

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：82118

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06855

研究課題名(和文) イノシトールリン脂質キナーゼのリン酸基転移反応の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanism of transphosphorylation by a phosphatidylinositol kinase

研究代表者

佐藤 友美 (SATO, Tomomi)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・博士研究員

研究者番号：20759211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イノシトールリン脂質キナーゼPI5P4K betaを中心としてそのリン酸化触媒反応機構を解明するため、1)SPRによるPI5P4K betaと脂質やヌクレオチドとの相互作用解析、2)阻害剤との複合体のX線結晶構造解析、3)PI5P4K alpha/gammaの結晶化を行った。その結果、PI5P4K betaと脂質二重膜とのバックグラウンドの結合が比較的強く、基質であるPI5Pとの結合は比較的弱いと予想されることを明らかにした。また、3種類の阻害剤の電子密度の観測とPI5P4K alphaの結晶を得ることに成功している。

研究成果の概要(英文)：In this research project, I performed following three experiments in order to elucidate catalytic mechanism of phosphorylation by an inositol phospholipid kinase, PI5P4K beta. 1) Interaction analysis between PI5P4K beta and lipid/nucleotide by SPR, 2) X-ray crystallographic structural analysis in complex with inhibitors, 3) Crystallization of PI5P4K alpha/gamma. From the results of the SPR analysis, I elucidated that the interaction between background lipid and PI5P4K beta is relatively strong (micro molar order) while the intersection between substrate (PI5P) and PI5P4K beta is predicted to be weak. I also succeeded in observation of electron density of 3 inhibitors and crystallization of PI5P4K alpha.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 キナーゼ 相互作用解析 イノシトールリン脂質 結晶化 PI5P4K リン酸化反応機構 X線結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

ホスファチジルイノシトールリン酸(PIP)は、脂質二重膜中に存在するリン脂質の一種であり、ホスファチジルイノシトール(PI)のイノシトール環の3, 4, 5位のヒドロキシ基が様々な組み合わせでリン酸化を受けることにより産生される。PIPには、リン酸化状態が異なる7種類が存在し、それぞれが別々のタンパク質により認識されることによりセカンドメッセンジャーとして働き、生体内での様々な重要な調節を行っている(G. D. Paolo and P. D. Camilli, *Nature*, 2006, review)。

PIやPIPのリン酸化は、イノシトールリン脂質キナーゼを介したATPからのリン酸基転移反応により行われる。イノシトールリン脂質キナーゼは、その触媒する反応の違いにより合計で19種類のアイソフォームが存在し、その種類によって癌や双極性障害など多くの疾病に関わることから、創薬ターゲットとしても重要視されており、その反応機構の解明が希求されている。

本研究開始時までには、イノシトールリン脂質キナーゼの反応機構解明のため、アポ体やヌクレオチドが結合した状態のX線結晶構造解析が行われてきた(V. D. Rao *et al.*, *Cell*, 1998/A. Baumlova *et al.*, *EMBO reports*, 2014 など)。ところが、リン酸化反応の直前の状態である「キナーゼ-基質-ATP」との三者複合体構造は解析されておらず、最も重要な状態の構造情報は得られていないため反応機構解明には至っていない。

イノシトールリン脂質キナーゼの基質であるPIやPIPは脂質二重膜中に存在するため、イノシトールリン脂質キナーゼによる基質のリン酸化は膜上で行われると考えられる。実際、基質をリポソームに組み込むことで脂質二重膜が存在する状態にすると、キナーゼ活性が上昇するという報告もあるため(Q. Zhou *et al.*, *Nature Communications*, 2013)、

脂質二重膜はイノシトールリン脂質キナーゼの反応に関して重要であると考えられる。さらに、同様の膜結合型でPI(4)Pを認識するセラミド輸送タンパク質においては、脂質二重膜が存在しないと親和性が約250倍低いことが知られている(T. Sugiki *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2012)。従って、イノシトールリン脂質キナーゼの三者複合体の結晶構造を捉え、その反応機構を解明するためには、脂質二重膜と相互作用した状態での解析が必要である。

