

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15741

研究課題名（和文）溶血性貧血の原因となる代謝疾患G6PD欠乏症における酵素活性化と活性化機構の解明

研究課題名（英文）Activation of dysfunctional metabolic enzymes in G6PD deficiency causing hemolytic anemia

研究代表者

堀越 直樹（Horikoshi, Naoki）

東京大学・定量生命科学研究所・准教授

研究者番号：60732170

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内において、活性酸素種は様々なシグナル経路において重要であるとともにDNAやタンパク質の損傷を引き起こす。ペントースリン酸経路において中心的な役割を果たすglucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)は、細胞内の活性酸素の調節に必須のタンパク質である。これまでに多くのG6PD遺伝子の変異が見つかり、それらの変異は溶血性貧血をはじめとした重篤な症状を呈するG6PD欠乏症の原因となる。本研究では、酵素活性が野生型の10%以下に低下する最も重篤なクラスI変異による活性低下機構の解明、クラスI変異体の活性化、及び活性化メカニズムの解明に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、G6PD欠乏症における最も重篤なクラスIに対する活性化分子は同定されていない。本研究によって、世界で初めてクラスI変異による活性低下機構の解明及びクラスI変異体の活性化に成功した。今後、本研究によって得られた知見やG6PD変異体の構造情報を用いて、クラスIに対する新規の治療薬の開発につながる事が期待される。また、本研究は酵素活性レベルは同程度にも関わらず症状が異なるクラスI及びクラスIIの変異に関する研究に対しても重要な知見を与えた。以上のことから、本研究は学術的及び社会的に非常に意義深いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) plays a key role in the pentose phosphate pathway. In cells, G6PD is essential for regulating reactive oxygen species (ROS), which are involved in oxidative damage to DNA and proteins as well as many signaling pathways. More than 160 mutations on the G6PD gene have been reported worldwide. Some mutations, which are categorized as Class I and II, cause severe symptoms including hemolytic anemia, kernicterus, sepsis, and jaundice. Molecular mechanisms of activity loss caused by Class I and II mutations have remained elusive. In this study, we analyzed the structures and characteristics of G6PD Class I mutants and elucidated a mechanism of activity loss. We also found that additional mutations, which stabilize the tetramerization of G6PD, increase the enzymatic activity of Class I mutants. These findings would pave the way for future drug discovery for Class I mutants in G6PD deficiency.

研究分野：機能生物化学

キーワード：G6PD欠乏症 溶血性貧血 構造解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内において、活性酸素種は、様々なシグナル経路において必須の因子であるのに加え、DNAやタンパク質に損傷を引き起こすため、その量は厳密に制御される必要がある。グルコース代謝経路の一つであるペントースリン酸経路において、中心的な役割を果たすグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (glucose-6-phosphate dehydrogenase: G6PD) は、グルコース-6-リン酸 (glucose-6-phosphate: G6P) を酸化すると同時に NADP^+ を NADPH に還元する。産生された還元型 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。それゆえに G6PD の酵素活性は細胞内の活性酸素の量的な制御に非常に重要である。特に、 NADPH の供給源としても知られるミトコンドリアを持たない赤血球においては、G6PD が NADPH 産生の主要な酵素であり、また、細胞核も持たないため新規のタンパク質合成が起こらないことから、G6PD の活性が赤血球の活性酸素の量的制御に直接的に関与している。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おり、変異によっては溶血性貧血、脳機能障害、敗血症、黄疸等の症状を呈する G6PD 欠乏症を引き起こす。G6PD 変異は酵素活性と症状によって 4 つのクラスに分類される。その中で、最も重篤なクラス I 変異は、野生型と比較して活性が 10% 以下であり、かつ慢性の溶血性貧血を引き起こすことが知られている。G6PD は、活性部位が単量体中にあるにも関わらず、二量体あるいは四量体が活性型、単量体が不活性型と考えられている。また、G6PD は活性部位に基質である G6P 及び NADP^+ (以降、catalytic NADP^+) の結合部位を有し、加えて、活性部位から離れた二量体形成領域に 2 つ目の NADP^+ (以降、structural NADP^+) 結合部位を有する。興味深いことに、クラス I 変異は G6PD の structural NADP^+ 結合部位や二量体形成部位周辺に多く集積していることが分かっているが、structural NADP^+ が酵素活性に寄与するメカニズムやクラス I 変異による活性低下機構は全く明らかになっていなかった。加えて、これまでの研究によって、クラス II やその他のクラスの G6PD 変異体に対する活性化化合物は報告されているが、クラス I については、活性化化合物の同定はなされていない。それゆえに、クラス I 変異を有する G6PD 欠乏症の患者に対する有効な治療法を確立するためには、G6PD 欠乏症のクラス I 変異による活性低下機構の解明を行い、未だ開発されていないクラス I に対する活性化分子を同定する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、G6PD 欠乏症において最も重篤なクラスであるクラス I 変異に着目して、クラス I 変異による G6PD タンパク質の活性低下のメカニズム解明と、低下した G6PD の酵素活性の向上、及びその活性化機構の解明を目的としている。

