

NMR による脂質結合性タンパク質の構造生物学的研究

—PKC α のシステインリッチドメインおよび
ダニアレルゲン Der f 2 の構造解析—

学位論文内容の要旨

【序論】

タンパク質の機能は分子表面や内部の化学的性質や構造によって決まるため、立体構造解析は機能を理解する上でしばしば重要な役割を果たす。特に脂溶性リガンドを結合するタンパク質は、リガンドが分子表面だけでなく分子内部や分子間・ドメイン間接触面に結合することが多く、結合により立体構造や酵素活性、細胞内局在などが大きな影響を受けるため、それらのメカニズムの理解や薬剤による制御のために構造生物学には大きな貢献が期待できる。本研究では、核磁気共鳴（NMR）法を用いて異なる2種のタンパク質の立体構造解析を行なうとともに、脂質様リガンドとの結合部位について検討した。

【プロテインキナーゼ C α の制御ドメイン CRD2 の NMR による構造解析】

プロテインキナーゼ C（PKC）は、ホルモンや神経伝達物質など種々の細胞外刺激による細胞内情報伝達系でタンパク質をリン酸化する酵素である。その酵素活性はホスファチジルセリン（PS）やジアシルグリセロール（DAG）の存在下で飛躍的に高まり、また発ガンプロモーターである 12-O-テトラデカノイルホルボール 13-アセテート（TPA）のようなホルボールエステルによっても活性化される。本研究では、cPKC に属する PKC α の 2 番目の CRD（CRD2、アミノ酸 65 残基）の立体構造解析を NMR を用いて行なった。その結果、CRD2 は 2 つの小さな β シートと 1 つの α ヘリックスからなり、シートの内 1 つは 3 つの β ストランドがねじれた配置をとっていることがわかった。またその上にはヘアピンループが覆いかぶさるように位置していた。立体構造から得られた知見と、PKC ファミリーや相同性タンパク質 CRD の一次配列の比較から、このヘアピンループがジアシルグリセロールやホルボールエステルとの結合に関与していると推定した。

【ダニアレルゲン Der f 2 の立体構造と機能の解析】

コナヒョウヒダニ *Dermatophagoides farinae* やヤケヒョウヒダニ *D.*

pteronysinus といったハウスダスト中のダニは、アトピー性皮膚炎や気管支喘息などの症状を引き起こす最も重要なアレルゲンの発生源である。グループ2アレルゲン

(Der f 2 と Der p 2) はダニ抽出物中の主要アレルゲンであるが、その生物学的機能は全くわかっていない。本研究では、Der f 2 (アミノ酸 129 残基) の立体構造解析を NMR を用いて行なった。その結果、Der f 2 が s-type のイムノグロブリンフォールドをもつ単ドメインタンパク質であることがわかった。グループ2アレルゲンは、近年 ML タンパク質に分類された。その構造類似性の比較から、グループ2アレルゲンが β シートを二枚貝のように開閉してリガンドと結合する可能性が示唆された。また、Der f 2 が大腸菌 C 株の表面に結合することを実験で見出した。Der f 2 には塩基性残基のクラスターがあり、また他の ML タンパク質は脂質を結合することなどから、グループ2アレルゲンはリポ多糖のリピド A 部分のような構造の脂質と結合するかもしれないと考えた。

【Der f 2 の抗体認識部位の解析】

IgE はアレルゲンの部分配列ではなく立体構造を認識している。アレルゲンの立体構造による情報はエピトープ解析に有用であり、アレルゲン特異的免疫療法(減感作療法)のための安全かつ効果的な新しい治療ワクチンの開発に役立つと期待される。ある患者血清で調べられた 43 種の変異体 Der f 2 の IgE 結合能の結果を用いて、立体構造に IgE エピトープ領域をマップした。また、患者血清 IgE の結合を阻害する2種のモノクローナル IgG 抗体のエピトープを NMR により調べた。抗原抗体複合体は結合強度が高く高分子量になるため、NMR シグナルの直接観測が困難であるが、界面活性剤を適用することでこの問題を解決し、2種のモノクローナル抗体のエピトープを検出することに成功した。

【総括および展望】

NMR による立体構造解析から Der f 2 の生物学的機能を考察し、また実際にアレルギー反応が起こる際の IgE エピトープの解析について検討した。ここで「なぜアレルゲンがアレルゲンになるのか」という問題は、非常に興味深い問題である。食物や花粉などが多種多様なタンパク質を含んでいるにも関わらず、なぜ一部のタンパク質だけがアレルゲン性を示すのかについては、未だによくわかっていない。アレルゲンの立体構造はさまざまであるが、機能的に見ると、脂質結合タンパク質や生体防御関連タンパク質が多いという傾向が見受けられる。今後も立体構造解析を含め、アレルゲンの生物学的機能を視野に入れた研究が進むことで「アレルゲンがなぜアレルゲンになるのか」という問題に近付けるのではないかと考えている。

