

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570087

研究課題名(和文) 酵素の局在と機能特化：テトラヒメナ繊毛膜に局在するAK酵素をモデルとして

研究課題名(英文) Localization and function of enzymes: role of arginine kinase in cilia of *Tetrahymena pyriformis*

研究代表者

鈴木 知彦 (Suzuki, Tomohiko)

高知大学・自然科学系・教授

研究者番号：60145109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：テトラヒメナには単量体のAK(AK1)と2ドメイン型のAK(AK2)が存在しており、繊毛運動のエネルギー供給に関与している。また、AK1は主に繊毛に、AK2は細胞質や細胞膜に局在する。興味深いことに、AK1はN末端にミリスチル化シグナル配列を持つ。この研究では、ミリスチル化を触媒する酵素(ミリスチルトランスフェラーゼ：NMT)のクローニングと発現、AK1のN末端ペプチドがNMTの基質となることの酵素学的な証明、無細胞タンパク質合成系によるAK1の合成とPMF分析によるN末ミリスチル基の確認を行った。この一連の研究により、ミリスチル基を介したAK1の繊毛膜への局在が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Tetrahymena pyriformis contains two arginine kinases (AKs), a typical 40-kDa AK (AK1) and a two-domain 80-kDa enzyme (AK2). Interestingly, the amino acid sequence of *T. pyriformis* AK1, had a distinct myristoylation signal sequence at the N-terminus. In this work, we isolated and cloned the N-myristoyltransferase (NMT) cDNA from *T. pyriformis*. Then the NMT assay were performed, using the recombinant NMT and the N-terminal peptide GCSNSRSG of *T. pyriformis* AK1 or the peptide CSNSRSG which lacks N-terminal G of the former peptide. The use of the former peptide gave a typical Michaelis-Menten curve, while that for the latter gave no activity. A sufficient amount of modified AK1 enzyme was synthesized using an insect cell-free protein synthesis system. Then peptide mass fingerprinting (PMF) analyses were performed. The target N-myristoylated peptide was clearly observed with an experimental mass (m/z -H+) of 832.4747, indicating that the synthesized *T. pyriformis* AK1 is myristoylated.

研究分野：比較生化学

キーワード：酵素の局在 アルギニンキナーゼ 繊毛運動

1. 研究開始当初の背景

生理機能の分子基盤を解明する上で、現在、特に注目されていることは機能の鍵を担うタンパク質や酵素の局在化の問題である。その中でも、タンパク質の N 末端グリシンに、N-ミリスチル・トランスフェラーゼ (NMT) を介してミリスチン酸を特異的に共有結合させ、それをタグとして特定の場所 (膜成分) へと輸送する方法は、最近、数々のタンパク質の局在化の制御に関わっていることが分かってきた。そして、このミリスチル化の機能解明は、基礎科学のみならず生理学及び医学的な応用に繋がることから広く関心が持たれている。例えば、トリパノソーマを原因とするヒト眠り病の治療には、上述した NMT の阻害剤の投与が有効であることが示された (Julie et al.(2010) Nature 464: 728)。ミリスチル化を妨げられたタンパク質が本来の行き場を失い、トリパノソーマの生命分子基盤を破壊したのである。

我々は、テトラヒメナの 2 種類のアルギニンキナーゼ (AK1 及び AK2) が、それぞれ、繊毛膜と細胞質に局在していることを解明した。そして、AK1 の N 末端がミリスチル化される可能性を見だし、これが AK1 の繊毛膜への局在化を促して繊毛運動のエネルギー供給に関わっていると考えている。この研究では、これらの考察を実証し、さらにタンパク質の局在化の一般メカニズムの解明に繋げることを目指す。

2. 研究の目的

今回の研究の大きな目的は、これまでのテトラヒメナ AK に関する研究を基盤とし、最近我々が提案している AK1 のミリスチル化と繊毛膜成分への局在を証明し、繊毛や鞭毛運動における持続的なエネルギー供給と AK の関わり合いを具体的に解明しようとするものである。これは、上述したタンパク質の N-ミリスチル化と局在を示すモデル実験系として、極めて有用であるばかりでなく、繊毛運動とエネルギー供給の全貌を明らかにすることを通じて比較生理生化学分野の基礎研究として大きな貢献に繋がる。

