

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450126

研究課題名(和文)ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼの制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase

研究代表者

廣政 恭明 (HIROMASA, Yasuaki)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：40291934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒトピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ(PDHK)の機能制御の解明を目的に、リガンド結合によるC末端に存在するクロスアーム構造の変化について、PDHK2のTrp383の蛍光を指標とした物理化学的手法により明らかにした。また、ROSによるCys384の化学修飾によるPDHKの機能制御について検討した。ADPとピルビン酸がPDHK2と共結合すると、Trp383を含むC末端構造の運動性が増加しクロスアーム構造が開放され、基質であるPDCとの相互作用が失われた。PDHK1についても同様の結果を得た。また、Cys384の化学修飾によりクロスアーム構造の形成が阻害されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The human pyruvate dehydrogenase kinase (PDHK) specifically regulates the reaction of pyruvate dehydrogenase complex (PDC). The function of PDHK is allosterically inhibited by ADP and pyruvate. In this study, to understand the regulation of PDHK, the dynamical structural changes of the C-terminal cross arm structure by binding ligands and chemical modification was analyzed using fluorescence of Trp383 in PDHK2. The binding of ADP and pyruvate induced substantial dynamical changes of C-terminal cross arm structure of PDHK2 as well as PDHK1. Chemical modification of Cys384 by NEM introduced similar effects on the cross arm structure. Analytical ultracentrifuge analysis using NEM-PDHK2 suggests that the dislocation of cross arm structure led to dissociate PDHK2 from inner lioyl domain of E2, which could cause the significant loss of the accessibility to substrate E1.

研究分野：生化学

キーワード：アロステリック効果 ダイナミクス 蛍光異方性 分子間相互作用 キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

ヒトピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(PDC)は、ミトコンドリア内に局在し、解糖系で生成されたピルビン酸をアセチル CoA に不可逆的に変換する。PDC の反応は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(E1)、ジヒドロリポイルアセチルトランスフェラーゼ(E2)、及びジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ (E3)の 3 種の構成酵素の連携反応によって果たされる。PDC の活性は、E1 のリン酸化により制御され、この不活性化は、特異的酵素であるキナーゼ(Pyruvate dehydrogenase kinase: PDHK)により触媒される。

PDHK には、これまで4種のアイソザイム(PDHK1-4)が発見され、それぞれのアイソザイムには局在性と機能制御に違いがある。PDC の反応は、グルコースからの解糖生成物を TCA サイクルに運ぶ唯一の経路であるため、PDC の調節は代謝制御の要である。糖尿病やがん細胞において、PDC の機能は PDHK に強く抑制され、乳酸が蓄積しアシドーシスを生じる。このため、PDC を活性化して解糖生成物を TCA サイクルへシフトさせることにより、乳酸蓄積の緩和や癌細胞ではアポトーシスの誘導を目的として、薬剤の開発が進められている。我々は、生体内における代謝状態やエネルギー需要の変化が、いかにして PDHK に伝達され PDC の活性を制御しているか、その分子機構について興味を持っている。

PDHK、特に PDHK2 の制御機構について、以下の事が明らかとなっている。(1) PDHK2 は、E2 のリポイルドメインに結合する。PDHK2 の基質である E1 が同じく E2 に結合する事から、E1 に対する PDHK2 の衝突頻度の増加、またリポイルドメイン結合によるアロステリック効果による PDHK の活性化が生じる。(2) PDHK2 の機能は ADP とピルビン酸の結合により協同的に失活する。我々は、(3)失活の協同効果に、カリウムイオンとリン酸イオン(活性部位以外の部位)の結合が重要である事、(4)PDHK/ADP/pyruvate/K⁺/Pi 複合体が Dead end complex であり、PDHK2 を強く制御する事を明らかにした。

