

Hexosaminidase Aのミスセンス変異による立体構造への影響

Tay-Sachs病の原因となるHexosaminidase Aの遺伝子変異による立体構造への影響を解析した例をご紹介します。170番目のアルギニンがヒスチジンに変異した例では、ドメイン間の水素結合が消失することにより、タンパク質立体構造の安定性がなくなること、また、178番目のアルギニンがヒスチジンに変異した例では、基質アナログであるリガンドとの水素結合が消失することにより、基質との結合に影響を及ぼすことが推測されました。

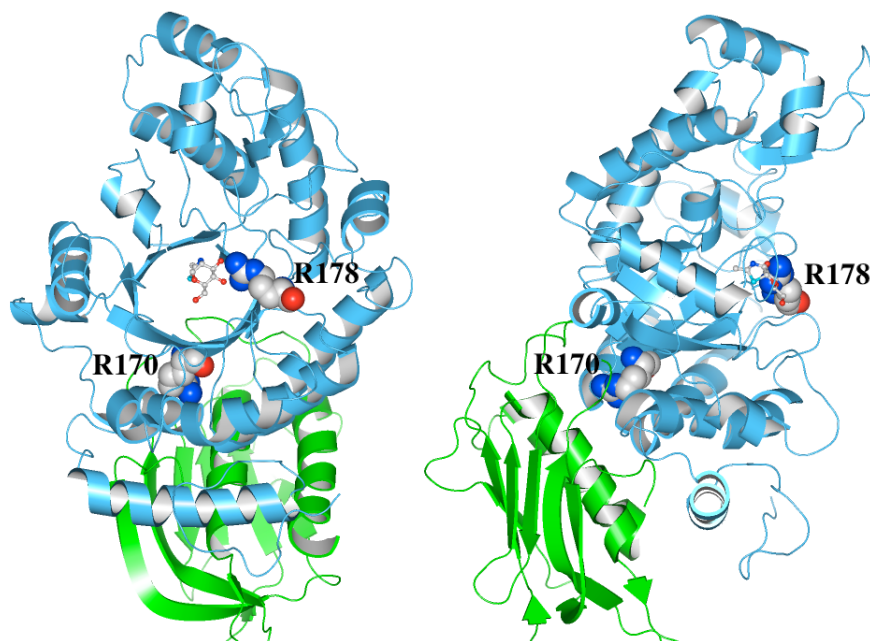


図1 HexA αサブユニットでの変異の位置 左図は正面から、右図は側面から表示

1. 立体構造データの入手

ヒトHexosaminidase A (HexA)の立体構造は、Protein Data Bankより入手(PDB ID:2GK1)しました。

2. 立体構造上の変異の位置

図1にHexAのαサブユニットの立体構造上で、ミスセンス変異が見られた170番目のアルギニン(R170)及び178番目のアルギニン(R178)の位置を示します。HexA αサブユニットには、N末端側のドメインI（緑で表示）と、C末端側のドメインII（水色で表示）の2つのドメインが存在します。R170はドメインIIにあり、ドメインIと結合しています。また、R178は、基質結合ポケットに存在し、リガンドの結合に関与しています。

3. 変異体モデルの作成

野生型HexAの立体構造をテンプレート構造として、R170をHに置換した立体構造モデル及びR178をHに置換した立体構造モデルをSWISS-MODELを使用して作成しました。

4. 変異の影響 野生型の立体構造と変異体モデルの立体構造の比較

Waalsを使用して、作成した変異体モデルの立体構造について、ミスセンス変異が起こったアミノ酸残基の周辺構造を調べました。

・ R170Hによる立体構造への影響 立体構造の不安定化

野生型の立体構造（左）とR170H変異体モデルの立体構造（右）を図2に示します。野生型のR170はドメインII（水色）に存在し、立体構造上では、ドメインI（緑色）に隣接しています。

