ヒト由来グルコキナーゼの結晶構造解析

万有製薬つくば研究所 鎌田健司, 長田安史

Kenji KAMATA and Yasufumi NAGATA: Crystal Structures of Human Glucokinase

Glucokinase is a cytoplasmic enzyme that phosphorylates glucose and triggers glucose utilization and metabolism. Glucokinase expressed in liver and pancreas is thought to be the glucose sensor controlling plasma glucose levels. The role of glucokinase as a glucose sensor is due to its allosteric properties. In order to elucidate the molecular mechanism of glucose sensor, we analyzed the crystal structures of human glucokinase in both its active and inactive forms. Crystal structures suggest that the allosteric regulation of monomeric glucokinase obeys the "mnemonical mechanism" rather than the well-known concerted model.

1. グルコースセンサー

生体がグルコースをエネルギーに変換する最初のステップはヘキソキナーゼによるグルコースからグルコース6-リン酸への反応である。ヘキソキナーゼは全部で4種類ありヘキソキナーゼIVは別名グルコキナーゼとも呼ばれている。ヘキソキナーゼI～IIIはヒトのほとんどの組織に分布し、グルコースに対してミカエリス・メンテン型の反応曲線を示す。グルコースに対する K_m 値は0.2 mM以下であり、血糖値(5～8 mM)よりはるかに低いことからこれらの酵素は生体でグルコースによって常に飽和されていると考えられている。¹⁾ このメカニズムにより大部分の組織ではいくら血糖値が低くなった状態でも常に一定のグルコースをエネルギー源として利用することができる。

一方グルコキナーゼは主に膵臓ベータ細胞、肝臓、脳など血糖調節に重要な組織に発現している。ほかのヘキソキナーゼのグルコース反応曲線が双曲線型を示すのに対して、グルコキナーゼはシグモイド型反応曲線を示すアロステリック酵素である。ヒトの正常血糖付近の高い $S_{0.5}$ 値(最大反応速度 V_{max} の半分の速度を与えるグルコース濃度、 K_m に相当)をもつために、グルコキナーゼ活性は血糖のわずかな変化によって大きく変化する。このグルコキナーゼ活性の変化が血糖調節には重要であると考えられている。正常人の血糖値はどんなにたくさんの食事をとったとしても一定の範囲内に収まるように、種々のメカニズムによって厳格にコントロールされている。その主役であるインスリンは強力な血糖低下ホルモンで、血糖が高くなると膵臓ベータ細胞から分泌され血糖上昇を抑制する。膵臓ベータ細胞のインスリン分泌はグルコース代謝と共役していて、なかでもグルコキナーゼのグルコース反応曲線と膵臓ベータ細胞のインスリン分泌曲線は完全に一致して

いる。このことから膵臓ベータ細胞のグルコキナーゼは、血糖の恒常性維持のためにインスリン分泌を調節する際に、血糖の変化を感知するグルコースセンサーとして働いていると考えられている。^{2),3)} 一方肝臓は食事由来のグルコースをグリコーゲンとして貯蔵する役割と、食間や就寝中など血糖が下がったときに蓄えたグリコーゲンを使いグルコースを放出して正常血糖を維持する役割をもつ臓器である。消化管で吸収された食事由来のグルコースの約3分の1が、初めに肝臓を通過するとき肝臓グルコキナーゼにより代謝され、グリコーゲンとして貯蔵される。そのためたとえ食後であっても急激な血糖上昇は起きにくくなっているわけである。⁴⁾

