

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440033

研究課題名(和文) 微小管構成タンパク質 チュープリンのアセチル化酵素による基質認識の構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis of the substrate specificity of the alpha-tubulin acetyltransferase

研究代表者

湯澤 聡 (Yuzawa, Satoru)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：40515029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：微小管の機能は、各種微小管結合タンパク質やtubulinの翻訳後修飾により制御されている。TAT1は $\alpha$ -tubulinの主要なアセチル化酵素としての機能を持ち、アセチル基の供与体であるアセチルCoAから $\alpha$ -tubulinの40番目のリジン残基へとアセチル基を転移する。本研究では、アセチルCoAやCoA-TAT1複合体の結晶構造を決定し、アセチルCoAやCoAの結合によるTAT1の安定化していることを示した。さらに、野生型と変異体タンパク質を用いてTAT1による $\alpha$ -tubulinの認識機構を検討し、CoA disulfide-TAT1複合体の構造解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：The functions of microtubules are controlled in part by tubulin post-translational modification. TAT1 is the major  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase in ciliated organisms and acetylates conserved lysine residue at lysine 40 on  $\alpha$ -tubulin proteins by transferring an acetyl group from acetyl-CoA to form  $\alpha$ -N-acetyllysine. In this study, we determined the crystal structures of TAT1 bound to its substrate acetyl-CoA or CoA and show the cofactor-mediated stabilization of TAT1. We also elucidate the recognition of  $\alpha$ -tubulin by TAT1 using wild type and mutant proteins and study on structure of the CoA disulfide bound TAT1.

研究分野：構造生物学

キーワード：翻訳後修飾 微小管 酵素 基質特異性 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

微小管は  $\alpha$ -tubulin と  $\beta$ -tubulin という 2 種類の構成タンパク質がヘテロ 2 量体を形成し、中空状の繊維構造を形成する。微小管がもつ特徴である重合と解離により伸長と短縮を繰り返す動的平衡性は、各種微小管結合タンパク質や tubulin の翻訳後修飾により調節されている。微小管の翻訳後修飾は、微小管結合タンパク質との相互作用に影響を及ぼし、微小管ダイナミクスやモータータンパク質の特異性を制御するという点で重要である。微小管の脱チロシン化、ポリグルタミン酸化、ポリグリシン化、リン酸化等の翻訳後修飾部位の多くは tubulin の C 末端領域に位置し、微小管の分子表面の多様性を生みだしている。一方、微小管の主要なアセチル化は、 $\alpha$ -tubulin の 40 番目のリジン残基に特異的な翻訳後修飾である。このリジン残基は  $\alpha$ -tubulin のループに位置し、微小管の管腔側を向いている。微小管のアセチル化修飾は、安定な微小管で広く観察されることが知られており、一次繊毛の軸糸、神経細胞の突起、遊走細胞で顕著に見られる。微小管のアセチル化修飾が微小管結合タンパク質やモータータンパク質の特異性や活性の制御に関与し、細胞内の極性形成や物質輸送を制御していることが示唆されている。一般に翻訳後修飾はタンパク質の構造や機能を調節し、生命活動を支える普遍的な制御機構であることから、微小管のアセチル化修飾の役割にも興味を持たれている。しかしながら、アセチル化修飾が微小管の安定性やダイナミクスに及ぼす影響については未だ不明な点がある。

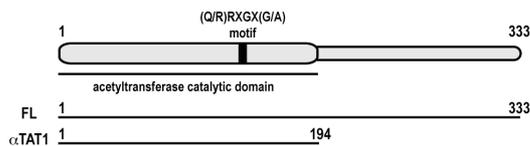


図1  $\alpha$ TAT1のドメイン構造

$\alpha$ TAT1のN末端側には酵素ドメインがあり、C末端側には天然変性領域。酵素ドメインには、コファクター認識に重要な (Q/R)RXGX(G/A)配列がある。

網羅的な解析から、アセチル化は細胞内タンパク質で著しく広範に存在する翻訳後修飾であることが示され、アセチル化修飾が活性や局在性、安定性を変えることでタンパク質の機能を制御する役割を持つと考えられている。これまで、タンパク質アセチル化は、ヒストンの修飾と遺伝子の転写調節を中心に研究が進んでいる。 $\alpha$ -tubulinのアセチル化修飾については、脱アセチル化酵素が HDAC6 と SIRT2 であることは以前から知られていたが、 $\alpha$ -tubulinアセチル化酵素は不明であった。2010年になり2つのグループから異なるアプローチで、主要な  $\alpha$ -tubulinアセチル化酵素は  $\alpha$ TAT1 (Mec-17)であることが示された(図1)。この酵素は、テトラヒ

