

- 1) Li, Q.L., Ito, K., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K., Chi, X.Z., Lee, K.Y., Nomura, S., Lee, C.W., Han, S.B., Kim, H. M., Kim, W.J., Yamamoto, H., Yamashita, N., Yano, T., Ikeda, T., Itohara, S., Inazawa, J., Abe, T., Hagiwara, A., Yamagishi, H., Ooe, A., Kaneda, A., Sugimura, T., Ushijima, T., Bae, S. C., & Ito, Y. (2002) *Cell*, 109, 113-124.
- 2) Ito, K., Liu, Q., Salto-Tellez, M., Yano, T., Tada, K., Ida, H., Huang, C., Shah, N., Inoue, M., Rajnakova, A., Hiong, K.C., Peh, B.K., Han, H.C., Ito, T., The, M., Yeoh, K.G., & Ito, Y. (2005) *Cancer Res.*, 65, 7743-7750.
- 3) Chi, X.Z., Yang, J.O., Lee, K.Y., Ito, K., Sakakura, C., Li, Q. L., Kim, H.R., Cha, E.J., Lee, Y.H., Kaneda, A., Ushijima, T., Kim, W.J., Ito, Y., & Bae, S.C. (2005) *Mol. Cell. Biol.*, 25, 8097-8107.
- 4) Yano, T., Ito, K., Fukamachi, H., Chi, X.Z., Wee, H.J., Inoue, K., Ida, H., Bouillet, P., Strasser, A., Bae, S.C., & Ito, Y. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, 26, 4474-4488.
- 5) Chang, T.L., Ito, K., Ko, T.K., Liu, Q., Salto-Tellez, M., Yeoh, K.G., Fukamachi, H., & Ito, Y. (2010) *Gastroenterology*, 138, 255-265.
- 6) Ito, K., Lim, A.C., Salto-Tellez, M., Motoda, L., Osato, M., Chuang, L.S., Lee, C.W., Voon, D.C., Koo, J.K., Wang, H., Fukamachi, H., & Ito, Y. (2008) *Cancer Cell*, 14, 226-237.
- 7) Weis, V.G. & Goldenring, J.R. (2009) *Gastric Cancer*, 12, 189-197.
- 8) Ito, K., Chuang, L.S., Ito, T., Chang, T.L., Fukamachi, H., Salto-Tellez, M., & Ito, Y. (2011) *Gastroenterology*, 140, 1536-1546.
- 9) Quante, M., Marrache, F., Goldenring, J.R., & Wang, T.C. (2010) *Gastroenterology*, 139, 2018-2027.
- 10) Tsang, Y.H., Lamb, A., Romero-Gallo, J., Huang, B., Ito, K., Peek, R.M. Jr., Ito, Y., & Chen, L.F. (2010) *Oncogene*, 29, 5643-5650.
- 11) Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M.J., Bae, S.C., Komori, T., Ito, Y., & Littman, D.R. (2002) *Cell*, 111, 621-633.
- 12) Sugai, M., Aoki, K., Osato, M., Nambu, Y., Ito, K., Taketo, M. M., & Shimizu, A. (2011) *J. Immunol.*, 186, 6515-6520.
- 13) Ito, K., Inoue, K.I., Bae, S.C., & Ito, Y. (2009) *Oncogene*, 28, 1379-1384.

伊藤 公成

(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)

Tumor suppressive functions of RUNX3 in gastric carcinogenesis

Kosei Ito (Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8588, Japan)

