

リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の 疎水性低分子結合能の研究

飯田津喜美、堀早穂子、近藤麻衣、稲木綾子、川邊朱里、乾 隆

The Binding Affinities of Hydrophobic Small Ligands to Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase

Tsukimi IIDA, Sahoko HORI, Mai KONDO, Ayako INAKI, Juri KAWABE and Takashi INUI

1. はじめに

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) は、ほ乳類の中枢神経系や生殖器に局在し、プロスタグランジン H₂ (PGH₂) を基質として、PGD₂ を産生する。PGD₂ は、生体膜に含まれるアラキドン酸より合成される一連の生理活性物質であり、中枢神経系における睡眠誘発物質としての作用を持つとともに、アレルギーのメディエーターとして脂肪細胞において活発に産生され、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 は輸送蛋白質群であるリポカリン遺伝子群に属し、且つ酵素としての機能も有する多機能蛋白質である。リポカリン遺伝子蛋白質は、細胞分化に重要とされるレチノイド (活性型ビタミン A) や、物質の代謝、あるいは発生・分化に重要な役割を果たす甲状腺ホルモンなどの疎水性生理活性物質を結合し、運搬する輸送蛋白質群である。一般にリポカリン蛋白質は、疎水性リガンドに対する選択性は低い、結合親和性は高いことが知られている^{3), 4), 5)}。

これまでに我々は、L-PGDS の熱変性機構を解明するために断熱型示差走査熱量計 (DSC) を用いて熱変性反応を測定し、変性の熱力学量および変性機構について解明してきた。DSC 測定では変性温度や変性に必要な熱量などが簡便に得られる他、変性ピークの大きさや形状をもとに、蛋白質のド

メイン構造の推測や変性中間体の存在についての情報を得ることも可能である。昨年度の本紀要において我々は、酸性条件下 (pH 4.0) において、L-PGDS が熱変性に対して可逆性を示すことを明らかにした⁶⁾。さらに、熱変性過程において、L-PGDS の熱平衡中間体が存在することを明らかにした⁶⁾。

今回我々は、蛋白質の高次構造を構成する鍵になる蛋白質内ジスルフィド結合 (-S-S-結合) に注目し、蛋白質の構造安定性及び機能に与える影響を検討した。L-PGDS の構造安定性については DSC による熱変性反応を測定し、機能については L-PGDS に対する疎水性低分子結合能を調べた。その結果、ジスルフィド結合を保存した L-PGDS は、ジスルフィド結合非保存 L-PGDS に比べて、熱に対して非常に安定であり、且つ疎水性低分子結合能が高いことが示された。以上の結果から、蛋白質内のジスルフィド結合は、高次構造を維持するために必須であり、蛋白質の持つ機能に対しても非常に重要な働きをしていることが示唆された。

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 4B (Amersham Biosciences) に結合させた後、トロンピン(100 単位/100 μ l)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。

遺伝子を組換えた 2 種類の L-PGDS (ジスルフィド結合保存型: Ala¹-L-PGDS、および非保存型: Ala^{2,3}-L-PGDS) を作製し、熱変性と疎水性低分子結合能の測定を行った。

2) 試料の調製

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 μ m Ultrafree-CL (Millipore) で遠心ろ過した後、蛋白質定量を行い、L-PGDS 濃度を 1 mg/ml に調製した。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・脱気したものを用いた。

蛍光消光効果測定においては、DSC と同様に pH 4.0 で透析し、最終試料濃度は 1.5 μ M を用いた。

3) DSC 測定

熱量測定には、MicroCal 社の VP-DSC を用い、1 $^{\circ}$ C/min で昇温し、Ala¹-L-PGDS は 5 $^{\circ}$ C \sim 100 $^{\circ}$ C、Ala^{2,3}-L-PGDS は 5 $^{\circ}$ C \sim 75 $^{\circ}$ 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⁷⁾。

4) 蛍光消光効果測定

L-PGDS 内因性トリプトファン残基の疎水性低分子による蛍光消光効果を利用して、解離定数 (K_d) を求めた。

蛍光消光効果測定には、島津分光蛍光光度計 (Shimadzu RF-1500) を用い、励起光 295 nm に対する 338 nm の蛍光強度を室温で測定した。疎水性低分子 (リガンド) として、血中ヘムの代謝産物であるビリベルジン (BV: $\epsilon_{377}=51500\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)、ビリルビン (BR: $\epsilon_{453}=61700\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)、およびビタミン A 誘導体であるレチノイン酸 (RA: $\epsilon_{336}=45000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を用い、各リガンド濃度に対する L-PGDS 内因性トリプトファン残基の蛍光強度変化を測定し、Cogan らの方法を用いて L-PGDS に対する K_d 値を求めた⁸⁾。

