

令和元年5月17日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07270

研究課題名(和文)細胞増殖因子ポリアミンの細胞内濃度調節機構の解明

研究課題名(英文)Structural basis for the regulation mechanism of intracellular polyamine concentration

研究代表者

杉山 成 (Sugiyama, Shigeru)

高知大学・教育研究部自然科学系理工学部門・教授

研究者番号：90615428

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)：ポリアミン(PA)は、生理活性物質として生命活動維持に重要な役割を果たしている。大腸菌内で、PA濃度はアセチルトランスフェラーゼ(SAT)によって影響される。SATはアセチルCoAからスペルミジン(SPD)の両端の一方にアセチル基を転移する。アセチル化されたSPDは細胞外へと排出され、その結果細胞内SPD濃度は減少する。本研究では、SATの構造と機能を明らかにするために、基質SPDと生産物CoAが結合したSAT複合体構造を2.5 Å分解能で決定した。この複合体構造は、SATがフレキシブルな分子であるPAに対してブロードな基質特異性を持っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸菌ではポリアミン(PA)の生合成、分解、輸送に関わる遺伝子は、全体の実に0.6%も占めています。このことは、生体内でのPA制御機構が崩れると生命活動に影響を及ぼすことから分かるように、生体内でのPA濃度の制御が非常に重要であると言えます。このように重要な機能を持つPAの細胞内濃度調節機構について構造生物学的な観点から研究を進めています。PA濃度はアセチルトランスフェラーゼ(SAT)によって一部制御されています。SATは、病原性の赤痢菌や大腸菌の生存能力に重要な役割を持っています。本研究では、SATの立体構造を明らかにすることによりPAアセチル化転移反応機構を解明しました。

研究成果の概要(英文)：Polyamines such as spermidine (SPD) are distributed widely from prokaryotic to eukaryotic cells and are essential for cell growth. SPD acetyltransferase (SAT) from *E. coli*, which catalyses the transfer of acetyl groups from acetyl-CoA to spermidine, is a key enzyme in controlling polyamine levels in prokaryotic cells. In this study, we determined the crystal structure of SAT in complex with SPD and CoA at 2.5Å resolution. SAT is a dodecamer organized as a hexamer of dimers. The SPD molecule is located at the inter-dimer interface. The distance between SPD and CoA molecules is 13Å deep, highly acidic, water-filled cavity encompasses the SPD and CoA binding sites. Structure-based mutagenesis and in-vitro assays identified SPD-bound residues, and the acidic residues lining the walls of the cavity are mostly essential for enzymatic activities. Based on mutagenesis and structural data, we propose an acetylation mechanism underlying promiscuous polyamine recognition for SAT.

研究分野：構造生物化学、タンパク質結晶学

キーワード：ポリアミン 細胞増殖因子 生理活性物質 アセチルトランスフェラーゼ X線結晶構造解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ポリアミン (代表的なものとしてプトレスシン[PUT]、スペルミジン[SPD]、スペルミン[SPM]) とは、アミノ基を複数もつ直鎖脂肪族炭化水素の総称であり広く生体内に存在する。生体内でポリアミンは、RNA/DNA の安定化、膜の安定化、細胞増殖・細胞分裂の制御、タンパク質合成など、生理活性物質として生命活動維持に重要な役割を果たしている。しかし、ポリアミンは細胞内で高濃度に存在することや、種々の酸性物質 (DNA、RNA、リン脂質、ATP 等) と相互作用するために、ポリアミンの生理機能を特定するための分子生物学的な研究はあまりなされて来なかった。ポリアミンは種々の刺激にตอบสนองしてその量に変動するため、ポリアミンと相互作用する酸性物質の重要な機能が、ポリアミン量の変化により大きく影響されることが予測される。このことからわれわれは、ポリアミン機能解明へ向けた第 1 目標として、構造生物学的なアプローチによって細胞内のポリアミン濃度調節機構の解明を進めてきた。実際に、われわれはこれまでに大腸菌のペリプラズムに存在する SPD 結合タンパク質である PotD と SPD との複合体の結晶構造解析を行い、初めてタンパク質による SPD 認識機構を明らかにしている (S. Sugiyama, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271, 9519-9525, 1996)。

