

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素のリガンド認識機構

島本 茂,^{*,a,b} 吉田卓也,^b 大久保忠恭^b

Ligand Recognition Mechanism of Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase

Shigeru SHIMAMOTO,^{*,a,b} Takuya YOSHIDA,^b and Tadayasu OHKUBO^b^aFaculty of Science and Technology, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashiosaka, Osaka 577-8502, Japan, and ^bGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received May 28, 2011)

Lipocalin-type prostaglandin (PG) D synthase (L-PGDS) is a multi functional protein acting as a PGD₂ synthesizing enzyme, a transporter or scavenger of various lipophilic ligands, and an amyloid β chaperon in the brain. L-PGDS is a member of the lipocalin superfamily and has the ability to bind various lipophilic molecules such as prostanoid, retinoid, bile pigment, and amyloid β peptide. However, the molecular mechanism for a wide variety of ligand binding has not been well understood. In this study, we determined by NMR the structure of recombinant mouse L-PGDS and L-PGDS/PGH₂ analog complex. L-PGDS has the typical lipocalin fold, consisting of an eight-stranded β -barrel and a long α -helix. The interior of the barrel formed a hydrophobic cavity opening to the upper end of the barrel, the size of which was larger than those of other lipocalins and the cavity contained two pockets. Kinetic studies and molecular docking studies based on the result of NMR titration experiments provide the direct evidence for two binding sites for PGH₂ and retinoic acid in the large cavity of L-PGDS. Structural comparison of L-PGDS/U-46619 complex with apo-L-PGDS showed that the H2-helix, CD-loop, and EF-loop located at the upper end of the β -barrel change the conformation to cover the entry of the cavity upon U-46619 binding. These results indicated that the two binding sites in the large cavity and induced fit mechanism were responsible for the broad ligand specificity of L-PGDS.

Key words—lipocalin; prostaglandin D₂; prostaglandin H₂; NMR

1. はじめに

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) は、哺乳類の脳脊髄液中に豊富に存在するタンパク質であり、その機能は多岐にわたる。

当初、L-PGDS は、睡眠誘発物質であるプロスタグランジン (PG) D₂ を合成する酵素として着目されてきた。^{1,2} L-PGDS は、くも膜細胞内でシクロオキシゲナーゼから PGH₂ を受け取り、PGD₂ への異性化反応を触媒する (Fig. 1)。また、一般的な酵素と異なり、生成物の PGD₂ とも結合し、細胞外に輸送すると考えられている。PGD₂ は、睡眠薬によるものとは異なる自然な睡眠を誘発することから、^{3,4} L-PGDS の機能の解明により、副作用の少な

い睡眠導入薬の開発につながると期待されている。

L-PGDS のもう 1 つの機能として、沈着性の高い様々な疎水性低分子と結合できることが明らかになっている。L-PGDS はリポカリンファミリーと呼ばれる疎水性低分子輸送タンパク質ファミリーに属している。一般的にリポカリンファミリータンパク質は、レチノイド (Fig. 2) などの細長い形状の疎水性低分子と特異的に結合する。⁵⁻⁸ しかし、L-PGDS は、PGH₂ や PGD₂ だけでなく、分子の化学構造や大きさが全く異なるレチノイドやビリルビン (Fig. 2)、ビリベルジンとも強く結合できる ($K_d = 30-150$ nM)、際立って広いリガンド選択性を示す。^{2,9,10} さらに、近年、分子量 4000 以上もあるアミロイド β ペプチドとも強く結合し ($K_d = 40$ nM)、さらにその凝集を阻害することが報告された。¹¹ 特定のを輸送する存在であるリポカリンファミリーの中で、L-PGDS は、酵素機能だけでなく、人体に不要な様々な物質を捕捉できるという明らか

^a近畿大学工学部生命科学科 (〒577-8502 大阪府東大阪市小若江 3-4-1), ^b大阪大学大学院薬学研究科 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)

*e-mail: sshimamoto@life.kindai.ac.jp

本総説は、平成 22 年度日本薬学会近畿支部奨励賞 (物理系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

