

称号及び氏名 博士（応用生命科学） 宮本 優也

学位授与の日付 平成24年3月31日

論文名 **Characterization of Structure, Ligand-binding Ability, and Thermal Stability of Mouse Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase**

(マウス由来リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の構造と低分子結合能, および熱安定性の解析)

論文審査委員 主査 乾 隆

副査 北村 進一

副査 杉本 憲治

論文要旨

序論

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS, EC 5.3.99.2) は、分子量約 19,000 の蛋白質であり、哺乳動物の中樞神経系において高発現している。L-PGDS は、プロスタグランジン (PG) H₂ を基質として睡眠誘発作用を有する PGD₂ を合成する酵素である。また、本蛋白質は、アミノ酸配列の相同性から生体内輸送蛋白質群であるリポカリンファミリーに属する。リポカリンファミリーは、140-200 残基の分泌型蛋白質により構成されており、生体内において疎水性低分子を結合し、貯蔵や運搬に関与すると考えられている。L-PGDS は、*in vitro* において、ビタミン A 誘導体や血中ヘム代謝産物などの疎水性低分子を高い親和性で結合することが知られている。

また、L-PGDS は中樞神経系における N 型糖鎖転移異常に対する診断マーカーになることが報告されており、脳脊髄液中の L-PGDS 濃度は、神経疾患に対する有用な臨床マーカーになることが期待されている。これまでに我々の研究グループは、くも膜下出血後の脳脊髄液中の L-PGDS 濃度が一過性に上昇するとともに、血中ヘムの代謝産物である biliverdin を結合することを明らかにしている。以上のように、L-PGDS は様々な疎水性低分子との結合能を有するが、蛋白質の構造に基づいた研究が少ないため、詳細な疎水性低分子認識様式や結合様式は未だ解明されていない。

さらに、我々の研究グループは蛋白質の構造と安定性の関係について知見を得るために、

L-PGDS の変性メカニズムを調べている。これまでに、酸性条件下において、マウス由来 L-PGDS の熱変性過程が可逆的であること、天然状態 (N) と変性状態の間にひとつの中間状態 (I) が存在することが明らかとなっている。しかし、中間状態における立体構造や変性に伴う構造変化については明らかになっていない。

本研究では、L-PGDS の疎水性低分子認識様式の解明を目的として、X線小角散乱 (SAXS)、および多次元 NMR 法を用いて、マウス由来 L-PGDS、および L-PGDS と血中ヘム代謝産物の biliverdin との複合体の溶液状態における構造解析を行った。また、L-PGDS の構造と熱安定性の関係を調べるために、NMR、および CD 分光法を用いて酸性条件下における本蛋白質の熱変性中間体について調査した。

第1章 X線小角散乱および多次元 NMR 法を用いたマウス由来リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素/biliverdin 複合体の構造解析

実験には触媒残基である Cys65 を Ala に置換した酵素活性を持たない C65A L-PGDS 変異体を使用した。まず、L-PGDS と biliverdin の結合親和性は、内因性 Trp 残基の蛍光消光作用を用いて、25 °C、pH 4.0 において調べた。その結果、L-PGDS は biliverdin と解離定数 590 nM で結合することがわかった。

次に、biliverdin 結合による L-PGDS の構造変化を調べるため、L-PGDS、および L-PGDS/biliverdin 複合体の SAXS 実験を行った。SAXS 実験は、SPRING-8 のビームライン BL40B2 において、X線波長 1.0 Å、カメラ長 1.0 m の条件で行った。L-PGDS と L-PGDS/biliverdin 複合体の散乱曲線は、biliverdin 結合に関わらず L-PGDS が球状蛋白質であることを示した。散乱曲線の小角領域をギニエプロット解析した結果、L-PGDS、および L-PGDS/biliverdin 複合体の慣性半径は、それぞれ 19.2 Å、および 17.9 Å となり、biliverdin 結合に伴い本蛋白質の慣性半径が 1.3 Å 小さくなることが判明した。また、L-PGDS と L-PGDS/biliverdin 複合体の距離分布関数を比較すると、biliverdin 結合により分子の最大長が約 3.0 Å 減少していることが明らかとなった。

L-PGDS の溶液構造を決定するために、¹⁵N 標識、および ¹³C/¹⁵N 標識蛋白質を用いて、L-PGDS の各種多次元異核 NMR スペクトルを測定した。得られたスペクトルを解析することにより、L-PGDS のほぼ全ての炭素、窒素、水素原子由来の NMR シグナルを帰属した。水素原子間距離情報を反映する NOE から得られた 1479 個の距離制限と主鎖原子のケミカルシフトから得られた 202 個の主鎖二面角制限を用いて、L-PGDS の立体構造を計算した結果、本蛋白質は 8 本のβストランド (A-H) からなるβバレル構造と 2 本のαヘリックス (H2, H3)、および 1 本の₃₁₀ヘリックス (H1) を持つことが判明した (PDB code: 2RQ0)。

