

第3章

部位特異的変異誘発法を用いた

h A R の構造活性相関の解析

[はじめに]

A Rがその活性を発現するうえで重要な分子中の部位は活性中心と呼ばれるが、その活性中心は触媒中心、基質結合部位、補酵素結合部位などから構成されていると考えられる。また、糖尿病性慢性合併症の予防・治療に用いられるA R阻害剤はA Rのみに特異的、かつ強力に結合し効果を発揮し、副作用が少ないことが望ましい。そのためには、A Rの触媒中心あるいは、基質結合部位に特異的に結合する薬剤を開発する必要がある、A Rの活性中心の構造解析が待たれている。トリプシンのようにX線回析によって活性中心が詳細に解明されている蛋白に対しては、その触媒中心の電子の空間的配置に対応して特異的かつ強力に結合し、活性を完全に阻害し、副作用も極めて軽微な優れた薬剤が開発されており、広く肺炎などの治療に用いられている。h A RのX線回析による構造解析研究は、まだ始められたばかりであり、h A Rの結晶化が試みられている段階に過ぎないので、3次元構造の完全な解明には、なお長い年月を要すると考えられる。そこで我々は、活性中心の形成に直接関与しているアミノ酸残基を同定するために、部位特異的変異誘発法を用いて、アミノ酸1つが変異したh A Rを発現させ、基質、補酵素、A R阻害剤との親和性などを検討した。基質や補酵素との結合に関与するアミノ酸残基が同定されれば、基質や補酵素なしに結晶化してX線回析によって構造決定された場合に、後から基質や補酵素の結合部位を推定するための貴重な情報となりうる。

ARの補酵素はNADPHであり、NADPHを補酵素とする多くの酵素において、NADPH結合部位のアミノ酸の consensus sequence が知られている(74~76)。しかし、hARにおいてはそのような配列はなく、NADPHとの結合に関与するアミノ酸を推測することは比較的困難である。近年、Morjanaらは、NADPHのアナログとして、pyridoxal 5'-diphospho-5'-adenosine (PLP-AMP)を用い、 NaBH_4 によってヒト筋肉AR、ヒト肝臓アルデヒド還元酵素、ラット水晶体ARとそれぞれ共有結合させるという実験を行った。そしてPLP-AMPのピリドキサールのアルデヒド基が三者の共通配列(1文字表記で、I-P-K-S)のLys(K)に結合したことから、このLysはNADPH結合部位の近傍に存在するとした(77)。しかし、NADPHにはアルデヒド基が存在しないこと、NADPHやPLP-AMPよりもはるかに小さいピリドキサルリン酸もやはり、 NaBH_4 によって同部に結合すること(77)、補酵素結合部位と基質結合部位とは近傍に位置すると予想されることなどから考えて、このLysは実は、補酵素とではなく、基質のアルデヒド基と結合するのではないかと我々は推測した。そこでhARのI-P-K-S配列中のLys-263をそれぞれ、Met、Glu、Argに変異させたhAR(それぞれ、Met-263、Glu-263、Arg-263と略す)をバキュロウイルス-昆虫細胞系で発現させ、精製後に補酵素、基質、AR阻害剤との親和性の変化を詳細に検討した。

一方、hARの触媒中心にどのアミノ酸残基が参加しているのかということに関する情報はさらに少ない。ARはアルデヒド基にNADPHの水素イオンをトランスファーして還元するのがその活性であり、水素イオンを運搬するアミノ酸残基は水素イオンを結合するために、陰性に荷電しているはずである。しかし、pKaが低く、強力な陰性荷電を有するGlu、Asp残基は一度結合した水素イオンを離しにくいと考えられる。そこで、周囲のアミノ酸残基の影響を受け、ときには陰性に、そしてまたあるときには陽性に荷電するようなアミノ酸残基が水素イオンの運搬を司っていると考えた。このような条件を満たすアミノ酸の1つがHisである。HisのpKaは6.0と中性付近であるため、周囲のアミノ酸残基の影響を受け、容易に水素イオンを結合したり、