## タンパク質のスワッピングを伴う新規翻訳後修飾メカニズム

### 1. はじめに

ニトリル分解酵素の一つであるニトリルヒドラーゼ(以下, NHase と記載)<sup>1)</sup>は現在, アクリルアミドやニコチンアミドのバイオコンバージョンによる工業生産に使用されている. NHase は  $\alpha$  と  $\beta$  の2種類のサブユニットからなる酵素であり, 活性中心に Fe イオンを持つ Fe 型 NHase と Co イオンを持つ Co 型 NHase の二つに大別できる<sup>2)</sup>. アミド生産上有用な酵素であるため様々な微生物において解析され, いくつかの NHase の立体構造が既に決定されている<sup>3,4)</sup>. どちらの金属イオンも酵素の  $\alpha$  サブユニットに存在し, 金属イオンに配位する ( $\alpha$  サブユニット中の) 三つのシステイン残基のうち, 二つはシステインスルフィン酸・システインスルフェン酸として存在することが判明している<sup>3,4)</sup>. 即ち, 本酵素は金属イオンの配位とシステイン残基の酸化という翻訳後修飾を受けて活性型になる.

アジポニトリルを基質とする 5-シアノバレルアミドの工業生産に使用されている *Pseudomonas chlororaphis* B23 菌の酵素<sup>5)</sup>は Fe 型 NHase であるのに対し, (アクリロニトリルを基質とする) アクリルアミドの工業生産や (3-シアノピリジンを経由して) ニコチンアミドの工業生産に使用される *Rhodococcus rhodochrous* J1 菌 (以下, J1 菌と記載) の酵素は Co 型 NHase である (図 1)<sup>6)</sup>. Fe 型, Co 型いずれの酵素もどのような機構により翻訳後修飾が導入されるのかは不明であった. J1 菌は高分子量型 (H-) と低

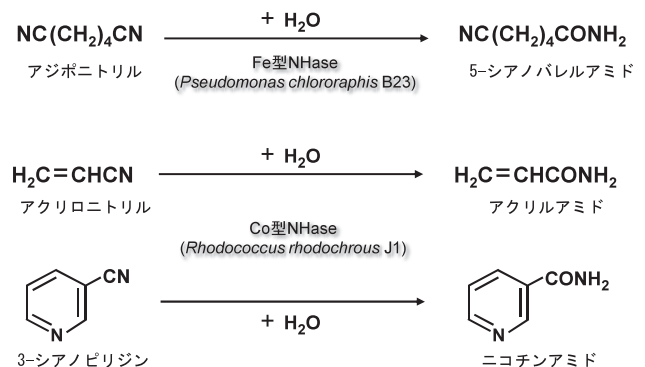


図 1 有用化合物の工業生産に利用されるニトリルヒドラーゼ (NHase)

分子量型 (L-) の2種のCo型NHaseをもっており、極く最近、L-NHaseがタンパク質のスワッピングを伴うこれまで誰も予想しなかった新規なメカニズムにより翻訳後修飾を受けて活性型になることを筆者らは発見した<sup>7,8)</sup>。本稿では最新の研究成果<sup>9)</sup>も併せて解説する都合上、H-NHaseを例として新規翻訳後修飾機構を概説する。

## 2. NHaseの翻訳後成熟化に関する メデイエーターの発見

Co非存在下で培養した場合や、H-NHaseの構造遺伝子である*nhhBA*<sup>10)</sup>のみをNHase活性を保持しない他の*Rhodococcus*属微生物に導入しCo存在下で培養した場合、H-NHaseはCoをほとんど含まないアポ酵素として生成する。一方、構造遺伝子と一緒にその下流に位置する*nhhG*遺伝子<sup>10)</sup>も*nhhBAG*として他の*Rhodococcus*属微生物に導入しCo存在下で培養すると、H-NHaseはCoを含むホロ酵素として生成する。この結果より、*nhhG*遺伝子産物は、アポ酵素からホロ酵素への成熟化に重要な役割を果たすことが示唆された。*nhhBAG*を導入した菌株から調製した無細胞抽出液をSDS-PAGEに供するとNhhGタンパク質(以下、gタンパク質とも記載)の発現が確認できることから、SDS-PAGE上のバンドを指標に精製したところ、gタンパク質はH-NHaseの $\alpha$ サブユニットとの複合体として得られた。ゲルろ過法により解析した結果、本複合体の分子量は48.8 kDaであり、H-NHaseの $\alpha$ サブユニットおよびgタンパク質の分子量がそれぞれ22.8 kDa, 11.7 kDaであることを考慮すると本複合体はヘテロ三量体( $\alpha g_2$ )と示唆された<sup>9)</sup>。 $\alpha g_2$ 複合体中の $\alpha$ サブユニットはCoを配位しているが、本複合体はH-NHase活性を示さない。しかし、 $\alpha g_2$ 複合体を精製したアポ酵素と混合すると、混合液中のNHase活性の上昇が認められた。アポ酵素と過剰量の $\alpha g_2$ 複合体を混合し、その溶液から精製したH-NHase(以下、R-H-NHaseと記載)の諸性質をアポ酵素やホロ酵素と比較した。いずれの遠紫外CDスペクトルも