L-PGDS の biliverdin 結合部位を同定するために、0.5 mM の L-PGDS に対して、0-0.3 mM になるように biliverdin を滴定し、それに伴う HSQC シグナルの変化を解析した。Biliverdin 濃度の上昇と共に、βバレル、EF ループ、および H2 ヘリックスのアミノ酸残基由来のシグナルが大きくシフト、または消失することが判明した。滴定実験の結果から、L-PGDS は biliverdin を 'multiple binding modes' によりβバレル内部に結合し、その結合に伴い EF ルー

プ、および H2 ヘリックスの構造が変化することが示唆された。

第2章 NMRおよびCD分光法を用いたマウス由来リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の熱変性中間体の解析

マウス由来 L-PGDS の熱変性過程を詳細に調べるため、pH 4.0, 25–60 °C において C65A L-PGDS の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した。天然状態に相当する 25 °C と N \leftrightarrow I 転移の転移温度付近の 45 °C における HSQC スペクトルを比較したところ、HSQC シグナルのシフト、およびシグナルが消失するアミノ酸残基が観測された。シグナルがシフトしたアミノ酸残基は、芳香族残基の側鎖近傍に位置しており、L-PGDS の側鎖の相互作用が変化したことを示唆している。また、HSQC シグナルが消失した残基は β バレルの上部に位置していた。これは、 β バレル上部において NMR タイムスケールでの異なる構造間の交換が存在すること示しており、 β バレル上部の構造が変化していると考えられる。さらに、中間体の割合が最も多く存在する 54 °C において、 β バレルの底部に位置するアミノ酸残基のシグナルは天然状態と同じケミカルシフトで観測された。これは、 β バレルの底部の主鎖構造が中間状態において保持されていることを示している。

熱変性に伴う局所的な構造変化を調べるため、マウス由来 L-PGDS の 2 つの Trp 残基 (Trp43 および Trp54) に着目した。Trp43, および Trp54 残基はそれぞれ β バレル底部、および上部に位置している。 β バレル上部の構造変化を調べるため、C65A L-PGDS の 1D ^1H -NMR スペクトルを 25–80 °C において測定した。その結果、25 °C において 10.17 ppm に観測された天然状態に対応する Trp54 残基の NH ϵ シグナルが温度上昇に伴って消失する一方、10.0 ppm に新たに出現した NH ϵ シグナルの強度は増加した。これら 2 つのシグナル強度比の van't Hoff plot 解析から、その転移温度が 41.4 °C であることが判明した。次に、 β バレル底部の側鎖の構造変化を調べるため、 β バレル底部の Trp43 残基のみを持つ W54F/C65A 変異体の 290 nm における CD 強度変化を測定した。二状態転移モデルで解析したところ、転移温度は 47.5 °C と求められた。以上の結果より、N \leftrightarrow I 転移において β バレル上部の構造は底部の側鎖構造よりも低温で変化することがわかった。

さらに、内因性 Trp 残基の蛍光消光作用を用いて、熱変性中間状態 (54 °C, pH 4.0) における低分子結合能を調べた。その結果、中間状態において、L-PGDS は biliverdin と解離定数 830 nM で結合することがわかった。

結論

L-PGDS は 8 本の β ストランド (A–H) からなる β バレル構造と 2 本の α ヘリックス (H2, H3), および 1 本の 3_{10} ヘリックス (H1) を持つことが判明した。

本蛋白質の疎水性低分子結合メカニズムは次のように考えられる。まず、L-PGDS は疎水性相互作用によって疎水性低分子を β バレル内部に取り込み、球状構造を保ちながら EF ループ、および H2 ヘリックスの相対的な位置を変化させる。それに伴い、蛋白質全体がコンパクトになると考えられる。このような構造的柔軟性が、幅広い疎水性低分子選択性を可

能にしていると考えられる。

本蛋白質の熱変性中間状態において、L-PGDS の β バレル上部の構造、および側鎖の相互作用は消失しているが、バレル底部の主鎖構造は天然状態を維持していることが示唆された。また、中間状態においても低分子結合能が保持されていることから、バレル底部の構造が疎水性低分子結合に重要であると考えられる。

審査結果の要旨

生体内における諸反応は、それに関わる分子の構造を明らかにして初めて正確に理解することができる。特に、蛋白質の構造と機能の相関を明らかにすることは、創薬研究にとって必須であり、新薬開発への重要な手がかりを与えてくれる。

