

平成 30 年 4 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07387

研究課題名(和文) 細胞質とミトコンドリアのNADP(H)濃度の制御を司るNADキナーゼの翻訳後修飾

研究課題名(英文) The post-translational modification of NAD kinase governing the regulation of concentrations of cytosolic and mitochondrial NADP(H)

研究代表者

河井 重幸 (Kawai, Shigeyuki)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：00303909

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)：模倣リン酸化した組換え精製ヒトMitNADKのin vitroにおけるNADK活性を詳細に調べた。その結果、模倣リン酸化MitNADK組換え精製酵素(MitNADK S188D、S289D/E、S376D)のin vitroにおけるNADK活性低下を見出した。Ser-188のmitNADKのホモログに特有なMotif 2での高度な保存も考え併せると、特に当該Ser-188のリン酸化はmitNADKの活性制御に重要な役割を有すると推察された。しかし、ヒトならびに出芽酵母の細胞内におけるmitNADKと細胞質NADKの活性制御に対するin vivoでのリン酸化の役割の解明には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The effect of phosphomimetic mutations at six of the phosphorylation sites (Ser residue) in human mitochondrial NAD kinase (mitNADK) were examined in vitro using the purified recombinant enzyme. The enzymatic activity was downregulated by a substitution of an Asp residue at Ser-289 and Ser-376, and completely inhibited by substituting Ser-188 with an Asp or Glu. Taken together that Ser-188 is highly conserved in the primary structures of mitNADK homologs in higher animals, this indicates that Ser-188 (and perhaps the other residues) is an important phosphorylation site that can downregulate the NAD kinase activity of this critical enzyme. However, it has remained still unclear how mitNADK and cytosolic NADK are regulated "in vivo" through phosphorylations in human and budding yeast cells.

研究分野：応用微生物学

キーワード：NADキナーゼ 翻訳後修飾 NADP+ NAD+ フォスフォプロテオミクス解析 Sirtuin リン酸化

1. 研究開始当初の背景

NAD キナーゼ (NADK) は、補酵素 NADP⁺の合成酵素であり、NAD⁺のリン酸化反応 (NAD⁺ + ATP → NADP⁺ + ADP) を触媒する。研究代表者は 2000 年に世界で初めて NADK (結核菌由来 NADK) の遺伝子を特定して以来、NADK の研究に従事し、最近 (2012 年) は永らく未知であったヒトのミトコンドリア (Mit) 局在型 NADK (mitNADK) も特定した (Nature Commun. 3:1248 doi: 10.1038/ncomms2262, 2012)。これによりヒト細胞には、細胞質 NADK (CytNADK) と mitNADK が存在することが明らかとなった。なお、大腸菌で発現させて精製した組換え mitNADK の NAD⁺に対する K_m 値と活性 (V_{max} 値) は、組換え精製 CytNADK のそれらよりも著しく低い (K_m 値は約 1/50、 V_{max} 値は約 1/200)。補酵素 NADP⁺の還元型 NADPH は、活性酸素種 (ROS) の代謝や各種反応において還元力供給という不可欠な役割を果たす。これは、5 歳で亡くなった男児が発症していた「ミトコンドリアの機能不全を伴うジエノイル CoA 還元酵素欠損症」の病因として、MitNADK 遺伝子のホモ欠損が特定された (Hum. Mol. Genet. 23:5009, 2014) 事実からも明らかである。細胞質および Mit における NADP(H) [NADP⁺と NADPH] 濃度の制御を司る NADK の機能は、細胞内外からのシグナルに応答して厳密かつ合目的的に制御され、様々な状況下における細胞質と Mit が必要とする NADP⁺濃度が維持されていると予想される。しかし、ヒト細胞内で NADK の機能 (安定性と活性など) を制御する仕組みはよく分かっていない。その制御の破綻が病気の発症と関係する可能性も考えられる。両 NADK の活性制御に関しては、組換え CytNADK が NAD(H)によって、同 MitNADK が NAD(H)と NADP⁺によって活性が阻害されることのみが分かっていた。

