

令和元年6月4日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07151

研究課題名(和文) 酵素の局在化メカニズムの多様性：テトラヒメナとゾウリムシの明瞭な違い

研究課題名(英文) Diversity in enzyme localization: difference in Tetrahymena and Paramecium AK enzymes.

研究代表者

鈴木 知彦 (Suzuki, Tomohiko)

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：60145109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：P. tetraureliaの4種類のアルギニンキナーゼ(AK1-4)の遺伝子を単離し、リコンビナント酵素の活性を決定した。AK1, AK2, AK4はミカエリス・メンテン型の酵素反応を示したが、AK3は典型的な基質阻害を示した。この阻害は、酵素基質複合体ESに基質が付加したSES複合体が形成されることが要因であった。無細胞タンパク質合成系を用いてAK3を合成しPMF分析した結果、AK3は実際にプレニル化されることが判明した。ウェスタンブロット法によりAK3は繊毛に局在していることも分かった。食餌RNAi法によりAK1とAK3をsilence化すると、繊毛虫の遊泳速度が有意に半減した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命活動における酵素の局在化は、生理機能の維持に重要な役割を果たしている。この局在化が妨げられると酵素は本来の行き場を失う。我々は、繊毛虫Tetrahymenaのアルギニンキナーゼ(AK)が、N末端のミリストイル基を介して繊毛膜に局在していることを明らかにした。一方で、繊毛虫Parameciumでは事情が大きく異なる。後者のAKはN末のミリストイル化シグナル配列を欠き、代わりにC末端にプレニル化シグナル配列を持っていた。つまり、両者は全く異なる方法でAK酵素を繊毛膜に局在させている可能性が高い。この研究では、繊毛虫AK酵素の局在化メカニズムの多様性を明らかにし、生理機能との関連性を探る。

研究成果の概要(英文)：The cDNAs for arginine kinases (AK1, AK2, AK3 and AK4) from Paramecium tetraurelia were isolated, and their recombinant enzymes were expressed in E. coli. The AK1, AK2 and AK4 showed a typical Michaelis-Menten profile, while the AK3 displayed a substrate inhibition profile. The latter inhibition was caused by a formation of SES complex, which is formed by additional substrate to the normal ES complex. The AK3 enzyme was synthesized using a cell-free protein synthesis system, and the resultant enzyme was purified and subjected to PMF analysis. The prenylated C-terminal peptide was clearly observed. Western blot analyses indicated that the AK3 is localized in the ciliary fraction. The role of P. tetraurelia AKs on ciliary movement was examined by feeding RNA interference (RNAi) method. The swimming velocity of AK1- and AK3-silenced cells was significantly decreased to half of the control cells. In contrast, that of AK2-silenced cells was unchanged.

研究分野：比較生化学

キーワード：アルギニンキナーゼ 酵素の局在 基質阻害メカニズム プレニル化 ミリストイル化 RNAi

1. 研究開始当初の背景

細胞や組織・器官の生理機能を明らかにする上で、タンパク質や酵素の局在化の問題は特に重要である。局在化するタンパク質の多くは特異的に脂肪酸や疎水性基を結合し、それをタグとして目的の場所に輸送される。例えば脂肪酸としてはミリスチン酸やパルミチン酸が使われ、それらはタンパク質中の特定のグリシンやシステインに、特定の酵素を介して共有結合する。脂肪酸を使って膜成分への局在化を制御している例は、可溶性タンパク質として広く知られているヘモグロビンやプロテイン・キナーゼにも見られ、細胞や組織・器官の機能特化とタンパク質の局在化が深く結びついていることが伺える。

酵素の局在化機構の解明は、医学的な応用に繋がることもあり、その重要度が指摘されている。例えば、原生生物トリパノソーマを原因とするヒト眠り病の治療に、NMTの阻害剤の投与が有効であることが示された。ミリスチル化を妨げられたタンパク質が本来の行き場を失い、トリパノソーマの生命分子基盤を破壊したのである。ヒトでは全タンパク質の0.5%がミリスチル化され、細胞膜やオルガネラ膜を介して固有の機能を発現し細胞情報伝達に関わっているとされる。