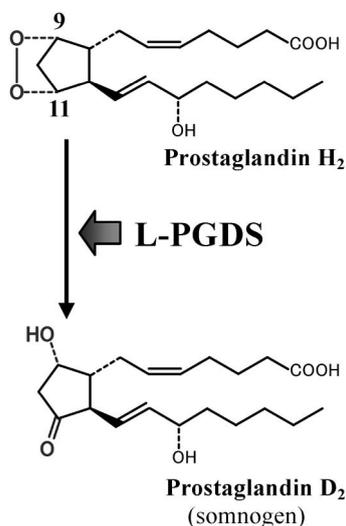


Fig. 1. The Catalytic Reaction by L-PGDS

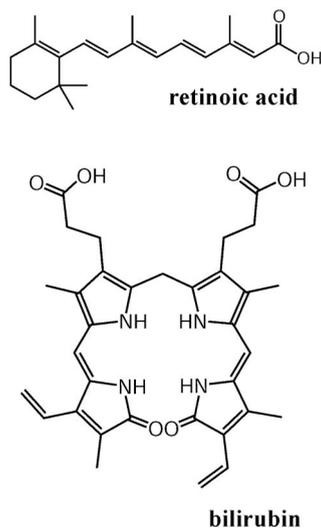


Fig. 2. The Hydrophobic Ligands of L-PGDS

に異なった特徴も持っている。

これまでに述べたように、L-PGDSは複数の機能を併せ持つタンパク質であり、その役割は、睡眠調節や脳内の恒常性の維持など、生命活動に非常に重要な役割を担っている。このようなL-PGDSの多機能性は、様々なリガンドを認識できる能力によって実現している。そこで本研究では、L-PGDSの原子レベルでの立体構造をNMRにより決定することで、どのようにして酵素反応の基質、及び、疎水性低分子認識をしているのかという機能発現の仕組みの解明を試みた。¹²⁾

2. L-PGDSの構造解析

マウスL-PGDSは、分子内に3個のCys残基

(Cys65, Cys89, Cys186)を持つことが分かっている。Cys89とCys186はジスルフィド結合を形成しており、多くのリポカリンファミリータンパク質で同様のジスルフィド結合がみられる。¹³⁾ Cys65はL-PGDSのみに見いだされるCys残基であり、Cys65をAlaに置換するとL-PGDSの酵素活性が完全に消失することから、Cys65が酵素活性に必須であることが明らかになっている。^{14,15)} 本研究ではマウスL-PGDSのシグナルペプチドである1-24残基目までを除き、さらにジスルフィド結合を形成しているCys89, Cys186をAlaに置換した変異体を用いた。このL-PGDS変異体(Δ 1-24-Cys89, 186Ala L-PGDS)は、野生型のL-PGDSと同程度の酵素活性及び疎水性低分子結合活性を示すことが報告されており、¹⁶⁾ さらに野生型より長期間安定であるためNMR試料として適していた。同位体標識されたL-PGDSについて、pH 6.5のリン酸緩衝液(50 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄) 85%及び重水15%の条件下でNMR測定を行った。

最終的に、NMR測定によって得られた2081個の制限情報を用いて計算を行った。計算によって得られた構造の中で、最も距離情報を満たす15個の構造が最終構造として得られた。15個の構造の重ね合わせ図をFig. 3(A)に示す。最終構造のRMSD (root mean square deviation) 値は、二次構造形成領域において主鎖で0.41 Å、側鎖で0.85 Åとよく収束していた。一方、ループ部分においては二次構造形成領域と比較して収束が悪く、溶液中では運動性が高い領域であると考えられる。

L-PGDSの立体構造の模式図をFig. 3(B)に示す。L-PGDSは、9本の β -ストランド(A, 残基番号41-50; B, 63-71; C, 76-84; D, 89-98; E, 104-107; F, 115-121; G, 128-135; H, 144-149; I, 177-179)、2本の短い³10-ヘリックス(H1, 36-39; H2, 56-60)、及び、1本の長い α -ヘリックス(H3, 157-171)によって構成されていた。L-PGDSは、一般的なりポカリンファミリーのタンパク質と同様に8本の β -ストランド(A-H)による β バレル構造をとり、その内部に空洞が存在していた。

