

NMR 解析に基づくマウス外分泌ペプチド ESP4 の

立体構造と受容体認識に関する研究

分子機能薬学専攻 創薬化学講座 構造機能物理化学分野 谷口雅浩

フェロモンとは、同じ種の間で、社会行動や生殖行動に影響を与える物質である。多くの哺乳動物は、鼻腔下部にある鋤鼻（じよび）器官でフェロモンを感知する。フェロモンの重要な働きとして、同種の別個体を正確に認識する役割がある。個体認識の仕組みを理解する上で、受容体がどのようにしてフェロモンを厳密に認識するかを理解することは重要であるが、フェロモン認識における特異性発現のメカニズムの理解は十分でない。

共同研究者である東原らは、オスマウスの涙に分泌される新規ペプチドを同定した。外分泌腺に分泌されることから、ESP1 (exocrine gland-secreting peptide 1) と命名し、ESP1 が 38 種類からなる新規の多重遺伝子ファミリー (ESP ファミリー) を構成することを明らかにした。ESP4 は、眼窩外涙腺、顎下腺、ハーダー腺に分泌されているファミリー分子であり、ESP1 とのアミノ酸配列相同性が最も高いという特徴をもつ。したがって、ESP4 は ESP1 と似た立体構造をもつが、異なる機能を有することが考えられる。本研究は、ESP4 の立体構造および受容体認識機構を解明し、構造生物学の観点から受容体認識における特異性を明らかにすることを目的とする。

1. マウス鋤鼻神経活性化能をもつ ESP4 の調製法の確立

マウスの鋤鼻器官において神経細胞の活性化能をもつ ESP4 の試料調製法を確立した。大腸菌を用いて発現させた結果、ESP4 は単量体とジスルフィド結合に起因する二量体を形成していることが分かった。各種カラムクロマトグラフィーを用いて単量体と二量体を分離・精製することに成功した。チオール基の修飾試薬である AMS (4-acetamido-4'-maleimidyl-stilbene-2,2'-disulfonic acid) を用いた解析により、ESP4 単量体が分子内でジスルフィド結合をもつこと、また、二量体が分子間でジスルフィド結合をもつことを確認した。マウスの鋤鼻器官における c-Fos タンパク質の発現誘導に基づいて鋤鼻神経活性化能を調べたところ、単量体のみが活性をもつことが分かった。

2. c-Fos タンパク質の発現誘導に基づく ESP4 受容体の解析

抗 c-Fos 抗体と抗 ESP1 受容体抗体を用いた免疫組織学的実験により、ESP4 受容体の解析を行った。脱脂綿に含ませた ESP4 または ESP1 をマウスに嗅がせた後に、鋤鼻器官の切片を抗 c-Fos 抗体と抗 ESP1 受容体抗体で共染色したところ、ESP4 による刺激を受けた細胞は、ESP1 受容体を発現している細胞とは異なることが分かった。この結果は、ESP4 受容体が ESP1 受容体と異なることを強く示唆する。

3. NMRに基づくESP4の立体構造解析

活性をもつESP4の立体構造決定に向けて、安定同位体標識したESP4を用いて各種の多核多次元NMR測定を行い、ESP4由来の信号の帰属を完了した。さらに三次元¹⁵N-edited NOESYおよび¹³C-edited NOESYにより立体構造解析を行った結果、ESP4はカルボキシル末端領域にESP1には見られないヘリックス構造をもつことが示唆された。

また、受容体の存在する生体膜環境を模したミセル構造を形成するDPC (dodecyl phosphocholine)をESP4に滴定したところNMR信号の著しい分散がみられた。この結果は、DPC存在下において立体構造の形成が促進されたことを示す。DPC存在下でのNMR解析を進めた結果、多くの距離情報を含むNMR信号を得た。NMRに基づく立体構造解析の結果、ESP4はヘリックス4本から成る立体構造をもつことを明らかにした。また、ESP4は酸性残基と塩基性残基から成るいくつかの分極面をもっており、ESP1上の受容体結合面に対応するESP4分子表面の電荷分布は、ESP1と異なることがわかった。

以上、本研究において、マウス鋤鼻神経活性化能をもつESP4の調製に初めて成功した。また、免疫組織学的実験により、ESP4受容体がESP1受容体と異なることを強く示唆する結果を得た。この結果は、フェロモン認識においてLuoらが提唱する“1受容体—1リガンド”仮説を支持する。DPC存在下におけるESP4のNMR解析に基づき、ESP4はカルボキシル末端領域にESP1には見られないヘリックス構造をもつこと、また、ESP1と分極面が異なることを明らかにした。ESP4とESP1における立体構造と分子表面における電荷分布の違いが、受容体の特異的な認識に重要であると考えている。また、ESP4上の受容体結合面を同定するために、構造情報に基づいたESP4変異体をすでに調製済みである。現在、ESP4変異体のマウス鋤鼻神経活性化能を調べている。

今回得られた知見は、これまで不明であった、生物が正しくフェロモンを認識するメカニズムの解明につながる結果であり、フェロモンを介した個体間コミュニケーションのさらなる理解が可能になると考える。