

学 位 論 文 題 名

X-ray crystal structure analysis
of D-dopachrome tautomerase, a homologue
of macrophage migration inhibitory factor(マクロファージ遊走阻止因子相同蛋白質
D-ドーパクローム異性化酵素の X 線結晶構造解析)

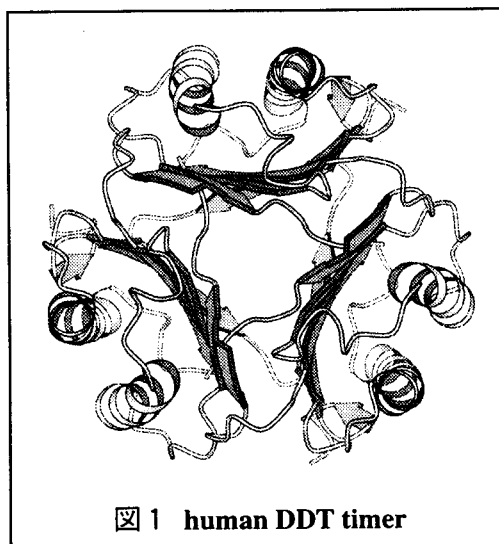
学位論文内容の要旨

高等生物の生体を構成する細胞の増殖・分化・機能発現は周りのほかの細胞により厳密に制御されている。こうした細胞同士のコミュニケーションは細胞同士の接触により細胞表面分子を介して直接的に行なわれるものと可溶性分子を介して間接的に行なわれるものがある。後者において細胞間シグナル伝達をおこなう蛋白質因子は総称してサイトカインと呼ばれている。**Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)**は高等生物の炎症作用や免疫応答においてシグナル伝達に関与するサイトカインのひとつである。**MIF**は血中の **T** 細胞やマクロファージから分泌されるほか、脳、腎臓、肝臓、角膜、上皮など様々な組織に普遍的に存在しているが、血中への毒物 (**lipopolysaccharide**) 投与で刺激を与えると脳下垂体からも分泌される。**TNF**, **IL-1**, **IL-6** や **IL-8** などの他のサイトカインは免疫抑制作用をもつホルモンであるグルココルチコイドによって産生が抑制されるのに対して、**MIF** はグルココルチコイドに拮抗して産生されることから免疫システムの調節因子としての役割を担っていることがわかる。さらに **MIF** は多機能タンパク質であることが知られており、ケト-エノール異性化活性、**glutathione S-transferase** 活性や **oxidoreductase** 活性を持っているとの報告がある。しかし、受容体は発見されておらず、**MIF** の酵素活性と生理学的な機能とがどのような関係にあるのかは明らかにされていない。**D-dopachrome tautomerase (DDT)**は **MIF** と約 30% のアミノ酸相同性があり、類似したケト-エノール異性化活性をもつ。**DDT** 発現は **MIF** とは異なり肝臓などの一部の組織に限られている。生体内での機能や異性化活性の役割も明らかになっていないが、**MIF** と同じように炎症作用や免疫応答、細胞分化、増殖因子などへの関与の可能性にも関心が注がれている。**D-dopachrome tautomerase** と **MIF** の 2 つの蛋白質の生理学的な機能および異性化活性との関係を明らかにしていくためには、構造学的なアプローチが不可欠である。そこで本研究では X 線結晶構造解析によって **human** および **rat** 由来の **DDT** の立体構造決定を行った。

第 1 章 **human DDT** の結晶構造解析

human DDT の構造解析は分子置換法によって行なった。以前に構造決定を行なった **human MIF** とはアミノ酸配列の相同性が 33% と低いものの、これをサーチモデルとして回転および並進関数を計算し初期位相を得た。構造の精密化は **Photon Factory** のシンクロトン放射光を利用して測定した 1.54 Å の高分解能 X 線回折データを用いた。これにより高精度の立体構造決定を行なうことができた。結晶中の非対称単位には 3 個の **monomer** が含まれ、結晶学的な 3 回対称によって機能的な 3 量体が形成されている (図 1)。3 量体内には β シートが 3 つ存在するが、それぞれの β シー