このようにグルコキナーゼは血糖調節に重要であるために、その変異は病気の原因となる。ヒトでは多くのグルコキナーゼ遺伝子異常が知られていて機能別に2種類に分けることができる。グルコキナーゼ活性が低下した($S_{0.5}$ の上昇や V_{max} の低下)遺伝子変異をもつと若年発症型の糖尿病(MODY2: maturity-onset diabetes of the young type 2)になることが知られている。⁵⁾ MODY2家系のヒトではグルコキナーゼの血糖感知のしきい値が正常人と比べ高グルコース側にシフトしている。その結果として高血糖になっても十分にインスリン分泌が促進されず、また肝グリコーゲンの貯蔵も増えないので高血糖状態を呈する。一方グルコキナーゼ活性が上昇した($S_{0.5}$ の低下や V_{max} の上昇)遺伝子変異をもつヒトは、新生児持続性高インスリン血症性低血糖症(PHHI: persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy)になる。これらのヒトでは、グルコキナーゼの血糖感知のしきい値が逆に低グルコース側になっていることから正常血糖であってもインスリン分泌が惹起され、慢性的な高インスリン、低血糖症状を示してしまう。⁶⁾

このようにグルコキナーゼがグルコースに対してシグ

モイド型の反応曲線を示し、その $S_{0.5}$ 値が正常な血糖値付近に存在することが、血糖調節には重要である。しかしグルコキナーゼがグルコース結合に対しての正の協同性をどのように獲得し、シグモイド型の反応曲線を示すようになっているかはよくわかっていなかった。リガンドに対して正の協同性を示す蛋白質は、アロステリック蛋白質(酵素の場合はアロステリック酵素)として古くから研究されている。蛋白質結晶構造解析の対象にも早くからなっており、蛋白質結晶構造解析のバイオニアであるPerutzらによって始められたヘモグロビンのアロステリック機構解明の仕事は一番有名な例であろう。ヘモグロビンをはじめ現在までに数種のアロステリック蛋白質に関して、酵素学的研究および構造解析によりそのアロステリック機構が明らかにされている。⁷⁾それらのすべてがMonodらにより提唱された協奏的モデルとよく一致している。つまりアロステリック蛋白質は活性状態と不活性状態の2つの構造をとることができ、多量体を構成するすべてのサブユニットがいっせいに構造変化することが正の協同性の基礎となっているという考えである。⁸⁾しかしながらグルコキナーゼの正の協同性はこのモデルでは説明できないと考えられる。なぜならグルコキナーゼは1つの活性部位をもつ単量体の酵素であり、サブユニット間の協同性はありえないからである。^{9),10)}このようにアロステリック蛋白質の中でユニークな存在であるグルコキナーゼの正の協同性を説明するために、古くからいくつかのモデルが提唱されている。¹¹⁾しかし構造解析が成功していなかったこともあり、どのモデルが正しいのかはよくわかっていなかった。グルコキナーゼは、ヘキソキナーゼIVとも呼ばれるようにヘキソキナーゼのアイソザイムの1つである。ヘキソキナーゼに関してはSteitzらによって解析された酵母ヘキソキナーゼの構造解析をはじめとし、ヒト由来ヘキソキナーゼIについても構造解析が行われている。¹²⁾⁻¹⁴⁾これらの解析によりヘキソキナーゼがオープン構造とクローズド構造の2つの状態をとることが示された。これは基質の結合が酵素の構造変化を誘導すること(Induced-fit)が、初めて結晶構造で示された例として有名である。しかしこれらの酵素はグルコキナーゼとホモロジーが高いにもかかわらず、グルコースに対して正の協同性を示さない。そのためグルコキナーゼの活性状態と不活性状態の両方の構造解析を行うことは、単量体酵素の正の協同性という不可思議な特性に関して理解を深めることににおおいに役立つと考えられた。

また最近になってわれわれを含むいくつかのグループによってグルコキナーゼを活性化する低分子化合物が見つけた。¹⁵⁾⁻¹⁸⁾これらの化合物の存在下では、グルコキナーゼは特徴的であったグルコースに対する正の協同性を示さず、ほかのヘキソキナーゼと同様のミカエリス・メンテン型の反応曲線を示すようになる。われわれのグループが見つけた化合物Aは、30 μM 濃度で V_{max} を約1.6倍

