

2008年3月27日

独立行政法人 理化学研究所

生活習慣病に関連するタンパク質複合体の結晶構造を世界で初めて決定

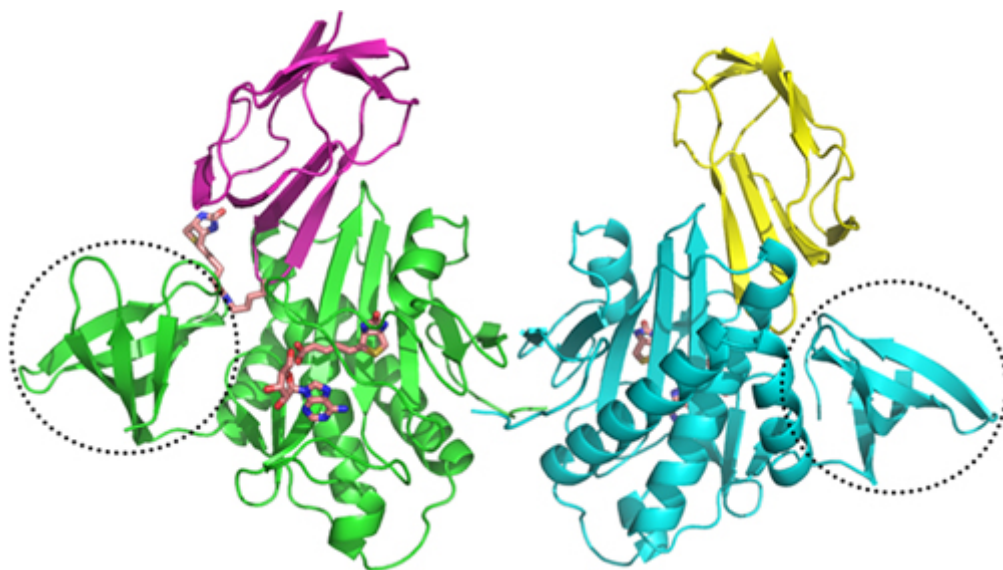
- 脂肪を体内に蓄える仕組みを制御する酵素の働きを可視化 -

メタボリックシンドロームの元凶と恐れられる太り過ぎは、過食して余ったエネルギーを脂肪（脂肪酸）として蓄えるシステムが働いた結果です。蓄積した脂肪は、厳しい環境で生きる野生動物にとっては、生命活動の維持に必要なエネルギー源として不可欠ですが、食糧事情が安定している人間にとっては肥満や糖尿病などの生活習慣病を引き起こす原因となっています。

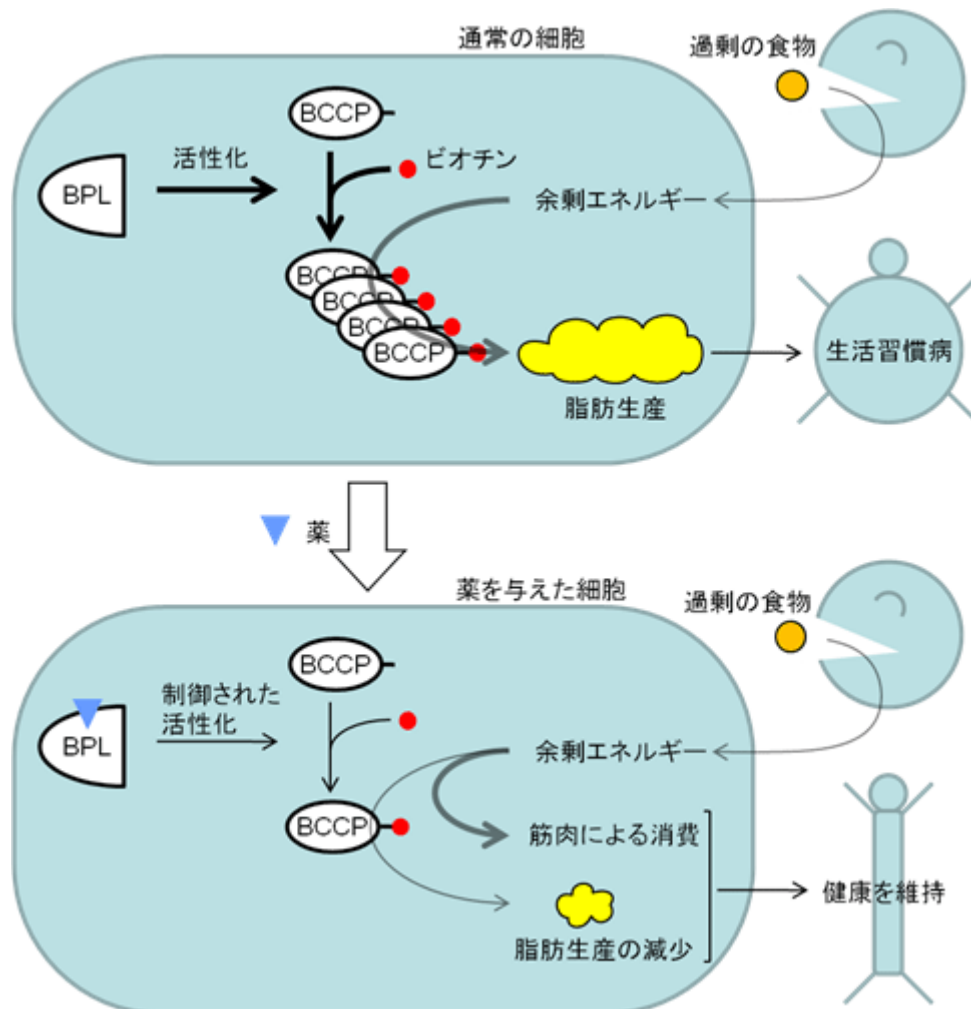
細胞の中で脂肪酸を合成する働きを制御することができると、生活習慣病を防ぐ新たな道が拓けます。

