

## 6. エピジェネティクス制御による PP1 発現抑制の可能性

興味深いことに、成体ラットの恐怖条件付け文脈学習では、記憶固定期にDNAメチル基転移酵素の発現が上昇し、*PP1γ1* 遺伝子のCpGアイランドが高度にメチル化を受け、その発現が抑制される<sup>13)</sup>。ATR-X症候群にはDNAメチル化パターンに変化が見られる<sup>14)</sup>。今後、*PP1γ1* 遺伝子のメチル化がATR-X症候群を含めた精神遅滞において重要な役割を担うか検討する。

## 7. その他の精神遅滞モデルマウスと CaMKII 活性の関連性

X-連鎖精神遅滞であるRett症候群は、*MECP2* 遺伝子の変異に起因する。CaMKIIによるMeCP2 (Ser421) のリン酸化はMeCP2依存性のBDNF (brain-derived neurotrophic factor) の誘導を制御し、樹状突起の伸展やスパイン形態に関与することが報告された<sup>15)</sup>。Angelman症候群は、母由来15番染色体上の*UBE3A* 遺伝子コピーの欠失または変異により引き起こされる重度の精神遅滞である。*UBE3A* 遺伝子改変マウスでは海馬におけるCaMKII活性の低下が見られ、スパインの長さが短く、密度も低い。さらに、そのマウスを活性化型CaMKIIを発現する遺伝子改変マウスと掛け合わせることで、*UBE3A* 遺伝子改変マウスのCaMKII活性の低下が修復され、シナプス可塑性の障害、学習記憶の改善が見られた<sup>16)</sup>。これらの結果は、CaMKII活性制御が精神遅滞の治療に役立つ可能性を示している。

## 8. おわりに

今回紹介した精神遅滞だけでなく、統合失調症やADHD等の精神疾患においても樹状突起スパインの異常な形態変化や密度変化が報告されている。樹状突起スパイン制御機構解明の研究が、精神疾患の原因解明だけでなく、将来的に、精神疾患の治療に貢献できると考えている。

- 1) Kaufmann, W.E. & Moser, H.W. (2000) *Cereb. Cortex*, 10, 981-991.
- 2) Jourdain, P., Fukunaga, K., & Muller, D. (2003) *J. Neurosci.*, 23, 10645-10649.
- 3) Zechner, U., Wilda, M., Kehrer-Sawatzki, H., Vogel, W., Fundele, R., & Hameister, H. (2001) *Trends Genet.*, 17, 697-701.
- 4) Ropers, H.H. & Hamel, B.C. (2005) *Nat. Rev. Genet.*, 6, 46-57.
- 5) Govek, E.E., Newey, S.E., & Van Aelst, L. (2005) *Genes*

- Dev.*, 19, 1-49.
- 6) Boda, B., Dubos, A., & Muller, D. (2010) *Curr. Opin. Neurobiol.*, 20, 519-527.
- 7) Pfeiffer, B.E. & Huber, K.M. (2009) *Neuroscientist*, 15, 549-567.
- 8) Calfa, G., Percy, A.K., & Pozzo-Miller, L. (2011) *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 236, 3-19.
- 9) Bérubé, N.G., Mangelsdorf, M., Jagla, M., Vanderluit, J., Garrick, D., Gibbons, R.J., Higgs, D.R., Slack, R.S., & Picketts, D. J. (2005) *J. Clin. Invest.*, 115, 258-267.
- 10) Howard, M.T., Malik, N., Anderson, C.B., Voskuil, J.L., Atkins, J.F., & Gibbons, R.J. (2004) *J. Med. Genet.*, 41, 951-956.
- 11) Nogami, T., Beppu, H., Tokoro, T., Moriguchi, S., Shioda, N., Fukunaga, K., Ohtsuka, T., Yoko, I., Sasahara, M., Shimada, Y., Nishijo, H., Li, E., & Kitajima, I. (2010) *Hippocampus*, 21, 678-687.
- 12) Shioda, N., Beppu, H., Fukuda, T., Li, E., Kitajima, I., & Fukunaga, K. (2011) *J. Neurosci.*, 31, 346-358.
- 13) Miller, C.A. & Sweatt, J.D. (2007) *Neuron*, 53, 857-869.
- 14) Gibbons, R.J., McDowell, T.L., Raman, S., O'Rourke, D.M., Garrick, D., Ayyub, H., & Higgs, D.R. (2000) *Nat. Genet.*, 24, 368-371.
- 15) Zhou, Z., Hong, E.J., Cohen, S., Zhao, W.N., Ho, H.Y., Schmidt, L., Chen, W.G., Lin, Y., Savner, E., Griffith, E.C., Hu, L., Steen, J.A., Weitz, C.J., & Greenberg, M.E. (2006) *Neuron*, 52, 255-269.
- 16) van Woerden, G.M., Harris, K.D., Hojjati, M.R., Gustin, R.M., Qiu, S., de Avila Freire, R., Jiang, Y.H., Elgersma, Y., & Weeber, E.J. (2007) *Nat. Neurosci.*, 10, 280-282.

