最近の研究から

プロスタグランジン D₂ 合成酵素

高い反応特異性と効率を備えた新奇的なグルタチオン転移酵素

日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所 吾郷日出夫, 宮野雅司

Hideo AGO and Masashi MIYANO: Structural Basis of Specific and Efficient Catalysis in Hematopoietic Prostaglandin D Synthase as an Glutathione S-Transferase.

Hematopoietic prostaglandin (PG) D synthase is the key enzyme for production of the D and J series of prostanoids in the immune system and mast cells. We crystallized the recombinant enzyme, and determined the three-dimensional structure of the enzyme complexed with glutathione at 2.3 Å resolution. The enzyme is the first member of the sigma class glutathione S-transferase (GST) from vertebrates and possesses a prominent cleft as the active site which is never seen among other members of the GST family. The unique 3-D architecture of the catalytic cleft leads to the putative substrate binding mode and its catalytic mechanism, responsible for the specific conversion of PGH₂ to PGD₂.

It is not of any important where the guess comes from ; it is only important that it should agree with experiment, and that it should be as definite as possible. R. Feynman

1. はじめに

生体膜を構成するトリグリセリドから PLA₂によって切り出されたアラキドン酸は多くの脂質メディエーターの前駆体である。¹⁾ このアラキドン酸カスケードは、病気になると悪いところが痛みそして発熱する普通症状に関わっており、古くから医薬品開発分野では重要なターゲットとなってきた。²⁾ アスピリン、インドメタシンなどは解熱、鎮痛薬として用いられる代表的な非ステロイド抗炎症剤 NSAID であり、プロスタグランジン (PG) H₂ シクロオキシゲナーゼ (COX) を阻害し PG H₂ 産生を止めそれから派生するすべてのプロスタグランジン類の生成を押さえて解熱、鎮痛という薬理作用を示す。COX によって生成した化学的に不安定な PG H₂ はさらにプロスタグランジン代謝に関わる特異的酵素群によって、発熱痛みを引き起こす PGE₂ 以外にも PGD₂, PGF_{2α}, プロスタサイクリン (PG) I₂, トロンボキサン (TX) A₂ などそれぞれに応じた多様な作用を持つプロスタグランジン類に転換される (図 1)。どちらの薬剤とも COX のサブタイプ I, II に選択性はなく³⁾ これ以外にも生体内タンパク質ターゲットである酵素あるいは受容体が知られており、治療薬としては特異性があまり高くない。非選択的 COX 阻害剤としていっさいのプロスタグランジン類生成をま

とめて止めてしまうので、胃壁からの出血などときには重篤な副作用として現れる。そこで炎症によって誘導される COX-II だけを阻害するというような選択性がある薬剤による副作用の低減、³⁾ さらには標的組織細胞に発

図 1 プロスタグランジン類の代謝経路。(Metabolic Pathway of Prostaglandins)。

現したプロスタノイド受容体に作用して必要な組織でのみ作用するような薬剤を開発することでいままでに考えられないような新たな治療効果を持った薬が開発されつつある。⁴⁾ こうした高い特異性をもつ薬剤のデザインにはターゲットであるこれらの代謝酵素, 受容体のサブタイプの違いさえ区別できるほど精度の高い原子レベルでの詳細な立体構造が大いなる助けとなる。³⁾ これまで多くの薬が開発されてきたプロスタグランジン類に関するタンパク質について, 受容体については言うまでもなく代謝酵素群の遺伝子が次々とクローニングされ遺伝子の配列が明らかになってきた。^{5), 6)} そこで, まだCOX 以外にはほとんど立体構造未知であるこれらのタンパク質の立体構造の解明がこれからの最先端科学の一つである医薬品開発に寄与することが大いに期待されている。^{3), 7)}

2. プロスタグランジン D₂ 合成酵素 (PGDS)