放射光科学総合研究センタータンパク質結晶構造解析研究チームは、この脂肪酸合成の初期に活躍する酵素「アセチル CoA カルボキシラーゼ」にその活性化を触媒する酵素が結合した瞬間のタンパク質複合体の結晶化に成功し、その構造を世界で初めて解明しました。このタンパク質複合体は不安定で、これまで結晶化が不可能でした。今回、活性化酵素の変異体を使うことで安定した複合体をつくり、問題を解決しました。

この方法を活用すると、結晶化が難しいとされてきたタンパク質の結晶化と構造解析が実現でき、機能の解明が可能となります。また、今回の結晶構造解析で得た脂肪酸の合成に関する知見は、医薬開発の基盤となる情報となり、生活習慣病やメタボリックシンドロームの治療薬開発に結びつくものと期待されます。



(図) 脂肪酸合資酵素活性に深く関係する
BPL-BCCP 複合体



(図) BCCP の活性化制御による生活習慣病の
 予防システム

2008年3月27日
独立行政法人 理化学研究所

生活習慣病に関連するタンパク質複合体の結晶構造を世界で初めて決定

- 脂肪を体内に蓄える仕組みを制御する酵素の働きを可視化 -

◇ポイント◇

- ・活性化した瞬間の複合体の結晶化に成功し、構造解析を実現
- ・解析困難なタンパク質の立体構造決定の新手法に
- ・肥満や糖尿病などの治療薬開発に新たな糸口をもたらす

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、生活習慣病に関連するタンパク質複合体の結晶構造を決定することに世界で初めて成功しました。理研放射光科学総合研究センター（石川哲也センター長）タンパク質結晶構造解析研究チームのバガウティン・バガウティノフ研究員および国島直樹上級研究員らによる研究成果で、文部科学省「タンパク 3000 プロジェクト」の一環として実施したものです。

生物は、体内で余ったエネルギーを脂肪（脂肪酸）として蓄え、生命活動の維持に必要な時にエネルギー源として利用しています。元来この仕組みは生物にとって必要不可欠なものですが、食糧事情の安定している人間では逆に肥満や糖尿病など生活習慣病を引き起こす原因となることがあります。過剰な食物摂取が原因の生活習慣病は、細胞による脂肪酸合成の最初の段階で必須な役割を担う酵素「アセチルCoAカルボキシラーゼ^{*1}」の働きを制御することで、原理的には予防が可能です。具体的には、アセチルCoAカルボキシラーゼのBCCPと呼ばれる部分の活性化を薬によって制御します。そのような薬を開発するためには、この活性化を触媒するBPLと呼ばれる酵素とBCCPとの複合体の立体構造を決定する必要がありますが、この複合体は非常に不安定で、その構造解析はいまだ成功していません。

