【解説】

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体制御の構造生物学

廣政恭明

生体内には、一連の反応を触媒する酵素タンパク質が複合体を形成した、いわゆる酵素複合体が見られる。酵素複合体は、酵素タンパク質の集積化により効率的な機能の発現と制御を獲得し、生体内の環境変化への迅速な対応において重要な役割を果たしている。ここでは、5種の酵素が会合した総分子量約900万の巨大な酵素複合体である哺乳類ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体を取り上げ、酵素複合体の機能制御機構について解説する。

哺乳類ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 (pyruvate dehydrogenase complex: PDC) は、ミトコンドリア内に局在し、解糖系で生成されたピルビン酸をアセチル CoA に不可逆的に変換する^(1~7)。PDC のミトコンドリア内局在濃度は約 3 mg/ml (マウス心臓由来) にも達し、生体内の要求に応じて大量のアセチル CoA を TCA サイクルに供給することが可能である。この反応は、哺乳類ではグルコースからの解糖生成物を TCA サイクルに運ぶ唯一の経路であるため、PDC の調節は代謝制御の要である (図 1)。たとえば、グルコースおよびその前駆体の減少が生じ、糖の貯蔵レベルが下がると、PDC の活性は制御される。また、運動に対応するエネルギーの

需要増や、余剰の糖を脂肪酸に変換する場合、PDC の活性は上昇する。一方、代謝障害の一つである糖尿病では、PDC の機能は強く制御され、乳酸が蓄積しアシドーシスが生じる。また、がん細胞では、好氣的条件下においてエネルギーを解糖系から優先的に得ている (War-

図1 ■代謝経路とピルビン酸デヒドロゲナーゼ反応の調節
ピルビン酸デヒドロゲナーゼの反応は、解糖系、TCA サイクル、また脂肪酸代謝系との要である。ピルビン酸デヒドロゲナーゼの阻害 (PDK の活性化) をうすコバルト色点線で、活性化 (PDK の阻害) を濃コバルト色点線で示す。

Regulation of Mammalian Pyruvate Dehydrogenase Complex
Yasuaki HIROMASA, 米国カンザス州立大学

burg 効果)。このため、PDC を活性化して解糖生成物を TCA サイクルへシフトさせることにより、糖尿病では乳酸蓄積の緩和を、またがん細胞ではアポトーシスの誘導を目的として、多くの製薬会社により薬剤の開発が進められている⁽⁷⁻⁹⁾。

PDC の活性は、構成酵素の 1 つであるピルビン酸デヒドロゲナーゼ (pyruvate dehydrogenase: E1) のリン酸化による不活性化と、脱リン酸化による活性化で調節される⁽¹⁻⁷⁾。リン酸化を触媒するのはピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ (pyruvate dehydrogenase kinase: PDK) であり、脱リン酸化を触媒するのはピルビン酸デヒドロゲナーゼホスファターゼ (pyruvate dehydrogenase phosphatase: PDP) である。筆者らは、生体内における代謝状態やエネルギーの需要の変化が、いかにして PDK に伝達され PDC の活性を制御しているかに興味をもっている。近年、生化学的ならびに構造生物学的アプローチにより、PDC の機能発現と制御機構が分子レベルで明らかになってきた。本稿では、特に哺乳類 PDC の制御機構に焦点を当てて解説する。

PDC の機能と構造

まず、PDC の機能について述べよう。PDC が触媒する反応は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (pyruvate dehydrogenase: E1)、ジヒドロリポイルアセチルトランスフェラーゼ (dihydrolipoyl acetyltransferase: E2)、およびジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ (dihydrolipoamide dehydrogenase: E3) という 3 種の構成要素の連携によって果たされている (図 2)⁽¹⁻⁷⁾。