ポリアミンの細胞内濃度は、生合成、分解、細胞内外への取り込みと排泄により厳密に調節されている (図 1)。SPD を細胞外から優先的に取り込む分子複合体 PotABCD (PotA, PotB, PotC, PotD の 4 種類のタンパク質より構成されている) は、ATP 加水分解エネルギーを利用した ABC トランスポーターであり、タンパク質間の相互作用によって構造変化を生じ、SPD を取り込む機能を発揮する。ポリアミンがどのようにして細胞外から PotABCD 複合体を通じて細胞内に取り込まれるのかについては、まだ詳細な機能は解明されていない。

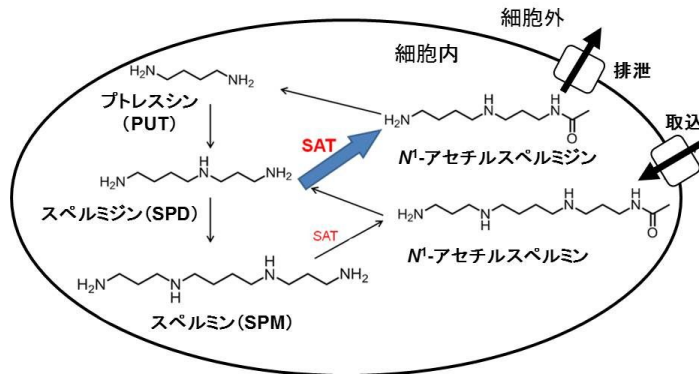


図 1 細胞内ポリアミン濃度調節

一方、大腸菌内で、ポリアミン濃度はポリアミンアセチル転移酵素 (SAT) によって影響される。SAT はアセチル CoA から SPD の両端の一方にアセチル基を転移する。アセチル化された SPD は細胞外へと排出され、その結果細胞内 SPD 濃度は減少する。SAT は原核細胞内でポリアミン量を調節する主要な酵素である。以前の研究で、我々は SAT がほとんど等しい量の N<sup>1</sup> と N<sup>8</sup>-acetylspermidines を生産することを発見した。この結果は、大腸菌 SAT の基質特異性は、真核生物の SAT のそれと異なっていることを示している。そして、SAT はポリアミンに対して曖昧な基質特性を持っている。このように、真核生物の SAT の構造機能相関は広く研究されているが、原核生物の SAT に関してはあまり研究されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、SPD 分解過程の 1 つである SPD のアセチル転移酵素 SAT の立体構造と SPD を優先的に取込む分子 PotA の立体構造を X 線結晶構造解析によって明らかにすることにより、アセチル化転移反応機構とポリアミンの細胞内取り込み機構を解明し、生理活性物質ポリアミンの細胞内濃度調節機構を構造生物学的に解明していくことを目的としている。

#### (1) SPD 分解過程における SPD アセチル化転移反応機構の解明

原核生物において、細胞内ポリアミン濃度の調整に関与する酵素の 1 つが SAT である。SAT は、SPD の N-1 位および N-8 位のアミノ基にアセチル CoA のアセチル基を転移させる反応を触媒する。アセチル化された SPD は生理活性物質ポリアミンとしての機能を失い、1 つ電荷の小さい PUT に分解される、もしくは細胞外へと排出される。本研究では、SAT-SPD-CoA 三者複合体の立体構造を明らかにすることにより、SPD のアセチル化転移反応機構を解明していく。

#### (2) ポリアミンの細胞内取り込み機構の解明

PotA は、SPD 優先取り込み系のエネルギー供給に関与する ATPase である。N 末端側 (1 ~ 250 アミノ酸残基) が ATP 結合部位を含む触媒部位であり、C 末端側 (251 ~ 378 アミノ酸残基) が ATPase 活性調節部位である。先行研究により、SPD が ATPase 活性を阻害することが分かっている。このことから SPD の取り込み活性は、ATPase である PotA により調節されていることが示唆される。本研究では、PotA の立体構造を明らかにし、構造学的な知見から取り込み機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) SAT サンプルの調整

Sat 遺伝子を含む遺伝子フラグメントは PCR により増幅させた (pT7-7 の NdeI/SalI サイト

に導入されている)。SATは大腸菌株 BL21(DE3)内で発現させ、IPTG の添加により誘導した。培養後の菌体は超音波により破碎し遠心分離した。次に上清を緩衝液で透析後、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムを用いて、塩溶液のリニアグラジエントで溶出させ粗精製品とした。さらに、SAT を含むフラクションは、CoA と Sepharose 4B から作られた CoA- Sepharose column にアプライし精製をおこなった。最終的に、溶出された SAT はゲルろ過クロマトグラフィーカラムを通すことで結晶化のための精製標品とした。

