

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：34401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22385

研究課題名（和文）機能不明酵素の登録済み結晶構造を基にした非ATP依存性リン酸化酵素の大量同定

研究課題名（英文）multiple identification of non-ATP-dependent kinases based on registered crystal structures of enzymes with unknown function

研究代表者

藤橋 雅宏（Fujihashi, Masahiro）

大阪医科薬科大学・医学部・准教授

研究者番号：10397581

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では「生体内リン酸化反応のリン酸基供与体はATP」という常識の打破に挑んだ。データベースに登録された酵素の中から、立体構造上の特徴からATPが結合しにくいと考えられる酵素を選んで活性を測定したところ、複数のピロリン酸依存性リン酸化酵素（PPi-kinase）を同定できた。また、PPi-kinaseのPPi認識部位とATP依存性リン酸化酵素のリン酸基受容基質の構造を組み合わせ、myo-inositolの3位をPPiでリン酸化する新しいPPi-kinaseの開発にも成功した。本研究の成果により、環境と予算の双方に親和的なリン酸化反応が可能になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リン酸化反応は生体内における様々な場面で重要な役割を果たしている。これまで「生体内リン酸化反応のリン酸基供与体はATP」と信じられてきたが、本研究により広く例外が存在する可能性が示された。今後ATPを使わない様々なリン酸化反応が発見され、生命活動の仕組みがより深く理解されることが期待される。

またリン酸化は、化粧品の有効成分の安定性を高めるなど、産業的にも重要である。本研究で成功したPPi-kinaseの創成手法を応用すれば、ATPに比べて3桁安価なピロリン酸を用いて様々な物質を酵素でリン酸化することが可能になり、環境的にも経済的にも優しい有用物質生産の実現が期待される。

研究成果の概要（英文）：We challenged to remove the common notion that “The phosphate group donor in biological process is ATP”. We searched kinases that have no pocket to recognize ATP from kinases registered in the three-dimensional structure database. Their pyrophosphate-dependent kinase (PPi-kinase) activities were investigated against the ligand library for potential phosphate acceptors. Several PPi-kinase were identified by this strategy. Also, we transplanted the myo-inositol recognition residues of ATP-dependent myo-inositol-3-kinase into PPi-dependent myo-inositol-1-kinase based on their three-dimensional structure similarity. The transplantation successfully converted PPi-dependent myo-inositol-1-kinase into PPi-dependent myo-inositol-3-kinase. Some phosphorylated products are industrially important. Our results may contribute to develop the phosphorylation process that is friendly to both the environment and our wallet.

研究分野：構造生物化学

キーワード：ピロリン酸 結晶構造

1. 研究開始当初の背景

リン酸化反応は、代謝・遺伝子の発現制御・環境変化への応答など様々な必須不可欠の場面に関わる。ここで、ごく一部の例外を除いてリン酸化反応の ATP がリン酸基の供給源であると広く信じられている。これに対し我々は、ピロリン酸 (PPi) をはじめとする様々な高エネルギーリン酸結合を持つ化合物が、多くの場面で ATP の代替をしていると考えている。本研究では立体構造並びに一次配列のデータベースに登録された情報を基に、PPi 依存性のリン酸化酵素 (PPi-kinase) を大量同定することにより、「生体内リン酸化反応のリン酸基供与体は ATP」という常識の転換を図る。

2. 研究の目的

現在ではゲノムデータベースをはじめとした様々なデータベースが整備されている。これらには無数のリン酸化酵素と考えられる酵素も登録されているが、どのような化合物をリン酸化するのかの情報が無い例が非常に多い。このような機能未知酵素の中には、実際のリン酸供与基質が ATP 以外の化合物であるにもかかわらず、リン酸基供与基質として ATP のみを用いたリン酸基受容体のスクリーニングを行ったために活性が検出できていなかった例も存在する (例えば Rodionova IA *et al.* *Environ. Microbiol.* 15(8), 2254-66 (2013))。本研究では結晶構造データベースに登録された登録済情報をもとに、機能未知として埋もれている PPi-kinase を発掘する。このようにして見つかる PPi-kinase は、既に結晶構造が決定されている酵素である事から、PPi 複合体の結晶構造解析も比較的容易と考えられる。実際に PPi 複合体の結晶構造を決定することで、PPi 認識に重要なアミノ酸モチーフ配列を同定する。このモチーフ配列を手がかりに、ゲノムデータベースにアクセスすれば、PPi-kinase の大量同定が期待できる。

