

難水溶性薬剤結合に伴うリポカリン型プロスタグランジン D
合成酵素 (L-PGDS) の構造変化

Conformational Changes Induced in Lipocalin-type Prostaglandin D
Synthase (L-PGDS) by Binding of Lipophilic Drugs.

福原彩乃^a, 宮本優也^a, 山田真央^a, 井上勝晶^b, 八木直人^b, 乾 隆^a

Ayano Fukuhara^a, Yuya Miyamoto^a, Mao Yamada^a, Katsuaki Inoue^b, Naoto Yagi^b, Takashi Inui^a

^a大阪府立大学, ^b高輝度光科学研究センター

^aOsaka Prefecture University, ^bJASRI

X線小角散乱法を用いて、ジアゼパム(DZP)およびNBQXの2種類の疎水性薬剤の結合に伴う、リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素(L-PGDS)のコンフォメーション変化を調査した。その結果、L-PGDS, L-PGDS/DZP複合体, L-PGDS/NBQX複合体の慣性半径はそれぞれ、19.4 Å, 18.2 Å, および17.3 Åとなり、疎水性薬剤の結合に伴い、L-PGDS分子がコンパクトになることが判明した。L-PGDSのこのような柔軟性は、疎水性低分子に対するL-PGDSの「非選択性」を示すものである。

We measured small-angle x-ray scattering (SAXS) of lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) to clarify their conformational changes induced by binding of small lipophilic drugs, such as diazepam (DZP) and NBQX. The radius of gyration was estimated to be 19.4 Å for L-PGDS, and 18.2 Å for L-PGDS/DZP, 17.3 Å for L-PGDS/NBQX complexes. These results indicated that L-PGDS became compact after binding of these drugs and such structural flexibility of the L-PGDS molecule was responsible for the broad ligand selectivity of L-PGDS.

キーワード：X線小角散乱, リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素, 疎水性薬剤, 非選択性

背景と研究目的：リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素(L-PGDS)は、脳脊髄液中に多く存在し、疎水性リガンド輸送蛋白質群であるリポカリンファミリーに属する蛋白質であるとともに、PGH₂を基質として、脳内における睡眠誘発物質であるPGD₂を合成する酵素としての機能を併せ持つ多機能蛋白質である。我々はこれまでの研究で、SPring-8放射光施設を使用し、疎水性リガンドであるビリベルジン(BV), ビリルビン(BR), 及びレチノイン酸(RA)とL-PGDSの複合体について、X線溶液散乱法を用いた構造解析を行い、L-PGDSは結合するリガンドの大きさによっ

てその構造を変化させる珍しい蛋白質であることを見出した。一方、L-PGDSと疎水性リガンド(BV, BR, RA等)との結合親和性を調べるために、L-PGDS内因性トリプトファン蛍光消光作用の測定を行い、解離定数(K_d)が、70 - 140 nMであることを見出し、各リガンドともL-PGDSに対して、ほぼ同程度の高い結合親和性を持つことを示した¹⁾。以上の結果は、L-PGDSの驚くべき構造的柔軟性を示し、他の同属分子にはない疎水性リガンドに対する「非選択性」を有することの証明である。

我々は、L-PGDSが有するリガンド非選択性を利用し、難水溶性であるがゆえに薬剤開発

が困難で、薬剤候補からドロップアウトしていた薬に脚光を当て、それぞれの薬剤構造に適した人工蛋白質を設計・開発し、DDSに利用することを目指す。

実験：溶液散乱実験はBL40B2で行った。単色化されたX線を集光ミラーによって集光した後、スリットで整形し、試料に入射した。X線の波長は1.0Åを用いた。検出器は、ビームラインに設置されている自動読み取り型イメージングプレート(R-AXIS IV⁺⁺ system)を用いた。散乱測定は、蛋白質濃度依存性、コントラストバリエーション法などの各種条件下で行った。分子量決定のためのリファレンスとして、ovalbumin(*Mr* : 45,000, Sigma)を用いた。ジアゼパム(DZP, *Mr* : 284.7), およびNBQX(*Mr*:336)は、L-PGDSと1:1のモル比で混合し、濃縮した後、2.5 mg ml⁻¹, 5.0 mg ml⁻¹, 8.0 mg ml⁻¹, および12.5 mg ml⁻¹の各濃度に調整し、実験に用いた。

