

疫病菌 *Phytophthora infestans* の 2 種類のタウロシアミンキナーゼの酵素特性
鳥海秀人・鈴木知彦

〒780-8520 高知市曙町 2-5-1
高知大学理工学部比較生化学研究室

Enzymatic properties of two taurocyamine kinases from *Phytophthora infestans*
Hideto Torinoumi and Tomohiko Suzuki

Laboratory of Comparative Biochemistry, Faculty of Science and Technology, Kochi
University, Kochi 780-8520 Japan

Key Words; guanidino kinase, phosphagen kinase, *Phytophthora infestans*, two-
domain enzyme, taurocyamine kinase, cooperativity.

要旨

フォスファゲンキナーゼ (PK) は、ATP のリン酸基をグアニジノ化合物に転移し、高エネルギー化合物のフォスファゲンを合成する反応を可逆的に触媒する酵素群の総称であり、エネルギー代謝において重要な役割を果たしている。タウロシアミンキナーゼ (TK) もその一つであり、環形動物、扁形動物、そして単細胞生物などのそれぞれ一部に分布している。

単細胞生物である疫病菌 *Phytophthora infestans* (以下、*P.infestans*) はトマトやジャガイモ等に寄生し、農作物大きな被害を及ぼす。*P.infestans* には、2 種類の PK (1 ドメイン型及び 2 ドメイン型酵素) が存在しており、両者ともタウロシアミンに対して基質特異性を示すことが示された (それぞれ TK1 および TK2)。疫病菌が感染する植物細胞は TK を発現していないことから、TK 酵素の機能解明とその阻害剤の開発は、新たな疫病菌対策に繋がる可能性がある。

本研究では先ず *P.infestans* TK1 及び TK2 それぞれに対して詳細な活性測定を行い、完全な酵素パラメータ (4 種類の解離定数: K_a^{Tau} , K_{ia}^{Tau} , K_a^{ATP} , K_{ia}^{ATP} , 及び触媒定数 k_{cat}) を決定した。その結果、酵素とタウロシアミンに対する親和性を表すパラメータ K_a^{Tau} は TK1 で 0.34 mM, TK2 で 0.77 mM となり、TK1 の基質親和性が TK2 より 2 倍高かった。一方、ATP に対する親和性 K_a^{ATP} はそれぞれ 0.55 mM, 0.85 mM であった。また両者の触媒定数 (k_{cat}) は TK1 で 98 s^{-1} , TK2 で 189 s^{-1} であり、TK2 が活性ドメインを二つ含むことを考慮すれば、ドメインあたりの触媒定数はほぼ同等であることが分かる。また両者の触媒効率 ($k_{\text{cat}}/K_a^{\text{ATP}}/K_{ia}^{\text{Tau}}$) は TK1 で $117 \text{ mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, TK2 で $100 \text{ mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ と計算され、ドメインあたりの触媒効率では TK1 が 2 倍以上優る。

次に、*P.infestans* 2 ドメイン型 TK2 のドメイン 1 (TK2-D1) とドメイン 2 (TK2-D2) を切り離し、それぞれのリコンビナント酵素を作成したが、ドメイン 1 は発現量が極めて低く酵素活性の測定には至らなかった。一方、ドメイン 2 では、 K_a^{Tau} が 1.01 mM, K_a^{ATP} が 4.46 mM と決定され、この値を 2 ドメイン型酵素 TK2

と比較すると特に ATP に対する親和性が 5 倍低下していた。また、TK2-D2 の触媒定数と触媒効率はいずれもそれぞれ 5.1 s^{-1} 及び $2.5 \text{ mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であり、TK2 のそれぞれ 37 分の 1 及び 40 分の 1 に低下していた。このことから、両ドメイン間に相互作用が存在し、それが触媒効率を高めている、すなわち 2 ドメイン型 TK に協同性が存在する可能性が示唆される。また、単離された TK2-D2 酵素は安定性が低く、 4°C で保存しても 12 時間後にはその活性が 69% に低下しており、ドメイン 2 単独では構造的に不安定であることが予想される。

これまでに報告されている様々な 2 ドメイン型 PK 酵素、及び単離されたドメインの触媒定数から総合的に判断すると、ヨロイソギンチャク *Anthopleura japonica* の 2 ドメイン型 AK においてのみ、ドメイン間に明白な相互作用が存在し、その結果 k_{cat} を増大させる強い協同性が生じていると結論される。その構造基盤としては、両ドメインの接触部位に存在する Arg122 (ドメイン 1) と Asp408 (ドメイン 2) 間のイオン結合が関与している可能性がある。

Abstract

Phosphagen kinases are enzymes that catalyze the reversible transfer of the gamma phosphoryl group of ATP to naturally occurring guanidino compounds, yielding ADP and a phosphorylated guanidine referred to as a phosphagen. The PK reaction has a key role in temporal and spatial ATP buffering systems in cells to maintain effective energy flow. Taurocyanine kinase (TK) is one of the PKs, and is distributed in some species of annelids, flatworms, and unicellular organisms.

Phytophthora infestans (hereinafter referred to as *P. infestans*), a unicellular organism, infests tomatoes and potatoes and causes great damage to crops. *P. infestans* contains two types of PKs (one-domain and two-domain enzymes: TK1 and TK2, respectively), both of which show substrate specificity for taurocyanine. Since plant cells do not express TK usually, elucidation of the function of the TK enzyme and development of its inhibitors may lead to new measures against the disease.

In this study, we first measured the enzyme activity of *P. infestans* TK1 and TK2, and determined the complete parameters (four dissociation constants: K_a^{Tau} , $K_{\text{ia}}^{\text{Tau}}$, K_a^{ATP} , $K_{\text{ia}}^{\text{ATP}}$, and the catalytic constant k_{cat}). The K_a^{Tau} , showing the affinity for the enzyme and taurocyanine in the presence of ATP, was 0.34 mM for TK1 and 0.77 mM for TK2. On the other hand, the K_a^{ATP} , was 0.55 mM and 0.85 mM, respectively. The catalytic constants (k_{cat}) were calculated to be 98 s^{-1} for TK1 and 189 s^{-1} for TK2. Considering that TK2 contains two active domains, the catalytic constants per domain are almost the same. In addition, the catalytic efficiency ($k_{\text{cat}}/K_a^{\text{ATP}}/K_{\text{ia}}^{\text{Tau}}$) is estimated to be $117 \text{ mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ for TK1 and $100 \text{ mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ for TK2, suggesting that the catalytic efficiency of the former (per domain) is approximately twice that of TK2.

