

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	久米 慧嗣
学位授与の日付	平成25年3月31日	
論文名	Systematic Interaction Analysis of Human Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase with Small Lipophilic Ligands (リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の脂溶性低分子に対する系統的相互作用解析)	
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

序章

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) は中枢神経系に高発現し、ヒト脳脊髄液中において血清アルブミンに次いで 2 番目に多く存在するタンパク質である。臨床的な側面において、脳脊髄液中における本タンパク質の濃度は、クモ膜下出血、正常圧水頭症、および脊柱管狭窄症のような神経疾患の発症と密接に関係しており、これら疾患のバイオマーカーとして期待されている。また、L-PGDS は、アラキドン酸由来のプロスタグランジン (PG) H₂ から生理的な睡眠誘発作用を持つ PGD₂ への異性化反応、活性酸素スカベンジャー、および脂溶性低分子の生体内輸送タンパク質としての機能を併せ持つ多機能タンパク質である。多次元核磁気共鳴法、および X 線結晶構造解析を用いた構造生物学的解析により、本タンパク質は、リポカリン属に特有である 8 本の β -ストランドから形成されるバレル (樽状) 構造を持ち、その内部に脂溶性リガンドの結合に関わる疎水性ポケットを有していることが報告されている。これまでの *in vitro* 結合実験の結果により、マウスやラット由来 L-PGDS が、ヘム代謝産物であるビリベルジンやビタミン A 誘導体であるレチノイン酸などの様々な脂溶性低分子と結合することが明らかとなっている。しかし、L-PGDS と脂溶性低分子の相互作用における熱力学的な駆動力は未だ解明されていない。

本研究では、L-PGDS の輸送タンパク質としての機能に着目して、物理化学的な実験手法

(内因性 Trp 残基の蛍光消光効果, 誘起円偏光二色性分光法, および等温滴定型熱測定法) を用いてヒト由来 L-PGDS の様々な脂溶性低分子に対する分子間相互作用の特性, 特に結合選択性, 結合親和性, 結合比, および熱力学的な駆動力を解明することを目指した。

第1章 蛍光消光効果, 誘起円偏光二色性分光法, および等温滴定型熱測定法を用いたリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素とヘム代謝産物との分子間相互作用解析

L-PGDS は3つの内因性 Trp 残基を有しており, これら Trp 残基の蛍光消失効果 (励起波長: 290 nm, 蛍光波長: 334 nm, 25 °C, pH 8.0) を利用して, ヘム代謝産物であるビリベルジン, ビタミンA誘導体であるレチノイン酸, 甲状腺ホルモンである L-サイロニン, 黄体ホルモンであるプロゲステロン, および植物フラボノイドであるゲニステインに対する結合親和性を測定した。すべての脂溶性低分子において, リガンド濃度依存的な蛍光強度の減少が観測された。この結果により, L-PGDS がこれら脂溶性低分子と結合することが判明し, 脂溶性低分子に対して幅広い結合選択性を持つことが示唆された。特に, ビリベルジンに対する L-PGDS の解離定数 (K_d) は 19.5 nM であり, 他の脂溶性リガンド ($K_d = 308 \text{ nM} \sim 11.3 \text{ }\mu\text{M}$) と比較して非常に高い結合親和性を有することが明らかとなった。そこで, ビリベルジンと L-PGDS との結合状態を詳細に調査するために, 円偏光二色性分光法を用いた両者の相互作用解析を行った (pH 8.0, 25 °C)。その結果, 本タンパク質はビリベルジン濃度依存的に2種類の異なる結合反応を呈し, ビリベルジンに対して2個の結合部位 (高親和, および低親和結合部位) が存在することを見出した。また, 得られた K_d 値は, 高親和結合部位において 2.8 nM, 低親和結合部位において 710 nM であった。さらに, 両者の相互作用における熱力学パラメータを決定するために, 等温滴定型熱測定法を用いた相互作用解析を行った。ビリベルジン溶液 (41.7 μM) に対して L-PGDS (500 μM) を逆滴定したところ, 両者の結合に伴って発熱, および吸熱反応が観察された (pH 8.0, 25 °C)。本測定結果を解析したところ, L-PGDS は, 2分子のビリベルジンを高親和 ($K_d = 6.6 \text{ nM}$), および低親和結合部位 ($K_d = 1.2 \text{ }\mu\text{M}$) にそれぞれ結合することが確認された。また, 高親和結合部位における結合のギブスエネルギー変化 (ΔG_b°), エンタルピー変化 (ΔH_b°), およびエントロピー変化項 ($-T\Delta S_b^\circ$) は, それぞれ $-46.6 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-12.6 \text{ kJ mol}^{-1}$, および $-34.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ であった。一方, 低親和結合部位における ΔG_b° , ΔH_b° , および $-T\Delta S_b^\circ$ は, それぞれ $-33.8 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-23.9 \text{ kJ mol}^{-1}$, および -9.9 kJ mol^{-1} であった。得られた熱力学パラメータより, 有利なエンタルピー変化, およびエントロピー利得両方がビリベルジンとの相互作用に重要であることが示唆された。さらに, ヘム代謝産物であるヘミン, およびビリルビンにおいても同測定を試みたところ, L-PGDS はこれらヘム代謝産物を高親和, および低親和性により結合することが判明した。