3. L-PGDSとレチノイン酸結合タンパク質の比較

一般的にりポカリンファミリータンパク質では固有のリガンドに対する特異性が高いが、一方で、

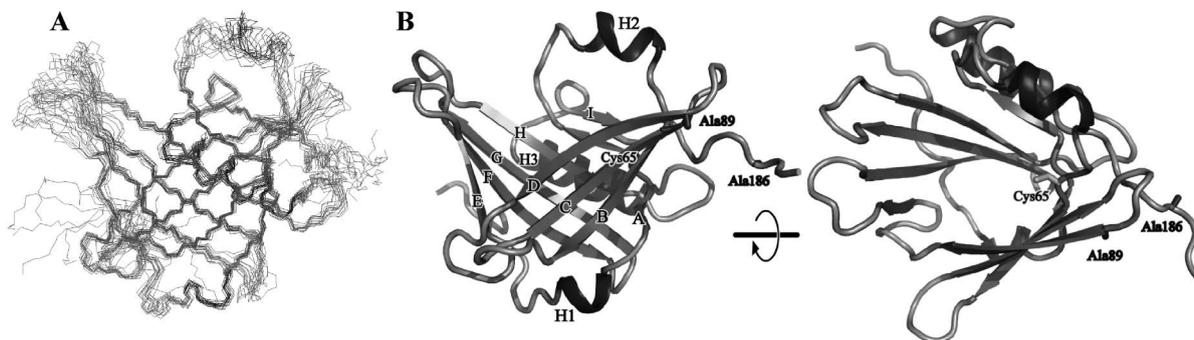


Fig. 3. The Structure of Mouse L-PGDS (PDB Accession Code: 2E4J)

(A) The final structural ensemble comprised of 15 structures with the lowest total energy. (B) Ribbon representation of L-PGDS (left: side view, right: top view).

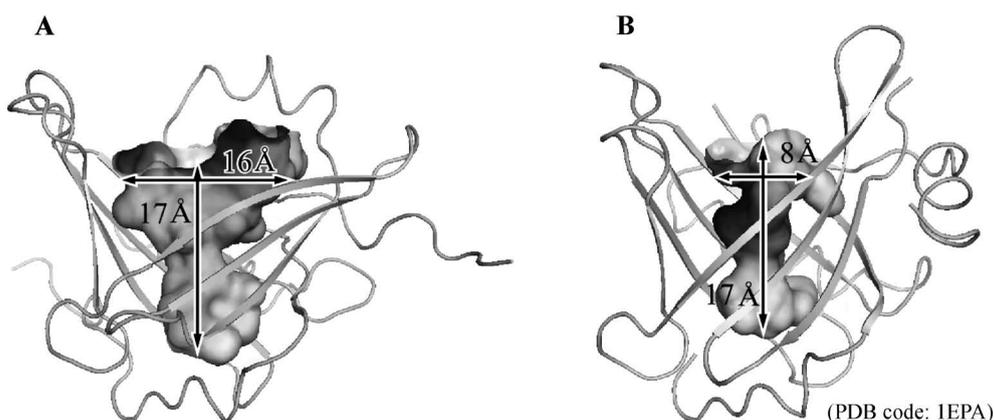


Fig. 4. The Illustration of the Cavity of (A) L-PGDS and (B) RABP

L-PGDS は形状や大きさの異なる様々なリガンドと結合することができるという変わった性質を持つ。構造解析の結果、その要因の1つが β バレル内部の空洞の大きさの違いにあることが明らかになった。L-PGDSの空洞と一般的なリポカリンファミリータンパク質であるレチノイン酸結合タンパク質 (RABP) の空洞を比較した図を Fig. 4 に示す。L-PGDSの空洞は、幅 16 Å、深さ 17 Å、厚さ 8 Å であり、横方向と縦方向に分岐した形状であった [Fig. 4(A)]。それに対し、RABPの空洞は、幅 8 Å、深さ 17 Å、厚さ 8 Å であり [Fig. 4(B)]、L-PGDS に比べ、空洞の入り口や大きさが小さい。多くのリポカリンファミリータンパク質は、RABPと同様で、細長い形状の空洞を持ち、その形状に合った疎水性低分子 (脂肪酸やレチノイドなど) と結合することが知られている。^{8,13,17)}しかし、L-PGDS はリポカリンファミリータンパク質の中でも特に大きな空洞を持っており、このことが、レチノイン酸などの細長い形状の疎水性低分子だけでなく、ビリ