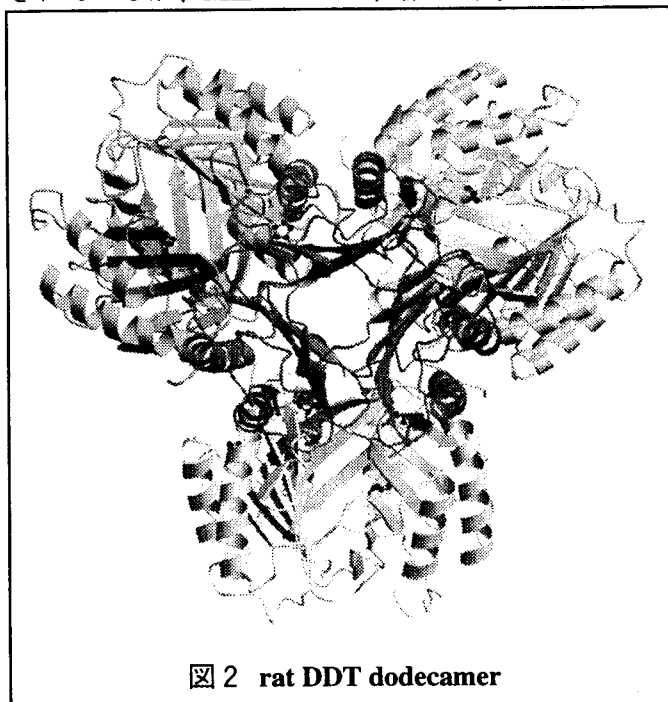
トは3つの単量体の β ストランドにより構成されている。3つの β シートの周りに計6本の α ヘリックスが取り囲む形で3量体構造を形成している。全体的なトポロジーや3量体形成の様式は **human MIF** に良く似ているが、 α ヘリックスの位置、ループ部分や **C** 末端領域の構造が両者では大きく異なる。**DDT** の **N** 末端の **Pro** 残基は正に荷電した **cavity** の底に位置する。**MIF** と同様にここで異性化反応が行われると考えられる。**MIF** ではここに芳香族側鎖のクラスターが存在するが、**DDT** では極性を持った残基に置換されている。両者の触媒基である **Pro1** のすぐ近くに保存性の高い **Lys32** と **Ser63** が存在している。これらの蛋白質活性部位周辺の残基の立体配置の情報は異性化活性の阻害剤の開発にも貢献すると考えられる。



第2章 rat DDT の結晶構造：tetrapod 型 1 2 量体

rat DDT では **orthorhombic** および **monoclinic** の2種類の結晶系における構造解析を行なった。それぞれ分解能 **2.3Å**、**2.2Å** の構造決定に成功した。いずれの結晶系でも非対称単位あたり4つの3量体が存在し、それらはテトラポッド型の12量体構造を形成している（図2）。すなわち23対称（**cubic**）を持っている。しかもそれぞれの3量体内には3量体による3回軸に加えてそれに垂直な疑似の2回軸がある32対称も含まれている。このように蛋白質の構造に高い対称性が存在することはとても興味深い。3量体間の相互作用には **C** 末端の残基番号 **115-117** の領域が重要である。**C** 末端領域は **human** と **rat** の間では保存されているが、**MIF** では **C** 末端が2残基欠損しているため、このような相互作用はあり得ないと考えられる。さらに3量体間の相互作用には、異性化反応の基質認識に重要であると考えられる **Lys32** の側鎖も関与しており、12量体構造が異性化反応にも十分影響を及ぼすことが推測できる。

ゲルろ過の実験からは通常の溶液中の条件下では **rDDT** が3量体として存在しているようである。しかし2種類の結晶系のいずれからでも12量体という結果が得られたことは、単に結晶中のパッキングの影響によるもののみとは考えにくく、高濃度では12量体構造が安定な状態であるということが考えられる。ただし3量体間の相互作用はおもに側鎖による相互作用が中心であり、主鎖間の水素結合によって形成される3量体の場合と比べるとそれほど強い接触ではない。一般的にサイトカインは受容体



と結合することにより多量体を形成、あるいは多量体を形成して受容体と結合するケースが多い。そして受容体の多量体形成がシグナル伝達に必要であると同時にその経路を決定している。したがって **DDT** においてもこの12量体構造が重要な意味を含んでいる可能性が考えられる。これまでにサイトカインとその受容体が2:2の結合をする例が数多く報告されている。**TNF** とその受容体は3:3の結合をすることがX線構造解析でも明らかにされている。12という数字はこれまでに報告された例はない。現在はまだ **DDT** および **MIF** の受容体は明らかになっておらず、ほかの実験

的な証拠はない状況であるが、今後の機能解析の進展により 1 2 量体構造と分子機能の関係が明らかにになるであろう。

第 3 章 多波長異常分散データの有効性と限界

セレン原子の異常分散効果を利用したタンパク質の構造解析は 1980 年代後半ころのシンクロトロン放射光と遺伝子工学の発展に伴って **Hendrickson** らにより開発されタンパク質結晶学に新たな可能性を示した。数年ほど前からセレン原子を利用した **MAD** 法による解析の成功例が飛躍的に増大しており、今では非常に有力な手段として半ば汎用的に構造解析に利用されている。この章では第 1 章で述べた **hDDT** のセレン置換体結晶の多波長異常分散データをもとにセレン原子による位相決定力を検証し、その有効性と限界を確認した。さらその応用や問題点についても述べる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 勲

副 査 教 授 西 村 紳一郎

副 査 助教授 渡 邊 信 久

副 査 助教授 西 平 順 (北海道大学大学院医学研究科)

学 位 論 文 題 名

X-ray crystal structure analysis of D-dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor

(マクロファージ遊走阻止因子相同蛋白質

D-ドーパクローム異性化酵素の X 線結晶構造解析)

