

解 説

リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の
リガンド相互作用解析
～熱力学的パラメータと構造情報の相関～

島本 茂^a, 丸野 孝浩^b

^a近畿大学 理工学部 生命科学科

^b大阪大学 大学院 工学研究科

(受取日: 2017年5月19日, 受理日: 2017年6月12日)

ITC Analysis of Ligand Binding to Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase

Shigeru Shimamoto^a, Takahiro Maruno^b

^a Graduate School of Science and Engineering Research, Kindai University,

^b Graduate School of Engineering, Osaka University

(Received May 19, 2017; Accepted Jun. 12, 2017)

Isothermal titration calorimetry (ITC) is the only technique whereby complete set of thermodynamic profile for molecular interaction can be determined from a single experiment. Binding thermodynamic parameters (free energy, enthalpy, and entropy) provide fundamental information on the forces driving the formation of the protein-ligand complex. The connection between structural and thermodynamic features of protein-ligand binding, however, is not as simple as expected because of the multifactorial character of the enthalpy and entropy of binding. Here, we review the structural and thermodynamic studies of lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) as a model of broad-ligand binding properties. Our ITC and NMR analyses of interactions between L-PGDS and hydrophilic ligands, NADs, revealed that negatively charged part of ligands is important for binding to L-PGDS. Moreover, the good correlation was found between the binding free energy and hydrophobic surface area of the ligands (ASA_h), indicating that increased affinity is associated with increased ASA_h . L-PGDS has a large cavity, which contains distinct and separate hydrophilic and hydrophobic parts. Taken together, it is suggested that positively charged hydrophilic part of L-PGDS cavity is involved in ligand specificity and hydrophobic part contributes to affinity.

Keywords: isothermal titration calorimetry, lipocalin, L-PGDS, protein structure, binding thermodynamics, broad binding selectivity



島本 茂
Shigeru Shimamoto
E-mail: sshimamoto@life.kindai.ac.jp



丸野 孝浩
Takahiro Maruno
E-mail: tmaruno@bio.eng.osaka-u.ac.jp

1. はじめに

生命現象は、無数のタンパク質と様々な相互作用分子との出逢いによって織りなされる。生命を理解する上で、生体内のタンパク質とそれに特異的な分子との結合を一つ一つ紐解いていくことは欠かせず、さらに、疾患の原因解明や治療薬開発ではそれらの情報が鍵になってくる。そのため、タンパク質とそれに特異的に結合する分子との相互作用を調べる手法が数多く開発され、それぞれの一長一短を考慮し補い合いながら利用されている。その中でも、等温滴定型熱量測定 (isothermal titration calorimetry; ITC)¹⁾ は、化学修飾、固定化や検出プローブなどが必要なく、より生体内で存在する状態に近い状態で分子間の相互作用を検出できるのが大きな利点であり、さらに、相互作用に関するほぼ完全な熱力学的パラメータが得られる手法である。本稿では、ITC を利用した睡眠誘発物質合成酵素とリガンドの相互作用解析について紹介する。

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) は、哺乳類の脳内や心臓に多く存在しており、睡眠誘発物質であるプロスタグランジン D₂ (PGD₂) を合成するだけでなく、その他種々の疎水性低分子の輸送に関わっている多機能タンパク質である。また、L-PGDS が属するリポカリンファミリーのタンパク質は、近年、抗体に次ぐ工学的に有望な分子認識鋳型として注目されている。²⁾ リポカリンの基礎構造 (リポカリンフォールド) を用いれば、比較的容易に特定の分子に特異的に結合する人工タンパク質が設計できることから、今後の生体高分子の相互作用情報と熱力学的パラメータの相関解析のモデルタンパク質としても期待できる。その中で、著者らが対象としている L-PGDS は、リガンドに対する特異性を持ちながらもその分子構造認識が幅広いことが特徴であり、数多くの分子が結合することが明らかになっている。さらに、それらのリガンドに関して ITC による相互作用情報が揃いつつある。³⁻⁵⁾ そこで、これまでの研究を基に、L-PGDS とリガンドの結合の熱力学的パラメータを構造情報と共に議論した。

2. 等温滴定型熱量測定から得られる熱力学的パラメータ

等温滴定型熱量測定 (ITC) は、一定圧力・一定温度下で滴下に伴う熱量変化を検出し、その解析によって、主に分子間の相互作用に関する熱力学量を得る手法である。分子同士が結合する際の微小な熱量変化を計測し、得られる滴定曲線を解析することで、結合によるエンタルピー変化 (ΔH)、化学量論 (n) および結合定数 (K_a) を独立して得ることができる (Fig.1)。さらに、後述の式(2)より、結合定数 (K_a) から結合のギブス自由エネルギー変化 (ΔG) が求まり、式(3)より結合のエンタルピー変化 (ΔS) が算出できる。即ち、ITC は一回の実験で分子間相互作用の本質に関する熱力学的パラメータをすべて得ることが出来る唯一の手法である。¹⁾

あるタンパク質 P とそのリガンド L の複合体 PL の結合定数 (K_a) と解離定数 (K_d) は以下の式(1)で表せる：

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1}{K_d} \tag{1}$$

結合定数または解離定数は、結合前後の標準ギブス自由エネルギー変化 (ΔG) と以下の式(2)の関係にある：

$$\Delta G = -RT \ln K_a = RT \ln K_d \tag{2}$$

R は気体定数 ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)、T は絶対温度 (K) である。なお、標準ギブス自由エネルギー変化などの熱力学量は標

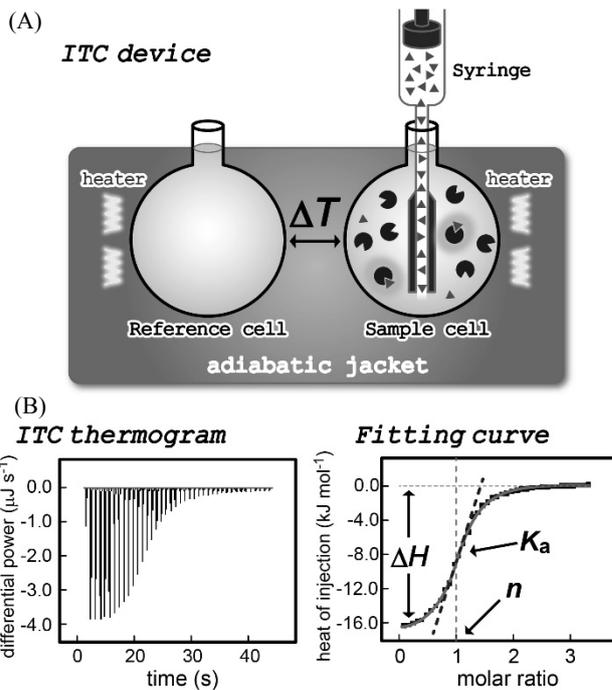


Fig.1 Schematic representation of an ITC device. (A) A solution containing dissolved ligand molecules is stepwise injected into the sample cell containing a solution of the protein. The heat released or absorbed from the binding reaction between protein and ligand is detected with respect to the reference cell. (B) The raw data obtained through multiple injections (left) will be integrated to the binding isotherm (right), which is fitted to yield the observed binding enthalpy ΔH^{obs} , the binding affinity K_a (determined by the slope of inflection point), and stoichiometry n (molar ratio at the inflection point).

