

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) とアミロイド
β ペプチド複合体の X 線溶液散乱法による構造解析

Structural analysis of the complex between lipocalin-type
prostaglandin D synthase and amyloid β-peptide with small angle x-ray
scattering.

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

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

^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, ヒト組換え型リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) とアミロイド β ペプチド (Aβ1-40) 複合体の構造解析を行った。その結果, アポ L-PGDS に関しては, これまでに行ってきたマウス組換え型 L-PGDS と同様に球状蛋白質であることを示す散乱曲線が得られ, その慣性半径は 19.23 Å であった。しかし, Aβ1-40 との複合体に関しては複合体作製の条件が悪くノイズの多いデータを得るにとどまった。

We tried structural analysis of the complex between human recombinant lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) and amyloid β-peptide (Aβ1-40) by the use of small angle x-ray scattering (SAXS). The scattering intensity curve obtained from apo-L-PGDS revealed a globular shape of human L-PGDS as well as mouse L-PGDS. The radius of gyration was estimated to be 19.23 Å for L-PGDS in the absence of Aβ1-40. However, due to the aggregation through the preparation of L-PGDS/Aβ1-40 complex, it was not succeeded to perform SAXS measurements.

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, アミロイド β ペプチド

背景と研究目的 : アルツハイマー病において, 痴呆の程度と神経細胞の脱落が非常によく相関し, 脳の病理学的所見として老人斑, 及び神経原線維変化の形成が認められる。老人斑の主要構成成分は, アミロイド β ペプチド (Aβ) であり, 老人斑は Aβ が細胞外に繊維状に蓄積することによって形成されたものである。Aβ には, 2 種類の Aβ, Aβ 1-40 と Aβ 1-42 があり, 脳内では Aβ 1-42 に比べて Aβ 1-40 が圧倒的に多く合成される。また, びまん性老人斑には Aβ 1-42 が蓄積しており, 核化老人斑には両方とも蓄積している。つま

り, Aβ 蓄積過程において, 初期に Aβ 1-42 が蓄積し, それが核となり Aβ 1-40 が蓄積するのではないかと考えられている。また, 健康な脳では未確認のシャペロンが, Aβ の凝集体形成を防いでいると推定されている。以上より, Aβ を脳内で蓄積させないことが, アルツハイマー病の予防あるいは治療の大きな鍵になると考えられる。これまでに, 我々はヒト脳脊髄液中に存在する蛋白質であり, リポカリン遺伝子ファミリーに属する L-PGDS が, Aβ 1-40 と高親和性に結合することが見出した ($K_d=20$ nM)。さらに, L-PGDS

が、アルツハイマー病患者とアルツハイマー病モデルマウスの双方のアミロイド斑に局在化していること、L-PGDSとA β 1-40が高親和性に結合し、A β 1-40のミスフォールディングを防ぐことにより、A β 1-40の凝集体形成を阻害することが報告された¹。L-PGDSが脳脊髄液中に非常に多いタンパク質であること、老人斑蓄積の核になると考えられているA β 1-40と高親和性に結合することから、L-PGDSは、A β 1-40に対して分子シャペロン、あるいはスカベンジャーとして働き、この性質を利用することにより、L-PGDSは新規アルツハイマー病予防薬、あるいは改善薬として利用できる可能性が示唆されるのではないかと期待される。これらの複合体の構造を解明することは、蛋白質性医療薬としての可能性を開拓することにつながり、非常に意義があると考えられる。本申請研究では、L-PGDSとA β 1-40の複合体の構造についてX線小角散乱法を用いて解明することを目的とし実験を行う。さらにL-PGDSの変異体を用いた実験も行い、それぞれの構造変化を比較することにより、詳細な病理メカニズムの検討を行う。

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1.0 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⁺⁺ 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)を用いた。A β 1-40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/A β 1-40複合体のX線溶液散乱パターンを示す。

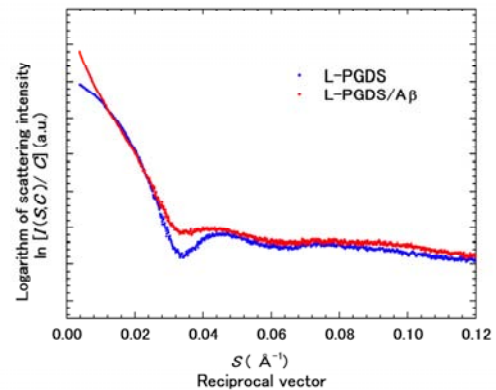


Fig. 1 SAXS profiles of L-PGDS and L-PGDS/A β 1-40 complex. SAXS profiles of L-PGDS (blue dots) and L-PGDS/A β 1-40 (red dots) are shown. The logarithm of scattering intensity is shown as a function of reciprocal vector (S).

図1の散乱曲線より、ヒト L-PGDS は球状蛋白質であることが判明した。また、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 $R_g(C)^2$ (R_g :慣性半径) をプロットし、濃度ゼロにおける L-PGDS の慣性半径を計算した結果、19.23 Å という値を示し、マウス L-PGDS (19.4 Å) とほぼ同程度の大きさであることが判明した。しかし、L-PGDS/A β 1-40 複合体の SAXS は、ギニエ領域でその強度が急上昇し、試料調整の段階における凝集体形成を示唆するデータとなった。今後は、L-PGDS/A β 1-40 複合体において、SXAS 測定行える濃度まで凝集対形成しない条件を見出す必要がある。

¹Kanekiyo, T. et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 6412–6417.