プロスタグランジン類のうち, PGD₂ は末梢血管拡張, 気管支収縮, 血小板凝集阻害, また中枢では, 睡眠誘導, 体温低下, 黄体ホルモン分泌抑制などの生理作用が知られている。^{8), 9)} PGD₂ はまた, 生体内でさらにPG J シリーズのPG J₂, Δ^{12} -PG J₂そして15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PG J₂へと転換される。¹⁰⁾ このうち Δ^{12} -PG J₂とPG J₂は腫瘍細胞の増殖を抑制することが知られている。¹¹⁾ また, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PG J₂は, 核内リセプターPPAR γ (peroxysome proliferator-activated receptor γ) の内因性リガンドと考えられており,¹²⁾ 脂肪細胞の分化誘導,¹³⁾ マクロファージの分化さらには酸化LDLの取り込みを促進し動脈硬化の引き金と考えられているマクロファージの泡沫化を引き起こす。¹⁴⁾ そして, 最近発売された血糖を下げる働きがあるとされるインシュリン抵抗性糖尿病の薬Troglitazone (商品名: ノスカル) がこのPPAR γ に対する強力なアゴニスト (アゴニストとは, 標的の受容体に結合して, 生体内にもとからあるホルモンなど本来のその受容体の内在性リガンドと同様の反応を引き起こす薬剤, cf. アンタゴニスト) であり,¹⁵⁾ この薬剤は応用上の重要性だけでなくすでにライフサイエンス研究の必須の道具として周辺研究分野の発展に寄与している。

生体内でPGH₂ からPGD₂へ異性化反応を触媒するのが

PGD 合成酵素 (PGDS) である。このPGDSにはまったく違った2種類の酵素が知られている。ひとつはリポカリン型PGDSであり,⁶⁾ もう一つは造血器型PGDSである。¹⁶⁾ タンパク質としてまったく別物である。

これらのPGDSは, それぞれ脳型, 脾臓型とも呼ばれていたように生体組織での発現の分布においても異なっている。造血器型酵素は, グルタチオン転移酵素 (GST) と相同性があり, 脊椎動物としては初めてのシグマクラスに属するGSTである。PGDSの構造研究を進めるなかで, ラット由来の組み換え体造血器型PGDSの結晶化に成功し, 結晶構造を解くことができた。¹⁷⁾ この結晶構造をもとにこれまでに立体構造が知られている哺乳動物のGSTとの比較において, PGH₂ からPGD₂への異性化を高効率かつ特異性高く触媒するシグマクラスGSTである造血器型PGDSについてその立体構造と触媒機能の特徴を考察する。

3. 造血器型 PGDS の結晶化と立体構造決定。

共同研究者である大阪バイオサイエンス研究所の金岡と裏出らは造血器型PGDSの遺伝子をラット脾臓からクローニングし, さらに大腸菌によって大量発現精製に成功した。¹⁷⁾ この組み換え体タンパク質を広範な結晶化条件検索とそれに続く結晶化条件の精密化によって, 補酵素であるグルタチオン存在下で三方晶系 (空間群P3₁21, $a = b = 56.5$ Å, $c = 233.4$ Å) の結晶解析品質の結晶を得た (図2A)。

組み換え体造血器型PGDSの結晶は単位胞の1軸が200 Åを越えており, 実験室のX線回折計の中分解能までのデータを使ってチメロサールとK₂PtCl₄の重原子誘導体による多重重原子同型置換法によって位相決定し立体構造を解いた。そして, KEK-PFで収集した精密化用ネイティブデータセットを使って分解能2.3 Åで構造精密化をした。現在のモデルはRファクターで20.4% (フリーRファクター 28.9%) である。

造血器型PGDSの構造決定に関して特筆することは, より高分解能での精密化によって中分解能では曖昧であった活性部位のクレフト上部の底を形成する2本のヘリックスをトレースし直し, 造血器型PGDSの構造を特徴

図2 A: ラット造血器型PGD合成酵素の結晶.B: 造血器型PGDS 2量体のステレオ図。(A: Crystal of Hematopoietic PGDS B: Stereo gram of a dimer of Hematopoietic PGDS.)

づける大きな特徴的活性クレフトのアーキテクチャーが明確になったことである。結果から見れば、この底の先端部分が溶媒マスク内に入ってしまう溶媒領域平滑化による位相改良と位相拡張によってこの部分の電子密度を切り捨てたことによる（詳細はすでに別のところに書いたのでそちらを参照されたい）。¹⁸⁾

この構造決定を進めるなかで最も腐心したことはいかにしてより正しい構造を得るかであり、モデルバイアスを少なくするために CCP4 の SigmaA 荷重をかけた構造因子で FFT 計算しこの電子密度図を使ってモデルの再構築を繰り返した。¹⁹⁾ Glusker が指摘しているように、より高分解能での解析で精密化パラメーターあたりの観測値（回折点）が増えて、モデルを組むときの任意性恣意性が減ったことも寄与しているだろう。²⁰⁾