準状態 (1 atm, 25 °C, 1 mol L⁻¹) を意味する “°” を付けて ΔG° などと表記されることが多いが、本稿では省略した。また、結合のギブス自由エネルギー変化 (ΔG) は結合によるエンタルピー変化 (ΔH) とエンタルピー変化 (ΔS) を用いて、以下の式(3)でも表せる：

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \tag{3}$$

結合の ΔG における ΔH と ΔS の寄与を比べる際、 ΔS に関しては、便宜上、測定温度 T を掛け負号を付けた $-T\Delta S$ を用いることが多い。そうすることで、 $\Delta G, \Delta H, -T\Delta S$ の単位が同じになり (kJ mol^{-1})、直感的に比較しやすくなる。結合における $\Delta G, \Delta H, -T\Delta S$ は、いずれも負の値が大きくなるほど結合に有利である。 ΔG に対して、 ΔH が優位に寄与している場合、その結合を“エンタルピー駆動型”と呼び、しばしば水素結合などの特異性の高い極性の相互作用が結合の駆動力であると言われる。一方で、 $-T\Delta S$ が優位に寄与している場合、その結合を“エンタルピー駆動型”と呼び、比較的特異性の低い疎水性相互作用が結合の駆動力であると見なされる。しかし、実際の駆動力は以下に記すように様々な寄与から成っている。

ITC 測定では、ある結合における“見かけの”エンタルピー変化 (ΔH^{obs}) とエンタルピー変化 (ΔS^{obs}) を得ることができる。しかし、その中にはタンパク質 P とリガンド L の直接的な相互作用によって生じる“本質的な”エンタルピー変化 ($\Delta H_{int}, \Delta H_{cont}$) とエンタルピー変化 (ΔS_{cont}) だけでなく、溶媒和/脱溶媒和の効果など式(4)や式(5)に示すような他の寄与が含まれていることを注意しなければならない (Fig.2)。

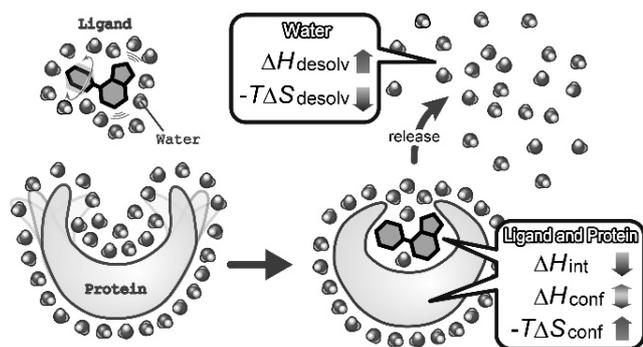


Fig.2 Main enthalpic and entropic contributions to the Gibbs free energy of protein-ligand binding. The formation of the protein-ligand complex mainly consists of three parts: (i) formation of protein-ligand interaction, (ii) conformational adaptation containing loop reorganization of the protein and rotatable restraints in the ligand, (iii) release of solvating water molecules to the bulk. The ΔH_{int} and ΔH_{desolv} are generally favorable and unfavorable, respectively. The ΔH_{conf} may favor or oppose binding. The $-T\Delta S_{desolv}$ is always favorable, while the $-T\Delta S_{conf}$ is generally unfavorable.

$$\Delta H^{obs} = \Delta H_{int} + \Delta H_{desolv} + \Delta H_{conf} + \Delta H_{ex} + \dots \quad (4)$$

ITC から得られる見かけのエンタルピー変化 (ΔH^{obs}) は、タンパク質-リガンド間の非共有結合による実質のエンタルピー変化 (ΔH_{int})、タンパク質とリガンドの脱水和によるエンタルピー変化 (ΔH_{desolv})、コンフォメーション変化によるエンタルピー変化 (ΔH_{conf})、溶液中のイオンなどその他の因子の結合解離 (プロトン化/脱プロトン化を含む) などの交換反応によるエンタルピー変化 (ΔH_{ex}) などの合計となる。これまでに、これらを個別に見積る試みもなされている。^{6,7)}

$$-T\Delta S^{obs} = -T\Delta S_{desolv} - T\Delta S_{conf} - T\Delta S_{ex} - T\Delta S_{rt} - T\Delta S_{vib} - \dots \quad (5)$$

見かけのエンタルピー変化 (ΔS^{obs}) は、結合に伴うタンパク質とリガンドの脱水和によるエンタルピー変化 (ΔS_{desolv})、タンパク質とリガンドのコンフォメーションのエンタルピー変化 (ΔS_{conf})、リガンドとその他の因子 (イオンやプロトン化など) の結合や解離などの交換反応によるエンタルピー変化 (ΔS_{ex})、結合に伴う回転・並進運動の変化によるエンタルピー変化 (ΔS_{rt})、共有結合の振動に伴うエンタルピー変化 (ΔS_{vib}) などの合計となる。このうち、 ΔS_{rt} や ΔS_{vib} は、通常負になる ($-T\Delta S$ としては正) ので、結合には不利に働くが、その他の項と比べて寄与が小さいことがわかっている。⁸⁾ また、 ΔS_{desolv} は正になるので結合に有利に働き、一方で ΔS_{conf} は負になるので結合に不利に働く。さらに、Chalikian らは、 ΔS_{desolv} と ΔS_{conf} のいずれも結合エンタルピー変化に大きく寄与しており、結合に伴う ΔS_{conf} の損失を水和水の放出による ΔS_{desolv} が補い、その僅かな差によってエンタルピー変化が結合に有利に働くか不利に働くかが決まると考察している。⁹⁾

以上のように、ITC 測定は、タンパク質とリガンドの直接的な相互作用の情報だけでなく、両者とそれを取り囲む溶媒 (水) の相互作用の情報を与えてくれる。そのため、生理的条件での受容体と薬剤の相互作用を見積もるために有用な情報が得られると期待されてきた。シード化合物としてエンタルピー駆動型結合するものが有望であることが提唱され、^{1,10)} その後もシード化合物の ΔH 、 $-T\Delta S$ を最適化することで、新たな薬剤候補化合物を合理的に設計する試

みがなされている。¹¹⁾ しか一方で、これらの試みは、標的とするタンパク質が比較的固い“剛体モデル”の例が多く、“柔らかい”対象 (本来ほとんどのタンパク質がそうである) の例が少数であること、さらに、 ΔH 、 $-T\Delta S$ の最適化において、いわゆる“エントロピー-エンタルピー補償効果”^{12,13)} が避けられない障害として存在することが問題となっている。また、先述のように ΔH 、 $-T\Delta S$ が多成分であることも関係して従来考えられていたよりも構造と熱力学的パラメータの関係が複雑であり、解釈が非常に難しいことがわかってきている。¹⁴⁾

3. リポカリンファミリー

3.1 リポカリンファミリータンパク質の特徴と機能

リポカリンファミリーは、細菌類からヒトなどの高等生物に至るまで幅広く存在する分泌タンパク質の一群である。¹⁵⁾ リポカリンの多くは、水溶液中で不安定な物質や不溶性の物質と特異的に結合する。^{15,16)}