以上より, ヘム代謝産物に対する L-PGDS の高親和, および低親和結合性は, ヘムスカベンジャーとして機能するために重要であることが考察された。

第2章 等温滴定型熱測定法を用いたリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素と脂溶性低分子との相互作用における熱力学的解析

等温滴定型熱測定法を用いて L-PGDS と様々な脂溶性低分子との相互作用における熱力学的な駆動力の解明を試みた。本実験には、ビタミンA誘導体であるレチノイン酸、黄体ホルモンであるプロゲステロン、甲状腺ホルモンである L-サイロニン、および基質アナログである U-46619 などの 12 種類の脂溶性リガンドを使用した。各リガンド溶液に対して L-PGDS を逆滴定したところ、すべてのリガンドにおいて発熱反応が観察された。これらの測定結果を解析したところ、得られた K_d 値は、1.01 μM から 22.9 μM であった。得られた相互作用の熱力学パラメータにより、 ΔH_b° はすべてのリガンドにおいて負の符号 ($-10.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ から $-63.8 \text{ kJ mol}^{-1}$) であり、L-PGDS の結合反応に寄与することが分かった。一方、エントロピー変化項 ($-T\Delta S_b^\circ$) は $-38.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ から 32.8 kJ mol^{-1} であり、その寄与はリガンド間で大きく異なることが判明した。さらに、 ΔH_b° に対して $-T\Delta S_b^\circ$ をプロットしたところ、複合体形成に伴うエンタルピー変化の寄与は、エントロピー変化項により打ち消されており、典型的なエントロピー・エンタルピー補償効果を示すことが明らかとなった。また、AutoDock を用いた複合体予測シミュレーションにより得られた水素結合、および疎水性相互作用の寄与は、 ΔH_b° 、および $-T\Delta S_b^\circ$ それぞれと相関が無く、これら熱力学パラメータの予測は困難であることが示唆された。これらの結果により、L-PGDS の幅広い結合選択性は、エンタルピー変化、およびエントロピー変化両方の繊細なバランスによって熱力学的に最適化されていることが示唆された。

結論

L-PGDS は分子量や化学構造が異なる様々な脂溶性低分子を結合し、その相互作用はエンタルピー変化、あるいはエントロピー変化の一方だけの寄与ではなく、両者のバランスによって熱力学的に微調整されている。

審査結果の要旨

生体における分子間相互作用は根源的な生命現象の1つであり、酵素の基質認識、抗体の抗原認識、細胞膜受容体のシグナル伝達、物質の輸送や排出、分子の凝集・沈殿などが挙げられ、それら相互作用の挙動は熱力学の一般法則に従う。したがって、エネルギー論に基づいた相互作用の熱力学的な理解は、生体分子の分子認識機構の解明を目指す基礎生命科学において必須である。