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) は、哺乳動物の中枢神経系において高発現しており、プロスタグランジン (PG) H_2 を基質として睡眠誘発作用を有する PGD₂ を合成する酵素である。また、本蛋白質は、アミノ酸配列の相同性から生体内輸送蛋白質群であるリポカリンファミリーに属しており、*in vitro* において、ビタミン A 誘導体や血中ヘム代謝産物などの疎水性低分子を高い親和性で結合する。このように L-PGDS は多機能蛋白質であることが知られているが、立体構造に基づいた研究が少ないため、疎水性低分子認識様式や結合様式は未だ解明されていない。一方、本蛋白質のような多機能蛋白質の熱変性メカニズムを調べることは、機能性蛋白質の安定化や人工蛋白質の設計にもつながると考えられる。このような観点から、学位申請者は、マウス由来 L-PGDS の立体構造を明らかにするとともに、L-PGDS の疎水性低分子結合メカニズム、及び熱安定性についての研究を行った。

第 1 章では、マウス由来 L-PGDS の疎水性低分子結合メカニズムの解明を目的とし、X 線小角散乱、及び多次元 NMR 法を用いた L-PGDS、及び biliverdin との複合体の構造解析を行った。L-PGDS の内因性 Trp 残基の蛍光消光作用を用いて、biliverdin に対する結合親和性を調べたところ、L-PGDS は biliverdin を解離定数 590 nM で結合することが判明した。また、L-PGDS/biliverdin 複合体の X 線小角散乱実験を行った結果、biliverdin の結合により、L-PGDS の慣性半径が 1.3 Å 小さくなることを分った。L-PGDS と L-PGDS/biliverdin 複合体の距離分布関数を解析することにより、biliverdin 結合により、分子の最大長が約 3.0 Å 減少していることが判明した。次に、多次元 NMR 法により、L-PGDS の溶液構造を決定した。その結果、L-PGDS は 8 本の β ストランドからなる β バレル構造と 2 本の α ヘリックス、及び 1 本の 3_{10} ヘリックスを持つことが分った (PDB code: 2RQ0)。さらに、L-PGDS の biliverdin 結合部位を同定するために、NMR 法を用いた結合実験を行い、L-PGDS の β バレル内部に biliverdin が結合することを明らかにし、

その結合に伴い EF ループ，及び H2 ヘリックスの構造が変化することを示した。以上の結果から学位申請者は，L-PGDS の疎水性低分子結合メカニズムを次のように考察した。L-PGDS は，疎水性相互作用によって疎水性低分子を β バレル内部に取り込み，EF ループ，及び H2 ヘリックスの相対的な位置を変化させ，蛋白質全体がコンパクトになる。また，この構造的柔軟性が，幅広い分子量を持ち，且つ異なった構造を有する様々な疎水性低分子との結合を可能にしている。

第2章では，L-PGDS の立体構造と熱安定性の関係を解明するために，NMR，及び円偏光二色性分光法を用いて L-PGDS の熱変性中間体を解析した結果について示している。温度上昇に伴う NMR 測定を行い，天然状態から中間状態への転移過程において，L-PGDS 側鎖の相互作用と β バレル上部の構造が変化することを示した。また，中間状態においては， β バレル底部の主鎖構造が保持されることを明らかにした。さらに，熱変性に伴う局所的な構造変化を調べるため，マウス由来 L-PGDS の2箇所 Trp 残基に着目した解析を行った。L-PGDS の β バレル上部に位置する Trp54 について解析を行い， β バレル上部の転移温度が 41.4 °C であることを示した。次に， β バレル底部に位置する Trp43 のみを持つ W54F 変異体について解析を行い， β バレル底部の側鎖構造の転移温度が 47.5 °C であることを示した。以上の結果より，天然状態から中間状態への転移において， β バレル上部の構造は底部の側鎖構造よりも低温で変化することを示した。さらに，L-PGDS の内因性 Trp 残基の蛍光消光作用から，熱変性中間状態が低分子結合能を保持することを明らかにした。以上の結果から，L-PGDS の熱変性中間状態において， β バレル上部の構造，及び側鎖の相互作用は消失しているが， β バレル底部の主鎖構造は天然状態を維持していると結論づけた。

本研究では，マウス由来 L-PGDS の立体構造を解明するとともに，その立体構造情報を基に L-PGDS の疎水性低分子結合メカニズムを明らかにし，さらに L-PGDS の構造と熱安定性の関係について詳細に調べている。これらの知見は，蛋白質の構造と機能の相関を明らかにするとともに，機能性蛋白質や人工蛋白質の設計や開発の礎となり，蛋白質科学，及び生物物理化学分野に大きく貢献するものである。よって，最終試験の結果とあわせて，博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。