研究の主たる目的とする。

(1) PGES を結晶化し、PGES の立体構造を決定する。基質結合に重要なアミノ酸残基を同定する。

(2) 阻害剤が PGES の酵素反応に及ぼす影響について調べる。

(3) カイコ体内における PGES mRNA ならびにその翻訳産物の挙動を調査する。

## 3. 研究の方法

本課題の研究方法を以下に述べる。

### (1) PGES の構造活性相関解析

PGES 単独あるいは基質-PGES 複合体の結晶化条件を検索する。得られた結晶を用いて、X線結晶構造を解析する。また、部位特異的アミノ酸置換法により PGES 変異体を作製し、アミノ酸変異が基質類の分解・代謝に与える影響を検討し、その作用機構を酵素の反応速度論的に解析する。

### (2) PGES が触媒する反応の阻害様式

PGES の阻害剤を使用し、PG の分解・代謝に与える影響を検討し、その阻害機構を酵素反応速度論的に解析する。

### (3) PGES の誘導機構

PGES の挙動を解析することを目的とする。PGES の mRNA レベルでの誘導機構についてはリアルタイム PCR を、そしてタンパク質レベルでは免疫染色法を用いて調査する。

## 4. 研究成果

### (1) PGES の構造活性相関解析

大腸菌にて作製した PGES 組換えタンパク質を硫酸分画、陰イオン交換クロマトグ

ラフィーそしてゲル濾過クロマトグラフィーの各手法を用いて電気泳動的に均一に精製した。精製後に、PGE 合成活性を酵素速度論的に解析した。[14C]PGH を基質とし、薄層クロマトグラフィーにより分析したところ、PGES はグルタチオン (GSH) 存在下にて PGE を合成した。一方、PGD ならびに PGF の合成は見られなかった。

結晶化は、sitting-drop 蒸気拡散法により行った。これら結晶を用いて X 線回折実験を行った。分子置換法により位相を決定し、全体構造を解析したところ、PGES はホモダイマーを形成していた。各モノマーは、9 本のアルファヘリックスならびに 4 本のベータストランドより構成されていた。GSH 結合サイトも保存されており、構成アミノ酸残基 (Tyr8, Leu14, Trp39, Lys43, Gln50, Met51, Gln63, Ser64) をそれぞれ部位特異的アミノ酸置換法により Ala に変異した。活性に与える影響を検討した結果、Trp39 ならびに Gln63 を Ala に変換した変異体において顕著な活性減少が見られた。以上の構造解析そして部位特異的アミノ酸置換法の結果より、上記のアミノ酸残基は PGES 活性発現に重要であることが示唆された。

### (2) PGES が触媒する反応の阻害様式

Prostaglandin synthase 阻害剤である 2-(2-benzothiazolyl)-5-styryl-3-(4-phthalhydrazidyl)tetrazolium chloride (BSPT) との相互作用部位を調査した。その結果、PGES 構造中の Tyr8, Lue14, Tyr107, Lys114, Val155, Met159, Glu159, Glu203 の各残基の結合への関与が示唆された。

### (3) PGES の誘導機構

PGES mRNA は、カイコ組織中に広く存在していることが分かった。

## 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 9 件)

(1) Yamamoto K, Usuda K, Kakuta Y, Kimura M, Higashiura A, Nakagawa A, Aso Y, Suzuki M: Structural basis for catalytic activity of a silkworm Delta-class glutathione transferase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820, 1469-1474 (2012) (査読あり)

(2) Kamita SG, Yamamoto K, Dadala MM, Pha K, Morisseau C, Escaich A, Hammock BD: Cloning and characterization of a microsomal epoxide hydrolase from *Heliothis virescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43, 219-228 (2013) (査読あり)

(3) Yamamoto K, Higashiura A, Suzuki M, Aritake K, Urade Y, Uodome N, Nakagawa A: Crystal structure of a *Bombyx mori* sigma-class glutathione transferase exhibiting prostaglandin E synthase activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3711-3718 (2013) ( 査読あり )