これまでの研究から、*Tetrahymena*と*Paramecium*は繊毛運動へのエネルギー供給システムにおいてAK酵素が実に有効に使われていることが示唆された。ところが、両者は同じ繊毛虫の仲間にも属しながら、AK酵素の局在化に関して大きく異なるメカニズムを持つと予想される。即ち、*Tetrahymena*がN末端にミリスチル化シグナル配列を持つのに対して、*Paramecium*ではそれを持たずに、代わりにC末端にプレニル化シグナル配列を持っていたのである。このように、同様な機能を発現する際にも生物種間で明瞭な多様性がある。この多様性を明確にすることができれば、比較生理生化学分野の基礎研究として大きな貢献に繋がり、また、繊毛運動へのエネルギー供給機構をより明らかにできる。

2. 研究の目的

この研究の目的は、*Paramecium tetraurelia* AKの機能を通して繊毛内に存在するアルギニンリン酸シャトル機構の分子メカニズムを解明し、その結果を*Tetrahymena pyriformis*のものと比較することにある。そのために、以下の4点を明らかにする：(1) *P. tetraurelia*の4種類のAKの酵素機能と細胞内局在の解明、(2) 無細胞タンパク質合成系を用いたAK3の合成とプレニル化の実証、(3) AK3で新たに見出された基質阻害のメカニズムの酵素反応速度論による解明、(4) 食餌RNAi法によるAK1-4の機能阻害と繊毛運動の関連性。

3. 研究の方法

(1) *P. tetraurelia*の4種類のAK(AK1-4)の酵素特性の解明

ゲノム上では4種類のAK遺伝子が存在する。それらが細胞内で発現していることを確かめるために、細胞からmRNAを市販のキットを用いて単離し、その後cDNA化した。このcDNAプールから、AK1-4に特異的なプライマーを用いてcDNAの一部を、PCR増幅した。

(2) *P. tetraurelia* AK3の基質阻害メカニズムの解明

基質阻害のメカニズムを解明するために、3種類の酵素反応速度論モデルをテストし、理論値と実測値の誤差が最も少ないモデルを最適なモデルと決定した。誤差は、 R^2 、AICc、及び $Sy.x$ によって評価した。モデル1は最もシンプルなもの、SES複合体が生成物を生じないと仮定したもの、モデル2はSES複合体が生成物を生じると仮定したもの、モデル3は最も複雑なものでSE複合体の形成も考慮したものである。

(3) *P. tetraurelia* の AK3 の細胞内局在

AK3 の細胞内局在を調べるために、AK3 のポリクローナル抗体を作製した。他の AK アミノ酸配列との一致率は 70% 程度であるので、それらを抗体で区別できる可能性はある。*Paramecium* 細胞をジブカイン処理や凍結融解することで、(a) 繊毛、(b) 繊毛を除く細胞膜、(c) 細胞質に分画した。それぞれの分画から、Triton X の存在化及び非存在化においてタンパク質を抽出し、一定量を SDS 電気泳動にかけ、AK3 抗体を用いたウェスタンブロットにより AK3 の局在を確かめた。

(4) *P. tetraurelia* AK3 のプレニル化

4 種類の AK のうち、AK3 のみが C 末端側に明瞭なプレニル化シグナル配列を持つ (CTIY)。この配列は、C 末端から 4 番目のシステインに疎水性プレニル基の一種、ファルネシル基が結合することを強く示唆する。実際にファルネシル基が結合することを証明するために、まず、AK3 を無細胞タンパク質合成系 (島津) を用いて合成した。このタンパク質合成系にはプレニル化するために必要な酵素が含まれている。尚、大腸菌を用いた系では、原核生物がプレニル化酵素を欠くことから、リコンビナント酵素がプレニル化されることはない。合成された AK3 は、予め N 末側に付加しておいた Strep Tag を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって高純度に精製した。精製された AK3 はトリプシンで消化し、マスペクトル分析を行なった。C 末端のペプチドがファルネシル基を加算した質量 (約 +270 Da) として得られれば、プレニル化が証明されたことになる。

