

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20570072

研究課題名（和文）

テトラヒメナのアルギニンキナーゼの構造、機能、及び進化に関する研究

研究課題名（英文）

Structure, function and evolution of arginine kinase from *Tetrahymena piriformis*

研究代表者

鈴木 知彦 (SUZUKI TOMOHIKO)

高知大学・教育研究部自然科学系・教授

研究者番号：60145109

研究成果の概要（和文）：テトラヒメナ (*Tetrahymena pyriformis*) に2種類のアルギニンキナーゼ (AK1, AK2) が発現していることを示すとともに、その酵素学的性質と細胞内での局在を明らかにした。AK1 及び AK2 の抗体を用いたウェスタンブロット法、また免疫蛍光抗体法により、AK1 が繊毛内に局在していることを明確にした。局在を促進しているのは、AK1 の N 末端に結合する可能性が高いミリストイル基ではないかと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Two arginine kinases (AK1 and AK2) of *Tetrahymena pyriformis* were characterized based on their structural and enzymatic properties. The AK2 had an unusual two-domain structure with two active sites in a molecule. Intracellular localization of the two AKs was examined by using Western blotting and immunofluorescence technique, and the AK1 was identified unambiguously to localizing in cilia. On the other hand, AK2 appears to be distributed widely in cell body. We suggest that the localization of AK1 in cilia is promoted by putative myristoylated group of AK1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：代謝生理

1. 研究開始当初の背景

アルギニンキナーゼ (AK) はフォスファゲンキナーゼ (PK) の一種である。PKは、ATPとグアニジン化合物からフォスファゲンとADPを合成する反応を可逆的に触媒し、エネルギー需要が高い組織（筋肉、脳、神経系、鞭毛など）に多く発現している。フォスファゲ

ンは高エネルギーリン酸・グアニジン化合物の総称で、ATPの急激な消費に対して速やかにADPからATPの再生を可能とし、エネルギーの緩衝剤として重要な働きを担う。

PKの分布は生物学的に興味深い話題であり、古くから研究対象とされてきた。すべての脊椎動物及び一部の無脊椎動物には、PKとして

クレアチンキナーゼ(CK)が含まれている。一方、節足動物や軟体動物等、多くの無脊椎動物においてはAKが含まれる。特に興味深いのは環形動物内の分布で、この動物門（及び近縁の動物門）においては、CK, AKに加えて、グリコシアミンキナーゼ (GK), ロンブリシンキナーゼ (LK), タウロシアミンキナーゼ (TK) 等、これまでに発見されているすべてのPKが分布している。環形動物門においてのみPKに著しい多様化が起こった理由は、興味ある謎である。

1970年にWatts & Bannisterは、テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) に分子量の異なる二種類のAKが含まれることを示した。また我々は、*T. thermophila*のゲノムデータベースを徹底的にサーチし、ゲノム配列から二種類のAKアミノ酸配列を抽出した。眠り病の原因となる原生生物 *Trypanosoma* にもAKが含まれている報告があるが、このAKは *Trypanosoma*の宿主であるサシバエの遺伝子が水平移動したものと推定されている。

このように、この酵素群の遺伝子は著しい変化を遂げており、それが結果として、酵素の多様化を生み、各種アイソフォームや異常なドメイン融合型酵素等の出現を生んでいる。

さて、原生生物テトラヒメナ (*Tetrahymena pyriformis*) の繊毛運動を持続させるためには、ATPの連続的な供給が必要である。現在のところ、それはアルギニンキナーゼ (AK) を介した「アルギニンリン酸シャトル」機構によって維持されていると考えられている。この研究では、この酵素の構造 (cDNA配列及びゲノム配列決定)、機能及び進化を明らかにするとともに、2種類のAKアイソフォームの細胞内分布の特徴を探る。

2. 研究の目的

我々は *T. thermophila* には2種類のAK遺伝子が存在していることをゲノムレベルで明らかにしたが、実際に両遺伝子がテトラヒメナの中で発現しているかどうかは、不明である。一方、2001年Noguchiは、ゾウリムシの表層シートを調整し、繊毛の運動のために必要なATPが「アルギニンリン酸シャトル」によって供給されることを生理学的に示し