ルビンやビリベルジンなどの嵩高い疎水性低分子の結合を可能にしていると考えられる。

4. L-PGDS のリガンド結合部位

続いて、レチノイン酸の L-PGDS 酵素活性阻害様式を調べることで、レチノイン酸と酵素反応の基質である PGH₂ の結合部位の比較をした。Figure 5 (A) に示すように、レチノイン酸では、L-PGDS の酵素活性を非競合阻害し、しかも、その阻害活性 (K_i) は 5–6 μ M 程度で、L-PGDS とレチノイン酸の結合 ($K_d=80\text{--}150$ nM) に比べて非常に弱いことがわかった。この結果は、レチノイン酸が酵素活性中心 Cys65 とは異なる部位に結合すること、すなわち、レチノイン酸と PGH₂ の結合領域が異なることを示している。

L-PGDS の β バレル内部の空洞のどの領域にレチノイン酸と PGH₂ が結合するのかを調べるため、NMR によるリガンドタイトレーション実験¹⁸⁾と AutoDock¹⁹⁾ を用いたリガンドドッキングシミュレーションを行った。PGH₂ は、L-PGDS と反応し

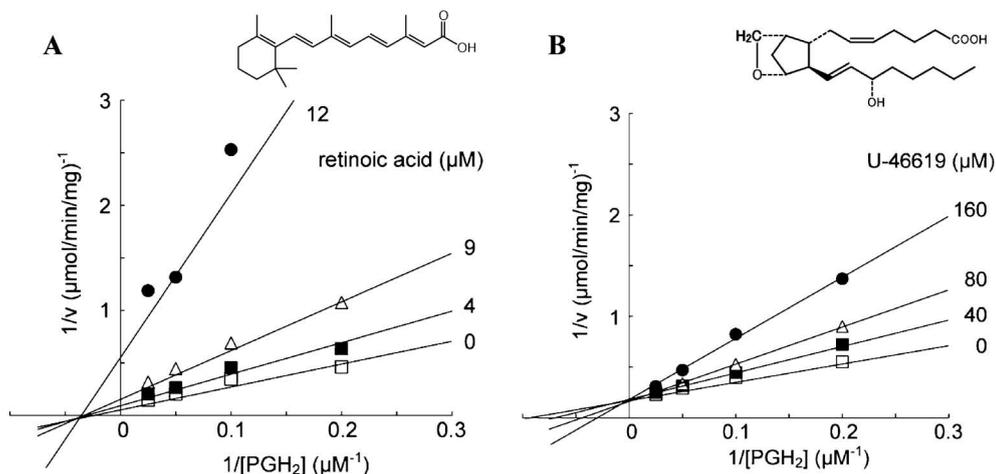


Fig. 5. Lineweaver-Burk Plots of L-PGDS Activity in the Presence of Various Concentrations of Retinoic Acid (A) and U-46619 (B)

てしまうこと、また、溶液中で非常に不安定なことから、NMR 実験には代替物として PGH₂ 安定誘導体 U-46619 を用いた。U-46619 は、PGH₂ の 9 位の酸素原子がメチレン基に置換されたもので、L-PGDS の酵素活性を競合阻害すること、つまり、PGH₂ と同様の結合様式で L-PGDS と結合することが確認できている [Fig. 5(B)]. 実験の結果、レチノイン酸と U-46619 では空洞内部の異なる部分に結合することが示唆された (Fig. 6). その結果、Fig. 6 に示すように U-46619 が結合すると考えられる空洞上部のポケット (ポケット 1) は親水的な環境になっており、RABP の空洞にはみられない空間である。また、ポケット 1 には酵素活性中心 Cys65 が存在しており、PGD₂ 合成が行われる場所と考えられる。一方で、レチノイン酸が結合する空洞底部のポケット (ポケット 2) の領域は、5 個の芳香族残基 (Phe34, Phe39, Trp43, Tyr105, Tyr149) によって囲まれており、疎水的な環境になっている。これらの芳香族残基は、RABP でも保存されており、レチノイン酸のシクロヘキセン環を認識していることが報告されている。²⁰⁾ よって、L-PGDS においても、これらの 5 個の芳香族残基がレチノイン酸のシクロヘキセン環を認識していると考えられる。