Next, domain 1 and 2 of *P. infestans* 2-domain enzyme, TK2-D1 and TK2-D2, respectively, were separated and the recombinant enzymes were expressed. The expression level of TK2-D1 was extremely low and the enzyme activity was not measured. On the other hand, the K_a^{Tau} and K_a^{ATP} of TK2-D2 was determined to be 1.01 mM and 4.46 mM, respectively. Compared with the native two-domain TK2, the affinity for ATP was reduced by 5 times. The catalytic constant and catalytic

efficiency of TK2-D2 were remarkably reduced: 5.1 s^{-1} and $2.5 \text{ mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, respectively, which were 1/37 and 1/40 that of two-domain TK2, respectively. This suggests that there exists cooperativity, which enhances the catalytic efficiency, between the two domains. Moreover, the isolated TK2-D2 was structurally unstable, and its activity was decreased largely after 12 hours storage at 4°C .

Comparison of the catalytic constants from the various two-domain PK enzymes suggested that a clear cooperativity between the domains was found only in the two-domain AK of the sea anemone *Anthopleura japonica*. In this case, one of the key residues responsible for the cooperativity might be the ionic bond between Arg122 (domain 1) and Asp408 (domain 2).

序論

フォスファゲンキナーゼ (PK) は、ATP のリン酸基をグアニジノ化合物に転移し、高エネルギー化合物のフォスファゲンを合成する反応を可逆的に触媒する酵素群の総称であり、特に ATP の需要が高い細胞のエネルギー代謝において重要な働きをしている (Morrison, 1973; Ellington, 2001). PK は、使用する基質の違いにより、アルギニンキナーゼ (AK)、クレアチンキナーゼ、ロンブリシンキナーゼ、タウロシアミンキナーゼ (TK)、グリコシアミンキナーゼ、ハイポタウロシアミンキナーゼ、サラセミンキナーゼ、オフエリンキナーゼ等に分類される (van Thoai, 1968; Watts, 1971; Suzuki et al., 1997b; Ellington & Suzuki, 2006).

単細胞生物である疫病菌 *Phytophthora infestans* (以下、*P. infestans*) には2種類のタウロシアミンキナーゼ(分子量 40 kDa のペプチド鎖からなる通常型 TK1 と、その倍の分子量 80 kDa を持つ 2 ドメイン型 TK2) が存在する (Uda et al., 2013). これらの TK のグアニジノ基質の認識に関わる GS 領域のアミノ酸配列 (Suzuki et al., 1997b) は、環形動物の TK のものとは大きく異なっており (Uda et al., 2013; Tanaka et al., 2011), 両酵素はタウロシアミンに対する基質特異性を独立に獲得したことが分子系統樹の解析から分かっている.

疫病菌 *P. infestans* は人間の生活に身近なトマトやジャガイモ等の農作物に寄生し大きな被害を及ぼすことから、その対策は喫緊の課題とされている. 疫病菌が感染する植物は TK を発現していないことから、疫病菌の TK 酵素の機能解明とその阻害剤の開発は、新たな疫病菌対策に繋がる可能性が高い.

本研究では、*P. infestans* TK1, TK2 の詳細な酵素活性測定を行い、完全な酵素活性パラメーターを決定した. 次に、2 ドメイン型 TK2 のドメイン間相互作用や酵素機能の協同性を調べる目的から、二つのドメインを分離して、それぞれの遺伝子を発現用ベクターに組み込んだ. ドメイン 1 については発現が極めて弱く酵素パラメータの決定には至らなかったが、ドメイン 2 については決定することができた. また、これまでの 2 ドメイン型 PK 酵素のデータを総括し、その協同性発現に必要な分子的基盤を考察した.

材料と方法

TK1 および TK2 のクローンは、すでに発現用プラスミド pET-30b の NdeI / EcoRI サイトに組み込まれているものを用いた (Uda et al., 2013). TK2 のドメイン 1 とドメイン 2 の分割は TK2 クローンを鋳型に PCR により行った. 両ドメインとも 5'側に NdeI サイトを、3'側に His-tag と EcoRI サイトを付加するよう設計した. 増幅には KOD⁺ Neo DNA Polymerase を用いた. 両ドメインをクローン化した後、塩基配列にエラーが起こっていないことを確かめた.

これらの発現プラスミドを用いて大腸菌 BL-21 をトランスフォームし、0.5 mM IPTG 存在下、16-25°C、24-48 時間振盪培養してリコンビナント酵素を発現させた。発現大腸菌は超音波により細胞を破碎し、His-tag を付加したリコンビナント酵素は、Ni-NTA resin を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した (Uda et al., 2013)。酵素濃度は ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) を使い、アミノ酸組成 (6 x His-tag を含む) から推定される値 (280 nm の吸光度が 0.954 の時に 1 mg/ml) を用いて決定した。PK の正反応 (フォスファゲン合成方向) は、二基質高速平衡ランダムオーダー反応速度論によって説明される (Morrison and James, 1965)。TK の酵素活性測定は、25°C において、その反応にピルビン酸キナーゼ、乳酸脱水素酵素の反応をリンクさせ、最終的に NADH が NAD⁺ に変化する反応を 340 nm で追跡して決定した (Morrison and James, 1965)。この反応の初速度 (v) は、2 種類の基質濃度 (ATP 及びタウロシアミン) と 5 種類の酵素パラメータにより以下の式で表される。