図1 グルコキナーゼのグルコース反応曲線。(Glucose saturation curve of glucokinase.) グルコキナーゼの反応速度はグルコース濃度に対してS字型の曲線を示す(●)が、30 μM の化合物Aは存在下(■)では通常のカエリス・メンテン型の反応曲線となる。¹⁵⁾

上昇させ、 $S_{0.5}$ を8 mMから0.6 mMに減少させる(図1)。この化合物とグルコキナーゼの複合体構造を解析することは、活性制御機構を明らかにすることに役立つと思われる。

2. 構造解析

2.1 結晶化用コンストラスト

結晶構造解析には、N末端領域を11残基あるいは15残基短くした変異型酵素GK($\Delta 1-11$)、GK($\Delta 1-15$)を用いた。肝臓と膵臓ベータ細胞のグルコキナーゼでは、スプライシングによりこれらのN末端の15残基が異なっていることが知られている。^{19),20)}作製された2種類の変異型酵素は野生型酵素と同様のアロステリック特性を示し、また化合物により同様に活性化された。

2.2 活性化構造

活性状態の構造は、変異型酵素GK($\Delta 1-11$)と基質グルコースおよび活性化剤である化合物Aとの複合体状態で解析された。複合体の結晶は30% PEG1500, 0.1 M Hepes-NaOH (pH6.6)の結晶化条件を用い、約1週間20度に静置することで得られた。結晶系は $P6_522$ ($a = b = 79.86$ Å, $c = 322.22$ Å)であった。データ測定は、高エネルギー研究機構Photon FactoryのBL6Bにおいて行った。ヘキソキナーゼIの構造(PDBコード: 1CZA¹³⁾)をモデルとして分子置換法により構造解析を行い、 $R = 0.232$, $R_{\text{free}} = 0.274$ の最終構造を得た。¹⁵⁾

グルコキナーゼは2つのドメイン(ラージドメイン、スモールドメイン)およびそれを結ぶ3つのコネクティング領域(I~III)で構成されている。2つのドメイン間には大きなクレフトが存在し、その内部に活性部位が形成されていた(図2a)。今回の構造解析では、 α アノマーのグルコースがこの活性部位に結合していた。また化合物Aの電子

図2 グルコキナーゼの全体構造. (Overall structures of glucokinase.) (a) 活性状態の構造の模式図. ヘキソキナーゼの構造と類似であり, ラージドメインとスモールドメインの位置関係はクローズド構造と呼ばれるものであった. グルコースおよび化合物Aが結合している. (b) 不活性状態の構造の模式図. 2つのドメインの位置関係は, ヘキソキナーゼで知られているオープン構造とも異なっており, スーパーオープン構造と呼ぶ. $\alpha 13$ ヘリックスがスモールドメインからリリースされている.¹⁵⁾

図3 アロステリック部位の構造. (Structures of the allosteric site.) (a) グルコキナーゼのアロステリック部位の構造. コネクティング領域Iが, 溶媒に露出した構造をしており, その下の大きな空間に化合物Aが結合している. (b) ヘキソキナーゼタイプIにおけるアロステリック部位に相当する部分の構造. コネクティング領域Iはパッキングした構造をしている. そのため化合物Aの結合できる空間はなく, $\alpha 13$ ヘリックスもコネクティング領域Iにしっかりとホールドされている.

密度も2つのドメイン間に観測された. 活性状態のグルコキナーゼの全体構造は, 今までに解析されているヘキソキナーゼのクローズド構造とほぼ同一の構造であったが, コネクティング領域I付近の構造に大きな違いが見られた(図3). グルコキナーゼのコネクティング領域Iはフレキシブルで溶媒に露出した構造であるのに対し, ヘキソキナーゼではリジットでパッキングした構造をとっている. 化合物Aが結合するアロステリック部位は, このグルコキナーゼに特徴的であるコネクティング領域I, ラー

ジドメイン($\beta 1$ ストランド, $\alpha 5$ ヘリックス), スモールドメイン($\alpha 13$ ヘリックス)に囲まれた部位であった.