## (2) SAT の結晶化と構造解析

SAT の結晶化実験は蒸気拡散法を用いておこなった。SAT 結晶を用いた X 線回折実験は、シンクروتロン放射光 SPring-8 を用いて収集した。結晶構造解析では、コレラ菌由来スペルミジン n1-アセチルトランスフェラーゼ (アミノ酸配列の相同性 49%) の構造が Protein Data Bank に登録されているため、その座標を初期モデルとして分子置換法を適用した。さらに、SAT のオリゴマー構造が結晶中のみだけでなく、溶液中でも同じ状態を示していることを確認するため、SAT-SPD-CoA 三者複合体を用いて電子顕微鏡測定と分析超遠心測定をおこなった。

## (3) 野生型 PotA とセレノメチオニンで標識した PotA サンプルの調整

野生型 PotA と SeMetPotA サンプルは、大腸菌にて N 末端に His-tag を付加した融合タンパク質として発現させた。菌体は遠心分離により収集し超音波により破碎した後、遠心分離した。次に、得られた上清を Ni-アフィニティークロマトグラフィーを用いて、イミダゾールのリニアグラジエントによって溶出させた。最終的に、溶出されたサンプルはゲルろ過クロマトグラフィーカラムを通すことで結晶化のための精製標品とする。

## (4) 野生型 PotA と SeMet PotA の結晶化と構造解析

PotA-SPD 複合体と SeMetPotA サンプルを用いて結晶化実験をおこなった。これらの結晶を用いた X 線回折実験は、シンクروتロン放射光 SPring-8 を用いて収集した。結晶構造解析では、SAD 法を用いておこなった。

## 4. 研究成果

### (1) SPD 分解過程における SPD アセチル化転移反応機構の解明

ポリアミンアセチル転移酵素 SAT の活性部位: 基質 SPD と生産物 CoA が結合した SAT の結晶構造を 2.5 Å 分解能で決定した。SAT は、新規な 12 量体構造を形成している (図 2)。それはダイマーの 6 量体として構造化している。SPD 分子は内部のダイマー接触面上に位置し直線状コンフォメーションをとっていた。しかし、SPD 分子は予想外の結合位置に結合しており、SPD 分子の末端アミノ基と CoA 分子の硫黄原子との間の距離は、およそ 13 Å であった (図 3A)。SPD 分子は、いくつかの静電的相互作用と疎水性相互作用を通して、2 つの SAT 分子と相互作用していた。

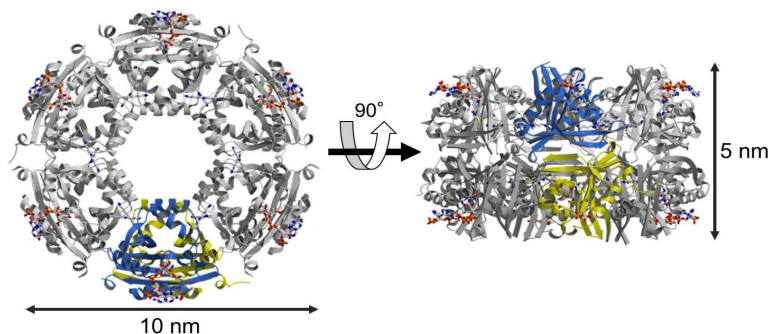


図 2 SAT-SPD-CoA 三者複合体の 12 量体構

Glu33 の側鎖は、SPD 分子

の末端アミノ基と相互作用していた。もう一方のアミノ基は隣の SAT 分子の Glu55 の側鎖、および His49 と Asp52 の主鎖カルボニル基と相互作用していた。N4 アミノ基は、Glu41 と Gln53 の側鎖と相互作用していた。加えて、SPD 分子の C2-C7 領域は、Tyr36 と Gln53/Arg56 のグアニジン面によって囲まれていた。Gln53 と Arg56 の立体配座は、さらに Glu34 との塩橋によって強固となっていた。

SPD 結合部位と CoA 結合部位周辺は、広い酸性領域を形成していた (図 3B)。また 10 個以上の水分子によって満たされており、それらの水分子と酸性残基は、広い範囲の水素結合ネットワークを形成していた。この酸性表面は、グルタミン酸クラスター (Glu33,