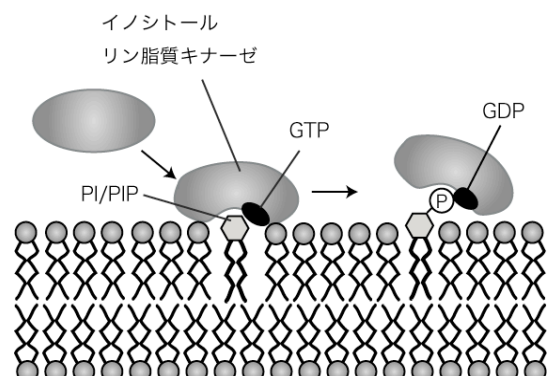


図1. イノシトールリン脂質キナーゼによるPI/PIPのリン酸化反応(予想図)

申請者の所属する高エネルギー加速器研究機構においては、イノシトールリン脂質キナーゼの一種であるPI5P4K $\beta$ の構造生物学的研究が本申請の研究協力者であるアメリカシンシナティ大学佐々木敦朗Associate Professorと産業技術総合研究所の竹内恒主任研究員と共同で進められてきた。PI5P4K $\beta$ は、5位のヒドロキシ基がリン酸化されているホスファチジルイノシトールリン酸(PI(5)P)の4位のヒドロキシ基をリン酸化して4位と5位がリン酸化されたホスファチジルイノシトールリン酸(PI(4,5)P<sub>2</sub>)を生成する反応を触媒することが知られてきていた(図2)。さらに、PI5P4K $\beta$ は、研究協力者らにより、ATPよりもGTPをリン酸基供与体として好んで使用し、キナーゼ活性のGTP濃度依存性は細胞内GTP濃度の変動域と一致するという特徴

を持つことから、PI5P4K $\beta$ は GTP センサーとして働くことが新たに見いだされている (K. Sumita *et al.*, *Mol. Cell*, 2016)。さらに、結晶構造解析によって、ATP/GTP アナログとの複合体構造が得られている (K. Takeuchi *et al.*, *FEBS J.*, 2016)。従って、PI5P4K $\beta$ の反応機構を明らかにすることは、細胞の GTP 応答性の分子基盤を明らかにすることにもつながること、さらに、PI5P4K $\beta$ は、これまでに糖尿病や癌との関連が指摘されているため、反応機構の解明が創薬の観点からも重要視されている (K. A. Lamia *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 2004/B. M. Emerling *et al.*, *Cell*, 2013) ことを鑑みて、PI5P4K $\beta$ を中心に研究を行うことにした。

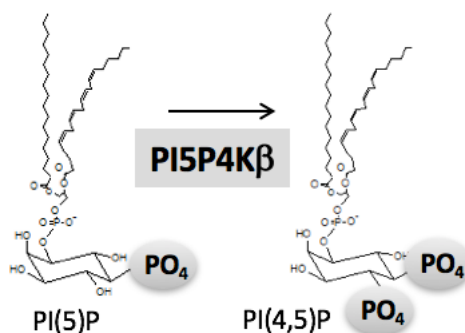


図 2. PI5P4K $\beta$ による PI5P のリン酸化反応

## 2. 研究の目的

本研究は、イノシトールリン脂質キナーゼ (PIPK) による基質のリン酸化反応機構を明らかにすることを目的としている。そのために、リポソーム存在下での PI5P との結合の解析や結晶化など、多角的に研究を進めた。

## 3. 研究の方法

### (1) SPR による PI5P4K $\beta$ と脂質やヌクレオチドとの相互作用解析

リポソーム存在下での PI5P と PI5P4K $\beta$ の結合強度の目安を把握するため、センサーチップ L1 にリポソームを固定化し、PI5P4K $\beta$ をアナライズとして流路に流した。この時、リポソ

ームに PI5P を組み込んだものと組み込んでいないものを調製し、結合定数を比較した。さらに、PI5P4K $\beta$ とヌクレオチドとの結合に関して測定するため、PI5P4K $\beta$ をアミンカップリングにてセンサーチップに固定化し、複数種類のヌクレオチドをアナライズとして、異なる塩濃度条件下にて結合定数を測定した。

### (2) 阻害剤との複合体の結晶構造解析

PI5P4K $\beta$ の酵素反応阻害機構を生化学実験と併せて立体構造的に理解することにより、本来の反応機構の解明に役立てるため、6 種類の阻害剤との複合体の結晶構造解析を試みた。