一方、リン酸化、アセチル化、およびユビキチン化などによるタンパク質の翻訳後修飾は、タンパク質の機能制御の手段の一つである。最近のプロテオミクス研究の進展により、ヒトの cytNADK と mitNADK、およびマウスとラットの両 NADK ホモログのこれら修飾部位が多数報告されている ([http://](http://www.phosphosite.org)

www.phosphosite.org; 各生物の両 NADK と両 NADK ホモログ間の修飾部位は高度に保存)。

2. 研究の目的

「ヒト細胞の細胞質および Mit における NADK の機能 (安定性と NADK 活性) が、細胞内外からのシグナルにどのように応答して厳密かつ合目的的に制御され、様々な状況下における細胞質と Mit が必要とする NADP⁺濃度が維持されているか」という問題を明らかにするために、即ち、ヒトの両 NADK の機能制御の仕組みを明らかにするため、本研究では「両 NADK の活性制御」、「両 NADK の安定性制御」、および「両 NADK と他のタンパク質との相互作用の制御」に対する両 NADK の翻訳後修飾 (特にリン酸化とアセチル化) の役割を明確にする。さらに、両 NADK を特異的に脱アセチル化する Sirtuin (脱アセチル化酵素) も特定することを目的とした。

3. 研究の方法

模倣リン酸化 mitNADK および cytNADK の Asp (D) および Ala (A) 置換体は pQE-80L を用いて大腸菌で発現させ、TALON アフィニティカラムで精製した。FLAG 融合体として mitNADK 遺伝子、cytNADK 遺伝子、Sirt3、Sirt4、Sirt5 各遺伝子、リン酸化抵抗性 MitNADK (mitNADK_STAYF: 下記参照) をプラスミドを介してヒト HEK293A 細胞へ導入し、抗 FLAG M2 抗体 (Sigma, F1804、マウスモノクローナル抗体) で検出および免疫沈降した。細胞質およびミトコンドリア画分のローディングコントロールには各々 GAPDH 抗体と CoxII 抗体を用いた。ヒト HEK293A 細胞を培養する場合には、基本的にはダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) [4.5 g/l グルコース、L-グルタミン含有、ピルビン酸不含] (Nacalai Tesque, 08459-35, Kyoto, Japan、以下 DMEM (High Glc) と表記する) にウシ胎児血清 (FBS) (Gibco、Life Technologies、Carlsbad, CA; 56 °C で 30 分間処理し非働化済み) を 10% (v/v) 添加して用いた。培養は、37 °C、5% CO₂ 存在下で行った。トランスフェクションは Lipofectamine 2000 Reagent のプロトコルに従って行った。その際、Opti-MEM I Reduced

Serum Medium (Opti-MEM) (Life Technologies) を用いた。ヒト HEK293 細胞はサンプル調製時にはフォスファターゼ阻害剤とデアセチラーゼ阻害剤を併用した。市販の Protein kinase A (PKA) は New England Biolab 社の製品を用いた。

リン酸化は Phos-Tag システムを用いて移動度の差で検出した。本系では、リン酸化されることによりバンドの移動度が減少する、即ちバンドが上にシフトする。

リン酸化抵抗性 MitNADK (mitNADK_STAYF) は、mitNADK の Thr-183, Ser-188, Ser-289, Ser294, Ser345, Ser-363, Ser-367, Ser-376、および Thr-357 を Ala 残基に、Tyr-290, Tyr-291、および Tyr-360 を Phe 残基に置換した。円二色性 (CD) スペクトル解析は、円二色分光計 (J-720 Spectropolarimeter、Jasco, Tokyo, Japan) を用いて行った。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた系では、cytNADK (Utr1, Yef1) ならびに mitNADK (Pos5) 各々の C 末端側に TAP タグの導入された株を用いた。また、3' 側に FLAG タグを導入した Utr1 遺伝子をプラスミド (UTR1::FLAG.415 または UTR1::FLAG.425) を介して Utr1 欠損株 (utr1 株) に導入した。フォスファターゼ阻害剤を併用した TCA 法によりサンプルを調製した。

NADK の酵素活性、NADP(H)、NAD(H)濃度の定量等のアッセイは既報 (Nature Commun. 3:1248 doi: 10.1038/ncomms2262, 2012) に従った。

4. 研究成果

ヒト細胞の Mit 内における mitNADK の活性制御に対するリン酸化の役割を明確にするために、模倣リン酸化 (リン酸化部位である Ser (S) または Thr (T) 残基を Asp (D) 残基へ置換) した組換え精製ヒト MitNADK の *in vitro* における NADK 活性を詳細に調べた (図 1, 2)。その結果、模倣リン酸化 MitNADK 組換え精製酵素 (MitNADK S188D、S289D/E、S376D) の *in vitro* における NADK 活性低下を見出した (同 S345D、S363D、および S367D の活性は変動しなかった)。特に、MitNADK S188D の活性は完全に消失した。MitNADK