メナやクラミドモナスといった単細胞真核生物からヒトまで、繊毛や鞭毛を持つ生物種で高度に保存されている。未だ不明な点も多いが、 $\alpha$ TAT1が繊毛の輸送複合体と共に精製されていることや、 $\alpha$ TAT1をノックダウンすることにより上皮細胞で一次繊毛の構築が遅延することから、繊毛形成において  $\alpha$ -tubulinのアセチル化修飾が重要な役割を担うことが示唆されている。しかし、 $\alpha$ TAT1の細胞内局在がどのように制御され、特定の微小管を選択して修飾しているのかについては殆ど分かっていない。バイオインフォマティクスによる解析から、 $\alpha$ TAT1とヒストンアセチル化酵素 GCN5との構造上の類似性が指摘されている。ところが、 $\alpha$ TAT1はヒストンに対するアセチル化活性を示さない。逆に、GCN5はヒストンを主要な基質としてアセチル化活性を示すが、Myc-Nickと共に  $\alpha$ -tubulinをアセチル化するという報告もある。

GCN5は特定の構造を持たないヒストンのN末端側の天然変性領域にあるリジン残基を基質として認識するのに対し、 $\alpha$ TAT1は  $\alpha$ -tubulinのループにあるリジン残基を基質として認識する。 $\alpha$ TAT1は  $\alpha$ -tubulinあるいは微小管と比較し、Lys40近傍のペプチドを効率的にアセチル化できない。さらに、 $\alpha$ TAT1は遊離の  $\alpha$ -tubulinに比べ、微小管中の  $\alpha$ -tubulinを効果的にアセチル化することが示されている。このことから、 $\alpha$ TAT1はLys40近傍のアミノ酸配列に加え、 $\alpha$ -tubulinの立体構造、さらに微小管形成時の  $\alpha$ -tubulinの立体構造を認識している可能性がある。

近年、微小管のアセチル化レベルとがんとの間には密接な関係があることが明らかになってきた。例えば、アセチル化レベルの上昇が乳がん細胞の接着と浸潤を促進することが示され、アセチル化レベルが高い原発性乳腺腫瘍は基底細胞様乳がんに関連し、致命的ながんに進展するリスクが高いことが報告された。微小管のアセチル化修飾がどのようなメカニズムで亢進し、がんの浸潤や転移と関係するのかを調べることは重要な課題である。

2. 研究の目的

本課題では、 $\alpha$ TAT1による  $\alpha$ -tubulinのLys40に特異的な基質認識の構造基盤を明らかにするとともに、 $\alpha$ -tubulinのアセチル化の制御機構について明らかにすることを目的としている。そのため、 $\alpha$ TAT1とコファクターや基質との複合体のX線結晶構造を決定することで認識機構を明らかにし、変異体  $\alpha$ TAT1の  $\alpha$ -tubulinのアセチル化活性を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) タンパク質を大腸菌で発現し、アセチル CoA あるいは CoA を添加することで  $\alpha$  TAT1 とコファクターとの複合体を分離・精製し調製した。また、 $\alpha$  TAT1-コファクター複合体に様々な鎖長の  $\alpha$ -tubulin 由来ペプチドを添加し、酵素-基質複合体を調製した。初期スクリーニングから得られた結晶化条件について条件を精密化し、アディティブスクリーニングやシーディングなどの手法を用い、結晶の成長を最適化した。X 線回折実験は、高エネルギー加速器研究機構 フォトンファクトリーおよび大型放射光施設 SPrin-8 で行った。結晶化溶液中にヨウ素を添加し得られた  $\alpha$  TAT1-アセチル CoA 複合体の重原子誘導体結晶を用いて、ヨウ素の異常分散効果を用いた単一重原子同形置換法により構造決定を行った。また、他の  $\alpha$  TAT1 複合体は、 $\alpha$  TAT1-アセチル CoA 複合体をサーチモデルとして分子置換法により構造決定した。

(2) 野生型あるいは変異体  $\alpha$  TAT1 を、GST 融合タンパク質として大腸菌を用いて発現した。大腸菌を3つの条件（アセチル CoA 添加、CoA 添加、添加なし）の下で破碎し、目的タンパク質を含む可溶性画分をグルタチオン セファロース 4B を用いて精製した。プロテアーゼを利用して GST タグを用いて切り離し、変異体タンパク質を溶出した。回収できたタンパク質量を SDS-PAGE により分析した。