塩田 倫史, 福永 浩司

(東北大学大学院薬学研究科薬理学分野)

Abnormal dendritic spine morphology and its signal transduction mechanisms in mental retardation  
Norifumi Shioda and Kohji Fukunaga (Department of Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 6-3 Aramaki-Aoba, Aobaku, Sendai 980-8578, Japan)

## ユニークな酵素活性——超好熱アーキア由来耐熱性糖代謝酵素の特性

### 1. はじめに

糖は、大部分の生物でエネルギー源・細胞表層の構成物・情報伝達物質の構成要素として重要な役割を担っている。その代謝及び各反応を司る酵素の活性や機能について大腸菌をはじめとするモデル生物で詳しく解析されてきている。近年では次世代シーケンサーの登場で微生物のゲノ



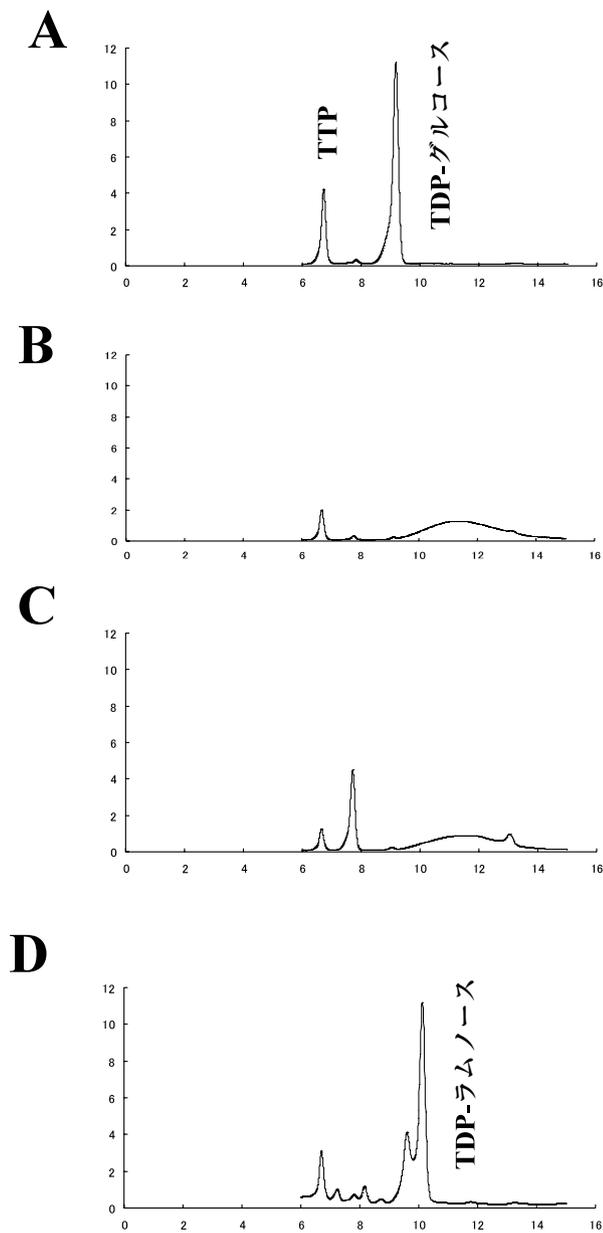


図2 ラムノース合成酵素を反応させた場合の産物の HPLC 分析結果

グルコース 1-リン酸と TTP を基質として加えた反応系に、A : RmlA 酵素を加えた場合、B : RmlA 及び RmlB を加えた場合、C : RmlA, RmlB 及び RmlC を加えた場合、D : RmlA-D 及び NADPH を加えた場合。

ろ、図2に示すように、RmlA 相同酵素のみを加えるとグルコース-1-リン酸と TTP が結合した TDP-グルコースの合成が確認された(図2A)。次に、RmlA にさらに RmlB 相同酵素を加えた反応、RmlA, RmlB 及び RmlC 相同酵素を加えた反応では、TDP-グルコースの糖部分が変化した