2.3 不活性化構造

不活性状態の構造は, 変異型酵素GK($\Delta 1-15$)を用いて何のリガンドも結合しないフリー体として構造解析された. フリー体グルコキナーゼの結晶は, 1.6 M 硫酸アンモニウム, 50 mM 塩化ナトリウム, 0.1M Bicine-NaOH (pH8.7), の結晶化条件を用い, 約1週間20度に静置することで得られた. 結晶系は $P6_322$ ($a = b = 103.18 \text{ \AA}$, $c =$

281.02 Å)であった。データ測定はSPring-8のBL32B2で行い、クローズド構造の2つのドメインを別々のモデルとして用い、分子置換法により構造解析を行った。その結果 $R = 0.274$, $R_{\text{free}} = 0.306$ の最終構造を得た。¹⁵⁾

フリー体グルコキナーゼの構造は、活性状態のグルコキナーゼの構造と大きく異なっていた(図2b)。ラージドメインの構造は、ほぼ同一であるがスモールドメインのコア部分は 99° 回転していた。このラージドメインとスモールドメインの位置関係はヘキソキナーゼで知られているオープン構造とも異なり、さらに大きく開いた構造をしているため“スーパーオープン構造”と呼ぶこととした。このスーパーオープン構造のグルコキナーゼでは、先に述べたグルコキナーゼのクローズド構造やヘキソキナーゼのオープン構造ではスモールドメインを形成していた $\alpha 13$ ヘリックスがスモールドメインからリリースされ、2つのドメイン間に横たわっていた。グルコキナーゼの活性部位は両ドメインのアミノ酸残基で構成されており、スモールドメインの回転によって活性に重要ないくつかの残基がこの部位に存在しなくなっているため、この構造は不活性状態であると考えられた。また大きく動いていた $\alpha 13$ ヘリックス上のアミノ酸残基が関与していたアロステリック部位は、スーパーオープン構造では完全に消滅していた。

3. 構造変化

ヘキソキナーゼのクローズド・オープン間の構造変化と今回解析されたクローズド・スーパーオープン間の構造解析を比較した(図4)。ヘキソキナーゼの構造変化では、コネクティング領域I~IIIがヒンジとなりスモールドメインが一体の構造として 12° 回転していた。それに対してグルコキナーゼのスモールドメインでは、 $\alpha 13$ ヘリックスがスモールドメインから解離してしまい一体のドメイン構造を保持しておらず、残りの部分が 99° もの大きな回転をしていた。活性化構造がほぼ同一の構造であったにもかかわらず、構造変化にこのような大きな差が生じた原因は唯一異なっていたコネクティング領域Iの構造によりよく説明される(図3)。グルコキナーゼのコネクティング領域Iは溶媒に露出したフレキシブルな構造をしており、コネクティング領域Iの下には化合物Aが結合できるような大きな空間が存在した。ヘキソキナーゼのコネクティング領域Iはリジッドでパッキングした構造をしており、構造変化でヒンジの役割を果たしている間もそれは変わっていなかった。ヘキソキナーゼではリジッドなコネクティング領域Iが $\alpha 13$ ヘリックスの動きを制限し、スモールドメインを一体の構造に保っているのに対して、グルコキナーゼではルーズな構造のコネクティング領域Iは $\alpha 13$ ヘリックスをホールドしていない。このため $\alpha 13$ ヘリックスはコネクティング領域Iの下で大きな空間を通過してスモールドメインを抜け出すことができ、またス

図4 グルコキナーゼおよびヘキソキナーゼの構造変化。(Conformational changes in glucokinase and hexokinase.) (a) グルコキナーゼの構造変化。スモールドメインのコア部分は 99° 回転し、 $\alpha 13$ ヘリックスはスモールドメインからリリースされ異なった方向へ動いている。(b) ヘキソキナーゼタイプIの構造変化。スモールドメインは一体の構造を保持したまま 12° 回転している。リジッドなコネクティング領域Iが $\alpha 13$ ヘリックスをしっかりとホールドしたままスモールドメインが回転する。¹⁵⁾