た。このためには、ゾウリムシの繊毛にAKが実際に存在していることが前提だが、その直接的な証拠はまだ得られていない。

これらのことを踏まえて、この研究では、*T. pyriformis* を材料にして、原生生物由来のAK遺伝子 (mRNA) の発現を初めて確認するとともに、そのcDNA及びゲノム配列を決定する。また、大腸菌内でAK遺伝子を発現させてリコンビナント酵素を得る。更に、その酵素機能を詳細に測定し、他のAKとの比較から原生生物のAKの特性を明らかにする。*T. thermophila* 及び *T. pyriformis* のAKのアミノ酸配列から、AKの繊毛内の微小管等への結合の可能性を推定し、「アルギニンリン酸シャトル」の存在を補強する。2種類小野AKが、部位特異的に分布している可能性も探る。

一方、原生生物の酵素機能の決定は、AK機能の初期進化に関して重要な知見を与える。現在、原生生物のAKの酵素特性は不明であり、単細胞生物でのこの酵素の機能解明は興味深い。

3. 研究の方法

(1) *Tetrahymena pyriformis* の mRNA の抽出、AK cDNA の PCR 増幅、及びプラスミドへのクローニングは、定法に従って行う。

(2) 原生生物ではコドンの使用が異なる。大腸菌内での発現のために、AK 遺伝子へ適切な変異導入を PCR を用いて導入する。

(3) リコンビナント酵素の発現と詳細な酵素活性の測定は、従来の方法によって行う。

(4) 2種類のAKアイソフォームの細胞内局在の解明は、抗体を用いたウエスタンブロット法や免疫蛍光法で行う。

(5) AK機能の初期進化を探る目的から、バクテリアAK様酵素の遺伝子クローニングとそのリコンビナント酵素の機能特性の解明を行う。

これらの研究の多くの部分は、研究分担者と共同で行う。研究分担者は同じ研究室に所属しており、日常的に議論を進める。

4. 研究成果

(1) *T. pyriformis* から mRNA を抽出し、フォスファゲンキナーゼのコンセンサス配列

に基づいたプライマーを用いた PCR 法により二種類の AK cDNA を増幅した。増幅産物は、プラスミド pGEM ヘクローニングした。AK1 は分子量 40 kDa の通常の大きさを持つ AK 酵素であったが、AK2 は遺伝子重複と融合により生じたと考えられる 2 ドメイン型酵素 (80 kDa) であった。AK 遺伝子の進化では、2 ドメイン型酵素は、独立に、複数回生じていることが分った。

(2) 原生生物の遺伝子では、Gln のコドンが、終止コドンで代用されている。従って、原生生物のタンパク質を大腸菌で発現させるためには、このコドンを通常のものに変異させる必要がある。 *T. pyriformis* AK1 には 1 カ所、2 ドメイン型 AK2 のドメイン 1 に 2 カ所、ドメイン 2 に 3 カ所の Gln のコドンがあるので、これらを通常のコドンに変異させた。更に、C 末に His タグ (6 x His) を付加したリコンビナント酵素として発現させるために、pET30-b ベクターへ乗せ換えた。

(3) *T. pyriformis* からゲノムを抽出し、イントロン領域を PCR 増幅し、最終的に 2 種類の AK 遺伝子のエキソン/イントロン構造を明らかにした。

(4) テトラヒメナの 2 種類の AK の野生型リコンビナント酵素を可溶性酵素として得ることができた。また、AK2 (2 ドメイン型酵素) については、切り離れたドメイン (ドメイン 1 及び 2) についても可溶化したリコンビナント酵素として得ることができた。

(5) テトラヒメナ AK1, 及び AK2 のドメイン 1 部分を用いて、これらを抗原としたマウス・ポリクローナル抗体を作製した。これらの抗体を用いてウエスタンブロットにより、2 種類の AK 酵素の細胞内局在を調べた。テトラヒメナの繊毛を取り除いた細胞体から抽出したタンパク質プールでは、AK2 が強く検出され、AK1 はほとんど検出されなかった。一方、ジブカイン処理によって単離された繊毛から抽出したタンパク質プールでは、AK2 は検出されず、AK1 が強く検出された。これらの結果から、AK1 は繊毛に局在しているこ