ピークが検出された(図2B, C)。さらに、4種類の相同酵素全てと NADPH を加えると4段階の反応が全て進行して、TDP-ラムノースが合成されることが確認された(図2D)。このように、試験管内で4段階の反応が正確に進行することは、本超好熱アーキア *P. horikoshii* の細胞内でもこれらの酵素が機能していることを示唆している。さらにこのことは、本超好熱アーキアの細胞内には図1Aに示す TDP-ラムノース合成経路が存在し、実際にラムノースが合成されていることも強く示唆している。この反応経路の最終産物である L-ラムノースは、結核菌等の病原菌の細胞膜に結合している糖鎖の最も基部に位置する N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) の次に位置し、病原性の発現に重要な役割を果たしていることが知られている<sup>3)</sup>。しかし、超好熱アーキアは病原性を有さないため、この合成された L-ラムノースはどのような役割を担っているのか？ 本 L-ラムノースが超好熱アーキア細胞内で担っている実際の機能を明らかにしていくことが次の重要な課題だと考える。

#### 4. *S. tokodaii* の有する ST0452 酵素の解析

上で示した TDP-ラムノース合成経路の初発反応であるグルコース-1-リン酸と TTP を結合する反応をつかさどる酵素であるグルコース-1-リン酸 TTP 転移酵素との類似酵素の検索を行ったところ、ゲノム配列が明らかとなっている好酸性超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* strain7 のゲノム情報<sup>4)</sup>中に複数の相同遺伝子が見出されてきた。その中で ST0452 蛋白質をコードする遺伝子を他の相同遺伝子と比較したところ、タンパク質の C 末端領域に相当する部分が非常に長いことが見出されてきた。本 ST0452 タンパク質は、実際に糖リン酸とヌクレオシド三リン酸とを結合することができるか、長い C 末端領域の機能は何か、という疑問点を明らかにすることを目的に、本 ST0452 タンパク質を大腸菌で発現させ、得られたタンパク質の詳細な機能解明に取り組んだ。

その結果、本 ST0452 タンパク質は、80度で3時間加温処理しても60%程度の活性が残ることが、また95度1時間半の加温処理後でも半分の活性が残るという非常に高い耐熱性を有していることが判明した<sup>5)</sup>。さらに最適な pH は、7.5 とほぼ中性だと見出された<sup>5)</sup>。本 ST0452 タンパク質が見出された超好熱アーキア *S. tokodaii* は好酸性で pH2 から3が最適生育条件だが、この酵素が機能する細胞内は細胞外の条件と異なり中性に保たれていることも示唆される。また、大腸菌やその他のモデル生物の類縁酵素では金

属イオンとしては、 $Mg^{2+}$  また  $Mn^{2+}$  のみしか利用できないが、本 ST0452 タンパク質の場合には、 $Co^{2+}$  や  $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  のような他では利用されない多様な金属イオンも利用できることも明らかとなった<sup>5)</sup>。

次に、反応に用いることが可能な基質の種類を調べたところ、本 ST0452 タンパク質の相同性から予想されたグルコース-1-リン酸と TTP を結合できるだけでなく、グルコース-1-リン酸と全ての種類のデオキシ NTP とを結合できることが見出された。さらに、本 ST0452 タンパク質には、糖リン酸基質として *N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸 (GlcNAc-1-リン酸) を TTP または UTP と結合する活性も見出されてきた。これらの活性については、相同性から予想されたグルコース-1-リン酸と TTP を結合する活性よりも高い活性が見出されてきた。ここで生成される UDP-GlcNAc は、多くの生物の細胞表面に結合している糖鎖の中でも最も基部に存在する糖である GlcNAc を糖鎖中に取り込むために必要な化合物である。また、この化合物の合成経路は図 1B に示すように、バクテリアと真核生物で異なることが知られている<sup>6)</sup>。バクテリア型の UDP-GlcNAc 合成経路では、図 1B に示すように最後の GlcNAc-1-リン酸と UTP を結合する酵素がその一段階前のグルコサミン-1-リン酸のアセチル化も触媒することが知られている<sup>6)</sup>。一方、真核生物型の合成経路では、先にアセチル化された GlcNAc-6-リン酸から、リン酸の分子内転移によって GlcNAc-1-リン酸が合成される。果たしてアーキアでは、どちらのタイプの合成経路を用いているか等の疑問点解明に取り組んだ。