S376A の活性は野生型 mitNADK と同程度、同 S289A は約 2 倍、同 S188A の活性は依然として消失したままであった (図 3)。

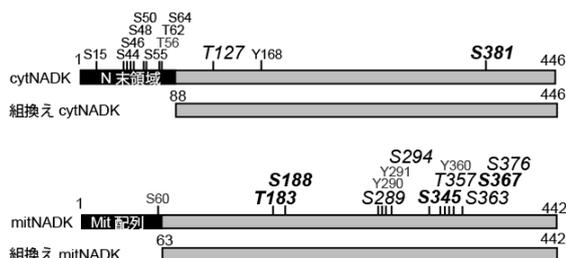


図 1 cytNADK と mitNADK のリン酸化報告部位
フォスフォプロテオミクス解析でリン酸化修飾が報告されている Ser 残基、Thr 残基、および Tyr 残基の一次構造上における位置を示した。本研究で模倣リン酸化を検討した残基を斜体で、ヒトのフォスフォプロテオミクス解析で報告されている残基を太字で示す。

Ser-188 の模倣リン酸化および Ala 残基への置換で活性の低下が観察されたため、Ser 残基の置換によって mitNADK の構造が変化している可能性が考えられた。そこで、mitNADK、mitNADK S188D、および mitNADK S188A の CD スペクトル解析を行った。この結果から、CD スペクトルにおいて、これらのタンパク質間に有意な差はなく、模倣リン酸化および Ala 置換がタンパク質の構造を変化させていないことが示唆された。

ヒト mitNADK Ser-188 のリン酸化は、高頻度かつ複数のフォスフォプロテオミクス解析で検出されている。さらに Ser-188 は mitNADK のホモログに特有な Motif 2 に高度に保存される。Ser-188 の疑似リン酸化による活性消失というデータも考え併せると、特に当該 Ser-188 のリン酸化は重要な役割を有すると推察された。

他方、cytNADK、cytNADK T127D、および cytNADK S381D を精製し、NADK 活性を測定した。cytNADK T127D および cytNADK S381D の模倣リン酸化タンパク質の NADK 活性は cytNADK の NADK 活性と比較して差がなかった。

ヒト細胞内における MitNADK のリン酸化の Phos-Tag システムによる検出を試みた。即ち、FLAG タグを導入した mitNADK でトランスフェクトしたヒト HEK293 細胞を、低グルコース環境 (DMEM [Low Glc、FBS 不含]) や酸化ス

トレス存在下 (12.5 μ M メナジオン存在下) で培養し、mitNADK の *in vivo* でのリン酸化を Phos-Tag 解析で検出することを試みた。