以上より、L-PGDS はリポカリンファミリータンパク質の中でも特に大きな空洞を持ち、その内部にリガンドによって異なる結合部位を持つことが明らかになった。この L-PGDS の構造的、機能的特徴が、他のリポカリンファミリーではみられない

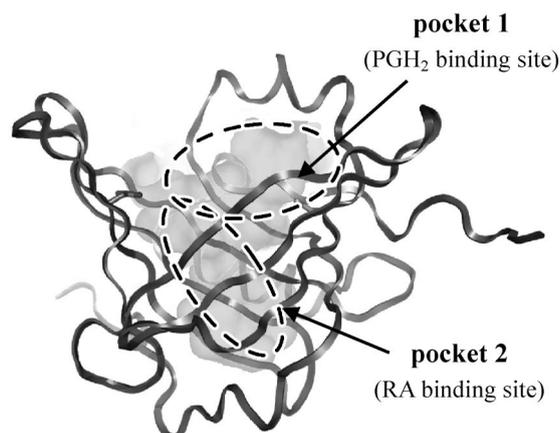


Fig. 6. The Binding Sites for PGH₂ and Retinoic Acid (RA) in the Cavity

“広いリガンド選択性”を規定している要因であると考えられる。

5. L-PGDS と基質誘導体 U-46619 の複合体構造解析

これまで、L-PGDS とリガンドとの複合体構造解析が溶液 NMR 法及び X 線結晶構造解析法により試みられてきたが、疎水性リガンドが不溶性であることや複合体が不安定であるなどの理由から成功していなかった。しかし、U-46619 は、水溶液への溶解度が比較的高く、L-PGDS との複合体も NMR の測定時間に十分なほど安定であることがわかった。L-PGDS/U-46619 複合体の構造情報より基質認識機構及び疎水性リガンド認識機構について、詳細な情報が得られると考えられる。

NMR により決定した L-PGDS/U-46619 複合体

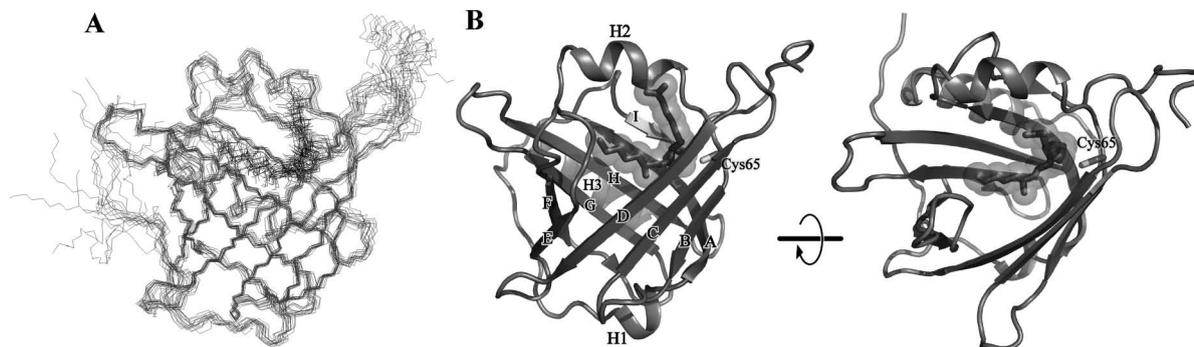


Fig. 7. The Structure of L-PGDS/U-46619 Complex (PDB Accession Code: 2KTD)

(A) Superposition of the 15 lowest-energy backbone conformers of L-PGDS/U-46619 complex. (B) Ribbon representation of the L-PGDS/U-46619 complex.

の15個の最終構造の重ね合わせ図を Fig. 7(A)に模式図を Fig. 7(B)に示す。最終構造のRMSD値は、二次構造形成領域において主鎖で0.41 Å、側鎖で0.88 Åと遊離型L-PGDS (apo-L-PGDS)と同等によく収束していた。Figure 7(B)から二次構造に関して、L-PGDS/U-46619複合体とapo-L-PGDSではほぼ同様であった。U-46619はバレル上部のポケット1に相当する領域に結合していることが明らかになった [Fig. 7(B)]。U-46619は、酵素活性中心であるCys65に非常に近い位置にあった。