$$v = \frac{V_{max}}{\frac{K_a^{ATP} \cdot K_{ia}^{Tau}}{[Tau][ATP]} + \frac{K_a^{ATP}}{[ATP]} + \frac{K_a^{Tau}}{[Tau]} + 1}$$

$$K_{ia}^{Tau} / K_a^{Tau} = K_{ia}^{ATP} / K_a^{ATP}$$

$$V_{max} = k_{cat}[E_0]$$

ここで、 K_a はもう一方の基質の存在下における当該基質の解離定数、 K_{ia} はもう一方の基質の非存在下における当該基質の解離定数、 k_{cat} は V_{max} から計算される触媒定数である。また、 E_0 は反応に用いた酵素濃度である。二基質速度論における上記 5 種類のパラメータ (4 種類の解離定数: K_a^{Tau} , K_{ia}^{Tau} , K_a^{ATP} , K_{ia}^{ATP} 及び k_{cat}) を求めるために、TK1 においては 64 通りの異なる基質濃度 (それぞれの基質濃度で独立に 3 回測定: 総測定点 192)、TK2 においては 72 通りの異なる基質濃度 (それぞれの基質濃度で独立に 3 回測定: 総測定点 216)、TK2-D2 においては 48 通りの異なる基質濃度 (それぞれの基質濃度で独立に 2 回測定: 総測定点 96) において酵素反応を測定し (Figure 1-3)、それぞれの初速度から SigmaPlot12 または Dr. R. Viola によって書かれた Enzyme kinetics Programs, ver.2.0 を用いて、5 種類のパラメータを算出した。尚、ここで算出した k_{cat} は、一分子あたりの触媒定数であり、一分子に活性部位が 2 箇所存在する 2 ドメイン型酵素の場合、 k_{cat} はそれぞれのドメインの値の和として見積もられる。

結果

P. infestans TK1 酵素は、大腸菌クローンを 0.5 mM IPTG 存在下、20°C で 24 時間発現誘導をした結果、可溶性分画に大量に発現することができた。一方、*P. infestans* TK2 酵素は、前者に比べて発現量が少なかったが、0.5 mM IPTG 存在下、25°C で 24 時間発現誘導をすることで活性測定には十分な量のリコンビナント酵素を得ることができた。

P. infestans TK2 のドメイン 1 部分 (TK2-D1) は、0.5 mM IPTG 存在下、16-25°C で 48 時間発現誘導したが、発現量が極めて少なく酵素活性の測定には至らなかった。ドメイン 2 部分 (TK2-D2) は、0.5 mM IPTG

存在下, 16°C で 48 時間発現誘導し, 酵素活性の測定には十分な量のリコンビナント酵素を得ることができた (Fig. 1).

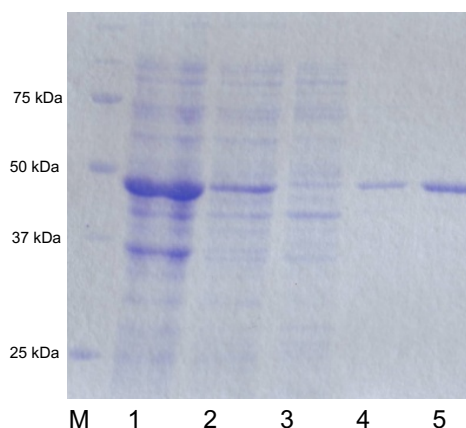


Fig.1 *P. infestans* TK2 のドメイン 2 部分の発現と精製 (SDS-PAGE) . M: マーカートンパク質, 1: 不溶性分画, 2: 可溶性分画, 3: アフィニティークロマトグラフィー未吸着部分, 4: 50 mM イミダゾール溶出分画, 5: 100 mM イミダゾール溶出分画. 酵素活性測定は分画 5 のリコンビナント酵素を用いて行われた.

アフィニティークロマトグラフィーにより精製された TK2-D2 リコンビナント酵素の活性を, グアニジノ化合物 L-アルギニン, クレアチン, グリコシアミン, タウロシアミンを用いて決定したところ, *P. infestans* TK1 及び TK2 と同様に (Uda et al., 2013), タウロシアミンにのみ有意な活性を示した.

P. infestans TK1 及び TK2 の野生型 2 種類のリコンビナント酵素を用いて, 詳細な酵素活性測定を行い (Fig. 2), 二基質酵素反応の完全なパラメーターを決定した (Table 1). その結果, 酵素と基質タウロシアミンの親和性を表す K_a^{Tau} は TK1 で 0.34 mM, TK2 で 0.77 mM と決定され, 前者の基質親和性が後者より 2 倍高かった. 一方, ATP に対する親和性 K_a^{ATP} はそれぞれ 0.55 mM, 0.85 mM であり, 大きくは変わらなかった. また両者の触媒定数 (k_{cat}) は TK1 で 98 s^{-1} , TK2 で 189 s^{-1} であり, TK2 が活性ドメインを二つ含むことを考慮すれば, ドメインあたりの触媒定数はほぼ同等であることが分かる. 一方, 両者の触媒効率 ($k_{\text{cat}}/K_a^{\text{ATP}}/K_a^{\text{Tau}}$) は TK1 で $117 \text{ mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, TK2 で $100 \text{ mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ と計算され, ドメインあたりの触媒効率では TK1 が 2 倍以上高かった.

