

X線結晶構造解析と NMR 解析の融合による
PI5P4K β の GTP センサー機能獲得過程の解明
Molecular evolution of PI5P4K β to achieve GTP sensing function
unveiled by X-ray crystallography and NMR

竹内恒^{1,*}, 千田美紀², 長瀬里沙², 千田俊哉²

¹ 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

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, Lisa Nagase², Toshiya Senda²

¹UTokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-0033, Japan

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

1 はじめに

生物は環境変化に応じて、細胞内の代謝物の量やタンパク質をはじめとする生体高分子の活性をダイナミックに変化させる。その際、細胞内での反応の駆動力となるのが、ATP、GTP などのエネルギー分子である。細胞はその生存を維持するためにこれらの分子の量を常にモニターし、エネルギー分子を消費する生体反応の制御や、生合成の調整を行う必要がある。

細胞のエネルギー分子については、ATP を中心として精力的な研究が行われてきた。一方、GTP は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エネルギー分子であるが、その量が ATP に比べて 1/10 程度と少ないことから、あまり注目されてこなかった。しかし、GTP は ATP と独立に細胞内存在量が制御されており、細胞によって ATP/GTP 比が大きく異なることが知られている。このことから我々は GTP の細胞内濃度を独立にモニターする分子があると考え、細胞内 GTP センサーの探索を独自に行ってきた。

その結果、2016 年に phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase β (PI5P4K β) 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、細胞増殖を GTP の量に応じて制御する細胞内 GTP センサーの一つであることを構造生物学的、生化学的、細胞生物学的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 β の出現は脊椎動物以降であり、全ゲノム遺伝子重複により PI5P4K (別名 Type II PIP kinase) が 4 遺伝子に分かれた際に獲得されたと考えられる。また PI5P4K 遺伝子自体は、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遺伝子である。これらの事実は GTP の細胞内濃度を ATP と独立に制御する仕組みが、高等生物において新たに獲得されてきたことを示している。

そこで我々はさらに研究を進めることで、2022 年に、PI5P4K β のヌクレオチド特異性を規定するのが GEA (guanine efficient association) モチーフと名付けた 5 残基 (Thr-Arg-Asn-Val-Phe) からなる短いモチーフであること、また PI5P4K β がむしろ GTP だけでなく、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) などの幅広いヌクレオチド 3 リン酸を酵素反応に利用できることを見出し、2a-ATP、ITP、XTP との複合体の X 線結晶構造解析により、その基質特異性を拡張させる分子メカニズムの解明に成功した。さらに脊椎動物の GEA モチーフを祖先配列へと逆行進化させる変異を導入し、結晶構造解析と NMR 法による生化学的実験データを組み合わせることで、PI5P4K β の GTP センサー機能が、活性と ATP 特異性のトレードオフにより獲得されたことが明らかにした [4]。本年度は、当該研究についての考察をさらに深化させ、進化的意義について考察を行った論文を発表したので紹介する [5]。

2 実験

本研究において結晶化に供する human PI5P4K β 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 β 変異体標品を調製することができた。

複合体結晶は PI5P4K β 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, BL-1A 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 β 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。本研究に関連する PDB 登録座標は以下の

通りである。WT-GMPPNP 複合体, 6K4G; WT-AMPPNP 複合体, 6K4H; WT-ITP 複合体, 7EM1; WT-XTP 複合体, 7EM2; WT-2a-ATP 複合体, 7EM3; F205L-ITP 複合体, 7EM4; F205L-XTP 複合体, 7EM5; N203D-ITP 複合体, 7EM6; N203D-XTP 複合体, 7EM7; T201M-2a-ATP 複合体, 7EM8。

3 結果および考察

GEA モチーフの進化解析により、GTP 依存性キナーゼ活性の獲得はヌクレオチド特異性の喪失によって達成されたことが明らかになった (図 1) PI5P4Kβ^{T201M_F205L} 二重変異体は祖先である ATP 依存性キナーゼ (すなわち PI4P5K) と同じアミノ酸配列を持つが、GTP、ITP、XTP に対する加水分解活性をほぼ完全に失い、ATP 加水分解活性を強く示した (図 1 左)。PI5P4Kβ^{T201M_F205L} 変異体は、GTP 依存性キナーゼから祖先である ATP 依存性キナーゼへと戻ることになる。