PDHK1 と 2 について、基質やリガンドとの結合構造が X 線結晶構造解析により明らかになっている(図)。いずれの PDHK も 2 量体で存在し、C 末端ドメインと N 末端ドメインの 2 つのドメインがある。N 末端ドメインには、ピルビン酸結合部位やリポイル基結合部位などの調節部位が存在する。一方、C 末端ドメインには活性部位が存在し、C 末端に存在するテール構造がもう一方のサブユニットに結合している(クロスアーム構造)。我々は PDHK2 についてクロスアーム構造の先端に位置する Trp383 の蛍光が、ピルビン酸や ATP/ADP の結合により蛍光は大きく消光すること、両者を加えると協同的に強く消光することを見いだした。結晶構造を比較すると、ADP とピルビン酸が同時に結合すると、C 末端のクロスアーム構造が消失し、リポイルドメインとの相互作用が失われた。また、ピルビン酸結合部位は、ADP の結合により露出する事から、クロスアーム構造の動きとピルビン酸結合部位の露出が連動する

事が示唆される。また、クロスアーム構造はリポイルドメインとの結合に関与する。基質であるスクレオチドやピルビン酸などリガンド結合部位とは異なるクロスアーム構造の PDHK の機能制御への関与は、これまで指摘されてきた。本研究では、物理化学的手法を用いクロスアーム構造と PDHK 機能制御との関係を明らかにする物である。

2. 研究の目的

本研究では、PDHK の中でも制御因子に強く応答する PDHK1 と PDHK2 について、制御因子による構造と機能の変化について、物理化学的手法を用い明らかにする。結晶構造解析よりクロスアーム構造と機能制御の関係が示唆されている。本研究では、クロスアーム構造上の Trp の蛍光を用い、その運動性と機能制御の関係を PDHK1 と PDHK2 について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PDHK2 の制御因子によるクロスアーム構造の動的構造変化の解明

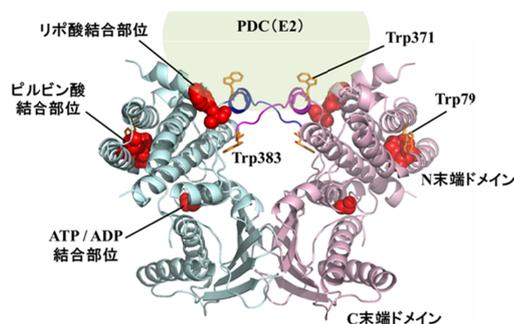
クロスアーム構造に存在する Trp383 に注目したクロスアーム構造の動的構造変化を明らかにするために、Trp383 以外の Trp79 と Trp371 のフェニルアラニンへの変異体を作成し Trp の蛍光変化ならびに変異体の酵素学的性質を調べた。変異体の中で、野生株とほぼ同様の性質を有した W371F について、Trp383 を指標とした制御因子(ADP とピルビン酸)による動的構造変化について時間分割蛍光分光法を用いて調べた。

(2) クロスアーム構造の変化による PDK2 の制御機構の解明

(1)より、クロスアーム構造の動的変化が PDHK2 の機能制御に密接に関係していることが明らかになった。さらに Hurd ら(JBC 2012)は、Trp383 の隣の Cys384 の活性酸素による化学修飾による PDK2 の機能制御を提案した。そこで、クロスアーム構造の運動の指標として Cys384 の化学修飾による PDHK2 の機能・制御の変化、さらに Trp383 蛍光動的変化を調べた。

(3)PDHK1 の制御因子によるクロスアーム構造の動的構造変化の解明

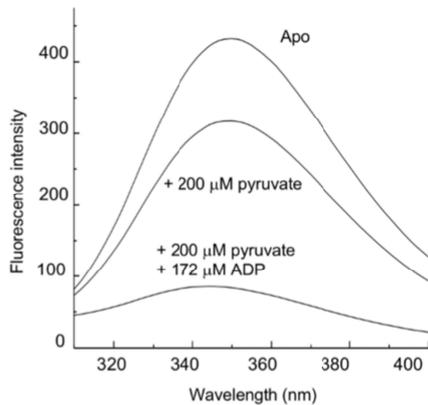
(1)と同様に、クロスアームに存在する Trp に注目したクロスアーム構造の動的構造変化について蛍光を指標に明らかにした。