放出したりすることができる。したがって我々は、さまざまな種のARや、ARのアミノ酸配列と50%以上の相同性を持つ類縁酵素において保存されているアミノ酸配列領域(図12)に含まれるHis-42とHis-188とを選択した。そして同部のHisをそれぞれ、Tyr、Glnに変異させたAR(それぞれ、Gln-42、Tyr-42、Gln-188、Tyr-188と略す)をバキュロウイルス-昆虫細胞系で発現させ、精製後、酵素活性が消失しているか否かを検討した。

[方法]

(I) 部位特異的変異誘発法

原則的に Oligonucleotide-directed *in vitro* mutagenesis system version 2 (Amersham) の protocol に従った(図13)。まず mutagenic oligonucleotides(表3)をDNA合成機(Applied Biosystems Model 391)で作成し、OPCカートリッジで精製した後、5'末端をヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化した。M13mp8中にクローニングされ、1本鎖となったhARcDNAとそれぞれのmutagenic oligonucleotideとをアニーリングさせ、Klenow fragmentとDNAリガーゼとによって、もう一方のDNA鎖を合成した。このとき、dCTPの代わりにdCTP α Sを用いる。できあがった2本鎖DNAを次にNciIで切断するが、新たに合成された変異を含む側のDNA鎖はdCTP α Sが含まれているため、NciIによって切断を受けない。したがって、次に exonuclease IIIで処理すると、変異を含まない方のDNA鎖のみが消化されることになる。その後再びDNAポリメラーゼとリガーゼによって2本鎖DNAとしたときにはどちらのDNA鎖にも変異は導入されている。変異を導入し終わったDNAを大腸菌にトランスフェクションし、クローニングして増幅し、 α -[35 S]-dATPを用いたジデオキシヌクレオチド法によってその塩基配列を決定し、目的とする部分にのみ変異が導入されて

いることを確認した。

(II) 変異AR蛋白質の発現と精製

第2章 (I) に記載したバキュロウィルス—昆虫細胞系によるhARの発現と同様の方法にて変異ARを発現させた。変異ARを含むSF9細胞の培養上清は第2章 (II) の記載と同様に脱塩、濃縮したが、次の段階でMatrix orange A columnを用いず、ヒドロキシルアパタイトカラムを用いたHPLCによって、変異ARを精製した。これは、一部の變異ARにおいてMatrix orange A columnに対する親和性が変化し、十分に精製できなかつたからである。精製後の變異ARはSDS-PAGEと銀染色とによって、その純度が確認された(図14)。

(III) 基質、補酵素、AR阻害剤に対する親和性

基質であるglyceraldehydeと補酵素であるNADPHに対する變異ARの親和性を、その逆数である K_m として求めた。各種AR阻害剤に対する變異ARの親和性もまた、その逆数である K_i として、Dixon blot法(83)を用いて算出した。

[結果]

(I) Lys-263が變異したhAR

① glyceraldehydeに対する親和性

K_m 値はMet-263、Glu-263でそれぞれ13.6倍、60.1倍に増加した一方で、Arg-263では5.4%にまで減少した(表4)。すなわち、基質の親和性はGlu-263で著明に減少し、Arg-263では逆に著明に増加した。

これに呼応して、catalytic efficiency (K_{cat}/K_m) も Glu-263 で著明に低下し、Arg-263 では著明に上昇した。

② NADPH に対する親和性

K_m 値はいずれも増加したがその程度は glyceraldehyde における変化の程度に比して小さく、最高でも 8.3 倍の増加にとどまった (表 4)。すなわち、補酵素に対する親和性はいずれも多少、減少した。

③ AR 阻害剤に対する親和性

hAR に変異が導入されたことによって、 K_i 値が増加する場合も減少する場合も認められたが、Glu-263 における K_i 値の増加が際だっている。Glu-263 の sorbinil、AL1576、tolrestat に対する K_i 値は、正常 AR の K_i 値に比べ、それぞれ、35 倍、450 倍、11 倍であった (表 5)。すなわち、Glu-263 では AR 阻害剤に対する親和性が著明に低下した。

(II) His-42、His-188 がそれぞれ変異した hAR

① glyceraldehyde に対する親和性

いずれも K_m 値は軽度に増加したがその程度は小さく、正常 AR の 4 倍未満であった。すなわち、基質に対する親和性がわずかに減少したに過ぎない。Catalytic efficiency に関しても、正常 AR との間に著明な差異を認めなかった (表 6)。