高等生物の生体を構成する細胞の増殖・分化・機能発現は周りのほかの細胞により厳密に制御されている。こうした細胞同士のコミュニケーションは細胞同士の接触により細胞表面分子を介して直接的に行なわれるものと可溶性分子を介して間接的に行なわれるものがある。後者において細胞間シグナル伝達をおこなう蛋白質因子は総称してサイトカインと呼ばれている。Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) は高等生物の炎症作用や免疫応答においてシグナル伝達に関与するサイトカインのひとつである。MIF は血中の T 細胞やマクロファージから分泌されるほか、脳、腎臓、肝臓、角膜、上皮など様々な組織に普遍的に存在しているが、血中への毒物 (lipopolysuccaride) 投与で刺激を与えると脳下垂体からも分泌される。TNF, IL-1, IL-6 や IL-8 などの他のサイトカインは免疫抑制作用をもつホルモンであるグルココルチコイドによって産生が抑制されるのに対して、MIF はグルココルチコイドに拮抗して産生されることから免疫システムの調節因子としての役割を担っていることがわかる。さらに MIF は多機能タンパク質であることが知られており、ケト-エノール異性化活性, glutathione S-transferase 活性や oxidoreductase 活性を持っているとの報告がある。しかし、受容体は発見されておらず、MIF の酵素活性と生理学的な機能とがどのような関係にあるのかは明らかにされていない。D-dopachrome tautomerase (DDT) は MIF と約 30% のアミノ酸相同性があり、類似したケト-エノール異性化活性をもつ。DDT 発現は MIF とは異なり肝臓などの一部

の組織に限られている。生体内での機能や異性化活性の役割も明らかになっていないが、MIF と同じように炎症作用や免疫応答、細胞分化、増殖因子などへの関与の可能性にも関心が注がれている。D-dopachrome tautomerase と MIF の 2 つの蛋白質の生理学的な機能および異性化活性との関係を明らかにしていくためには、構造学的なアプローチが不可欠である。そこで本研究では X 線結晶構造解析によって human および rat 由来の DDT の立体構造決定を行った。

human DDT の構造解析は分子置換法によって行なった。以前に構造決定を行なった human MIF とはアミノ酸配列の相同性が 33% と低いものの、これをサーチモデルとして回転および並進関数を計算し初期位相を得た。構造の精密化は Photon Factory のシンクロトン放射光を利用して測定した 1.54 Å の高分解能 X 線回折データを用いた。これにより高精度の立体構造決定を行なうことができた。結晶中の非対称単位には 3 個の monomer が含まれ、結晶学的な 3 回対称によって機能的な 3 量体が形成されている。全体的なトポロジーや 3 量体形成の様式は human MIF に良く似ているが、 α ヘリックスの位置、ループ部分や C 末端領域の構造が両者では大きく異なる。DDT の N 末端の Pro 残基は正に荷電した cavity の底に位置する。MIF と同様にここで異性化反応が行われると考えられる。MIF ではここに芳香族側鎖のクラスターが存在するが、DDT では極性を持った残基に置換されている。両者の触媒基である Pro1 のすぐ近くに保存性の高い Lys32 と Ser63 が存在している。これらの蛋白質活性部位周辺の残基の立体配置の情報は異性化活性の阻害剤の開発にも貢献すると考えられる。

rat DDT では orthorhombic および monoclinic の 2 種類の結晶系における構造解析を行ない、それぞれ分解能 2.3 Å、2.2 Å の構造決定に成功した。いずれの結晶系でも非対称単位あたり 4 つの 3 量体が存在し、それらはテトラポッド型の 1 2 量体構造を形成し、2 3 対称 (cubic) を持っている。このように蛋白質の構造に高い対称性が存在することはとても興味深い。3 量体間の相互作用には C 末端の残基番号 115-117 の領域が重要である。さらに 3 量体間の相互作用には、異性化反応の基質認識に重要であると考えられる Lys32 の側鎖も関与しており、1 2 量体構造が異性化反応にも十分影響を及ぼすことが推測できる。ゲルろ過の実験からは通常の溶液中の条件下では rDDT が 3 量体として存在しているようである。しかし 2 種類の結晶系のいずれからでも 1 2 量体という結果が得られたことは、高濃度では 1 2 量体構造が安定な状態であるということが考えられる。一般的にサイトカインは受容体と結合することにより多量体を形成、あるいは多量体を形成して受容体と結合するケースが多い。そして受容体の多量体形成がシグナル伝達に必要であると同時にその経路を決定している。したがって DDT においてもこの 1 2 量体構造が重要な意味を含んでいる可能性が考えられる。

本研究は炎症作用や免疫応答においてシグナル伝達に関与するサイトカインである MIF および DDT の役割に関するこれまでの広範囲な研究に対して極めて重要な構造的基盤を与えるものである。本研究が生物科学に及ぼす貢献には多大なものがあると考えられ、よって審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を得る十分の資格があるものと認めた。