

疎水性低分子結合によるリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の 熱安定性についての研究

西口茉実・古田智子・飯田津喜美・乾 隆

Thermal stability of lipocalin-type prostaglandin D synthase induced by hydrophobic small ligand

Mami NISHIGUCHI, Tomoko FURUTA, Tsukimi IIDA and Takashi INUI

1. はじめに

プロスタグランジン(PGs)は、生体膜に含まれるアラキドン酸より合成される一群の生理活性脂肪酸の総称である。炎症やアレルギーのような緊急時に、必要に応じて局所で合成され、近傍に存在する標的細胞上の特異的受容体に結合し作用する局所ホルモンの一種である。

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素(L-PGDS)は、シクロオキシゲナーゼの働きによりアラキドン酸から合成された PGH₂ を基質として、PGD₂ を合成する酵素である。PGD₂ は、中枢神経系において、睡眠誘発、体温低下、黄体ホルモン分泌の抑制、痛みや匂いの応答調節などの作用を示し、末梢神経では、肥満細胞からアレルギーのメディエーターとして放出され、血管拡張、気管支収縮、血小板凝集阻害などの作用を示す^{1), 2)}。

一方、L-PGDS は脂溶性低分子輸送蛋白質群であるリポカリンファミリーに属している。リポカリン蛋白質は、アミノ酸残基が 160~200 個から成り、分子量が約 2~3 万程度の蛋白質である。また、アミノ酸配列の相同性が 20% 以下であるにもかかわらず、その構造上の類似性は非常に高いことが知られている³⁾。

一般に、リポカリン蛋白質の折りたたみ構造は、連続的に水素結合した 8 本の逆平行の β シートから成り、疎水性低分子(リガンド)結合部を囲むようなバレル(樽)型になっている。8 本の β シートをつなぐ 7ヶ所のループは、6ヶ所が短いヘアピンで、1ヶ所がオメガグループであり、このオメガグループがリガンド結合部の蓋の役割をすると考えられている。この構造により、疎水性

リガンドを結合し、輸送することができる⁴⁾。NMR を用いた構造解析から、L-PGDS も 8 本の β シートからなるバレル型の構造をしていることが判明している(図 1)。さらに、我々は L-PGDS が、ビリルビンやビリベルジンなどの胆汁色素や、レチナールなどの疎水性リガンドを高親和性に結合することを報告している⁵⁾。以上のことから、L-PGDS は酵素としての機能と輸送蛋白質としての機能を併せ持つ多機能蛋白質であると考えられる。

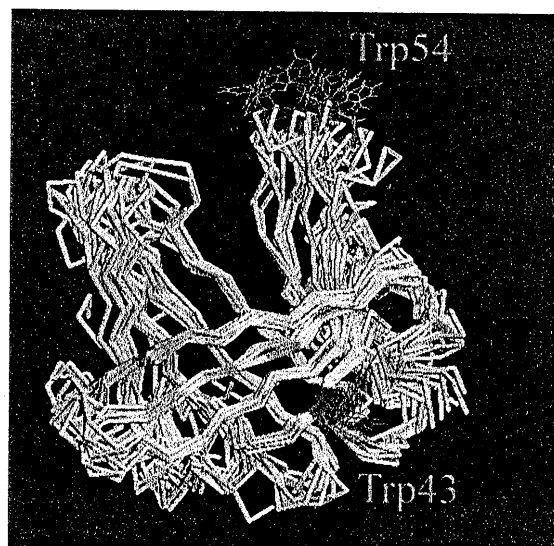


図 1. L-PGDS の NMR 構造(n=9)

これまでに我々は、断熱型示差走査熱量計(DSC)を用いて熱変性反応を測定し、蛋白質の変性の熱力学量および変性機構について調べてきた。L-PGDS

は、酸性条件下 (pH 4.0) で熱変性において可逆性を示すことや、熱変性過程において平衡中間体が存在することを報告した⁶⁾。また、蛋白質内因性トリプトファン⁷⁾の蛍光消光効果の測定により、L-PGDS は酸性条件下においても、疎水性リガンドであるビリベルジンに対して、高い結合親和性 ($K_d=200\text{nM}$) を持つことを報告した⁷⁾。

