

称号及び氏名	博士(応用生命科学)	飯田 津喜美
学位授与の日付	2023年5月31日	
論文名	ヒトリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の熱力学的安定性に関する研究	
論文審査委員	主査	乾 隆
	副査	川口 剛司
	副査	渡邊 義之

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、疎水性低分子輸送に関連するタンパク質群であるリポカリンファミリーに属し、哺乳類の中枢神経系、ヒト心臓及び男性生殖器に豊富に存在し、ヒト脳脊髄液に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。L-PGDS は、プロスタグランジン (PG) H_2 を睡眠誘発を引き起こす PGD_2 に異性化する酵素であるが、活性酸素スカベンジャー、脂溶性低分子輸送タンパク質としての機能も併せ持つ多機能性タンパク質である。L-PGDS は、8 本の β ストランドからなる β バレル構造を有し、様々な難水溶性生理活性低分子を β バレル内部の疎水性ポケットに結合し ($K_d = 30 \text{ nM} - 2 \mu\text{M}$)、且つ結合に伴い β バレル上部のループが柔軟に変化して分子全体がコンパクトになることが報告されている。これまでに、L-PGDS の安定性を調べるために、マウス由来 L-PGDS の化学変性について調べられた。その結果、マウス由来 L-PGDS の塩酸グアニジンまたは尿素による化学変性は、天然 (native : N) 状態から変性 (unfolding : U) 状態への移行の間に、低濃度変性剤存在下での活性増強状態 (active-state) と、高濃度変性剤存在下での非活性状態 (inactive-state) の 2 つの異なる中間状態が存在する変性であることが明らかにされた。また、申請者は、酸性 (pH 4.0) 条件下において、マウス由来 L-PGDS の熱変性過程は可逆的であり、N 状態と U 状態の間にひとつの平衡中間体が存在する三状態転移であることを明らかにした。

一方、ゲノム創薬研究において生み出される医薬候補化合物は総じて難水溶性であり、このような化合物は化学修飾により水溶性を高めることは可能であるが、薬効の低減や標的細胞に対する特異性低下に伴う強い副作用の発現により、非臨床段階で研

究開発から除外される。そこで、これらの難水溶性医薬候補化合物を可溶化し、目的部位まで輸送する Drug Delivery System (DDS) の開発が精力的に行われている。申請者の研究対象であるヒト由来 L-PGDS は、難水溶性低分子を結合し可溶化できることから、難水溶性医薬候補化合物の DDS キャリアとしての利用が期待されている。これまでに、ヒト由来 L-PGDS が難水溶性抗がん剤である SN-38 を可溶化し、且つマウス *in vivo* 病態モデルにおいて、SN-38 内包 L-PGDS の静脈内投与により、優れた抗腫瘍効果を示すことが報告されている。今後、ヒト由来 L-PGDS を DDS キャリアとして臨床応用するためには、本タンパク質の構造安定性に関する情報が不可欠である。そこで、本研究では、示差走査熱量計 (DSC) 測定法及び円偏光二色性 (CD) 分光法を用いて、強酸性 (pH 2.5) から弱アルカリ (pH 8.0) 条件下におけるヒト由来 L-PGDS の水溶液中の pH 安定性及び熱力学的安定性の定量的評価を行った。

第一章 ヒト由来 L-PGDS の pH 安定性

本章では、pH 2.5, 4.0, 5.0, 6.0, 7.4, 及び 8.0 が L-PGDS の分子サイズに与える影響を動的光散乱 (Dynamic Light Scattering: DLS) 法及び X 線小角散乱 (Small-Angle X-ray Scattering : SAXS) 法を用いて調べ、さらに、pH が L-PGDS の高次構造に与える影響を CD 分光法により評価した。

L-PGDS は、活性中心である 65 番目及び 167 番目のシステイン残基をアラニン残基に置換したヒト由来変異型 C65A/C167A-L-PGDS を使用した。大腸菌発現系を用いて発現及び精製を行い、透析により各 buffer に置換後、各実験に使用した。実験には、20 mM sodium citrate buffer (pH 2.5), 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.0, 5.0), 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0, 7.4, 8.0) を使用した。タンパク質溶液は、分光光度計を用いて定量し [$\epsilon_{280} = 25,900 / (\text{M} \cdot \text{cm})$], 各測定に応じた濃度に調製した。

