

称号及び氏名	博士(応用生命科学) 平 松 元
学位授与の日付	平成 19 年 5 月 31 日
論 文 名	「ヒト由来ジペプチジルペプチダーゼ IV の立体構造と機能に関する研究」
論文審査委員	主査 切畑 光統 副査 和田野 晃 副査 北村 進一 副査 多田 俊治

論文要旨

緒論

2 型糖尿病は、筋肉や脂肪などの糖を取り込む細胞におけるインスリン作用の減弱やインスリン分泌の低下による量的不足が原因となる。平成 14 年度の厚生労働省による実態調査では、糖尿病患者数は 1620 万人という報告があり、そのうち、約 95% は 2 型糖尿病である。高血糖の状態を改善する薬物療法には大別して、経口血糖降下薬とインスリンの 2 つがあり、経口血糖降下薬で治療を開始するのが一般的である。しかし、現在、臨床に用いられている経口血糖降下薬には副作用があるため、新しい治療薬の開発が望まれている。

インスリンは、生体内において血糖を低下させる唯一のものであり、これを分泌促進させるホルモン（インクレチン）の 1 つとして Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) が知られている。さらに GLP-1 は、膵β細胞の保護および増殖促進、グルカゴン分泌抑制、胃排出抑制、肝臓での糖新生抑制などの作用がある。2 型糖尿病では GLP-1 分泌の低下が認められるが、その補充により病態が改善することが知られている。それゆえ、GLP-1 の作用機序に基づいた治療薬の開発は、新たな 2 型糖尿病の治療法として非常に有望である。しかしながら、GLP-1 は血液中に存在するジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP-IV) により、速やかに加水分解されて不活性型となる。従って、DPP-IV 阻害薬は、GLP-1 の加水分解を阻害することによって、生体内に存在している GLP-1 の作用を増強することとなり、糖尿病の有効な治療薬となる。

DPP-IV (EC 3.4.14.5) は、1964 年に Hopsu-Havu と Glenner によってラットの肝臓や腎臓に新しい酵素として見出された。ヒト由来 DPP-IV は、腎臓、小腸、前立腺、胆管などの上皮細胞や内皮細胞に豊富に存在するほか、免疫担当細胞では主に活性化したリンパ

球 (T 細胞、B 細胞、NK 細胞) に強く発現している。本酵素は、細胞表面に存在する膜結合型糖蛋白質であり、その機能から CD26 または T 細胞活性化抗原とも呼ばれている。DPP-IV は、プロリルオリゴペプチダーゼ (POP) ファミリーに属するセリンプロテアーゼであり、N 末端側から順に細胞質領域、細胞膜貫通領域、高グリコシル化領域、システインリッチ領域、触媒領域の 5 つの領域から構成され、766 アミノ酸残基からなる 1 本鎖の蛋白質である。C 末端側の触媒領域には catalytic triad を形成する Ser630, Asp708, His740 が位置している。また、生体内では 2 量体で存在することが知られている。本酵素の基質特異性は、N 末端側から 2 残基目に位置するプロリンまたはアラニンをもつペプチド構造を特異的に認識して、その C 末端側を切断してジペプチドを遊離する。生体内における基質としては、GLP-1 の他に Glucagon-like peptide-2 (GLP-2), Glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP), Neuropeptide Y (NPY) などが知られている。

本研究では、合理的分子設計手法を利用して、新たな糖尿病治療薬になり得る DPP-IV 阻害薬を創製するため、X 線構造解析による DPP-IV の立体構造の決定を行った。また、分子レベルで DPP-IV の基質認識機構を解明するため、DPP-IV とジプロチン A およびジプロチン B との共結晶構造解析を行った。

第 1 章 ジペプチジルペプチダーゼ IV の結晶構造解析

本酵素の発現は、物性を考慮して細胞質および細胞膜貫通領域を除いた領域を選び、また、C末端側には 6 残基の His タグを付与して、昆虫細胞 Sf21 を用いて発現させた。精製は、Ni カラムクロマトグラフィーと陰イオン交換カラム (Resource Q) を用いた。結晶化は、蛋白質濃度を 10mg/ml、沈殿剤組成として 0.18M glycine-NaOH buffer (pH 9.5)、18% PEG4000、0.18M Na acetate、温度 20°C の条件で行った。回折実験の結果、結晶は空間群 P2₁2₁2₁ に属し、a=118.04 Å, b=125.92 Å, c=136.84 Å であった。回折強度データは、実験室の装置を用いて 2.6Å 分解能までのデータを収集し、初期位相は塩化水銀を用いた重原子同型置換法で決定した。

第 2 章 ジペプチジルペプチダーゼ IV の高分解能結晶構造解析

高精度の構造解析を行うため、高輝度の X 線源である放射光実験施設 SPring-8 の創薬産業ビームライン BL32B2 において、1.9Å 分解能までの回折強度データを収集し、構造解析を行った。