リポカリンは、160~180 残基のアミノ酸で構成されており、一般的に 8 本の β -ストランドよりなる β -バレル構造と 1 本の長い α -ヘリックスを有するリポカリンフォールドと呼ばれる類似構造を持つ (Fig.3)。これは、“コップ”のような形状の β -バレル構造であり、4 本のループ (Loop-1, Loop-3, Loop-5, Loop-7) によりなる入口から疎水性リガンドの結合部位である内部の cavity に繋がっている。¹⁷⁾

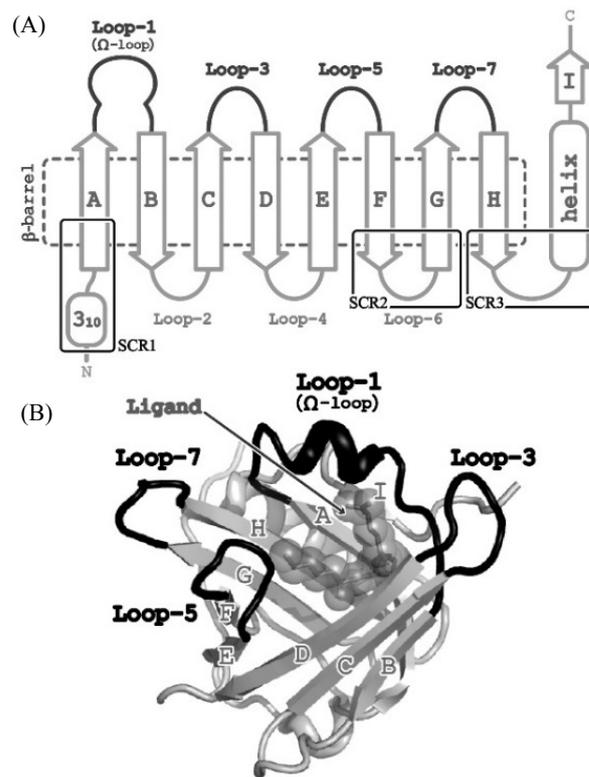


Fig.3 Topology and structure of the lipocalin fold. (A) A simplified schematic drawing orthogonal to the axis of the barrel. The nine β -strands of the antiparallel β -sheet are shown as arrows and labeled A-I. The N-terminal 3_{10} -like helix (labeled 3_{10}) and C-terminal long α -helix (labeled helix) are also illustrated. One end of the barrel which has four loops (Loop-1,3,5,7) opens into the inner ligand-binding cavity. There are three main structurally conserved regions (SCRs) of the lipocalin fold (SCR1, SCR2 and SCR3). (B) Ribbon representation showing the typical lipocalin fold of L-PGDS, in which the secondary structural elements are labeled.

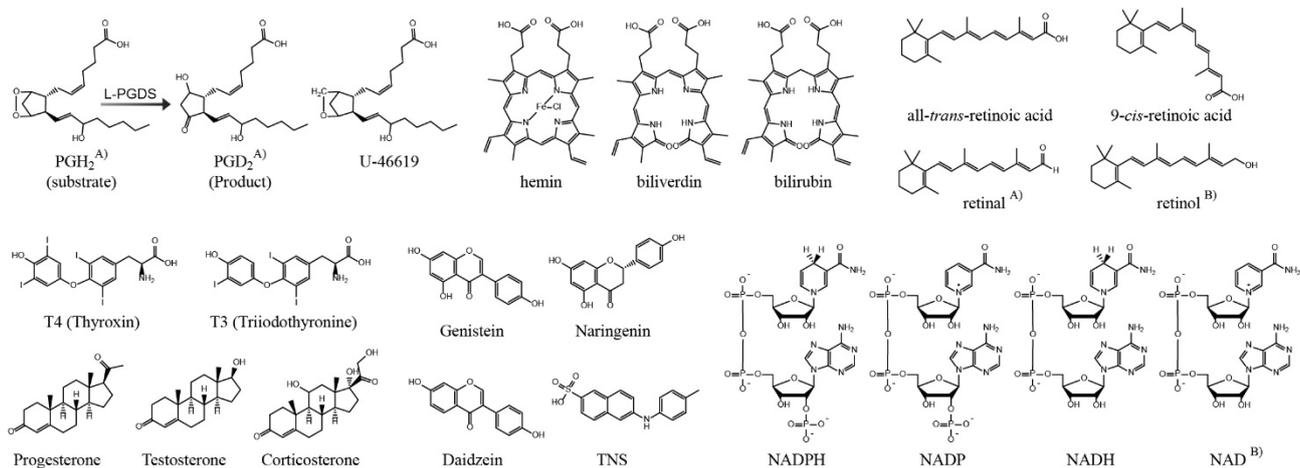


Fig.4 Chemical structure of ligands and non-ligands. (A) These ligands bind to L-PGDS but thermodynamic parameter of these has not reported. (B) These molecules have similar chemical structure with a L-PGDS ligand but do not bind to L-PGDS.

リポカリンの立体構造の類似性は高く、特にβ-バレル構造の底部に位置する領域 (structurally conserved regions: SCR) の構造は高度に保存されている。¹⁵⁾ SCR にはβ-バレル底部の疎水性コアを形成するアミノ酸やβ-バレルとその外側に位置するα-ヘリックスの相互作用に重要なアミノ酸などが存在している。¹⁷⁾ 一方で、リガンドの認識に関与するバレル上部のループ領域は、様々な形状をとっており、特に、最も長いループである Loop-1 は“Ω-loop”とも呼ばれ、多くのリポカリンにおいて疎水性 cavity 内にリガンドを捕捉する蓋として働く。これらのループ領域の多様性が、リポカリンのリガンドの多様性に繋がっている。^{15,17)}

リポカリンは、構造類似性が高い一方で、アミノ酸配列の相同性は15%程度と低く、¹⁷⁾ 相同性が高い領域はSCRに集中しており、先述のループ領域のアミノ酸配列は多様である。¹⁵⁾ リポカリンは一概に熱や変性剤への耐性が高く、熱変性中点が比較的低いものでも50°C以上である。また、SCR領域以外のβ-バレル領域やループ領域に変異を導入しても、その熱安定性への影響は小さい。^{18,19)} 即ち、“機能に関わる領域”と“全体の構造安定性に関わる領域”が分かれているため、リポカリンフォールドの安定性を損なうことなくリガンド結合などの機能改変が可能である。

3.2 リポカリンファミリータンパク質の機能の応用

リポカリンは、近年、その機能の有用性が着目されており、その応用として主に二つの方向性が示されている。一つは、生理活性物質に非常に高い親和性を有するリポカリンの利用である。例えば、マダニ由来ヒスタミン結合タンパク質などは、ヒスタミンと非常に強く結合 ($K_d \sim 2$ nM) する性質をアレギー反応におけるヒスタミン除去薬として応用されている。²⁰⁾ もう一つは、Skerraらによって考案された、リポカリンを鋳型とした人工低分子結合タンパク質“Anticalin”が挙げられる。²⁾ 初期に強心剤などによるジキタリス中毒の解毒薬として作られたものを皮切りに、¹⁶⁾ 現在では、タンパク質などの生体高分子を標的としたAnticalinも作製されている。²¹⁾ このAnticalinは、抗体と同様に特定の物質を検出、あるいは除去するのに有効と考えられている。抗体は、現在、最も医薬品に应用されている生体高分子の一つであるが、その分子構造が複雑であり(150 kDa程度のヘテロ4量体、Fab領域のみでも50 kDa程度のヘテロ2量体)、大量生産及び保管が難しく、抗体医薬品が高額になる一因となっている。一方で、リポカリンは単量体(分子量20 kDa以下)で機能を持ち、熱安定性もプロテアーゼ耐性も高い。さらに、抗体同様、構造安定性