とが明らかになった。この結果は、免疫蛍光染色法によって可視化して確かめた。

(6) 二種類の AK の機能を比較するために、C 末に His タグを付加しリコンビナント酵素を用いて、両者の酵素活性を詳細に比較した。2 ドメイン型の AK2 に対しては、ドメイン 1 と 2 に分離した酵素も作成して酵素活性を測定した。AK2 の各ドメインは単独でも活性を示し、また、触媒効率 ($k_{cat}/K_d^{Arg} \cdot K_m^{ATP}$ 値) の比較から、ドメイン間に相互作用があることが示唆された。一方、AK1 と AK2 の触媒効率を比較すると、AK1 が約 1.5 倍程度高い値を示し、AK1 の方がより効率的な酵素であると考えられた。従って、両酵素は、局在する場所に応じた酵素機能を持つと言える。

AK1 のリコンビナント酵素は構造的に不安定らしく、信頼性のある酵素パラメータを出すには時間を要した。AK1 は、ウエスタンブロットや免疫蛍光染色法の結果から、繊毛に局在していることが明らかになっている。そこで、AK1 のアミノ酸配列を詳細に検討した結果、N 末にミリストイル基結合シグナルが存在することが明らかとなった。即ち、AK1 の N 末端のグリシンにミリストイル基が結合する可能性が強く示唆されたのである。従って、AK1 は疎水的なミリストイル基を介して繊毛膜に結合し、構造的にも安定化している可能性がある。今後、AK1 におけるミリストイル基の存在の実証、テトラヒメナでミリストイル化を触媒する酵素 (N-ミリストイル・トランスフェラーゼ) のクローニングが課題となった。また、ミリストイル基の存在下、及び非存在下における AK1 酵素機能の差異等を明らかにしていくことも重要である。

(7) 「AK1 の N 末端に存在する疎水的なミリストイル基が AK1 の繊毛膜への局在を促進しているのではないか」という作業仮説に基づき、これを実証していくための基礎となる実験を行った。ミリストイル化が起こるためには、その反応を触媒する酵素ミリストイルトランスフェラーゼ (NMT) が必要である。NMT が原生生物にも存在することを、原生生物の EST 及びゲノムデータベースを解析して確認した。その結果を基に、縮重 PCR プライマー