一致したことから、三者間で二次構造は同じであることが示唆された。アポ酵素はCoをほとんど含まず酵素活性値が低いのに対し、R-H-NHaseではCo含量と酵素活性値は上昇し、ホロ酵素と同様の数値を示した。さらに、紫外可視吸収スペクトルおよび近紫外CDスペクトル解析から、ホロ酵素とR-H-NHaseにおいてのみ(Coに配位する)酸化システイン残基に由来するスペクトルが確認できた。即ち、 $\alpha g_2$ 複合体との混合により、アポH-NHaseは*in vitro*でCoイオンの配位とシステイン残基の酸化を伴う翻訳後修飾を経てホロH-NHaseに成熟化することが示唆された<sup>9)</sup>。この時、 $\alpha g_2$ 複合体はH-NHaseのメデイエーター(成熟化複合体)として機能し、アポ酵素の翻訳後成熟化に重要な役割を果たす。

## 3. self-subunit swappingの発見

アポH-NHaseに、Coイオンの配位とシステイン残基の酸化が導入されるには、(1)アポH-NHaseの $\alpha$ サブユニットのシステイン残基が酸化され、そこに $\alpha g_2$ 複合体からCoだけが供給されるメカニズム、(2) $\alpha g_2$ 複合体のCoを含む $\alpha$ サブユニットと、アポH-NHaseの $\alpha$ サブユニットが置換(スワッピング)するメカニズム、のいずれかが考えられる。どちらのメカニズムで成熟化するのかを調べるために、部位特異的変異法によりH-NHaseの $\alpha$ サブユニットの5番目のアミノ酸(バリン)をロイシンに置換した変異アポH-NHase( $\alpha$ -V5L)を作成し精製した。本変異酵素もアポH-NHaseと同様に酵素活性値は低いが、(Coを含み) $\alpha$ サブユニットの5番目のアミノ酸がバリンのままの $\alpha g_2$ 複合体と長時間混合すると、ホロH-NHaseと同じ活性値を示すようになった。この状態の混合液からH-NHaseを精製し、その $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列を調べた結果、5番目のアミノ酸はロイシンではなくバリンであり、アポH-NHaseの $\alpha$ サブユニットは $\alpha g_2$ 複合体の $\alpha$ サブユニットとスワッピングしたことが証明された(図2)<sup>9)</sup>。

次に、変異アポH-NHase( $\alpha$ -V5L)と $\alpha g_2$ 複合体とを混合し、

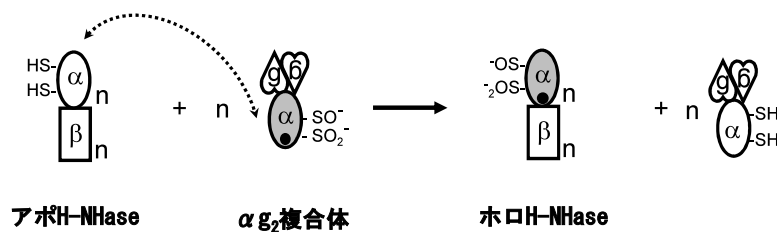


図2 Self-subunit swappingによるH-NHaseの翻訳後成熟化  
コバルトイオン(●)