### (3) PI5P4K $\alpha/\gamma$ の結晶化

PI5P4K $\beta$ 以外のサブタイプの構造から、酵素活性の違いを立体構造的に理解することで反応機構の理解を進めるため、PI5P4K $\alpha$ および PI5P4K $\gamma$ の結晶化を試みた。結晶化は、KEK 構造生物学研究センター内に設置されている大型自動結晶化装置を用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) SPR による PI5P4K $\beta$ とヌクレオチドや脂質との相互作用解析

PI5P4K $\beta$ と PI5P を含むリポソームと含まないリポソームとの結合を測定したところ、PI5P の有無に関わらず結合定数はマイクロモルオーダーであり、PI5P 存在下では結合強度が数倍程度上昇することが明らかとなった。従って、PI5P4K $\beta$ は PI5P 非存在下でも比較的強く脂質二重膜と結合しており、PI5P 自体との結合は弱いことが予想された (表 1)。

一方、種々のヌクレオチドとの結合定数は 0.6-3.0 mM 程度と、キナーゼアッセイにて報告されている  $K_m$ (約 0.1 mM) よりも著しく大

きかった。

表 1. PI5P4K $\beta$ とリポソームとの SPR 解析結果

	$K_D$	$R_{max}$
POPS	$1.82 \times 10^{-6}$ (M)	1280
POPS + 20% PI5P	$8.38 \times 10^{-7}$ (M)	1700
POPC	$1.59 \times 10^{-6}$ (M)	1020
POPC + 20% PI5P	$5.59 \times 10^{-7}$ (M)	1480

## (2) 阻害剤との複合体の結晶構造解析

スクリーニングによって得られた 6 種類の阻害剤との複合体の結晶構造解析を試みるため、各阻害剤を PI5P4k $\beta$ の結晶にソーキングした後、高エネルギー加速器研究機構 放射光科学研究施設

にて X 線回折実験を行い、データセットを取得した。データ処理を行ったところ、3 種類については化合物の電子密度が観測された (図 3)。

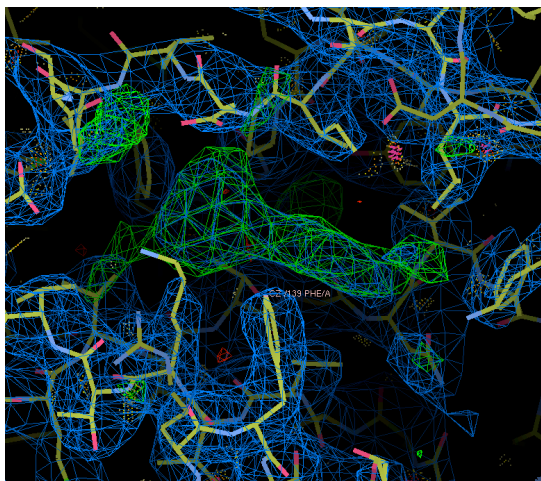


図 3. 観測された化合物の電子密度の一例

## (3) PI5P4K $\alpha$ / $\gamma$ の結晶化

PI5P4K $\alpha$ および $\gamma$ の結晶化の初期スクリーニングを行った結果、PI5P4K $\alpha$ に関しては微結晶が得られたが(図 4)、PI5P4K  $\gamma$ に関しては結晶が得られなかった。

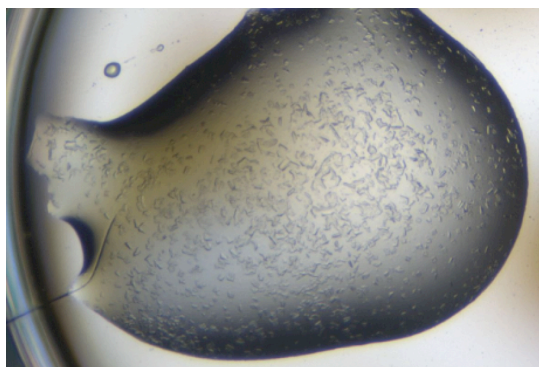


図 4. PI5P4K $\alpha$ の微結晶

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 友美 (SATO, Tomomi)

大学共同利用法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造化学研究所・構造生物学研究センター・博士研究員

研究者番号: 2 0 7 5 9 2 1 1

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

竹内 恒 (TAKEUCHI, Ko)

産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリングセンター・主任研究員

佐々木 敦郎 (SASAKI, Atsuo)

University of Cincinnati ・ Associate Professor