研究チームは、2005年に古細菌^{*2}由来のBPLの結晶構造を決定することに成功し、その立体構造情報をもとにBPLを部分的に改変した変異体タンパク質をいくつも作成し、古細菌由来BCCPとの複合体の結晶化を試しました。その結果、2種類のBPL変異体を使うと通常不安定なBPL-BCCP複合体が安定化して、結晶を得ることに成功しました。その後、理研の大型放射光施設SPring-8^{*3}の放射光（ビームラインBL26B1）を用いてこれらの結晶の構造決定を世界で初めて実現し、創薬の基盤となる貴重な構造情報を得ることとなりました。

タンパク質の立体構造に基づく薬の設計が一般的になった今、タンパク質の立体構造決定の成否が治療薬開発成功の鍵を握っています。今回の変異導入によるタンパク質構造安定化法の成功により、今まで解析できなかった疾患関連タンパク質の構造解析に道が開けました。多くの治療困難な病気に対する安全で効能の高い治療薬設計が可能となり、その開発スピードが加速すると期待できます。

本研究成果は、米国の科学雑誌『*Journal of Biological Chemistry*』に近く掲載予定です。

1. 背景

生物は、体内で余ったエネルギーを脂肪（脂肪酸）として蓄え、生命活動の維持に必要な時にエネルギー源として利用しています。この仕組みは、常に飢えにさらされた野生生物では必要不可欠な安全装置となりますが、食糧事情が安定している人間では逆に肥満や糖尿病など生活習慣病を招く原因となることがあります。脂肪酸の生合成は、そのいくつかの段階で重要な役割を担う酵素「アセチル CoA カルボキシラーゼ」の BCCP (biotin carboxyl carrier protein) と呼ばれる部分の特定のアミノ酸残基に、ビオチンが化学的に結合して初めて動き出します (図 1)。この BCCP のビオチン化は、すべての生物に共通して BPL (biotin protein ligase) と呼ばれる酵素が触媒します。従って、この BPL による BCCP のビオチン化の仕組みを原子レベルで理解することができると、生活習慣病の治療薬開発に道が開けます (図 2)。そのためには、BPL と BCCP の複合体の結晶構造を決定し、それぞれの機能を解析することが必要ですが、この複合体が不安定なために、これまで誰も結晶化に成功していませんでした。研究チームは、2005 年に古細菌由来の BPL の結晶構造を決定することに成功し、それに引き続いて、BPL と古細菌由来の BCCP との複合体の結晶化を試みていました。しかし、BPL-BCCP 複合体が示す本質的な不安定性のため、従来行われてきた様々な方法では結晶化が困難でした。(図 3)。

2. 研究手法と成果

研究チームは、古細菌 BPL の結晶構造を参考にして、BPL における基質^{*4}の分子認識に関係するアミノ酸残基に部位特異的変異^{*5}を導入した BPL 変異体を 8 種類作成し、BCCP との複合体の結晶化を試みました。その結果、2 種類の変異体では BPL-BCCP 複合体の結晶化に世界で初めて成功しました (図 3)。使用した変異体が酵素としての機能を本質的に保っていることは、反応中間体やビオチン化した活性型 BCCP が正常に生成していることで確認しました。

次に、大型放射光施設 SPring-8 の放射光 (ビームライン BL26B1) を用いて、BPL-BCCP 複合体の構造決定を行いました。構造決定により、これらの BPL 変異体では基質認識が野生型 BPL におけるそれよりも弱くなっていることがわかりました。また、驚いたことに、1 つの結晶中でビオチン化が起きる前の状態とビオチン化後の状態の複合体を同時に観測することができました (図 4)。最終的に、反応前後の 3 つの複合体構造と、複合体をつくる前の 2 つの構造を含む 5 つの異なる状態の結晶構造を得ました。

BPL によるタンパク質のビオチン化は、特定のタンパク質の特定のアミノ酸残基だけを標的にするという選択性の非常に高い反応として注目されていますが、なぜそのようなことが可能なのか今まで不明でした。今回、複数の結晶構造を観測し、ビオチン化に至るまでに数多くの反応段階が存在することがわかりましたが、このことが高い選択性に大きく寄与していることが推測できました。さらに、複合体形成や反応に関わるアミノ酸残基が判明するなど、創薬の基盤となる貴重な構造情報を得ました。例えば、BPL の C 末端ドメインと呼ばれる部分の構造が、観測された反応段階の間で大きく変化し、反応を制御する鍵となっていました。この C 末端ドメインの構造を固定化する薬剤を設計すると、BCCP の活性化を効果的に制御する