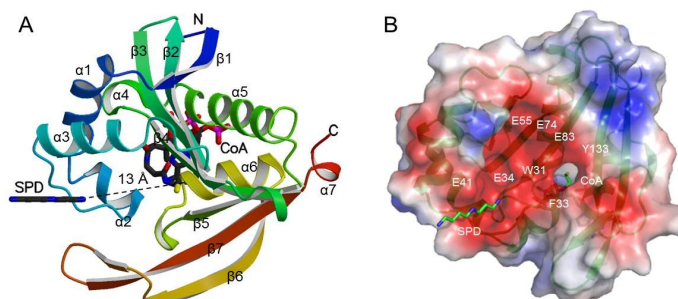


図 3 SAT-SPD-CoA 複合体の立体構造

(A) モノマー構造、(B) SPD と CoA 結合部位周辺の広い酸性領



とである。活性部位周辺の大きな空間と多くの水分子は、SPD 分子が拡散することを可能にしているかもしれない。CoA 分子の硫黄原子の近くに存在する Trp31 と Phe32 の芳香族残基は、SPD 分子の C2-C7 領域を認識することが可能な位置にいる。この仮説は、変異体解析結果 (Trp31Ala は酵素活性を減少させている) によって支持されている。

SAT 中の Tyr133 の OH 基は、アセチル化反応においてアセチル CoA の硫黄へのプロトン供与体の可能性がある。しかし、Tyr133Phe への変異体解析は酵素活性に影響を与えなかった (図 5)。このことから、Tyr133 はプロトン供与体ではないと考えられる。立体構造から判断して、SAT の可能性ある活性部位の塩基は Glu83 である。Glu83Gln 変異体は、酵素活性を大きく減少させた。SAT の活性部位とその周辺で、Glu83 と水分子は水素結合の広いネットワークを形成している。この中で Glu83 と水分子はプロトン受容体として機能しているように思える。SAT の酵素反応は、水分子を通じて SPD の末端アミン基から Glu83 の側鎖に向けてプロトンを動かしているかもしれない。そうして、SPD のアミノ窒素がアセチル CoA のカルボニル炭素をアタックし、オキシアニオン四面型中間体を誘導する (図 7)。また Gln85 は CoA をベースにしたモデル化 acetyl-CoA のアセチル基の近くに位置している。このことから、Gln85 の側鎖のアミド基は、アセチル化反応で形成されるオキシアニオンの安定化に寄与していると考えられる。この仮説は、一連の変異体解析の結果と良く一致している。

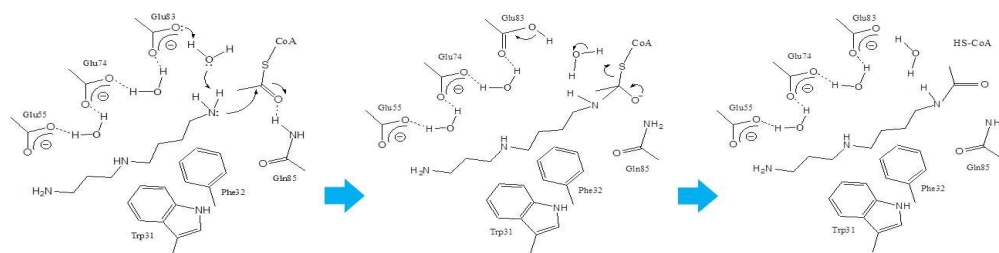


図 7 SAT の酵素反応メカニズム

## (2) ポリアミンの細胞内取り込み機構の解明

アポ型 PotA、PotA-SPD 複合体と SeMetPotA の結晶化実験は、両者ともに針状結晶ながらシンクロトロン放射光 (SPring-8) を用いて、それぞれ 2.5Å および 2.7Å 分解能の X 線回折データをそれぞれ得ることに成功した (表 1)。これらのデータを用いて構造解析を行ったところ、PotA の 2 量体構造が観察できている。現在、アポ型 PotA 結晶構造の精密化が進行中である。

表 1 X-ray data statistics for PotA

Proteins	Native PotA	SeMet PotA-ADP 5 mM ADP Derivative	PotA-ADP 5 mM ADP	PotA-ATP 5 mM ATP
Source	SPring-8 BL41XU	PF BL17	SPring-8 BL44XU	SPring-8 BL44XU
Wavelength (Å)	1.00	0.9788	0.90	0.90
Temperature (K)	100	100	100	100
Space group	P3 <sub>1</sub> 12 (or P3 <sub>2</sub> 12)	P3 <sub>1</sub> 12 (or P3 <sub>2</sub> 12)	P3 <sub>1</sub> 12 (or P3 <sub>2</sub> 12)	P3 <sub>1</sub> 12 (or P3 <sub>2</sub> 12)
Unit-cell parameters (Å, °)				
$a, b, c$	88.9, 88.9, 221.9	89.3, 89.3, 222.6	89.2, 89.2, 221.5	88.4, 88.4, 219.2
$\alpha, \beta, \gamma$	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0
Resolution (Å)	50–2.55	50–2.55	50–2.25	50–3.80
(High-resolution shell)	(2.59–2.55)	(2.75–2.70)	(2.29–2.25)	(3.87–3.80)
No. of reflections	132,890	323,869	210,077	44,846
No. of unique reflections	32,487	54,713	45,879	9,814
Redundancy	4.1 (2.9)	5.9 (5.2)	4.9 (3.4)	4.6 (3.6)
Mean $I/\sigma(I)$	12.8 (1.7)	9.7 (2.9)	8.9 (1.5)	11.8 (2.0)
Completeness (%)	98.5 (96.6)	99.9 (99.5)	95.2 (95.6)	98.1 (96.8)
$R_{\text{merge}}$ (%) <sup>a</sup>	9.6 (56.0)	10.3 (58.4)	14.0 (73.4)	8.0 (48.1)
$R_{\text{pim}}$ (%)	5.2 (36.8)	4.6 (28.0)	7.1 (44.4)	3.8 (27.5)
CC <sub>1/2</sub> in high-resolution	0.10	0.73	0.14	0.31
Mosaicity (°)	0.70	0.35	0.28	0.47

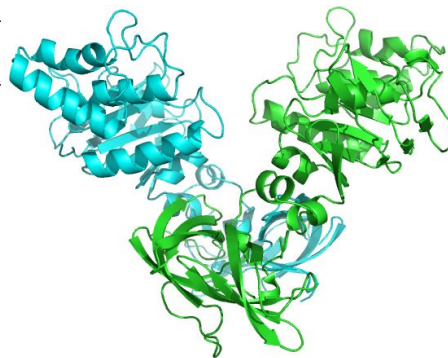


図 8 PotA の 2 量体構造

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- K. Takada, R. Amano, Y. Nomura, Y. Tanaka, S. Sugiyama, T. Nagata, M. Katahira, Y. Nakamura, G. Kawai, T. Kozu, and T. Sakamoto, Characterization of an aptamer against Runt domain of AML1 (RUNX1) by NMR and mutational analyses, *FEBS Open Bio.*, 査読有, 8, (2018), 264–270
- R. Tachibana, T. Terai, G. Boncompain, S. Sugiyama, N. Saito, F. Perez, Y. Urano, Improving the solubility of artificial ligands of streptavidin to enable more practical reversible switching of protein localization in cells, *ChemBioChem*, 査読有, 18, (2017), 358–362
- Y. Mori, M. Maruyama, Y. Takahashi, H. Y. Yoshikawa, S. Okada, H. Adachi, S. Sugiyama, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, M. Yoshimura, Y. Mori, Crystallization of acetaminophen form II by plastic-ball-assisted ultrasonic irradiation, *Appl. Phys. Express*, 査読有, 10, (2017), No. 025501 (4 pages)
- Y. Mori, M. Maruyama, Y. Takahashi, H. Y. Yoshikawa, S. Okada, H. Adachi, S. Sugiyama, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, M. Yoshimura, and Y. Mori, Metastable crystal growth of acetaminophen using solution-mediated phase transformation, *Appl. Phys. Express*, 10, (2017), No. 015501 (3 pages)

T. Nakane, S. Hanashima, M. Suzuki, H. Saiki, T. Hayashi, K. Kakinouchi, S. Sugiyama, S. Kawatake, S. Matsuoka, N. Matsumori, E. Nango, J. Kobayashi, T. Shimamura, K. Kimura, C. Mori, N. Kunishima, M. Sugahara, Y. Takakyu, S. Inoue, T. Masuda, T. Hosaka, K. Tono, Y. Joti, T. Kameshima, T. Hatsui, M. Yabashi, T. Inoue, O. Nureki, S. Iwata, M. Murata, and E. Mizohata, Membrane protein structure determination by SAD, SIR, or SIRAS phasing in serial femtosecond crystallography using an iododetergent, *Proc Natl Acad Sci USA*, 113, (2016), 13039-13044