6. リガンド結合による構造変化

apo-L-PGDSでは、空洞は開いた状態になっており [Fig. 4(A)], リガンドが結合しても、空洞内部には十分なスペースがあることがドッキングモデルから予測されていた。¹²⁾しかし、複合体の表面構造を表示した Fig. 8から分かるように空洞の入り口は開いておらず、U-46619はL-PGDSの内部にほぼ完全に埋もれる形で結合していた。apo-L-PGDSとL-PGDS/U-46619複合体の立体構造の重ね合わせによる比較から、空洞入り口に存在するCD-ループ、EF-ループ及びH2-ヘリックスの領域がU-46619を握るように構造変化していることが分かった (Fig. 9)。

最近、われわれは、X線小角散乱法 (SAXS) を用いて、レチノイン酸やビリルビン、ビリベルジンの結合により、L-PGDSの分子サイズが小さくなることを明らかにした。^{21,22)}今回複合体解析に用いたU-46619の結合によっても、L-PGDSの分子サイズが小さくなることをSAXSで確認できた。これらの結果から、L-PGDSは、どのリガンドに対しても結合時に誘導適合 (induced-fit) を起こし、

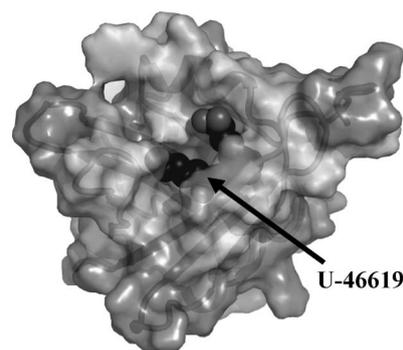


Fig. 8. The Surface Structure of L-PGDS/U-46619 Complex

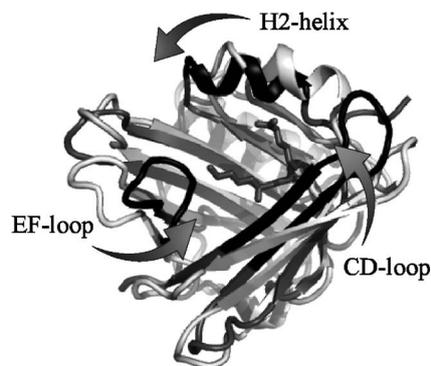


Fig. 9. The Superposition of apo-L-PGDS (white) and L-PGDS/U-46619 Complex (black)

バレル構造上部のループ領域によってリガンドを包み込むように構造が変化すると考えられる。しかし、L-PGDSにみられるようなリガンド結合に伴う分子サイズや構造の変化は、他のリポカリンファミリータンパク質にはみられない。例えば、SAXSによって、レチノール結合タンパク質やβ-ラクトグロブリンは、リガンドを結合させても分子サイズがほとんど変わらないことが報告されている。²¹⁾さら

に、RABPにおいては、遊離型とレチノイン酸複合体型の立体構造が既に決定されているが、両者に大きな構造変化がないことが明らかとなっている。²⁰⁾ これらの事実は、一般的にリポカリンファミリータンパク質とリガンドは、「鍵と鍵穴」の関係で相互作用することを示唆している。また、「鍵と鍵穴」様式で結合すると考えられるRABPとレチノイン酸の結合 ($K_d=900$ nM) よりも、レチノイン酸の大きさに対して明らかに大きい空洞を持つL-PGDSとレチノイン酸の結合 ($K_d=80-150$ nM) の方が強い。これらのことから、L-PGDSは、リガンド結合に伴う induced-fit により、空洞の内部に入ったリガンドとより厳密に相互作用することで、リガンドを強く捕捉することができると考えられる。

7. おわりに

本研究の結果、多機能タンパク質L-PGDSのリガンド認識の仕組みが明らかになった。また、基質誘導体であるU-46619の結合様式を詳細に調べることで、酵素反応機構の解明もできつつある。冒頭でも述べたように、L-PGDSは睡眠と深く関与しており、睡眠調節の創薬ターゲットとして着目されている。また、最近では、L-PGDSの様々な疎水性低分子と結合できるという機能をドラッグ・デリバリー・システムに応用する研究も成されている。今後、本研究によって得られた知見がそれらの創薬研究に貢献することを願っている。