② NADPH に対する親和性

いずれも K_m 値は軽度に増加したがその程度は小さく、正常 AR の 4 倍未満であった (表 6)。すなわち、補酵素に対する親和性はわずかに減少したに過ぎない。

③ A R 阻害剤に対する親和性

正常A Rの各種A R阻害剤に対する K_i 値に比べて、変異A Rの K_i 値の変化はいずれもわずかであり、増加しても3倍未満であり、減少しても、 $1/6$ 以下にはならなかった(表7)。すなわち、A R阻害剤に対する親和性はわずかに変化したに過ぎない。

[考察]

(I) L y s - 2 6 3 が変異した h A R

陽性に荷電したL y s残基を置換する際に選択したアミノ酸は、L y sと大きさがほぼ同じで非極性残基を持つM e tと、L y sとは逆の陰性に荷電した残基をもつG l uと、L y sよりもさらに強く陽性に荷電したA r gであった。これらの変異によるN A D P Hに対する親和性の減少の程度は一律に小さいので、変異に伴うh A R分子全体の3次元構造変化によるものと考えられる。一方、glyceraldehydeに対する親和性はL y sの陽性荷電をM e tに変異させて消去したところ減少し、G l u変異によって陰性に荷電したところさらに著明に減少した。逆に、A r g変異によって陽性荷電を強めることによってglyceraldehydeとの親和性は著明に増加した。これらの結果から導きだされることはL y s - 2 6 3の陽性荷電はh A R分子とglyceraldehydeとの結合に寄与しており、陽性荷電が強いほどその結合力は大きくなるということである。L y s - 2 6 3はヒト筋肉A Rにおいて、P L P - A M P、あるいは、ピリドキサーリン酸のアルデヒド基が結合することが知られている(77)ので、我々の結果と合わせて考察するならば、L y s - 2 6 3の陽性荷電は基質のアルデヒド基に含まれる酸素原子の陰性荷電と静電的な結合をすることによって、基質結合部位の一部を形成している可能性が示唆される。

hARとの結合にLys-263の陽性荷電を必要とするのは基質だけではない。Glu-263において、AR阻害剤との親和性が著明に低下したことはLys-263が少なくとも一部のAR阻害剤とhARとの結合に関与していることを示唆している。また、Lys-263が、基質のアルデヒド基との結合にも、AR阻害剤の結合にも重要な役割を果たしているとすれば、AR阻害剤の主な作用発現機序は基質結合部位の一部を占拠することによると考えられる。しかしながら、hARの詳細な3次元構造が不明で、活性中心に対して完全に相補的なAR阻害剤を作ることが不可能な現在の状況では、AR阻害剤はその種類によってhARとの結合部位が大きく相違していると考えられる。Glu-263変異において、hARとの親和性の低下の程度がAR阻害剤間で著しく異なった理由は、Lys-263以外の結合部位がAR阻害剤ごとに異なっているからであろう。

(II) His-42、His-188がそれぞれ変異したhAR

His-42、あるいは、His-188のいずれかは触媒中心の一部を形成し、それを変異させることによって水素イオンの運搬が不能となり、AR活性は消失すると予想して、変異ARを作成した。しかしながら、いずれの変異ARも酵素活性があるばかりか、基質、補酵素、各種AR阻害剤に対する親和性は正常ARと比較して、著明な変化を認めなかった。わずかな親和性の変化は変異に伴うhAR分子全体の3次元構造の変化によるものと考えられる。したがって、His-42、His-188のいずれも基質、補酵素、AR阻害剤の結合部位、触媒中心の形成に参加せず、AR分子の形状支持という面でも重要な役割を果たす残基ではないと結論された。

[小括]

hARの構造活性相関を検討するために、His-42、His-188、Lys-263をそれぞれ他のアミノ酸に置換した変異ARを作成した。それぞれの変異ARについて、基質、補酵素、AR阻害剤との親和性の変化を検討したところ、His-42、His-188を他のアミノ酸に置換しても大きな変化は起こらなかった。一方、陽性荷電を持つLys-263を、陰性荷電を持つGluに置換したところ、基質とAR阻害剤との親和性は著明に低下し、Argに置換し、陽性荷電に強めたところ基質との親和性は著明に上昇した。したがって、Lys-263の陽性荷電はhARと基質、AR阻害剤との結合に重要な役割を果たしていると考えられた。