に大きく影響を与えずに機能部位に変異を入れることができ、十分な結合活性(～pM)を実現できる。従って、大量生産や品質管理などを視野に入れた場合、抗体に並ぶ有用な生体高分子となってくるだろう。今後もリポカリンのリガンド特異性とその高い親和性に着目した応用例が多く出てくると予想される。

3.3 リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素

L-PGDS は、1960年代に脳脊髄液中の主要タンパク質“β-trace”として発見され、その後、1980年代に睡眠誘発物質プロスタグランジン D₂を合成する酵素であることが証明された。²²⁾ さらに、アミノ酸配列の相同性検索により、この酵素がリポカリンファミリーに属していることが示され、²³⁾ リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素と名付けられた。さらに、レチノイド(ビタミンA類)や胆汁色素とも結合することが示され、酵素と疎水性低分子輸送機能を併せ持つ多機能タンパク質であることが明らかになった。^{24,25)}

マウス由来 L-PGDS は、189 残基のアミノ酸よりなり、酵素活性中心は65番目のCys残基であることがわかっている。また、リポカリンに保存されているジスルフィド結合を持つが、これを変異させても酵素活性には大きな影響はなく、疎水性低分子との結合親和性もわずかに低下することとどまる。²⁶⁾ 一方で、Cys65はリポカリンの中でL-PGDS特有のCys残基であり、これを獲得したことで、輸送タンパク質から酵素へと進化したと考えられている。

特定のリガンドに対して特異的に結合する機能が着目されているリポカリンの中で、L-PGDS はリガンド選択性が幅広いという変わった特徴を持つ。結合可能な低分子リガンドは、**Fig.4**に示すように10種類以上であり、基質であるPGH₂だけでなく、骨格も分子量も全く異なる低分子とも比較的強く結合する。最近では、疎水性リガンドに比べて親和性は劣るものの、NADPHなど親水性の高いリガンドとも特異的に結合することが明らかになってきた。³⁾ このL-PGDSの特殊なリガンド選択性の解明のため、これまで様々な研究が行われてきた。

4. 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の解明

4.1 L-PGDS の構造とリガンド認識の特徴

我々は、L-PGDS のリガンド認識様式を明らかにするため、構造生物学的な研究を行ってきた。^{27,28)} その結果、

L-PGDS がリポカリンの中でも特殊な構造的特徴を持つことが明らかになってきている。

NMR によって決定したマウス L-PGDS の溶液構造は、Fig.3(B)で示した通り、一般的なリポカリンフォールドであった。また、活性中心の Cys65 の側鎖もバレル内部を向いていることから、酵素反応がバレル内部の cavity で行われることが示唆された。最終構造における β -バレル構造領域の主鎖構造は良く収束していた。一方で、cavity の入り口のループ領域 (loop-1,3,5,7) の収束は悪く、同じく NMR で構造が決定されていたリポカリン^{29,30)}と比較しても、L-PGDS のループ領域の可動性はリポカリンの中で特に大きいことが示唆された。

また、リガンド選択性と cavity の形状の関係に着目し、L-PGDS のリガンド結合 cavity を他のリポカリンと比較した (Fig.5)。レチノイン酸結合タンパク質 (retinoic acid-binding protein: RABP) は、細長い形状をした疎水性低分子であるレチノイン酸と特異的に結合する ($K_d = 25\text{--}65\text{ nM}$)。³¹⁾その cavity の形状はリガンドであるレチノイン酸の形状になっており、“鍵と鍵穴”の関係になっていることがわかる (Fig.5(B), (C))。一方で、L-PGDS は RABP に比べて cavity の入り口が開いており、また、cavity の容量も大きいことがわかった。この L-PGDS の特徴が、レチノイン酸より大きな胆汁色素などを受容できることに繋がっていると考えられる (Fig.5(A))。しかし、L-PGDS は cavity の形状がミスマッチであるレチノイン酸とも強く結合するが ($K_d = 80\text{--}150\text{ nM}$)、これは遊離型の cavity の形状からだけでは説明できない。これに関して、X 線小角散乱法でリガンド結合に伴う L-PGDS の構造変化を観察すると、レチノイン酸やピリベルジンの結合に伴って、リガンドに L-PGDS が誘導適合 (induced-fit) することが示唆されている。^{32,33)}さらに、我々は、L-PGDS と基質誘導体 (U-46619) との複合体構造を決定し、^{27,34)}遊離型構造と比較すると運動性が高い loop 領域に大きな構造変化があることを明らかにした (Fig.6(A), (B))。その表面構造から、リガンドを cavity 内部にほぼ包み込むように結合していることがわかる (Fig.6(A))。他のリポカリンの遊離型と複合体型の立体構造比較を見ると、リガンド結合に伴う主鎖の構造変化はほとんどない (Fig.6(C), (D))。即ち、リガンド結合に合わせた主鎖レベルでの構造変化は、リポカリンの中でも L-PGDS 特有の性質であると考えられる。^{27,28)}

さらに、L-PGDS の cavity 内部には、親水的な領域と疎水的な領域の 2 つのポケットが存在していた (Fig.5(A))。即ち、cavity 上部と入り口付近は塩基性アミノ酸が存在する正電荷に富んだ領域、一方で cavity 下部は疎水性アミノ酸や芳香族性アミノ酸による疎水的な領域になっている。また、親水性領域と疎水性領域の境界付近には、ヒドロキシル基を持つアミノ酸が多く存在する。NMR によるリガンド滴下実験によって、レチノイン酸やピリベルジンなど疎水性リガンドは主に疎水性領域に結合し、比較的極性が高い疎水性リガンドである基質誘導体 U-46619 や親水性リガンドである NADPH などは親水性領域に結合することがわかっている。^{3,28,32)}また、NADPH 結合実験の結果から、L-PGDS の cavity の正電荷とリガンドの負電荷の相互作用が結合に重要であることが示唆された。³⁾これは、レチノイン酸とほぼ同じ立体構造であるレチノールが結合しないこと²⁵⁾も説明でき、実際に、リガンドの多くはカルボキシル基などの生理条件で負電荷を帯びる官能基を持っている (Fig.4)。L-PGDS のような cavity の特徴は、同じく“広いリガンド選択性”を示す CYP450 などでも見られる。^{35,36)}このことから、リガンド特異性に関わる親水性領域と親水性を高める疎水性領域が局所に分かれて存在することが、様々な形状のリガンドを認識でき、かつ、選択性を保持す

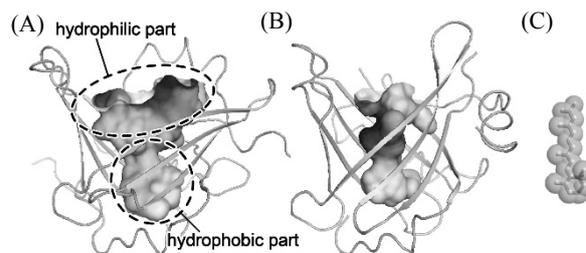


Fig.5 Illustration of L-PGDS (A) and RABP (B) cavities. Inner accessible surface of the cavity with the polypeptide backbone are shown. (C) All-trans-retinoic acid, which is ligand of both L-PGDS and RABP, is represented by space-filling model on the same scale to (A) and (B).