Table 1 Kinetic parameters of TKs from *P. infestans* and *P. sojae*

Source	Enzyme	Reference	V_{max} [$\mu\text{moles}/\text{min} \cdot \text{mg}$]	K_a^{Tau} [mM]	K_i^{Tau} [mM]	K_a^{ATP} [mM]	K_i^{ATP} [mM]	k_{cat} [1/s]	$K_{\text{ia}}K_a$	$k_{\text{cat}}/K_a^{\text{ATP}}/K_a^{\text{Tau}}$ [$\text{mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]
<i>Phytophthora infestans</i>	TK1	This work	146.72 ± 5.40	0.34 ± 0.03	1.51 ± 0.31	0.55 ± 0.09	2.43 ± 0.36	97.80 ± 3.60	4.4	117
	TK2		141.74 ± 4.15	0.77 ± 0.07	2.36 ± 0.33	0.85 ± 0.089	2.60 ± 0.37	188.9 ± 5.53	3	100
	TK2-D2		7.61 ± 1.61	1.01 ± 0.56	0.67 ± 0.30	4.46 ± 1.49	3.00 ± 2.11	5.07 ± 1.05	0.6	2.5
<i>Phytophthora sojae</i>	TK1	Palmer et al. (2013)	141.15 ± 4.5	0.52 ± 0.03	0.1 ± 0.02	1.8 ± 0.1	0.35 ± 0.1	94.1 ± 3.0	0.2	522

次に, TK2 のドメイン 1 (TK2-D1) とドメイン 2 (TK2-D2) を切り離し, それぞれのリコンビナント酵

素を作成したが、ドメイン1は発現量が極めて低く酵素活性の測定ができなかった。一方、ドメイン2 (TK2-D2) では、 K_a^{Tau} が 1.01 mM , K_a^{ATP} が 4.46 mM と決定され、2ドメイン型TK2と比較するとドメイン分割によりATPに対する親和性が5倍低下した (Table 1)。また、TK2-D2の触媒定数と触媒効率はそれぞれ 5.1 s^{-1} 及び $2.5 \text{ mM}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であり、TK2のそれぞれ37分の1及び40分の1に低下していた。さらに、ドメイン2のリコンビナント酵素は安定性が低く、4°Cで5時間後には活性が87%に、10時間後には75%に、12時間後には69%に低下した。さらに、酵素溶液の希釈によっても活性の低下が見られた。このようにドメイン2単独では構造的に不安定であることが予想される。

考察

P. infestans TK1 と *P. sojae* TK1 と酵素パラメータの比較

前報において我々は *P. infestans* TK1 と TK2 の予備的な酵素パラメータを報告し、この酵素がタウロシアミンに対して高い基質特異性を持つことを示した (Uda et al., 2013)。また、*P. infestans* の細胞内に実際に基質タウロシアミンが存在することも示した。この研究では、*P. infestans* TK1 と TK2 の完全な酵素パラメータを決定した (Table 1)。

一方、Palmer et al. (2013)は、近縁種 *P. sojae* TK1 の酵素活性パラメータを報告している。両種のTK1酵素のアミノ酸一致率は94%と高く、また、既知のタウロシアミン結合部位やATP結合部位に関わるアミノ酸も両種で全て保存されている。Table 1に酵素パラメータの比較を示した。5種類の酵素パラメータ (4種類の解離定数： K_a^{Tau} , K_i^{Tau} , K_a^{ATP} , K_i^{ATP} 及び V_{max} (または k_{cat})) のうち、 K_a^{Tau} , K_a^{ATP} 及び V_{max} (k_{cat}) については、両者は比較的良く似た値を取っていたが、 K_i^{Tau} と K_i^{ATP} については7-23倍の違いが見られた。

二基質反応酵素であるPKにおいては、基質の解離定数の比 K_{ia}/K_a が基質結合時の相乗効果の指標となることが知られている。通常この値は1以上であることが多いが、これは一方の基質が酵素に結合している状態では、もう一方の基質が酵素により相乗的に結合することを示している (Jacobs and Kuby, 1980)。これはまた、基質の結合時と非結合時において酵素の立体構造が変化することも示唆する。PK酵素はN末及びC末の二つの内部ドメイン構造を持ち、前者は主にグアニジノ基質、後者はATPの結合に関与している。おそらく K_{ia}/K_a が示す基質結合に関する相乗効果は、両内部ドメインの相互作用を表していると思われる。

今回の研究では *P. infestans* TK1 の K_{ia}/K_a 値は4.4、TK2では3.0であった。この結果から両酵素とも基質結合に対する相乗効果は存在すると結論される。しかし、*P. sojae* TK1においては、1をかなり下回る K_{ia}/K_a 値 (0.2) が報告されており、Palmer et al. (2013) はこれが卵菌類TKの特徴ではないかと述べている。しかし *P. infestans* TK1 では $K_{ia}/K_a = 4.4$ と決定されたことを踏まえると、両者の違いは、パラメータ算出手法の違いに由来する可能性が指摘される。すなわち、Palmerらは等温滴定熱量測定 (Isothermal Titration Calorimeter) によって、基質と酵素の結合時に発生する僅かな熱量の変化の計測から解離定数を算出しているのに対して、本研究では多くのPK反応で用いられている手法、すなわちTKが触媒する反応によって生じるタウロシアミンリン酸をNADHの減少に共役させて340 nmで追跡する方法によって測定している。