モールドメインのコア部分はより大きな回転が可能になっていると考えられる。またグルコキナーゼを活性化する化合物Aは、このコネクティング領域Iの下に結合することで、 $\alpha 13$ ヘリックスの動きを制限しスーパーオープン構造への構造変化を阻害すると推察された。

4. グルコキナーゼの活性調節

今回の構造解析の結果からグルコキナーゼは、正の協同性を示さないヘキソキナーゼよりフリー体の構造から活性構造になるまでに大きな構造変化を必要とすることがわかった。この結果は、単量体の正の協同性を示すモデルの中で“メネモニカルメカニズム”(記憶する機構)と呼ばれるものとよく一致する。^{21),22)} この機構は酵素が1つの反応終了後、一定時間だけ活性化状態を記憶していると考えられるモデルである。すなわちグルコース濃度が低いと、反応終了後グルコキナーゼはいったんスーパーオープン構造をとって活性状態に戻るには時間がかかる(=忘れてしまう)ために、反応の回転が遅くなる。グルコース濃度が高くなると、スーパーオープン構造になる前に次の基質が結

合する(=覚えている)ために、速い反応が実現されるというわけである。その結果としてグルコース反応曲線は、シグモイダル型を描くと考えられる。正の協同性を示さないヘキソキナーゼは、コネクティング領域Iの構造が違うためスーパーオープン構造をとらない(=忘れない)。そのためどんなグルコース濃度でも速い反応が実現し、反応曲線は単純なミカエリス・メンテン型となる。

上で想定したメネモニカルメカニズムにより、化合物Aや活性型変異体の活性化機構もよく説明することができる。化合物Aは、アロステリック部位に結合しスーパーオープン構造への構造変化を阻害するために、グルコキナーゼもヘキソキナーゼと同様に活性化状態を“忘れなく”なり、反応曲線は単純なミカエリス・メンテン型となると考えられる。またアロステリック部位に存在する残基が変異したV455M, A456V, Y214Aといった活性型変異体は、 $\alpha 13$ ヘリックスの動きを制限することになり活性化していると考えられる。^{6),23),24)}

5. まとめ

以上のようにグルコキナーゼの構造解析の結果、グルコースセンサーの巧みな調節機構が明らかになってきた。またこれは単量体酵素の正の協同性という不可思議な現象を構造解析により解明できた初めての例であり、ヘモグロビンなどでよく知られている協奏的機構と並んでメネモニカルメカニズムがアロステリック酵素による代謝制御に重要であることが示唆された。

謝 辞

本研究は、万有製薬つくば研究所の三ツ谷守弘、西村輝之、永木淳一、岩間年治、保坂薫花(敬称略)との協力で行われた。またデータ収集に関しては、構造生物坂部プロジェクトおよび蛋白質構造解析コンソーシアムのサポートを受けた。お世話になった坂部知平博士、五十嵐教之博士、勝矢良雄博士に感謝いたします。図は文献15)よりElsevier社の許可を得て掲載した。