実験データで可能な限りの正確なタンパク質モデルを組む努力と、組み上げたタンパク質モデルの信頼性を評価して正確さを向上する方法が多くの研究者によって精力的に追求されてきている。X-plor のように強力すぎる精密化ソフトウェアが一般化して単に R ファクターを下げるだけがモデルの構造をより正しくするための指標ではないことはこの 10 年来追求され、このソフトウェアの著者である Brünger により提案されたフリー R 値（ファクター）は R ファクターと併せて結晶構造解析のモデル構造の信頼性を評価するためのひとつの標準となっている。^{21), 22)} Huber たちによる Cambridge Structure Database の小分子結晶構造を基にした理想タンパク質構造辞書の更新、²³⁾ ProCheck などの部分構造正当性評価のソフトウェアの開発を含め、²⁴⁾ より正確な構造を得る努力は、構造決定によって得られた結晶構造をもとにしてタンパク質の機能を立体構造から議論するための必要欠くべからざる前提であり、造血管型 PGDS の立体構造決定において

も、間違ったモデル部分を除きそして正しい構造モデルに修正すればさらに新たな正しい構造が見えてくるのがフーリエ解析であるという当然のことが再確認された。¹⁸⁾ さらには、タンパク質のフォーディングを決めている非共有結合による原子間相互作用の議論の基本となるタンパク質の原子構造論が磐石な実験事実で統計的に議論できる基盤確立のためにも、Huber たちが用いた小分子有機化合物の X 線単結晶構造解析並みに、十分な数の測定回折データを使うことで化学構造による制約なしに精密化できる高分解能である 1.0 Å 以下理想的には 0.7 Å 程度での数十以上の原子分解能でのタンパク質結晶構造解析の集積が待たれる。これほどの分解能になれば温度因子の低い水素原子も X 線結晶構造解析結果だけで見えてくるのでタンパク質の原子構造論が飛躍的に進むことが期待できる。²⁵⁾

4. 造血管型 PGDS の立体構造の特徴.

ラット造血管型 PGDS の結晶は非結晶学的単位胞中に PGDS を 2 分子含む。この非結晶学的単位胞の 2 分子は非結晶学的 2 回対称によって関係づけられ、この 2 量体はきわめてコンパクト (5 × 5 × 6 nm) である (図 2B)。それぞれの PGDS 分子当たり 1 分子のグルタチオンが結合している。そして、立体構造既知の哺乳動物由来の GST と同じように、2 量体は、Phe48 を鍵とし、2 量体の対応するもう 1 分子の Asp130 の主鎖、そして Val91, Thr94, Leu127, Leu131, Tyr134, Phe141 の側鎖によって形成された相補的な鍵穴との疎水的相互作用によって保持されている (図 3A)。そして、結合グルタチオンの γ-グルタミン酸の α-アミノ基は 2 量体のもう 1 分子の PGDS 単分子からの Asp97 と塩橋している。これらの結果は、生体中でも 2 量体を形成して機能していることを強く示唆する。

図 3 A: 造血管型 PGDS の骨格。結合したグルタチオンは空間充填模型で表した。また 2 量体間相互作用に関係する F48 とその側鎖を受け入れる残基を串団子モデルで示した。片方についてはドット表面で疎水表面を示した。B. タンパク質のファンデルワールス表面を持った造血管型 PGDS の紐モデル。(A: Cartoon model of Hematopoietic PGDS dimer with CPK modeled bound glutathione molecules and the side chains of residues concerning with dimer interaction. B: Ribbon model of Hematopoietic PGDS monomer with van der Waals surface.)

図4 結合したグルタチオン分子のタンパク質との相互作用ダイアグラムとグルタチオン分子を除いたモデルでの差フーリエ電子密度のステレオ図。(Schematic diagram on the interaction of bound glutathione and hematopoietic PGDS, and stereo-gram of different Fourier map ($F_o - F_c$) of bound glutathione without the glutathione model.)

