

理論と実験を統合した代謝性制御性アミノ酸の結合タンパク質との相互作用解析

藤田 卓*

Theoretical and Experimental Analysis of the Interaction between Metabolically Controlled Amino Acids and Their Binding Proteins

Suguru FUJITA*

Ectopic lipid accumulation and elevated LDL cholesterol are linked to metabolic diseases. We previously found that amino acid X regulates hepatic lipid metabolism via binding to its partner protein. This study integrated AlphaFold-based prediction, MD-supported docking, and binding assays to identify domain-specific interactions between protein A and amino acid X, highlighting domain 3 as essential for binding. These findings support future design of compounds that modulate this interaction to jointly suppress fatty liver and LDL elevation.

1. 研究の背景と目的

肝臓や骨格筋・膵臓など本来溜まるはずのない臓器に脂肪が蓄積する異所性脂肪や、血中のLDLコレステロール(LDL-Cho)量が増加する脂質異常症(高脂血症)は、糖尿病や肝硬変、循環器系疾患など生活習慣病への進行との関連性が指摘されている。これらの脂質代謝異常を予防することは健康寿命の延伸を目指す日本にとって重要な研究課題である。所属研究室において、単一のアミノ酸量を少なくした餌に異なる単一のアミノ酸(アミノ酸X)を添加した食事を給餌したラットの肝細胞において、アミノ酸Xが脂質代謝を調節していたことを明らかにした¹⁾。その他の実験結果を合わせると、アミノ酸Xがアミノ酸X結合タンパク質と結合することにより始まるシグナル伝達が、脂肪肝形成(異所性脂肪)を抑制する一方で、血中LDL-Cho(脂質異常)を増加させる相反的な代謝制御を行っていることが予想される(論文投稿中)。したがって、アミノ酸X結合タンパク質と結合し代謝制御を最適化する化合物を探索することは、脂肪肝形成、血中LDL-Choいずれも抑制する薬剤候補の提案につながる(図1)。本研究では、アミノ酸Xがタンパク質のどの部位に結合しうるのかを、理論と実験の両面から研究を行った。

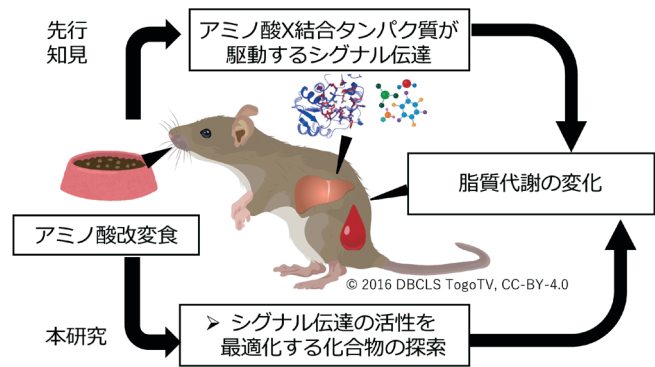


図1 アミノ酸Xが駆動する脂質代謝調節。

2. 結合予測

まず、所属研究室において取得されていたアミノ酸X結合タンパク質のうち、1つに標的を絞った。このタンパク質Aは3つの構造ドメインを天然変性領域(IDR)が結ぶ構造を持つ。そこで、タンパク質Aのどの部位に結合するかを判断するため、AlphaFold3(AF3)²⁾を用いた化合物とタンパク質の複合体予測を行った(図2)。ここで、AF3は独自のアルゴリズムによって算出される結合の妥当性や立体構造の信頼度をもとに、複数の予測候補を出力することと、その出力にはランダム性を含むことを考慮し、計2,500の複合体予測を行った。その後、アミノ酸Xの結合部位によってクラスタリングを行い、結合の指標を算出する

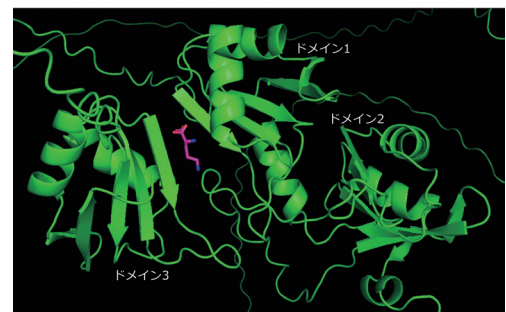


図2 タンパク質A(緑)とアミノ酸X(紫)の結合予測。

2026年3月1日 受理

* 豊田理研スカラー

東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学専攻

ことで予測した複合体構造の妥当性を評価した。結合の指標は、結合の妥当性、立体構造の信頼度、クラスター中の占有率の重みつき線形和によって算出される。ややアドホックな指標ではあるが、この結合の指標が高い構造群の中には、タンパク質Aのドメイン1とドメイン3の間にアミノ酸Xが挟まるように位置し、相互作用しうる結合様式を示していた。そこで、まずドメイン1とドメイン3が結合には必要であると仮説を立て、次のような実験を行った。