T. piriformis における繊毛内の持続的なエネルギー供給に深く関与している酵素は繊毛内に局在している AK1 であり、その局在は N 末端のグリシンのミリスチル化に依存していると予想される。一方、AK2 はミリスチル化に必須の N 末端のグリシンを持たず、ミリスチル化されることはない。これらのことを踏まえて、この研究では、*T. piriformis* を材料にして、特に以下の 3 点を明らかにする。

(1) *T. piriformis* のミリスチル化を触媒する酵素、N-ミリスチル・トランスフェラーゼ (NMT) 遺伝子の単離、及びそのリコンビナント酵素の作成。

(2) *T. piriformis* の NMT が実際に AK1 の N 末端ペプチドをミリスチル化することの酵素学的な証明。

(3) 無細胞タンパク質合成系を用いて合成された AK1 が実際にミリスチル化されていることを、ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 分析により解析する。

3. 研究の方法

(1) *T. pyriformis* のミリスチル化触媒酵素、NMT 遺伝子の PCR クローニング
mRNA は市販のキットを用いて単離し、その後 cDNA 化した。この cDNA プールから、NMT に高く保存されているアミノ酸配列からデザインした 2 種類の混合プライマーを用いて、PCR 法により、NMT cDNA の中央部分の約 200 塩基対を増幅した (全体の約 1/6 に相当)。混合プライマーの配列は、Database 検索によって得られた繊毛虫の NMT ホモログ配列 (ゾウリムシから 4 種類、*T. thermophila* から 1 種類) のアラインメントから、保存性の高い部分を選んでデザインされている。*T. pyriformis* NMT の部分配列から、3' 及び 5' RACE 法を用いて全長配列を決定した。全長配列は、まず、プラスミド pGEM-T Easy にクローニングした。

(2) NMT のリコンビナント酵素の作成及び活性測定法の確立

原生物の遺伝子では、グルタミンのコドンが、ユニバーサルコドン表の終止コドンで代用されているため、原生物由来の遺伝子をそのまま大腸菌で発現させることはできない。大腸菌での発現には、NMT のグルタミンのコドンを通常のものに変異させる必要がある。従って、実験時間を短縮するために、*T. pyriformis* NMT の予想アミノ酸配列を基に、大腸菌での発現用 cDNA 配列は、cDNA 合成法 (オーバーラップ・エクステンション PCR: Kain K. C., Orlandi P. A. and Lanar D. E., 1991; Biotechniques 10: 366-374.) で作成した。この方法は、最近、cDNA プールが入手しにくい場合に頻りに利用されている。尚、NMT は C 末端に His タグを付加した形で発現させ、カラム精製を容易にした。

活性測定は以下の方法で行った。NMT は、ミリスチル-S-CoA とタンパク質の N 末端のグリシンから、HSCoA とミリスチル化タンパク質を生じる反応を可逆的に触媒する。この時生成される HSCoA を、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの存在下でピルビン酸と NAD⁺ で

反応させると、アセチル-S-CoA と NADH を生じる。従って、NADH の増加に由来する 340 nm の吸光度の増加を分光光度計で追跡することで、NMT の活性を測定した。

(3) NMT 酵素による *T. pyriformis* N 末端合成ペプチドのミリストイル化

クローニングされた *T. pyriformis* NMT を用い、野生型 N 末端側 8 アミノ酸残基の合成ペプチド (GCSNSRSG) 及び N 末端グリシン欠失ペプチド (CSNSRSG) を基質として用いて酵素活性を測定した。

(4) 無細胞タンパク質合成系を用いて合成された AK1 が実際にミリストイル化されていることを、ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 分析により解析する。尚、この分析は外注により行った。

4. 研究成果

(1) テトラヒメナの NMT の 1525 塩基からなる cDNA 配列を決定した。この配列から NMT 酵素は 421 アミノ酸から構成されていると予想された。この NMT を大腸菌内で発現させるために、NMT の DNA 配列を新たに全合成した (N 末に His Tag を付加)。リコンビナント酵素は大腸菌 BL-21 (DE3) 内で可溶化し、His Tag カラムを用いて目的タンパク質 (49 kDa) を精製することができた。

(2) 次に、既報の反応系 (Boisson et al., 2003) を基に、テトラヒメナ NMT の酵素濃度を $14 \mu\text{M}$ とし、反応に関わる 2 基質の内ミリストイル CoA の濃度を $250 \mu\text{M}$ に保ち、もう一方の基質 (テトラヒメナ AK1 の N 末端の 8 アミノ酸からなるペプチド: 純度 80% 以上の合成ペプチド) の濃度を $5\text{-}2000 \mu\text{M}$ の範囲で変動させて酵素活性を測定した。その反応速度は、以下の図のように、ミカエリスメンテンの酵素反応式に正確に従っていた。シグマプロットを用いてペプチドに対する見かけの K_m を $50 \mu\text{M}$ であると決定した。尚、上記で用いたペプチドの N 末端の Gly を削除したものに対しては、テトラヒメナ NMT は一切活性を示さなかった。これらの結果は、テトラヒメナ AK1 の N 末端 Gly がミリストイル化され得ることを証明するものである。