(3) 野生型あるいは変異体  $\alpha$  TAT1 を用いて、*in vitro*での  $\alpha$ -tubulin のアセチル化レベルを測定した。MBP と融合した  $\alpha$ -tubulin の Lys40 残基近傍の 14 残基のペプチドを、基質である  $\alpha$ -tubulin の代わりに利用した。野生型あるいは変異体  $\alpha$  TAT1, アセチル CoA と基質を混合し、一定の条件下で酵素反応を行った。 $\alpha$ -tubulin のアセチル化 Lys40 を特異的に認識する抗体を用いたイムノブロッティングにより、基質のアセチル化レベルを分析した。

(4) 野生型あるいは変異体  $\alpha$ -tubulin を用いて、*in vitro*での  $\alpha$  TAT1 による  $\alpha$ -tubulin の Lys40 に対するアセチル化レベルを測定した。 $\alpha$ -tubulin 由来ペプチドのアミノ酸をそれぞれアラニンに置換した変異体を基質として調製した。 $\alpha$  TAT1 に放射性同位元素 [ $^3$ H]ラベルされたアセチル CoA と野生型あるいは変異体  $\alpha$ -tubulin 基質を混合し、一定の条件下で酵素反応を行った。反応溶液をろ紙にブロットし未反応のアセチル CoA を洗浄した後、ろ紙に保持された [ $^3$ H]ラベルされたアセチル化  $\alpha$ -tubulin 由来ペプチドの量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

(5) MDCK 細胞に野生型および変異体  $\alpha$  TAT1 の遺伝子を導入し、シクロヘキシミドで処理し、その 1.5 時間後と 4 時間後に細胞を回

収した。イムノブロッティングを用いて、細胞内での野生型と変異体  $\alpha$  TAT1 のタンパク質量を検討した。

### 4. 研究成果

$\alpha$  TAT1 の構造生物学的・生化学的解析を行うため、 $\alpha$  TAT1 を大腸菌による組換えタンパク質として調製した。コファクターを添加せず大腸菌から精製した  $\alpha$  TAT1 のアセチルトランスフェラーゼ活性を検討したところ、アセチル CoA の添加の有無にかかわらず基質をアセチル化修飾した。一方、CoA 存在下で調製した酵素を用いて  $\alpha$  TAT1 のアセチルトランスフェラーゼ活性を検討したところ、アセチル CoA を添加しない場合には基質のアセチル化修飾は確認できなかったが、アセチル CoA を添加することで基質のアセチル化修飾は増強された。 $\alpha$  TAT1 がアセチル CoA と安定な複合体を形成していることを見出した。

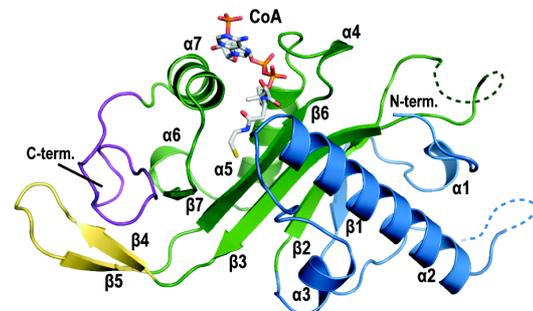


図2 CoA結合型  $\alpha$  TAT1 の構造

緑: GNAT ファミリーに共通してみられるモチーフ、青: N末端領域、マゼンタ: C末端領域 黄:  $\beta$ -hirepin 領域、スティックモデル: CoA (論文1より引用)

$\alpha$  TAT1 へのコファクター結合の役割について検討するため、X 線結晶構造解析を行った。 $\alpha$  TAT1-アセチル CoA 複合体の結晶と  $\alpha$  TAT1-CoA 複合体の結晶をそれぞれ、蒸気拡散法により作成した。 $\alpha$  TAT1-AcCoA 複合体の構造は、ヨウ素の異常分散効果を用いた単一重原子同形置換法 (SIRAS) で位相決定した。得られた  $\alpha$  TAT1-アセチル CoA 複合体のモデルを利用し、 $\alpha$  TAT1-CoA 複合体の構造を分子置換法で決定した。最終的に、 $\alpha$  TAT1-AcCoA 複合体を 1.25 オングストローム分解能で、また  $\alpha$  TAT1-CoA 複合体を 1.8-2.2 オングストローム分解能で決定した。 $\alpha$  TAT1 の分子の中心部は、GNAT ファミリートランスフェラーゼと共通の立体構造が保持され、保存性の高い分子の中心部でコファクターが認識される (図2)。 $\alpha$  TAT1 に特徴的な種間で保存されている Arg132 と Ser160 が、アセチル CoA と同様に CoA に大きく寄与していることが示唆された。