2量体間のタンパク質分子間相互作用において, 上記のようにシグマタイプである造血器型PGDSも含め哺乳動物由来GSTでは疎水表面の相補構造がみられるものの, 同じシグマタイプでも無脊椎動物イカ由来のGSTでは静電的相互作用によって2量体が維持されているという.²⁶⁾

造血器型PGDSはそのペプチド主鎖の折れ畳みは典型的なGSTフォールドに属する。GSTは特徴的ドメイン構造として, 4ストランドの β -シート1枚と短い α -ヘリックス3本からなる $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ モチーフをつくったN末ドメインと, 5本の α -ヘリックスだけからなるC末ドメインのふたつのドメインをもっている。造血器型PGDSでは, N末とC末のドメイン間に他のGSTにはない特徴的な大きい活性クレフトを形成している(図3B)。その, N末ドメイン側の β -シートの縁に補酵素であるグルタチオンが結合している。また, C末ドメインの長い2本の α -ヘリックスのうち, この広く深いクレフトの天井を形成している $\alpha 4$ ヘリックスの先にはペプチド主鎖の”ひねり”構造があり, ここにTrp104のインドール環が $\alpha 4$ ヘリックスの軸方向に横たわり活性クレフトの天板を形成している。そしてこのペプチド鎖の”ひねり”構造によって他のGSTより少ないアミノ酸残基で深く広いクレフトの構築を可能にしている。

造血器型PGDSに結合したグルタチオンの主鎖はN末ドメインの縁にある cis -コンフォーションを取っているIle51のペプチド主鎖と逆平行 β -シートを形成している(図4)。それ以外にも多くの水素結合, 塩橋がグルタチオンのタンパク質への結合に寄与している。酵素反応機構を考える上で注目すべき点は, 酵素活性の触媒原子と考えられているグルタチオンのCysのSH基とTyr8のフェノール性の水酸基が水素結合距離内にあることである。これまで知られている哺乳動物由来のGSTにおいてもこのTyr8に相当する残基はよく保存されている。通常はpKaで8.0程度のプロトンの結合定数を示すグルタチオンのチオール基がこのTyr8の水酸基と水素結合してpKaが低下する。この結果, このチオール基が中性付近でも

プロトン解離して活性化されたチオレートイオンとなり, 酵素の触媒反応における活性種となると考えられている。²⁶⁾⁻³⁰⁾ このことは, 造血器型PGDSにおいても酵素の触媒活性の初段反応はGSTと基本的に同じであることを予想させる。

5. シグマタイプGSTとしての造血器型PGDS

造血器型PGDSは, すでに述べたとおりシグマクラスのGSTに属する。哺乳動物のシグマ, ミュー, パイ, アルファクラスGSTと造血器型PGDSの立体構造をもとにしたアミノ酸配列の比較を示した(図5A)。参考に, イカ由来のシグマクラスとハエ由来のシータクラスのGSTのアミノ酸配列も並べてある。^{26), 27)} また, 共同研究者の菊野, 藤による分子系統樹により, それぞれの分子の進化的距離を示してある(図5B)。

Ujiharaたちは, 哺乳動物由来GSTが PGH_2 を基質とすることをリボカリン型と造血器型の2種類のPGDSとの比較において報告している。³¹⁾ この報告によれば, 哺乳動物由来GSTは PGH_2 を異性化し, PGE_2 と PGD_2 を生成すること, さらには $PGF_{2\alpha}$ へ還元する活性がある。反応生成物の特異性と効率に目をつぶれば, これらのGSTが PGH_2 を基質として異性化, 還元反応を触媒することになる。このことは, 解毒酵素として知られてきたGSTの広い基質スペクトルを持つグルタチオン転移反応の様式として PGH_2 がグルタチオンの受容化合物となり, 一連の触媒反応が開始されるのかもしれない。PGDS活性でこれらのクラスの違う哺乳動物由来のGSTでのPGDS活性を比較してみると, 活性の強さは,

造血器型PGDS $\gg$ リボカリン型PGDS $\gg$ α クラスGST $>$ μ/π クラスGST

の順番になる。³¹⁾ ところが, 在来のGSTではすでに述べたように反応生成物の特異性が低く, その幾何異性体である PGE_2 さらには還元生成物である $PGF_{2\alpha}$ の生成の方が PGD_2 よりも多い。なかでもアルファクラスにおいては PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ のどちらの生成量についても PGD_2 の生

A

B

図5 A：立体構造に基づくアミノ酸配列のアライメント。B：GSTファミリーのアミノ酸配列による分子系統樹。(A: Amino acid sequence alignment of GSTs including hematopoietic PGDS based on their three-dimensional structures. B: Phylogenetic tree of amino acid sequences of GST families including hematopoietic PGDS.)