4. 研究成果

(1) PDHK2 の制御因子によるクロスアーム構造の動的構造変化の解明

PDHK2 には、Trp79、Trp371、Trp383 の3つの Trp が存在する。そこで、Trp383 の蛍光シグナルを極大化するために、W79F/W371F を調製した。しかし、発現された大部分のタンパク質が封入体に存在し、可溶性画分のタンパク質にほとんど活性がなかった。そこで、W371F を作成したところ、野生株の $80.6 \pm 6.4\%$ の活性を有し、制御因子(ADP とピルビン酸)との相互作用が野生株と同等であった。結晶構造から W383 は親



水性領域に存在し、W79 は内部の疎水性領域に存在する。W79F への変異がタンパク質内部の misfolding を誘引した可能性が示唆された。

変異体 W371F と W383F、Wild type を用いた蛍光スペクトルを比較することにより、Trp383 由来の蛍光ピークが 357nm に、Trp79 の蛍光は 340nm 付近にピークを有することがわかった。このことから、Trp383 からの蛍光観測波長を 370nm 以上の領域に設定することにより、Trp383 のみの情報を抽出することが可能となった。このため、W371F について、370nm 以上で蛍光を観測することにより、Trp383 の構造情報を得た。

制御因子(ADP とピルビン酸)によるクロスアーム構造の運動性変化について、定常光による Trp 蛍光異方性 (観測波長: 380nm) を指標に調べた。ADP(200μM)の添加により、異方性値 r は apo の 0.130 から 0.122 に低下した。蛍光強度は、40%低下したことから、Trp383 の環境が変化し、クロスアーム構造の運動性がわずかに増加したことが示唆された。一方、200μM ピルビン酸を ADP と併せて加えると、異方性値は、0.094 に大きく低下し、クロスアーム構造の運動性が大きく増加したことが示唆された。

次に、制御因子の結合による Trp383 間の距離変化を、Trp383 間の蛍光エネルギー移動を利用することにより明らかにした。なお蛍光測定は 380nm で行った。測定には、red edge 効果を利用した蛍光偏光特性から Trp- Trp 間の蛍光エネルギー移動測定を行った。その結果、異なる励起波長(310nm と 295nm)による蛍光偏光比 (測定波長 380nm) r_{310}/r_{295} は、apo と ADP ではそ

れぞれ、1.67、1.75 であった。クロスアーム構造を形成した 2 量体上のクロスアーム構造を形成した2つの Trp383 間の距離は、結晶構造解析では、 22.0\AA であり、これらの蛍光偏光比は、エネルギー移動が生じていないことを示唆する。

一方、ADP とピルビン酸を加えると 2.04 へ上昇し、Trp- Trp 間で蛍光エネルギー移動が生じたことが示唆された。エネルギー移動は、12Å 以下の Trp- Trp 間距離で生じる。このため、ADP とピルビン酸との結合により、クロスアーム構造が開放され、Trp383- Trp383(他方のサブユニット)の接近によりエネルギー移動が生じたことが示唆された。

制御因子による Trp 蛍光寿命を測定した。平均蛍光寿命は、apo、ADP 存在下、ADP とピルビン酸共存存在下において、それぞれ、4.71ns、2.62ns、1.10ns に減少した。定常光における実験結果同様、制御因子により Trp383 周辺の構造が変化したことが示唆された。

Parameters derived from fluorescence quenching observed in the presence of 200 μM ligand 1 upon binding of a second titrated ligand 2.

Ligand 1 at 200 μM	Quenching %	Titrated Ligand 2	$L_{0.5}^a$ μM	Total quenching ^a %	Hill coefficient
pyruvate	34	ADP	1.5 ± 0.03	81.0 ± 0.2	1.75 ± 0.1
ADP	40	pyruvate	4.9 ± 0.2	80.6 ± 0.1	1.20 ± 0.1

^a95% confidence interval.

さらに、クロスアーム構造の運動性の変化を調べるために、制御因子存在下における時間分割蛍光異方性を測定した。蛍光異方性の減衰曲線 $r(t)$ はすべてのサンプルにおいて 2 成分で最適フィットした。回転相関時間 1 および 2 の大きさから、1 は W383 を含むペプチド部分の回転相関時間、2 はインドール間の回転相関時間を表していると考えられた。1 は、apo では 3.92ns、ADP 存在下では 2.40ns に減少した。さらに、ADP とピルビン酸共存存在下では、0.62ns に大きく減少した。1 の大きな低下は、Trp383 を含むペプチド、すなわち、クロスアーム構造が、もう一方のサブユニットから解離し、Trp383 を含む構造の運動性が大きくなったことが示唆された。

Effects of the ligands on the fluorescence anisotropy decay parameters of W371F-PDHK2.

