

機関番号 : 14301

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21780069

研究課題名 (和文) 出芽酵母における NADP (H) 合成および分解系の制御機構

研究課題名 (英文) The mechanism underlying the regulation of biosynthesis and degradation of NADP(H) in *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

河井 重幸 (SHIGEYUKI KAWAI)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号 : 00303909

研究成果の概要 (和文) :

NAD(H) と NADP(H) の機能の違いとその諸機能が生命現象に与えるインパクトの大きさから、NADP(H) の合成および分解系の理解は重要である。本研究では、特に出芽酵母由来 NADPH 合成酵素 (NADH キナーゼ: NADHK, Pos5) と NADH との複合体の立体構造を、X 線結晶構造解析により初めて分解能 2.0 Å で決定した。本構造を、構造既知のヒトおよび細菌由来 NADP⁺合成酵素 (NAD キナーゼ) の立体構造と比較するなどして詳細に解析した結果、Pos5 の Arg293 が、Pos5 が高い NADH キナーゼ活性を示す構造要因の一つと推察された。

研究成果の概要 (英文) :

Due to the difference of the physiological roles between NAD(H) and NADP(H) as well as the significant impacts of them on the cellular metabolism, it is important to elucidate the mechanism underlying the regulation of biosynthesis and degradation of NADP(H). In this study, the tertiary structure of budding yeast NADPH-biosynthetic enzyme (NADH kinase; Pos5) complexed with NADH was determined at 2.0 Å. Detailed analysis including the comparison of the tertiary structure of Pos5 with those of human and bacterial NADP⁺-biosynthetic enzymes (NAD kinases) revealed that the Pos5 Arg293 is at least one of the structural determinants of Pos5 for high NADH kinase activity and for discriminating NADH from NAD⁺.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野: 農学

科研費の分科・細目: 農芸化学・応用微生物学

キーワード: NADP(H)、NAD(H)、NAD キナーゼ、NADH キナーゼ、リン酸化、NADP(H) フォスファターゼ、結核菌

1. 研究開始当初の背景

NAD(H) は異化反応における電子運搬体として、さらに ADP リボシル化反応やヒストン脱アセチル化反応の基質として重要であり、NADP(H) は主に生合成反応および酸化ストレスからの防御反応における電子運搬体として機能する。NAD(H) と NADP(H) の機能の違いとその諸機能が生命現象に与えるインパ

クトの大きさから、NADP(H) の合成および分解系の理解は重要である。さらに、NADP(H) の生理機能の重要性を考えると、NADP(H) 合成系酵素が細胞内外の変化に応じた可逆的なリン酸化/脱リン酸化による活性制御を受けている可能性は高い。また、NADP⁺合成酵素 (NAD キナーゼ: NADK) の反応産物 NADP(H) による NADK 活性の阻害も合目的であると考えられるが、ヒト由来 NADK の NADP(H) による阻

害機構は不明である。真核生物 NADK の立体構造も決定されていない。出芽酵母由来 NADPH 合成酵素 (NADH キナーゼ: NADHK, Pos5) の立体構造レベルでの NADHK 反応触媒機構 (特に Pos5 が強力な NADHK 活性を示す構造要因) も不明である。

2. 研究の目的

上記の学術的背景に基づき、本研究では以下の(1)~(4)を明らかにする。(1) NADP(H) 合成系酵素のリン酸化による制御の詳細を明らかにする。(2) ヒト由来 NADK の NADP(H) による活性制御機構を明らかにする。(3) 出芽酵母の NADP(H) 分解酵素 (NADP(H)ase) を同定する。(4) Pos5 が強力な NADHK 活性を示す構造要因を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) NADP(H) 合成系酵素のリン酸化: NADPH 合成酵素である Zwf1 (グルコース-6-リン酸脱水素酵素: G6PDH) は、アルファ・ファクター (性フェロモン) 処理によりリン酸化される。アルファ・ファクター処理後、細胞の同調性を確認し、細胞抽出物を調製してその活性を調べた。出芽酵母由来 NADK (Utr1) のリン酸化による局在性変化を調べるために、Utr1 の可視化を GFP を用いて試みた。