本研究を基にした PPi-kinase の大量同定は様々な波及効果をもたらすことが期待できる。PPi は ATP の 1/1000 程度の価格で入手できるため、うまみ調味料であるイノシン酸の PPi による生産技術のように、産業的酵素リン酸化のコストの大幅低減が期待できる。原始地球上には ATP よりも PPi や無機ポリリン酸が多く存在したと考えられるが、その様な環境下で原始生命体がどのように生まれ、進化してきたかの情報も得られると期待される。ヒトにおいても、例えば癌の増殖にはシグナル因子のリン酸化が関係することが知られており、PPi-kinase の存在を考えることで新しい癌治療手法の手がかりがつかめるかもしれない。

3. 研究の方法

応募者が過去に行った研究 (文献 1) の適用範囲の拡大から取り組むことで、「生体内リン酸化反応のリン酸基供与体は ATP」という常識の着実な転換をめざした。

これまでに多数のリン酸化酵素と推測されるタンパク質の結晶構造が解析されている。このためどの化合物をリン酸化するのが未知の酵素であっても、立体構造の相同性を基にすればリン酸基供与基質 (主に ATP) とリン酸基受容基質の結合する位置を高い精度で予測できる。このリン酸基供与基質について ATP のアデノシンが結合すると考えられるポケットが、酵素由来のアミノ酸残基で埋まっている酵素が一部に存在する。このような酵素には ATP は結合しないと考えられるが、リン酸化酵素である可能性は高いので、その酵素を PPi-kinase の候補とする。続いてこのような候補酵素のそれぞれについて、遺伝子発現系の構築を行った。また活性の

スクリーニングを行うため、リン酸受容基質の候補となる化合物のライブラリを構築した。

また、様々な化合物の PPI-kinase によるリン酸化を可能にするためには、データベースに眠る機能未知酵素の機能同定に加えて、既知の ATP 依存性のリン酸化酵素 (ATP-kinase) のリン酸基受容体結合部位と PPI-kinase の PPI 認識部位を組み合わせることによる、新しい PPI-kinase の創成も有効であると考えられる。この観点から、過去の研究で同定した PPI 依存性 *myo*-inositol-1-kinase (PPI-Ins1K) の PPI 認識部位と、ATP 依存性 *myo*-inositol-3-kinase (ATP-Ins3K) の *myo*-inositol 認識部位を組み合わせることによる、PPI 依存性 *myo*-inositol-3-kinase (PPI-Ins3K) の構築も試みた。

4. 研究成果

タンパク質立体構造データベース (PDB) の探索からは、数例の PPI-kinase 候補を見いだした。続いて ATP-kinase のリン酸基受容基質を参考に、化合物ライブラリを構築した。現在のところ見いだした PPI-kinase のリン酸基供与基質が PPI であることは予測できるが、リン酸基受容基質が何であるかを予測することは難しい。このため ATP-kinase のリン酸基受容基質を参考にした、化合物ライブラリの構築によって、多様なリン酸基受容基質に対応する PPI-kinase についての活性検出が可能な体制を構築した。いくつかの PPI-kinase 候補については、この化合物ライブラリを用いての活性検出に成功した。本研究では PPI-kinase の大量同定には至らなかったが、提案した手法で PPI-kinase の効率的な同定が可能である事は示せた。このことは、本手法の大規模な展開により、PPI-kinase の大量同定が十分可能である事を示している。

PPI-Ins1K と ATP-Ins3K の立体構造上の特徴をもとにした PPI-Ins3K の構築も行った(図 1)。それぞれの酵素は図 2 のように *myo*-inositol を認識する。この図にも示されているように、PPI-Ins1K で *myo*-inositol を認識する残基のうち D11, G25, Q141, R145, D234 は ATP-Ins3K でも保存されている。一方、PPI-Ins1K の N78, S89, L116 の 3 残基は ATP-Ins3K の L77, L87, V112 に対応している。始めに PPI-Ins1K におけるこれら 3 つの残基を、対応する ATP-Ins3K の残基に置き換えたところ (N78L/S89L/L116V 三重変異体)、PPI によって *myo*-inositol の 3 位をリン酸化する酵素となった。続いて三重変異のうち、どの変異が重要かを確かめるため、3 つの単変異酵素 (N78L, S89L, L116V)、3 つの二重変異酵素 (N78L/S89L, S89L/L116V, L116V/N78L) を作成し、それぞれの PPI 依存性 *myo*-inositol リン酸化活性を確かめたところ、N78L/S89L 二重変異体は *myo*-inositol-1-phosphate (Ins1P) を生成せず、*myo*-inositol-3-phosphate (Ins3P) のみを生成した。N78L 単変異体は Ins1P と Ins3P の両方を生成した。そのほかの変異体は野生型と同じ Ins1P のみを生成した。以上のことから、PPI-Ins1K を PPI-Ins3K に変換するには、第一に N78L 変異、続いて S89L 変異が重要であることが示された。また、この PPI-Ins3K 作成の成功は、これまでにわずかしかなかった PPI 依存性リン酸化酵素に、無数同定されている ATP 依存性リン酸化酵素の立体構造上の特徴を導入することにより、任意のリン酸基受容体に対する PPI-kinase のデザインが可能である事を示唆している。

