

ポリリン酸キナーゼの進化学による高活性 無細胞タンパク質合成系の構築

大阪大学 大学院工学研究科生物工学専攻 松浦友亮



【略歴】

1999. 3. 31 大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻博士課程 修了（工学博士）
1999. 5. 1～2003. 1. 31 チューリヒ大学（スイス）でポスドク研究員
2003. 2. 1～2006. 3. 31 科学技術振興機構 さきがけ「生体分子の形と機能」代表研究者
2003. 4. 1～2004. 2. 28 大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻助手
2004. 3. 1～2006. 12. 31 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物工学コース助手
2007. 1. 1～2010. 3. 31 大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻特任准教授
2010. 4. 1～2015. 3. 31 科学技術振興機構 ERATO プロジェクトグループリーダー（兼任）
2010. 6. 15～ 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物工学コース准教授

【ポリリン酸キナーゼ】

ポリリン酸キナーゼ 1 (PPK1) は、ATP の末端リン酸を短鎖ポリリン酸に転移し、長鎖ポリリン酸を生成する酵素である¹⁾。PPK1 の多くは、ポリリン酸の合成を担う一方で、その逆反応も触媒するが、前者の反応のほうが優先的に進行する。他方、PPK1 との配列類似性を示さないポリリン酸キナーゼ 2 (PPK2) は PPK1 とは対照的に、優先的に核酸のリン酸化を触媒することが明らかになっている²⁾。

PPK2 は現在、その特徴によって 3 つのサブファミリーに分類されている（図 1）。単一の PPK2 ドメインを含む第 1 のサブファミリー（Class I）に属する酵素は、ヌクレオシド二リン酸（NDP）のヌクレオシド三リン酸（NTP）へのポリリン酸依存性リン酸化を触媒し、2 つの PPK2 ドメインを有する PPK2 のサブファミリー（Class II）に属する酵素は、ヌクレオシド一リン酸（NMP）をリン酸化することで NDP へのポリリン酸依存性リン酸化を触媒する³⁾。加えて、最近の研究によって新しいサブファミリー（Class III）が発見され、NMP および NDP 両方のリン酸化を触媒する機能を持つことが報告された⁴⁾（図 1）。

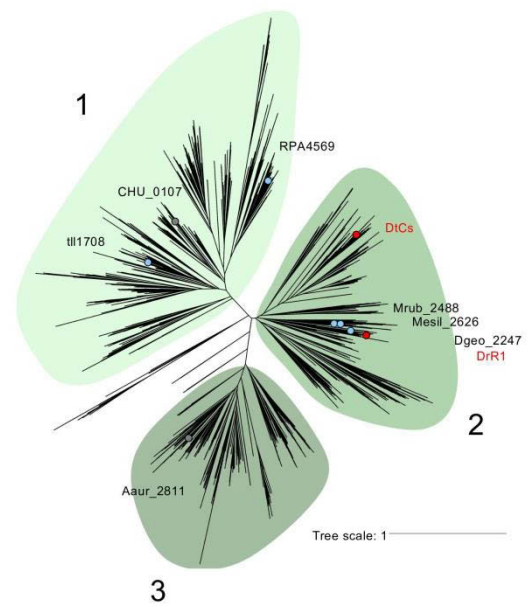


図 1：PPK2 は 3 つのサブファミリーに分類される

【ポリリン酸キナーゼ 2 class III の反応機構】

PPK2 class III に属する酵素は、1 つの酵素でポリリン酸を基質として、AMP, ADP を ATP に、GDP を GTP に変換してくれる酵素である。従って、ATP や GTP を必要とする酵素反応のエネルギー再生系に必要な酵素として、非常に魅力的な分子であり、その応用例も既に報告されている⁵⁾。一方で、その反応機構については、未だ不明な点が存在している。我々のグループでは、無細胞タンパク質合成系のエネルギー再生系への応用を考え、37°C で活性を有する PPK2 class III の酵素の性状解

析を行った。そのため、常温菌である *Delftia tsuruhatensis* と *Deinococcus radiodurans* R 由来の PPK2 Class III 酵素を大腸菌を用いて、発現・精製し、それぞれ DtCs と DrR1 と名付けた酵素の性質を調べた⁶⁾。