(2) ヒト由来 NADK の NADP(H) による活性制御: 均一な精製ヒト由来 NADK を取得し、その詳細な機能解析を行った。

(3) 出芽酵母の NADP(H)ase の同定: 出芽酵母は、構成的に発現する酸性 (Pho3) およびアルカリフォスファターゼ (Pho13)、ならびにリン酸で発現が抑制される酸性 (Pho5/10/11) およびアルカリフォスファターゼ (Pho8) を有する。これらの非特異的フォスファターゼの干渉を除外するため、Pho13 遺伝子欠損株 (*pho13*) および対照としての野生株を 10 mM リン酸および 15 μ M チアミン存在下で培養し、その NADP(H)ase 活性を測定した。

(4) Pos5 が強力な NADHK 活性を示す構造要因: Pos5-NADH 複合体の立体構造を X 線結晶構造解析により決定し、結核菌およびヒト由来 NADK の立体構造 (立体構造決定済み) との詳細な比較解析および部位特異的変異導入実験を行った。

4. 研究成果

(1) NADP(H) 合成系酵素のリン酸化: アルファ・ファクター処理無しでは G6PDH 活性が 2.5U/mg、処理ありでは 3.1U/mg であった。これは、同処理により、G6PDH (Zwf1) がリン酸化された結果、その活性が若干 (約 24%) 増大したことを示唆した。一方、Utr1 の十分な可視化には至らなかった。

(2) ヒト由来 NADK の NADP(H) による活性制御: 均一な精製ヒト由来 NADK の取得およびその機能解析を試みた。しかし、得られたヒト由来 NADK は約 43kDa で、N 末端配列が三箇所切断除去された、不均一な標品であった。そこでヒト由来 NADK の N 末端を均一にするため、あらかじめ N 末端を除いたヒト由来 NADK の発現系を構築し、同時に発現量の向上も試みた。大腸菌宿主および発現条件を検討し、無細胞抽出液の比活性で、既報の約 20 倍のヒト由来 NADK の発現量を達成した。発現量の上昇には、pLysS が大きく寄与したと考えられた。ヒスタグを用いて TALON で精製したヒト由来 NADK の N 末端配列解析を行ったところ、N 末端のヒスタグ配列が確認できた。従って、当該ヒト由来 NADK は N 末端の切断を受けていない、均一な標品であると判断できた。次にヒト由来 NADK の性質を調べた。ヒト由来 NADK は NAD^+ に対してはミカエリスメンテン型の飽和曲線を、ATP に対して