図3に、野生型のR170と置換したH170の周辺構造を示します。野生型では、R170の側鎖はE114, F167の側鎖およびK197の主鎖と計4つの水素結合が推察されました。そのうち3つの水素結合はドメインIに存在するアミノ酸残基E114, F167との間で形成されています。一方、R170H変異体モデルでは、H170とこれらの残基との間に水素結合はみられませんでした。

野生型のR170はドメインII（水色）とドメインI（緑色）との間の相互作用に関与する残基と推察されます。特に、正電荷をもつR170の側鎖とドメインIの負電荷をもつE114の側鎖とは、静電相互作用による結合と推察され、ドメイン間の結合に大きく寄与していると考えられます。R170からH170のアミノ酸置換により、野生型では4つあったこれらの相互作用が全て消失するとが推察されました。この変異によりドメイン間の相互作用の消失による立体構造の不安定化が予測されます。本変異を持つ患者の細胞では、成熟型HexA α サブユニットの量が減少していることがWestern blottingにより確認され、本変異による立体構造の不安定化と関連づけられました。

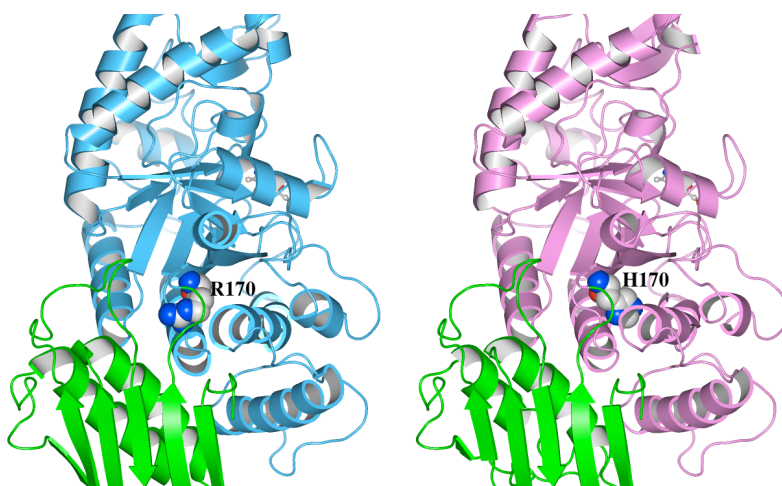


図2 HexA α サブユニットの野生型とR170H変異体モデルの立体構造

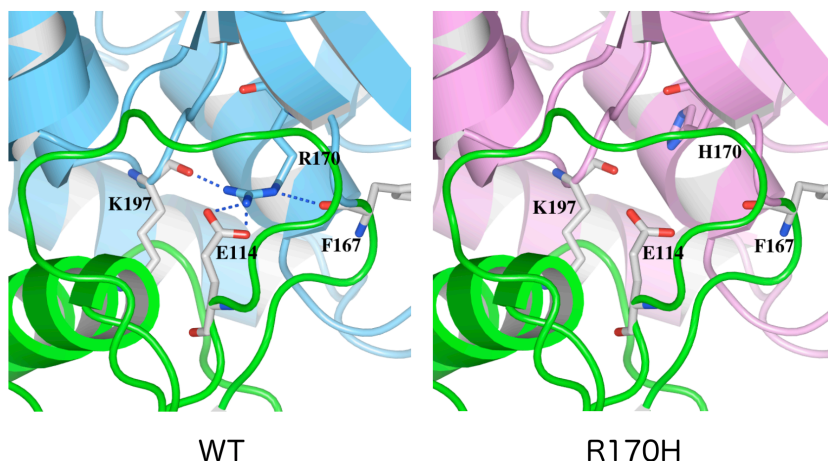


図3 R170Hの変異による近傍の残基との水素結合の変化

・ R178Hによる立体構造の変化 リガンドとの水素結合の消失

野生型の立体構造（左）とR178H変異体モデルの立体構造（右）を図4に示します。野生型では、R178の側鎖は基質結合のポケットの内側に向いており、基質結合に寄与している残基とされています。図5に示すように、野生型では、R178と基質アナログであるリガンドNGTとの間に2つの水素結合が推察されました。これらの水素結合が基質結合に関与していると考えられます。一方、R178H変異体モデルでは、リガンドの酸素とH178の間の距離はいずれも3.7Å以上あり、水素結合が消失していることが推測されました。