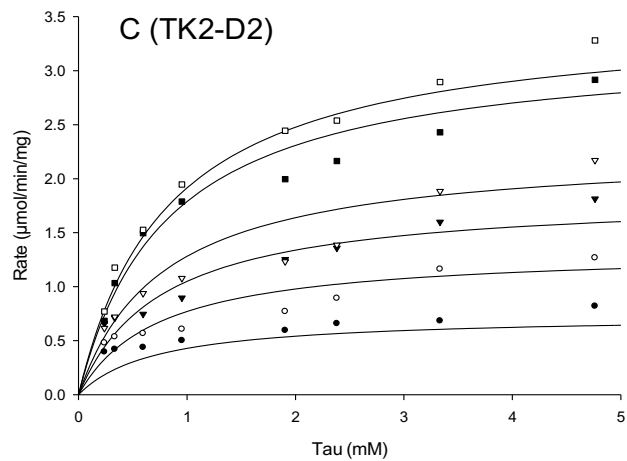
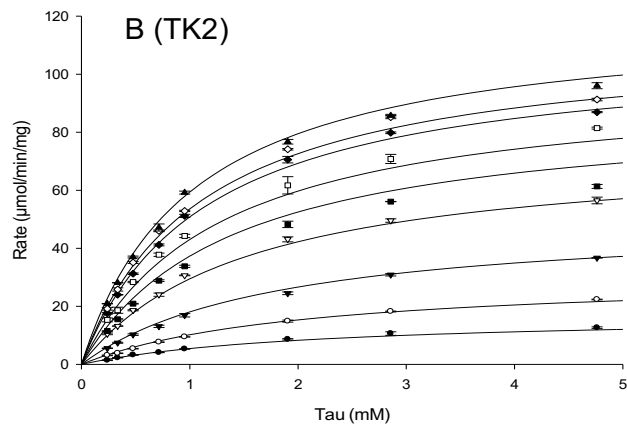
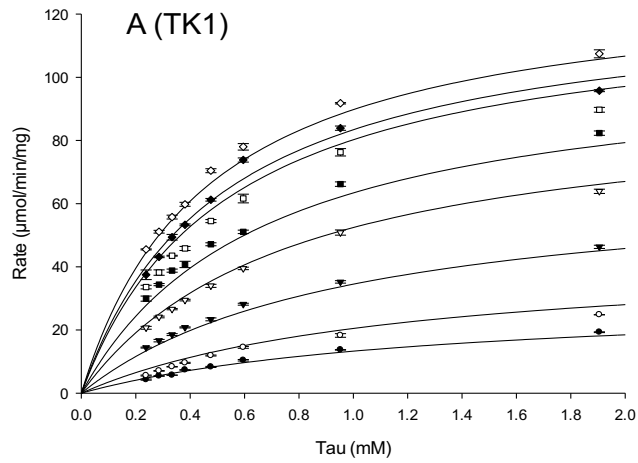


Fig.2 *P. infestans* TK1 (A) , TK2 (B) および TK2-D2 (C) のタウロシアミンに対する酵素活性. これらのデータを用い, SigmaPlot12 を使って酵素パラメータを決定した. (A) 8種類のカエリス・メンテン型グラフのATP濃度は, 上から, 4.76, 3.33, 2.86, 1.43, 0.952, 0.476, 0.238, 0.143 mM, (B) ATP濃度は, 上から, 4.76, 3.33, 2.86, 1.90, 1.43, 0.952, 0.476, 0.238, 0.119 mM, (C) ATP濃度は, 上から, 3.81, 3.33, 1.90, 1.43, 0.952, 0.476 mM.

2ドメイン型 PK 酵素のドメイン間に協同性は存在するか？

通常、PK 酵素は 40kDa のサブユニットからなり、単量体または二量体を形成している。ところが、Stein et al. (1990) は、 Manson 住血吸虫 *Schistosoma mansoni* に基質特異性が不明の 74 kDa のポリペプチド鎖をコードする PK 遺伝子が存在することを初めて示し、これが二つの活性部位を持つことを明らかにした。後にこの酵素は、タウロシアミンに対して活性を示すことが示され TK とされたが (Awama et al., 2008), *S. mansoni* の生体内に実際に基質タウロシアミンが存在するかどうかは不明である。次いで、北海道教育大学の Soga and Yazawa は 1996 年の日本動物学会において、二枚貝 *Pseudocardium sachalinensis* の閉殻筋にポリペプチド鎖の分子量が 80 kDa のアルギニンキナーゼ (AK) が存在することを発表した。その後、この酵素の cDNA 由来のアミノ酸配列が報告され、この酵素が通常の AK 遺伝子が重複融合し、完全な活性部位を 2 箇所もつ 2ドメイン型 AK 酵素であることが判明した (Suzuki et al., 1998)。驚くべきことに、二枚貝においては 2ドメイン型 AK が極めて広く分布していることが分かっている (Suzuki et al., 2002; Uda et al., 2008)。一方、ヨロイイソギンチャク *Anthopleura japonica* においても 2ドメイン型 AK 酵素が直接単離され、その cDNA 由来のアミノ酸配列が決定された (Suzuki et al., 1997a)。吾妻のグループは、肺吸虫 *Paragonimus westermani* に 2ドメイン型 TK 酵素が存在することを示した (Jarilla et al., 2009)。また最近、繊毛虫 *Tetrahymena pyriformis* においても通常の単量体 AK (40 kDa) に加えて、2ドメイン型 AK が存在することが示された (Okazaki et al., 2015)。このように、2ドメイン型 PK 酵素は、進化の段階で独立に何度も生じており、2つのドメイン間の相互作用や酵素機能の協同性などは非常に興味ある問題を提示している。

2ドメイン型 PK 酵素のドメイン間相互作用と協同性に関する酵素反応速度論からのアプローチには三通りの手法があり、[A]それぞれのドメインを分離し野生型 2ドメイン型酵素の酵素活性と比較する方法、[B]2ドメイン型酵素の一方のドメインに致命的なアミノ酸変異を導入し、そのドメインの活性がほぼ消失していると仮定して野生型 2ドメイン型酵素の活性と比較する方法、そして[C]2ドメイン型酵素のドメイン間に数アミノ酸の挿入を加え強制的にドメイン間の相互作用の程度を減じる方法である。

[A]の手法では、2ドメイン型酵素の k_{cat} (または完全な酵素パラメータ算出によって算出される触媒効率 $k_{cat}/K_a^{ATP}/K_{ia}^{Tau\ or\ Arg}$, 簡易的には $k_{cat}/K_{ia}^{Tau\ or\ Arg}$) を、分離された各ドメインの総和と比較し、2ドメイン型酵素の方が有意に大きければドメイン間に相互作用が存在すると推定される。ただし、分離されたドメインの立体構造が2ドメイン型酵素の中に置かれている状態と大きくは変わらないと仮定している。またこの方法では、分離されたドメインの可溶性や発現量に問題が生じて活性測定できない場合がある。今回の研究でも *P. infestans* 2ドメイン型 TK のドメイン 1 については十分な発現量が得られず、また過去に行った研究においても、シジミ *Corbicula japonica* 2ドメイン型 AK のドメイン 1 は発現するものの不溶化して活性測定ができなかった。[A]の方法で完全な酵素パラメータが算出されており比較しうるデータが揃っているのは、ヨロイイソギンチャク *A. japonica* (Tada and Suzuki, 2010)、肺吸虫 *P. westermani* (Jarilla et al., 2009)、テトラヒメナ *T. pyriformis* (Okazaki et al., 2011) についてである (Table 2 [A])。それぞれの $(k_{cat}^{D1} + k_{cat}^{D2}) / k_{cat}^{2-Domain}$ 値は、*T. pyriformis* AK : 0.91, *A. japonica* AK : 0.38, *P. westermani* TK : 1.07 と計算された。従って、1 よりも有意に低い値 (0.38) を示している *A. japonica* AK 2ドメイン型酵素においては、2つのドメイン間に相互作用が存在し、活性発現に正の協同性が生じている可能性がある。尚、触媒効率 $k_{cat}/K_a^{ATP}/K_{ia}^{Tau\ or\ Arg}$ を用いた比較からもこの結論は変わらない。