まず、DtCs を用いポリリン酸過剰の条件において、AMP とポリリン酸を基質として酵素反応を行うと、AMP の 90%以上が ATP に変換された。一方、ADP を基質として酵素反応を行っても ATP は僅かしか生成せず、AMP の生成も見られた。この結果から、DtCs は AMP から ATP が生成する反応には中間体として、ADP が存在しないことが予想された。すなわち、これまでは提案されていない、AMP のピロリン酸化により ATP が生成する可能性が示唆された。

この仮説を検証するために、トリリン酸 (P_3) を基質として、AMP のリン酸化反応を行った。 P_3 が過剰の状態で行っているため、AMP から ATP への反応が ADP を中間体として行われている (いない) ならば、ピロリン酸は生成する (しない) が、モノリン酸は生成しない (する) はずである。実際に実験を行ってみるとモノリン酸の生成は計測され、さらに生成する ATP 量とモノリン酸量が比例していることが分かった。ATP 量の 8 割の量のモノリン酸が生成していた。この結果は、AMP のピロリン酸化により ATP が生成する可能性が指示するものである。同様の実験を別の菌株由来の酵素 DrR1 で行ってみると、同様の結果が得られた。このことから AMP のピロリン酸化による ATP 生成は、PPK2 class III 酵素に共通する性質である可能性が示唆された。

【今後の展望】

今後、PPK2 class III の酵素を無細胞タンパク質合成系において、使用することを考えている。これにより、現行の 3 つの酵素と高価なクレアチンリン酸を必要とするシステムから (図 2 A)、1 つの酵素と安価なポリリン酸を使用するシステム (図 2 B) に改良できると考えている。先行研究で、*Cytophaga hutchinsonii* 由来 PPK2 ClassIII (CHU0107) を用いた場合にタンパク

質合成量は変化しないが、反応速度が速くなったことが報告されている⁷⁾。今後、進化分子工学的手法により CHU0107 の高活性変異体を得て、無細胞タンパク質合成系の製造コストを下げかつ、従来品よりもタンパク質合成活性の高い無細胞タンパク質合成系を開発することを目指す。

【参考文献】

1. Ahn K, Kornberg A. (1990). Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* **265**, 11734–11739
2. Ishige K, Zhang H, Kornberg A. (2002). Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 16684–16688.
3. Nocek B, Kochinyan S, Proudfoot M, Brown G, Evdokimova E, Osipiuk J, Edwards AM, Savchenko A, Joachimiak A, Yakunin AF. (2008). Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 17730–17735.
4. Motomura K., Hirota R., Okada M., Ikeda T., Ishida T., Kuroda A. (2014). A new subfamily of polyphosphate kinase 2 (class III PPK2) catalyzes both nucleoside monophosphate phosphorylation and nucleoside diphosphate phosphorylation. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2602–2608.
5. Ogawa, M., Uyeda, A., Harada, K., Sato, Y., Kato, Y., Watanabe, H., Honda, K., and Matsuura, T. (2019) Class III Polyphosphate Kinase 2 Enzymes Catalyze the Pyrophosphorylation of Adenosine-5'-Monophosphate. *ChemBioChem* **20**, 2961-2967
6. Suzuki, S., Hara, R., and Kino, K. (2018) Production of aminoacyl prolines using the adenylation domain of nonribosomal peptide synthetase with class III polyphosphate kinase 2-mediated ATP regeneration. *J Biosci Bioeng* **125**, 644-648
7. Wang, P. H., Fujishima, K., Berhanu, S., Kuruma, Y., Jia, T. Z., Khusnutdinova, A. N., Yakunin, A. F., and McGlynn, S. E. (2020) A Bifunctional Polyphosphate Kinase Driving the Regeneration of Nucleoside Triphosphate and Reconstituted Cell-Free Protein Synthesis. *ACS Synth Biol* **9**, 36-42

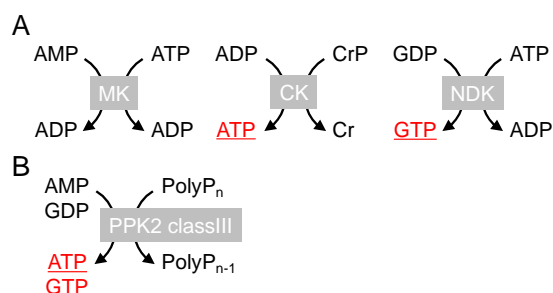


図 2 : 無細胞タンパク質合成系におけるエネルギー再生系。(A) 現行、(B) 本研究で構築する系