Ligand at 200 μM	β_1	β_2	ϕ_1 (ns)	ϕ_2 (ps)	χ^2
apo	0.045	0.175	3.92	51	0.0008
ADP	0.035	0.171	2.40	32	0.0020
ADP + pyruvate	0.075	0.141	0.62	51	0.0062

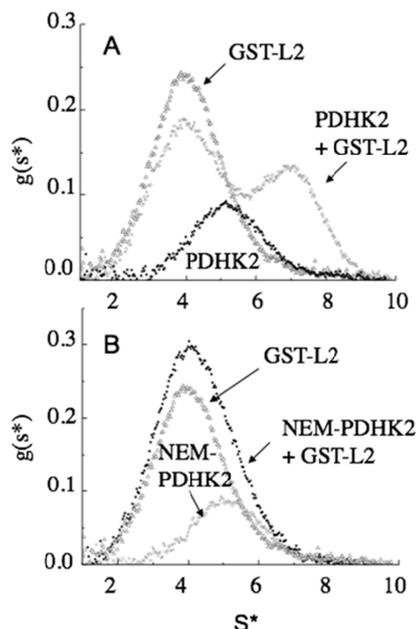
以上の結果より、ADP と PDHK2 との相互作用により、Trp383 は他方のサブユニットとの相互作用について、結合構造のずれなど一部構造変化が生じること、ADP とピルビン酸と共存存在下においては、Trp383 を含む C 末端領域が他方の

サブユニットから解離し、運動性が増加することが蛍光測定より明らかとなった。超遠心分析(既報)から ADP とピルビン酸存在下では、PDHK2 はリポイルドメインとの相互作用を失うことが明らかになっている。クロスアーム構造の開放は、リポイルドメインとの相互作用、さらには、基質である PDC との相互作用を喪失する。これらのことから、PDHK2 の機能制御にクロスアーム構造の開放が大きく関与していることが、本研究により明らかとなった。

(2) クロスアーム構造の変化による PDHK2 の制御機構の解明

Hurd ら(JBC 2012)は、Trp383 の隣の Cys384 の活性酸素による化学修飾による PDHK2 の機能制御を提案した。(1)で明らかとなったように、クロスアーム構造の開放は、PDHK2 の機能制御に関係する。そこで、クロスアーム構造自体が PDHK2 の機能制御に直接関連することを明らかにするために次の研究を行った。Cys384 を N-エチルマレイミド(NEM)により修飾し、ピルビン酸や ADP との相互作用、さらに蛍光共鳴エネルギー移動を測定した。NEM で修飾した W371F (NEM-W371F)の酵素活性は、W371F に比べ 66%の低下がみられた。W371F と ADP、ピルビン酸との相互作用を調べたところ、ADP、ATP、ピルビン酸単体に関しては、W371F と大きな変化はなかった。しかし、ピルビン酸存在下のヌクレオチドとの親和性は大きく低下した。

蛍光共鳴エネルギー移動を W371F 同様に調べたところ、NEM-W371 の r_{310}/r_{295} は、2.29 であった。偏光比が 2 以上であることから 2 量体中の 2 つの Trp383 間においてエネルギー移動が生じていることが示唆され、Cys384 の修飾がクロスアーム構造形成を阻害していることが考えられた。



PDHK2 は基質である PDC と E2 のリポイルドメインを介して結合する。そこで、NEM-PDHK2 と GST に連結したリポイルドメイン 2 (GST-L2) との