さまざまな間隔でサンプリングを行った。それらの酵素活性を測定すると同時に、サンプリングした混合液から H-NHase を精製して  $\alpha$  サブユニットのアミノ酸配列を調べ 5 番目のアミノ酸中のバリンあるいはロイシンの量を測定した。その結果、精製した H-NHase の当該アミノ酸中のバリンの存在比率 [バリン/(バリン+ロイシン)] の増加と比活性の上昇との間で時間経過に応じた有意な相関性が見られ、 $\alpha$  サブユニット同士のスワッピングの割合と翻訳後の H-NHase の成熟化の割合が同じであることを実証した。即ち、アポ H-NHase への Co イオンの配位とシステイン残基の酸化は、 $\alpha_2$  複合体からの  $\alpha$  サブユニットのスワッピングを介することが判明した<sup>9)</sup>。同一サブユニットの置換により翻訳後修飾が導入される現象はこれまで誰も予想しなかったユニークなタンパク質の挙動を伴うことから、我々は本メカニズムを self-subunit swapping を命名した (図 2)<sup>7,9)</sup>。

#### 4. self-subunit swapping 中間複合体の発見

本翻訳後成熟化メカニズムを詳細に解明するために、反応溶液中に含まれるタンパク質の粒子径を動的光散乱法により解析した。アポ H-NHase 溶液、 $\alpha_2$  複合体溶液ではそれぞれ 14.7 nm, 6.6 nm の単一の粒子径ピークが確認でき、各々のサイズは 45 分間の計測中変化しなかった。アポ H-NHase と  $\alpha_2$  複合体を混合し、self-subunit swapping が起こっている反応溶液を測定したところ、混合後に  $\alpha_2$  複合体に相当する 7.6 nm の粒子径ピークとアポ H-NHase より大きい 30.7 nm の粒子径ピークの二つが観察できた。45 分間の計測中、 $\alpha_2$  複合体に相当するピークの粒子径は変化しなかったが、もう一つのピークの粒子径は (アポ H-NHase より大きい) 21.3–32.0 nm の間で変動した。また、self-subunit swapping 後に生成するホロ H-NHase とアポ  $\alpha_2$  複合体は、アポ H-NHase とホロ  $\alpha_2$  複合体と同じ粒子径としてそれぞれ観察された。これらの結果より、self-subunit swapping 中に確認されたアポ H-NHase より大きい粒子は、アポ H-NHase と  $\alpha_2$  複合体が結合した中間複合体と考えられる。また、この中間複合体が幅広いサイズ分布を示すことから、様々な大きさの中間複合体の存在が示唆された<sup>9)</sup>。例えば、アポ H-NHase に対して一つしか  $\alpha_2$  複合体が結合していない中間複合体 [ $\alpha_2$ -( $\alpha\beta$ )<sub>n</sub>]、二つの  $\alpha_2$  複合体が結合している中間複合体 [ $2\alpha_2$ -( $\alpha\beta$ )<sub>n</sub>]、さらに複数の  $\alpha_2$  複合体が結合している中間複合体 [ $n\alpha_2$ -( $\alpha\beta$ )<sub>n</sub>] などである。さらに、アポ H-NHase と  $\alpha_2$  複合体を混合して 3 分経過後には既にアポ H-NHase より大きい

粒子径が確認できていることから、これらの中間複合体の形成過程は非常に早いと示唆される。

#### 5. self-subunit swapping による翻訳後成熟化モデル

$\alpha$  サブユニットと複合体を形成する g タンパク質は複合体中において (モル比で)  $\alpha$  サブユニットの 2 倍存在する。g タンパク質と相同性を示す NhlE (e タンパク質) も  $\alpha_2$  複合体として L-NHase の翻訳後成熟化に関与し、さらに、本複合体から変性条件下で  $\alpha$  サブユニットと e タンパク質を分離した後に変性剤を除去すると e タンパク質は二量体として存在していた<sup>7)</sup>。(H-NHase の翻訳後成熟化に関与する) g タンパク質や (L-NHase の翻訳後成熟化に関与する) e タンパク質が単量体ではなく二量体を形成する性質を有する点を考慮し、self-subunit swapping による H-NHase の翻訳後成熟化メカニズムの詳細なモデルを以下のように提唱した (図 3)<sup>9)</sup>。