### 5. ST0452 酵素のアセチル基転移活性

大腸菌や他のバクテリアが有する UDP-GlcNAc 合成経路の最後の 2 段階を触媒する酵素は GlmU と呼ばれるが、本 ST0452 タンパク質とは 20% 程度の相同性しか見出されなかった<sup>7)</sup>。しかし、アセチル基やアシル基を転移させる既知酵素から見出されていたモチーフパターンであるアミノ酸残基の繰り返しは本 ST0452 タンパク質の C-末端領域から見出されてきた。つまり、この ST0452 タンパク質にはアセチル基転移活性の存在が示唆されたので、本活性の検出に取り組んだ。

アセチル基転移反応では、アセチル-CoA のアセチル基が CoA から遊離して、アセチル化される化合物に結合する。生成された CoA は、DTNB (thiol reagent 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) 試薬と反応させることで波長 412 nm の光に吸収が見出されるので、412 nm の波長の光の吸光

度から生成された CoA の定量ができる。そこで、まず基質であるグルコサミン-1-リン酸、アセチル-CoA を含む反応液に ST0452 タンパク質を加えて 80 度で保温してみたところ、412 nm での吸光度の増加が検出されたことから、本アセチル基転移活性の存在が強く示唆された。一方、真核生物型のアセチル基転移活性が存在するかグルコサミン-6-リン酸を基質として同様の反応を行ったが、この場合には 412 nm での吸光度の上昇は見られなかった。これらの結果から、好酸性超好熱アーキア *S. tokodaii* では、バクテリア型の UDP-GlcNAc 合成経路が機能していることが示された。

しかし、このグルコサミン-1-リン酸を基質にした時の 412 nm の吸光度の上昇だけでは、アセチル基がアセチル-CoA から遊離したことが検出されただけで、反応生成物は同定されてはいない。そこで、推定どおりにグルコサミン-1-リン酸から GlcNAc-1-リン酸が生成されているかの確認を本 ST0452 タンパク質が有している糖 1 リン酸ヌクレオチド転移酵素活性を用いて検出することを試みた。

本 ST0452 タンパク質の糖 1 リン酸ヌクレオチド転移酵素活性では、グルコサミン-1-リン酸を基質にできないが、アセチル基転移活性の反応生成物である GlcNAc-1-リン酸を UTP と結合させて UDP-GlcNAc を生成することができる。そこで、本アセチル基転移反応の系に UTP を加えた場合に生成される UDP-GlcNAc を検出することでアセチル基が目的の化合物に結合しているかを確認することとした。図 3A に示すようにアセチル CoA または ST0452 タンパク質を加えない場合には、糖ヌクレオチド分子は検出されなかったが、これらの基質を全て加えて反応を行うと図 3B に示すように UDP-GlcNAc 標準品と同一の溶出位置にピークが検出された。この結果から、アセチル基が確かにグルコサミン-1-リン酸に転移されて GlcNAc-1-リン酸が生成されていることが確認されたのである<sup>7)</sup>。

### 6. 新規アセチル基転移活性

次に本 ST0452 タンパク質のアセチル基転移活性が利用できるアミノ糖-1-リン酸基質の種類について検討した。その結果、ガラクトサミン-1-リン酸を基質にした反応を行ったところ CoA の産生を示す吸光度の上昇が検出された。そこで、上記と同様に UTP を反応系に加えて反応を進行させてみたところ、図 3C に示されるように、UDP-*N*-アセチルガラクトサミン (UDP-GalNAc) 分子が生成されることが確認された<sup>7)</sup>。このことは、本 ST0452 タンパク質がグルコサミン-1-リン酸だけでなくガラ