(5) 食餌 RNAi 法による AK1-3 の機能阻害と繊毛運動の関連性

3 種類の AK 酵素が、実際に繊毛運動にどの位影響を与えているかは、食餌による RNAi 法により間接的に観察することができる。まず、AK1-3 それぞれの翻訳領域の一部を PCR 増幅し、LITMUS 28i ベクターにクローニングした。これを大腸菌 HT115 に導入し、IPTG によって 2 本鎖 RNA の発現誘導を行なった。これを、飢餓状態の *P. tetraurelia* に食餌させ、遊泳速度等をビデオ録画から算出した。これをコントロールと比較することで、AK の繊毛運動に関する寄与を間接的に評価した。

4 . 研究成果

(1) *P. tetraurelia* の 4 種類の AK (AK1-4) の酵素特性の解明

ゲノム上では 4 種類の AK 遺伝子が存在するが、それらが実際に細胞内で発現しているかどうかを確かめるために、AK1-4 に特異的なプライマーを用いて PCR 増幅した。増幅産物をクローニングし配列を確認したところ、AK4 以外は細胞内で発現していることが分かった。一方で既存のデータを用いて、*P. tetraurelia* AK のトランスクリプトーム解析による遺伝子発現の比較を行った結果、発現量の比は、最も発現量の少ない AK4 を 1 としたとき、AK1 : AK2 : AK3 : AK4 = 7 : 43 : 5 : 1 (N=4) であった。

次に 4 種類の AK 酵素を大腸菌内で発現させ、その酵素活性を測定した。生体内での発現が確認された AK1-3 は十分な酵素活性をもっていたが、一方で AK4 の酵素活性は極端に低く、AK4 の配列上の変異により酵素活性が低下している可能性が示唆された。また、AK1、AK2、AK4 は通常のカチオン・メンテン型の酵素反応プロファイルを示したが、AK3 は自身の基質であるアルギニンによって阻害を受ける典型的な「基質阻害」を示すことが判明した。

(2) *P. tetraurelia* AK3 の基質阻害メカニズムの解明

Paramecium AK3 は自身の基質アルギニンの濃度が高くなると反応速度が極端に低下する現象、即ち基質阻害を示す(図1)。AK が属するフォスファゲンキナーゼにおいては、基質阻害を示す野生型酵素は AK3 が初めての報告である。この基質阻害のメカニズムを解明するために、3種類の酵素反応速度論モデル(図2)をテストし、理論値と実測値の誤差が最も少ないモデルを見出した。誤差は、 R^2 , AICc, 及び $Sy.x$ によって評価した。解析の結果、モデル2が最適であり(図1の赤の実線は理論曲線)、通常の酵素基質複合体 ES (解離定数 0.61 mM) に2個目の基質が結合するプロセスが存在し (SES 複合体)、その解離定数が 0.34 mM と ES 複合体のものより低い (ES 複合体に、余分な S がより速やかに結合する) ことが基質阻害を引き起こす主因であることが判明した。また、ES 複合体のみならず、SES 複合体も前者の 1/3 程度の速度で生成物を生じることが分かった。基質阻害は、20%程度の酵素で見られる現象であるが、今回の研究のように詳細な酵素活性データに基づき、速度論的解析が行われた例は極めて少ない。

