

脱アセチル化酵素 human SIRT2 の基質複合体・反応中間体の結晶構造 Crystal Structures of human SIRT2 in complex with acyl-peptide and acyl-ADP ribose

工藤紀雄^{1,*}, 伊藤昭博^{2,3}, 吉田稔^{1,2,3}

¹理化学研究所 環境資源科学研究センター 創薬シード化合物探索基盤ユニット,

²理化学研究所 環境資源科学研究センター ケミカルゲノミクス研究グループ,

³理化学研究所 吉田化学遺伝学研究室, 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

Norio Kudo^{1,*} Akihiro Ito^{2,3} and Minoru Yoshida^{1,2,3}

¹Seed Compounds Exploratory Unit for Drug Discovery Platform, RIKEN CSRS

²Chemical Genomics Research Group, RIKEN CSRS

³Chemical Genetics Laboratory, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama, 351-0198, Japan

1 はじめに

ヒト由来 SIRT2 は、Sirtuin ファミリーに属する酵素であり、NAD⁺を補酵素としてアセチル化リジンを脱アセチル化する酵素である。リジンのアセチル化は、タンパク質翻訳後修飾の一つであり、遺伝子発現やエネルギー代謝などを制御している[1]。近年、Sirtuin ファミリーは、脱アセチル化だけではなく脱アシル化反応も触媒することが報告され、リジンのアシル化修飾も新たな翻訳後修飾として注目されてきている。

そこで、この SIRT2 の脱アシル化反応機構を解明するために、SIRT2 の基質複合体（アシル化リジンを持つペプチド）および、反応中間体の結晶構造（acyl-ADP ribose 複合体）を決定し、反応機構についての解析を行った[2]。

2 実験

GST 融合タンパク質として human SIRT2 の活性ドメイン (54-356 a.a.) を大腸菌で発現させた。GS4B アフィニティカラムに供した後、プロテアーゼでタグを切断し、陰イオン交換カラムで精製した。

基質ペプチドは、アシル化（ミリストイル化）リジン(Kmyr)を用い、ヒストン H3 由来配列(TAR-Kmyr-STG)、腫瘍壊死因子 α 由来配列(LPK-Kmyr-TGG)の2種類を用い、それぞれ結晶を得た。

また、反応中間体の構造を得るために、上記のアシル化ペプチドと NAD⁺を混合し結晶化した。

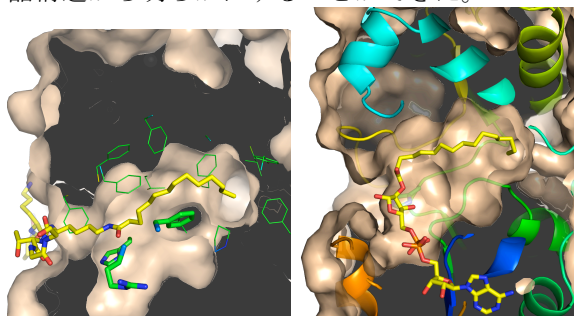
結晶の回折強度データは、BL-5A, 17A, AR-NW12A, AR-NE3A のビームラインで取得し、SIRT2 アポ体の座標(PDB entry 1J8F)を用い分子置換法によって構造を決定した。

3 結果および考察

種々の検討の結果、SIRT2 のループ部(292-303a.a.) 欠損体が結晶化に有効であることが見出され、ループ欠損変異体が結晶解析を行った。2種類のアシル化基質複合体の立体構造は、ともに 1.6 Å 分解能で決定した。基質ペプチドは、どちらも酵素の中央の

クレフト部に結合し、リジン側鎖のアシル基は、SIRT2 内部に作られる疎水ポケットに結合していた(図・左)。この空間は、SIRT2 アポ体には存在しない空間であり、アシル基を取り込むことで形成される。

また、反応中間体の結晶構造は 1.9 Å 分解能で決定でき、SIRT2 と acyl-ADP ribose の複合体構造が得られた(図・右)。これは、補酵素 NAD⁺ からニコチンアミドが離脱し、基質のアシル基が転移した状態である。アシル基は、基質複合体とほぼ同じ位置に存在しており、SIRT2 の脱アシル化反応機構を結晶構造から明らかにすることができた。



(図：SIRT2 基質複合体(左)、反応中間体(右))

4 まとめ

脱アセチル化酵素 SIRT2 の結晶構造を決定した。本研究成果は、アメリカ・ウィスコンシン大学 Denu 研究室の酵素反応速度論的解析と合わせ、文献[2]にて発表した (PDB entry: 4Y6L, 4Y6O, 4Y6Q)。

謝辞

ビームラインスタッフをはじめ、PF の方々に大変お世話になりました。ここに感謝いたします。

参考文献

- [1] Ed. Seto, M. Yoshida, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a018713 (2014).
[2] Feldman J. L. et al., *Biochemistry*, **54**, 3037-50 (2015).

* nkudo@riken.jp