

PI5P4K $\beta$  の GTP センサー機能が獲得された進化的過程の解明に向けた  
変異体-ヌクレオチド複合体の X 線結晶構造解析  
Structural analysis of PI5P4K $\beta$  mutant-nucleotide complexes to unveil the  
evolutional process to achieve GTP sensing function.

竹内恒<sup>1,\*</sup>, 千田美紀<sup>2</sup>, 長瀬里沙<sup>2</sup>, 千田俊哉<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院薬学系研究科

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

<sup>2</sup> 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<sup>1,\*</sup>, Miki Senda<sup>2</sup>, Lisa Nagase<sup>2</sup>, Toshiya Senda<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UTokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>2</sup>KEK, 1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan

## 1. はじめに

生物は日々刻々と変化する外的環境や体内状況に応じて、細胞内の代謝物の量や酵素の活性などをダイナミックに変化させることで、生命活動を維持している。細胞が機能し続けるためには、細胞内での反応の駆動力となるエネルギー分子の量を常にモニターし、その量に応じて、エネルギー分子を消費する反応の制御を行う必要がある。

GTP は細胞内では ATP に次ぎ 2 番目に多く存在するエネルギー分子であり、タンパク質合成やシグナル伝達など ATP とは異なる特有の機能を担う。我々は、この GTP に着目し、GTP の細胞内濃度がどのようにモニターされ、細胞内におけるエネルギー代謝が GTP 量に応じてどのように制御されるのかを研究してきた。我々の研究などから、少なくとも脊椎動物において、GTP の細胞内濃度は ATP とは独立に制御されていることがわかりつつある。特に、2016 年には phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase  $\beta$  (PI5P4K $\beta$ ) が、他の多くのキナーゼとは異なり、GTP を生理的なリン酸供与体として利用し、ストレス下での細胞増殖を、GTP の量に応じて制御する「GTP ストレスレジリエンス」を担うキナーゼであることを様々な基盤技術の開発とともに世界に先駆けて示した[1-3]。PI5P4K $\beta$  の出現は、脊椎動物の出現とほぼ時を同じくしている。そのため、GTP 濃度に応答する新たなエネルギー代謝システムが、脊椎動物以上の高等生物において新たに獲得されたと考えることができる。しかし、PI5P4K $\beta$  の GTP センサー機能が分子論的あるいは進化的にどのように獲得されたかは不明なままであった。

PI5P4K の  $\beta$  アイソタイプは脊椎動物にしか存在せず、また PI5P4K (別名 Type II PIP kinase) 自体もその祖先種である PI4P5K (別名 Type I PIP kinase) から、多細胞生物へと進化する直前に派生したと考えられ

る。さらに、PI4P5K は ATP のみを使用する ATP キナーゼであり、PI5P4K $\beta$  は進化的に GTP 結合能を獲得したと考えられる。

我々の生化学的解析から、PI5P4K $\beta$  のヌクレオチド特異性を規定するのは GEA (guanine efficient association) モチーフと名付けた 5 残基からなる短いモチーフであること。PI5P4K $\beta$  は GTP のみならず、2a-ATP (2-アミノ ATP)、ITP (イノシトール 3 リン酸)、XTP (キサンチン 3 リン酸) などとも結合し、これらを酵素反応に利用する幅広いヌクレオチド 3 リン酸特異性を有することが明らかとなった。さらに、ITP、XTP との複合体の X 線結晶構造解析により、その基質特異性の拡張の分子メカニズムを明らかにすることに成功した。

そこで本研究においては、PI5P4K $\beta$  の基質特異性を明らかにしてきたこれまでの研究をさらに進め、PI5P4K $\beta$  が広範な特異性を、進化的にどのようにして獲得したかを明らかにすることを目的とした。具体的には、脊椎動物の GEA モチーフを祖先配列へと逆行進化させる変異導入をおこない、そのような PI5P4K $\beta$  変異体と 2a-ATP, ITP, XTP との複合体の結晶構造解析を行うことで、進化の過程でヌクレオチドの結合位置や認識ポケットの全体構造に、不連続的な想定外の変化が生じていないかを検討した。その上で、これらの逆行進化型の変異体の基質特異性を明らかにする生化学的実験データと組み合わせることで、PI5P4K $\beta$  の GTP センサー機能が獲得された進化的過程の解明が達成できると考えた。

## 2. 実験

結晶化に供する human PI5P4K $\beta$  の変異体は QuikChange 法により作成し、大腸菌において発現させた。N 末端 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 PI5P4K $\beta$  変異体標品を調製することができた。