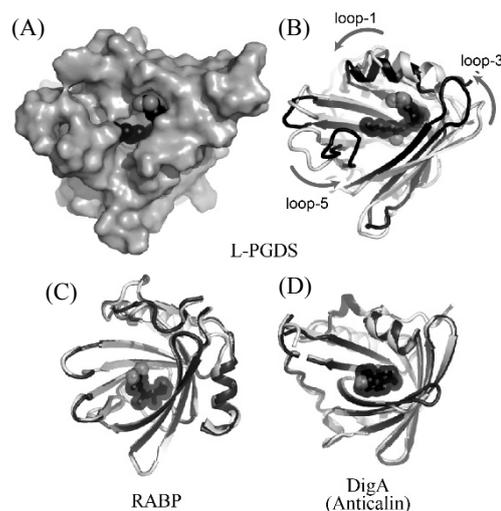


Fig.6 Structural comparison of apo and holo L-PGDS and other lipocalins. (A) Surface structure of holo-L-PGDS (gray) and its ligand U-46619 (black). The structure of the L-PGDS complex almost buries its ligand in the cavity. Overlay of the structure of apo (light gray) and holo (black) of L-PGDS (B), RABP (C) and Anticalin DigA (D).

ることを可能にしていると考えられる。

以上のように、L-PGDS は他のリポカリンに比べて非常に柔軟で大きな cavity を持っておりリガンドに合わせて形状を変化できること、さらに、その内部は特徴的な両親媒的環境になっていることが“広いリガンド選択性”を持ちながら強い結合を実現していると考えられる。

4.2 ITC による L-PGDS とリガンドの相互作用解析

タンパク質とそれに特異的に結合するリガンドの相互作用を調べる手法は数多くあるが、L-PGDS の場合では蛍光消光法や表面プラズモン共鳴法 (SPR) などが主に用いられてきた。^{24,25,37)}しかし、ピリベルジンの結合などのように、ITC によって初めて化学量論 (結合比) が明らかになる例もある。⁵⁾これは、蛍光消光法では観測する Trp 残基の位置や SPR ではタンパク質の固定化などの制約が原因の一つであると考えられる。一方で、ITC は、化学修飾、固定化や検出プローブなどが必要なく、より生体内で存在する状態に近い状態で分子間の相互作用を検出できるのが大きな利点である。さらに、異なる親和性を示す 2 つの結合部位があるとき、多くの場合、両結合部位の熱力学的パラメータが異なるため分離して評価できる。ただし、測定したデータを正しい結合モデルを選択して解析することが

Table 1 Thermodynamic parameters for ligand binding to L-PGDS and solvent accessible surface areas of ligands

| | ΔG (kJ mol ⁻¹) | ΔH (kJ mol ⁻¹) | $-T\Delta S$ (kJ mol ⁻¹) | Ref No. | ASA (Å ²) | ASA _h (Å ²) | ASA _v (Å ²) | ASA _n (Å ²) | ASA _p (Å ²) | logD |
|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|------------|--------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------|
| Hemin | -48.4 (-38.1) | -10.1 (-14.8) | -38.3 (-23.3) | 5 | 860 | 504 | 356 | 702 | 158 | 2.2 |
| Biliverdin | -46.6 (-33.8) | -12.6 (-23.9) | -34.0 (-9.9) | 5 | 764 | 468 | 296 | 580 | 184 | -4.0 |
| Bilirubin | -44.2 (-33.0) | -29.0 (-52.0) | -15.2 (19.0) | 5 | 782 | 497 | 286 | 628 | 154 | -3.5 |
| All-trans-retinoic acid | -34.2 | -38.8 | 4.6 | 4 | 548 | 376 | 172 | 469 | 79 | 2.1 |
| 9-cis-retinoic acid | -26.5 | -51.7 | 25.2 | 4 | 534 | 370 | 164 | 462 | 73 | 2.1 |
| All-trans-retinol | N.D. | N.D. | N.D. | 25 | 554 | 437 | 117 | 510 | 44 | 4.7 |
| T4 (Thyroxin) | -32.5 | -63.8 | 31.3 | 4 | 528 | 253 | 275 | 370 | 158 | 3.1 |
| T3 (Triiodothyronine) | -29.6 | -62.3 | 32.8 | 4 | 503 | 234 | 269 | 348 | 155 | 2.7 |
| Progesterone | -27.6 | -25.2 | -2.4 | 4 | 424 | 320 | 103 | 377 | 47 | 4.1 |
| Testosterone | -26.1 | -21.7 | -4.4 | 4 | 378 | 289 | 89 | 327 | 51 | 3.4 |
| Corticosterone | -24.9 | -15.5 | -9.4 | 4 | 426 | 326 | 100 | 318 | 108 | 1.3 |
| Genistein | -27.1 | -54.3 | 27.2 | 4 | 418 | 207 | 211 | 266 | 152 | 1.4 |
| Naringenin | -28.9 | -60.0 | 31.1 | 4 | 430 | 278 | 151 | 271 | 159 | 2.4 |
| Daidzein | -28.5 | -32.1 | 3.6 | 4 | 413 | 181 | 233 | 280 | 133 | 1.4 |
| TNS | -27.3 | -35.3 | 8.0 | 4 | 559 | 307 | 252 | 412 | 147 | 1.7 |
| U-46619 | -27.6 | -19.1 | -8.5 | 4 | 628 | 436 | 192 | 518 | 111 | 0.8 |
| NADPH | -24.7 | -18.8 | -5.9 | 3 | 708 | 355 | 353 | 310 | 398 | -13.1 |
| NADP ⁺ | -19.7 | -24.3 | 4.6 | 3 | 660 | 344 | 316 | 277 | 383 | -15.9 |
| NADH | -20.1 | -25.9 | 5.9 | 3 | 643 | 365 | 278 | 294 | 349 | -8.6 |
| NAD ⁺ | N.D. | N.D. | N.D. | 3 | 648 | 374 | 274 | 282 | 366 | -11.4 |

(Values in parenthesis represent the parameters for the lower affinity site.)

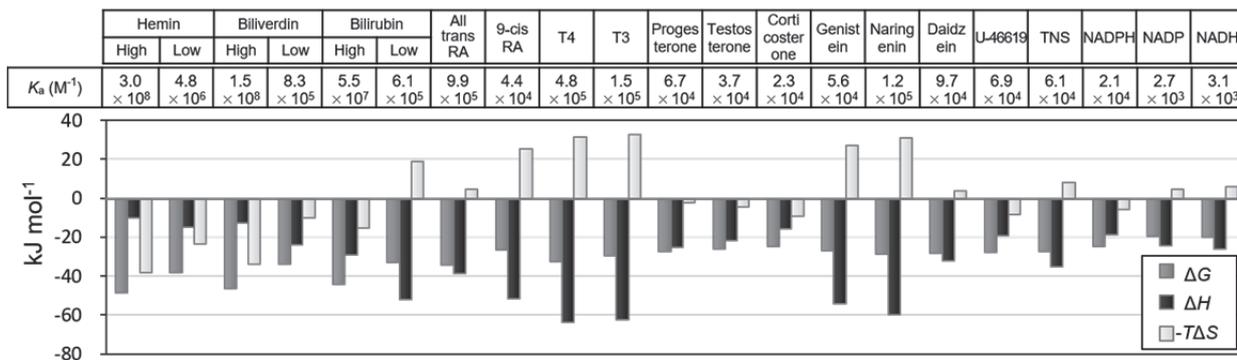


Fig.7 Enthalpic and entropic contributions to the binding affinity of the ligands of L-PGDS.

