

## X線溶液散乱法を用いたリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素と脂肪酸複合体の構造解析

### Structure analysis of lipocalin-type prostaglandin D synthase complexed with fatty acids by X-ray small angle scattering

乾 隆<sup>a</sup>, 久米慧嗣<sup>a</sup>, 福原彩乃<sup>a</sup>, 宮本優也<sup>a,b</sup>

Takashi Inui<sup>a</sup>, Satoshi Kume<sup>a</sup>, Ayano Fukuhara<sup>a</sup>, Yuya Miyamoto<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>大阪府立大学, <sup>b</sup>独) 日本学術振興会特別研究員DC

<sup>a</sup>Osaka Prefecture University, <sup>b</sup> JSPS Research Fellow

飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (PA), 及びステアリン酸 (SA) の結合に伴う組換え型ヒトリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) の構造変化を、X線小角散乱法を用いて調査した。その結果、L-PGDS, L-PGDS/PA 複合体, 及び L-PGDS/SA 複合体の慣性半径はそれぞれ、17.8 Å, 17.9 Å 及び 18.1 Å となり、L-PGDS は飽和脂肪酸と複合体を形成しても、慣性半径が変化しないことが判明した。以上の結果から、飽和脂肪酸に対する L-PGDS の結合様式は、我々がこれまでに調べてきたレチノイドや胆汁色素などの疎水性リガンドに対する結合様式とは異なることが示唆された。

We measured small-angle X-ray scattering (SAXS) of recombinant human lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) to clarify the conformational change induced by binding of saturated fatty acids such as palmitic acid (PA) and stearic acid (SA). The radius of gyration ( $R_g$ ) was estimated to be 17.8 Å for L-PGDS, and 17.9 Å for L-PGDS/PA and 18.1 Å for L-PGDS/SA complexes. These results showed that human L-PGDS did not change its  $R_g$  after binding of the fatty acids. Thus, we suggest the binding mode of L-PGDS for the fatty acids is different from that for the hydrophobic ligands such as retinoids and bile pigments measured so far.

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, 飽和脂肪酸

**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、生理的睡眠誘発物質である PGD<sub>2</sub> を生合成する酵素としての機能を併せ持つ。L-PGDSの種による酵素活性の違いを解析したところ、魚類では酵素活性を持たず、両生類や鳥類では酵素活性を保存しているが、哺乳類と比較して、その酵素活性が非常に低いことから、L-PGDSは進化の過程において酵

素としての機能を獲得したと考えられる<sup>1, 2)</sup>。一方、L-PGDSの疎水性リガンド結合能は、魚類から哺乳類まで広範囲に保存されており、本来、L-PGDSは生体内における疎水性リガンド輸送蛋白質であった可能性がある。しかしながら、L-PGDSの内因性リガンドは未だ明らかとなっていない。これまでにX線溶液散乱法を用いた構造解析により、L-PGDSは胆汁色素であるビリベルジンなどの疎水性リガンドとの結合に伴って、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<sup>3)</sup>。一方、

内因性Trp蛍光消光作用を利用して、L-PGDSと各種疎水性リガンドとの結合親和性を調べたところ、各分子ともL-PGDSに対して、高い結合親和性を持つことが判明した<sup>4)</sup>。以上の結果は、L-PGDSが驚くべき構造柔軟性を有しており、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」を有することを示唆する。さらに、我々はL-PGDSが飽和脂肪酸とも結合することを見出している。昨今注目を集めているメタボリックシンドロームの原因の1つに、血中におけるトリアシルグリセロール（中性脂肪）濃度の上昇があげられる。L-PGDSが中性脂肪のスキャベンジャーであることが判れば、メタボリックシンドロームに対する1つの治療薬となる可能性がある。本申請研究では、生体内におけるL-PGDSの新たな役割を明らかにするために、飽和脂肪酸の結合によるL-PGDSの慣性半径の変化、及びその構造変化を調べた。

**実験:** 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1.0 Å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<sup>++</sup> 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を用いて行った。分子量決定のためのリファレンスとして、ovalbumin ( $M_r$ : 45,000, Sigma) と lysozyme ( $M_r$ : 14,307, 生化学工業) を用いた。ジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解したPA ( $M_r$ : 256.5), 及びSA ( $M_r$ : 284.5) とL-PGDS溶液を混合し、脱塩カラムに供した後、L-PGDSを各濃度に調整し実験に用いた。

**結果と考察:** 2008A 期と同様に、X線溶液散乱法の測定には、組換え型ヒトL-PGDSを用いた。溶液中におけるL-PGDSは凝集を示さず、良好な散乱曲線が得られた。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 $R_g(C)^2$ の変化を得た(Fig. 1)。濃度ゼロで得られたL-PGDSの慣性半径は、17.8 Åであり、L-PGDS/PA, 及びL-PGDS/SA複合体の慣性半径はそれぞれ、17.9 Å, 及び18.1 Åとなり、L-PGDSは飽和脂肪酸との複合体形成に伴い、その慣性半径を変化させないことが判明した。

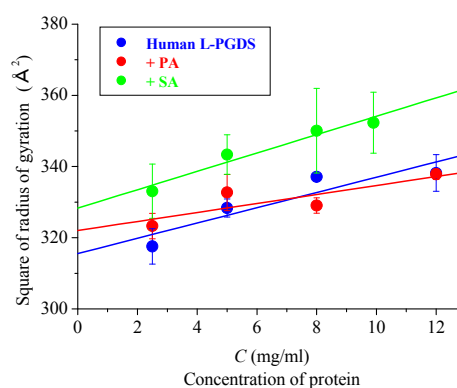


Fig. 1. Concentration-dependence of  $R_g^2$  of human L-PGDS (blue circles), L-PGDS/PA (red circles), and L-PGDS/SA (green circles). Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of 3 independent experiments.

以上の結果は、L-PGDS に対する飽和脂肪酸の結合様式が、我々がこれまでに調べてきた胆汁色素やレチノイドなどの疎水性リガンドの結合様式とは異なることを示唆するものであり、生体内におけるL-PGDSの役割を調べる上で大きな知見であると考えられる。今後、高肥満マウスを用いた *in vivo* 実験系を構築し、L-PGDS による飽和脂肪酸、及び中性脂肪の除去効果を検討する。

#### 参考文献

- 1) K. Fujimori *et al.*, *Gene*. **375** (2006) 14-25
- 2) D. Irikura *et al.*, *J. Biochem.* **141**. (2007) 173-180
- 3) K. Inoue *et al.*, *J. Biochem.* **145** (2009) 169-175
- 4) T. Inui *et al.*, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 2845-2852