Y. Tominaga, M. Maruyama, M. Yoshimura, H. Koizumi, M. Tachibana, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Tsukamoto, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, H. Y. Yoshikawa, and Y. Mori, Promotion of protein crystal growth by actively switching crystal growth mode via femtosecond laser ablation, *Nat. Photonics*, 10, (2016), 723-726

M. Maruyama, Y. Hayashi, H. Y. Yoshikawa, S. Okada, H. Koizumi, M. Tachibana, S. Sugiyama, H. Adachi, H. Matsumura, T. Inoue, K. Takano, S. Murakami, M. Yoshimura, and Y. Mori, A crystallization technique for obtaining large protein crystals with increased mechanical stability using agarose gel combined with a stirring technique, *J. Cryst. Growth*, 452, (2016), 172-178

S. Sugiyama, S. Ishikawa, H. Tomitori, M. Niiyama, M. Hirose, Y. Miyazaki, K. Higashi, M. Murata, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, K. Kashiwagi, K. Igarashi, and H. Matsumura, Molecular mechanism underlying promiscuous polyamine recognition by spermidine acetyltransferase, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 76, (2016), 87-97

M. Matsuoka, K. Kakinouchi, H. Adachi, M. Maruyama, S. Sugiyama, S. Sano, H. Y. Yoshikawa, Y. Takahashi, M. Yoshimura, H. Matsumura, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, and K. Takano, Protein crystallization with paper, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 55, (2016), No. 050302 (3 pages)

[学会発表](計 10 件)

天野妙法華、成瀬太智、柏木敬子、五十嵐一衛、杉山成、ポリミアン優先取込システムに関与する好熱菌由来 PotA の結晶構造解析、高大連携科学系研究フォーラム、2018. 12. 16、高知大学朝倉キャンパス

天野妙法華、成瀬太智、柏木敬子、五十嵐一衛、杉山成、Crystal structure of PotA, a membrane-associated ATPase of the spermidine-preferential uptake system in *Thermotoga maritima*、第 56 回日本生物物理学会年会、2018. 9. 16、岡山大学津島キャンパス

東浦彰史、高木賢治、中川敦史、杉山成、薬剤スクリーニングの効率化を目指した蛋白質結晶の高圧凍結とハイドロゲル結晶化とのハイブリッド法の開発、第 16 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2018)、2018. 9. 3-4、神奈川県マホロバ・マインズ三浦

永安麻優、土川博史、杉山成、松岡茂、原利明、村田道雄、島本知英、吉川武男、脂肪酸結合タンパク質 FABP7 の選択的阻害剤の開発を目指した環状脂肪酸誘導体の合成と親和性評価、日本化学会第 98 春季年会、2018. 3. 20-23、日本大学理工学部船橋キャンパス

野村舞、林史夫、茂木俊憲、杉山成、原利明、松岡茂、村田道雄、園山正史、Ligand-Binding Properties of Wild-Type and Mutant Fatty-Acid-Binding Protein 3、第 7 回日本生物物理学会関東支部会、2018. 3. 13-14、東京大学駒場 I キャンパス

坂本沙祐里、杉山成、洲崎悦子、平岡修、単量体ストレプトアビジンのタンパク質発現用タグとしての有用性について、第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、2017. 10. 22、徳島大学蔵本キャンパス

坂本沙祐里、杉山成、洲崎悦子、平岡修、新規抗マラリア薬標的タンパク質、PfERC の大腸菌を用いた高発現と結晶化用試料としての評価、第 55 回日本薬学会中国四国支部学術大会、2016. 11. 5-6、就実大学

平岡修、坂本沙祐里、洲崎悦子、杉山成、新規抗マラリア薬標的タンパク質、PfERC の結晶化用試料の調製、第 68 回日本生物工学会大会、2016. 9. 26-30、富山国際会議場

S. Sugiyama, Growth of high-quality and large protein crystals by new seeding techniques, The 18th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy (ICCGE18), 2016. 8. 7-12, Nagoya, Japan 招待講演

S. Sugiyama, Growth of Protein Seed Crystals with High-Strength Hydrogels, 16th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules (ICCBM16), 2016. 6. 2-7, Prague, Czech Republic 招待講演

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：五十嵐一衛

ローマ字氏名：IGARASHI Kazuei

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：柏木敬子

ローマ字氏名：KASHIWAGI Keiko