

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23687014

研究課題名(和文)骨形成や糖尿病と関連するNPP1タンパク質の機能構造解析

研究課題名(英文)Crystal structure of the extracellular glycoprotein Enpp1

研究代表者

西増 弘志(Nishimasu, Hiroshi)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00467044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,600,000円、(間接経費) 6,480,000円

研究成果の概要(和文)：Enpp1はピロリン酸を産生する細胞膜結合型の酵素で、骨形成を制御する役割を担う。Enpp1の遺伝子変異は重篤な骨疾患を引き起こし、Enpp1の遺伝子多型は肥満や2型糖尿病とも関連するが、Enpp1の変異や多型が病態を引き起こすメカニズムは不明だった。我々は生化学的解析とX線結晶構造解析を行い、Enpp1遺伝子に変異が起こると、Enpp1の分子構造がくずれることで酵素活性が低下し、骨疾患に至ることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Enpp1 is a membrane-bound glycoprotein that regulates bone mineralization by hydrolyzing extracellular nucleotide triphosphates to produce pyrophosphate. Enpp1 dysfunction causes human diseases characterized by ectopic calcification. Enpp1 also inhibits insulin signaling, and an Enpp1 polymorphism is associated with insulin resistance. However, the precise mechanism by which Enpp1 functions in the cellular processes remains elusive. Here, we report the crystal structures of the extracellular region of mouse Enpp1 in complex with four different nucleotide monophosphates. Structural mapping of disease-associated mutations indicated the functional importance of the interdomain interactions. A structural comparison of Enpp1 with Enpp2, a lysophospholipase D, revealed marked differences in the domain arrangements and active-site architectures. Our findings provide structural insights into how the Enpp family proteins evolved to exert their diverse cellular functions.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：Enpp 骨形成 X線結晶構造 細胞外酵素

1. 研究開始当初の背景

骨はカルシウムイオンと無機リン酸が結合したハイドロキシアパタイトから構成されており、骨形成はカルシウムイオン、無機リン酸、および、ピロリン酸の濃度のバランスにより制御されている。Enpp1 タンパク質は細胞外 ATP を加水分解しピロリン酸を産生することにより骨形成を抑制する役割をもち、Enpp1 の遺伝子変異は重篤な骨疾患につながる。Enpp1 タンパク質はインスリンシグナル経路の抑制にも関与しており、Enpp1 の遺伝子多型は肥満や2型糖尿病と関連することが報告されている。しかし、Enpp1 が2つの生理機能を発揮する分子機構は不明だった。

2. 研究の目的

Enpp(ectonucleotide

pyrophosphatase/phosphodiesterase) ファミリータンパク質は脊椎動物において保存された細胞外酵素であり、ヌクレオチドやリゾリン脂質のホスホジエステル結合を加水分解する。哺乳類は7つの Enpp ファミリータンパク質 (Enpp1~Enpp7) をもつ。Enpp1~Enpp3 は2つのソマトメジン B 様ドメイン、触媒ドメイン、ヌクレアーゼ様ドメインから構成される一方、Enpp4~Enpp7 は触媒ドメインのみから構成される。Enpp ファミリータンパク質は相同な触媒ドメインをもつが、それぞれ異なる基質特異性を示し、さまざまな生命現象に関与している。Enpp1 は膜結合型糖タンパク質であり、ATP を加水分解し骨形成の制御に関与するが、Enpp1 による ATP 認識機構、および、骨形成とインスリンシグナル経路に関与する分子機構は不明だった。本研究では、Enpp1 の X 線結晶構造を決定し、構造情報に基づく変異体解析を行うことにより、Enpp1 の構造機能相関を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

C 末端に TARGET タグを付加したマウス由来 Enpp1 細胞外ドメインを哺乳類細胞に過剰発現させ、培養上清から TARGET タグを特異的に認識する P20.1 抗体カラムを用いて精製した。TEV プロテアーゼで TARGET タグを切断したのち、ゲルろ過カラムにより高純度に精製した。精製 Enpp1 タンパク質を結晶化し、シンクロトロン放射光施設 SPring-8 BL32XU において X 線回折データを収集した。セレノメチオニン置換体を用いた SAD 法により結晶構造を決定した。構造情報をもとに変異体 Enpp1 を調製し、生化学的な解析を行った。

4. 研究成果

精製 Enpp1 を用いた生化学的解析の結果、Enpp1 は UTP、GTP、CTP と比較して ATP を効率よく加水分解しピロリン酸を産生することが明らかになった。Enpp1 と4種類のヌクレオチドとの複合体結晶構造を 2.7~3.2 分解能で決定した。結晶構造から、Enpp1 は