成量よりも1桁高く、これらのPGH₂の反応生成物の総計ではリポカリンPGDSの酵素活性に匹敵するほどになるという。これに対して、CDNB (1-chloro-2,4-dinitro benzene)を基質としたときのGST活性は、ミュー、アルファ、パイそれぞれのクラスではほぼ同じであり、造血器型PGDSにはこの10分の1程度のGST活性がある。一方、グルタチオンを結合しないリポカリン型PGDSはGST活性を示さず、触媒機構の違いを反映しているのであろう。造血器型PGDS以外の無脊椎動物由来のシグマクラスのGSTのPGH₂を基質としたときの酵素反応に関する報告はこれまでのところない。

では、いかにしてPGDSとしてPGH₂を特異的にかつ効率よくPGD₂に異性化できるのであろうか。造血器型PGDSを含むGSTのPGDS活性の違いは反応機構の違いというより、活性クレフトへの基質結合様式に違いがありその結果として特異性のあるなしが決まっていることを予想させる。そこで、この点を立体構造の上から考えてみよう。

GSTの各クラスと造血器型PGDSの主鎖を重ねてみると、そのN末ドメインは比較的良く重ね合わせできる^{26), 28)-30)} (図6)。ただし、ミュークラスではN末ドメインからC末ドメイン側に突き出たミューループと呼ばれ

図6 造血器型PGDS (太い白) を含むイカσクラスGST (PDB-code: 1gsq), μクラスGST (1hna), πクラスGST (1gsr), αクラスGST (1guh)クラスのペプチド骨格針金モデルの重ね合わせ。(Superposed peptide main-chain wire models of GST classes including hematopoietic PGDS (thick white), sigma-class from squid (PDB-code: 1gsq), mu-class (1hna), pi-class (1gsr) and alpha-class (1guh) GSTs.)

る挿入配列を持つ²⁸⁾ (図6：左側中央に下から突き出た灰色ループ)。これに対してα-ヘリックスからなるC末ドメインは折れ畳み様式が同じとはいえ、その主鎖の位置や長さがN末ドメインに比べ大きく違う。アルファタイプGSTではC末の付加配列によってC末にひとつ多いα-ヘリックスを形成しており、このα-ヘリックスはN末ドメイン側に突き出ている。³⁰⁾ 造血器型PGDSではC末ドメインの底を形成している長い2本のα-ヘリックスのうち活性クレフトの天井を形成しているα4ヘリックスに連なった“ひねり”の利いたペプチド主鎖のせいで、この部分のアミノ酸配列の長さとしてはGSTのなかで短いにもかかわらず一番先まで突き出た構造を取っている (図5A, 図6：太いアミノ酸主鎖)。この底は、さらに造血器型PGDSに結合したグルタチオンの上までせり出している (図2b, 3)。このように、GSTのクラスによる構造的差異が、活性クレフトを形成しているN末とC末ドメインの間に集中している。つまり、活性クレフトの構築され方がクラスによって異なり、これがGSTクラスによる機能の違いを生じさせている立体構造的基礎である。

GSTのクラスによる活性クレフトのアーキテクチャーの違いは、タンパク質の分子表面構造を比較すると更にはっきりする (図7)。シグマクラスGSTである造血器型PGDSはタンパク質分子の外側に向けて大きくひらいたクレフトを持っている (図7A, A')。無脊椎動物由来では

図7 A~E: GSTファミリーメンバーの活性クレフトの構造。ファンデルワールス表面をドットで表した。A~Eは垂直断面図でA'~E'は水平断面。A: 造血器型PGDS, B: イカ σ クラスGST (26), C: μ クラスGST (28), D: π クラスGST (29), E: α クラスGST (30)。F: 結合したグルタチオン分子を含むGSTの活性部位のアーキテクチャーをTyr8の相同チロシン残基と近傍にある基質受容に関わると考えられる芳香環側鎖を持ったアミノ酸残基で表したステレオ模式図。(A~E: vander Waals surface of each GST class active-site cleft. Non-prim series are perpendicular sections and prim series are horizontal sections. A: hematopoietic PGDS, B: sigamaclass from squid (26), C: mu- class GST (28), D: pai- class GST (29), E: alpha- class GST (30). F: Stereo-schematic diagram on active sites of GST classes represented by the vicinity aromatic amino acid residues as putative lipophilic substrates asseptons as well as Tyr 8 and its corresponding residue.)