E1 はチアミンピロリン酸を利用してピルビン酸の脱炭酸を触媒する。その反応生成物は E2 のリポイルドメイン (LD) に存在する酸化型リポイル基に転移され、還元アセチルリポイル基が生じる。還元アセチルリポイル基は、E2 の活性部位に運ばれ、そのアセチル基は CoA へ転移され、アセチル CoA を生じる。脱アセチル化されたリポイル基は還元型リポイル基となる。還元型リポイル基は E3 の活性部位に運ばれ、E3 のジスルフィド結合によって酸化型リポイル基に再酸化される。還元されたジスルフィド結合は FAD で再酸化され、生じた FADH₂ は NAD⁺ により再酸化され、NADH を生じ、E3 は元に戻る。以上が、それぞれの酵素が分担している役割である。

特に、E2 のリポイル基は 3 つの酵素による連携の要となっている。すなわち、リポイル基による直接の反応生成物の受け渡しは、副産物の生成を抑え触媒効率を高めている。さらに、一連の PDC 反応に関わる酵素群が複合体を形成し集積することから、個々の酵素が単独に触媒反応する場合に比べると、大量の反応生成物を迅速に生産することが可能となっている。

次に、PDC の構造について述べよう。PDC の中心構造は E2 と E3 結合タンパク質 (E3 binding protein: E3BP) の複合体である⁽¹⁰⁻¹²⁾。E2 も E3BP も、ともに複数のサブユニット (同一ポリペプチド) の会合体である。E2 と E3BP のドメイン構造を図 3 に示す。E2 の C 末端領域には活性部位があり、他の E2 サブユニットまたは E3BP と相互作用する。一方、E3BP の C 末端領域は E2 と相同性を有し、E2 と相互作用する。しかし、触媒能はもたない。さらに、E2 には E1 との結合部位が、また

図 2 ■ ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の反応

図 3 ■ E2 と E3BP のドメイン構造と E2-E3BP 複合体モデル

E3BP には E3 との結合部位がある。

PDC の中心構造については、近年、議論の対象となっている。PDC の中心構造は、これまで 60 個の E2 ポリペプチドと 12 個の E3BP ポリペプチドの複合体だと考えられてきた。これは酵母 PDC をモデルにしたものである。これに対して、筆者らは、中心構造は 48 個の E2 ポリペプチドと 12 個の E3BP ポリペプチドから成る 60 分子複合体（正 12 面体構造）であることを提唱した（図 3）^(12~13)。それは、次のような観測結果に基づいている。ヒト E2 を大腸菌で発現させると、E2 だけの 60 分子複合体（正 12 面体構造）がつくられる。一方、ヒト E2 と E3BP を共発現させると、E2-E3BP 複合体がつくられる。この E2-E3BP 複合体は、E2 の場合と同じく正 12 面体である。超遠心分析と X 線小角散乱分析の結果、E2-E3BP 複合体は E2 複合体よりも分子サイズが小さいことがわかった。さらに、48 分子の E1 と 12 分子の E3 が、それぞれ E2-E3BP 複合体と会合することができる。最近、Chuang のグループは、超遠心分析と電気泳動分析の結果を基に、60 分子複合体の内訳は 40 個の E2 ポリペプチドと 20 個の E3BP ポリペプチドであると提起している⁽¹⁴⁾。

E2 ポリペプチドの N 末端には L1 および L2 と呼ばれる 2 つのリポイルドメインが存在する（図 3）。また、E3BP ポリペプチドの N 末端には L3 と呼ばれるリポイルドメインが 1 つ存在する。これらのリポイルドメインはいずれも、アラニン残基やプロリン残基を多く含む 20~30 アミノ酸残基から成るポリペプチド鎖で連結されている。その結果、フレキシブルな構造を形成し、これが反応中間体の構成酵素間の転移を可能にしている。PDK と PDP はリポイルドメインに結合する^(15~17)。

哺乳動物から精製された PDC では、E2-E3BP 複合体に 20~30 分子の E1、6~12 分子の E3、2~3 分子の PDK および PDP が結合している。PDK 活性は、フリーの E1 と比べると、E2-E3BP 複合体に会合した E1 のほうが数

百倍高い。すなわち、複合体を形成することにより数分子の PDK と PDP が代謝やエネルギー需要の変化に対応して効率よく E1 活性を制御している^(7, 18)。