結果と考察：図1に、溶液中におけるL-PGDS, およびL-PGDSとDZP(L-PGDS/DZP), あるいはL-PGDSとNBQX(L-PGDS/NBQX)複合体のX線溶液散乱パターンを示す。

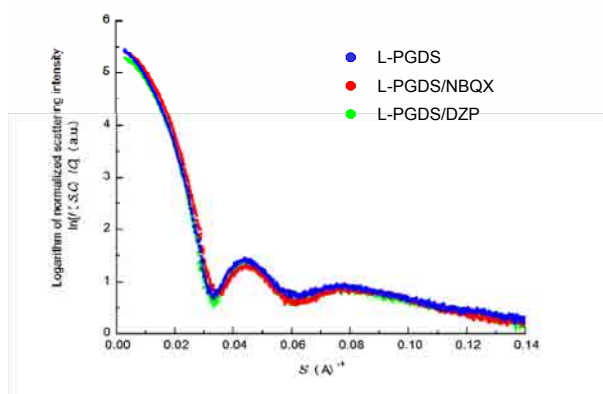


Fig. 1 SAXS profiles of L-PGDS and each L-PGDS complex. SAXS profiles of L-PGDS (blue dots), L-PGDS/NBQX (red dots), and L-PGDS/DZP (green dots) are shown. The logarithm of scattering intensity is shown as a function of reciprocal vector (*S*).

これらの散乱曲線より、L-PGDS は球状蛋白質であることが判明した。また、薬剤結合に伴い小角領域($S < 0.02 \text{ \AA}^{-1}$)に変化があることが確認された。さらに、得られた散乱曲線を用いてギニエ・プロット解析を行い、蛋白質濃度に対する $R_g(C)^2$ (R_g : 慣性半径)の変化を得た(図2)。濃度ゼロで得られた L-PGDS の慣性半径は、19.4Åであり、L-PGDS/DZP, および L-PGDS/NBQX 複合体はそれぞれ、18.3 Å, および 17.4Åとなり、L-PGDS は薬剤との複合体形成に伴い、慣性半径を減少させることが判明した。

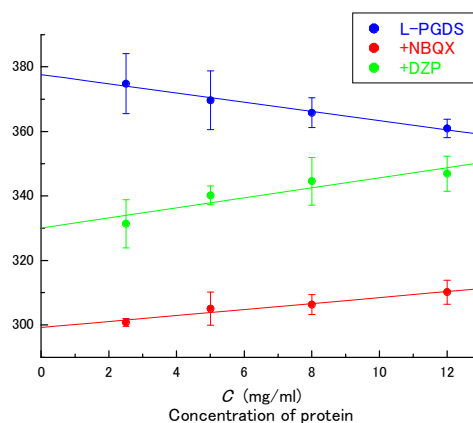


Fig. 2 Concentration dependence of R_g^2 of L-PGDS with or without NBQX and DZP. Samples used were L-PGDS (●), L-PGDS/NBQX (●), and L-PGDS/DZP (●), respectively. Data are expressed as the mean \pm S.D. of 3 independent experiments.

以上の結果より、L-PGDS は、分子量が 300 前後の疎水性低分子薬剤の結合に伴い、その慣性半径が、1 - 2Å程度コンパクトになる蛋白質であることが判明した。この L-PGDS の柔軟性は、L-PGDS の疎水性低分子に対する「非選択性」を示すものであり、L-PGDS を用いた様々な難水溶性薬剤に対する DDS の可能性を示唆する。

参考文献

- 1) T. Inui *et al.*, J. Biol. Chem. **278** (2003) 2845.