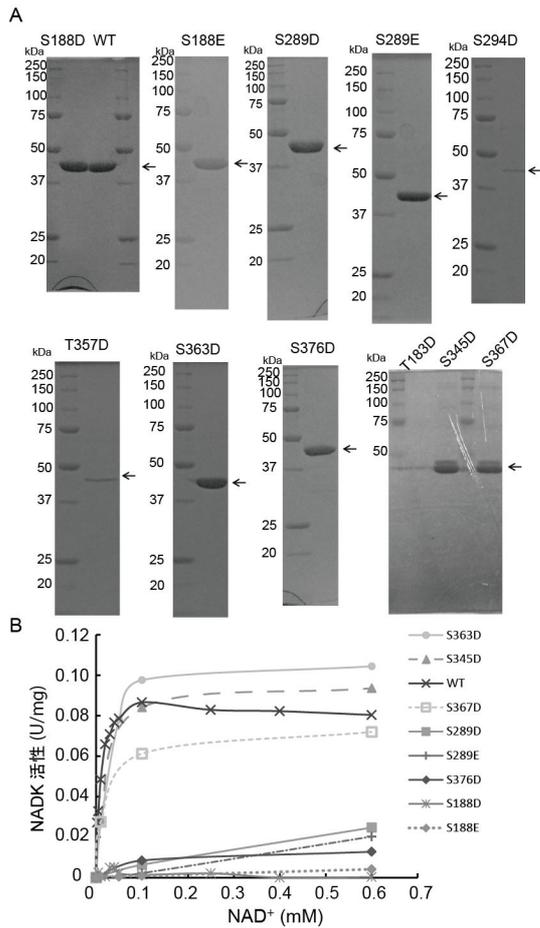


図 2 模倣リン酸化 mitNADK の精製および活性

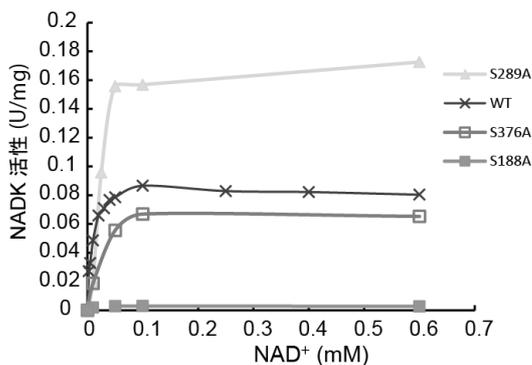


図 3 mitNADK Ala 置換体の活性

しかし、市販の PKA による *in vitro* での mitNADK (大腸菌から調製した組み換え精製) のリン酸化は Phos-Tag 解析により検出されたものの (図 4)、*in vivo* での mitNADK のリ

ン酸化は検出することが出来なかった。更に、mitNADK と相互作用する Sirtuin を特定するために、FLAG タグを導入した Sirt3、Sirt4、Sirt5 の各々でトランスフェクトした HEK293 細胞と抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降実験を行ったが、目的のタンパク質は検出されなかった。

mitNADK の安定性制御および mitNADK と他のタンパク質との相互作用の制御のために、Ser/Thr 残基すべてを Ala 残基に、Tyr 残基を Phe 残基に置換したリン酸化抵抗性 MitNADK (mitNADK_STAYF) を人工合成 DNA も援用して構築し、ヒト HEK293 細胞に導入したが当該 NADK の発現量或いは安定性が低いという問題に遭遇した。ここで、HEK293A 細胞はトランスフェクトした後 6 時間後に培地を交換し、さらに 39 時間培養した。

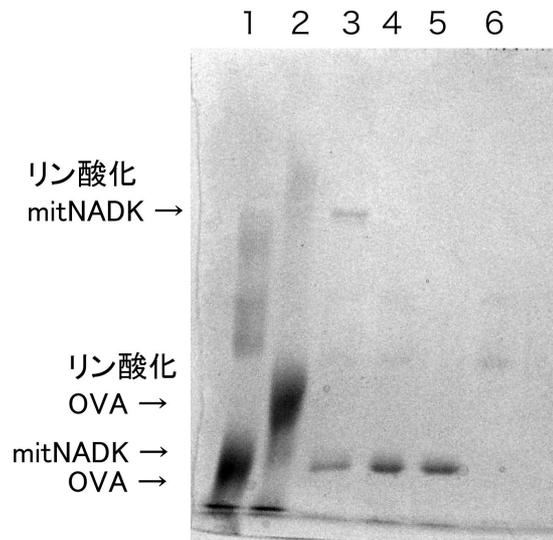


図 4 mitNADK の *in vitro* でのリン酸化

1:OVA, 2: リン酸化 OVA, 3: mitNADK+PKA+ATP, 4: mitNADK+PKA-ATP, 5: mitNADK-PKA+ATP

cytNADK の Ser-64 (他のグループにより CaMKII 依存的にリン酸化されることが報告済み) のリン酸化が他のタンパク質との相互作用を可能にし、その相互作用が CytNADK 活性が活性化されるという作業仮説をたて、本仮説の検証を先ず試みた。Ser-64 を Asp 残基に置換した cytNADK を作成し、ヒト HEK293A 細胞に導入後、免疫沈降実験により相互作用するタンパク質の検出を試みたが、検出には至らなかった。

なお、NADP(H)、NAD(H)濃度の定量技術を援用し、*Deinococcus radiodurans* 細胞内の、NADP(H)、NAD(H)濃度の定量技術を援用し、*D. radiodurans* 細胞内のこれらの濃度を測定し、同細胞のストレス耐性能が高濃度の NADH と関連する可能性を指摘した。

他方、出芽酵母 *S. cerevisiae* は、ヒト同様に真核細胞であり、真核生物のモデル生物である。出芽酵母の cytNADK (Utr1, Yef1) ならびに mitNADK (Pos5) 各々の C 末端側に TAP タグの導入された株を用いて、様々な培養条件における各 NADK のリン酸化を Phos-tag システムで検出することを試みたところ、ある条件におけるリン酸化を検出することに成功した。