Table 2 Kinetic parameters of native two-domain PK, its isolated subunit and mutants (incorporated fatal amino acid replacement into the native enzyme)

Source	Specificity for guanidine	Enzyme (tag)	Reference	V _{max} [μmole/min/mg]	K _A ^{Arg/Tau} [mM]	K _A ^{Arg/Tau} [mM]	K _A ^{ATP} [mM]	K _A ^{ATP} [mM]	k _{cat} [1/s]	K _{cat} /K _A	k _{cat} K _A ^{Arg/Tau} [mM ⁻¹ ·s ⁻¹]	k _{cat} K _A ^{ATP} /K _A ^{Arg/Tau} [mM ⁻² ·s ⁻¹]	k _{cat} (D1+D2)/k _{cat} (D2) [%]
[A]													
Oomycete	<i>Phytophthora infestans</i>	taurocyamine	This work	141.7 ± 4.15	0.77 ± 0.07	2.36 ± 0.33	0.85 ± 0.08	2.60 ± 0.37	188 ± 5.53	3	100		
		TK2-D2 (6 x His)		7.61 ± 1.61	1.01 ± 0.56	0.67 ± 0.30	4.46 ± 1.49	3.00 ± 2.11	5.07 ± 1.05	0.6	2.5		
Fungus	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	arginine	Okazaki et al. (2015)	47.5 ± 1.86	0.35 ± 0.08	0.60 ± 0.14	0.73 ± 0.07	1.27 ± 0.48	63.4 ± 2.25	1.7	145		91
		AK2-D1 (6 x His)		38.0 ± 1.47	0.23 ± 0.06	0.29 ± 0.08	1.03 ± 0.09	1.29 ± 0.59	25.4 ± 0.98	1.2	85		
		AK2-D2 (6 x His)		48.8 ± 1.88	0.76 ± 0.11	1.62 ± 0.20	0.87 ± 0.99	2.06 ± 0.39	32.5 ± 1.25	2.1	21		
Cnidaria	<i>Anthopleura japonica</i>	arginine	Tada and Suzuki (2010)	503 ± 24.3	0.28 ± 0.05	0.30 ± 0.08	1.52 ± 0.16	1.61 ± 0.55	678 ± 33	1.07	1487		38
		AK-D1 (6 x His)		150 ± 6.60	0.29 ± 0.05	0.26 ± 0.88	2.83 ± 0.24	2.66 ± 0.75	104 ± 5	0.9	137		
		AK-D2 (6 x His)		234 ± 10.1	0.68 ± 0.07	0.34 ± 0.07	1.27 ± 0.11	0.86 ± 0.14	157 ± 7	0.52	364		
Trematode	<i>Paragonimus westermani</i>	taurocyamine	Janile et al. (2009)	60.01 ± 3.01	0.57 ± 0.10	1.95 ± 0.43	0.88 ± 0.16	3.37 ± 0.70	33.44 ± 1.01	3.42	17.5		107
		TK-D1 (MBP)		40.31 ± 2.51	0.75 ± 0.07	4.22 ± 1.12	0.86 ± 0.11	3.58 ± 0.27	24.16 ± 1.54	5.63	8.7		
		TK-D2 (MBP)		21.43 ± 1.75	0.51 ± 0.04	1.49 ± 0.29	1.43 ± 0.36	4.03 ± 0.76	11.56 ± 0.45	2.92	5.4		
[B]													
Cnidaria	<i>Anthopleura japonica</i>	arginine	Tada and Suzuki (2010)	503 ± 24.3	0.28 ± 0.05	0.30 ± 0.08	1.52 ± 0.16	1.61 ± 0.55	678 ± 33	1.07	1487		31
		2-domain AK (Y68G in D1)			0.42 ± 0.04	0.14 ± 0.04	1.62 ± 0.11	0.55 ± 0.16	89 ± 3	0.33	392		
		2-domain AK (Y68G in D2)			0.18 ± 0.02	0.23 ± 0.05	0.78 ± 0.05	1.02 ± 0.24	123 ± 2	1.28	686		
Trematode	<i>Schistosoma mansoni</i>	taurocyamine	Meeron et al. (2015)		0.26 ± 0.02				87 ± 2		334.3		111
		2-domain TK (C268S in D1)			0.36 ± 0.02				61 ± 1		172.2		
		2-domain TK (C268S in D2)			0.21 ± 0.02				36 ± 1		171.4		
Bivalvia	<i>Conchabula japonica</i>	arginine	Uda et al. (2008)		0.341 ± 0.026				174.8 ± 8.6*		514*		80
		2-domain AK (Y68A in D1) (MBP)			0.289 ± 0.011				84.2 ± 0.6*		298*		
		2-domain AK (Y68A in D2) (MBP)			0.378 ± 0.026				55.2 ± 2.0*		145.8*		
		2-domain AK (Y68A both in D1 and D2) (MBP)			3.61 ± 0.19				8.00 ± 0.34*		2.22*		
Bivalvia	<i>Calyptogenia kaikoi</i>	arginine	Uda et al. (2008)		0.912 ± 0.031				45.8 ± 1.6*		50.4*		61
		2-domain AK (Y68A in D1) (MBP)			0.828 ± 0.029				22.2 ± 0.4*		16.8*		
		2-domain AK (Y68A in D2) (MBP)			1.06 ± 0.08				5.62 ± 0.04*		5.32*		
[C]													
Cnidaria	<i>Anthopleura japonica</i>	arginine	Tada and Suzuki (2010)	503 ± 24.3	0.28 ± 0.05	0.30 ± 0.08	1.52 ± 0.16	1.61 ± 0.55	678 ± 33	1.07	1487		18
		2-domain AK (D1-KKKKK-D2)			0.18 ± 0.02	0.23 ± 0.05	0.78 ± 0.05	1.02 ± 0.24	123 ± 2	1.28	252		