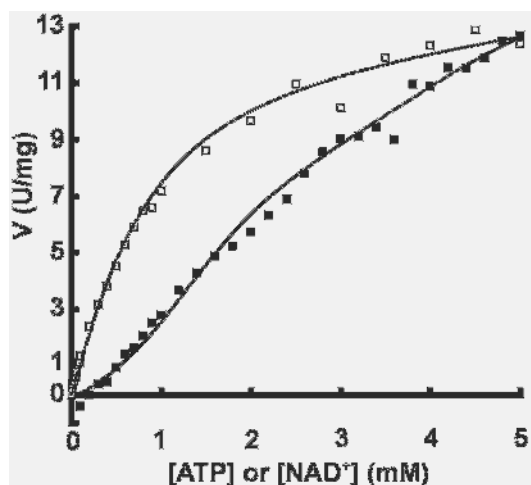


図 1 ヒト由来 NADK 活性に対する基質濃度の影響
ATP (黒四角)、 NAD^+ (白四角)。

はシグモイド型の曲線を示した (図 1)。

本酵素は NADK 活性の約 10% の NADHK 活性を示した。他の酵素学的諸性質に関しては、ATP に対してシグモイド曲線を示すこと、NADHK 活性を持つことなど以外は既報と大きな違いはなかった。なお、結核菌や枯草菌の NADK は、ATP に対しシグモイド型を示すことが報告されているが、ヒト由来 NADK の ATP に対する曲線がシグモイド型を示すという知見は本研究ではじめて得られた。次に、 NADP^+ 、NADPH、および NADH がヒト由来 NADK の NADK 活性に及ぼす影響を調べた。ヒト由来 NADK は酸化型補酵素 NADP^+ では阻害されなかったが、還元型補酵素 NADPH および NADH でその活性が阻害された。このことから、ヒト由来 NADK はレドックス状態により制御されてい

ることが示唆された。また、ヒト由来 NADK は NADP^+ で阻害されなかったが、結核菌 NAD キナーゼ Ppnk は NADP^+ で阻害されると報告されているので、 NADP^+ 類似化合物が結核治療薬になる可能性も示唆された。NADH および NADPH による NADK 阻害の形式を調べたところ、NADH による阻害は NAD^+ に対する拮抗阻害であることが示された。なお、 K_i は 0.13 mM であった。一方、NADPH による阻害も NAD^+ に対する拮抗阻害であることが示された。 K_i は 0.34 mM であった。

(3) 出芽酵母の NADP(H)ase の同定：方法欄記載の方法で NADP(H)ase 活性を測定したところ、出芽酵母野生株、*pho13* とともに一晩反応させてようやく活性が検出される程度の微弱な NADPase 活性しか示さなかった。

(4) Pos5 が強力な NADHK 活性を示す構造要因：Pos5-NADH 複合体の立体構造を NADHK として初めて決定した(図 2)。

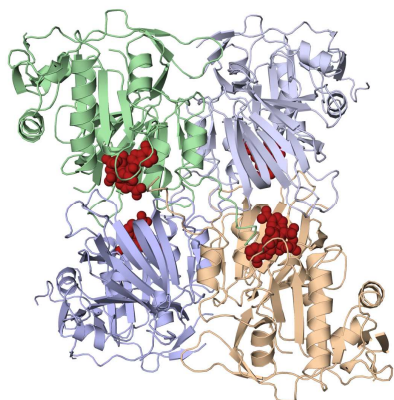


図 2 Pos5-NADH 複合体の立体構造
ホモ四量体構造を形成する。各サブユニットに NADH 分子 (赤色) が一分子ずつ結合する。

結核菌およびヒト由来 NADK の立体構造との詳細な比較解析を通じて、Pos5 の Arg293 に起因する NADH 結合部位の表面電荷の差異が当該要因の一つではないかとの仮説をたてた(図 3)。本 Arg293 は、Ppnk およびヒト由来 NADK の立体構造上では各々 His226 ならびに His351 に対応していた。なお、真菌 NADK は Pos5 ホモログタンパク質と Utr1 ホモログタンパク質に分類されるが、Pos5 Arg293 は真菌 Pos5 ホモログタンパク質の一次構造中では Arg として、Ppnk His226 とヒト由来 NADK His351 は真菌 Utr1 ホモログタンパク質の一次構造中では His として保存されていた(以下、かかる特徴的な保存様式を Pos5 ホモログタンパク質特異的な保存と称する)。なお、Pos5 の NADH 結合部位を構成する殆どのアミノ酸残基は、Ppnk およびヒト由来 NADK のそれと立体構造上で保存されていた。Pos5 の Arg293 を His 残基に置換した Pos5 R293H 精製酵素の NADK 活性に対する NADHK 活性の比

