

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の熱変性機構における

疎水性低分子結合の効果

飯田津喜美・田中晶善*・山添和香*・乾 隆**

*三重大学生物資源学部 **大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

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

Tsukimi IIDA, Akiyoshi TANAKA, Waka YAMAZOE 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。経口摂取されたリノール酸からアラキドン酸は生合成され、細胞膜にリン脂質として貯蔵されている。そしてホスホリパーゼ A₂ によって遊離され PGs の中間代謝産物である PGH₂ となる。PGH₂ は、シクロオキシゲナーゼによる酵素反応により合成され、さらに各種細胞に存在する特異的な合成酵素により PGs に変換される。PGD₂ は中枢神経系において、睡眠誘発、体温調節、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), 3)}。

PGD₂ を合成する重要な酵素としては、中枢神経系、ほ乳類の生殖器およびヒトの心臓に多く局在するリポカリン型 PGD 合成酵素(L-PGDS)が同定されている。L-PGDS は疎水性低分子輸送蛋白質群であるリポカリン遺伝子ファミリーに属する。リポカリン蛋白質群は、レチノール結合蛋白質、β-ラクトグロブリン、ビリジン結合蛋白質、tear リポカリンなどを含め、既に 100 種類以上が報告されている。また、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 万程度の分泌性蛋白質である。さらに、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⁴⁾。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 シートからなり、疎水性低分子(リガンド: L) 結合部を囲むようなバレル(樽)型になっている。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⁵⁾。L-PGDS は *in vitro* において細胞分化に重要なレチノイド、胆汁色素であるビリルビン・ビリベルジン、あるいは甲状腺ホルモンなどの疎水性生理活性物質を高親和性に結合することが報告されている⁶⁾。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ことがわかる。

蛋白質が安定した立体構造を形成するために必要な諸条件については現在も不明な点が多いが、様々な条件下で蛋白質の構造活性相関を調べることは、理論的にも、あるいはバイオテクノロジー等への応用にも非常に重要である。

これまでに我々は、断熱型示差走査熱量計(DSC)を用いて L-PGDS の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。その結果、L-PGDS は酸性条件下(pH 4.0)で熱変性において可逆性を示し相転移の中間点を示す変性ピーク温度が 50°C 付近であることを明らかにした⁷⁾。また、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 の熱変性では分子間の解離会合が伴わないこと、天然状態(N)から変性状態(アンフォールディング状態 U)に転移する熱変性過程においてひとつの平衡中間体(intermediate: I)が存在するこ

とを報告した⁷⁾.

N ⇌ I ⇌ U (1)

また、L-PGDS 内因性トリプトファン残基の蛍光消光効果測定により、L-PGDS は酸性条件下において、30℃では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(解離定数 $K_d=200\text{nM}$)を持つことを報告した⁸⁾.

今回我々は、新たに L-PGDS の蛍光消光効果測定について、L-PGDS と疎水性リガンド結合の温度依存性を調べた。また、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 とビリベルジンのモル比率を変えて DSC 測定を行った。その結果、蛍光消光効果測定では、50℃においてもある程度結合能を維持していることがわかった。さらに、DSC 測定では、ビリベルジンの結合により、L-PGDS の熱安定性が上昇し L-PGDS とビリベルジンのモル比率1で熱安定性が最大になることが判明した。

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 4B (GE Healthcare) に結合させた後、トロンピン(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(GE Healthcare)でゲルろ過後、Mono-Q カラムクロマトグラフィー(GE Healthcare)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 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。

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 μM とした。

3) ビリベルジン溶液の調製

疎水性リガンドとして、ヘムの代謝産物であり、ポルフィリン環を持つ分子量 582.7 のビリベルジンを用いた。DSC 測定には、L-PGDS 0.5 mg/ml (25 μM)に対し、ビリベルジン濃度をそれぞれ 0、5、10、20、25、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) 蛍光消光効果測定

蛍光消光効果測定には、日立分光蛍光光度計(HITACHI RF-4500)を用い、励起光 295 nm に対する 338 nm の蛍光強度を 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃で測定した。各リガンド濃度での L-PGDS 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⁹⁾。