必須であるが、滴定曲線の形状から結合比を見積もるので、蛍光消光法やSPRに比べて結合モデルの絞り込みを行いやすい。例えば、プログラム SEDPHAT³⁸⁾ などを用いることで、結合モデル・親和性・結合エンタルピーの違いによってどのような滴定曲線になるかを予測できる。

これまで L-PGDS と結合することが明らかになっているリガンドの大部分において、その結合の熱力学的パラメータが報告されている。³⁻⁵⁾ このように、1つのタンパク質に対して、骨格構造の大きく異なる分子の ITC 実験の結果が得られている例は少ない。

ITC から得られる結合の熱力学的パラメータは、結合における微妙な違いに非常に敏感である。Fig.7 と Table 1 に示すように、実際にリガンドの僅かな部分構造の違いが、結合の熱力学的パラメータに差異を与えている。Kume らは、L-PGDS と疎水性リガンドの熱力学的相互作用解析を行い、類似した形状を持つ疎水性リガンドは同程度の親和性 (ΔG が同程度の値) を示す傾向があり、またそれらの間でエントロピー-エンタルピー補償効果が観察されることを示し、また、ビリベルジンなどの胆汁色素化合物に関しては、高親和性結合部位と低親和性結合部位との独立した二つの結合が検出されることを明らかにした。⁴⁾ さらに、我々は、L-PGDS に結合する親水性リガンドを見出し、その類似化合物との熱力学的パラメータの比較を行ったことで、負電荷を帯びる官能基の有無や分子中の正電荷の有無

で結合の ΔG に比較的大きな差が生じることから、極性部位がリガンド選択性に関与していることを示した。³⁾ 例えば、NADPH と NADH を比較すると、ただ一つのリン酸基の違いで各パラメータに明らかな違いが出ている。NADPHの方がより強く結合することから L-PGDS がリン酸基を認識している可能性は高い。そのためリン酸基の負電荷が L-PGDS の cavity の正電荷と相互作用するならエンタルピー的に有利であると直感的に考えてしまうが、興味深いことに、実際にはリン酸基を持たない NADHの方が ΔH の寄与が大きい。これは、前述したが“見かけの”エンタルピー変化 (ΔH^{obs}) が直接の相互作用による ΔH_{int} 以外の寄与を含んでいることに起因していると考えられる。極性官能基では疎水性官能基より ΔH_{desolv} が結合に不利に働くことが報告されており、³⁹⁾ そのことがこの結果をもたらしている可能性がある。また、NADPHの方がNADHよりもエントロ皮的寄与 ($-T\Delta S$) が大きいことも、極性官能基は ΔS_{desolv} が結合に有利に働くこと³⁹⁾ が関係していると考えられる。また、NADPHとNADP⁺を比較すると、正電荷を持つNADP⁺の親和性が低下しており、cavityの正電荷の反発を受けている可能性がみられる。NADPHのリン酸基の有無とニコチンアミド部位の酸化還元型の違いで、それぞれ約 5 kJ mol⁻¹ の結合 ΔG の差が生じる。NAD⁺では、恐らく NADPH より 10 kJ mol⁻¹ 以上結合に不利になる ($\Delta G > -15$ kJ mol⁻¹; $K_d > 2$ mM) と考えられ、少なくとも ITC では検出

Table 2 Correlation coefficients between binding thermodynamic parameters and solvent accessible surfaces and log*D* of ligands.

| | ASA | ASA ₊ | ASA ₋ | ASA _h | ASA _p | log <i>D</i> |
|--------------|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| ΔG | -0.58 (-0.60) | -0.59 (-0.60) | -0.33 (-0.39) | -0.85 (-0.81) | 0.28 (0.27) | -0.26 (-0.25) |
| ΔH | 0.47 (0.42) | 0.61 (0.51) | 0.14 (0.18) | 0.37 (0.33) | 0.19 (0.18) | -0.37 (-0.30) |
| $-T\Delta S$ | -0.63 (-0.59) | -0.75 (-0.66) | -0.25 (-0.30) | -0.65 (-0.59) | -0.05 (-0.05) | 0.21 (0.16) |

(Correlation coefficients in parentheses include multi-ligand binding data, such as bilin low affinity binding and TNS binding data.)

できなくなるだろう。これは、NMR リガンド滴下実験で、NAD⁺を滴下したとき僅かに相互作用が見られるが、ITCでほとんど熱量が検出できない実験的事実と一致している。³⁾

4.3 熱力学的パラメータとリガンド表面積の相関解析

L-PGDSが結合するリガンドの構造的特徴やその認識に関与する熱力学的パラメータを見出すため、リガンドの表面構造に着目し、ITCから得られた結合の熱力学的パラメータとの比較を行った。リガンドの溶媒接触表面積 (accessible surface area: ASA) とその詳細、疎水性表面積 (ASA_h)、親水性表面積 (ASA_p)、正電荷表面積 (ASA₊; 電荷 $q > 0$ の領域)、負電荷表面積 (ASA₋; 電荷 $q < 0$ の領域) を、また、リガンドの化学的性質として log*D* (pH 8.0) をソフトウェア MarvinSketch (ChemAxon) を用いて算出し、熱力学的パラメータと共に **Table 1** にまとめた。さらに、リガンドの表面構造情報・化学的性質と熱力学的パラメータの相関係数 (*R*) を求め、**Table 2** にまとめた。その結果、測定 pH 条件での疎水性度に関わる log*D* ではどの熱力学的パラメータも相関がなかった ($|R| < \sim 0.5$)。これは、Kumeらが示した Xlog*P* (分子の電離を考慮しない分配係数) と熱力学的パラメータと相関が弱かったことと矛盾しない結果となった。⁴⁾ 一方で、構造的特徴である疎水性表面積 (ASA_h) と ΔG には強い負の相関が観察された ($R = -0.85$) (**Fig. 8**)。このことは、リガンドの ASA_h が大きいほど結合に有利であることを示している。また、その帰直線の傾きから、ASA_h の ΔG に対する寄与を計算すると $-52 \text{ J mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ であった。Olsson らによる、ITC 相互作用解析のデータベース (SCORPIO) を用いた熱力学的パラメータとタンパク質-リガンド複合体形成による表面積変化との相関解析から、非極性表面積の減少量 ($-\Delta \text{CAS}_{\text{apolar}}$) と ΔG に強い負の相関があることがわかっており (ただし、 $-\Delta \text{CAS}_{\text{apolar}}$ にはタンパク質側の表面積変化も含まれている)、⁴⁰⁾ 一般的に疎水性表面の相互作用が結合に有利であることを示している。また、L-PGDS の結合 $-T\Delta S$ とリガンドの ASA_h では、負の相関がみられた ($R = -0.65$)。しかし、結合に伴う $-T\Delta S$ は、疎水性表面の水和水の放出に伴うエントロピー的な寄与 ($-T\Delta S_{\text{desolv}}$) が主であると考えられがちだが、タンパク質とリガンドの結合に伴うエントロピーの損失 ($-T\Delta S_{\text{conf}}$) も $-T\Delta S_{\text{desolv}}$ に匹敵するほど大きい。従って、疎水性表面の相互作用と $-T\Delta S$ の関係を安易に解釈することは危険である。ただし、今回のように同一タンパク質の結合の比較の場合、リガンドに関わらず同様の構造変化を起こすなら、タンパク質側 $-T\Delta S_{\text{conf}}$ に大きな違いがないため、リガンドの $-T\Delta S_{\text{conf}}$ と水和水の $-T\Delta S_{\text{desolv}}$ の寄与が抽出できているのかもしれない。今後、これまで構造決定に至っていない複合体の構造情報が得られれば、さらに詳細な議論が可能になると期待される。

