

ファブリー病の病態酵素ガラクトシダーゼの三次元構造への遺伝子多型の影響解析

●佐藤 能雅 ◆水谷 隆太

東京大学 大学院薬学系研究科

〈研究の目的と進め方〉

スフィンゴ糖脂質の先天性代謝異常症のファブリー病は、 α -ガラクトシダーゼの遺伝子の変異によって酵素活性が低下した変異体酵素を生じ、リソソーム内に基質の globotriaosylceramide が活性低下によって蓄積することにより発症する。研究では、ファブリー病を発症するヒト α -ガラクトシダーゼの変異体を3種取り上げ、病態酵素として、これらの三次元構造を高分解能のX線結晶構造解析で解明する。さらに、変異体の性状の解析と、正常体酵素の三次元構造との比較を行い、遺伝子変異がもたらす三次元構造、性状、病態への影響を蛋白質レベルで解明することを目的とする。

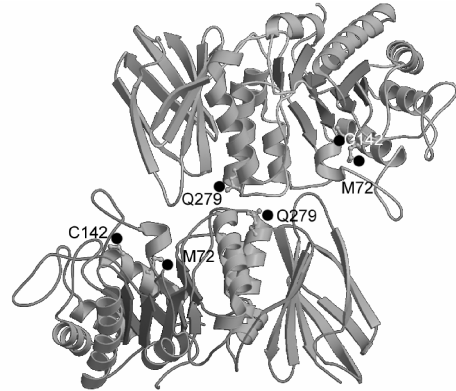
研究では、古典型1種と亜型2種のヒト α -ガラクトシダーゼの変異体酵素を調製、結晶化し、構造のX線解析を行う。また、酵素の活性部位あるいは変異部位が基質とどのように相互作用するのかを明らかにするため、globotriaosylceramide あるいはその類似体との複合体の結晶のX線解析を行う。これらと併せて、変異体酵素の性状の解析を行う。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 変異体酵素（2量体で分子量は約8万2千）について、シンクロトロン放射光X線を用いて高分解能のX線回折データを収集する。
- 2) 収集したデータを用いて、分子動力学を併用する結晶学的最小二乗法による結晶構造の精密化を進める。
- 3) 基質あるいは基質類似体との複合体結晶の調製を試み、得られる結晶について高分解能のX線解析を行う。
- 4) 動的散乱法、ゲルろ過法、蛍光基質の加水分解などを指標に、変異体酵素の性状解析を行う。

〈研究期間の成果〉

- 1) 正常体酵素、古典型C142Y変異体、亜型M72V変異体、亜型Q279E変異体を調製し、それぞれの結晶について放射光X線を利用して1.9~2.0 Å高分解能のX線回折データを測定できた。
- 2) 測定した回折データを用い、結晶学的な構造精密化を進めた。その結果、各変異体の三次元構造には正常体とは著しい差異が無いこと、古典型変異体ではY142が基質結合部位をブロックしていること、亜型変異体では変異したアミノ酸残基が基質結合部位および触媒部位からは遠く離れていることが判明した（図）。
- 3) 亜型Q279E変異体と基質類似体のガラクトノジリマイシンとの複合体が得られ、そのX線解析を行うことができた。
- 4) 変異体は正常体と同じ2量体を形成すること、古典型変異体には酵素活性が全く無いこと、亜型変異体には正常体酵素とほぼ同程度の活性が認められるが急速に失活しやすいことが判明した。
- 5) これら知見をもとに、これまで見出されている遺伝子変異を三次元構造にマッピングし、変異の影響を考察した。古典型変異体では、C142でのジスルフィド結合が無くなっている。亜型変異体では変異したアミノ酸残基が蛋白質分子内の水素結合のパターンを変えて酵素の表面構造を変化させ、急速な活性の失活をもたらしている。



ヒト α -ガラクトシダーゼ 2 量体構造と●変異体部位

〈国内外での成果の位置づけ〉

研究で対象とした蛋白質はヒト由来の糖蛋白質であり、また、疾患を惹起する変異体である。 α -ガラクトシダーゼの三次元構造自体は米国グループから報告されたが分解能が低く、酵素の活性部位、変異と疾患の関わりは明らかにされていない。

ファブリー病を惹起する古典型1種と亜型2種の α -ガラクトシダーゼの変異体酵素を調製、結晶化、高い分解能の構造解析を行ったが、同様の研究の国内外での報告例はない。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

分子量が大きな基質である globotriaosylceramide を結晶に導入して変異体酵素との複合体結晶を調製しようとしたが、この基質は脂質部分の溶解度が低く、複合体結晶を得ることができなかった。一方、基質類似体のガラクトノジリマイシンとの複合体結晶を正常体と変異体3種について得ることができ、シンクロトロン放射光X線回折データの収集と三次元構造の解析に成功した。

分子のサイズが大きく、大量のデータ処理が必要なこと、収集した結晶データに質的な問題があって、解析処理に多大な作業時間を要した。

〈今後の課題〉

研究期間内で得られた結果に基づいて、古典型C142Y変異体、亜型M72V変異体、亜型Q279E変異体すべてについて、結晶構造の精密化、変異体酵素の性状解析を最近終えることができた。

遺伝子変異、その三次元構造、酵素の性状への影響も詳細に調べることができたので、病態との関連を考察して研究をまとめ、詳細な報告を行うこととしている。

研究では、正常体酵素と変異体を大量発現させ、かつ高純度で調製できた。この技術は、酵素補充療法のための蛋白質の調製と、変異体での失活を防ぐ薬物のスクリーニングにも適用可能なものと考えられる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) Osawa, Y., Mizutani, R. and Satow, Y., Three-Dimensional Structural Studies on the Human α -Galactosidase Enzyme and Its Mutants Responsible for Fabry Disease, *SPRING-8 Experiment Report* 9, 238 (2002).