謝辞 本研究を遂行するにあたり共同研究を行って頂きました大阪バイオサイエンス研究所・裏出良博博士、有竹浩介博士、大阪府立大学大学院生命環境科学研究科・乾 隆教授、宮本優也氏、福原彩乃氏、関西分子設計研究会・合田圭吾博士、大阪大学大学院薬学研究科・丸野孝浩氏、大阪薬科大学・小林祐次教授に深く感謝いたします。また、本研究は、日本学術振興会特別研究員研究奨励金(課題番号21-652)の支援の下、進められました。

REFERENCES

- 1) Urade Y., Kitahama K., Ohishi H., Kaneko T., Mizuno N., Hayaishi O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9070-9074 (1993).
- 2) Beuckmann C. T., Aoyagi M., Okazaki I.,

- Hiroike T., Toh H., Hayaishi O., Urade Y., *Biochemistry*, **38**, 8006-8013 (1999).
- 3) Hayaishi O., *FASEB J.*, **5**, 2575-2581 (1991).
- 4) Eguchi N., Minami T., Shirafuji N., Kanaoka Y., Tanaka T., Nagata A., Yoshida N., Urade Y., Ito S., Hayaishi O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 726-730 (1999).
- 5) Cowan S. W., Newcomer M. E., Jones T. A., *Proteins*, **8**, 44-61 (1990).
- 6) Vogt M., Skerra A., *J. Mol. Recognit.*, **14**, 79-86 (2001).
- 7) Goetz D. H., Holmes M. A., Borregaard N., Bluhm M. E., Raymond K. N., Strong R. K., *Mol. Cell*, **10**, 1033-1043 (2002).
- 8) Schlehuber S., Skerra A., *Drug Discov. Today*, **10**, 23-33 (2005).
- 9) Tanaka T., Urade Y., Kimura H., Eguchi N., Nishikawa A., Hayaishi O., *J. Biol. Chem.*, **272**, 15789-15795 (1997).
- 10) Mohri I., Taniike M., Okazaki I., Kagitani-Shimono K., Aritake K., Kanekiyo T., Yagi T., Takikita S., Kim H. S., Urade Y., Suzuki K., *J. Neurochem.*, **97**, 641-651 (2006).
- 11) Kanekiyo T., Ban T., Aritake K., Huang Z. L., Qu W. M., Okazaki I., Mohri I., Murayama S., Ozono K., Taniike M., Goto Y., Urade Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 6412-6417 (2007).
- 12) Shimamoto S., Yoshida T., Inui T., Gohda K., Kobayashi Y., Fujimori K., Tsurumura T., Aritake K., Urade Y., Ohkubo T., *J. Biol. Chem.*, **282**, 31373-31379 (2007).
- 13) Flower D. R., North A. C., Sansom, C. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1482**, 9-24 (2000).
- 14) Toh H., Kubodera H., Nakajima N., Sekiya T., Eguchi N., Tanaka T., Urade Y., Hayaishi O., *Protein Eng.*, **9**, 1067-1082 (1996).
- 15) Urade Y., Eguchi N., Hayaishi O., "Lipocalins," ed. by Akerstrom B., Landes Bioscience, Austin, 2006, pp. 99-109.
- 16) Urade Y., Tanaka T., Eguchi N., Kikuchi M., Kimura H., Toh H., Hayaishi O., *J. Biol. Chem.*, **270**, 1422-1428 (1995).
- 17) Flower D. R., *Biochem. J.*, **318** (Pt 1), 1-14 (1996).
- 18) Craik D. J., Wilce J. A., *Methods Mol. Biol.*, **60**, 195-232 (1997).
- 19) Morris G. M., Goodsell D. S., Huey R., Olson A. J., *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **10**, 293-

-
- 304 (1996).
- 20) Pattanayek R., Newcomer M. E., *Protein Sci.*, **8**, 2027–2032 (1999).
- 21) Inoue K., Yagi N., Urade Y., Inui T., *J. Biochem.*, **145**, 169–175 (2009).
- 22) Miyamoto Y., Nishimura S., Inoue K., Shimamoto S., Yoshida T., Fukuhara A., Yamada M., Urade Y., Yagi N., Ohkubo T., Inui T., *J. Struct. Biol.*, **169**, 209–218 (2010).