3. 結合実験による検証と新規の結合予測

2. 結合予測の検証のため、ドメイン1とドメイン3をそれぞれ欠損させたプラスミド、または同胞を欠損させたプラスミドを用いて、Flagタグ付きタンパク質AをHEK293T細胞に過剰発現させた。これらの細胞抽出液をアミノ酸Xビーズを反応させ、アミノ酸Xで溶出、Flag抗体を用いたImmunoblottingに供した(図3)。図3では、inputはタンパク質量、beadsはその中でアミノ酸Xと結合したタンパク質量を表す。Flag-タンパク質A、Flag- $\Delta 3$ は同程度の発現が認められたが、アミノ酸Xビーズとの結合量はFlag- $\Delta 3$ で減少していた(図3)。また、Flag- $\Delta 1$ とFlag- $\Delta 1\Delta 3$ は同程度発現していたが、ビーズとの結合量はFlag- $\Delta 1\Delta 3$ で減少していた(図3)。これらの結果は、ドメイン1を欠損してもアミノ酸Xと結合すること、ドメイン3を欠損するとアミノ酸Xと結合しなくなることを示している。補助的な実験として、ドメイン3単体を過剰発現した系も作成し同様の実験を行ったところ、ドメイン3単体でアミノ酸Xと結合することを示した。したがって、結合予測ではドメイン1とドメイン3に挟まる結合様式を考えていたが、ドメイン3単体で十分に結合することを実証した。

次に、ドメイン3単体とアミノ酸Xがどの残基に結合するか、詳細な結合様式の予測を行った。上述のAF3の結果は偽陽性が多いと判断し、AF2とドッキングシミュレーションを用いた。この際、ドメイン3の多様な立体構造を考慮するため、MDシミュレーションによって500 ns、50,000のスナップショットを取得し、主成分分析の結果をもとに代表構造40個をテンプレートとした。その結果、ドメイン3のアミノ酸Xと相互作用する2つの残基を抽出した。これらの残基のうち片方は他のドメインでは置換されていること、これらの残基周辺にリン酸化部位があることなどから、非常に興味深い残基部位であった。現在、過剰発現の実験系をもとにドメイン変異体の作成と結合実験を進めているところである。

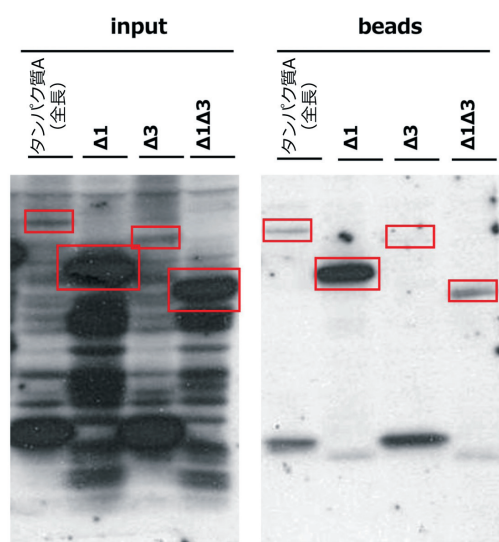


図3 ドメイン欠損タンパク質Aとアミノ酸Xの結合実験。

4. まとめと今後の展望

今回、脂質代謝を調節することが知られているアミノ酸を例に、結合タンパク質とその詳細な結合様式の同定を理論と実験を統合することで試みた。本研究では、少なくともタンパク質中のドメイン特異的な結合を明らかにすることができたが、依然として詳細な結合様式の同定には至っていない。しかしながら、本研究で用いた手法を継続的に行うことで、過剰な実験を行う必要なく、理論的な仮説とその検証実験のサイクルを繰り返すことで効率よく目的を達成できると考えられる。さらに、詳細な結合様式の同定後、結合を促進または阻害する化合物やペプチドの設計³⁾を予定している。このように本研究の手法が一般化されることで、特別な機器や大型の予算などを必要とせず、小規模の計算機と実験系で生理的に機能する物質の創出が可能になるのではないかと期待している。

REFERENCES

- 1) H. Nishi, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.*, **775** (2025) 152076.
- 2) J. Abramson, *et al.*, *Nature*, **630** (2024) 493-500.
- 3) F. Opo, *et al.*, *Sci Rep.*, **11** (2021) 4049.