ことができるようになります (図 4)。

3. 今後の期待

生命を担うタンパク質の機能を原子レベルで理解するには、その立体構造を原子レベルで決定することが不可欠です。X線結晶構造解析は、これまでタンパク質の原子レベルの立体構造を決定するための最も強力な一般的な方法の一つでした。しかし、これまでの構造ゲノミクス^{*6}の結果から、耐熱性微生物由来のタンパク質でさえ、容易に結晶化できるものはゲノム全体の4割程度でしかないことがわかってきました。残り6割のタンパク質の結晶を得ることは、現在の技術では非常に困難です。超分子複合体^{*7}や膜タンパク質^{*8}など、一般に難解析性タンパク質と呼ばれるものの多くは分子の性質に問題があり、良質の結晶が得られません。また、今回の例のように、タンパク質の機能に関わった本質的な不安定性がある場合もやはり結晶が得られません。

一般的に変異の導入は、タンパク質の本来の機能を損なう可能性があり、構造解析の手段として変異体を利用することはできるだけ回避される傾向にあります。しかし、今回の成功例のように、変異の導入によって初めて構造解析が可能になる場合もあり、この手法が使えるケースはほかにも多くあると予想されます。今回決定した結晶構造は、変異体を含む試料タンパク質と異なる結晶化条件の組み合わせで、約30種類にもなります。これら様々な結晶構造を比較検討することでBPLタンパク質の本来の機能に迫ることができました。研究チームは、この成功例を解析困難なタンパク質の構造解析のための技術開発につなげていきます。また、今回の研究成果をもとに、肥満や糖尿病などの治療薬開発のための候補化合物探索や、ビオチン標識を利用したタンパク質工学的技術^{*9}の開発などを進めていきます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所播磨研究所

放射光科学総合研究センター

タンパク質結晶構造解析研究チーム

上級研究員 国島 直樹 (くにしま なおき)

Tel : 0791-58-0802 (内線 3648)

播磨研究推進部 企画課

Tel : 0791-58-0900 / Fax : 0791-58-0800

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 アセチル CoA カルボキシラーゼ

ビタミンの1種であるビオチンを化学的に結合することで活性化する「ビオチン依存性カルボキシラーゼ」と呼ばれる酵素の1種。4種類のサブユニットあるいはドメインから成る分子量45万の大型タンパク質。クエン酸による調節を受け巨大な繊維状ポリマーになることでさらに活性化される。アセチル CoA カルボキシラーゼは、脂肪酸の生合成の最初の段階でアセチル CoA へ炭酸を付加し、マロニル CoA を産生する。この反応は数段階の素反応を含む複雑な反応であり、地球温暖化問題を解決する切り札として注目されている炭酸固定反応でもある。この酵素の遺伝子を破壊した変異体マウスは食物の過剰摂取による肥満がなく、筋肉が発達して健康で寿命も平均的という実験結果が報告されており、生活習慣病治療のためのターゲットタンパク質として注目されている。

※2 古細菌

ヒトを含む真核生物、バクテリアなどの原核生物と並ぶ、生物の第3のグループ。温泉の源泉など、通常の生物では生体物質が熱で変性してしまうために生きられないような環境を好んで生息する。これらから抽出したタンパク質は熱に強く、実験を行う上で都合がよいため、タンパク質研究によく用いられる。今回の研究対象タンパク質である BCCP および BPL は、ヒトと古細菌の間でアミノ酸配列がよく似ているため、モデル生物として古細菌を用いてビオチン化の仕組みを解明することは、ヒトにおけるそれを明らかにすることと直結していると言える。

※3 大型放射光施設 SPring-8

理化学研究所が所有する、兵庫県播磨科学公園都市にある大型共同利用施設。ほぼ光速で進む電子が、その進行方向を磁石などによって変えられると接線方向に電磁波が発生する。これが「放射光（シンクロトロン放射）」と呼ばれるものであり、電子のエネルギーが高く、進行方向の変化が大きいほど、X線などの短い波長の光を含むようになる。特に第3世代の大型放射光施設と呼ばれるものには、理研の SPring-8、APS（アメリカ）、ESRF（フランス）の3つがある。SPring-8（電子の加速エネルギー：80億電子ボルト）の場合、遠赤外から可視光線、真空紫外、軟X線を経て硬X線に至る幅広い波長域で放射光を得ることができる。国内外の研究者の共同利用施設として、物質科学・地球科学・生命科学・環境科学・産業利用などの幅広い分野で利用されている。年間の利用者は、11,000人にもものぼる。