3. 研究の方法

まず、クラス I 変異による G6PD の活性低下のメカニズム解明を行うために、G6PD 欠乏症患者において見つかっているクラス I 変異体を精製し、生化学的解析及び構造生物学的解析を行った。クラス I 変異体である G6PD F381L、R393H、V394L、P396L、及び二量体形成重要な C 末端テール領域の G6PD W509A 変異体をリコンビナントタンパク質として精製した。精製した各 G6PD 変異体を用いて、X 線結晶構造解析、X 線小角散乱解析、クライオ電子顕微鏡解析、生化学的解析、分子動力学シミュレーションを行った。さらに、G6PD 二量体及び四量体形成に関与するアミノ酸残基の変異体についてもリコンビナントタンパク質として精製し、生化学的解析及び構造生物学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) G6PD 欠乏症由来のクラス I 変異体の構造解析及び性状解析

本研究を遂行するために、まず G6PD 欠乏症のクラス I 変異体 4 種類及び structural NADP^+ 結合の責任残基である W509 のアラニン変異体 W509A の精製を行った。その結果、全ての変異体について、高純度に精製することに成功した。続いて、精製した G6PD 変異体を用いて結晶化を行った。得られた単結晶を用いて、SLAC National Accelerator Laboratory の Stanford Synchrotron Radiation Lightsource (SSRL) にて X 線回折像を取得した。取得した X 線回折データを用いて分子置換法によって初期構造を決定し、構造精密化を行うことで 5 種類の G6PD 変異体の立体構造を決定した。構造解析の結果、G6PD における structural NADP^+ の結合に重要な C 末端テール領域及び structural NADP^+ の電子密度が観察されなかった。この結果は、クラス I 変異体が structural NADP^+ を保持できないことを示唆している。これらのことは、C 末端テール領域及び structural NADP^+ の結合に関与するアミノ酸残基における変異 (R393H 及び W509A) によって引き起こされたと考えられた。C 末端テール領域及び structural NADP^+ の結合は、G6PD の二量体形成及びその安定化に重要であることが示唆されていることから、 NADP^+ 存在下、あるいは非存在下での G6PD の熱安定性を調べた。その結果、野生型 G6PD は、 NADP^+ 存在下において熱安定性が劇的に向上するのに対し、クラス I 変異体では NADP^+ の熱安定性への効果はほとんど観察されなかった。この結果は、クラス I 変異体の立体構造において、structural NADP^+ の結合が観察され

ないことと一致している。加えて、G6PD の二量体形成面における 2 つのベータストランドの電子密度が観察されなかった。このことは、structural NADP⁺の結合が二量体形成面における正しいベータシート形成に必須であることが示唆している。このベータシート形成に重要であると考えられるアミノ酸残基の変異体である P396L についても structural NADP⁺及び C 末端テール領域の電子密度が観察されなかったことから、structural NADP⁺、C 末端テール、及び二量体形成面におけるベータシート形成は相互依存的であることが示唆された。G6PD のクラス I 変異による二量体形成面における正しいベータシート形成の阻害によって、G6PD が野生型とは異なる湾曲した二量体を形成することが明らかになった。これまで、G6PD は二量体、四量体が活性型、単量体が不活性型と考えられてきたが、本研究で解析した G6PD のクラス I 変異体においては、単量体は形成せず、異常な二量体を形成することで活性低下が引き起こされることが示唆された。

G6PD の活性部位は二量体形成領域や structural NADP⁺結合領域からは離れた領域に存在しており、structural NADP⁺の結合阻害や二量体形成阻害によって引き起こされる活性低下のメカニズムはこれまで不明であった。クラス I 変異体及び野生型 G6PD の構造比較によって、G6PD 二量体形成領域のベータシートにおいて structural NADP⁺との相互作用面と反対側にて相互作用する f ヘリックスの結合位置及び角度がクラス I 変異体と野生型との間で相違があることが明らかになった。クラス I 変異によって、ベータシートと相互作用する f ヘリックスが 1 ターン分ずれることにより、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。クラス I 変異が報告されている V394 及び F381 残基は f ヘリックスとの結合に重要なアミノ酸であり、クラス I 変異体である G6PD V394L や F381L において、野生型 G6PD と比較して f ヘリックスの位置のずれが観察された。実際に、等温滴定カロリーメトリーによって G6PD と G6P との相互作用を解析すると、G6P は野生型 G6PD に結合するのに対し、G6PD 変異体には結合しないことが明らかになり、構造解析の結果と一致することを示した。