(3) 直接的に AK1 のミリストイル化を証明するために、昆虫細胞由来の無細胞タンパク質合成系 (島津製作所) を用いて、ミリストイル化された AK1 を直接合成した。先ず、C 末に Strep タグを付加した AK1 の cDNA 配列を全合成した。次に、その mRNA を大量に合成し、ミリストイル CoA を含む無細胞系に加えた。この系で合成された AK1 は、付加された Strep タグを用いて純度よく精製することができた。さらに、SDS 電気泳動を行い、合

成された AK1 を切り出して MALDI-TOF-MS 分析 (トリプシン消化産物の質量分析) を外注した。比較のために、*Tetrahymena* AK1 と同様にミリストイル化シグナル配列を持つ 2 種類のフォスファゲンキナーゼを合成し、併せて質量分析を行った。その結果、この分析においては、後者の 2 種類については、ミリストイル化された N 末端トリプシンペプチドの質量が 0.1 Da 以下の誤差で検出された。しかしながら、*Tetrahymena* AK1 については、上記に相当する質量は観測されなかった。次に、*Tetrahymena* AK1 を無細胞タンパク質合成系を用いて、再度、大量に合成し、PMF 分析を行った。その結果、ミリストイル化された N 末ペプチドに相当する質量 ($m/z\text{-H}^+$: 832.4747) が観測され、この値は理論値 ($m/z\text{-H}^+$: 832.4477) と非常に近い値 (誤差: 0.0271) であった。この結果より、*Tetrahymena* AK1 の N 末端は、確かにミリストイル化されていると結論された。

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 4 件)

1. Michibata, J., Okazaki, N., Motomura, S., Uda, K., Fujiwara, S. and Suzuki, T. (2014) Two arginine kinases of *Tetrahymena pyriformis*: characterization and localization. *Comp. Biochem. Physiol. Part B. Biochem. Mol. Biol.* 171: 34-41. (査読有)

2. Suzuki, T. and Kanou, Y. (2014) Two distinct arginine kinases in *Neocaridina denticulate*: psychrophilic and mesophilic enzymes. *Int. J. Biol. Macromol.* 67: 433-438. (査読有)

3. Suzuki, T., Soga, S., Inoue, M. and Uda, K. (2013) Characterization and origin of bacterial arginine kinases. *Int. J. Biol. Macromol.* 57: 273-277. (査読有)

4. Uda, K., Hoshijima, M. and Suzuki, T. (2013) A novel taurocyamine kinase found in the protist *Phytophthora infestans*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B. Biochem. Mol. Biol.* 165: 42-48. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 鈴木知彦, 本村翔, 丁野可愛, 矢野大地: 酵素の細胞内局在と N 末ミリストイル化及び C 末プレニル化 / 日本動物学会第 83 回大会 (大阪) (2012.9.13-15)

2. 丁野可愛, 矢野大地, 本村翔, 鈴木知彦:

アルギニンキナーゼ酵素群に見いだされた
ミリスチル化とプレニル化シグナル：細胞
内局在との関連性 / 日本動物学会第 84 回大
会 (岡山) (2013.9.27)

3. 丁野可愛, 矢野大地, 鈴木知彦 : オオウ
ミシダのアルギニンキナーゼ . その進化起源,
酵素活性及びプレニル化シグナルの発見 /
日本動物学会第 85 回大会 (仙台) (2014.9.11)

4. 矢野大地, 丁野可愛, 鈴木知彦 : ヨツヒ
メゾウリムシの繊毛運動とアルギニンキナ
ーゼ (AK) : アルギニンリン酸シャトル機構
の詳細 / 日本動物学会第 85 回大会 (仙台)
(2014.9.11)

5. 本村翔, 鈴木知彦 : テトラヒメナの繊毛
に局在するアルギニンキナーゼのミリスチ
ル化 : 「アルギニンリン酸シャトル」の詳
細 / 日本動物学会第 85 回大会 (仙台)
(2014.9.11)

〔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