PDK の構造

哺乳類には、これまで 4 種の PDK アイソザイムが見いだされ、クローニングされた順に番号を付けて PDK1~PDK4 と称される^(19~20)。PDK アイソザイムには局在性と機能制御に違いがある。このうち PDK2 が最も広く分布している。PDK は細胞質 Ser/Thr/Tyr キナーゼとは異なる Ser キナーゼに分類され、分子量はいずれも約 46 kDa、一次構造には約 65% の相同性がある⁽⁴⁾。PDK には C 末端ドメインと N 末端ドメインの 2 つのドメインがある。C 末端ドメインには、他の ATP 加水分解酵素と相同性を有する活性部位が存在する。一方、N 末端ドメインには、ピルビン酸結合部位やリポイル基結合部位などの調節部位が存在する。調節部位の相同性はアイソザイム間で差があり、これが制御機構の相違を反映すると考えられている⁽⁷⁾。

PDK1~PDK4、それらと基質やリガンドとの結合構造、ならびにリポイルドメインとの結合構造が X 線結晶構造解析により決定された^(21~25)。ここでは、特に筆者が携わってきたヒト PDK2 の構造について述べよう（図 4-A）⁽²³⁾。PDK2 の C 末端ドメインには活性部位が存在し、N 末端ドメインにはリポ酸結合部位ならびにピルビン酸結合部位が存在する。後に述べるが、これら 2 つの結合部位にリガンドが結合すると、活性部位にアロステリックな変化が誘導される。PDK2 は二量体であり、2 つのサブユニットは C 末端ドメインを介して接している。また、図 4-B に示すように、C 末端に存在するテール構造がもう一方のサブユニットに結合している。これをクロスアーム構造と称する。クロスアーム構造の先端の Trp383 は他方のサブユニットに埋まっている。この

図4 ■ PDK とエフェクター結合構造

(A) PDK (単量体) のドメイン構造と活性部位ならびにエフェクター結合部位を示す。 (B) PDK (二量体) 構造とリポイルドメイン (黄色) との結合構造、ならびにエフェクターとの結合構造を示す。 クロスアーム構造を含むC末端構造はリポイルドメインとの結合に重要である。 ADPとDCA (ジクロロ酢酸) を加えると、クロスアーム構造は消失し、リポイルドメインとの相互作用が失われる。

クロスアーム構造を含むC末端構造は、リポイルドメインとの結合に重要である。

PDC における PDK の移動

PDK は二量体であり、最大2個のリポイルドメインと同時に結合することが可能である⁽¹⁶⁾。 Roche らは、PDC 上に存在する20分子のE1が数分子のPDKで迅速にリン酸化されるのは Hand Over Hand 機構によるものとした^(4, 26)。 すなわち、PDK 全体がリポイルドメインとの解離・会合を繰り返しながら移動するのではなく、1つのサブユニットがリポイルドメインから解離しても、もう一方はリポイルドメインに結合したままという構造をとりながらPDC上を移動する (図5)。 この機構により、PDK はリポイルドメインから完全に解離することに比べ、迅速にE1間を移動することが可能になる。

PDC にはE2に96個、E3BPに12個で、計108個の

図5 ■ Hand over Hand 機構

PDK は、PDC 上においてリポイルドメインから完全に解離することなく、1つのサブユニットがリポイルドメインから解離しても、もう一方はリポイルドメインに結合したままという構造を繰り返して移動する。

リポイルドメインがある。 PDC の体積から計算すると、リポイルドメインの濃度はPDC中において1 mM 以上にもなる。 ヒトPDK2にATPやADPが結合するとリポイルドメインとの結合が弱められる⁽¹⁶⁾。 少なくとも3種のリポイルドメインとPDKとの相互作用には違いがある。 E1が存在するとリポイルドメインとPDK2の相互作用は高まる。 リン酸化されたE1が存在するとPDK