25°C における DLS 測定の結果、上記 pH 条件下で L-PGDS は、平均粒径が約 5 nm の均一なサイズ分布を示したことから、pH に依存してオリゴマーを形成しないことが明らかとなった。また、本粒径は、SAXS 測定によって決定された L-PGDS の最大粒径 4.8 nm と一致した。さらに、遠紫外 (far-UV) 及び近紫外 (near-UV) 領域の CD 測定結果から、上記 pH 条件において、本タンパク質の二次及び三次構造に変化は見られず、 β シート構造が豊富な構造であることがわかった。また、L-PGDS の等電点を等電点電気泳動法により 8.3 と決定した。以上より、pH 2.5 から 8.0 の範囲において L-PGDS は、単量体として存在し、いずれも同様の高次構造を有することが明らかとなった。

第二章 ヒト由来 L-PGDS の熱力学的安定性の評価

本章では、DSC 測定法及び CD 分光法を用いて L-PGDS の熱変性過程を解析し、熱変性に伴う熱力学的パラメータを詳細に調べ、L-PGDS の構造安定性について評価した。

DSC 測定により、各 pH 条件下での L-PGDS の熱変性過程を解析した。その結果、pH 2.5 から 7.4 の範囲では、L-PGDS の熱変性は可逆的であったが、pH 8.0 では不可逆であった。pH 2.5 の条件下で、変性中点温度 (T_m) 及び T_m におけるエンタルピー変化量 [$\Delta H(T_m)$] は、それぞれ $47.2 \pm 0.03^\circ\text{C}$, $317 \pm 0.89 \text{ kJ/mol}$ であった。また、生理的 (pH

7.4) 条件下では、それぞれ $70.2 \pm 0.04^\circ\text{C}$ 、 $433 \pm 1.86 \text{ kJ/mol}$ となり、pH の上昇とともに T_m 及び $\Delta H(T_m)$ は上昇した。ヒト由来 L-PGDS の熱変性過程は、マウス由来 L-PGDS とは異なり、pH 2.5 から 7.4 では N 状態から U 状態への二状態転移を示した。これは、DSC 測定法により得られたエンタルピー変化量 [$\Delta H(T_m)$] が van't Hoff エンタルピー変化量 [ΔH_{vH}] とよく一致することによっても支持された。

次に、L-PGDS 溶液を 85°C まで昇温後、 20°C に降温し CD スペクトルを解析したところ、far-UV CD 測定では、pH 2.5 から 8.0 において、降温後の CD スペクトルは N 状態の CD スペクトルとほぼ一致し、熱変性は可逆的であった。一方、near-UV の CD 測定では、pH 2.5 から 6.0 において、降温後の CD スペクトルは N 状態の CD スペクトルとほぼ一致したが、pH 7.4 及び 8.0 では変性し一致しなかった。これは、DSC 測定及び far-UV CD 測定におけるタンパク質濃度が、それぞれ 0.25 mg/ml ($12.5 \text{ }\mu\text{M}$)、 0.1 mg/ml ($5 \text{ }\mu\text{M}$) であるのに対して、near-UV CD では 0.5 mg/ml ($25 \text{ }\mu\text{M}$) であり、実効電荷が 0 となる等電点付近で凝集を起こしたものと推測される。また、far-UV 及び near-UV 測定で可逆的であった pH 条件において、二状態転移モデルにより T_m 及び $\Delta H(T_m)$ を算出した結果、pH の上昇に伴い T_m は上昇し DSC の測定結果と概ね一致した。 $\Delta H(T_m)$ は、far-UV CD 測定における pH 7.4 の値を除き、DSC の測定結果と同様に増加した。以上より、ヒト由来 L-PGDS の熱変性は N 状態から U 状態への二状態転移であることが CD 測定でも明らかとなった。

さらに、L-PGDS の DSC 測定結果より、pH 2.5 から 7.4 の範囲において、 T_m に対する $\Delta H(T_m)$ のプロットは直線性 ($r = 0.974$) を示し、回帰直線の傾きから熱容量変化量 (ΔC_p) が温度及び pH に依存しない一定値 $4.76 \text{ kJ/(K}\cdot\text{mol)}$ と算出された。 ΔC_p 値は、N 状態で埋もれていた疎水性アミノ酸残基が変性に伴って露出したときの hydrophobic surface area に直接比例すると報告されている。本実験から得られた L-PGDS ($M_r: 18,778$, アミノ酸残基数: 170) の ΔC_p 値 $4.76 \text{ kJ/(K}\cdot\text{mol)}$ より、一残基当たりの ΔC_p 値は $28.0 \text{ J/(K}\cdot\text{mol)}$ と計算されたが、この値は球状タンパク質において一般に知られている値と比較して非常に小さいことが明らかとなった。これは N 状態で疎水性アミノ酸残基が既に溶媒に接触している、あるいは、U 状態で疎水性アミノ酸残基からなる部分構造が残り、完全に溶媒と接触していないことが考えられる。