L-PGDS の cavity の正電荷領域はリガンドの負電荷の認識に関与すると考えられるが、^{3,28)} ASA₊はいずれの熱力学的パラメータとも相関がなかった。先の ASA_h の結果と合わせると、相関グラフで ASA_h → 0 とした時に残る約 -10 kJ

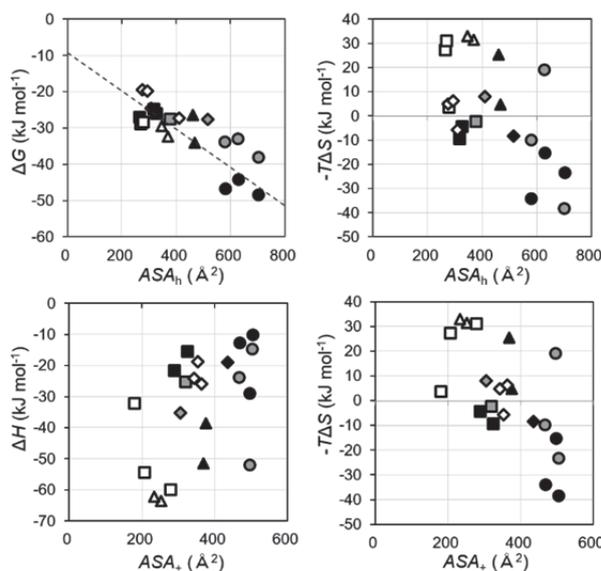


Fig. 8 Correlation between thermodynamic parameters and solvent accessible surface area of ligands, Heme and bile pigments (high affinity binding: solid circles, low affinity binding: gray circles), retinoids (solid triangles), thyroids (open triangles), progesterone and other steroids (gray square and solid squares), flavonoids (open squares), NADs (open diamond), U-46619 and TNS (solid diamond and gray diamond). The dashed line in the correlation between ΔG and ASA_h indicates a linear least-squares fit.

mol⁻¹ が最低限必要な cavity の正電荷領域とリガンドの負電荷の相互作用エネルギーと考えられる。つまり、L-PGDS の場合、リガンドとの極性相互作用は約 -10 kJ mol^{-1} 程度あれば良く、あとは、疎水性相互作用が親和性を補完していることを示唆しており、我々は、この最低限の極性相互作用エネルギーがリガンドの親和性よりも選択性の鍵を握っていると考えている。これは、正電荷の親水性領域がリガンド選択性、疎水性領域が親和性に関与しているという構造情報と相互作用解析から得た知見と矛盾しない。さらに、正電荷表面積 (ASA₊) と ΔH や $-T\Delta S$ にそれぞれ正の相関 ($R = 0.61$) と負の相関 ($R = -0.75$) がみられる。これは、正電荷領域同士の反発が ΔH に不利に働き、また、それによってリガンドが密に固定されないため $-T\Delta S$ としては有利に働く現象を示していると推測されるが、前述した極性表面の水和水の寄与も入ってくるからか全てのリガンドでその傾向があるわけではない。

ITC で得られる結合の熱力学的パラメータは、タンパク質とリガンドの直接の相互作用以外の様々な要素を含んだ総和として得られる。それぞれの要素の寄与を抽出または算出し、構造情報などとの相関を見出す試みがなされているが、^{9,14)} タンパク質とリガンドの相互作用を直接的に熱力学的パラメータで解釈することは未だに困難である。し

かし、今回の L-PGDS とリガンドの相互作用解析のように、解釈が難しいとされる“柔らかい”タンパク質が対象であっても構造的特徴と熱力学的パラメータには相関するものが存在し、一つのタンパク質に複数のリガンドがある場合、それらの比較によって見えてくる相関もあることがわかる。今後、L-PGDS とリガンドの複合体構造や水に関わる水分子などの情報が得られれば、熱力学的パラメータのさらに細かい議論ができるだろう。

5. おわりに

本稿では、リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) のリガンド認識機構について解説した。この L-PGDS の持つ“広いリガンド選択性”という興味深い性質は、特定の物質と特異的に結合する Anticalin の鋳型としても有用であると考えられる。さらに近年、その性質に着目し、難溶性薬剤の可溶化と標的指向性の付加によるドラッグ・デリバリー・システムに応用する試みもなされている。⁴¹⁻⁴³⁾ 従って、将来的に L-PGDS の認識可能な化合物の化学的・構造的特徴を明らかにする必要も出てくるだろう。既にリガンド結合の熱力学的データも数多く得られているが、それらを有用に活用するのは容易ではない。今回は、L-PGDS の構造情報と結合の熱力学的パラメータから、主に親水性リガンドである NADPH の結合を説明した。またリガンド側のみ表面構造に着目し、結合の熱力学的パラメータとの相関を探った。その結果、疎水性表面積と ΔG 、 $-T\Delta S$ の相関など、リガンドの構造的特徴と熱力学的パラメータに相関が得られ、L-PGDS の構造情報から得られた知見とよく一致した。未だにタンパク質-リガンド相互作用における構造と熱力学的パラメータの解釈では、経験的・慣習的な議論が多い。しかし、そこには普遍の真理が眠っているはずであり、近年急速に増えつつある ITC による相互作用解析の研究データの集積と技術の向上が、その扉を開く鍵になると期待している。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、大阪大学大学院工学研究科 小林 祐次 博士、大阪大学大学院薬学研究科 大久保 忠恭 博士、吉田 卓也 博士、河原 一樹 博士、秦 殊斌 博士、近畿大学理工学部 日高 雄二 博士、筑波大学国際統合睡眠医学科学研究機構 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 博士を始めとする共同研究者や大学院生・学部生の方々にご助力を頂いた。最後に記して深く感謝を申し上げる。