(NADHK/NADK 比) は、予想どおり 8.6 から 2.1 に減少した。すなわち、NADK 活性の比活性(U/mg)は His 残基の置換により 0.7 から 1.7 へと上昇し、NADHK 活性の比活性は 6.0 から 3.6 へと減少した。より詳細な情報を得るため精製酵素の動力学的パラメーターを決定したところ、Pos5 R293H の NAD^+ に対する K_m [$K_m(\text{NAD}^+)$] が低下したことから、確かに当該 Arg293 は野生型 Pos5 の低い NADK 活性[高い $K_m(\text{NAD}^+)$] の要因の一つと推察された。一方、 V_{max} に関しては Pos5 R293H の $V_{max}(\text{NADH})$ が野生型 Pos5 のそれと比べて約 50% 減少した。これは、確かに当該 Arg293 が野生型 Pos5 の高い NADHK 活性[高い $V_{max}(\text{NADH})$] の要因の一つであることを示した。以上の結果から、Pos5 の Arg293 は Pos5 の高い NADHK 活性の構造要因の一つであると考えられた。

Pos5 の Arg293 以外の構造要因の候補として、ニコチンアミド結合部位近傍の荷電状態に影響を及ぼしている Pos5 His231 に着目した。Pos5 His231 は、立体構造上で Ppnk Glu164 に、さらにヒト由来 NADK Asp289 に対応していた。NADK ホモログ全体においても Asp 残基

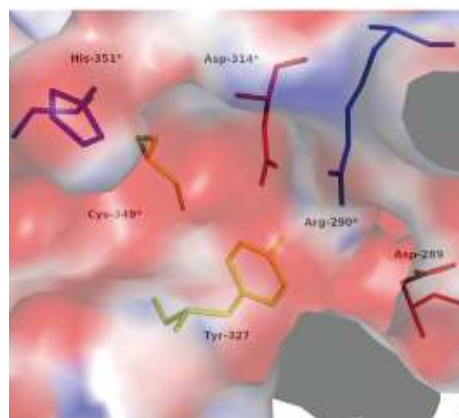
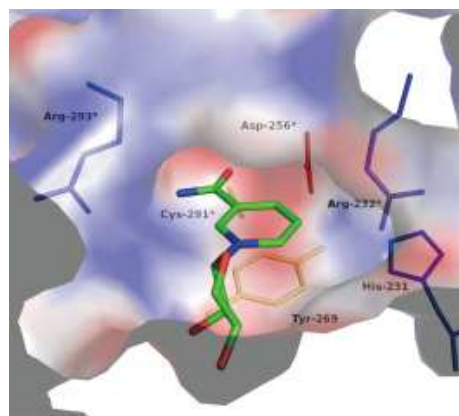


図 3 Pos5(上)およびヒト由来 NADK(下)の NAD(H) 結合部位の表面電荷

青色が陽性電荷、赤色が陰性電荷を示す。Pos5 の陽性電荷は、Pos5 Arg293 に起因する(Arg 残基の pKa は 12)。当該残基は、ヒト NADK においては、His351 に対応する(His 残基の pKa は 6)。

として保存されていた。さらに、Pos5 His231 は Pos5 ホモログタンパク質に特異的に完全に保存されていた。しかし、Pos5 His231 をヒト NADK 型の Asp に置換した Pos5 H231D 精製酵素は NADK 活性を完全に喪失し、NADHK 活性も激減した。Pos5 R293H H231D 精製酵素に至っては、NADK および NADHK 両活性が消失した。したがって、Pos5 His231 が基質識別に関わるかどうかを明確にすることはできなかった。