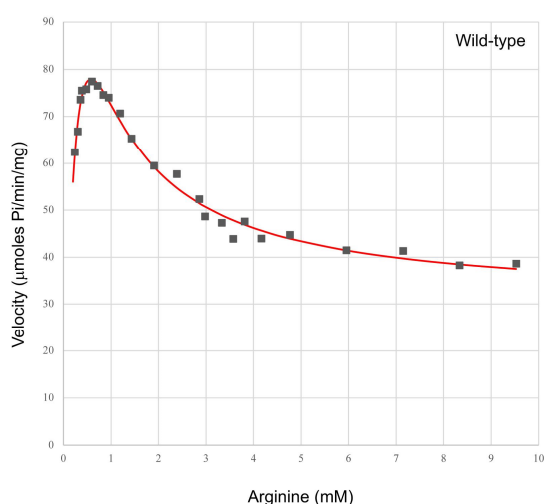


図 1

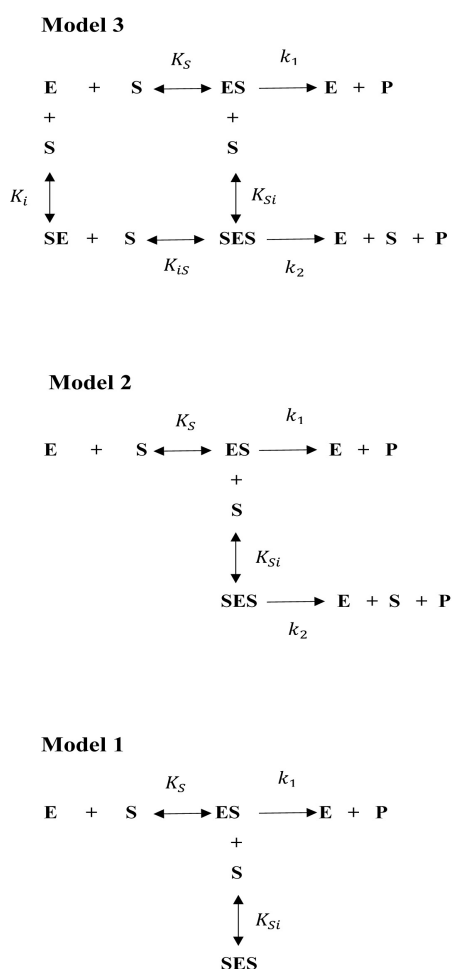


図 2

また、基質阻害を引き起こす構造的要因を探るために、基質結合に関わる GS 領域のアミノ酸配列 D-D-S-Q-V (77-81 番目の残基) に変異を導入した 6 種類の変異体 (D77A, D78A, S79A, Q80A, Q80S, and V81A) を作成して基質阻害メカニズムの解明を行なった。結果的に、S79A 変異体において基質阻害の大部分が消失し、S79 が最も深く基質阻害に関わっていることが証明された。また、S80, V81 のアミノ酸も基質結合に関与していることが明らかになった。

基質阻害は、一般的には活性部位に本来の基質結合部位とは異なる第 2 の基質結合部位が生じ

ることによって引き起こされると考えられる。この現象は、生理機能と密接に関わっている場合がある。この点について今後議論する必要がある。

(3) *P. tetraurelia* の AK3 の細胞内局在

P. tetraurelia の各分画のタンパク質を Triton X の存在化及び非存在化で抽出し、ポリクローナル抗体を使って AK3 の局在を調べた。この結果、Triton X の非存在化においては、AK3 は検出できなかったが、Triton X の存在化においては、繊毛から抽出したタンパク質のウェスタンブロットにより鮮明なシングルバンドが検出された。またその分子量は AK3 のものと一致した。この研究で、AK3 の C 末端側はプレニル化され得ることが PMF 解析から判明しており、このことは AK3 が繊毛膜に結合している可能性が高いことを示唆している。

(4) *P. tetraurelia* AK3 のプレニル化

AK3 がプレニル化(ファルネシル化)されることを証明するために、AK3 を無細胞タンパク質合成系により合成した。尚、大腸菌を用いた系では、原核生物がプレニル化酵素を欠くことから、リコンビナント酵素がプレニル化されることはない。合成された AK3 は、高純度に精製した後、PMF 分析を行った。その結果、C 末端のトリプシンペプチドが二重にファルネシル化されていることが明らかとなった。

(5) 食餌 RNAi 法による AK1-3 の機能阻害と繊毛運動の関連性

P. tetraurelia においては、摂餌法による遺伝子の発現阻害を容易に行うことができる。そこで AK1, AK2 及び AK3 の発現を阻害し、AK 機能の生理学的意義を調べた。三種類の AK の発現阻害を PCR により確認し、それぞれの遊泳速度を測定した。その結果、AK1, 及びプレニル化シグナル配列を持ち繊毛に局在している可能性がある AK3 の阻害では、コントロールの遊泳速度 (0.502 mm/s) よりも有意な遊泳速度の低下 (AK1: 0.268, AK3: 0.298) が見られた。一方で、AK2 の発現を阻害しても、有意な遊泳速度の差は見られなかった。このことは、*P. tetraurelia* の繊毛内の「アルギニンリン酸シャトル機構」に AK3 が深く関わっていることを支持している。