2との相互作用が弱まる。これらのことは、すべて、PDC 上において PDK が E1 間を迅速に移動するために不可欠なことだと推測される。

PDK の制御

解糖系や TCA 回路ならびに脂肪酸代謝の需要と供給、そしてエネルギー代謝の変化は、ピルビン酸、NADH、アセチル CoA、また、ADP+Pi の濃度変化をひき起こす (図 1)。これらの変化は、直接、あるいはリポイルドメインを介して間接的に PDK に伝えられる。前にも述べたが、PDK による E1 のリン酸化が E1 を不活性化し、PDC の活性を下げる。逆に、PDP による E1 の脱リン酸化が E1 を活性化し、PDC の活性を上げる^(4,7)。ここでは、さらに、PDK の活性化と不活化について述べよう。

1. PDK の活性化

飢餓などにより体内の糖貯蔵量が減少すると、脂質の酸化が糖に代わる主要なエネルギー源となる。そして、脂肪酸やケトン体の使用が増加すると、NADH/NAD 比とアセチル CoA/CoA 比が増加する (図 1)。図 2 に示すように、E2 と E3 が触媒する反応は可逆である。NADH が増加すると、E3 の逆反応により酸化型リポイル基は還元される。さらに、アセチル CoA が増加すると、E2 の逆反応によりアセチル CoA のアセチル基が、還元型リポイル基に転移され、還元アセチルリポイル基を生じる。E1 は不可逆反応なので、還元アセチルリポイル基は PDC 中に蓄積する。この還元アセチルリポイル基が蓄積すると、E1 は生成物阻害を受けるとともに、PDK と強く結合して PDK を活性化する。

筆者らは、ヒト PDK2 と PDK3 の活性化機構を調べた^(16,18,27)。PDK2 とリポイルドメインとの相互作用は、代謝状態の変化を反映したリポイル基の化学状態に依存する。すなわち、(酸化型リポイル基)<(還元型リポイル基)<(還元アセチルリポイル基)の順に相互作用が強くなる。リポイルドメインとの相互作用が強くなると、PDK2 は PDC 上において E1 へのアクセスが容易となる。また、還元アセチルリポイル基との結合は PDK2 をアロステリックに活性化する。すなわち、還元アセチルリポイル基がリポ酸結合部位に結合すると、活性部位の構造が変化し、キナーゼ活性の反応生成物である ADP の解離が速まり、PDK2 の活性は上昇する。PDK3 では、アロステリック効果はさらに顕著である。

2. PDK の不活性化

解糖系に十分な量の糖が供給されると、ピルビン酸濃度が上がる。また、運動で生じるリン酸ポテンシャルの低下は ADP+Pi 濃度を上げる。ピルビン酸と ADP+Pi は、PDK2 のエフェクターであり、PDK2 を不拮抗的に阻害する⁽²⁸⁾。Trp 残基の蛍光を指標としてエフェクターと PDK2 の相互作用を調べた結果^(29~31)、ピルビン酸と ADP が特に協同的に PDK2 と相互作用することを見いだした。PDK2 と ADP との相互作用はピルビン酸の添加により約 8 倍強くなり、PDK2 とピルビン酸との相互作用は ADP の添加により 150 倍強くなる。ADP との相互作用の増加は、キナーゼ活性の反応生成物である ADP の活性部位からの解離を遅くするため、PDK2 のキナーゼ活性を抑制する。さらに、ADP とピルビン酸との相互作用により、PDK2 とリポイルドメインとの結合が解離する。そこで、体内のピルビン酸濃度が上昇すると PDK2 は ADP と協同的に結合し PDC から離れる。その結果、PDK2 が不活性化される。

このような制御の仕組みは構造解析からも明らかになった⁽²⁹⁾。PDK2 には 3 つの Trp 残基がある。Trp 変異体を使った実験から、蛍光の変化は C 末端テールに存在する Trp383 に由来していることがわかった。Trp383 はクロスアーム構造の先端に存在し、他方のサブユニットに埋まっている。ピルビン酸の類似体であるジクロロ酢酸 (dichloroacetic acid : DCA) と ADP の共結晶構造から、クロスアーム構造は消失して活性部位が狭まっていることがわかる。したがって、ADP とピルビン酸が結合すると C 末端のクロスアーム構造が消失し、リポイルドメインとの相互作用が失われると考えられる。さらに、活性部位構造の狭まりが PDK2 と基質との相互作用を抑制することも示唆される。

PDK を標的とした医薬の開発

糖尿病患者では PDK4 が顕著に発現しており、その結果、PDC の活性が低下し、ピルビン酸や乳酸の蓄積もたらされている^(3,32)。そこで、PDK の活性を抑制して PDC の活性を上げる方策が試みられている。また、がん細胞の増殖を抑えるために、Warburg 効果を阻害し、解糖系から TCA サイクルに代謝をシフトさせ、アポトーシスを誘導する方法が議論されている⁽⁹⁾。PDK は、PDC の活性化を目指す医薬の開発現場では重要な標的の一つとなっている。

PDK の阻害剤の標的部位は、①リポイル基結合部位、②ピルビン酸結合部位、および③活性部位である。①に

については、Novartis 社の Novartis 3r や、Astra Zeneca 社の AZD7545 は還元アセチルリポアミド基をモデル化合物とし、PDK と PDC の会合を阻害する目的で開発された^(33, 34)。しかし、これらの薬剤には、還元アセチルリポアミド基の場合と同様、アロステリック効果による PDK の活性化も見られる^(21, 25, 34)。②については、これまで DCA が使用されてきたが、PDK アイソザイムによって感受性に差があるので、限定的な効果しか得られていない^(18, 35)。PDK2 が最も感受性が高いが、他の PDK に対しては感受性が高くない。神経毒性があることも使用が制限されている理由の一つである^(36~38)。

今後の展望

この 10 年間に、PDK による PDC 制御のメカニズムに関して、生化学的ならびに構造生物学的理解が著しく深まった。特に PDK については結晶構造解析による知見が多く発表され、リガンドとの相互作用とその構造変化が分子レベルで明らかになった。一方、構造解析データではうまく説明できない現象が多く存在する。これは、結晶構造という特定条件下だけの静的情報では、生化学実験において得られる動的な構造変化をとらえることが困難なことを示している。今後、動的な構造変化への理解が深まれば、PDC 研究において学術面のみならず、医薬開発などの応用面に大きく寄与することが期待される。

謝辞：本稿で紹介した研究結果は、米国カンザス州立大学 Thomas E. Roche 教授の研究室において行なわれたものです。心から感謝申し上げます。また、本解説を執筆するにあたり、共同研究者の九州大学農学研究科 麻生陽一教授に深謝申し上げます。