コファクターの認識に直接関与する Arg132 と Ser160 の役割を明らかにするため、

アラニンに置換した変異体 (R132A と S160A) を作成した (図 2, 3). R132A と S160A 変異体では,  $\alpha$ TAT1 の安定性が大幅に低下したが, アセチル CoA あるいは CoA を添加することで野生型と同程度の安定性を示した. また, 両変異体のアセチルトランスフェラーゼ活性を検討し,  $\alpha$ TAT1 の Arg132 と Ser160 がコファクターへの親和性に寄与することを示した. さらに, ほ乳動物由来の細胞では, R132A 変異体と S160A 変異体は野生型に比べ turnover が短くなることを示した. 以上の結果から,  $\alpha$ TAT1 は アセチル CoA や CoA との相互作用により, *in vitro* でも *in vivo* においても酵素の安定性が維持されていることを示した.

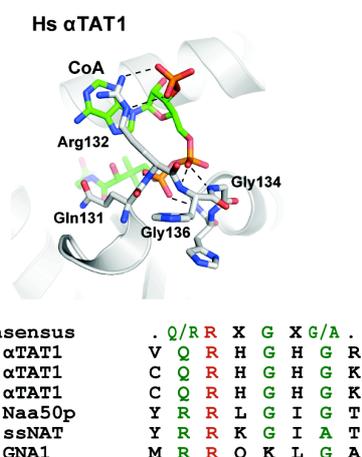


図3  $\alpha$ TAT1のコファクター認識部位と共通配列  $\alpha$ TAT1のArg132近傍のCoA認識部位, GNATファミリーアセチルトランスフェラーゼに保存されたコファクター認識部位の塩基性残基. (論文1より引用)

次に,  $\alpha$ TAT1 の基質認識に関与する残基を特定するため, 種間のアミノ酸の保存性を調査し  $\alpha$ TAT1 分子表面にプロットした (図 4). コファクターの認識に関与する残基の保存性は高く, 認識機構は種間で保存されていることが示唆された. 一方, アセチル CoA や CoA が配置するクレフトの外側に保存性の高い分子表面が見られた. この分子表面には, 主に塩基性残基から構成された表面と, 疎水性残基で構成された分子表面が見出された. 塩基性表面を形成する Lys98, Lys102, Arg158 について, また疎水性表面を形成する V184 について変異体を作成し, アセチル化活性を検討した. これらの残基への変異の導入によりアセチル化の効率が低下し, 基質への親和性が低下した. 影響が大きかったことから Lys98/Lys102 は,  $\alpha$ TAT1 による基質認識に重要なアミノ酸である. さらに,  $\beta$ -hairpin 領域の欠損変異体ではアセチルトランスフェラーゼ活性が失われた. このことから, この領域が基質認識あるいは酵素活性において重要な役割を果たしていることが示唆された. 次に,  $\alpha$ TAT1 による基質認識において

重要なアミノ酸残基を検討した.  $\alpha$ -tubulin 由来のペプチドについて 1 残基ずつアラニンに置換した変異体基質を用意し,  $\alpha$ TAT1 によるアセチルトランスフェラーゼ活性を検討した.  $\alpha$ TAT1 により基質  $\alpha$ -tubulin のアミノ酸残基 Ser38, Asp39, Ile42 が認識され, Lys40 のアセチル化に重要な役割を果たしている. また, Gly43-Gly44-Gly45 も認識に重要であることが示唆された. 一方,  $\alpha$ -tubulin Lys40 の N 末端側領域 (アミノ酸: 31-37) と C 末端側領域 (アミノ酸: 47-49) の重要性が低いことを示した.