※4 基質

酵素の触媒する反応の原料となる物質を一般的に基質と呼ぶ。BPLの触媒するBCCPタンパク質のビオチン化反応では、ATP（アデノシン三リン酸）・ビオチン・BCCPの3種類の基質がある。今回注目したのはこのうちのATPで、その分子認識に関与するBPLのアミノ酸残基に部位特異的変異を導入した。

※5 部位特異的変異

遺伝子操作により、目的タンパク質の特定のアミノ酸残基を任意の別の種類のアミノ酸に置換することができる。この技術でタンパク質に導入した突然変異を部位特異的変異という。

※6 構造ゲノミクス

タンパク質の立体構造は、生物を原子レベルで理解するために不可欠な情報である。生物の全遺伝子（ゲノム）を多種類の生物について解読するゲノミクスが実現した後、それらのゲノムがコードするタンパク質の立体構造を網羅的に決定し、立体構造に基づく研究開発の基盤として役立てようとする大規模な研究プログラムが世界的に進められている。この学問分野を構造ゲノミクスという。日本では2007年3月までの5年間「タンパク3000プロジェクト」と呼ばれる国家プロジェクトが実施され、多数の構造決定が行われるとともに、効率的な構造解析のためのインフラが整備された。研究チームでは、このタンパク3000プロジェクトにおいて結晶構造を139種類（PDB登録304件）決定し、これらの立体構造を比較してタンパク質の構造機能の相関関係を体系的に解明する研究を展開した。また同プロジェクトにおいて、タンパク質自動結晶化システムや構造解析支援ソフトウェアなどの効率的な構造解析基盤を確立した。現在、それらの成果をXFELプロジェクトや統合データベースプロジェクトの推進に活用する一方、難解析性タンパク質の構造決定を促進するため、タンパク3000プロジェクトで開発された要素技術を発展させ、変異導入による結晶改善技術やゼオライトによる結晶化制御技術の開発を進めている。

※7 超分子複合体

多種類のタンパク質が会合して巨大な複合体をつくることで、初めて機能を発揮するタンパク質複合体のこと。プロトンポンプやリボゾームなどが例として挙げられる。不安定で試料の調製や結晶化が難しく、解析困難なものがほとんどである。

※8 膜タンパク質

膜に組み込まれて機能するタンパク質のこと。膜タンパク質は、生体内では脂質でできた細胞膜という2次元の物質中に存在しており、結晶という3次元構造へ変化させるために必要な試料調製や結晶化には、特殊な発現系や界面活性剤処理など、高度な技術が求められる。膜タンパク質は、もっとも重要な創薬ターゲットであるGタンパク質共役型受容体（GPCR）に代表される、シグナル伝達の鍵となる膜受容体など医学的・生物学的に重要なものを多く含むが、解析困難なためほとんど構造が決定されていない。世界で初めて膜部分を含む全体構造が決定されたGPCRであるロドプシンの結晶構造解析は、SPring-8を使った成果である。

※9 ビオチン標識を利用したタンパク質工学的技術

タンパク質のビオチン修飾は生体内で非常にまれな反応で、また、その検出がアビジンと呼ばれるタンパク質を用いることにより非常に高感度で行えることから、タンパク質の標識によく用いられる。例えば、遺伝子操作により目的タンパク質と

BCCP をつないだ人工タンパク質を設計し、それを発現させた細胞を固定した後、BPL でビオチン化し検出することで、目的タンパク質が細胞のどこに局在しているかを詳細に調べることが可能。