次に、出芽酵母の cytNADK (Utr1) ならびに mitNADK (Pos5) 各々のリン酸化部位の特定を試みた。先ず Utr1 に着目し、3'側に FLAG タグを導入した Utr1 遺伝子をプラスミド (UTR1::FLAG.415 または UTR1::FLAG.425) を介して Utr1 欠損株 (*utr1* 株) に導入し、グルコース含有合成培地で培養して得られた対数期、対数期後期、定常期の細胞の Utr1 のリン酸化を調べたところ、低コピープラスミド使用時は非特異的シグナル等のために明瞭なシグナルが得られず、多コピープラスミド使用時は Utr1p の分解が観察された。そこで、低コピープラスミドを導入した対数期後期の細胞から免疫沈降した Utr1::FLAG にフォスファターゼを作用させ、Phos-Tag で分析したところフォスファターゼに依存したバンドシフトが観察されたため、当該 Utr1::FLAG はリン酸化されていると判断した。同 Utr1::FLAG を SDS-PAGE ゲルから切り出し、リン酸化部位の同定を試みた。しかし、プロテインシーケンスのカバレッジは 8% であり、リン酸化部位の特定には至らなかった。

再度 TAP タグを融合した Utr1 と Pos5 の系に戻り、Phos-Tag を用いてリン酸化を追跡した。前培養条件を栄養 (YPDA) 培地または合成 (SC) 培地で行い、本培養も YPDA または SC 培地で行った。振とう数は静置条件と好気条件を試した。対数期、対数期後期、定常期でサンプリングした。TAP タグの系では非特異的シグナルは検出されなかった。また、少

なくとも Utr1 のリン酸化によるバンドシフトは観察されたが、そのリン酸化を引き起こす要因の特定には至らなかった。

今後の展望として、先ずは細胞内での NADK のリン酸化を引き起こす要因の特定が必要と考えられる。

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3件)

- 河井重幸、村田幸作: ミトコンドリア NAD キナーゼ遺伝子 (*NADK2*) 欠損症の症例報告. *ビタミン*, 91(3):204-206 (2017). 査読有 <https://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/handle/2433/224953>
- Takumi Yamashiro, Kousaku Murata & Shigeyuki Kawai: Extremely high intracellular concentration of glucose-6-phosphate and NAD(H) in *Deinococcus radiodurans*. *Extremophiles* 21(2):399-407 (2017). 査読有 DOI: 10.1007/s00792-016-0913-z
- Yutaka Kawabata, Kousaku Murata & Shigeyuki Kawai: Significance of Ser-188 in human mitochondrial NAD kinase as determined by phosphomimetic and phosphoresistant amino-acid substitutions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 468:691-695 (2015). 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.11.017 <https://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/handle/2433/210210>

[学会発表](計6件)

- 河井重幸, NAD キナーゼホモログを有

さない放射線・紫外線耐性細菌 *Deinococcus radiodurans* における NADH と NADPH の生成機序, 日本ビタミン学会第 68 回大会, 2016.6.18, 富山国際会議場 (富山県・富山市)

・ Shigeyuki Kawai, The NAD kinase and NAADP synthesis., 2016 Jeju CD38 and NAD meeting, 2016 年 2 月 17 日, Jeju (Korea)

・ 河井重幸, 擬似リン酸化によって示されたヒト NAD キナーゼの Ser-188 の重要性, 第 5 回リン化合物討論会 (第 32 回 C-P 化合物研究会), 2015 年 11 月 28 日, 京都大学 芝蘭会館別館 (京都府・京都市)

・ 山代 卓未, 放射線・紫外線耐性細菌 *Deinococcus radiodurans* の NAD(P)⁺還元活性, 日本生物工学会平成 27 年度大会 (第 67 回), 2015 年 10 月 28 日, 城山観光ホテル (鹿児島県・鹿児島市)

・ Shigeyuki Kawai, Phosphomimetic human mitochondrial NAD kinase implies that some phosphorylation events downregulate this enzyme in mitochondria, FASEB Science Research Conference, NAD Metabolism & Signaling, 2015 年 8 月 11 日, Timmendorfer Strand (Germany).

・ 河井 重幸, ヒトのミトコンドリア NAD キナーゼの活性に対する翻訳後リン酸化修飾の影響, 日本ビタミン学会第 67 回大会, 2015 年 6 月 6 日, 奈良県新公会堂 (奈良県・奈良市)

〔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〕

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 (KAWAI, Shigeyuki)
京都大学・農学研究科・助教
研究者番号: 00303909

(2) 研究分担者

村田 幸作 (MURATA, Kousaku)
摂南大学・理工学部・教授
研究者番号: 90142299