今回我々は、疎水性リガンドが L-PGDS の熱安定性に及ぼす効果を調べるために、L-PGDS とビリベルジン複合体の熱変性過程を調べた。その結果、ビリベルジンの結合により、L-PGDS の熱安定性が上昇することが判明した。

2. 方法

1) L-PGDS の精製

189 アミノ酸配列から成るマウス L-PGDS に対する完全長cDNA をpGEX-2T plasmid 発現ベクターの BamHI-EcoRI サイトに結合させ、さらにグルタチオン-トランスフェラーゼ融合蛋白質として大腸菌 DH5 α に発現させた。

融合蛋白質は、Glutathione-Sepharose 4 B (Amersham Biosciences) に結合させた後、トロンビン (100 単位/100 μl) を用いて切断し、L-PGDS のみを回収した。さらに L-PGDS は、Superdex75 (Amersham Biosciences) でゲルろ過後、Mono-Q カラムクロマトグラフィー (Amersham Biosciences) により精製した。精製された L-PGDS は、5 mM Tris/Cl 緩衝液 (pH 8.0) で透析した。

2) 試料の調整

DSC 測定においては、上記 L-PGDS を 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) で透析し、0.22 μm Ultrafree-CL (Millipore) で遠心ろ過した後、280 nm の吸収による蛋白質定量を行い、L-PGDS 濃度を調節した。また、L-PGDS は、DSC 測定直前に脱気した。参照溶液として、最終透析外液を遠心ろ過・脱気したものをを用いた。

3) ビリベルジン溶液の調整

疎水性リガンドとして、今回はヘムの代謝産物であり、ポルフィリン環を持つバルキーな低分子であるビリベルジンを用いた。DSC 測定には、0.5 mg/ml (25 μ

M) の L-PGDS に対し、ビリベルジン濃度をそれぞれ 0、1、10、20、50 μM に調製し、その濃度依存性を調べた。ビリベルジンは DMSO に溶解し、濃度は分子吸光係数 ($\epsilon_{377}=51,500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を用いて決定した。

4) DSC 測定

熱量測定には、MicroCal 社の VP-DSC を用い、1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温し、L-PGDS は 5 $^{\circ}\text{C}$ ~100 $^{\circ}\text{C}$ の範囲で走査した。セルは2気圧で加圧した。VP-DSC は、1対の試料セルと参照セルが断熱壁で覆われており、試料セルには蛋白質溶液を入れ、参照セルには透析外液を入れる。データ解析には、試料セルと参照セルの両方に透析外液を入れ、試料と同条件で測定した結果を差し引いたものを用いた。また、データ解析には、MicroCal 社の解析ソフト Origin (Ver.5) とアドインソフト*を用い、ベースラインは高橋らの方法で求めた⁸⁾。

3. 結果及び考察

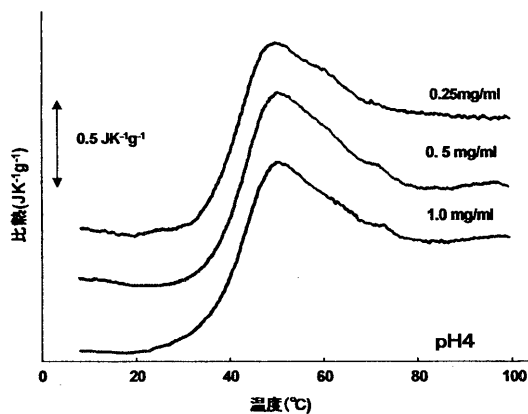


図 2. 熱変性における L-PGDS の濃度依存性

図 2 は、熱変性における L-PGDS の濃度依存性を示す。横軸は温度、縦軸は温度に対する比熱を示す。蛋白質濃度はそれぞれ 0.25、0.5、1.0 mg/ml を用い、pH 4.0 で測定を行った。図 2 に示すように、L-PGDS 濃度が 0.25 mg/ml の場合、20 $^{\circ}\text{C}$ 付近から変性に伴う比熱の上昇が見られ、50 $^{\circ}\text{C}$ 付近でピークに達し、80 $^{\circ}\text{C}$ 付近で変性が終了することが分かった。L-PGDS 濃度が 0.5、1.0 mg/ml の場合においても、0.25 mg/ml とほぼ同様の DSC 曲線を得ることができた。以上の

ように、L-PGDS が熱変性過程において濃度依存性を示さないことから、L-PGDS の熱変性において、分子間の解離会合が伴わないことが判明した。

図3は、pH 4.0でのL-PGDSの熱変性におけるビリベルジンの効果を示す。横軸は温度、縦軸は温度に対する比熱を示す。蛋白質濃度は全て0.5 mg/mlを用い、ビリベルジン濃度は、0、1、10、20、50 μM を用いた。その結果、ビリベルジン非存在下(0 μM)では、L-PGDSの変性ピーク温度は52.4 $^{\circ}\text{C}$ を示した。ビリベルジン濃度の上昇とともに、変性ピーク温度が

高温側にシフトし、ビリベルジンが1 μM 、10 μM 、20 μM 存在下では、ピーク温度はそれぞれ53.5 $^{\circ}\text{C}$ 、54.9 $^{\circ}\text{C}$ 、57.9 $^{\circ}\text{C}$ となった。しかし、ビリベルジン濃度が10 μM において、70 $^{\circ}\text{C}$ 付近に新たな変性のピークが出現した。さらに、ビリベルジン濃度が50 μM では、高温側のピークが低温側のピークより大きくなり、67.7 $^{\circ}\text{C}$ にピークを持つに至った。

以上の結果から、L-PGDSがビリベルジンと結合し、複合体を形成することで、熱に対する安定性が上昇するということが判明した。

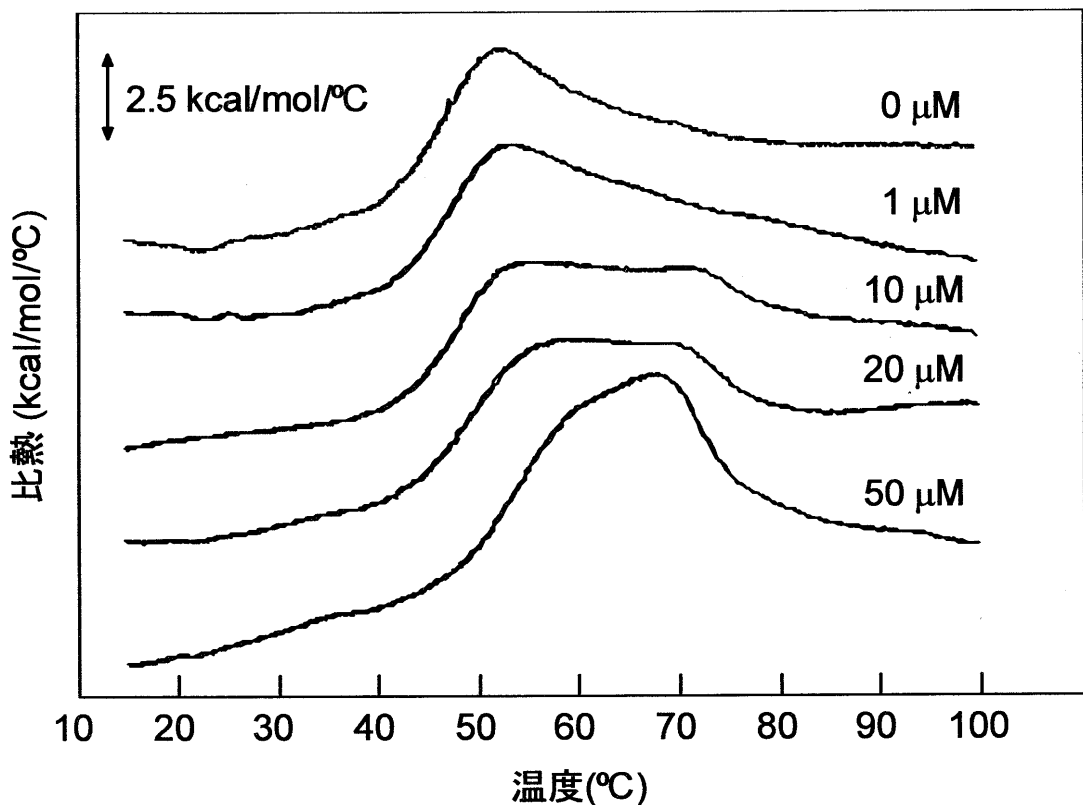


図3. L-PGDSの熱変性におけるビリベルジンの効果

表1は、ビリベルジン存在下におけるL-PGDSのDSC曲線の数値解析結果を示す。これまでの研究からL-PGDSの熱変性過程は、一つの平衡中間体が存在する、いわゆる三状態転移であることを報告している⁶⁾。今回の実験においても、三状態転移モデルを仮定し解析を行った。その結果、ビリベルジン非存在下における T_m は、それぞれ50.8 $^{\circ}\text{C}$ 、60.9 $^{\circ}\text{C}$ であった。ビリベルジン濃度が10 μM では、52.8 $^{\circ}\text{C}$ 、67.3 $^{\circ}\text{C}$ 、20 μM では、54.5 $^{\circ}\text{C}$ 、67.4 $^{\circ}\text{C}$ 、50 μM では58.0 $^{\circ}\text{C}$ 、68.3 $^{\circ}\text{C}$ であった。また、変性に伴う ΔH_{cal} (エンタルピー変化)は、ビリベルジン非存在下では、72.7 kcal/

molであったが、ビリベルジン濃度10 μM では、70.4 kcal/molとなり、非存在下とほぼ同程度の値を示した。しかし、ビリベルジン濃度20 μM では、92.6 kcal/mol、50 μM では102.6 kcal/molとなり、ビリベルジンの濃度依存的に ΔH_{cal} の上昇が観測された。 ΔH_{cal} の上昇は、単にL-PGDSの熱変性によるエンタルピーの上昇のみならず、リガンドとの結合による結合自由エネルギー(binding free energy)が加算されることによると考えられる。牛血清アルブミンと、蛍光プローブの一種である8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸や6-アニリノナフタレン-2-スルホン酸との複合体におい