あるが造血器型PGDSと同じシグマクラスのイカGSTはタンパク質分子の外側に向けて大きく開口している²⁶⁾(図7B, B')。しかしその上部は、造血器型PGDSでは大

きく突き出た庇構造により、餌をねらった大きなワニの口のように活性クレフトが開いている(図3B)。これに対して、主鎖の構造比較ですでに述べたように(図6)、ミュータイプにおけるN末ドメインの挿入配列²⁸⁾(図7C, C')が、またアルファタイプGSTではC末の付加アミノ酸配列による α -ヘリックスがグルタチオンが結合したクレフトからタンパク質の外側方向をふさいでいる³⁰⁾(図7E, E')。

造血器型PGDSを含めこれらのGSTに結合したグルタチオンの反応部位であるシステイン残基のチオール基と水素結合をしているTyr8と相同位置のチロシン残基(図7A~E: 図下中央付近の下から突き出た太いスティックのTyr残基)以外にも近傍にはそれぞれ、Tyr, Phe, Trpなどの芳香性残基の側鎖があり親油性基質の結合に重要な役割を果たしていることが予想される(図7A~E: 図上方中央付近の上から突き出た太い白抜きスティックのTyr, Phe, Trp残基。ただし造血器型PGDSはTrp残基は横向き(A)、アルファクラスでは左上方に奥向きのTyr残基(E)。)。これらのうち芳香族側鎖が $\alpha 4$ ヘリックスから放射方向に伸びているイカのシグマクラス、ミュークラス、パイクラスではこれらの側鎖の芳香環が結合グルタチオンの背後の壁を作っている(図7B, C, D)。アルファクラスではこの芳香環に相当するような芳香族残基はないが、C末の付加的 α -ヘリックス上にPhe222がありグルタチオンのペプチド骨格と直角のタンパク質を貫通した深い穴の外側の壁を形成している(図7E, E')。造血器型PGDSではねじれたペプチド骨格に芳香残基のTrp104があるためにこのトリプトファンインドル環が天井の一部を構成して空隙が維持され深いポケットが形成されている(図7A, A')。そして、どのクラスでもグルタチオンが結合したポケットの更に奥まった相同な位置に空隙を持っているが、この空隙がグルタチオンの結合した活性クレフトとそのまがつながっているのは造血器型PGDSのみである。結果として造血器型PGDSだけが疎水的でかなり嵩高い基質であるPGH₂をすっぽりとタンパク質内部に受け入れられるほどに深くて広い疎水的基質結合部位を形成している。

造血器型PGDSを含むGSTのタイプによる活性部位アーキテクチャーの違いを、結合したグルタチオンの近傍にある芳香族残基で代表してみたのが図7Fである。長い親油性の2本の足を持った嵩高いPGH₂が基質として結合する方向を模式的に示してみた。¹⁷⁾ 同じシグマクラスといっても軟体動物イカ由来のGSTと哺乳動物のシグマクラスである造血器型PGDSではかなり構造的に違っており、この構造的違いが両者の間にある機能的差異を同時に予想させる。この観点からみると、これまでのよく知られてきたGSTのなかでアルファクラスはミュー、パイなどとは活性クレフトのアーキテクチャーが構造的にも異なっていることが明白で、これは菊野たちによる

今回のクラスター分析による分子系統樹で得られたものとよく適合しており (図 5B), Ji たちが提案した分子系統樹²⁶⁾よりアミノ酸配列, 立体構造そして機能の分化を良く説明できる.¹⁷⁾ 残念ながら, 最近構造解析がされているシータクラスなどは立体構造は GST フォールドである²⁷⁾が, 統計的有意差検定ができるほどにはアミノ酸配列は相同性が高くないという. この立体構造とアミノ酸配列の類似度のギャップにこれからのバイオインフォーマティクスの課題がある.¹⁷⁾

6. 造血器型 PGDS の酵素反応機構.