2つのソマトメジン B 様ドメイン、触媒ドメイン、ヌクレアーゼ様ドメインからなること (図1) および、Enpp1 の ATP 認識の構造基盤 (図2) が明らかになった。これまでに報告されていた骨疾患につながる遺伝子変異は触媒ドメインやヌクレアーゼ様ドメインのアミノ酸残基の置換を引き起こし、Enpp1 の立体構造を不安定化させることが示唆された。一方、肥満や2型糖尿病と関連する遺伝子多型はソマトメジン B 様ドメインに存在しており、生化学的解析によりソマトメジン B 様ドメインは酵素活性には必要ないことが明らかとなった。これらの結果から、Enpp1 の触媒ドメインとヌクレアーゼ様ドメインは骨形成に関与し、ソマトメジン B 様ドメインはインスリンシグナルに関与していることが示唆された。

Enpp1 と異なり、Enpp2 はリゾホスファチジルコリンを加水分解しリゾホスファチジン酸を産生することによりさまざまな細胞応答を引き起こす。一方、Enpp6 はリゾホスファチジルコリンやグリセロホスホコリンを加水分解しホスホコリンを産生することによりコリン代謝にかかわる。Enpp ファミリータンパク質の構造機能相関をより深く理解するために、Enpp2 と阻害剤との共結晶構造、および、Enpp6 と加水分解産物との共結晶構造を決定した。Enpp1、Enpp2、Enpp6 の結晶構造の比較から、Enpp ファミリータンパク質の多様な基質特異性および生理機能を決定づける分子機構が明らかになった。

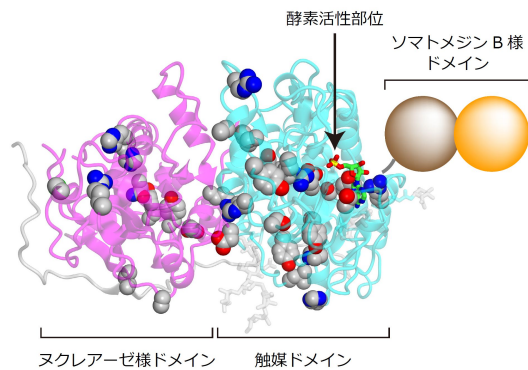


図1 Enpp1 の全体構造

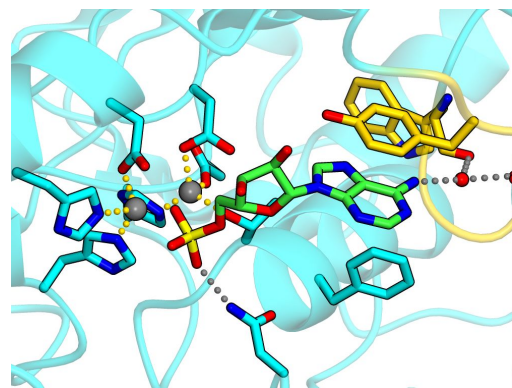


図2 AMP 認識機構

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

1. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Cell. 2014, 156(5):935-949. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001 査読有
2. Structural basis for potent inhibition of SIRT2 deacetylase by a macrocyclic peptide inducing dynamic structural change. Yamagata K, Goto Y, Nishimasu H, Morimoto J, Ishitani R, Dohmae N, Takeda N, Nagai R, Komuro I, Suga H, Nureki O. Structure. 2014, 22(2):345-352. doi: 10.1016/j.str.2013.12.001. 査読有
3. Screening and X-ray crystal structure-based optimization of autotaxin (ENPP2) inhibitors, using a newly developed fluorescence probe. Kawaguchi M, Okabe T, Okudaira S, Nishimasu H, Ishitani R, Kojima H, Nureki O, Aoki J, Nagano T. ACS Chem Biol. 2013, 8(8):1713-1721. doi: 10.1021/cb400150c 査読有
4. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Zucchini from *Drosophila melanogaster*. Fukuhara S, Nishimasu H, Bonnefond L, Matsumoto N, Ishitani R, Nureki O. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2012, 68(Pt 11):1346-1350. doi: 10.1107/S1744309112038936 査読有
5. The tRNA recognition mechanism of folate/FAD-dependent tRNA methyltransferase (TrmFO). Yamagami R, Yamashita K, Nishimasu H, Tomikawa C, Ochi A, Iwashita C, Hirata A, Ishitani R, Nureki O, Hori H. J Biol Chem. 2012, 287(51):42480-42494. doi: 10.1074/jbc.M112.390112 査読有
6. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. Nishimasu H, Ishizu H, Saito K, Fukuhara S, Kamatani MK, Bonnefond L, Matsumoto N, Nishizawa T, Nakanaga K, Aoki J, Ishitani R, Siomi H, Siomi MC, Nureki O. Nature. 2012, 491(7423):284-287. doi: 10.1038/nature11509 査読有
7. Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF- κ B regulation. Tokunaga F, Nishimasu H, Ishitani R, Goto E, Noguchi T, Mio K, Kamei K, Ma A, Iwai K, Nureki O. EMBO J. 2012, 31(19):3856-3870. doi: 10.1038/emboj.2012.241 査読有
8. Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling. Kato K, Nishimasu H, Okudaira S, Mihara E, Ishitani R, Takagi J, Aoki J, Nureki O. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012, 109(42):16876-16881. doi: 10.1073/pnas.1208017109 査読有
9. Molecular dynamics simulation of Autotaxin: roles of the nuclease-like domain and the glycan modification. Koyama M, Nishimasu H, Ishitani R, Nureki O. J Phys Chem B. 2012, 116(39):11798-11808. doi: 10.1021/jp303198u 査読有
10. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Enpp1. Kato K, Nishimasu H, Mihara E, Ishitani R, Takagi J, Aoki J, Nureki O. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2012, 68(Pt 7):778-782. doi: 10.1107/S1744309112019306 査読有
11. A 3D view of autotaxin. Nishimasu H, Ishitani R, Aoki J, Nureki O. Trends Pharmacol Sci. 2012, 33(3):138-145. doi: 10.1016/j.tips.2011.12.004