ても、リガンド結合に伴う蛋白質の熱安定化が報告されており、蛋白質の熱安定性は、リガンド結合の平衡状態と蛋白質変性平衡状態との相互作用により決定されると考えられている⁹⁾。

今後、L-PGDS の DSC 曲線の詳細な波形解析及び他の疎水性リガンドを用いた熱安定性に関する研究を続ける予定である。

表1. L-PGDS とビリベルジン複合体の DSC 曲線の数値解析

ビリベルジン濃度 (μ M)	0	10	20	50
T_m (°C)	50.8	52.8	54.5	58.0
	60.9	67.3	67.4	68.3
ΔH_{cal} (kcal/mol)	72.7	70.4	92.6	102.6

4. 結論

L-PGDS は熱変性において、pH 4.0 では濃度依存性を示さず、L-PGDS 分子間の解離会合が伴わないということが分かった。また、疎水性低分子との結合により、L-PGDS の熱安定性が上昇することが判明した。

謝辞

本研究は、三重大学生物資源学部分子生物情報学研究室の田中晶善教授、大阪大学大学院薬学研究科の大久保忠恭助教授との共同研究であり、記して謝意を表したいと思います。

参考文献

- 1) Urade, Y., and Hayaishi, O. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 259-271
- 2) Hayaishi, O. (1991) *FASEB J.* 5, 2572-2581
- 3) Akerstrom, B., Flower, DR., and Salier, JP. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 1-8
- 4) Flower, DR., North ACT., and Sansom, CE. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 9-24
- 5) Inui, T., Ohkubo, T., Emi, M., Irikura, D., Hayaishi, O., and Urade, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 2845-2852
- 6) 飯田津喜美, 金森さおり, 奥山香澄, 乾 隆 (2003) 三重短大紀要 51, 1-4
- 7) 飯田津喜美, 堀 早穂子, 近藤麻衣, 稲木綾子, 川邊朱里, 乾 隆 (2004) 三重短大紀要 52, 29-32
- 8) Takahashi, K., and Sturtevant, JM. (1981) *Biochemistry* 20, 6185-6190
- 9) Celej, MS., Montich, GG., and Fidelio, GD. (2003) *Protein Science* 12, 1496-1506

*エール大学 Sturtevant 名誉教授および大阪府立大学 北村進一教授によって開発・作成。