4) DSC 測定

熱量測定には、MicroCal 社の VP-DSC を用い、1℃/min で昇温し、5℃~100℃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た。蛋白質濃度は全て 0.5 mg/ml(25 μM)とし、ビリベルジン濃度は、0、5、10、20、25、50 μM を用いた。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、MicroCal 社の解析ソフト Origin(Ver.5)により、既報の方法で求めた¹⁰⁾。

3. 結果及び考察

図 1 は、pH 4.0 における L-PGDS 内因性トリプトファンの蛍光消光効果測定結果を示す。横軸はビリベルジン濃度、縦軸は蛍光相対強度を示す。30℃では、ビリベルジン濃度の上昇と共に蛍光強度が減少し、ビリベルジン 10 μM では 20%程度となった。L-PGDS とビリベルジン間での蛍光消光効果が観測されるためには、互いが近距離で結合している必要があることから、ビリベルジンはしっかりと L-PGDS のバレル構造のポケット部分におさまった状態であると考えられる。

試料溶液の温度を上昇させると、L-PGDS の立体構造が崩れ、ビリベルジンを結合できず蛍光強度の変化も少なくなったが、中間体が多いと考えられる 50℃でも、十分に蛍光消光効果が観測されることが判明した。これらの結果から、L-PGDS-ビリベルジン複合体の K_d 値は、30℃では 190 nM となり、前回の報告と同様に高い結合能を示し、また、50℃でも 570 nM と結合能を維持していることがわかった。しかし、60℃以上ではほとんど結合しないこともわかった。

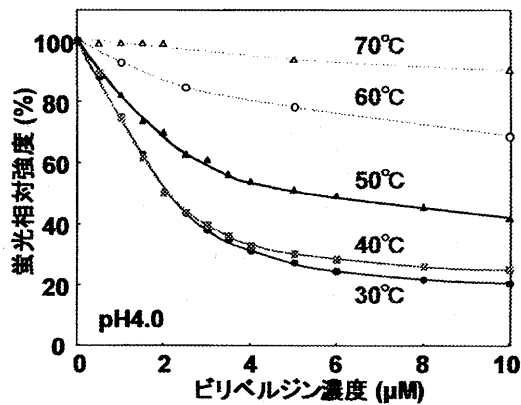


図1. pH4.0 におけるビリベルジンの蛍光消光効果測定

図2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 DSC 曲線である。横軸は温度、縦軸は比熱を示す。モル比率は 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2 である。ビリベルジン非存在下での DSC 曲線では、20℃付近より変性のため比熱の増大が始まり矢印の部分の 50℃付近に変性のピークがみられ、80℃付近で変性が終了していることがわかる。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、また DSC 曲線が示す面積量から L-PGDS の構造を壊すために多くの熱エネルギーが必要であることがわかった。

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三状態転移であることを報告している⁷⁾。

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。変性段階 $N \rightleftharpoons I$ における変性の midpoint 温度を T_{m1} 、 $I \rightleftharpoons U$ における変性の midpoint 温度を T_{m2} で示す。ビリベルジン非存在下では、 T_{m1} 51.1℃、

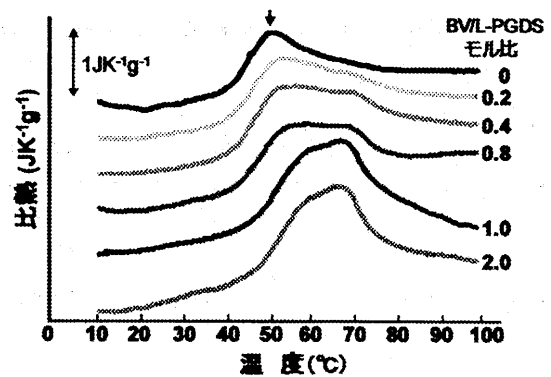


図2. pH4.0 での L-PGDS の熱変性におけるビリベルジンの効果

T_{m2} 60.9℃であったが、ビリベルジン濃度 25 μ M (モル比率 1) においては、58.6℃、69.5℃となり上昇傾向を示した。ビリベルジン濃度 50 μ M (モル比率 2) では 58.2℃、67.5℃であった。