[B]の手法では, *A. japonica* (Tada and Suzuki, 2010), マンソン住血吸虫 *S. mansoni* (Merceron et al., 2015), シジミ *Corbicula japonica* (Uda et al., 2008), カイコウシロウリガイ *Calyptogeno kaikoi* (Uda et al., 2008) で比較しうるデータが提示されている (Table 2 [B]). それぞれの $(k_{\text{cat}}^{\text{D1}} + k_{\text{cat}}^{\text{D2}}) / k_{\text{cat}}^{\text{2-Domain}}$ 値は, *A. japonica* AK : 0.31, *S. mansoni* TK : 1.11, *C. japonica* AK : 0.80, *C. kaikoi* AK : 0.61 と計算された. この場合も, 1 よりも有意に低い値 (0.31) を示している *A. japonica* 2ドメイン型 AK 酵素においては, 2つのドメイン間に相互作用が存在し, 活性発現に正の協同性が生じていると推定される. 尚, 簡易的な触媒効率 $k_{\text{cat}} / K_a^{\text{Tau or Arg}}$ を用いた比較からもこの結論は変わらない. *C. japonica* AK の結果からは, 両方のドメインに致命的なアミノ酸変異を導入しても (基質結合に関わる保存性の極めて高い Tyr を Ala に変異させた) 5%程度の k_{cat} が残っていた (Table 2 [B]).

[C]の手法は *A. japonica* でのみ行われているが (Tada and Suzuki, 2010), ドメイン間に Lys を 6 残基挿入することで $k_{\text{cat}}^{\text{6K intert}} / k_{\text{cat}}^{\text{2-Domain}}$ 値は 0.18 となり, *A. japonica* 2ドメイン型酵素では, 協同性により強い k_{cat} の増加が見られる結果を裏付ける結果となった.

以上の結果から, *A. japonica* 2ドメイン型 AK では, ドメイン間相互作用に由来する強い k_{cat} の上昇 (協同性) が存在することは確実であると思われる.

今回研究に用いた *P. infestans* 2ドメイン型 TK は, 吸虫 *S. mansoni* や *P. westermani* の TK とは遺伝子の起源が明確に異なる (Uda et al., 2013). この TK が協同性を示すかどうかは, ドメイン 1 のリコンビナント酵素の発現が極めて弱かったために明確な結論は導き出せなかったが, しかし, *P. infestans* 2ドメイン型 TK の k_{cat} (188 s^{-1}) が単離したドメイン 2 の k_{cat} (5.07 s^{-1}) より極めて大きいことから, この酵素も強い協同性を示す可能性はある.

2ドメイン型 PK が協同性を示す構造的基盤

2ドメイン型の PK 酵素の立体構造は, *S. mansoni* TK (Merceron et al., 2015) と *A. japonica* AK (Wang et al., 2015) について決定されている. Wang らの報告によれば, *A. japonica* AK の 2つのドメインは長い α ヘリックスにより接続された L 字型の非対称構造を取っている. 加えて, 2つのドメインは互いに直接接触し, 水素結合と疎水性相互作用を通じて L 字型ドメイン配置を安定化させている. 一方, このドメイン間の相互作用は *S. mansoni* TK においては明確に述べられていない. ドメイン間の接触は協同性の発現には必須であるので, 私たちは *A. japonica* AK の接触面に存在する結合の中で一対のイオン結合を形成するアミノ酸残基, ドメイン 1 の Arg122 及びドメイン 2 の Asp408 に注目した.

Table 3 A key ion-pair formed between the two domains of *A. japonica* 2-domain AK, and the corresponding residues in other two-domain PKs

Sources	Enzyme	Reference	Residue 122 (Domain 1)	Residue 408 (Domain 2)
<i>A. japonica</i>	AK	Suzuki et al.(1997a), Wang et al. (2015)	Arg	Asp
<i>C. kaikoi</i>	AK	Uda et al. (2008)	Asn	Gln
<i>T. pyriformis</i>	AK	Okazaki et al. (2015)	Asp	Gln
<i>S. mansoni</i>	TK	Merceron et al. (2015)	Asn	His
<i>P. westermani</i>	TK	Jarilla et al. (2009)	Asp	His
<i>P. infestans</i>	TK	Uda et al. (2013)	Glu	Met

他の 2ドメイン型 PK 酵素における, これらの残基に相当するアミノ酸を Table 3 に示した. Table 3 から明

らかなように、Arg-Asp イオンペアは *S. mansoni* や *T. pyriformis* の 2 ドメイン型酵素では保存されておらず、*P. westermani* 2 ドメイン型 TK でイオン結合が可能な組み合わせ (Asp-His ; His の pKa 以下の pH でのみ結合が可能) があるのみである。Table 2 から強い協同性を示す酵素は *A. japonica* 2 ドメイン型 AK のみであること、また *S. mansoni* や *T. pyriformis* の 2 ドメイン型酵素では協同性を欠き各ドメインが単独で働いていることを考慮すると (Merceron et al., 2015; Okazaki et al., 2015), この Arg-Asp イオンペアが協同性の発現に強く関わっている可能性がある。今後、Arg122 及び Asp408 のアミノ酸変異体作成を通じて、協同性の発現機序が明らかになると思われる。