学位論文審査の要旨

主査	教授	稲垣文彦
副査	教授	五十嵐靖之
副査	助教授	川原裕之
副査	助教授	森岡弘志

学位論文題名

NMR による脂質結合性タンパク質の構造生物学的研究

—PKC α のシステインリッチドメインおよび
ダニアレルゲン Der f 2 の構造解析—

タンパク質の機能は分子表面や内部の化学的性質や構造によって決まるため、立体構造解析は機能を理解する上でしばしば重要な役割を果たす。特に脂溶性リガンドを結合するタンパク質は、リガンドが分子表面だけでなく分子内部や分子間・ドメイン間接触面に結合することが多く、結合により立体構造や酵素活性、細胞内局在などが大きな影響を受けるため、構造生物学的研究はそれらのメカニズムの理解や薬剤による制御を考える上で不可欠となっている。

申請者は核磁気共鳴 (NMR) 法を用いて 2 種の脂質結合性タンパク質の立体構造解析を行い、脂質様リガンドとの結合部位について検討した。一つはプロテインキナーゼ C (PKC) α のシステインリッチドメイン (CRD) であり、もう一つはダニ主要アレルゲン Der f 2 である。まず、PKC がジアシルグリセロールやホルゴールエステルに結合することに着目し、申請者は CRD ドメインがそれらの脂溶性物質と結合する部位を調べることを目的として立体構造解析を行なった。一方、ダニアレルゲン Der f 2 はアレルギーに関わることはよく知られていたが、本来の生物学的機能については全く未知であり、結合するリガンドについても全く情報がなかった。しかし立体構造解析を進める内に、その構造的特徴や類縁タンパク質との構造類似性により、未知であった機能の推定が可能となった。構造生物学的アプローチとしてユニークなものであり、今後、機能未知の蛋白質が数多く報告されることを考えると、申請者の方法論の有用性は高いと考える。

博士論文の構成として、申請者は第 1 章で脂質結合性タンパク質の立体構造解析の意義について述べ、また NMR による立体構造解析の概要を述べた。第 2 章では、脂質結合タンパク質として知られる PKC α の 2 番目の CRD (CRD2、アミノ酸 65 残基) の立体構造解析を NMR を

用いて行なった。その結果、CRD2は2つの小さな β シートと1つの α ヘリックスからなり、シートの内1つは3つの β ストランドがねじれた構造をとっていることを明らかにした。またその上にはヘアピンループが覆いかぶさるように位置していた。立体構造から得られた知見と、PKCファミリーや相同タンパク質CRDの一次配列の比較から、このヘアピンループがジアシルグリセロールやホルボールエステルとの結合に関与していると推定した。第3章では、申請者はダニ主要アレルゲンDer f 2（アミノ酸129残基）の立体構造解析をNMRを用いておこない、その結果、Der f 2がs-typeのイムノグロブリンフォールドをもつ単ドメインタンパク質であることを示した。グループ2アレルゲン(Der f 2とDer p 2)は、近年MLタンパク質に分類された。その構造類似性の比較から、グループ2アレルゲンが β シートを二枚貝のように開閉してリガンドと結合する可能性が示唆された。また、Der f 2が大腸菌C株の表面に結合することを実験で見出している。Der f 2には塩基性残基のクラスターがあり、また他のMLタンパク質は脂質を結合することなどから、グループ2アレルゲンはリポ多糖のリピドA部分のような構造の脂質と結合するかもしれないと考えた。第4章では、第3章で明らかになったDer f 2の立体構造に基づき、IgE抗体のエピトープを解析した。またIgE抗体の結合を阻害する2種類の抗Der f 2モノクローナル抗体とDer f 2との結合実験をNMRを用いて行ない、エピトープ領域を検出した。第5章では、第3章と第4章をつなぐまとめの章として「なぜアレルゲンがアレルゲンになるのか」について考察を進めている。動植物の主要アレルゲンには脂質結合タンパク質や生体防御関連タンパク質が多いことに触れ、Der f 2の生物学的機能とアレルギーとの関係について考察し、本研究の成果をまとめると同時に、今後の研究について展望している。

以上、申請者はNMRによる構造解析を通して、PKC α のCRDドメインの構造を明らかにし、ジアシルグリセロール結合部位を明らかにし、PKC α の膜へのターゲット機構を議論した。なお、この研究は1998年度のJ. B. 論文賞を授与されたことを付記する。申請者の特筆すべき研究は、機能未知のタンパク質に対する構造に基づく推論である。Der f 2の研究より、MLファミリータンパク質の一般的な性質まで議論を展開した。MD2はTLR4結合タンパク質としてLipid Aとの結合部位として注目を浴びており、配列相同性より、Der f 2が脂質結合性タンパク質であることを示唆した。Der f 2はアトピー性皮膚炎のアレルゲンとして知られているが、MD2同様にLipid Aとの結合により、自然免疫系を亢進させる働きを持つことも考えられる。このような機能とアレルギーの関連については今後の検討が必要であるが、構造からのアプローチとしてユニークな研究を展開している。以上より、申請者の研究は博士論文にふさわしいものとする。