DPP-IV は、非対称単位中に 2 分子存在しており、それらは非結晶学的な 2 回軸で関係付けられていた。本酵素は、生体内において 2 量体で存在していることから、結晶構造も同様に生体内の存在状態を反映しているものと考えられる。活性部位には、ナトリウムとグリセロールが各々の活性部位に 1 モルずつ存在していた。また、DPP-IV の全体構造は、大きく 2 つのドメインから構成されていた。N 末端側ドメインは、8 枚のブレードから構成される β プロペラ構造を有していた。ブレードとは、4 本の β ストランドで形成された逆平行 β シートからなる一種の羽根構造である。このうち、1 枚目のブレードのみが不規則な構造を形成していたため、β プロペラ構造の側面には大きな空洞が存在していた。このような非対称な構造をもつ β プロペラ構造は、DPP-IV において初めて見出されたものである。C

末端側ドメインは、セリンプロテアーゼの catalytic triad を形成する Ser630、 Asp708、 His740 を含むセリンプロテアーゼで多く見られる α/β ヒドロラーゼ構造を有していた。

本酵素における構造の特徴を更に明確にするため、同じ POP ファミリーに属するブタ由来 POP との構造比較を行った。POP は、活性部位への基質アクセスルートとして、 β プロペラ構造の頂上方向と最初と最後の β プロペラ間である側面方向の 2 通りのルートが考えられている。一方、DPP-IV は、POP と同様に 2 通りのルートが考えられるが、 β プロペラ構造の側面には他の構造には見られない大きな空洞が存在していた。このため、DPP-IV における主な基質のアクセスルートは、側面に存在する空洞からのルートであることが推察された。

第 3 章 ジペプチジルペプチダーゼ IV とジプロチン A 複合体およびジプロチン B 複合体の結晶構造解析

ジプロチン A およびジプロチン B は、それぞれ Ile-Pro-Ile および Val-Pro-Leu の 3 つのアミノ酸残基からなるトリペプチドである。これらは、ゆっくり加水分解されるため、基質でありながら阻害剤のように作用することが知られている。ジプロチン A およびジプロチン B と DPP-IV の共結晶作製では、蛋白質を結晶化する際、予め化合物を加えておく共結晶法を用い、第 1 章の場合と同じ結晶化条件で行った。データ収集は放射光実験施設 SPring-8 で行い、構造解析はネイティブ構造をモデル分子とする分子置換法で決定した。ジプロチン A およびジプロチン B は、2 量体の各活性部位に 1 分子ずつ存在していた。ジプロチン A およびジプロチン B の N 末端の窒素原子は、本酵素の活性発現に重要な Glu205 と Glu206 という 2 つのアミノ酸残基と Tyr662 で水素結合を形成していた。また、ジプロチン A およびジプロチン B のプロリンは、DPP-IV の疎水性アミノ酸残基が形成するポケットに収まるように位置し、DPP-IV と相互作用していた。

本酵素との相互作用において、ジプロチン A およびジプロチン B では大きく異なる部分が P1' 部位（ジプロチン A では Ile、ジプロチン B では Leu）に認められた。両者の構造比較からジプロチン A の方が DPP-IV への親和性が高いことが推察された。これまでに、ジプロチン A とジプロチン B を含むトリペプチドに対する DPP-IV の基質特異性が検討され、P1' 部位が Ile または Leu であるトリペプチドを比較した場合、Ile の方が低い Km 値を示すことが報告されている。本研究から得られた構造情報は、この Km 値の差異を示唆している。

DPP-IV との相互作用に必須な部位の考察するため、ネイティブ構造とジプロチン B 複合体構造を重ね合わせるにより、DPP-IV と相互作用するために必要な共通部位を見出した。また、活性部位周辺の水分子に注目したところ、いくつかの共通な水分子、すなわち保存された水分子の存在を見出した。特に 3 つの水分子については、他のグループが報告したネイティブ構造において結晶格子が異なるにもかかわらず、同じように保存されていた。これらの知見は、DPP-IV と相互作用する阻害剤の分子設計において鍵となる重要な情報を与えるものである。

結論

DPP-IV の立体構造を初めて決定した。N 末端側ドメインは β プロペラ構造を、C 末端側

ドメインは α/β ヒドロラーゼ構造を有していた。 β プロペラ構造の側面には大きな穴が形成されており、この穴が主な基質のアクセスルートであることが示唆された。DPP-IV とジプロチン A およびジプロチン B との相互作用を明らかにすることにより、DPP-IV における基質認識機構を分子レベルで明らかにした。また、複数の構造を重ね合わせることにより、DPP-IV の阻害剤設計において有益な知見が得られた。