(4) Yamamoto K, Suzuki M, Higashiura A, Aritake K, Urade Y, Uodome N, Hossain MDT, Nakagawa A: New insights into the catalytic mechanism of *Bombyx mori* prostaglandin E synthase gained from structure-function analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 440, 762-767 (2013) ( 査読あり )

(5) Hossain MDT, Nagaoka S, Yamamoto K: Identification of residues essential for catalytic activity of a *Bombyx mori* arginase. *Journal of Insect Biotechnology & Sericulture*, 83, 47-51 (2014) ( 査読あり )

(6) Yamamoto K, Higashiura A, Hossain MDT, Yamada N, Shiotsuki T, Nakagawa A: Structural characterization of the catalytic site of a *Nilaparvata lugens* delta-class glutathione transferase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 566, 36-42 (2014) ( 査読あり )

(7) Hossain MDT, Yamada N, Yamamoto K: Glutathione-binding site of a *Bombyx mori* theta-class glutathione transferase. *PLoS One*, 9, e97740 (2014) ( 査読あり )

(8) 山本 幸治: 昆虫グルタチオン転移酵素群の機能解析と応用. *蚕糸・昆虫バイオテック*, 83, 5-10 (2014) ( 査読なし )

(9) 山本 幸治: 特集「昆虫由来酵素・タンパク質の機能解析とその応用」にあたって. *蚕糸・昆虫バイオテック*, 83, 3 (2014) ( 査読なし )

[ 学会発表 ] ( 計 8 件 )

(1) Yamamoto K: Novel Glutathione Transferase in Lepidoptera. 4th international symposium on pesticide and environmental safety, 2012 年 9 月 17 日, Beijin (China)

(2) 山本幸治, 臼田一弘, 角田佳充, 木村誠, 東浦彰史, 中川敦史, 鈴木守: デルタクラス・グルタチオン転移酵素の機能と構造. 日本結晶学会年会, 2012 年 10 月 25 日, 仙台

(3) Yamamoto K: Crystal structure and characterization of glutathione transferase of the silkworm. 7th Wild Silkworm and Silk,

2012 年 11 月 23 日, Khon Kaen (Thailand)

(4) 山本幸治, 伴野豊, 麻生陽一: カイコ・ステロイド還元酵素の X 線立体構造解析. 日本蚕糸学会, 2013 年 3 月 19 日, つくば

(5) Yamamoto K, Suzuki M, Higashiura A, Nakagawa A: Crystal structure of a *Bombyx mori* omega-class glutathione transferase. The 12th conference of the asian crystallographic association, 2013 年 12 月 9 日, Beijin (Hong Kong)

(6) 山本幸治: プロスタグランジン E 合成酵素の立体構造と機能. 第 7 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2013 年 9 月 26 日, つくば

(7) 山本 幸治, 東浦彰史, 山田直隆, 中川敦史: トビイロウンカ由来 Delta-class グルタチオン転移酵素の X 線立体構造解析. 日本農芸化学会西日本支部講演会, 2014 年 09 月 19 日, 佐賀

(8) Yamamoto K: Structural basis of catalytic mechanism of *Bombyx mori* prostaglandin E synthase. 9th International Workshop on the Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera, 2014 年 08 月 22 日, Greece

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]  
○出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 ( 計 0 件 )

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[ その他 ]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 幸治 ( Kohji  
Yamamoto )  
九州大学・大学院農学研究院・助教  
研究者番号：00346834

(2)研究分担者

鈴木 守 ( Mamoru Suzuki )  
大阪大学・たんぱく質研究所・准教授  
研究者番号： 40280507

有竹 浩介 ( Kousuke Aritake )  
公益財団法人大阪バイオサイエンス研究  
所・分子行動生物学部門・研究員  
研究者番号： 70390804

東浦 彰史 ( Akifumi Higashiura )  
大阪大学・たんぱく質研究所・助教  
研究者番号： 90598129

(3)連携研究者

該当ありません。