興味深いことに PI5P4Kβ^{T201M_F205L} 二重変異体を祖先種と考えると 201 番目の位置に Thr を獲得した変異体 (PI5P4Kβ としては、F205L 変異体に相当、図 1 中上) は、ATP に対する活性を維持したまま GTP に対する活性が増大した。しかも、同時に XTP、IMP に対する活性が大幅に強化されていた。一方、祖先種である二重変異体を基準として 205 番目の位置に Phe を獲得した PI5P4Kβ^{T201M} においても、ATP に対する活性を維持したまま、GTP 水解活性がわずかに増大した。この場合も、XTP および ITP に対する加水分解活性が増大していた (図 1 中下)。Thr-201 と Phe-205 の両方を獲得した結果として得られた WT PI5P4Kβ は、最も強い GTP 加水分解活性を示したが、XTP、ITP に対しても最も活性が最も高かった。このように、GTP 加水分解活性は XTP と ITP に対する活性の増加と一致しており、WT PI5P4Kβ ではヌクレオチド特異性および GTP 依存性キナーゼ活性の間でトレードオフが生じていることが示された。また、これらの変異が基質選択制の拡張をもたらす理由は、X 線結晶構造解析を行うことで明確に説明することができているが、詳細は 2021 年の Photon Factory Activity Report #52 を参照いただきたい。

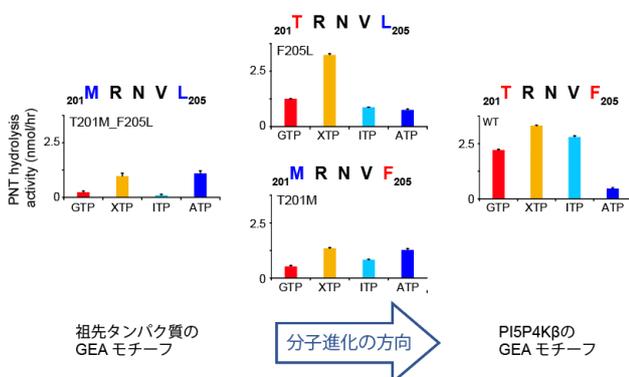


図 1 : PI5P4Kβ の分子進化に伴う ATP, XTP, ITP, XTP 加水分解活性の変化 (文献[4]より改変の上、許可を受け転載)。

細胞内の ATP 濃度は GTP よりも 10 倍高い、一方、ITP と XTP の細胞内濃度は無視できるほど低い。したがって、生理的なヌクレオチド濃度では、PI5P4Kβ 活性の半分以上は ATP に起因すると考えられ、また、XTP と ITP の活性増加は PI5P4Kβ の生物学的機能には寄与しない。また、ATP の濃度 (1-5 mM) は PI5P4Kβ の ATP に対する Km 値 (238 μM) よりもはるかに高いので、ATP に由来する酵素活性は ATP 濃度の生理的変動にほとんど影響を受けず、PI5P4Kβ の基礎活性 (basal activity) を提供していると考えられる (図 2 右、青色の影)。また PI5P4Kβ の「基本」となる ATP 依存活性は、ITP や XTP などのヌクレオチド濃度のわずかな変動を弱めるダンパーとして働き、エネルギー恒常性システムに安定性を与える可能性がある。

一方、PI5P4Kβ の 2 つの変異は主に細胞内の GTP 濃度に対するタンパク質の反応性を変化させる (図 2、赤影)。これにより細胞内に同じエネルギー分子の濃度変動が起こった場合に、祖先タンパク質がほとんど活性を変化させないのに対して (図 2 左)、PI5P4Kβ は大きな GTP 依存的活性変化を示すという新たな特性を獲得したと考えられる。