この結果より、本変異は、基質との水素結合を消失させ、基質との結合に影響を及ぼすことが予測されました。また、本変異による周辺のアミノ酸残基への影響は見られませんでした。以上の結果は、本変異を持つ変異体タンパク質が、残存活性はあるものの、Km値が30倍増大するという実験結果を支持していると考えられました。

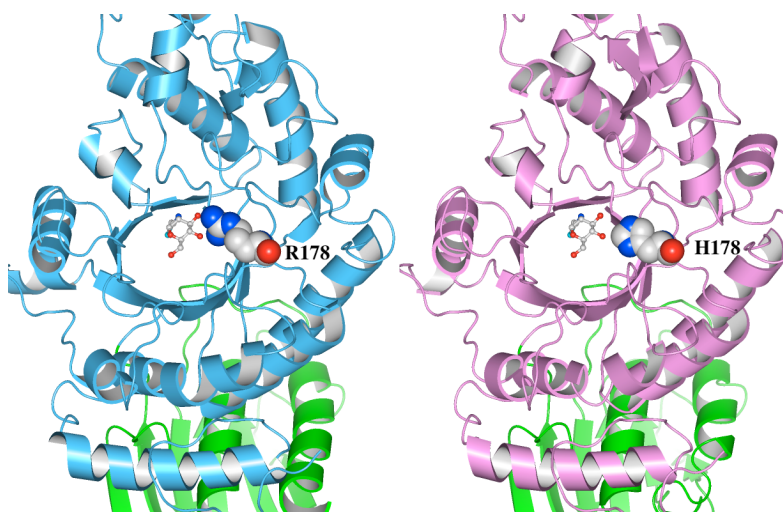


図4 HexA α サブユニットの野生型（左）とR178H変異体モデル（右）の立体構造

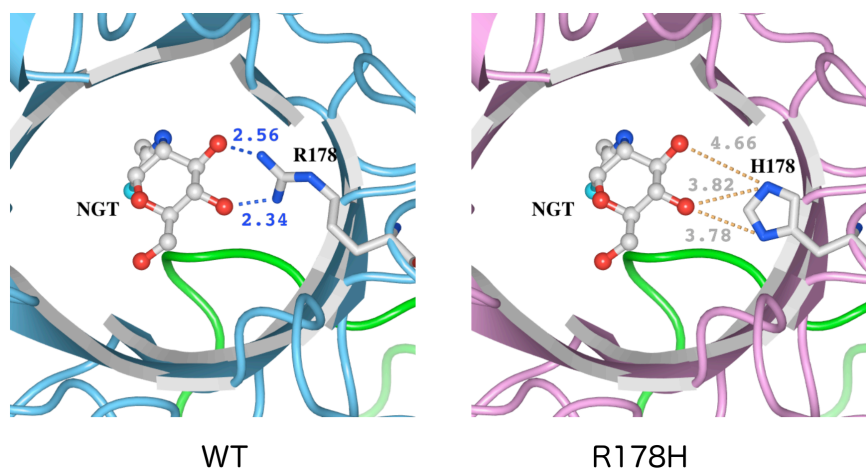


図5 R178Hの変異によるリガンドとの水素結合の変化

これら2つの変異は、どちらもアルギニンからヒスチジンへの変異であり、アミノ酸配列上の位置は8残基しか違いませんが、立体構造に及ぼす影響は大きく異なります。このように、ミスセンス変異による立体構造への影響を調べることにより、実験結果と合わせて変異の影響をより深く考察することができると考えられます。

参考文献

Structural basis of the GM2 gangliosidosis B variant. Matsuzawa F, Aikawa S, Sakuraba H, Lan HT, Tanaka A, Ohno K, Sugimoto Y, Ninomiya H, Doi H. J Hum Genet. 2003;48(11):582-9.