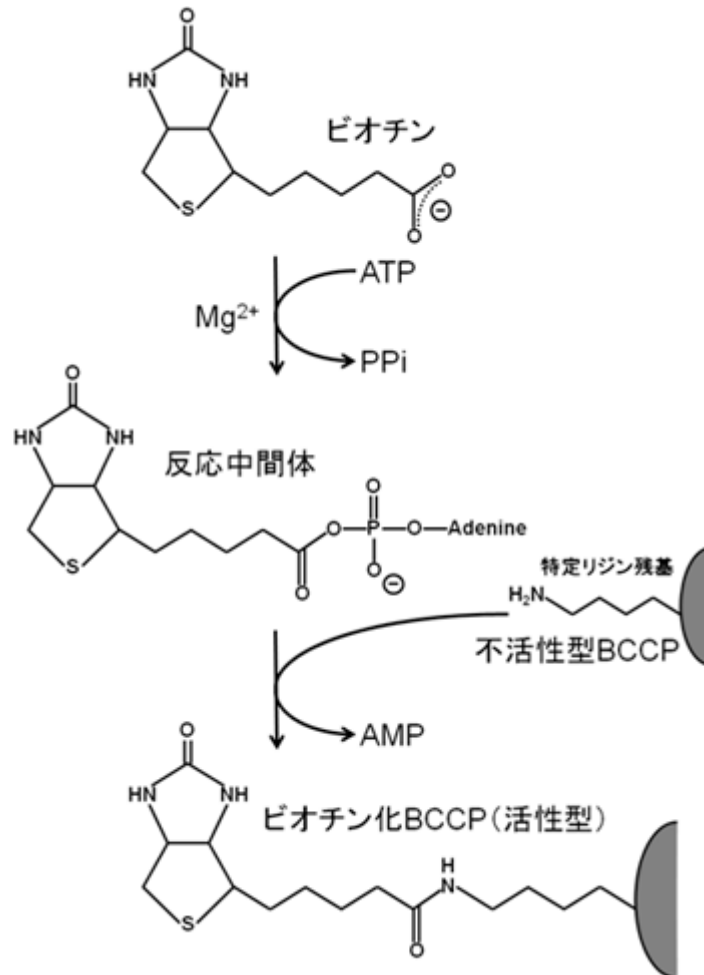


図 1 BPL による BCCP の活性化

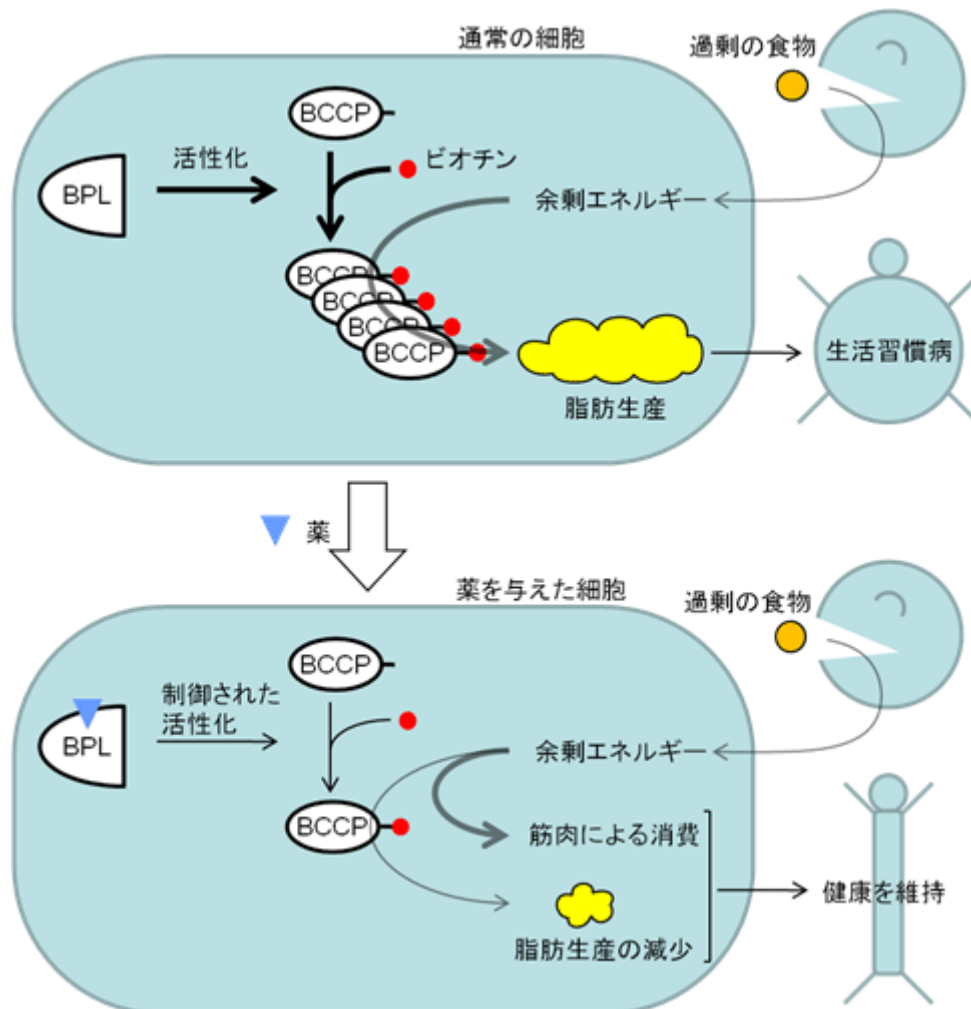


図 2 BCCP の活性化制御による生活習慣病の予防

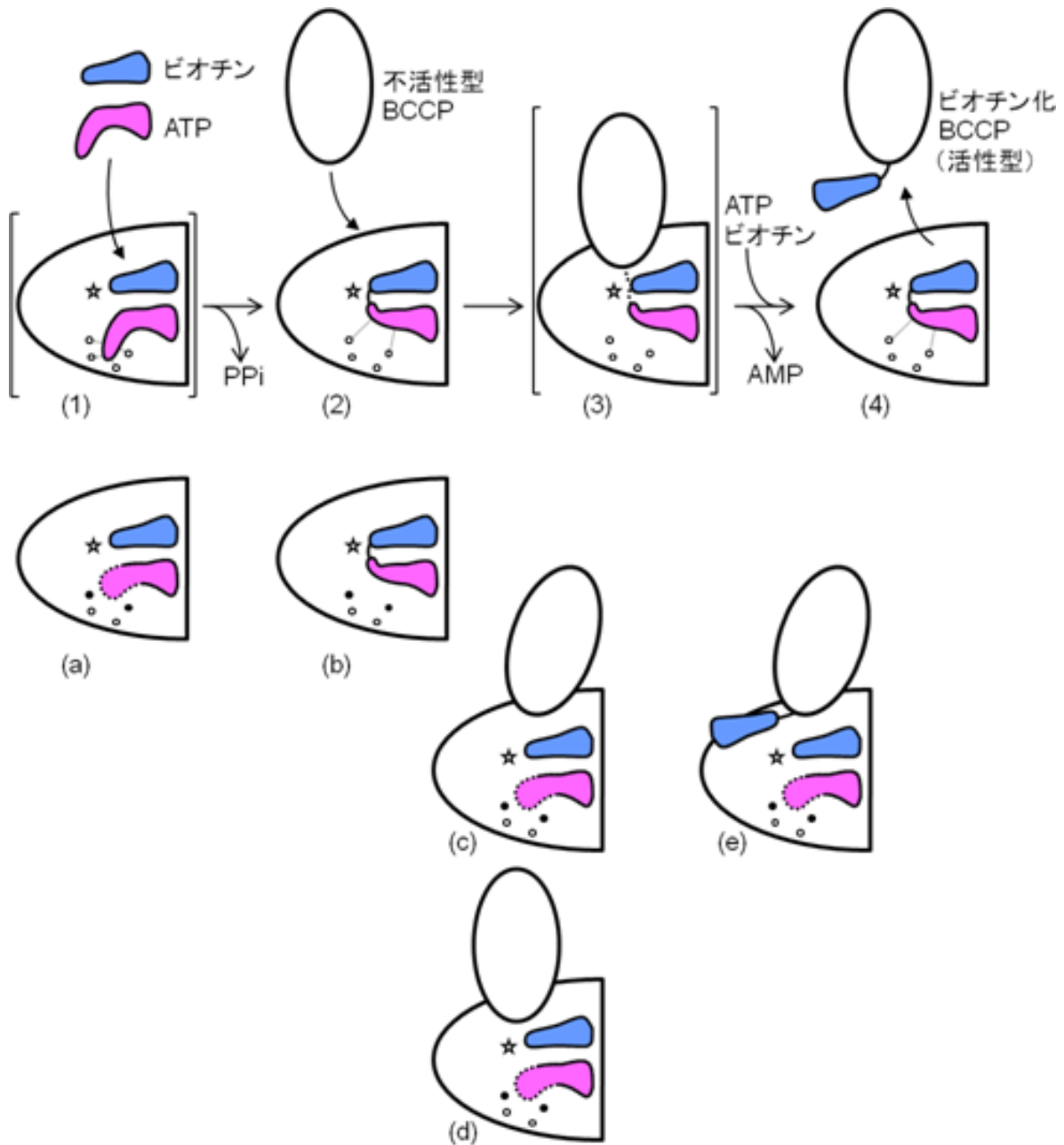


図3 変異導入によるBPL-BCCP複合体の可視化

(1)~(4)は野生型 BPL の反応機構を模式的に表現したもので、括弧付きの状態は不安定なため通常の結晶構造解析の方法では構造決定できない。BPL は半円状の物体として描いてあり、活性部位を星印で、今回変異導入を試みたアミノ酸残基を丸印で表してある。共有結合を太い実線、遷移状態の相互作用を太い点線、非共有結合性の相互作用を細い点線で示す。(2)、(4)には反応中間体である biotinyl-5'-AMP が、(3)には遷移状態中間体が結合している。