変性に伴う熱測定エンタルピー量 (Δh_{cal}) は、ビリベルジン非存在下では、1gあたり 16.8 J であった。また、ビリベルジン濃度が 5 μ M では、16.4 J となり、ほぼ同程度の値を示した。しかし、ビリベルジン濃度が 10 μ M 以上では、ビリベルジンの濃度依存的に Δh_{cal} の上昇が観測された。一方、ビリベルジン濃度が 50 μ M (モル比率 2) では 22.1 J となり、モル比率 1 の場合 (23.7 J) と比較して、ほとんど変化がみられなかった。以上の結果から、L-PGDS は熱変性において、疎水性リガンドであるビリベルジンとの結合により安定性が上昇することが判明した。

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、リガンド結合に伴う疎水性相互作用や分子間相互作用 (ファンデルワールス力) に関連した結合をほどこためのエネルギーが加算されている、つまり、リガンド結合がエンタルピー変化に関与していると考えられる。

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。また、リガンド結合に伴う蛋白質の熱安定化には、モル比率の影響を受けるとの報告がある。¹¹⁾

L-PGDS の熱変性機構は先に述べた (1) のとおりであるが、今回の実験から考察される L-PGDS の疎水性リガンド結合による熱変性機構は、例えば、モル比率 2 のビリベルジン濃度 50 μ M では、疎水性リガンド

表1. L-PGDS とビリベルジン複合体の DSC 曲線の
数値解析結果

BV 濃度 (μM)	Mole ratio	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta h_{\text{cal}}/\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$
0	0	51.1	60.9	16.8
5	0.2	54.0	67.7	16.4
10	0.4	53.3	67.4	19.6
20	0.8	55.1	67.9	20.2
25	1	58.6	69.5	23.7
50	2	58.2	67.5	22.1

過剰な状態であり、通常ならばルシャトリエの法則より N の状態に戻ろうとする平衡化エネルギーが働き、より多くのエネルギーを必要とするため Δh は上昇傾向を示すはずであるが、今回の実験結果においては顕著な傾向がみられなかった。以上のことから、L-PGDS の疎水性リガンド結合による熱変性機構は、以下の式で示される。



今後、さらに L-PGDS の DSC 曲線の詳細な解析を行い、他の疎水性リガンドを用いた L-PGDS の熱安定性に関する研究を続ける予定である。

4. 結論

L-PGDS は熱変性において、pH 4.0 では疎水性低分子との結合により熱安定性が上昇することが判明した。また、疎水性低分子結合状態での L-PGDS の熱変性機構として、リガンドが結合した状態の中間体 (IL) および変性状態 (アンフォールディング状態 UL) の存在が示唆された。

謝辞

本研究は、大阪大学蛋白質研究所後藤祐児教授、同大橋祐美子氏との共同研究であり、記して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) 及び平成 17 年度文部科学省科学研究費補助金(基盤研究 B, 課題番号: 17300165, 研究代表者; 乾 隆) 並びに津市からの助成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) 室田誠逸他 (2001) 現代化学増刊, 38
- 4) Akerstrom, B., Flower, DR., and Salier, JP. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 1-8
- 5) Flower, DR., North ACT., and Sansom, CE. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 9-24
- 6) Inui, T., Ohkubo, T., Emi, M., Irikura, D., Hayaishi, O., and Urade, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 2845-2852
- 7) 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
- 8) 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
- 9) Cogan, U., Kopelman, M., Mokady, S., and Shinitzky, M. (1976) *Eur. J. Biochem.* 65, 71-78
- 10) Takahashi, K., and Sturtevant, JM. (1981) *Biochemistry* 20, 6185-6190
- 11) Celej, MS., Montich, GG., and Fidelio, GD. (2003) *Protein Science* 12, 1496-1506