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) は、中枢神経系に高発現し、細胞膜由来のプロスタグランジン (PG) H_2 から生理的な睡眠誘発作用を持つ PGD₂ への異性化反応を触媒する酵素であるが、活性酸素スカベンジャー、および脂溶性低分子の輸送タンパク質としての機能も併せ持つ多機能タンパク質である。これまでの生化学的な研究により、L-PGDS はヘム代謝産物やビタミン A 誘導体などの様々な脂溶性低分子を高親和性に結合することが報告されている。しかし、L-PGDS と脂溶性低分子の相互作用における熱力学的な駆動力の寄与は未だ解明されていなかった。学位申請者は、L-PGDS の輸送タンパク質としての機能に着目し、内因性 Trp 残基の蛍光消光効果、誘起円偏光二色性分光法 (ICD)、および等温滴定型熱測定法 (ITC) などの物理化学的な実験手法を用いて、ヒト由来 L-PGDS と様々な脂溶性低分子との分子間相互作用特性、特に結合選択性、結合親和性、結合比、および熱力学的駆動力の解明に関する研究を行った。

第 1 章では、内因性 Trp 残基の蛍光消光効果を用いて、ヒト由来 L-PGDS の脂溶性低分子に対する結合選択性を明らかにするとともに、ヘム代謝産物 (ヘミン、ビリベルジン、およびビリルビン) と L-PGDS との詳細な相互作用様式を ICD、および ITC により示した。まず、蛍光消失効果を利用して、L-PGDS がヘム代謝産物であるビリベルジン、ビタミン A 誘導体であるレチノイン酸、甲状腺ホルモンである L-サイロニン、黄体ホルモンであるプロゲステロン、および植物フラボノイドであるゲニステインなど 12 種類の脂溶性低分子と結合することを明らかにした。この結果により、学位申請者は、ヒト由来 L-PGDS が脂溶性低分子に対して幅広い結合選択性を持つことを示した。特に、ヘム代謝産物に対する L-PGDS の結合親和性は、他の脂溶性低分子と比較して非常に高いことを見出した。そこで、学位申請者は、ヘム代謝産物と L-PGDS との詳細な相互作用様式を ICD、および ITC により調査した。その結果、L-PGDS の分子内において、ヘム代謝産物に対する高親和性、および低親和性結合部位の 2 個の結合部位が存在することを見出した。得られた相互作用の熱力学パラメータから、有利なエンタルピー変化、およびエントロピー利得の両方が L-PGDS とヘム代謝産物との高親和性相互作用に重要であることを明らかにした。以上の結果より、学位申請者は、ヘム代謝産物に対する L-PGDS の 2 分子結合能 (高親和、および低親和性) が、生体内でヘムスカベンジャーとして機能するために重要であると考察した。

第 2 章では、ITC を用いて L-PGDS と脂溶性低分子との相互作用における熱力学的駆動力の解明を試みた。実験には、ビタミン A 誘導体であるレチノイン酸、黄体ホルモンであるプロゲステロン、甲状腺ホルモンである L-サイロニン、および基質アナログである U-46619 などの 12 種類の脂溶性低分子を使用した。得られた相互作用の熱力学パラメータから、エンタルピー変化はすべての低分子において負の符号であり、L-PGDS の結合反応に寄与することが分かった。一方、エントロピー変化項の寄与は、低分子間で大きく異なることが判明した。また、複合体形成に伴うエンタルピー変化の寄与が、エントロピー変化項により打ち消されたことから、本結合では典型的なエントロピー・エンタルピー補償効果を示すことを見出した。さらに、タンパク質-低分子複合体予測アルゴリズムにより得られた水素

結合，および疎水性相互作用の寄与は，エンタルピー変化，およびエントロピー変化項それぞれと相関が無く，これら熱力学パラメータの予測は困難であることが示された。以上の結果により，L-PGDS の幅広い結合選択性は，エンタルピー変化，およびエントロピー変化両方の繊細なバランスによって熱力学的に最適化されていると結論した。

本申請論文は，生体内輸送タンパク質と脂溶性低分子との相互作用を分光学的，および熱力学的に詳細に調べ，本タンパク質の生体内における新しい機能を見出したこと，さらに，L-PGDS と脂溶性低分子との相互作用における熱力学的駆動力の寄与を詳細に示したことが非常に興味深い。これらの知見は，生体分子，特にタンパク質が有する多様で複雑な分子認識機構の解明に向けた新たな扉となると共に，創薬研究における薬剤分子の設計や開発の礎となり，生化学，タンパク質科学，および生物物理化学（特に，生体系の熱力学）分野に大きく貢献するものである。よって，最終試験の結果と合わせて，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。