最後に、DSC 測定法より得られた各熱力学的パラメータを用いて、ギブス-ヘルムホルツの式から熱変性に伴うギブス自由エネルギー変化量 [$\Delta G(T)$] を求め、各 pH 条件における L-PGDS の熱力学安定性を温度の関数として評価した。温度に対する $\Delta G(T)$ のプロットは、pH 2.5 から 7.4 の範囲で -7°C から -13°C にピークを持つ上に凸の放物線型を示し、pH の上昇に従って $\Delta G(T)$ が上昇した。即ち、pH 7.4 で $\Delta G(T)$ は最も高値となり、ヒト由来 L-PGDS は生理的 pH で最も高い安定性を有することが明らかとなった。また、pH 7.4 において、 4°C 、 25°C 、及び 37°C での $\Delta G(T)$ を算出すると、それぞれ 50.9 kJ/mol 、 42.2 kJ/mol 、及び 34.0 kJ/mol であった。 $\Delta G(T)$ が熱運動エネルギー RT の 10 倍以上あれば、タンパク質はその温度で安定であると報告されており、L-PGDS の 4°C 、 25°C 、及び 37°C での $\Delta G(T)$ は、それぞれ RT の 22 倍、17 倍、及び 13 倍あることから、本タンパク質は 4°C から 37°C の範囲で十分安定であると示された。

結論

本研究結果により、ヒト由来 L-PGDS は、生理的 pH の pH 7.4 で最も高い安定性を示した。また、温度依存的な $\Delta G(T)$ の解析から、pH 7.4 で冷蔵保存、室温、及び生理的溫度において熱力学的に十分安定であることが明らかとなった。以上より、ヒト由来 L-PGDS は、pH 安定性及び熱力学的安定性に優れており、タンパク質の構造安定性の観点から判断しても DDS キャリアとしての利用に適切であると結論づけられた。

審査結果の要旨

近年のゲノム創薬研究において生み出される医薬候補化合物は、総じて難水溶性である。このような難水溶性化合物は化学修飾により水溶性を高めることは可能ではあるが、薬効の低減や標的細胞に対する特異性低下に伴う強い副作用の発現により、非臨床段階で研究開発から除外される。そこで、このような難水溶性医薬候補化合物を可溶化し、標的細胞まで輸送し、且つ細胞内で薬効を発揮させるドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が精力的に行われている。申請者の研究対象であるヒト由来リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS, M_r : 18,778, アミノ酸残基数: 170) は、疎水性低分子を結合し可溶化できることから、難水溶性医薬候補化合物の DDS キャリアとしての利用が期待されている。これまでに、L-PGDS が難水溶性抗がん剤である SN-38 を可溶化し、且つ病態モデルマウスにおいて、SN-38 内包 L-PGDS の静脈内投与により、優れた抗腫瘍効果を示すことが報告されている。L-PGDS を DDS キャリアとして臨床応用するためには、L-PGDS の構造安定性に関する情報が必要不可欠である。本申請研究では、示差走査熱量計 (DSC) 測定法や円偏光二色性 (CD) 分光法などの手法を用いて、強酸性 (pH 2.5) から弱アルカリ性 (pH 8.0) 条件下における L-PGDS の pH 安定性、及び熱力学的安定性の定量的評価を行うことを目的として計画された。

第 1 章では、動的光散乱 (DLS)、X 線小角散乱 (SAXS)、及び CD 測定により、pH 2.5、4.0、5.0、6.0、7.4、及び 8.0 における L-PGDS 分子のサイズ、及び高次構造を調べた。大腸菌発現系により得られたヒト型 L-PGDS を用いて DLS 測定 (25°C) を行なった結果、L-PGDS は上記 pH 条件下において平均粒径が約 5 nm の均一なサイズ分布を示し、pH 依存的オリゴマーを形成しないことが分かった。また、本粒径は SPring-8 で行った SAXS 測定 (pH 7.4) で決定した L-PGDS の最大粒径 4.8 nm とよく一致した。さらに、遠紫外 (far-UV)、及び近紫外 (near-UV) 領域における CD 測定の結果から、上記 pH 条件下において L-PGDS の二次、及び三次構造に大きな変化は見られなかった。以上より、L-PGDS は pH 2.5~8.0 の範囲において、単量体として存在し、且つその高次構造は維持されていることを明らかにした。