造血器型 PGDS の構造を既知の GST と比較した結果, タンパク質としては GST フォールドに属し, その酵素としての機能においても基本は同じであることが推定された. 立体構造をもとに推定した PGDS の反応機構は, 分子モデリングした PGH₂ の立体モデルを造血器型 PGDS の大きな活性クレフトにドッキングして酵素基質複合体モデルを構築して, このモデルに基づいて考察した. このドッキングの結果の中で一番最もらしいモデルの一つを図 8 に示した.

この造血器型 PGDS : PGH₂ 複合体ドッキングモデルをもとに PGH₂ の PGD₂ 異性化の反応機構の特徴を推定してみた.

- I) 反応の特異性は, 化学的に反応性が高く不安定で嵩高い PGH₂ を造血器型 PGDS の大きな活性クレフト内にいくつかの塩橋と水素結合により特異的に結合して包み込み, 反応終了まで副反応を起こすような化合物を近づけないことである.
- II) ID 造血器型 PGDS の PGH₂ から PGD₂ への異性化の反応ステップは, PGH₂ とグルタチオンの付加体の形成, そして精製した付加体の開裂反応という 2 段階で進

む. 付加反応は, GST がグルタチオンを付加する反応機構と同じである. GST では酵素に結合したグルタチオンのシステイン残基のチオール基が近傍にあるチロシンやセリンと水素結合することで, 通常は 8.5 程度であるチオール基の pK_a が低下し, 生理的 pH でこのチオール基が求核攻撃の反応種として働くと考えられている. 実際, 造血器型 PGDS でも結合したグルタチオンは Tyr 8 の水酸基と水素結合をしており, グルタチオンのチオール基は活性化されている. このチオール基が PGH₂ の間に不安定な O-S 結合を形成し, 反応中間体が生成する. この付加体の開裂反応では, O-S 結合の酸素が結合している炭素 (C11) に結合している水素の引き抜きと協奏的に O-S 結合の開裂が起こり反応が完了する. この反応ではグルタチオンは触媒として働くので, GST のようにグルタチオンが消費されることはない.

III) O-O 結合を持った PGH₂ のシクロペンタン環は籠状コンフォメーションだったのがこの環が切れることで PGD₂ の平面構造になる. このとき当然, 2 本のプロスタグランジンの炭化水素の 2 本の尻尾は大きく動き, もはや安定して造血器型 PGDS の活性クレフトには結合できず反応生成物は容易に活性部位からはずれる.

これは仮説であり, 実験的な検証が必要である. すでに裏出たちはタンパク質工学によりこれらの仮説を実証すべく変異体を作成しその解析を進めている.

これを書いている間にニワトリの造血器型 PGDS のアミノ酸配列が明らかになり, PGH₂ との塩橋の可能性を指摘した K198 は保存されていないことが明らかとなりこの残基の直接関与の可能性をかなり減じた.³²⁾

7. おわりに

生体内での PGD₂ の働きについてはまだまだはっきりしていないことが多いため, これからの研究に待つところが多い. それには PGDS そして受容体遺伝子のトランスジェニックマウス, ノックアウトマウスによる発生工学的アプローチがある. そしてまた, リボカリン型 PGDS の立体構造が解かれて両者の特異性の高い PGDS の阻害剤が開発されることで PGD₂ の生体内での働きを解明することができるだろう.

文 献

- 1) 清水孝雄, 細胞工学 17, 684-692 (1998).
- 2) 貴島静正, in "続・新薬の話 (2)" pp116-149 裳華房 (1996).
- 3) Kalgutkar, A. S., Crews, B. C., Rowlinson, S. W., Garner, C., Seibert, K. and Marnett, L. J. *Science* 280, 1268-1270 (1998).
- 4) 渡辺 毅, 蛋白質 核酸 酵素 37, 925-936 (1992).
- 5) 牛首文隆, 平田雅一, 平田多佳子, 中村健一, 村田隆彦, 小林拓也, 成宮周, 現代医療 27, 1873-1886 (1995).

図 8 造血器型 PGDS への気質 PGH₂ の結合モデル. (A schematic drawing of PGH₂ binding mode in the active cleft of hematopoietic PDS.)