複合体結晶は PI5P4K $\beta$  変異体の apo 型結晶をヌクレオチド 3 リン酸にソーキングすることで作製した。結晶は予め Uni-puck を用いて凍結保存し、主に BL-17A 及び NE3A で全自動測定を積極的に利用し X 線回折データを収集した。立体構造決定は、申請者らが以前に PDB に登録した PI5P4K $\beta$  の結晶構造 (PDB ID: 3WZZ) をモデルとした分子置換法により行い、Phenix および Coot を用い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 型結晶のヌクレオチド 3 リン酸へのソーキング条件及び結晶凍結条件の最適化を行った結果、T201M-2a-ATP 複合体、N203D-ITP 複合体、N203D-XTP 複合体、F205L-ITP 複合体、F205L-XTP 複合体について、各々 3.05, 2.95, 3.45, 2.80, 2.80 Å 分解能の結晶構造を得ることに成功した (図 1 T201M-2a-ATP: 7EM8, N203D-ITP: 7EM6, N203D-XTP: 7EM7, F205L-ITP: 7EM4, F205L-XTP: 7EM5)。また、それらの結合モードを確認したところ、2a-ATP, ITP, XTP は変異体でも野生型に対するのと同様の結合モードを示すことが明らかとなった。

すでに構造決定していた T201M -ATP、T201M-GTP、N203D-ATP、N203D-GTP、F205L-ATP、F205L-GTP 複合体の構造や生化学実験と併せて考察した結果、PI5P4K $\beta$  が PI4P5K から進化する過程で、①もともと有していた ATP に対する酵素活性を維持しながら、GEA モチーフの Thr201 が、GTP, ITP, XTP に共通の 6 位酸素原子を水を介して強く認識するようになったこと。また、②Thr201 との水を介した結合に伴う「結合位置のずれ」に合うように Phe205 が配置されたことで、GTP のみならず ITP, XTP などの異なる基質に対しての反応性を拡張したことなどが明らかになり、PI5P4K $\beta$  の GTP センサー機能が獲得された進化的過程についての構造的側面から明確な答えを得ることができた。

### 4. まとめ

ここでは詳しく述べないが、本研究で明らかとなった複合体結晶構造解析と逆行的変異解析とを組み合わせることで、活性と特異性の究極の選択により、キナーゼの ATP 特異性とのトレードオフとして PI5P4K $\beta$  の GTP センサー活性が獲得されたことが明らかになった。また、中間的な変異体においては、もともと有していた ATP 依存的活性自体は維持されていた。このことは、生物がランダムな試行により新たな細胞機能を獲得する際に、元々備えている機能を失うことによるマイナスの影響を最小限にしつつ、効率的に探索を行う方法の一つを示すものであると考えることができる。[4]

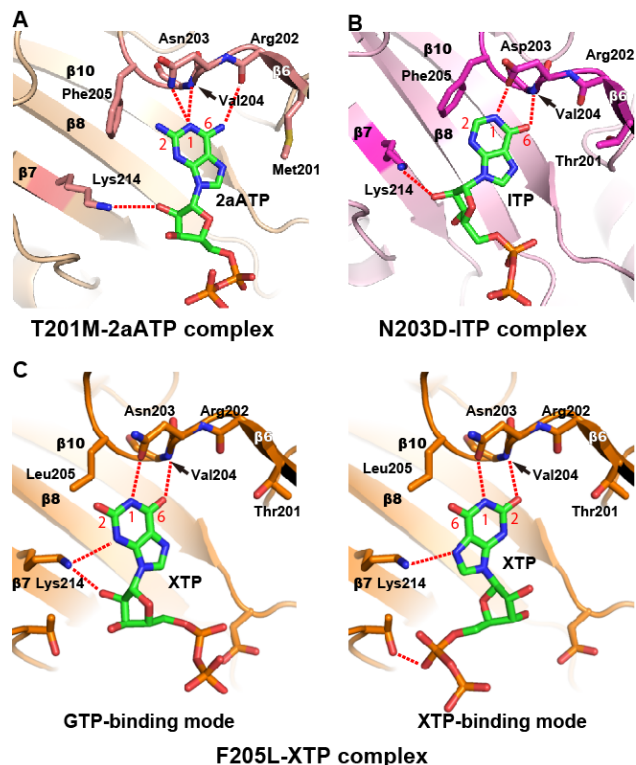


図 1 : PI5P4K $\beta$  変異体と各種ヌクレオチドの複合体の結構構造解析

### 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] Takeuchi et al, FEBS J., 283, 3556-3562 (2016).
- [3] Senda et al, Crystal Growth & Design, 163, 1565-1571 (2016)
- [4] Takeuchi, Ikeda, Senda et al, Structure (2020), in press.

\*koh-takeuchi@mol.f.u-tokyo.ac.jp