3. 結果および考察

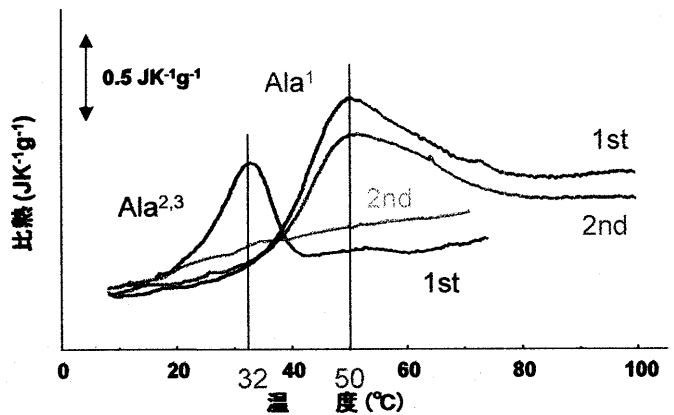


図 1. Ala¹-および Ala^{2,3}-L-PGDS の DSC 曲線

図 1 に、pH 4.0 における Ala¹-L-PGDS と、Ala^{2,3}-L-PGDS の DSC 曲線を示す (図 1, Ala¹-1st & Ala^{2,3}-1st)。縦軸は温度に対する比熱を示す。Ala¹-L-PGDS においては、20 $^{\circ}$ C 付近から変性に伴うタンパク質の比熱の増大がみられ、50 $^{\circ}$ C でピークに達し、80 $^{\circ}$ C 付近で変性が終了している。変性の前後での比熱の差 ΔC_p は 0.4 $\text{JK}^{-1}\text{g}^{-1}$ であった (図 1, Ala¹-1st)。また、熱変性における L-PGDS の可逆性を調べるために、試料溶液を

Ala¹-L-PGDS では 5℃~100℃の範囲まで昇温後、セル内で冷却し、再度昇温させた(図 1, Ala¹-2nd)。その結果、Ala¹-L-PGDS では 2 回目の熱走査においても 1 回目とほぼ同様の DSC 曲線が得られ、pH 4.0 において熱変性に対して可逆性を持つことが判明した。

一方、Ala^{2,3}-L-PGDS の DSC 曲線においては、10℃付近から変性に伴うタンパク質の比熱の増大がみられ、32℃でピークに達し、40℃付近で変性が終了している。変性の前後での比熱の差 ΔC_p は $0.18 \text{ JK}^{-1}\text{g}^{-1}$ であった(図 1, Ala^{2,3}-1st)。また、可逆性を調べるために、試料溶液を Ala^{2,3}-L-PGDS では 5℃~75℃の範囲まで昇温後、セル内で冷却し、再度昇温させた(図 1, Ala^{2,3}-2nd)。その結果、2 回目の熱走査においては明確なピークが観測されず、Ala^{2,3}-L-PGDS は、熱変性において不可逆性を示した。以上の結果から、Ala^{2,3}-L-PGDS は Ala¹-L-PGDS に比べ、変性に伴う熱量が低く、構造が不安定であることが示唆され、ジスルフィド結合は、蛋白質のフォールディングに重要な役割を果たしていることが示された。

図 2 は、pH 4.0 における疎水性リガンドに対する Ala¹-L-PGDS の内因性トリプトファン蛍光消光効果測定の結果を示す。DSC 測定において、酸性条件下(pH 4.0)で Ala¹-L-PGDS に可逆性があることが判明したため、同条件における疎水性低分子結合能をトリプトファンの蛍光消光作用から調べた。縦軸は、各リガンド濃度に対する相対蛍光強度(%)を示す。図より、リガンドの濃度依存的に蛍光強度が落ちていることがわかる。特にピリベルジン、ピリルビンにおける相対蛍光強度は、リガンド濃度が、10 μM 存在下において、それぞれ 16.0%および 12.7%まで低下した。一方、レチノイン酸においては、10 μM 存在下で、相対蛍光強度は 65.8%であった。

表 1 は、pH 4.0 における Ala¹-および Ala^{2,3}-L-PGDS の各リガンドに対する解離定数(K_d)を示したものである。 K_d 値は、1つの化合物が 2つ以上の化合物やイオンに解離するときの平衡定数であり、高親和性であれば K_d 値は小さい。