(a) ~ (e) は BPL 変異体を用いて今回構造決定に成功したすべての状態を模式的に表現したもので、変異導入した残基を黒い丸印で示す。ATP モデル中の点線は、変異導入により非共有結合性相互作用が減少し、ATP 構造の自由度が部分的に増したことを表している。変異体の結晶中では基質自体が非反応性の反応中間体アナログとして働き、通常不安定なはずの BCCP との複合体を結果的に安定化したと考えられる。(a)、

(b)はそれぞれ野生型の(1)、(2)に、(c)、(d)は(2)と(3)の中間状態に、(e)は(3)と(4)の中間状態に対応する。(b)や(e)が観測されることから、使用した変異体は酵素としての機能を本質的に保っていることがわかる。

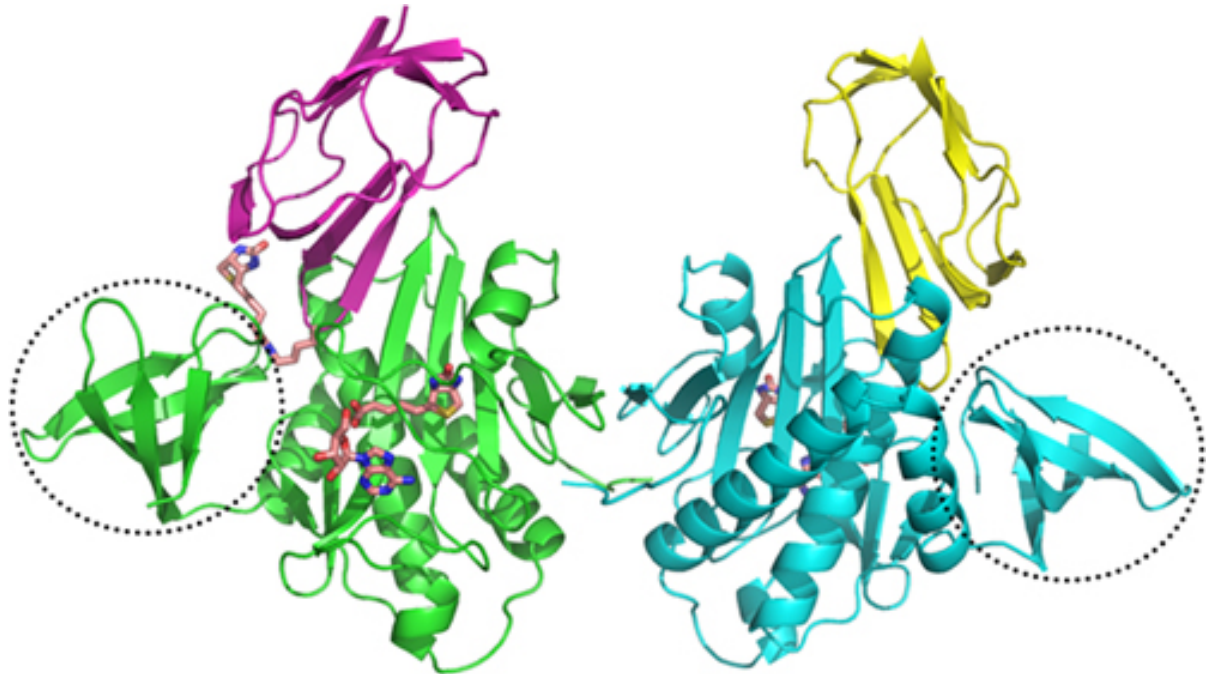


図4 BPL-BCCP 複合体の結晶構造

BPLは2量体であり、図では緑と青のモデルで示してある。今回決定した結晶構造では、BPLのそれぞれの分子にBCCPが1個ずつ計2個(図ではマゼンタと黄色のモデル)結合して2:2の複合体を形成していた。さらに、右の複合体(青と黄色のモデル)ではビオチン化が起きる前の状態が、左の複合体(緑とマゼンタのモデル)ではビオチン化後の状態の複合体構造が観測された。反応前後に複数の段階が存在することは、BPLによるタンパク質のビオチン化の高い選択性に関連していると考えられる。また、点線で囲んだBPLのC末端ドメインと呼ばれる部分の構造が、これらの反応段階の間で大きく変化し、反応を制御する鍵となっている。例えば、このC末端ドメインの構造を固定化する薬剤を設計すれば、BCCPの活性化を効果的に制御できると考えられる。