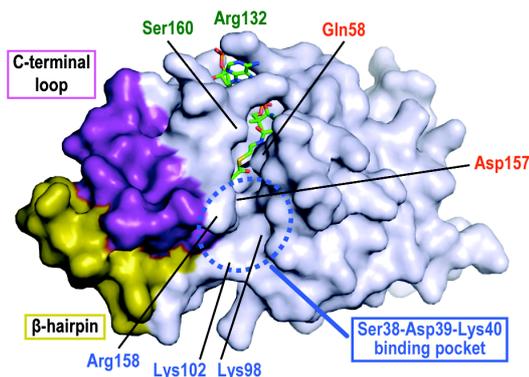


図4  $\alpha$ TAT1の基質結合部位構造  
灰:  $\alpha$ TAT1の分子表面,  
スティックモデル: アセチルCoA,  
マゼンタ: C末端領域, 黄:  $\beta$ -hairpin領域  
(論文1より引用)

$\alpha$ TAT1 による詳細な基質認識機構を明らかにするため,  $\alpha$ TAT1 と  $\alpha$ -tubulin 由来ペプチドとの複合体の結晶構造解析を試みた.  $\alpha$ -tubulin の Lys40 の近傍のアミノ酸を含む領域を基質として用い,  $\alpha$ TAT1 とアセチル CoA や CoA との三者複合体について結晶化を行った. 異なる結晶形に属する  $\alpha$ TAT1 の結晶が数種類得られ, それら結晶について構造解析を行った. しかし,  $\alpha$ -tubulin 由来ペプチドの電子密度は観察されず, いずれの条件の結晶でも複合体を形成していなかった. 次に, 変異体実験に基づき基質認識に関与する残基を含む 14 残基の  $\alpha$ -tubulin 由来ペプチドを基質として用意し, 再度三者複合体の結晶化を試みた. 得られた結晶の回折実験を行い構造解析を進めてみると,  $\alpha$ TAT1 の活性中心近傍に未帰属の電子密度が観察された. この電子密度は  $\alpha$ -tubulin 由来の S38-D39-K40 に対応する電子密度と想定されたが, 電子密度の占有率が低く解釈することができず構造決定には至らなかった.

$\alpha$ TAT1 の結晶化条件の検討中に偶然得られた CoA disulfide が結合した  $\alpha$ TAT1 についての構造解析を行った. CoA disulfide は, CoA が酸化され二量体化した分子である.  $\alpha$ TAT1-アセチル CoA 複合体のモデルを利用し,  $\alpha$ TAT1-CoA disulfide 複合体の構造を分子置換法で決定した.  $\alpha$ TAT1-CoA disulfide

複合体では2つの CoA のうち一つは、 $\alpha$  TAT1-CoA 複合体と同じ配置をもっていた。活性中心近傍には2つの CoA の間で S-S 結合と考えられる電子密度がみられ、もうひとつの CoA は活性中心からリジン残基が認識されると想定されるキャビティに、 $\beta$ -メルカプトエチルアミン部分とパントテン酸部分が配置していた。一方、アデノシン2リン酸部分の明確な電子密度は観察されなかった。ヒトでは CoA disulfide の生理学的意義は不明であるが、CoA disulfide が活性中心を占有していることから、阻害剤として機能する可能性がある。そこで、 $\alpha$  TAT1 に対する CoA disulfide の阻害能、および酸化状態と還元状態が阻害能に与える影響の検討を進めている。

#### 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 3 件)

1. Kanako Chishiki, Sachiko Kamakura, Junya Hayase, Satoru Yuzawa, Hideki Sumimoto. Ric-8A-mediated stabilization of the trimeric G protein subunit  $G\alpha i$  is inhibited by pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **483**, 941-945, 2017. (査読あり)

2. Hiroki Takayanagi, Satoru Yuzawa, Hideki Sumimoto. Structural basis for the recognition of the scaffold protein Frmpd4/Presol by the TPR domain of the adaptor protein LGN. *Acta. Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **71**, 175-183 (2017). (査読あり)

3. Satoru Yuzawa, Sachiko Kamakura, Junya Hayase, Hideki Sumimoto. Structural basis of cofactor-mediated stabilization and substrate recognition of the  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase  $\alpha$  TAT1. *Biochem. J.* **467**, 103-113 (2015). (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

1. アダプタータンパク質 LGN の TPR ドメインによるスキヤフォールドタンパク質 Frmpd4/ Presol 認識の構造基盤. 高柳宏樹,

湯澤 聡, 住本英樹. 第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会 BMB2015, 2015 年 12 月 1 日~2015 年 12 月 4 日, 神戸

2.  $\alpha$ -チューブリンアセチル化酵素  $\alpha$  TAT1 のコファクターによる安定化の構造基盤.

湯澤 聡, 鎌倉幸子, 早瀬純也, 住本英樹. 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015 年 6 月 24 日~2015 年 6 月 26 日, 徳島

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

該当なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯澤 聡 (Yuzawa Satoru)

九州大学大学院 医学研究院・助教

研究者番号: 4 0 5 1 5 0 2 9

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし