

課題番号：2007A1887，使用ビームライン：BL40B2

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.

実験責任者：乾 隆

大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 応用生命科学専攻

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, 18.2 Å for L-PGDS/DZP, and 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、プロスタグランジンH₂(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、ドラッグ・デリバリー・システム(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。

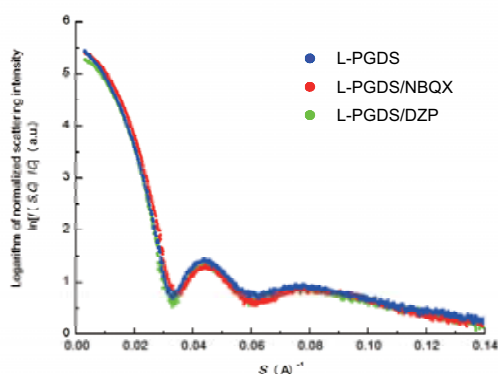


Fig.1 SAXS profiles of L-PGDS and each L-PGDS complex. SAXS profiles of L-PGDS (blue dots), L-PGDS/NBQX (red dots), and L-PGDS/DZP (green dots) are shown. The logarithm of scattering intensity is shown as a function of reciprocal vector (*S*).

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, 18.3Å, 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。

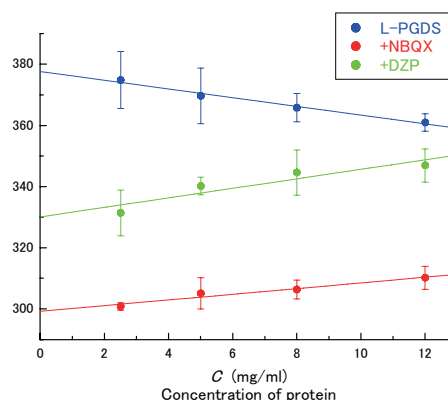


Fig.2 Concentration dependence of R_g^2 of L-PGDS with or without NBQX and DZP. Samples used were L-PGDS (blue circles), L-PGDS/NBQX (red circles), and L-PGDS/DZP (green circles), respectively. Data are expressed as the mean \pm S.D. of 3 independent experiments.

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.