- [1]  $\alpha_2$  複合体は、(g- $\alpha$ -g ではなく)  $\alpha$ -g<sub>2</sub> の構造をとる。
- [2] g タンパク質には、 $\alpha$  サブユニットへの結合部位が 1 ヶ所存在する。(従って、二量体状態の g<sub>2</sub> だと、 $\alpha$  サブユニットへの結合部位を 2 ヶ所保有することになる)
- [3] ホロ  $\alpha_2$  複合体において、g<sub>2</sub> が保有する 2 ヶ所の  $\alpha$  サブユニット結合部位のうち、片方は  $\alpha$  サブユニットと結合しているが、もう片方は空いている。
- [4] ホロ  $\alpha_2$  複合体とアポ H-NHase を混合した場合、(ホロ  $\alpha_2$  複合体中に存在する)  $\alpha$  サブユニットと結合していない方の g タンパク質の  $\alpha$  サブユニット結合部位にアポ H-NHase の  $\alpha$  サブユニットが結合する。
- [5] アポ H-NHase の  $\beta$  サブユニットとホロ  $\alpha_2$  複合体の (翻訳後修飾をもつ)  $\alpha$  サブユニットが、電氣的相互作用<sup>7)</sup>により互いに引き合う。
- [6] アポ H-NHase の (翻訳後修飾をもたない)  $\alpha$  サブユニットは、ホロ  $\alpha_2$  複合体中の (翻訳後修飾をもつ)  $\alpha$  サブユニットに押し出される形でスワッピングが起こる。この時、同時に、アポ H-NHase から外れた (翻訳後修飾をもたない)  $\alpha$  サブユニットと g タンパク質からなるアポ  $\alpha_2$  複合体が生成する。
- [7] アポ H-NHase の (翻訳後修飾をもたない)  $\alpha$  サブユニットの全てが (翻訳後修飾をもつ)  $\alpha$  サブユニットとスワッピングするまで [4]~[6] が繰り返され、最終的にホロ H-NHase が生成する。