第 2 章では、DSC、及び CD 測定により L-PGDS の熱変性過程を解析し、熱変性に伴

う熱力学的パラメータを用いて L-PGDS の構造安定性について評価した。DSC 測定の結果、pH 2.5~7.4 の範囲では L-PGDS の熱変性は可逆的であったが、pH 8.0 では不可逆であった。pH 2.5 での変性中点温度 (T_m)、及び T_m におけるエンタルピー変化量 $\Delta H(T_m)$ は、それぞれ $47.2 \pm 0.03^\circ\text{C}$ 、及び $317 \pm 0.89 \text{ kJ/mol}$ であった。また、生理的条件下 (pH 7.4) では、それぞれ $70.2 \pm 0.04^\circ\text{C}$ 、及び $433 \pm 1.86 \text{ kJ/mol}$ となり、pH の上昇とともに T_m 、及び $\Delta H(T_m)$ は上昇した。次に、L-PGDS 溶液を 85°C まで昇温後、 20°C に降温し CD 測定を行ったところ、far-UV 測定では、pH 2.5~8.0 において降温後の CD スペクトルは天然状態のスペクトルと一致し可逆的熱変性であったが、near-UV 測定では、pH 7.4、及び 8.0 において不可逆的変性を示した。これは、DSC 測定、及び far-UV CD 測定におけるタンパク質濃度が、0.25、及び 0.1 mg/ml であるのに対して、near-UV CD では 0.5 mg/ml であり、実効電荷が 0 となる等電点 (8.3) 付近で凝集を起こしたものと考えられる。また、far-UV、及び near-UV 測定で可逆性を示した pH において、二状態転移モデルにより T_m 、及び $\Delta H(T_m)$ を算出した結果、pH 上昇に伴い T_m は上昇し DSC の結果と概ね一致した。DSC の結果より、pH 2.5~7.4 の範囲において T_m に対する $\Delta H(T_m)$ をプロットしたところ直線性 ($r = 0.974$) を示し、回帰直線の傾きから熱容量変化 (ΔC_p) が温度と pH に依存しない一定値の $4.76 \text{ kJ/(K}\cdot\text{mol)}$ と算出された。 ΔC_p は、タンパク質内部に存在していた疎水性アミノ酸残基が変性に伴って露出したときの疎水性表面積に直接比例する。本研究で得られた L-PGDS の ΔC_p より一残基当たりの ΔC_p は $28.0 \text{ J/(K}\cdot\text{mol)}$ と求められたが、この値は球状タンパク質において一般的に知られている値と比較して非常に小さく、この低値が L-PGDS の安定性に寄与した。さらに、ギブス-ヘルムホルツの式から熱変性に伴うギブス自由エネルギー変化 $\Delta G(T)$ を求め、各 pH 条件における L-PGDS の熱力学安定性を温度の関数として評価したところ、pH 2.5~7.4 の範囲で $-13 \sim -7^\circ\text{C}$ にピークを持つ上に凸の放物線型を示し、pH 上昇に従って $\Delta G(T)$ が上昇した。即ち、pH 7.4 で $\Delta G(T)$ は最高値となり、L-PGDS は生理的 pH で最も高い安定性を示すことが判明した。 $\Delta G(T)$ が熱運動エネルギー RT の 10 倍以上であれば、タンパク質はその温度で安定であることが報告されており、ヒト由来 L-PGDS の 4°C 、 25°C 、及び 37°C での $\Delta G(T)$ は、それぞれ RT の 22、17、及び 13 倍となり、L-PGDS は $4 \sim 37^\circ\text{C}$ の範囲で非常に安定であると結論付けた。

本申請論文は、DDS キャリアとしての応用を目指すヒト由来 L-PGDS が、生理的 pH である pH 7.4 で最も高い構造安定性を示し、且つ温度依存的 $\Delta G(T)$ の解析から、pH 7.4 で冷蔵保存、室温、及び生理的温度において熱力学的に十分安定であることを見出し、pH、及び熱に対する構造安定性の観点から判断しても、DDS キャリアとして十分に利用可能であることを示すものである。本研究により得られた知見は、生物物理化学、構造生物学、及びタンパク質科学分野に大きく貢献するものである。したがって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、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。