を設計して、テトラヒメナ NMT の大部分を PCR 増幅した。また、NMT で最も性質が良く分かっているシロイヌナズナの遺伝子クローニングにも着手した。

(8) バクテリア *Sulfurovum lithotrophicum* から AK 遺伝子を単離し、His-tag 付き酵素として発現させた。この AK は非常に強い基質親和性を示すことが分かった。この結果や、テトラヒメナの AK 酵素の特徴は、AK 酵素の初期進化を解明する上で重要な役割を果たすだろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Uda, K., Ellington, W. R., Suzuki, T. (2012) A diverse array of creatine kinase and arginine kinase isoform genes is present in the starlet sea anemone *Nematostella vectensis*, a cnidarian model system for studying developmental evolution. *Gene* 497:214-227. (査読付き)
2. Suzuki, T., Yamamoto, K., Tada, H. and Uda, K. (2012) Cold-adapted features of arginine kinase from the deep-sea clam *Calyptogena kaikoi*. *Marine Biotechnology* 14:294-303. (査読付き)
3. Tanaka, K., Matsumoto, T. and Suzuki T. (2011) Identification of amino acid residues responsible for taurocyamine binding in mitochondrial taurocyamine kinase from *Arenicola brasiliensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1814: 1219-1225. (査読付き)
4. Uda, K., Ishida, M., Matsui, T. and Suzuki, T. (2010) Arginine kinase from the tardigrade *Macrobiotus occidentalis*. Molecular cloning, phylogenetic analysis and enzymatic properties. *Zool. Sci.* 27: 796-803. (査読付き)
5. Tada, H. and Suzuki, T. (2010) Cooperativity in the two-domain arginine kinase from the sea anemone *Anthopleura japonicus*. II. Evidence from site-directed mutagenesis studies. *Int. J. Biol. Macromol.* 47: 250-254. (査読付き)
6. Uda, K., Matumoto, A., and Suzuki, T. (2010) Identification of key amino acid residues distinguishing chiral guanidino substrates (D- and L-arginine) in *Sabellastarte* arginine kinase. *J. Molecular Catalysis* 64: 75-80. (査読付き)
7. Lim, K., Pullalarevu, S., Surabian, K. T., Howard, A., Suzuki, T., Moul, J., and Herzberg, O. (2010) Structural basis for the mechanism and substrate specificity of glycoamine kinase, a phosphagen kinase family member. *Biochemistry* 49: 2031-2041. (査読付き)
8. Jarilla, B.R., Tokuhiko, S., Nagataki, M., Hong, S-J., Uda, K., Suzuki, T., and Agatsuma, T. (2009) Molecular characterization and kinetic properties of a novel two-domain taurocyamine kinase from the lung fluke *Paragonimus westermani*. *FEBS Lett.* 583: 2218-2224. (査読付き)
9. Uda, K., Kuwasaki, A., Shima, K., Matsumoto, T. and Suzuki, T. (2009) The Role of Arg-96 in *Danio rerio* Creatine Kinase in Substrate Recognition and Active Center Configuration. *Int. J. Biol. Macromol.* 44: 413-418. (査読付き)
10. Iwanami, K., Isono, S., Uda, K. and Suzuki, T. (2009) A novel arginine kinase from the shrimp *Neocaridina denticulata*: the fourth arginine kinase gene lineage. *Gene* 437: 80-87. (査読付き)
11. Suzuki, T., Uda, K., Adachi, M., Sanada, H., Tanaka, K., Mizuta, C., Ishida, K., and Ellington, W. R. (2009) Evolution of the diverse array of phosphagen systems present in annelids. *Comp. Biochem. Physiol. Part B. Biochem. Mol. Biol.* 152: 60-66. (査読付き)
12. Uda, K., Yamamoto, K., Iwasaki, I., Iwai, M., Fujikura, K., Ellington, W. R., and Suzuki, T. (2008) Two-domain arginine kinase from the deep-sea clam *Calyptogena kaikoi* - Evidence of two active domains. *Comp. Biochem. Physiol. Part B. Biochem. Mol. Biol.* 151: 176-182. (査読付き)
13. Tada, H., Nishimura, Y., and Suzuki, T. (2008) Cooperativity in the Two-domain Arginine Kinase from the Sea Anemone *Anthopleura japonicus*. *Int. J. Biol. Macromol.* 42: 46-51.

(査読付き)

[学会発表] (計 5 件)

1. 岡崎紀子, 宇田幸司, 鈴木知彦: テトラヒメナ (*Tetrahymena pyriformis*) のアルギニンキナーゼ (AK) の N-ミリスチル化 / 日本動物学会第 82 回大会 (旭川) (2011. 9. 22)
2. 岡崎紀子, 道端珠梨, 桜木陽子, 宇田幸司, 鈴木知彦: テトラヒメナ (*Tetrahymena pyriformis*) アルギニンキナーゼの酵素機能解析 / 日本動物学会第 81 回大会 (東京) (2010. 9. 25)
3. 道端珠梨, 岡崎紀子, 宇田幸司, 鈴木知彦: テトラヒメナの 2 種類のアルギニンキナーゼの局在と役割 / 日本動物学会第 81 回大会 (東京) (2010. 9. 23)
4. 道端珠梨, 宇田幸司, 鈴木知彦: テトラヒメナの 2 種類のアルギニンキナーゼの性質と局在 I / 日本動物学会第 80 回大会 (静岡) (2009. 9. 17-20)
5. 松本保, 岡添七香, 桜木陽子, 宇田幸司, 鈴木知彦: テトラヒメナのアルギニンキナーゼの構造, 機能及び進化. 日本動物学会第 79 回大会 (福岡) (2008. 9. 5-7)

[その他]

ホームページ等

(<http://p164056.cc.kochi-u.ac.jp/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木知彦 (SUZUKI TOMOHIKO)

高知大学・教育研究部自然科学系・教授

研究者番号: 60145109

(2) 研究分担者

宇田幸司 (UDA KOUJI)

高知大学・教育研究部自然科学系・助教

研究者番号: 10448392