#### 6. おわりに

筆者らが発見した self-subunit swapping では、アポ酵素

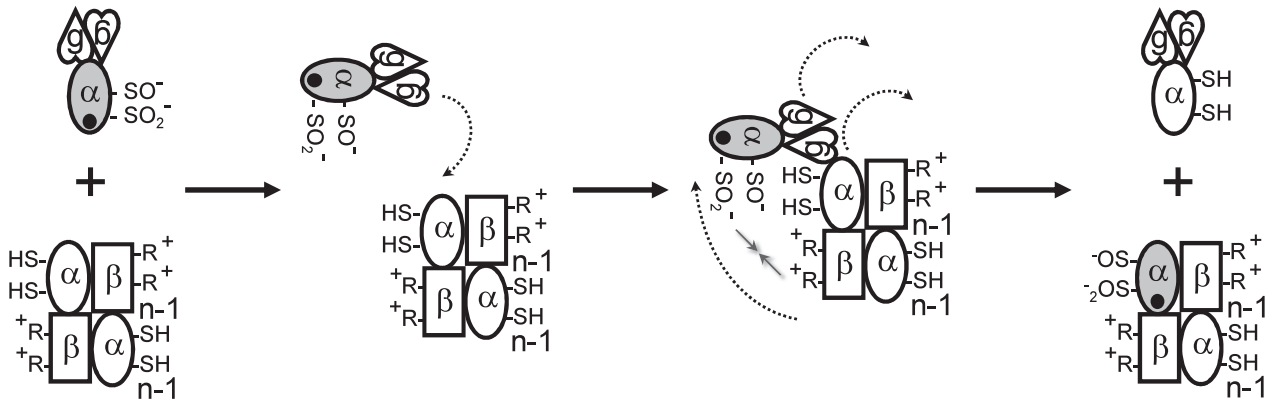


図3 Self-subunit swapping メカニズムの提唱モデル

アポ酵素 ( $\alpha\beta$ )<sub>n</sub> 中の n 個の  $\alpha$  サブユニットの一つが交換する場合を記載. コバルトイオン (●), システイン (SH), システィンシルフェン酸 ( $\text{SO}^-$ ), システィンシルフィン酸 ( $\text{SO}_2^-$ ), アルギニン (R)

の“ $\alpha$ サブユニット”は翻訳後修飾導入の過程で“外部で翻訳後修飾を受けた $\alpha$ サブユニット(翻訳後修飾以外は同一のタンパク質)”とスワッピングする<sup>7,9)</sup>。そのため、翻訳後修飾が完了した後に、“アポ酵素に元々存在していた $\alpha$ サブユニット”はホロ酵素には存在しない。一方、これまでに数多くのタイプの翻訳後修飾が発見されてきたが、これらのすべては元々存在していたタンパク質に対して翻訳後修飾がなされる。つまり、翻訳後修飾が完了した後も元々存在していたタンパク質は翻訳後修飾を受けて存在し続けることと対比させると、self-subunit swappingは翻訳後修飾“導入”の新しい概念である。スワッピングによる翻訳後修飾の“導入”を証明するためには、翻訳後修飾前後のタンパク質を区別する(1アミノ酸変異などの)目印をつける必要があり、現時点では、J1菌のL-NHase, H-NHaseのみでしか実証されていない。しかし、NHaseだけでなくチオシアネート加水分解酵素においても、サブユニットのスワッピングにより翻訳後修飾が導入されホロ酵素が生成する可能性がある。これまで報告されてきた数多くの翻訳後修飾(リン酸化, グリコシル化, ユビキチン化など)においても、外部でそれらの修飾を受けたタンパク質とスワッピングすることで修飾が導入される例が見つかれば、本概念はさらに多くの興味を集めるであろう。

- 1) Yamada, H., Shimizu, S., & Kobayashi, M. (2001) *Chem. Rec.*, 1, 152-161.
- 2) Kobayashi, M., Nagasawa, T., & Yamada, H. (1992) *Trends Biotechnol.*, 10, 402-408.
- 3) Nagashima, S., Nakasako, M., Dohmae, N., Tsujimura, M., Takio, K., Odaka, M., Yohda, M., Kamiya, N., & Endo, I.

(1998) *Nat. Struct. Biol.*, 5, 347-351.

- 4) Miyanaga, A., Fushinobu, S., Ito, K., & Wakagi, T. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288, 1169-1174.
- 5) Asano, Y., Tani, Y., & Yamada, H. (1980) *Agri. Biol. Chem.*, 44, 2251-2252.
- 6) Kobayashi, M. & Shimizu, S. (1998) *Nature Biotech.*, 16, 733-736.
- 7) Zhou, Z., Hashimoto, Y., Shiraki, K., & Kobayashi, M. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 14849-14854.
- 8) Zhou, Z., Hashimoto, Y., & Kobayashi, M. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 14930-14938.
- 9) Zhou, Z., Hashimoto, Y., Cui, T., Washizawa, Y., Mino, H., & Kobayashi, M. (2010) *Biochemistry*, 49, 9638-9648.
- 10) Komeda, H., Kobayashi, M., & Shimizu, S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 4267-4272.

橋本 義輝, 小林 達彦

(筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻)

New post-translational modification mechanism by protein swapping

Yoshiteru Hashimoto and Michihiko Kobayashi (Graduate School of Life and Environmental Sciences, The University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan)

## HDL 産生における ABC トランスポーター A1 の活性制御機構

### 1. はじめに

動脈硬化症, とりわけ心筋梗塞や狭心症など冠状動脈疾