

細胞内 GTP 感知機構を明らかにする PI5P4K 複合体の立体構造解析 Revealing intra cellular GTP sensing mechanism via structural analysis of PI5P4K complexes

竹内 恒^{1,*}, 千田美紀², 千田俊哉²

¹産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター
〒135-0063 東京都江東区青海 2-3-26

²高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 放射光
〒305-0801 つくば市大穂 1-1

Koh Takeuchi^{1,*}, Miki Senda², Toshiya Senda²

¹AIST, 2-3-26 Aomi, Koto, Tokyo 135-0063, Japan

²KEK, 1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan

1 はじめに

細胞の生存にとって、エネルギー代謝は最も重要な機能の一つである。GTP はタンパク質合成やシグナル伝達に利用される細胞内エネルギー物質であり、その細胞内絶対濃度や ATP との濃度比は、組織や病態によって異なる。すなわち細胞は GTP 濃度を ATP 濃度とは独立に制御している。我々は、これまで構造生物学（竹内 恒・産総研；千田 俊哉・KEK）、生化学・細胞生物学（佐々木 敦朗・シンシナティール大）の研究グループが一体となった共同研究体制を構築し、細胞内 GTP 濃度の調節機構に関する研究を行ってきた。その結果、イノシトールリン脂質キナーゼの一種 PI5P4K β が細胞内 GTP センサーであることを見出すとともに、少なくとも一部のがん細胞が、この細胞内 GTP センサーを悪用し、増殖することを発見した [1,2]。

その過程で、我々は、多重ソーキング法など新たな技術開発を行いながら [3]、PI5P4K β -ヌクレオチド複合体の結晶構造解析に成功し、その GTP 認識機構を解明した。複合体構造の解明は、PI5P4K β を細胞内 GTP センサーと位置付ける GTP 非感知型 PI5P4K β 変異体の構築にもつながった。

本研究は、これまでの研究をさらに発展させ、細胞内における GTP センサーの生物学的機能とその意義を明らかにするため、PI5P4K β を阻害する化合物との複合体結晶構造解析を行い、活性と特異性を向上させた、より良質の化学プローブを得ることを目指した。当該化合物を用いることで、細胞内の GTP センサー機能を、特異的かつ即時に停止させることが可能になり、GTP センサーの生物学的機能とその意義がより明確になることが期待される。

2 実験

結晶化に供する試料 (human PI5P4K β) は大腸菌において発現し、N 末端の His*6 タグを用いた精製の後、His*6 タグを酵素的に切断し、さらに Resource Q

カラムによる精製を行った。その結果、高純度の human PI5P4K β 標品を調製することができた。結晶化は、PI5P4K β の apo 体の結晶化条件に基づいて行った。apo 体結晶の分解能は 2.7-3.0 Å 程度であった。また、化合物との複合体の立体構造解析のためのソーキング条件を確立し、添加剤・抗凍結剤・発現領域の再構築などによる結晶性の改良も継続して行った。立体構造決定は、申請者らが PDB に登録した human PI5P4K β を用いた分子置換法により行い、Phenix 及び Coot を使用して構造精密化とモデル構築を行った。

3 結果および考察

apo 結晶に対する補酵素のソーキング・結晶凍結条件の最適化を行った結果、複数の化合物について、2.7-3.2 Å 分解能の結晶構造を得ることに成功した (図 1)。また異なる骨格を持った化合物について立体構造を比較し、両者の特徴を併せ持つ化合物を作成することで、活性と特異性を向上させることに成功し、国際特許の出願を行った。さらに確立した化合物を用いることで、PI5P4K β の GTP センサー機能により制御を受ける細胞機能を見出すことにも成功した。

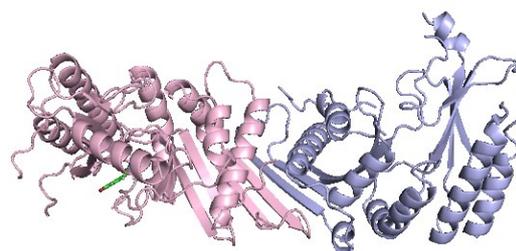


図 1 : PI5P4K β -化合物複合体構造の例

4 まとめ

本研究により、PI5P4K β に対する特異的阻害剤を複合体の立体構造に基づき設計することで、細胞内の GTP センサー機能を特異的かつ即座にシャットダウンする良質の化学プローブを得ることに成功した。

今後は確立した化学プローブを用いて GTP センサーの生物学的機能とその意義を明らかにする細胞生物学的実験を推し進める。また、PI5P4K β が腫瘍形成を促進するとの知見に基づき、当該化合物の抗がん剤としての応用も視野に入れて、多角的な研究を進める予定である。

謝辞

実験をサポートして下さったビームラインスタッフと PF の皆様に感謝致します。

参考文献

- [1] Sumita, Lo, and Takeuchi *et al*, *Mol Cell*, **61**, 187-98 (2016)
- [2] Senda *et al*, *Crystal Growth & Design*, **163**, 1565-1571 (2016)
- [3] Takeuchi K, *et al*, *FEBS J.*, **283**, 3556-3562 (2016).

成果

1. 学会発表（ワークショップ開催）
Conbio2017 にて「多角的解析からみえてくる GTP の新たな機能と人疾患への治療戦略」と財したワークショップを開催し（発表者 11 名）、筆頭著者も“細胞内 GTP センサーを標的とした新規抗がん戦略と阻害剤の探索”と題した講演を行った。

* koh-takeuchi@aist.go.jp