

令和 3 年 4 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23713

研究課題名(和文) 溶血性貧血の原因となる代謝疾患G6PD欠乏症の構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis of glucose-6-phosphate deficiency

研究代表者

堀越 直樹 (Horikoshi, Naoki)

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教

研究者番号：60732170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：G6PD欠乏症は世界において最も有名な酵素異常症の一つである。G6PD遺伝子において160を超えるミスセンス変異が報告されており、それによりG6PDの活性低下及び溶血性貧血などの重篤な症状が引き起こされる。最も重篤なクラスIに分類される変異の多くは活性部位から離れた領域に局在しており、それらによるG6PDの活性低下機構は全く不明であった。本研究によって、複数のクラスI変異体に共通した構造的特徴及び活性低下のメカニズムが明らかになった。本研究で得られた成果は、これまで有効な治療法が確立されていないG6PD欠乏症に対する創薬化学研究に大きく貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

G6PD欠乏症は溶血性貧血、黄疸、ビリルビン脳症、敗血症などを引き起こす疾患である。世界でおよそ4億人がG6PD遺伝子に変異を有しており、変異によってはG6PDの活性に甚大な影響を及ぼす。多くの場合、通常では無症状であるものの、ウイルス感染、薬の投与、特定の食物によって細胞に過剰な酸化ストレスが生じた際に溶血性貧血などの症状を呈する。現在までに、G6PD欠乏症に対する有効な治療薬は存在せず、創薬研究が急務である。本研究課題では、最も重篤なクラスI変異体の立体構造及び活性低下のメカニズムの解明に成功した。今後、本研究で得られた知見に基づいてG6PD欠乏症に対する治療薬の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is one of the most common enzymopathy in the world. More than 160 missense mutations in the G6PD gene have been reported, and those mutations cause loss of enzymatic activity and severe symptoms such as hemolytic anemia. Many Class I mutations in G6PD deficiency are localized in the dimer interface distant from the active site, and mechanisms of loss of activity have been unclear. In this study, we have successfully solved the structures of the most severe Class I mutants and elucidated mechanisms of loss of activity. This study paves the way for the development of a novel drug for G6PD deficiency.

研究分野：機能生物化学

キーワード：酵素異常症 構造解析 G6PD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内における活性酸素種の蓄積は、DNA、タンパク質、脂質などの損傷を誘起するため、速やかに代謝される必要がある。一方、活性酸素種は、免疫応答やアポトーシスをはじめとした様々な細胞内経路において重要なシグナル因子としても機能する。これらのことから、細胞内の活性酸素種は厳密に制御されなければならない。解糖系の分岐経路であるペントース・リン酸経路の律速酵素であるグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (glucose-6-phosphate dehydrogenase: G6PD) はグルコースの代謝物であるグルコース-6-リン酸(G6P)の酸化反応とともに、NADP⁺から NADPH への還元反応を触媒する酵素である。NADPH は還元型グルタチオンを介して細胞内の活性酸素を減少させるのに必要不可欠と同時に、NADPH オキシダーゼなどによる活性酸素種の生成にも必要である。このように G6PD の活性は細胞内の活性酸素制御に非常に重要である。特に、細胞核やミトコンドリアを失った赤血球においては G6PD が NADPH 産生の主要な酵素であり、また新規にタンパク質が生産されないことから G6PD の活性が直接的に赤血球の活性酸素種制御に関与する。G6PD の活性が低下すると、赤血球において酸化ストレスが蓄積し、その結果、溶血性貧血、黄疸、ビリルビン脳症などの症状を呈する G6PD 欠乏症の原因となる。興味深いことに、世界中でおよそ4億人が G6PD 遺伝子に変異を有すると推定されている。G6PD 遺伝子における変異は野生型と比較した酵素活性の程度と症状によって5つに分類される。最も重篤なクラス I 変異体は野生型と比較して 10%以下の活性しか持たず、また慢性の溶血性貧血を引き起こす。G6PD タンパク質は二量体及び四量体が活性型、単量体は不活性型と考えられている。G6PD の活性部位には基質である G6P と NADP⁺結合部位(以降、catalytic NADP⁺と表記する)が、二量体形成領域にもう一つの NADP⁺結合部位(以降、structural NADP⁺と表記する)が存在する。G6PD 欠乏症におけるクラス I 変異の多くは、活性部位から離れた structural NADP⁺結合部位や二量体形成領域周辺に局在することが分かっており、それらの変異による活性低下のメカニズムは全く分かっていない。

2. 研究の目的

本課題では、G6PD 欠乏症におけるクラス I 変異体の立体構造及び性質を明らかにすることにより、クラス I 変異による活性低下のメカニズムを解明するとともに、structural NADP⁺や二量体形成の酵素活性への寄与を明らかにすることを研究目的とした。