次に、遊泳速度が低下した AK1 と AK3 の発現をダブルノックダウンし、遊泳速度の観察を行った。遊泳速度(0.334)は、予想外に、有意にコントロールの遊泳速度(0.185)よりも上昇した。しかし、ダブルノックダウン時の遊泳行動は通常時とは異なり、大きな螺旋運動に変化した。この運動は Bonini (1988)らによって報告された ATP と cGMP を加えた際の遊泳行動と酷似していた。

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7件)

1. Yano, D. and Suzuki, T. (2018) Kinetic analyses of the substrate inhibition of Paramecium arginine kinase. *Protein J.* 37: 581-588. (査読付き)
2. Matsuo, T., Yano, D., Uda, K., Iwasaki, N., and Suzuki, T. (2017) Arginine kinases from the precious corals *Corallium rubrum* and *Paracorallium japonicum*: presence of two distinct arginine kinase gene lineages in cnidarians. *Protein J.* 36: 502-512. (査読付き)
3. Yano, D., Suzuki, T., Hirokawa, S., Fuke, K., and Suzuki, T. (2017) Characterization of four arginine kinases in the ciliate *Paramecium tetraurelia*: Investigation on the substrate inhibition mechanism. *Int. J. Biol. Macromol.* 101: 653-659. (査読付き)
4. Motomura, S. and Suzuki, T. (2016) Evidence for N-terminal myristoylation of *Tetrahymena* arginine kinase using peptide mass fingerprinting analysis. *Protein J.* 35: 212-217. (査読付き)

5. Yano, D., Mimura, S., Uda, K., and Suzuki, T. (2016) Arginine kinase from *Myzostoma cirriferum*, a basal member of annelids. *Comp. Biochem. Physiol. Part B. Biochem. Mol. Biol.* 198: 73-78. (査読付き)
6. Okazaki, N., Motomura, S., Okazoe, N., Yano D. and Suzuki, T. (2015) Cooperativity and evolution of Tetrahymena two-domain arginine kinase. *Int. J. Biol. Macromol.* 79: 696-703. (査読付き)
7. Chouno, K., Yano, D., Uda, K., Fujita, T., Iwasaki, I. and Suzuki, T. (2015) Arginine kinases from the marine feather star *Tropiometra afra macrodiscus*: the first finding of a prenylation signal sequence in metazoan phosphagen kinases. *Comp. Biochem. Physiol. Part B. Biochem. Mol. Biol.* 187: 55-64. (査読付き)

〔学会発表〕(計7件)

1. 大塚夢斗, 田中潤子, 矢野大地, 宇田幸司, 鈴木知彦, 杉山成: ヨツヒメゾウリムシ由来アルギニンキナーゼの構造学的研究 / 日本生物物理学会第56回年会(岡山大学)(2018.9.15-17)
2. 矢野大地, 舟谷亮二, 松岡達臣, 鈴木知彦: 原生生物におけるフォスファゲンキナーゼの多様性と酵素特性の解明 / 日本原生生物学会(つくば)(2017.11.17-19)
3. 矢野大地, 舟谷亮二, 松岡達臣, 鈴木知彦: ヨツヒメゾウリムシのアルギニンキナーゼ(AK)遺伝子のRNA干渉によるアルギニンリン酸シャトル機構の生理学的検証 / 日本動物学会第88回大会(富山)(2017.9.21)
4. 矢野大地, 舟谷亮二, 松岡達臣, 鈴木知彦: ヨツヒメゾウリムシのアルギニンキナーゼ(AK)遺伝子のRNA干渉による生理的機能の解析 / 2017年度生物系三学会中国四国支部大会(日本動物学会)(2017.5.13-14)
5. Daichi Yano, Tomohiko Suzuki: Arginine kinase (AK) and arginine phosphate shuttle in *Paramecium tetraurelia* / The 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Science of Japan (日本動物学会第87回大会)(沖縄 11.14-19)(2016.11.17)
6. 矢野大地・中野 啓二・宇田幸司・鈴木知彦: オフェリアゴカイにおけるフォスファゲンキナーゼの基質決定と基質合成 / 第108回土佐生物学会大会(高知)(2015.12.12)
7. 矢野大地, 鈴木知彦: ヨツヒメゾウリムシの繊毛運動におけるATP輸送とアルギニンリン酸シャトル機構 / 日本動物学会第86回大会(新潟)(2015.9.19)