参考文献

1. Nagata, R., *Fujihashi, M., Sato, T., Atomi, H. & *Miki, K. (2018), Identification of a pyrophosphate-dependent kinase and its donor selectivity determinants., *Nat. Commun.*, **9**, 1765

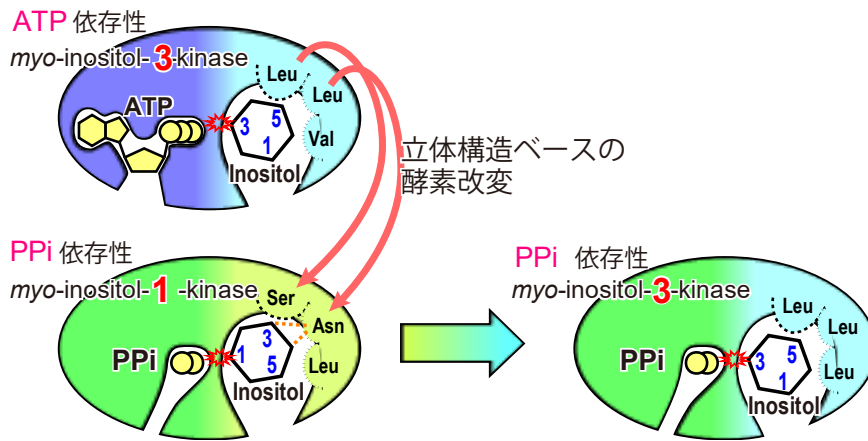


図 1: ATP 依存性 *myo*-inositol-3-kinase (ATP-Ins3K) の inositol 認識残基の移植による、PPi 依存性 *myo*-inositol-1-kinase (PPi-Ins1K) の PPi 依存性 *myo*-inositol-3-kinase (PPi-Ins3K) への改変

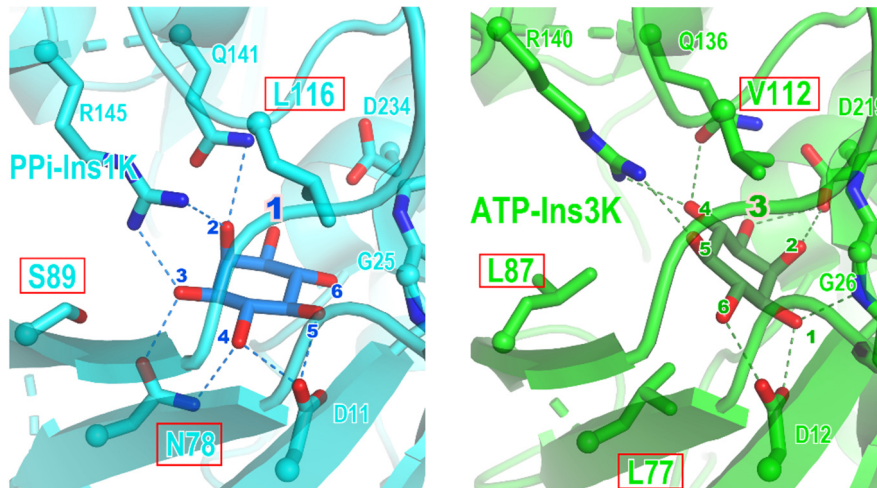


図 2: PPi 依存性 *myo*-inositol-1-kinase の *myo*-inositol 認識部位 (左) と、ATP 依存性 *myo*-inositol-3-kinase の *myo*-inositol 認識部位 (右)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tashiro Ryo, Sato Takaaki, Atomi Haruyuki, Miki Kunio, Fujihashi Masahiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Altering the Phosphorylation Position of Pyrophosphate-Dependent myo-Inositol-1-Kinase Based on Its Crystal Structure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 794 ~ 799
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acscchembio.0c00733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤橋雅宏
2. 発表標題 結晶構造を基にした無機ピロリン酸依存性リン酸化酵素の探索
3. 学会等名 酵素・補酵素研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田代峻, 佐藤喬章, 跡見晴幸, 三木邦夫, 藤橋雅宏
2. 発表標題 立体構造を基盤とした機能改変による新しいピロリン酸依存性キナーゼの創成
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuhei Nagata, Masahiro Fujihashi, Takaaki Sato, Haruyuki Atomi, Kunio Miki
2. 発表標題 Structural analysis on a new pyrophosphate-dependent kinase reveals its donor selectivity determinants
3. 学会等名 16th conference of the Asian crystallographic association (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------