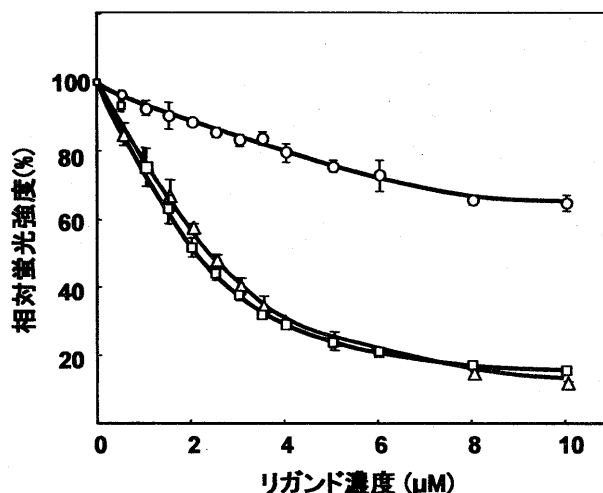


図 2. pH 4.0 における Ala¹-L-PGDS の蛍光消光効果測定
(○: レチノイン酸, □: ピリベルジン, △: ピリルビン)

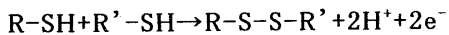
	pH	K_d (nM)		
		ピリベルジン	ピリルビン	レチノイン酸
Ala ¹ -L-PGDS	4.0	200	250	890
Ala ^{2,3} -L-PGDS	4.0	270	410	1100

表 1. pH 4.0 における Ala¹-および Ala^{2,3}-L-PGDS の各リガンドに対する解離定数(K_d)

Ala¹-L-PGDS の各リガンドに対する K_d 値は、ピリベルジン、ピリルビン、レチノイン酸の順に、200、250、890 nM であり、Ala^{2,3}-L-PGDS では、それぞれ 270、410、1100 nM であった。この結果から、Ala¹-L-PGDS は、Ala^{2,3}-L-PGDS と比較して、実験に用いたすべてのリガンドに対して高親和性に結合することが明らかになった。

Ala¹-および Ala^{2,3}-L-PGDS の 3 次構造は、8本の β シートおよび 1本の α ヘリックスとランダムコイルによるバレル構造(樽型構造)を形成する⁹⁾。L-PGDS はこのバレル内に疎水性低分子を結合し、輸送すると考えられる。DSC 測定より、ジスルフィド結合保存型 Ala¹-L-PGDS は、変性に伴う熱量が高く、非常に安定な構造をとっている。

ることがわかった。また、ジスルフィド結合非保存型 Ala^{2,3}-L-PGDS は、変性に伴う熱量が低く、構造が不安定な状態であることがわかった。一方、L-PGDS の疎水性低分子結合能も、蛋白質の高次構造と密接に関係しており、ジスルフィド結合の有無による結合定数の差異として現れた。以上の結果から、蛋白質内のジスルフィド結合は、L-PGDS のバレル構造のような高次構造を維持するために必須であり、蛋白質の持つ機能に対しても非常に重要な働きをしていることが示唆された。ジスルフィド結合の形成は、化学的には2つのシステインのチオール基の酸化反応である。



上記の過程で2つの電子が放出されるが、この電子捕捉を行う過程には、様々な酵素触媒や低分子物質が関与するといわれている¹⁰⁾。L-PGDS においてもジスルフィド結合形成に関する酵素あるいは低分子物質の存在も考えられるため、今後、ジスルフィド結合形成のメカニズムについても検討していきたい。また、L-PGDS の温度に対する酵素活性と疎水性低分子結合能を調べ、本酵素の熱安定性と機能との相関関係を明らかにしていきたいと考えている。

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との共同研究であり、記してここに謝意を表したいと思います。

なお、この研究は、(財)日本応用酵素協会15年度研究助成金 A(研究代表者・乾 隆)を受けて行ったものです。

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) Tanaka, T., Urade, Y., Eguchi, N., Nishikawa, A., and Hayaishi, O. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15789-15795.
- 4) Beuckmann, C. T., Aoyagi, M., Okazaki, I., Hiroike, T., Toh, H., Hayaishi, O. and Urade, Y. (1999) *Biochemistry* **38**, 8006-8013.
- 5) Inui, T., Ohkubo, T., Urade, Y., and Hayaishi, O. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 641-646.
- 6) 飯田, 金森, 奥山, 乾 (2003) 三重短大紀要 **51**, 1-4
- 7) Takahashi, K., and Sturtevant, J. M. (1981) *Biochemistry* **20**, 6185-6190.
- 8) Cogan, U., Kopelman, M., Mokady, S., and Shinitzky, M. (1976) *Eur. J. Biochem.* **65**, 71-78
- 9) Irikura, D., Kumasaka, Y., Yamamoto, M., Urade, Y., and Hayaishi, O. (1999) *Sleep Research Online*. **2**(Suppl.1), 125
- 10) 門倉 広 (2003) 蛋白質 核酸 酵素, **48**, 1386-1393

*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。