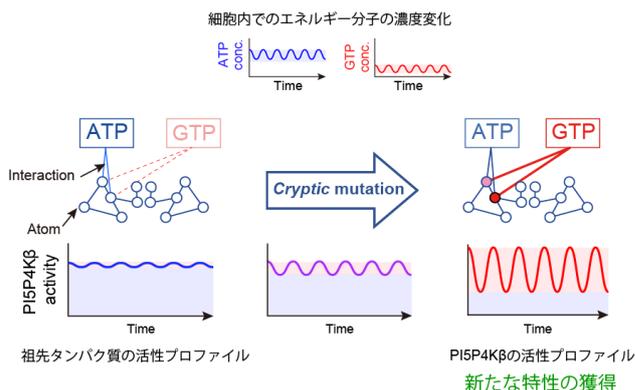
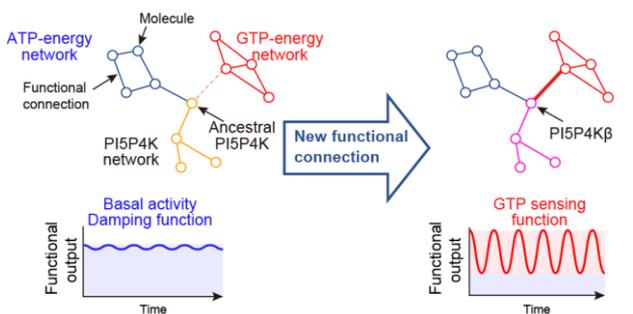


図 2 : PI5P4Kβ の分子進化に伴う細胞内活性プロファイルの変化 (文献[5]より改変の上、転載 Creative Commons CC BY license)

進化の圧力という観点から、ATP 依存活性が減弱した過程を詳しく調べることは興味深い。PI5P4Kβ^{T201M} も PI5P4Kβ^{F205L} も、本来の ATP 依存活性を維持していた (図 1)。したがって、GTP を認識する GEA モチーフに進化する過程で、ひとつ変異の入った半最適配列を持つことは、タンパク質の機能に悪影響を及ぼすことはない。このような機能的に有害ではない隠れた (Cryptic) な突然変異は、ATP 依存性キナーゼから GTP 感知性キナーゼへのスムーズな進化移行を可能にし、細胞機能への影響を低く抑えると考えられる。GEA モチーフに 1 つだけの突然変異を持つ種は、我々の知る限りでは確認されていないが、PI5P4Kβ^{F205L} のみを持つ細胞株の樹立には成功している[1]。また、異なる部位で同時に 2 つの突然変異が生じる確率は、2 つの突然変異が

別々に生じる確率よりもはるかに低いことから、GEA モチーフに1つの突然変異を持つ種が、完全に機能する GTP センサーへの橋渡しとして存在していた期間があると推測できる。

また、細胞内の機能ネットワークを俯瞰すると、GEA モチーフの獲得により、これまでは無関係だった GTP-エネルギー恒常性と細胞内のホスホイノシタイドシグナル伝達システムとの間に (図3左)、PI5P4K β を介した新たな機能的つながりが確立されたことになる (図3右)。ストレス条件下でのエネルギー代謝や増殖の制御において GTP 濃度が重要な役割を果たしていることを考えると、GTP を利用する新たなシグナル伝達経路の確立は、細胞が高次の新機能を獲得したことに相当し、その前後で細胞の持つ機能に大きな飛躍が生じることになる。このことが、個体レベルでどのような意義を持つのかを明らかにするため、現在、我々は GTP センサー機能のみを特異的に失わせたマウスを作成し研究を進めている。



新たな細胞機能の獲得

図3 : PI5P4K β の分子進化に伴う細胞内機能的ネットワークの変化 (文献[5]より改変の上、転載 Creative Commons CC BY license,)

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, 30, 886-899 (2022),
- [5] Takeuchi, Senda, Ikeda et al., FEBS J, 290, 4419-4428 (2023).

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