文献

- 1) P. J. Randle : *Biochem. Soc. Trans.*, **14**, 1799 (1986).
- 2) M. S. Patel & T. E. Roche : *FASEB J.*, **4**, 3224 (1990).
- 3) M. C. Sugden, K. Bulmer & M. J. Holness : *Biochem. Soc. Trans.*, **29**, 272 (2001).
- 4) T. E. Roche, J. C. Baker, X. Yan, Y. Hiromasa, X. Gong, T. Peng, J. Dong, A. Turkan & S. A. Kasten : *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **70**, 33 (2001).
- 5) L. J. Reed : *J. Biol. Chem.*, **276**, 38329 (2001).
- 6) M. S. Patel & L. G. Korotchkina : *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, 217 (2006).
- 7) T. E. Roche & Y. Hiromasa : *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 830 (2007).
- 8) R. M. Mayers, B. Leighton, R. J. Butlin & E. Kilgour : *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 367 (2005).
- 9) K. Garber : *Science*, **312**, 1158 (2006).
- 10) T. J. Thekkumkara, L. Ho., I. D. Wexler, G. Pons, T.-L. Lui & M. S. Patel : *FEBS Lett.*, **240**, 45 (1988).
- 11) R. A. Harris, M. M. Bowker-Kinley, P. Wu, J. Jeng & K. M. Popov : *J. Biol. Chem.*, **272**, 19746 (1997).
- 12) Y. Hiromasa, T. Fujisawa, Y. Aso & T. E. Roche : *J. Biol. Chem.*, **279**, 6921 (2004).
- 13) X. Yu, Y. Hiromasa, H. Tsen, J. K. Stoops, T. E. Roche & Z. H. Zhou : *Structure*, **16**, 104 (2008).
- 14) C. A. Brautigam, R. M. Wynn, J. L. Chuang & D. T. Chuang : *J. Biol. Chem.*, **284**, 13086 (2009).
- 15) T. E. Roche, Y. Hiromasa, A. Turkan, X. Gong, T. Peng & J. Dong : *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1050 (2003).
- 16) Y. Hiromasa & T. E. Roche : *J. Biol. Chem.*, **278**, 33681 (2003).
- 17) A. Turkan, Y. Hiromasa & T. E. Roche : *Biochemistry*, **43**, 15073 (2004).
- 18) J. C. Baker, X. Yan, T. Peng, S. A. Kasten & T. E. Roche : *J. Biol. Chem.*, **275**, 15773 (2000).
- 19) R. Gudi, M. M. Bowker-Kinley, N. Y. Kedishvili, Y. Zhao & K. M. Popov : *J. Biol. Chem.*, **270**, 28989 (1995).
- 20) J. Rowles *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **271**, 22376 (1996).
- 21) M. Kato, J. Li, J. L. Chuang & D. T. Chuang : *Structure*, **15**, 992 (2007).
- 22) C. N. Steussy, K. M. Popov, M. M. Bowker-Kinley, R. B. Sloan, R. A. Harris & J. A. Hamilton : *J. Biol. Chem.*, **276**, 37443 (2001).
- 23) T. R. Knoechel, A. D. Tucker, C. M. Robinson, C. Phillips, W. Taylor, P. J. Bungay, S. A. Kasten, T. E. Roche & D. G. Brown : *Biochemistry*, **45**, 402 (2006).
- 24) S.-C. Tso, R. M. Wynn & D. T. Chuang : *EMBO J.*, **24**, 1763 (2005).
- 25) R. M. Wynn, M. Kato, J. L. Chuang, S. C. Tso & D. T. Chuang : *J. Biol. Chem.*, **283**, 25305 (2008).
- 26) S. Liu, J. C. Baker & T. E. Roche : *J. Biol. Chem.*, **270**, 793 (1995).
- 27) H. Bao, S. A. Kasten, X. Yan, Y. Hiromasa & T. E. Roche : *Biochemistry*, **43**, 13442 (2004).
- 28) H. Bao, S. A. Kasten, X. Yan & T. E. Roche : *Biochemistry*, **43**, 13432 (2004).
- 29) Y. Hiromasa, L. Hu & T. E. Roche : *J. Biol. Chem.*, **281**, 12568 (2006).
- 30) Y. Hiromasa & T. E. Roche : *Biochemistry*, **47**, 2298 (2008).
- 31) Y. Hiromasa, X. Yan & T. E. Roche : *Biochemistry*, **47**, 2312 (2008).
- 32) R. A. Harris, B. Huang & P. Wu : *Adv. Enzyme Regul.*, **41**, 269 (2001).
- 33) T. D. Aicher, R. E. Damon, J. Koletar, C. C. Vinluan, L. J. Brand, J. Gao, S. S. Shetty, E. L. Kaplan & W. R. Mann : *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 2223 (1999).
- 34) J. A. Morrell, J. Orme, R. J. Butlin, T. E. Roche, R. M. Mayers & E. Kilgour : *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 1168 (2003).
- 35) M. M. Bowker-Kinley, W. I. Davis, P. Wu, R. A. Harris & K. M. Popov : *Biochem. J.*, **329**, 191 (1998).
- 36) R. Katz, C. N. Tai, R. M. Diener, R. F. McConnell & D. E. Semonick : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **57**, 273 (1981).
- 37) H. M. Yang & M. E. Davis : *Toxicology*, **124**, 63 (1997).
- 38) M. K. Smith, J. L. Randall, E. J. Read & J. A. Stober : *Teratology*, **46**, 217 (1992).