相互作用を、超遠心分析により測定した。その結果、NEM-PDHK2 と GST-L2 は相互作用しないことが分かった(図)。これは、(1)の研究結果と通じる。すなわち、Trp383 を含む C 末端構造が、クロスアーム構造を開放されることにより、PDC との相互作用が阻害される。結晶構造より、リポイルドメインと C 末端構造は相互作用しており、クロスアーム構造は、リポイルドメインとの相互作用の基盤である。リポイルドメインからの解離は、PDHK の基質である E1 への接近を妨げる。すなわち、Hurd らが提案したように、Cys384 の ROS による化学修飾による PDHK 活性の消失は、本研究で明らかとなったように、クロスアーム構造の開放と大きく関係していることが示唆された。また、NEM-W371F のピルビン酸存在下におけるヌクレオチドとの相互作用が、大きく低下していることから Cys384 の化学修飾は活性部位へも効果を生じている。これは、ピルビン酸と ADP の PDHK への結合がクロスアーム構造を開放した経路と、逆の経路による機能制御を示唆している。

(3) PDKH1 の制御因子によるクロスアーム構造の動的構造変化の解明

精製した PDHK1 は、PDHK2 と比較し凝集しやすい性質があり、緩衝液中に常に 100mM 程度の NaCl を添加する必要があった。また、超遠心分析の結果、5.4S の沈降係数を有する。PDHK2 と同様に、2 量体で存在した。

まず、PDHK1 とヌクレオチドとの相互作用を蛍光変化(消光)から測定した。ATP、ADP との相互作用は、解離定数が、それぞれ 3.8uM、11.7uM と、PDHK2 とほぼ同様の相互作用を示した。一方、蛍光の消光は、ともに 20%以下であり、PDHK2 では 30-40%の減少を観測した事と比較すると、大きな違いがみられた。また、0.2mM ADP 存在下においてピルビン酸を滴定したところ、ピルビン酸との相互作用は、23.4uM (hill 係数=1)であった。ADP 非存在下では、ピルビン酸との相互作用が、140uM であったことから、ADP 結合によるアロステリック効果が測定されたが、PDHK2 に比べその効果が小さいことが分かった。一方、0.2mM ピルビン酸存在下での ADP の相互作用は、5.9uM であった。PDHK2 と同様に、アロステリック効果により ADP との相互作用がピルビン酸との結合により強くなっていることが分かった。

超遠心分析より、リポイルドメインとの相互作用を測定した結果、PDHK2 と同様に GST-L2 とは、リポイル基還元状態で、2uM の結合能を示した。また、ピルビン酸と ADP 存在下で、PDHK1 はリポイルドメインより解離することがわかった。

PDHK2 と同様に、クロスアーム構造の運動性の変化を調べるために、制御因子存在下における時間分割蛍光異方性を測定した。その結果、

1 値は、PDHK2 と同じく、apo や ADP 単体での添加に比べ、ADP とピルビン酸共存下で大きく減少した。これらのことから、PDHK1 も PDHK2 同様、両リガンドとの相互作用によりクロスアーム構造が開放され、運動性が大きくなることが示唆

された。

以上のことから、PDHK1 は PDHK2 同様に、クロスアーム構造の形成が PDHK1 の機能制御に関係していることが明らかとなった。

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 1 件)

(1) Jiang J, Baiesc FL, Hiromasa Y, Yu X, Hui WH, Dai X, Roche TE, Zhou ZH. Atomic Structure of the E2 Inner Core of Human Pyruvate Dehydrogenase Complex. *Biochemistry*. 査読有り, **57**, 2018, 2325-2334. doi:10.1021/acs.biochem. 8b00357.

[学会発表] (計 4 件)

(1) 海谷京香, 藤野 泰寛, 土居 克実, 西本悦子, 廣政 恭明, Dynamical Structural Changes of Pyruvate Dehydrogenase Kinase 2 by modification of Cysteine, 日本生物物理学会, 2016 年 11 月 25 日、筑波大学

(2) 海谷京香, 藤野 泰寛, 土居 克実, 西本悦子, 廣政 恭明, システイン残基修飾によるピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ 2 の制御, 日本農芸化学会支部大会, 2016 年 9 月 16 日、長崎大学

(3) 海谷京香, 藤野 泰寛, 土居 克実, 西本悦子, 廣政 恭明, リガンドによるピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ 2 の動的構造変化, 日本農芸化学会, 2016 年 3 月 29 日、北海道大学

(4) 廣政 恭明, ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼの制御機構, 日本農芸化学会西日本支部例会, 2015 年 5 月、サントリー熊本工場

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

廣政 恭明 (HIROMASA, Yasuaki)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号 : 40291934