この研究で用いた *P. infestans* 2 ドメイン型 TK については、今回の予備的な研究から協同性を示す可能性が示唆されているので、今後、立体構造の解明が進みドメイン間の接触領域が明確になることを期待したい。

引用文献

- Awama, A.M., Paracuellos, P., Laurent, S., Dissous, C., Marcillat, O., Gouet, P. (2008) Crystallization and X-ray analysis of the Schistosoma mansoni guanidino kinase. Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 64: 854-857.
- Ellington, W.R. (2001) Evolution and physiological roles of phosphagen systems. Ann. Rev. Physiol. 63: 289-325.
- Ellington, W.R., Suzuki, T. (2006) Evolution and divergence of creatine kinases. In Molecular Anatomy and Physiology of Proteins – Creatine Kinase (ed. C. Vial). New York: NovaScience pp.1-26. ISBN: 1-59454-715-7
- Jacobs, H.K., Kuby, S.A. (1980) Studies on muscular dystrophy. A comparison of the steady kinetics of the normal human ATP-creatine transphosphorylase isoenzymes (creatine kinases) with those from tissues of Duchenne muscular dystrophy. J. Biol. Chem. 255: 8477-8482.
- Jarilla, B.R., Tokuhira, S., Nagataki, M., Hong, S.-J., Uda, K., Suzuki, T., Agatsuma, T. (2009) Molecular characterization and kinetic properties of a novel two-domain taurocyamine kinase from the lung fluke Paragonimus westermani. FEBS Lett. 583: 2218-2224.
- Merceron, R., Awama, A.M., Montserret, R., Marcillat, O., Gouet, P. (2015) The substrate-free and -bound crystal structures of the duplicated taurocyamine kinase from the human parasite Schistosoma mansoni. J. Biol. Chem. 290: 12951-12963.
- Morrison, J. F. (1973) Arginine Kinase and Other Invertebrate Guanidino Kinases. The enzymes 8: 457-486.
- Morrison, J.F., James, E. (1965) The mechanism of the reaction catalyzed by adenosine triphosphate-creatine phosphotransferase. Biochem. J. 97: 37-52.
- Okazaki, N., Motomura, S., Okazoe, N., Yano D., Suzuki, T. (2015) Cooperativity and evolution of Tetrahymena two-domain arginine kinase. Int. J. Biol. Macromol. 79: 696-703.
- Palmer, A., Begres, B.N., Van Houten, J.M., Snider, M.J., Fraga, D. (2013) Characterization of a putative oomycete taurocyamine kinase: Implications for the evolution of the phosphagen kinase family. Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol. 166: 173-181.
- Soga, T., Yazawa, Y. (1996) Zool. Sci. 13: 55 (Abstract) (Suppl.).

- Stein, L.D., Harn, D.A., David, J.R. (1990) A cloned ATP: guanidino kinase in the trematode *Schistosoma mansoni* has a novel duplicated structure. *J. Biol. Chem.* 265: 6582-6588.
- Suzuki, T., Kawasaki, Y., Furukohri, T. (1997a) Evolution of Phosphagen Kinase. Isolation, characterization and cDNA-derived amino acid sequence of two-domain arginine kinase from the sea anemone *Anthopleura japonicus*. *Biochem. J.* 328: 301-306.
- Suzuki, T., Kawasaki, Y., Furukohri, T., Ellington, W. R. (1997b) Evolution of Phosphagen Kinase VI. Isolation, characterization and cDNA-derived amino acid sequence of lombricine kinase from the earthworm *Eisenia foetida*, and identification of a possible candidate for the guanidine substrate recognition site. *Biochim. Biophys. Acta* 1343: 152-159.
- Suzuki, T., Kawasaki, Y., Unemi, Y., Nishimura, Y., Soga, T., Kamidochi, K., Yazawa, Y., Furukohri, T. (1998) Gene duplication and fusion have occurred frequently in the evolution of phosphagen kinases - A two-domain arginine kinase from the clam *Pseudocardium sachalinensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1388: 253-259.
- Suzuki, T., Sugimura, N., Taniguchi, T., Unemi, Y., Murata, T., Hayashida, M., Yokouchi, K., Uda, K., Furukohri, T. (2002) Two-domain arginine kinases from the clams *Solen strictus* and *Corbicula japonica*. Exceptional amino acid replacement of the functionally important D62 by G. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 1221-1229.
- Tada, H., Suzuki, T. (2010) Cooperativity in the two-domain arginine kinase from the sea anemone *Anthopleura japonicus*. II. Evidence from site-directed mutagenesis studies. *Int. J. Biol. Macromol.* 47: 250-254.
- Tanaka, K., Matsumoto, T., Suzuki, T. (2011) Identification of amino acid residues responsible for taurocyamine binding in mitochondrial taurocyamine kinase from *Arenicola brasiliensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1814: 1219-1225
- Uda, K., Hoshijima, M., Suzuki, T. (2013) A novel taurocyamine kinase found in the protist *Phytophthora infestans*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B. Biochem. Mol. Biol.* 165: 42-48.
- Uda, K., Yamamoto, K., Iwasaki, I., Iwai, M., Fujikura, K., Ellington, W. R., Suzuki, T. (2008) Two-domain arginine kinase from the deep-sea clam *Calyptogena kaikoi* - Evidence of two active domains. *Comp. Biochem. Physiol. Part B. Biochem. Mol. Biol.* 151: 176-182.
- Wang, Z., Qiao, Z., Ye, S., Zhang, R. (2015) Structure of a double-domain phosphagen kinase reveals an asymmetric arrangement of the tandem domains. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 71: 7797-89
- Watts, D.C. (1971) Evolution of phosphagen kinases. In: *Biochemical evolution and the origin of life* (Schoffeniels, E. (ed)). North-Holland, Amsterdam, pp. 150-173.
- van Thoai, N. (1968) Homologous phosphagen phosphokinases In : *Homologous Enzymes and Biochemical Evolution* (van Thoai, N, Roche, J. (Eds.)) . Gordon and Breach, New York, pp. 199-299.