文 献

- 1) S. Leavitt and E. Freire, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**(5), 560-566 (2001).
- 2) G. Beste, F. S. Schmidt, T. Stibora, and A. Skerra, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**(5), 1898-1903 (1999).
- 3) S. Qin, S. Shimamoto, T. Maruno, Y. Kobayashi, K. Kawahara, T. Yoshida, and T. Ohkubo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **468**(1-2), 234-239 (2015).
- 4) S. Kume, Y. H. Lee, M. Nakatsuji, Y. Teraoka, K. Yamaguchi, Y. Goto, and T. Inui, *FEBS Lett.* **588**(6), 962-969 (2014).
- 5) S. Kume, Y. H. Lee, Y. Miyamoto, H. Fukada, Y. Goto, and T. Inui, *Biochem. J.* **446**(2), 279-289 (2012).
- 6) I. Luque and E. Freire, *Proteins-Structure Function and Genetics* **49**(2), 181-190 (2002).
- 7) A. A. Rashin and K. Namboodiri, *J. Phys. Chem.-Us* **91**(23), 6003-6012 (1987).
- 8) I. Luque and E. Freire, *Methods. Enzymol.* **295**, 100-127 (1998).
- 9) R. Filfil and T. V. Chalikian, *FEBS Lett.* **554**(3), 351-356 (2003).
- 10) A. Velazquez-Campoy, Y. Kiso, and E. Freire, *Arch. Biochem. Biophys.* **390**(2), 169-175 (2001).
- 11) G. Klebe, *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**(2), 95-110 (2015).
- 12) T. S. Olsson, J. E. Ladbury, W. R. Pitt, and M. A. Williams, *Protein Sci.* **20**(9), 1607-1618 (2011).
- 13) M. R. Eftink, A. C. Anusiem, and R. L. Biltonen, *Biochemistry* **22**(16), 3884-3896 (1983).
- 14) R. Claveria-Gimeno, S. Vega, O. Abian, and A. Velazquez-Campoy, *Expert. Opin. Drug. Dis.* **12**(4), 363-377 (2017).
- 15) D. R. Flower, *Biochem. J.* **318** (Pt 1) 1-14 (1996).
- 16) S. Schlehuber and A. Skerra, *Drug. Discov. Today* **10**(1), 23-33 (2005).
- 17) D. R. Flower, A. C. North, and C. E. Sansom, *Biochim. Biophys. Acta* **1482**(1-2), 9-24 (2000).
- 18) A. Skerra, *J Mol Recognit* **13**(4), 167-187 (2000).
- 19) B. J. Glasgow, A. R. Abduragimov, T. N. Yusifov, O. K. Gasmov, J. Horwitz, W. L. Hubbell, and K. F. Faull, *Biochemistry* **37**(8), 2215-2225 (1998).
- 20) I. Couillin, I. Maillet, B. B. Vargaftig, M. Jacobs, G. C. Paesen, P. A. Nuttall, J. Lefort, R. Moser, W. Weston-Davies, and B. Ryffel, *J. Immunol.* **173**(5), 3281-3286 (2004).
- 21) A. Richter and A. Skerra, *Biol. Chem.* **398**(1), 39-55 (2017).
- 22) Y. Urade, N. Fujimoto, and O. Hayaishi, *J. Biol. Chem.* **260**(23), 12410-12415 (1985).
- 23) A. Nagata, Y. Suzuki, M. Igarashi, N. Eguchi, H. Toh, Y. Urade, and O. Hayaishi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**(9), 4020-4024 (1991).
- 24) C. T. Beuckmann, M. Aoyagi, I. Okazaki, T. Hiroike, H. Toh, O. Hayaishi, and Y. Urade, *Biochemistry* **38**(25), 8006-8013 (1999).
- 25) T. Tanaka, Y. Urade, H. Kimura, N. Eguchi, A. Nishikawa, and O. Hayaishi, *J. Biol. Chem.* **272**(25), 15789-15795 (1997).
- 26) Y. Urade, T. Tanaka, N. Eguchi, M. Kikuchi, H. Kimura, H. Toh, and O. Hayaishi, *J. Biol. Chem.* **270**(3), 1422-1428 (1995).
- 27) S. Shimamoto, T. Yoshida, and T. Ohkubo, *Yakugaku Zasshi* **131**(11), 1575-1581 (2011).
- 28) S. Shimamoto, T. Yoshida, T. Inui, K. Gohda, Y. Kobayashi, K. Fujimori, T. Tsurumura, K. Aritake, Y. Urade, and T. Ohkubo, *J. Biol. Chem.* **282**(43), 31373-31379 (2007).
- 29) C. Lucke, L. Franzoni, F. Abbate, F. Lohr, E. Ferrari, R. T. Sorbi, H. Ruterjans, and A. Spisni, *Eur. J. Biochem.* **266**(3), 1210-1218 (1999).
- 30) K. Kuwata, M. Hoshino, V. Forge, S. Era, C. A. Batt, and Y. Goto, *Protein Sci.* **8**(11), 2541-2545 (1999).
- 31) J. S. Bailey and C. H. Siu, *J. Biol. Chem.* **263**(19), 9326-9332 (1988).
- 32) Y. Miyamoto, S. Nishimura, K. Inoue, S. Shimamoto, T. Yoshida, A. Fukuhara, M. Yamada, Y. Urade, N. Yagi, T. Ohkubo, and T. Inui, *J. Struct. Biol.* **169**(2), 209-218 (2010).
- 33) K. Inoue, N. Yagi, Y. Urade, and T. Inui, *J. Biochem.* **145**(2), 169-175 (2009).
- 34) S. Shimamoto, H. Maruo, T. Yoshida, and T. Ohkubo, *Biomol. NMR Assign* **8**(1), 129-132 (2013).
- 35) J. K. Yano, M. R. Wester, G. A. Schoch, K. J. Griffin, C. D. Stout, and E. F. Johnson, *J. Biol. Chem.* **279**(37), 38091-38094 (2004).
- 36) P. A. Williams, J. Cosme, D. M. Vinkovic, A. Ward, H. C. Angove, P. J. Day, C. Vornrhein, I. J. Tickle, and H. Jhoti, *Science* **305**(5684), 683-686 (2004).

- 37) T. Kumasaka, K. Aritake, H. Ago, D. Irikura, T. Tsurumura, M. Yamamoto, M. Miyano, Y. Urade, and O. Hayaishi, *J. Biol. Chem.* **284**(33), 22344-22352 (2009).
- 38) J. C. D. Houtman, P. H. Brown, B. Bowden, H. Yamaguchi, E. Appella, L. E. Samelson, and P. Schuck, *Protein Science* **16**(1), 30-42 (2007).
- 39) S. Cabani, P. Gianni, V. Mollica, and L. Lepori, *J. Solution. Chem.* **10** 563-595 (1981).
- 40) T. S. Olsson, M. A. Williams, W. R. Pitt, and J. E. Ladbury, *J. Mol. Biol.* **384**(4), 1002-1017 (2008).
- 41) M. Nakatsuji, H. Inoue, M. Kohno, M. Saito, S. Tsuge, S. Shimizu, A. Ishida, O. Ishibashi, and T. Inui, *PLoS One* **10**(11), e0142206 (2015).
- 42) M. Mizoguchi, M. Nakatsuji, H. Inoue, K. Yamaguchi, A. Sakamoto, K. Wada, and T. Inui, *Eur. J. Pharm. Sci.* **74**, 77-85 (2015).
- 43) A. Fukuhara, H. Nakajima, Y. Miyamoto, K. Inoue, S. Kume, Y. H. Lee, M. Noda, S. Uchiyama, S. Shimamoto, S. Nishimura, T. Ohkubo, Y. Goto, T. Takeuchi, and T. Inui, *J. Control Release* **159**(1), 143-150 (2012).