- 6) 藤博幸, 裏出良博, 蛋白質 核酸 酵素 **36**, 1692-1702 (1991).
- 7) Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, Y. J., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Seibert, K., Isakson, P. C., and Stallings, W. C., *Nature* **384**, 644-648.
- 8) Hayaishi, O. *FASEB J.* **5**, 2575-2581 (1991).
- 9) Ito, S., Narumiya, S. and Hayaishi, O., *Essent. Fatty Acids* **37**, 219-234 (1989).
- 10) Hirata, Y., Hayashi, H., Ito, S., Kikawa, Y., Ishibashi, M., Sudo, M., Miyazaki, H., Fukushima, M., Narumiya, S. and Hayaishi, O. *J. Biol. Chem.* **263**, 16619-16625 (1988).
- 11) 腰原康子 蛋白質 核酸 酵素, **37**, 937 (1992).
- 12) Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M., and Evans, R. M., *Cell* **83**, 803-812 (1995).
- 13) Kliewer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Patel, I., Morris, D. C. and Lehmann, J. M., *Cell* **83**, 813-819 (1995).
- 14) Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G. A., Thomazy, V. A., and Evans, R. M., *Cell* **93**, 241-252 (1998).
- 15) 馬杉治郎, 春日雅人 医学の歩み **186**, 736-739 (1998).
- 16) Urade, Y., Fujimoto, N., Ujihara, M. and Hayaishi, O., *J. Biol. Chem.* **262**, 3820-3825 (1987).
- 17) Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., Fujii, Y., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y., and Hayaishi, O., *Cell* **90**, 1085-1095 (1997).
- 18) 吾郷日出夫, 宮野雅司 構造生物, **2**, 13-26 (1996).
- 19) Read, R., J., *Methods in Enzymol.* **277**, 110-128 (1997).
- 20) Glusker, J. P., in "Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists", pp.363-369 VHC Pub. Inc. New York, (1994).
- 21) Brünger, A. T., in "Crystallographic Methods and Protocols", ed. C. Jones, B. Mulloy, and M. R. Sandweson, pp.245-266 Humana Press Inc. New Jersey (1996).
- 22) Brünger, A. T., *Methods in Enzymol.* **277**, 366-396 (1997).
- 23) Engh, R. A. and Huber, R. *Acta Crystallogr.* **A47**, 392-400 (1999).
- 24) Laskowski, R. J., Macarthur, M. W., Moss, D. S. and Thornton, J. M., *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-290 (1993).
- 25) Bolt, R., Kuhn, P., Knapp, M., Soltis, M., Grashow, G., and Theone, M., *Amer. Crystallogr. Ass. Ann. Meeting. abstract P079* (1998).
- 26) Ji, X., Rosenvinge, E. C., Johnson, W. W., Tomarev, S. I., Piatigorsky, J., Armstrong, R. N. and Gilliland, G. L. *Biochemistry* **34**, 5317-5328 (1995).
- 27) Wilce, M. C. J., Board, P. G., Feil, S. C. and Parker, M. W., *EMBO J.* **14**, 2133-2143 (1995).
- 28) Raghunathan, S., Chandross, R. J., Kretsinger, R. H., Allison, T. J., Penington, C. J. and Rule, G. S., *J. Mol. Biol.* **238**, 815-832 (1994).
- 29) Reinemer, P., Dirr, H. W., Ladenstein, R., Schaffer, J., Gallay, O. and Huber, R., *EMBO J.* **10**, 1997-2005 (1991).
- 30) Sinning, I., Kleywegt, G. J., Cowan, S. W., Reinemer, P., Dirr, H. W., Huber, R., Gilliland, G. L., Armstrong, R. N., Ji, X., Board, P. G., Olin, B., Mannervik, B. and Jones, T. A., *J. Mol. Biol.* **232**, 192-212 (1993).
- 31) Ujihara, M., Tsuchida, S., Satoh, K., Sato, K. and Urade, Y., *Arch. Biochem. Biophys.* **264**, 428-437 (1988).
- 32) Thomson A., Meyer D. J., and Hayes D., *Biochem. J.* **333**, 317-325 (1998).

プロフィール

吾郷日出夫 Hideo AGO

日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所 〒569-1125 大阪府高槻市紫町1-1

専門分野：タンパク質X線結晶構造解析

現在の研究テーマ：タンパク質構造による創薬・抗ウイルス剤の開発。

宮野雅司 Masashi MIYANO

日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所 〒569-1125 大阪府高槻市紫町1-1

専門分野：タンパク質X線結晶構造解析, 生物物理化学

現在の研究テーマ：タンパク質構造による創薬・抗ウイルス剤の開発。