審査結果の要旨

2 型糖尿病は体内におけるインスリン分泌量の低下や細胞のインスリン作用の減弱等によって惹起される疾病であり、新たなコンセプトに基づいた副作用の少ない治療薬の開発が強く望まれている。インスリンの分泌は、インクレチンと呼ばれる glucagon-like peptide 1 (GLP-1) によって促進されるが、この GLP-1 は血液中のジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP-IV) によって速やかに加水分解を受けて不活性型に変化することが知られている。従って、DPP-IV の特異的阻害剤は、GLP-1 の血中存在時間を延伸させ、インスリンの分泌促進を増大させる新たな 2 型糖尿病治療薬の創薬に繋がると考えられる。

本研究は、GLP-1 の生体内作用機序に基づく新たな 2 型糖尿病治療薬の開発を最終目的とし、DPP-IV および基質-DPP-IV 複合体等の立体構造を X 線結晶構造解析により解明し、阻害剤の分子設計に繋がる酵素機能の構造化学的解明について展開したものである。

第 1 章 では、昆虫細胞 Sf21 を用いて発現させた DPP-IV の結晶化にはじめて成功し、実験室の装置を用いて X 線結晶構造解析を行い、2.6Å 分解能までの空間群データを収集した。結晶は空間群 $P2_12_12_1$ に属し、 $a=118.04 \text{ \AA}$ 、 $b=125.92 \text{ \AA}$ 、 $c=136.84 \text{ \AA}$ であった。また、初期位相を塩化水銀を用いた重原子同型置換法で決定した。

第 2 章 では、DPP-IV の X 線結晶構造解析を高輝度放射光実験施設 SPring-8 の創薬産業ビームラインを用いて行い、1.9Å 分解能までの回折強度データを収集した。この結果、DPP-IV は非対称単位中に 2 分子存在し、活性部位にはナトリウムとグリセロールが各々 1 モルずつ存在することが判明した。また、DPP-IV の全体構造は大きく 2 つのドメインから構成され、N 末端側ドメインは 8 枚のブレードから構成される β プロペラ構造をとっていた。1 枚目のブレードのみが不規則な構造をとるため、 β プロペラ構造の側面には大きな空洞が存在していた。このような非対称な構造をもつ β プロペラ構造は、DPP-IV において初めて見出されたものである。また、C 末端側ドメインは、セリンプロテアーゼの catalytic triad を形成する Ser630、Asp708、His740 を含むセリンプロテアーゼに多く見られる α/β ヒドロラーゼ構造を有していることが明らかとなった。

次に、DPP-IV における基質のアクセスルートを推定するために、同じ POP ファミリーに属するブタ由来 POP との構造比較を行った。この結果、DPP-IV では β プロペラ構造に起因する側面の大きな空洞が主たるアクセスルートであると推定した。

第 3 章 では、基質であるジプロチン A およびジプロチン B と DPP-IV の複合体の結晶構造解析を SPring-8 で行った。ジプロチン A およびジプロチン B は、それぞれ Ile-Pro-Ile

および Val-Pro-Leu の3つのアミノ酸残基からなるトリペプチドであり、加水分解速度が遅いため基質でありながら阻害剤のように作用することが知られている。ジプロチン A およびジプロチン B は、DPP-IV 2 量体の各活性部位に1分子ずつ存在し、それらのN末端の窒素原子は、DPP-IV の Glu205 と Glu206 のアミノ酸残基と Tyr662 で水素結合を形成していた。また、ジプロチン A およびジプロチン B 分子中のプロリン残基は、DPP-IV の疎水性ポケットに収まるように位置していた。さらに、DPP-IV の P1' 部位は、ジプロチン A の Ile、ジプロチン B の Leu と相互作用していることが明らかとなった。

次に、DPP-IV と阻害剤の相互作用に必須な部位の考察するために、ネイティブな DPP-IV 構造とジプロチン B 複合体構造を重ね合わせ、相互作用に必要な共通部位を解析した。また、活性部位周辺にいくつかの共通な水分子、すなわち保存された水分子の存在を見出し、加水分解反応に関与する水分子について考察した。

本研究は、2型糖尿病治療薬の開発に繋がる DPP-IV の阻害剤の開発を目的に展開したものであり、DPP-IV および基質-DPP-IV 複合体の立体構造をX線結晶解析によりはじめて明らかにした。また、DPP-IV における基質のアクセス経路や基質認識機構を分子レベルで明らかにした。これらの知見は、今後、新たなコンセプトに基づく2型糖尿病治療薬の分子設計・開発において極めて重要な情報を与えるものと評価し得る。

本研究で得られた成果は、構造生物学、酵素化学、薬化学、医薬品分子設計論等の分野の発展に資するものであり、本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。