次にヒト由来 NADK の NADHK 活性の上昇を期待して、His351 残基 (Pos5 Arg293 に対応: 図 3) を Arg 残基に置換したが、ヒト由来 NADK H351R 精製酵素の NADHK および NADK 両活性が消失した。そこで、Pos5 Arg293 の側鎖の配向を助ける残基の存在を想定し、当該 Arg293 と相互作用する残基を精査したところ、Ser272 が Arg293 の側鎖と水素結合を形成していた。Ser272 はヒト由来 NADK においては、Ala330 残基に対応していた。なお、当該 Ser 残基は、Pos5 ホモログの全ておよび NADK ホモログの一部においては Ser 残基として特異的に保存されており、NADK ホモログの残り大部分においては Ala 残基として高度に保存されていた。そこで、ヒト由来 NADK H351R の Ala330 を Ser 残基に置換したところ、精製酵素の NADHK および NADK 両活性が回復した。さらに、NADHK/NADK 比は 0.043 から 1.3 に大きく増大した (ヒト由来 NADK H351R A330S の活性自体は低下した。すなわち、二重置換により、NADK 活性の比活性は 14 から 0.00192 へと低下し、NADHK 活性の比活性も 0.6 から 0.0026 へと低下した)。本結果は、Pos5 Arg293 の重要性を支持するとともに、Pos5 Ser271 の Arg293 側鎖の配向を助ける上での重要性も示した。また、出芽酵母が NAD⁺ 生合成前駆体キノリン酸を細胞外へ分泌すること、および本キノリン酸の再利用が生理的に重要であることなども見出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① Kazuto Ohashi, Shigeyuki Kawai, Mari Koshimizu, & Kousaku Murata: NADPH regulates human NAD kinase, a NADP⁺-biosynthetic enzyme. **Mol. Cell. Biochem.**, 査読有り, in press (2011).

[学会発表] (計 11 件)

① 河井重幸 出芽酵母 Pos5 が高い NADH キナーゼ活性を示す構造要因 日本農芸化学会 2011 年度大会 2011 年 3 月 26 日 京都女子大学、京都

② 大橋一登, 河井重幸 ヒト機能未知タンパク質 C5orf33 の機能解析 日本農芸化学

会 2011 年度大会 2011 年 3 月 26 日 京都女子大学、京都

③ Shigeyuki Kawai Physiological significance of the NAD⁺ biosynthetic kynurenine pathway including the secretion and re-utilization of quinolinic acid 第 83 回日本生化学会大会 2010 年 12 月 7 日 神戸ポートアイランド、神戸市

④ 河井重幸 出芽酵母 *de novo* NAD⁺ 合成系の新規な側面 日本生物工学会平成 22 年度大会 (第 62 回) 2010 年 10 月 28 日 フェニックス・シーガイア・リゾート、宮崎市

⑤ 河井重幸 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるキノリン酸の合成と細胞外分泌の分子機序 日本ビタミン学会第 62 回大会 2010 年 6 月 12 日 いわて県民情報交流センター、盛岡市

⑥ 河井重幸 出芽酵母による NAD⁺ 合成系中間体キノリン酸の細胞外への分泌 日本農芸化学会 2010 年度大会 2010 年 3 月 30 日 東京大学 駒場キャンパス、東京

⑦ 藤原広樹, 河井重幸 出芽酵母の高濃度酸素ガスに対する応答機序 日本農芸化学会 2010 年度大会 2010 年 3 月 30 日 東京大学 駒場キャンパス、東京

⑧ 大橋一登, 河井重幸 ヒト NAD キナーゼの還元型補酵素による活性制御 日本農芸化学会 2010 年度大会 2010 年 3 月 29 日 東京大学 駒場キャンパス、東京

⑨ 河井重幸 出芽酵母 Pos5 が示す強力な NADH キナーゼ活性の構造基盤 第 2 回リン化合物討論会 (第 29 回 C-P 化合物研究会) 2009 年 12 月 5 日 静岡大学 浜松キャンパス

⑩ 安藤卓哉, 河井重幸 出芽酵母 Pos5 が強力な NADH キナーゼ活性を示し得る構造要因 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 22 日 神戸ポートアイランド、神戸市

⑪ 大橋一登, 河井重幸 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の NAD 合成系における新規キノリン酸利用経路 日本ビタミン学会第 61 回大会 2009 年 5 月 30 日 京都学園大学 悠心館、亀岡市

[その他]

ホームページ等

<http://www.molbiotech.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河井 重幸 (SHIGEYUKI KAWAI)

研究者番号 : 00303909

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :