

酵母の酸化ストレス耐性に関与する
N-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の構造機能解析

那須野 亮
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科
ストレス微生物科学研究室
(高木 博史 教授)

平成 25 年 6 月 10 日提出

目次

1. 序論	
1-1. 酸化ストレスと抗酸化機構	5
1-2. 酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
1-3. 酵母における酸化ストレス・抗酸化機構	6
1-4. アミノ酸代謝を介した抗酸化酵素 Mpr1	7
1-5. Gcn5-related N-acetyltransferase	8
1-6. 図表	10
2. 材料と方法	
2-1. 菌株、プラスミド、および培地	14
2-2. <i>MPR1</i> 遺伝子への部位特異変異導入	14
2-3. タンパク質発現、および精製	15
2-3-1. 結晶構造解析用 Mpr1 の発現、および精製	15
2-3-2. 酵素アッセイ用 Mpr1 の発現、および精製	15
2-4. 精製サンプルの評価	16
2-4-1. サンプル純度の評価	16
2-4-2. 分子量の測定	16
2-4-3. N末端アミノ酸配列分析	16
2-5. 結晶化	16
2-5-1. 結晶化スクリーニング	16
2-5-2. 結晶化条件の最適化	17
2-6. データ収集、構造決定、精密化	17
2-6-1. Leu87SeMet-Mpr1	17
2-6-2. 野生型 Mpr1 (WT-Mpr1)	17
2-7. 超遠心分析	18
2-8. Acetyltransferase 活性の測定	18
2-8-1. Mpr1 の新規リガンドの探索	18
2-8-2. 比活性の測定	19
2-8-3. 速度論的パラメータの決定	19
2-8-4. 二基質反応の速度論的解析	19
2-8-5. 阻害剤の阻害様式の解析	19
2-9. 変異型 Mpr1 の <i>in vivo</i> 機能解析	20

2-9-1. 酵母の AZC 耐性の評価	20
2-9-2. 酵母細胞内の P5C 含量の測定	20
2-10. 表	21
3. 結果	
3-1. Mpr1 の新規リガンドの探索	27
3-1-1. 一次スクリーニング	27
3-1-2. 二次スクリーニング	27
3-1-3. 阻害様式の決定	27
3-2. 組換え酵素の精製	28
3-2-1. SDS-PAGE による純度の評価	28
3-2-2. セレノメチオニン取り込みの確認	28
3-2-3. His-tag 除去の確認	28
3-3. 結晶化	29
3-3-1. 結晶化スクリーニング	29
3-3-2. 結晶化条件の最適化	29
3-4. 構造決定	29
3-5. 全体構造	29
3-6. Mpr1 の会合状態の解析	30
3-7. 構造既知タンパク質との立体構造比較	30
3-8. 基質結合部位の構造	30
3-9. Mpr1 による二基質反応の速度論的解析	31
3-10. 変異型 Mpr1 の解析	32
3-10-1. 変異型 Mpr1 の比活性の測定	32
3-10-2. 変異型 Mpr1 の速度論的パラメータ	32
3-11. 速度論的パラメータの pH 依存性	33
3-12. 触媒反応機構	33
3-13. 変異型 Mpr1 発現酵母の AZC 耐性の評価	34
3-14. 変異型 Mpr1 発現酵母の P5C 含量の測定	34
3-15. 図表	35
4. 考察	60

5. 総括	68
6. 謝辞	69
7. 参考文献.....	70

<略語リスト>

AcCoA: acetyl coenzyme A, AZC: L-azetidine-2-carboxylic acid,
CHOP: *cis*-4-hydroxy-L-proline, DTNB: 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid),
GNAT: Gcn5-related *N*-acetyltransferase, GSA: L-glutamate- γ -semialdehyde,
GSH: glutathione, 5-HYP: 5-hydroxy-L-proline,
IPTG: isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, MNA: 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid,
pGlu: pyroglutamic acid, P5C: L- Δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid,
ROS: reactive oxygen species, T4HYP: *trans*-4-hydroxy-L-proline.

1. 序論

1-1. 酸化ストレスと抗酸化機構

様々な環境に曝される生物の細胞内は活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) が発生しやすい状態にあり、ROS は DNA やタンパク質、脂質などの生体高分子を損傷し、細胞死や機能不全を引き起こす。

ヒトでは、様々な疾患や老化と ROS の関連が報告されている。例えば、老化機序の一つのモデルとして、生体内で発生した ROS が生体分子に障害を与え、老化が進むという仮説が提唱されている(1)。実際に、酸化ストレス耐性を強化したショウジョウバエや線虫は野生種より寿命が長いことが知られている(2, 3)。また、多くの疾患の原因や病態生理に ROS が関与している(4)。ROS は DNA 損傷とそれによる遺伝子の変異を介してガンの発生につながるだけでなく(5, 6)、血管新生の制御(7)などを介してガンの進行にも関与している。Alzheimer 病や Parkinson 病では、ROS による神経変性が疾患の原因と考えられている(8, 9)。心臓疾患(10)や糖尿病(11, 12)においても、その病態生理と ROS との関連性が報告されている。一方、正常な生体機能の発現にも ROS は関与している。顆粒球内での NADPH oxidase による ROS の合成は正常な免疫機能に必要であり(13)、甲状腺ホルモンの合成には過酸化水素の生成が不可欠である(14)。植物でも高温や乾燥、高浸透圧、強光などに伴い ROS が発生し、光合成能や成長速度に支障を来す(15)。真菌類では細胞分化に ROS が関与していることが報告されており(16)、抗生物質による殺菌作用には ROS が関係していることが示されている(17)。

このように ROS は数多くの生命現象に密接に関わっており、細胞の ROS に対する応答機構を理解することは、基礎・応用の両面で非常に重要である。

1-2. 酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、パン類、酒類、バイオエタノールなどの発酵生産に必要不可欠な微生物である。現在、酵母機能を利用した産業は大きな市場を形成しており、より発酵能や生育の優れた産業酵母の育種が求められている。発酵に適した菌株を育種することで、低コスト化やプロセスの高度化が期待できる。

また酵母では、ヒトをはじめとする高等生物に存在する基本的な生命現象や遺伝子がよく保存されているため、酵母を用いた基礎研究から得られた知見は、多くの高等生物に応用できる可能性を秘めている。例えば、先述したように、ショウジョウバエや線虫では、酸化ストレス耐性の向上が寿命の延長につながると報告されているが、同様の現象は酵母でも見られている(18)。また、神経変

性疾患研究に酵母をモデル生物として用いる試みも、数多くなされている(19, 20)。

1-3. 酵母における酸化ストレス・抗酸化機構

酵母は発酵生産過程において、冷凍、乾燥、高温、高浸透圧、高濃度エタノールなどに曝されているため、細胞内はミトコンドリア膜の損傷や抗酸化酵素群の変性などにより ROS が蓄積する「酸化ストレス」状態に陥り、有用機能（アルコール、炭酸ガス、味・風味成分などの生成）の発現が著しく制限されている (21, 22)。例えば、冷凍パン生地やドライイーストの製造プロセスでは、酵母が冷凍や乾燥に曝され酸化ストレスを受けることで多くの細胞が死滅している。一方、バイオエタノールの製造過程においても、酵母は高温や高浸透圧、高濃度エタノールによって酸化ストレスを受け、発酵能の低下を招いている。

好気条件下における酵母のミトコンドリアでは、エネルギーを生産する過程で、その副産物として過酸化水素、スーパーオキシドアニオン、ヒドロキシラジカルなどの ROS が必ず発生する。この ROS によって細胞の生育が阻害されたり、細胞死を引き起こす状態を「酸化ストレス」と呼んでいる。通常の場合、ROS は酵母細胞が有する抗酸化機構により除去されるため、細胞内は酸化ストレス状態にならない。しかし、上記で示したように発酵生産環境における酵母は、高温や冷凍、乾燥、高濃度エタノールなど多くのストレスに曝され、細胞内の抗酸化能は低下している。また、これらのストレスはミトコンドリア膜を直接攻撃し、ROS の過剰な発生も導いている。このため、酵母は発酵条件で酸化ストレスに暴露され、有用機能の発現が著しく制限される。特に、高温処理はミトコンドリアから大量の ROS を生成し、重度な酸化ストレスを引き起こす (23-25)。ROS はタンパク質や核酸、脂質などの生体高分子を酸化し、タンパク質変性、DNA・RNA 鎖の切断、生体膜の阻害などを誘導するため、細胞に対して極めて有害である。このため、細胞には ROS による酸化的障害から自身を守る「抗酸化機構」が存在している(26, 27)。

