

自己評価報告書

平成23年 4 月 15 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008~2011

課題番号：20570072

研究課題名 (和文) テトラヒメナのアルギニンキナーゼの構造, 機能, 及び進化に関する研究

研究課題名 (英文) Structure, function and evolution of arginine kinase from *Tetrahymena pyriformis*

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・教授

研究者番号：60145109

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：代謝生理

1. 研究計画の概要

原生生物テトラヒメナ (*Tetrahymena pyriformis*) の繊毛運動の持続のためには、ATP の連続的な供給が必要であり、それはアルギニンキナーゼ (AK) を介した「アルギニンリン酸シャトル」機構によって維持されていると考えられている。1970 年に Watts & Bannister は、テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) に分子量の異なる二種類の AK が含まれることを示した。一方我々は、*T. thermophila* のゲノムデータベースを徹底的にサーチし、ゲノム配列から二種類の AK アミノ酸配列 (AK1, AK2) を抽出した。しかし、実際に両遺伝子がテトラヒメナの中で発現しているかどうかは、不明である。この研究では、*T. pyriformis* を材料にして、原生生物由来の AK 遺伝子 (mRNA) の発現を初めて確認するとともに、その cDNA 及びゲノム構造を決定する。また、大腸菌で AK 遺伝子を発現させてリコンビナント酵素を得る。更に、その酵素機能を詳細に測定し、他の AK との比較から原生生物の AK の特性を明らかにする。また二種類の AK の細胞内局在を明らかにする。

2. 研究の進捗状況

(1) *T. pyriformis* から mRNA を抽出し、コンセンサスプライマーを用いた PCR 法により二種類の AK cDNA を増幅して、プラスミドへクローニングした。原生生物の遺伝子では、Gln のコドンが、終止コドンで代用されているので、これを通常のものに変異させた。さらに、His タグ (6 x His) を付加したリコンビナント酵素として発現させるために、pET ベクターへの乗せ換えた。一方、二種類の AK cDNA

配列とゲノム配列を比較することでエキソン／イントロン配置を特定した。

(2) AK I, 及び AK II のドメイン 1 部分のリコンビナントタンパク質を用いて、これらを抗原としたマウス・ポリクローナル抗体を作製した。これらの抗体を用いてウエスタンブロットティングを行ったところ、テトラヒメナの細胞全体では、AK II が強く検出され、AK I はほとんど検出されなかった。一方、ジブカイン処理によって単離された繊毛では、AK II は検出されず、AK I が強く検出された。即ち、AK I は繊毛に局在していることが明らかになった。

(3) 二種類の AK の C 末に His タグを付加しリコンビナント酵素を発現させ、両者の酵素活性を詳細に比較した。更に、2 ドメイン型の AK II はドメイン 1 と 2 に分離した酵素も作成して酵素活性を測定した。作成した 4 種類のリコンビナント酵素は、いずれも十分な AK 活性を保持していた。ただし、AK I のリコンビナント酵素は構造的に不安定で、信頼性のある酵素パラメータを出すには時間を要した。

3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。

(理由) 4 年計画のほとんどの部分が 3 年間で終了し、AK1 のミリスチル化を軸に研究が大きく進展しつつある。

4. 今後の研究の推進方策

AKIのアミノ酸配列を詳細に検討した結果、N末のグリシンにミリストイル基が結合する可能性が強く示唆された。AKIは疎水的なミリストイル基を介して繊毛膜に結合し、構造的にも安定化している可能性がある。今後、AKIにおけるミリストイル基の存在の実証、ミリストイル化を触媒する酵素(N-ミリストイル・トランスフェラーゼ)のクローニング、及びミリストイル基の存在下、及び非存在下におけるAKI酵素機能の差異等を明らかにしていきたい。

5. 代表的な研究成果

(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 10 件)

- (1) Uda, K., Ishida, M., Matsui, T. and Suzuki, T. (2010) Arginine kinase from the tardigrade *Macrobiotus occidentalis*. Molecular cloning, phylogenetic analysis and enzymatic properties. *Zool. Sci.* 27: 796-803. 査読有
- (2) Tada, H. and Suzuki, T. (2010) Cooperativity in the two-domain arginine kinase from the sea anemone *Anthopleura japonicus*. II. Evidence from site-directed mutagenesis studies. *Int. J. Biol. Macromol.* 47: 250-254. 査読有
- (3) Uda, K., Matumoto, A., and Suzuki, T. (2010) Identification of key amino acid residues distinguishing chiral guanidino substrates (D- and L-arginine) in *Sabellastarte* arginine kinase. *J. Molecular Catalysis* 64: 75-80. 査読有
- (4) Uda, K., Kuwasaki, A., Shima, K., Matsumoto, T. and Suzuki, T. (2009) The Role of Arg-96 in *Danio rerio* Creatine Kinase in Substrate Recognition and Active Center Configuration. *Int. J. Biol. Macromol.* 44: 413-418. 査読有
- (5) Iwanami, K., Iseno, S., Uda, K. and Suzuki, T. (2009) A novel arginine kinase from the shrimp *Neocaridina denticulata*: the fourth arginine kinase gene lineage. *Gene* 437: 80-87. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 岡崎紀子：テトラヒメナ (*Tetrahymena pyriformis*) アルギニンキナーゼの酵素機能解析／日本動物学会第 81 回大会 (東京大学) (2010. 9. 25)
- (2) 道端珠梨：テトラヒメナの 2 種類のアルギニンキナーゼの局在と役割／日本動物学会第 81 回大会 (東京大学) (2010. 9. 23)

- (3) 道端珠梨：テトラヒメナの 2 種類のアルギニンキナーゼの性質と局在 I／日本動物学会第 80 回大会 (静岡グランシップ (静岡県)) (2009. 9. 17-20)