3. 研究の方法

G6PD 欠乏症におけるクラス I 変異体の立体構造及び性質を明らかにするために、G6PD 野生型及びクラス I 変異体をリコンビナントタンパク質として精製した。精製したタンパク質を用いて、タンパク質の会合状態をゲル濾過クロマトグラフィーにより解析した。G6PD クラス I 変異体の立体構造を解明するために、G6PD クラス I 変異体を結晶化し、得られた単結晶に X 線を照射し、X 線回折データを取得した。得られた X 線回折データ及び G6PD 野生型の立体構造を用いて分子置換法により G6PD クラス I 変異体の立体構造を明らかにした。さらに、溶液状態での G6PD クラス I 変異体及び野生型の構造を解析するために、X 線小角散乱及びクライオ電子顕微鏡解析を行った。また、structural NADP⁺の役割を明らかにするために分子動力学シミュレーションを行った。さらに、等温滴定カロリーメトリー (isothermal titration calorimetry: ITC) を用いて、クラス I 変異体に対する基質 G6P の結合を解析した。

4. 研究成果

G6PD クラス I 変異体による活性低下機構を明らかにするために、まずクラス I 変異体の一つである G6PD P396L 変異体の X 線結晶構造解析を行った。その結果、G6PD P396L 変異体の二量体は野生型 G6PD 二量体と比較して湾曲した構造体であることが明らかになった。観察された G6PD P396L 変異体の構造が溶液状態でも保存されているか調べるために、X 線小角散乱解析及びクライオ電子顕微鏡解析を行った。その結果、溶液状態においても G6PD P396L 変異体に二量体は野生型と異なることが示された。さらに、ゲル濾過解析の結果、G6PD 野生型は濃度依存的に四量体、二量体、単量体を形成したのに対し、G6PD P396L 変異体は濃度非依的に二量体のみ形成することが明らかになった。次に、G6PD 野生型と P396L 変異体の構造を詳細に比較すると、P396L 変異体では、structural NADP⁺が欠失しており、さらに structural NADP⁺に結合していた C 末端テール領域も一定の構造を形成しないことが明らかになった。加えて、P396L 変異体においては、structural NADP⁺を欠失したことにより、structural NADP⁺と結合していたβ-sheet の一部 (βM-βN) も一定の構造を形成しないことが明らかになった。これらの一連の構造変化は分子動力学 (MD) シミュレーションによっても支持された。G6PD 野生型から structural NADP⁺を欠失させた状態で MD シミュレーションを行ったところ、開始直後に C 末端テールがフレキシブルになったのに加えて、βM-βN についてもβ-sheet から解離する様子が観察された。このことから、P396L 変異体において観察された構造変化は structural NADP⁺を欠失したことに起因していることが示唆された。そして、P396L 変異体においてβ-sheet の一部が崩壊したことにより、β-sheet と相互作用していたα-helix が 3 アミノ酸分活性部位の方向へシフトし、それにより基質である G6P の結合部位が塞がれることが明らかになった。P396L 変異体における活性部位の構造変化が溶液中においても保存されているか調べるために、等温滴定カロリーメトリー (isothermal titration calorimetry: ITC) によって G6PD 野生型あるいは P396L 変異体と G6P との相互作用解析を行った。その結果、G6PD 野生型は G6P と結合したのに対し、P396L 変異体は G6P と相互作用しないことが明らかになった。このことから、X 線結晶構造解析から明らかになった G6PD 野生型と P396L 変異体との一連の構造差異は溶液中においても保存されていることが示唆された。G6PD 野生型と比較して P396L 変異体において構造変化が観察された領域にその他のクラス I 変異のアミノ酸が複数存在することが分かった。そこで、P396L に加えて、4 つの G6PD 変異体 (F381L、R393H、V394L、W509A) の構造解析及び性状解析を行った。その結果、P396L と同様な構造的特徴及び性質を示した。以上の結果から、structural NADP⁺結合や二量体形成に関与するクラス I 変異体における共通の構造的特徴を有することが明らかになり、酵素活性における structural NADP⁺結合や二量体形成の役割が明らかになった。

本課題により得られた G6PD 欠乏症のクラス I 変異体の立体構造情報から、クラス I 変異体は G6PD 野生型と比較して湾曲した二量体を形成することが分かっている。それにより、クラス I 変異体は四量体を形成できないことが示唆される。それゆえに、クラス I 変異体の四量体形成を誘起する低分子化合物やペプチドを設計によってクラス I 変異体の低下した活性を向上させることが期待される。以上の研究成果は、研究代表者である堀越が第一著者として *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 誌に発表された (1)。

引用文献

Horikoshi, N. *et al.* Long-range structural defects by pathogenic mutations in most severe glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Proc National Acad Sci* **118**, e2022790118 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Horikoshi Naoki, Hwang Sunhee, Gati Cornelius, Matsui Tsutomu, Castillo-Orellana Carlos, Raub Andrew G., Garcia Adriana A., Jabbarpour Fatemeh, Batyuk Alexander, Broweleit Joshua, Xiang Xinyu, Chiang Andrew, Broweleit Rachel, Vohringer-Martinez Esteban, Mochly-Rosen Daria, Wakatsuki Soichi	4. 巻 118
2. 論文標題 Long-range structural defects by pathogenic mutations in most severe glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2022790118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Horikoshi, N., Jabbarpour, F., Hwang, S., Raub, A.G., Mochly-Rosen, D., Wakatsuki Soichi.
2. 発表標題 Structural basis of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency
3. 学会等名 The 92nd Annual meeting of the Japanese Biochemical Society
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Stanford University	SLAC National Accelerator Laboratory	
チリ	Universidad de Concepcion		