文 献

- 1) H. M. Katzen and R. T. Schimke: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **54**, 1218 (1965).
- 2) F. M. Matschinsky: *Diabetes* **45**, 223 (1996).
- 3) F. M. Matschinsky, B. Glaser and M. A. Magnuson: *Diabetes* **47**, 307 (1998).
- 4) E. Van Schaftingen, M. Detheux and M. Veiga da Cunha: *FASEB J.* **8**, 414 (1994).
- 5) N. Vionnet, M. Stoffel, J. Takeda, K. Yasuda, G. I. Bell, H. Zouali, S. Lesage, G. Vaelho, F. Iris, Ph. Froguel and D. Cohen: *Nature* **356**, 721 (1992).
- 6) B. Glaser, P. Kesavan, M. Heyman, E. Davis, A. Cuesta, A. Buchs, C. A. Stanley, P. S. Thornton, M. A. Permutt, F. M. Matschinsky and K. C. Herold: *N. Engl. J. Med.* **338**, 226 (1998).
- 7) A. Mattevi, M. Rizzi and M. Bolognesi: *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 824 (1996).
- 8) J. Monod, J. Wyman and J. P. Changeux: *J. Mol. Biol.* **12**, 88 (1965).
- 9) M. L. Cardenas, E. Rabajille and H. Niemeyer: *Arch. Biochem. Biophys.* **190**, 142 (1978).
- 10) B. A. Connolly and I. P. Trayer: *Eur. J. Biochem.* **99**, 299 (1979).
- 11) A. Cornish-Bowden and M. L. Cardenas: *J. Theor. Biol.* **124**, 1 (1987).
- 12) A. E. Aleshin, C. Zeng, H. D. Bartunik, H. J. Fromm and R. B. Honzatko: *J. Mol. Biol.* **296**, 1001 (2000).
- 13) A. E. Aleshin, C. Zeng, H. D. Bartunik, H. J. Fromm and R. B. Honzatko: *J. Mol. Biol.* **282**, 345 (1998).
- 14) W. S. Bennett, Jr. and T. A. Steitz: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 4848 (1978).
- 15) K. Kamata, M. Mitsuya, T. Nishimura, J. Eiki and Y. Nagata: *Structure* **12**, 429 (2004).
- 16) K. J. Brocklehurst, V. A. Payne, R. A. Davies, D. Carroll, H. L. Vertigan, H. J. Wightman, S. Aiston, I. D. Waddell, B. Leighton, M. P. Coghlan and L. Agius: *Diabetes* **53**, 535 (2004).
- 17) F. M. Matschinsky: *Diabetes* **51**, S394 (2002).
- 18) J. Grimsby, R. Sarabu, W. L. Corbett, N. E. Haynes, F. T. Bizzarro, J. W. Coffey, K. R. Guertin, D. W. Hilliard, R. F. Kester, P. E. Mahaney, L. Marcus, L. Qi, C. L. Spence, J. Tengi, M. A. Magnuson, C. A. Chu, M. T. Dvorozniak, F. M. Matschinsky and J. F. Grippio: *Science* **301**, 370 (2003).
- 19) Y. Tanizawa, L. I. Koranyi, C. M. Welling and M. A. Permutt: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 7294 (1991).
- 20) S. Nishi, M. Stoffel, K. Xiang, T. B. Shows, G. I. Bell and J. Takeda: *Diabetologia* **35**, 743 (1992).
- 21) A. C. Storer and A. Cornish-Bowden: *Biochem. J.* **165**, 61 (1977).
- 22) M. A. Moukil and E. Van Schaftingen: *J. Biol. Chem.* **276**, 3872 (2001).
- 23) E. A. Davis, A. Cuesta Munoz, C. Buettger, I. Sweet, M. Moates, M. A. Magnuson and F. M. Matschinsky: *Diabetologia* **42**, 1175 (1999).
- 24) M. A. Moukil, M. Veiga da Cunha and E. Van Schaftingen: *Diabetes* **49**, 195 (2000).

プロフィール

鎌田健司 Kenji KAMATA
万有製薬つくば研究所蛋白質化学グループ
Protein chemistry, Tsukuba Research Institute, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.
〒300-2611 茨城県つくば市大久保3番地
3 Okubo, Tsukuba, Ibaraki 300-2611, Japan
e-mail: kenji_kamata@merck.com
専門分野: 構造生物学
現在の研究テーマ: 創薬ターゲットとなる蛋白質のX線結晶構造解析
趣味: テニス

長田安史 Yasufumi NAGATA
万有製薬つくば研究所代謝性疾患領域研究部
Metabolic Disorder Research Director, Tsukuba Research Institute, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.
〒300-2611 茨城県つくば市大久保3番地
3 Okubo, Tsukuba, Ibaraki 300-2611, Japan
e-mail: yasufumi_nagata@merck.com
専門分野: 酵素学
現在の研究テーマ: 糖尿病治療薬の基礎開発
趣味: 音楽鑑賞, 料理