

紫外共鳴ラマン分光法によるヒト造血器型プロスタグランジン D₂ 合成酵素への阻害剤結合効果の検討

内田喜子¹、裏出良博²、高妻孝光¹

1) 茨城大院・応用粒子線科学、

2) 大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生物学部門

k_ohzuma@mx.ibaraki.ac.jp

<序> 造血器型プロスタグランジン (PG) D₂ 合成酵素 (H-PGDS) は、PGH₂ から PGD₂ への異性化を触媒する酵素である。PGD₂ は、抹消組織においてアレルギーや炎症反応のメディエーターとしてはたらき、中枢神経系において睡眠誘発物質としてはたらきことが知られている。H-PGDS は、 σ 型グルタチオン転移酵素 (GST) のアイソザイムとして同定されており、

触媒反応にグルタチオン (GSH) を要求する[1]。H-PGDS の活性中心は、GSH 結合部位と疎水性基質結合部位からなっていることが X 線結晶構造解析から明らかにされた[2]。部位特異的突然変異体を用いた酵素活性の検討から、活性発現には、活性中心に存在する Tyr8、Arg14、Trp104 が必須であることが示された[3]。近年、Mg²⁺ や Ca²⁺ のような金属イオンが H-PGDS を活性化することが報告され、H-PGDS の界面に金属イオンが結合する

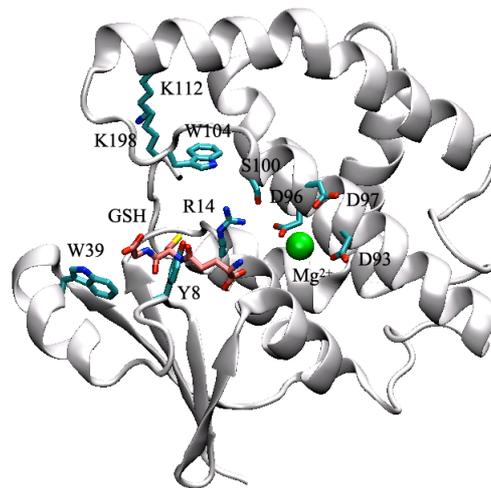


図 1. ヒト H-PGDS 単量体の構造

ことが見出された[4]、また、Mg²⁺ 及び Ca²⁺ の存在下において GSH 結合部位の Tyr8 が脱プロトン化されることが紫外共鳴ラマンスペクトルから見い出されている[5]。

本研究では、H-PGDS の活性中心の構造や機能についてより詳細な知見を得るために、GSH の阻害剤である S-hexyl-glutathion (GS-hex) を用い、H-PGDS へ GS-hex が結合したときの構造変化について紫外共鳴ラマンスペクトルにより検討した。

<実験> ヒト由来の H-PGDS は、大腸菌により発現させ、精製を行った。紫外共鳴ラマンスペクトルの測定には、244 nm の紫外レーザーを励起光として用いた。レーザー強度は、サンプル点で 100~150 μ W になるように調整し、試料の変性を防ぐために回転セルを用いた。ラマン散乱光は、プレモノクロメーターによりレーザー光を取り除いた後、1m シングルポリクロメーターへと導き、ICCD 検出器を用

いて測定を行った

<結果・考察> 244 nm 励起による Mg^{2+} 結合型 H-PGDS の紫外共鳴ラマンスペクトルを測定したところ (図 2)、 1601 cm^{-1} と 1163 cm^{-1} に Tyr8 のチロシネートに由来するラマンバンドが確認された。 Mg^{2+} 結合型 H-PGDS に GS-hex を加えると、 1601 cm^{-1} と 1163 cm^{-1} のラマンバンドが消失するとともに、トリプトファンに由来するラマンバンドの強度が強くなることを見出された。GS-hex 存在下の Mg^{2+} 結合型 H-PGDS のスペクトルから GS-hex 非存在下のスペクトルを引いた差スペクトルを計算したところ、 1163 cm^{-1} のラマンバンドは 1177 cm^{-1} へとシフトしていることを見出された。 1601 cm^{-1} のラマンバンドが消失したこと、 1163 cm^{-1} のラマンバンドが 1177 cm^{-1} へとシフトしたことから、GS-hex が Mg^{2+} 結合型 H-PGDS に結合したことにより、Tyr8 が

プロトン化を受けるものと考えられる。また、GS-hex の結合によって、トリプトファンの位置する環境が、より疎水的環境になるものと考えられる。

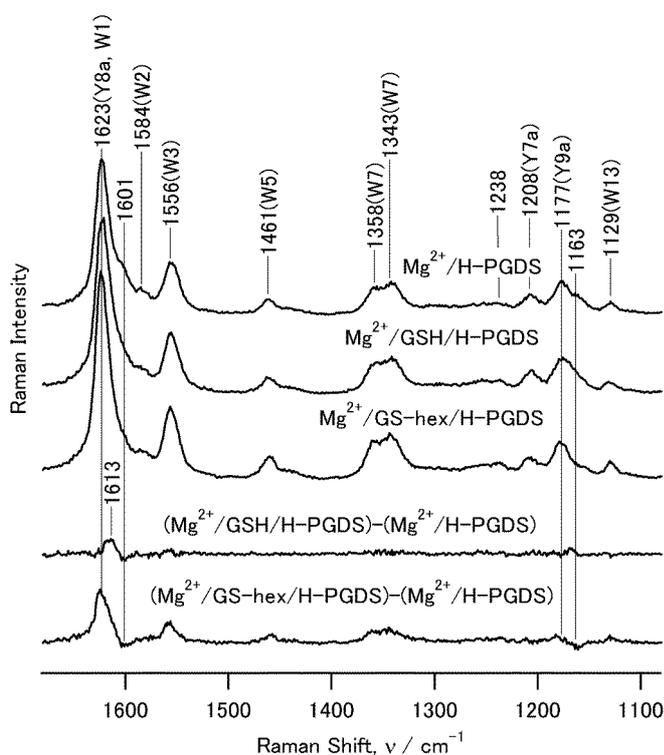


図 2. 244 nm 励起による GSH 及び GS-hex 存在・非存在下での Mg^{2+} 結合型 H-PGDS の紫外共鳴ラマンスペクトル. $(Mg^{2+}/GSH/H-PGDS)-(Mg^{2+}/H-PGDS)$ は、GSH 存在下のスペクトルから GSH 非存在下のスペクトルを引いた差スペクトル. $(Mg^{2+}/GS-hex/H-PGDS)-(Mg^{2+}/H-PGDS)$ は、GS-hex 存在下のスペクトルから GS-hex 非存在下のスペクトルを引いた差スペクトル.

参考文献

- [1] Mayer D. J., & Thomas M., (1995) *Biochem. J.* **311**, 739-742.
- [2] Kanaoka Y. *et al.*, (1997) *Cell.* **90**, 1085-1095.
- [3] Pinzar E. *et al.*, (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 31239-31244.
- [4] Inoue T. *et al.*, (2003) *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 291-296.
- [5] Uchida Y., Aritake K., Urade Y., & Kohzuma T., submitted.