査読有

12. Structural basis for the bifunctionality of fructose-1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase. Fushinobu S, Nishimasu H, Hattori D, Song HJ, Wakagi T. Nature. 2011, 478(7370):538-541. doi: 10.1038/nature10457
査読有

〔学会発表〕(計5件)

1. 加藤一希、西増弘志、奥平真一、三原恵美子、石谷隆一郎、高木淳一、青木淳賢
骨石灰化やインスリンシグナルに関わる細胞外酵素 Enpp1 の結晶構造
第13回蛋白質科学会年会
2013年6月12日
とりぎん文化会館(鳥取)
2. Kato K, Nishimasu H, Okudaira S, Mihara E, Ishitani R, Takagi J, Aoki J, Nureki O
Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling
Asian Crystallographic Association meeting 2012
2012年12月2日~2012年12月5日
Adelaid (Australia)
3. 西増弘志
細胞外酵素 Enpp ファミリーの結晶構造
大阪大学蛋白質研究所セミナー(招待講演)
2012年10月5日
大阪大学蛋白質研究所(大阪)
4. 西増弘志、奥平真一、濱弘太郎、三原恵美子、堂前直、井上飛鳥、石谷隆一郎、高木淳一、青木淳賢、濡木理
脂質メディエーター産生酵素オートタキシンのX線結晶構造
日本結晶学会年会
2011年11月24日
北海道大学(北海道)
5. Nishimasu H
Crystal structure of autotaxin
FASEB Research Conference
2011年8月15日
Lucca (Italy)

〔図書〕(計1件)

1. 脂質メディエーター産生酵素オートタキシンの構造機能解析
石谷隆一郎、西増弘志、高木淳一、青木

淳賢、濡木理
実験医学、羊土社、42-48 (2012)

〔産業財産権〕

出願状況(計5件)

1. 名称: オートタキシン阻害活性を有する縮合ピラゾール誘導体
発明者: 長野哲雄、岡部隆義、小島宏建、川口充康、濡木理、石谷隆一郎、西増弘志、青木淳賢、藤越千明、加藤学、大段正英、田中伸幸
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2014-37591
出願年月日: 2014年2月27日
国内外の別: 国内
2. 名称: オートタキシン阻害活性を有する8-置換イミダゾピリミジノン誘導体
発明者: 長野哲雄、岡部隆義、小島宏建、川口充康、濡木理、石谷隆一郎、西増弘志、青木淳賢、藤越千明、田中伸幸、舘野佑介、和田俊博
権利者: 同上
種類: 特許
番号: PCT/JP2014/54982
出願年月日: 2014年2月27日
国内外の別: 国外
3. 名称: Crispr-Cas, Crystal Structure and Uses Thereof
発明者: Feng Zhang, Osamu Nureki, Hiroshi Nishimasu, Ryuichiro Ishitani
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 61/930,214
出願年月日: 2014年1月22日
国内外の別: 国外
4. 名称: Crispr-Cas, Crystal Structure and Uses Thereof
発明者: Feng Zhang, Osamu Nureki, Hiroshi Nishimasu, Ryuichiro Ishitani
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 61/915,251
出願年月日: 2013年12月12日
国内外の別: 国外
5. 名称: Crispr-Cas, New Nickases and Uses Thereof
発明者: Feng Zhang, Osamu Nureki, Hiroshi Nishimasu
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 61/915,260
出願年月日: 2013年12月12日
国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

1. 骨疾患や糖尿病発症に関わるタンパク質の構造と機能を解明
<http://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2012/37.html>
東京大学大学院理学系研究科プレスリリース

6. 研究組織

(1)研究代表者

西増弘志 (NISHIMASU, Hiroshi)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：00467044