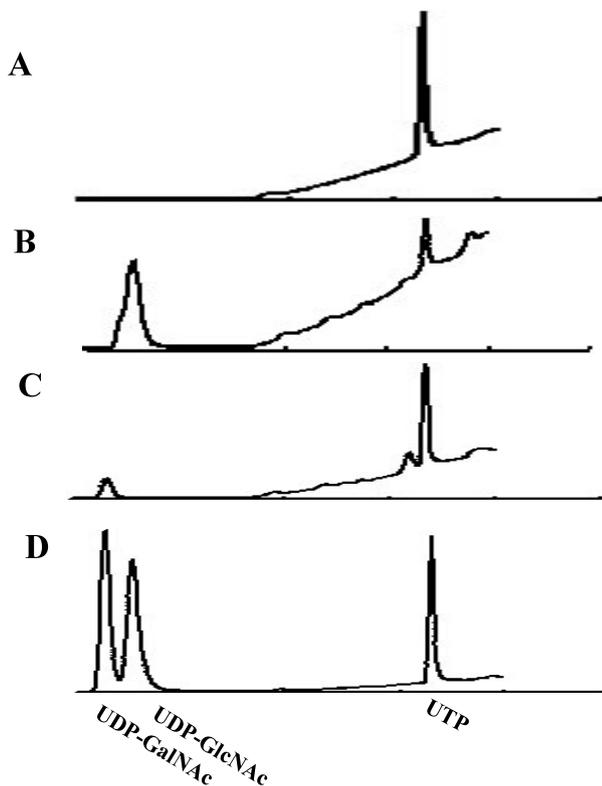


図3 UTPを加えてアセチル化反応を行った場合の生成物のHPLC分析結果

A: アセチル CoA または ST0452 酵素を加えない場合. B: グルコサミン-1-リン酸を基質としてアセチル CoA 及び ST0452 酵素も加えて反応を進めた場合. C: ガラクトサミン-1-リン酸を基質としてアセチル CoA 及び ST0452 酵素も加えて反応を進めた場合. D: 標準の UTP, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc を分離した結果.

クトサミン-1-リン酸もアセチル化できるということを示している. この反応を行うことができる酵素は, これまでにどの生物種からも見出されていなかったもので, 本 ST0452 タンパク質で初めて見出されたものである.

本 ST0452 タンパク質は, GlcNAc-1-リン酸と UTP を結合するだけでなく, GalNAc-1-リン酸と UTP も結合する活性の存在が示唆された. そこで, この酵素活性について, さらなる確認実験・解析を計画した. しかし GalNAc-1-リン酸は, どの会社からも市販されていないので, GalNAc-1-リン酸と UTP から UDP-GalNAc を生成する反応を直接確認することは不可能であった. 一方, UDP-GalNAc は, 試薬として市販されていたので, UDP-GalNAc とピロリン酸を基質として UTP と GalNAc-1-リン酸の生成から, 本酵素活性の存在の確認に取り組んだ. これらの基質を含む反応液に ST0452 タンパク質を加えて 80 度で保温したと

ころ, 確かに UTP の生成が確認されたのである<sup>7)</sup>.

以上の実験結果から, 本 ST0452 タンパク質には, これまで見出されていなかったガラクトサミン-1-リン酸にアセチル基を転移する活性並びに GalNAc-1-リン酸と UTP とを結合する活性が存在することが確認できたのである. これら二つの活性を一つのタンパク質が有している初めての例である. さらに, 本 ST0452 タンパク質は高い耐熱性を有していることから応用面での利用も期待されている.

これまで, UDP-GalNAc は UDP-GlcNAc からエビメラーゼを用いて合成される経路のみが微生物等で明らかにされていた<sup>8)</sup>. しかし, 本 ST0452 タンパク質が有する二つの活性を考慮すると図 1A に示すような新たな UDP-GalNAc 合成経路が本アーキアには存在することが強く示唆されたのである. このような経路の存在が示されたのは本成果が初めてである.

## 7. ま と め

本研究は, ゲノム情報を有効に利用して実際の活性を確認することが, 新たな発見につながった良い例だと思われる. ゲノム情報から作成したタンパク質を用いた詳細な解析は, 相同性だけでは見えてこない超好熱アーキアの有しているユニークで予想外な性質に迫れるパワフルな手法であろう.

本稿に示した結果は, 筆者の研究室の学術研究員の皆さんの協力の元で得られた成果で, この場を借りて感謝の意を表したい.

- 1) Woese, C.R. & Fox, G.E. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5088-5090.
- 2) Rose, M.D. et al. (1984) *Biochem. J.*, 224, 407-414.
- 3) McNeil, M. et al. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 18200-18206.
- 4) Kawarabayasi, Y. et al. (2001) *DNA Res.*, 8, 123-140.
- 5) Zhang, Z. et al. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 9698-9705.
- 6) Mengin-lecreulx, D. & van Heijenoort, J. (1994) *J. Bacteriol.*, 176, 5788-5795.
- 7) Zhang, Z. et al. (2010) *J. Bacteriol.*, 192, 3287-3293.
- 8) Bernatchez, S.C. et al. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 4792-4802.

河原林 裕

(九州大学大学院農学研究院)

Uniqueness of the metabolic pathway of carbohydrate in thermophilic archaea

Yutaka Kawarabayasi (Kyushu University, Faculty of Agriculture, Laboratory of Functional Genomics of Extremophiles, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan)