

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2010～2012
課題番号：22590113
研究課題名（和文） 創薬に向けたヒト由来アセチルCoAカルボキシラーゼの活性化機構の解明
研究課題名（英文） Elucidation of activation mechanism of human acetyl-CoA carboxylase
研究代表者
国島 直樹 (KUNISHIMA NAOKI)
独立行政法人理化学研究所・タンパク質結晶構造解析研究グループ・グループ副ディレクター
研究者番号：70415149

研究成果の概要（和文）：

脂肪酸合成の律速段階を触媒する酵素「アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC)」の「ビオチンプロテインリガーゼ (BPL)」による活性化機構を結晶構造解析の手法で解明することを目指して研究を行った。ヒト ACC の活性中心ドメイン (hBCCP1 と hBCCP2) およびヒト BPL (hBPL) の遺伝子を合成し大腸菌の大量発現系を構築したところ、概ね不溶性の封入体として発現した。変性巻き戻しとシステインのアラニンへの置換などを試みたが可溶性標品は得られていない。

研究成果の概要（英文）：

Toward the elucidation of the activation mechanism of acetyl-CoA carboxylase (ACC) that catalyzes the rate-limiting step of the fatty-acid biosynthesis, we tried the protein crystallography of the central domain of human ACC (hBCCP1, hBCCP2) and its activation enzyme biotin protein ligase (hBPL). The genes were synthesized for a large-scale expression using E. coli. These proteins were generally expressed as inclusion bodies that could not be solubilized by methods including the denaturation/refolding and the substitution of cysteine with alanine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：生活習慣病、脂肪酸合成、結晶構造解析、X線回折、酵素、タンパク質、立体構造、薬物設計

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病はメタボリック症候群とも呼ば

れ、最終的に心疾患や脳卒中を引き起こす。特に欧米では成人の約4人に1人が生活習慣病であると言われており、現代社会における深刻な問題の一つとなっている。

生物は、体内で余ったエネルギーを脂肪酸として蓄え、生命活動の維持に必要な時にエネルギー源として利用する。食糧事情の安定した現代人では、皮肉にもこの仕組みが肥満を引き起こし、生活習慣病の原因となっている。過剰な食物摂取が原因の生活習慣病は、脂肪酸生合成の律速段階を触媒する酵素「アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC)」の活性化を制御することで解決できると考えられている。この ACC 活性化の本質は、ACC 分子の一部を構成するビオチンカルボキシルキャリアプロテイン (BCCP) に存在する特定リジン残基のビオチン化である。ビオチンはビタミンの一種であり、BCCP に共有結合することで ACC の触媒中心の一つとして働く。従って、BCCP のビオチン化を薬によって制御することで生活習慣病を克服することが可能である。

この原理で生活習慣病治療薬を開発するためには、BPL と BCCP との複合体の結晶構造を決定するのが早道である。しかし、この複合体は恐らく BPL の非常に高い基質特異性を反映した本質的な不安定性を持っており、通常の方法では結晶化しない。そこで本課題代表者の国島らは、まず熱に強い古細菌由来 BPL の単独の結晶構造を決定した。次に、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多数作成し、古細菌由来 BCCP との複合体の結晶化を試した。その結果、2 種類の変異体で BPL-BCCP 複合体の結晶化に成功し、その構造を世界で初めて決定した。

国島らが行った古細菌由来 BPL-BCCP 複合体の結晶構造解析の結果、驚いたことに、1 つの結晶中でビオチン化反応が起きる前の状態とビオチン化後の状態の複合体が同時に観測された。最終的に、ビオチン化反応前後の 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、合計 5 種類の異なる状態の結晶構造を得ることができた。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 amino 酸残基だけを標的にするという基質特異性の非常に高い反応である。古細菌由来複合体で観測された複数の結晶構造は、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を意味する。このマルチステップロックシステムとも呼べる複雑な基質認識機構が BPL の厳密な基質特異性を生み出すのではないかと我々は考えている。特に、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、重要な役割を持つように見える。例えばこの C 末端ドメインの構造を固定化す

る薬剤を設計すると、BCCP の活性化を効果的に制御することができるかもしれない。

2. 研究の目的

古細菌由来 BPL/BCCP の結晶構造解析により、複合体形成や反応に関わる amino 酸残基が判明するなど、タンパク質のビオチン化に関する一般的な構造生物学的知見が得られた。これらの機構はヒトのタンパク質でも基本的に同じと考えられる。なぜならば、BPL/BCCP を古細菌とヒトの間で比較すると 3 割程度の同一 amino 酸残基率を示し、これは本質的に同一の基本構造を意味するからである。しかし、安全で効能の高い生活習慣病治療薬開発のためには古細菌の構造情報では不十分で、ヒト由来タンパク質の立体構造を決定する必要がある。そこで本課題では、古細菌での結果を踏まえ、リード化合物取得に関してより直接的な構造情報を得るため、ヒト由来 BPL/BCCP の結晶構造解析を行う。創薬に向け、ヒト由来 ACC の活性化機構解明を目指す。

3. 研究の方法

哺乳類は ACC1 および ACC2 という 2 種類の類似した ACC を持っており、生活習慣病の予防または治療のためには ACC2 を選択的に抑制する必要がある。そこで、ACC1 と ACC2 のそれぞれに対応する 2 種類のヒト BCCP (hBCCP1 および hBCCP2) とヒト BPL (hBPL) の遺伝子からタンパク質試料を調製し、結晶化および構造決定を行う。

ヒト由来 ACC1 と ACC2 の同一残基率は全長で 81%、BCCP 部分で 64% である。そこで、これら ACC1 と ACC2 のそれぞれに対応する 2 種類の BCCP (hBCCP1 および hBCCP2) の遺伝子からタンパク質試料を調製し、結晶化および構造決定を行う。BCCP は amino 酸 70~80 残基の単一ドメインから成る。まず、hBCCP1 および hBCCP2 (各 73 amino 酸残基) の遺伝子を、大腸菌発現系に最適化したコドンで全合成する。ヒトの場合、BCCP は分子量 27~28 万の ACC 全長タンパク質の一部であるため、解析可能な結晶を得るためには、遺伝子のどの部分を切り出して発現させるかが重要である。第一近似として、古細菌 BCCP で解析に成功したドメインに相当する部分を切り出して発現・精製・結晶化を行う。以上に述べた手順および手法でヒト由来 BCCP の高分解能結晶を取得し、SPring-8 の放射光を利用して高精度の X 線回折データを収集し、当研究グループの構造計算システムを利用して構造決定を行う。

BPL は amino 酸 240~270 残基の 2 ドメインから成る分子で、古細菌では 2 量体を形成し

ている。ヒト由来 BCCP と同様の手順で構造解析を進める。ヒト由来 BPL (hBPL) の全長タンパク質は分子量約 8 万の大きな分子であるが、ピオチン化に関与するのは当研究グループで結晶構造を決定した古細菌由来 BPL に対応する一部であるため、まず全長遺伝子のうち対応する 270 アミノ酸残基の部分を取り出して発現・精製・結晶化を試す。hBPL の高分解能結晶が得られたら、SPring-8 の放射光を利用して高精度の X 線回折データを収集し、当研究グループの構造計算システムを利用して構造決定を行う。

4. 研究成果

平成 22 年度は、それぞれのタンパク質について遺伝子合成を行い、試料調製を始めた。まず、hBCCP1・hBCCP2・hBPL の部分配列をコードする DNA を大腸菌のコドン使用頻度を考慮して最適化し合成した。次に、大腸菌発現用ベクター pET-11a (NdeI/BamHI) にサブクローニングし、BL21 系の宿主大腸菌を用いて発現させた。その結果、hBCCP1 (分子量 8002)・hBCCP2 (分子量 8216)・hBPL (分子量 30301) は全て発現したが、hBCCP1 と hBPL は不溶性であった (Fig. 1)。

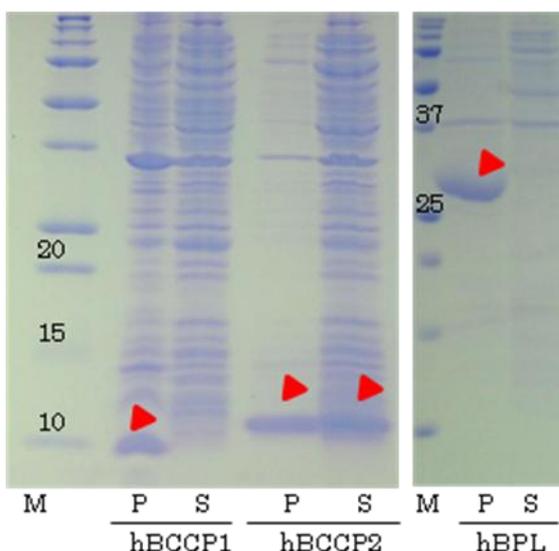


Fig. 1
SDS-PAGE of expressed samples
lane M : Molecular-weight markers (kDa)
lane P : Precipitation
lane S : Supernatant

平成 23 年度は、それぞれのタンパク質について引き続き試料調製の検討を行った。まず、BL21 系の宿主大腸菌を用いた大量発現により可溶性画分として得られる His タグ未付加の BCCP2 について、各種クロマトグラフィー

による精製を試みた。イオン交換クロマトグラフィーとヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーでは素通り画分に溶出された。さらに疎水性相互作用クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーを試みたが、結晶化に用いる程度まで精製純度を上げることは出来なかった (Fig. 2)。



Fig. 2
SDS-PAGE of purified hBCCP2

平成 24 年度は、それぞれのタンパク質についてさらなる試料調製の検討を行った。まず、His タグを付加した hBCCP1・hBCCP2・hBPL に関して、封入体として発現して可溶化・精製する方向で検討を行ったが、変性巻き戻しで可溶化できる条件が見つからなかった。また、ジスルフィド架橋による不溶化を防ぐため、各タンパク質のシステインをアラニンに置換した変異体を作成し発現を試みたが、やはり不溶性の封入体として発現した。その他 N 末端を削ったコンストラクトや GFP フュージョンも試したが、同様に封入体として発現した。GFP His-tag fusion hBCCP2 (分子量 37470) に関しては、変性条件下で精製を行い、変性剤除去による巻き戻しを行った。一部可溶化には成功したものの、現時点で天然状態への巻き戻しには至っていない (Fig. 3)。

以上の結果、本課題の期間内では hBCCP1・hBCCP2・hBPL のいずれも残念ながら結晶化に適するタンパク質試料を得るには至らなかった。しかし、試すべき項目はまだ残っており、今後の展開が待たれる。例えば、システインをアラニンに置換した変異体を使って変性巻き戻しを行うことは検討の価値があ

る。また、本課題の期間内では大腸菌の発現系を用いたが、今後、酵母や昆虫細胞などの発現系を試すことが望ましい。



Fig. 3
SDS-PAGE of purified GFP fusion hBCCP2

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0件)

[学会発表] (計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2008/080327

6. 研究組織

(1) 研究代表者

国島 直樹 (KUNISHIMA NAOKI)

独立行政法人理化学研究所・タンパク質結晶構造解析研究グループ・グループ副ディレクター

研究者番号：70415149

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松浦 祥悟 (MATSUURA YOSHINORI)

独立行政法人理化学研究所・タンパク質結晶構造解析研究グループ・リサーチアソシエイト

研究者番号：50513462