以上の結果より、structural NADP⁺及び C 末端テール領域の結合、二量体形成領域における適切なベータシートの形成、f ヘリックスの適切な位置・角度での保持、に関わるいずれのクラス I 変異についても同様な構造的変異を示したことから、これらの広範囲に渡る領域が相互依存的に G6PD の適切な構造形成に必要な不可欠であることが明らかになった。本研究によって、G6PD 欠乏症のクラス I 変異による活性低下のメカニズムを明らかにすることに成功し、これまで開発が進んでいない、クラス I 変異体の活性制御分子の探索及び改良に大いに貢献することが期待される。

(2) 活性低下した G6PD 変異体の四量体形成による酵素活性の向上

本研究によって、クラス I 変異体は野生型と比較して湾曲した二量体を形成することが明らかになった。野生型と異なる変異体の湾曲した二量体形成により、より安定かつ活性の高い四量体形成に影響を及ぼすことが考えられた。実際に、ゲル濾過クロマトグラフィー解析の結果、本研究において解析したクラス I 変異体は全て四量体を形成できないことが明らかになった。野生型 G6PD 四量体においては、二量体同士の相互作用面にて二つの j ヘリックスが平行に位置し、一方の j ヘリックス中の K290 及び E287 残基がもう一方の j ヘリックス中の E287 及び K290 残基と塩橋を形成することで、正常な四量体形成に寄与していることが示唆される。一方、クラス I 変異体においては、野生型 G6PD と比較して二量体同士の相互作用面にて j ヘリックス同士の位置関係が変化し、塩橋を形成することができないことが明らかになった。これがクラス I 変異体が四量体を形成できない原因であることが示唆された。加えて、クラス I 変異体において、四量体形成が可能になれば湾曲した二量体構造が矯正され、活性部位の構造変化や低下した酵素活性が向上するのではないかという仮説を立てた。G6PD は翻訳後修飾によっても活性が制御されており、多くのクラス I 変異に関わるアミノ酸残基と同様に structural NADP⁺の結合に重要な K403 残基のリン酸化によって、G6PD の活性が失われることが明らかになっている。そこで K403 のリン酸化を模倣した K403Q 変異体（酵素活性は野生型の 1%程度）を用いて、強制的に四量体形成を行うことを試みた。G6PD の二量体同士の相互作用面に着目すると、A277 と C294 残基が対称に二箇所存在することが分かる。そこで、A277C の変異を導入することで、二量体同士の相互作用面の二箇所において A277C と C294 との間でジスルフィド結合を形成し四量体化を促した。その結果、A277C の点変異導入によって、K403Q 変異体についても四量体を形成することがゲル濾過クロマトグラフィー解析によって明らかになった。また、熱安定性試験の結果、K403Q 及び A277C を含む変異体は野生型と同等の熱安定性を有することが明らかになった。さらに、X 線小角散乱解析 (SEC-SAXS 法) によって、K403Q 及び A277C を含む変異体は確かに四量体を形成し、かつフレキシビリティが低下していることが示された。このことは、K403Q 及び A277C を含む変異体が高い熱安定性を有することと一致する結果である。さらに、K403Q 及び A277C を含む変異体は、K403Q 変異体と比較して、酵素活性が 150 倍以上に上昇し、野生型の 16.5%程度まで活性が回復することが明らかになった。

以上のことから、本研究によって、G6PD 欠乏症のクラス I 変異体の活性低下機構の解明に加えて、低下した酵素活性を向上させる点変異とその活性化機構の解明に成功した。これによって、これまで活性化化合物などの制御分子の開発が立ち遅れていたクラス I 変異体についても、四量体形成を促進する分子を探索することで、活性化を行うことができると考えられる。本研究は、G6PD 欠乏症の最も重篤なクラス I 変異に対する効果的な治療薬の開発に大きなインパクトを与えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2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

1. 著者名 Garcia Adriana Ann, Mathews Irimpan I., Horikoshi Naoki, Matsui Tsutomu, Kaur Manat, Wakatsuki Soichi, Mochly-Rosen Daria	4. 巻 298
2. 論文標題 Stabilization of glucose-6-phosphate dehydrogenase oligomers enhances catalytic activity and stability of clinical variants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101610 ~ 101610
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.101610	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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岩崎憲治、堀越直樹、他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 669
3. 書名 医学のあゆみ 構造生命科学による創薬への挑戦	

〔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			