酵母の酸化ストレス応答機構については、多くの研究が行われており、機構の解明もある程度進んでいる。酸化ストレス応答に関わる代表的な転写因子としては、Hsf1, Msn2/4, Yap1 などが知られており、それぞれが heat shock elements, stress response elements, AP-1 responsive elements に結合し、抗酸化に関連する遺伝子の転写を制御している (18, 28)。興味深いことに、これらの転写因子の下流には直接的な抗酸化遺伝子だけでなく、アミノ酸代謝やエネルギー代謝を制御する遺伝子も多く存在する。抗酸化機構には酵素的な系と非酵素的な系が存在する。例えば、superoxide dismutase (SOD) や catalase (CAT)、glutathione (GSH)

peroxidase はスーパーオキシドアニオンや過酸化水素をそれぞれ直接消去する酵素であり、酵素的な抗酸化機構の代表例である。一方、非酵素的な抗酸化機構としては、グルタミン酸、システイン、グリシンから成るトリペプチド GSH があり、細胞内で直接的な還元剤として働き、ROS を消去する。また GSH は GSH peroxidase の電子供与体としても働くことから、酸化ストレス耐性機構の中で重要な位置を占めている(28)。

1-4. アミノ酸代謝を介した抗酸化酵素 Mpr1

最近ではアミノ酸代謝を介した抗酸化機構も見出されている。当研究室で見出した酵母 *N*-acetyltransferase Mpr1 を介した抗酸化機構もその1つである。当初、L-proline (Pro) の毒性アナログ L-azetidine-2-carboxylic acid (AZC) への耐性を付与する遺伝子として *MPR1/2* が見出され、これらがコードする *N*-acetyltransferase Mpr1 が AZC を *N*-アセチル化により解毒することが明らかになった(29, 30)。*MPR1* と *MPR2* は一塩基異なる (一アミノ酸置換) のみで、両者は同様の生理的機能を担っている。また *MPR1* のホモログと考えられる遺伝子は酵母やカビなどの真菌類に広く存在し、AZC *N*-acetyltransferase 活性も多く酵母から見出されている (31-33)。AZC は、タンパク質の新規合成の際に Pro の代わりに取り込まれ、合成されたタンパク質の変性や機能不全を引き起こし、毒性を発揮すると考えられていることから(34)、Mpr1 は *N*-アセチル化により AZC のタンパク質合成への取り込みを阻害することで、AZC の毒性を解除していると考えられる (Fig. 1A)。しかし、AZC は自然界には一部の植物中に存在するのみで(35-37)、Mpr1 の生理的な基質 (酵母細胞内基質) であるとは考えにくい。一方、*MPR1/2* を破壊した株が過酸化水素や冷凍解凍処理、エタノール処理に感受性を示すことなどから、Mpr1 が酵母に抗酸化能を付与することが示された (38-40)。その後当研究室では、Mpr1 が Pro 代謝中間体である L- Δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid (P5C) / L-glutamate-g-semialdehyde (GSA) をアセチル化し、L-arginine (Arg) 合成中間体である *N*-acetyl GSA を供給することで Arg 合成を促進すること (38, 41)、また増加した Arg 依存的な一酸化窒素 (NO) が酵母に酸化ストレス耐性を付与すること (42)を明らかにした (Fig. 2)。L-glutamic acid から Arg を合成する最初の2段階を触媒する酵素、*N*-acetylglutamate synthase、および *N*-acetylglutamate kinase はともに Arg により阻害されることが知られている(43) (Fig. 2)。そのため、これらより下流に位置する *N*-acetyl GSA の Mpr1 による供給は、フィードバック阻害を回避できるため Arg 合成の効率を高めると考えられる。一方、当研究室では、Mpr1 の生理的基質と考えられる P5C/GSA がミトコンドリアの呼吸鎖活性を直接阻害して、ROS の発生を促進することで細胞毒性を惹起していること

を示した (44)。酵母を酸化ストレスに曝すと P5C/GSA が蓄積することから (41)、Mpr1 は P5C/GSA を解毒するという点でも、酸化ストレス耐性に寄与していると言える (Fig. 2)。Pro / Arg 代謝を介した抗酸化機構はこれまで例がなく、Mpr1 はこの新規な抗酸化機構における鍵酵素である。

1-5. Gcn5-related *N*-acetyltransferase

Mpr1 は一次構造から Gcn5-related *N*-acetyltransferase (GNAT) スーパーファミリーに属すると考えられる。主な GNAT スーパーファミリーのタンパク質としては、aminoglycoside *N*-acetyltransferase, serotonin *N*-acetyltransferase, glucosamine-6-phosphate *N*-acetyltransferase, histone acetyltransferase, mycothiol synthase などが挙げられる。Aminoglycoside *N*-acetyltransferase は最初に見出された GNAT タンパク質であり、aminoglycoside 系抗生物質のアミノ基をアセチル化することで 16S rRNA との結合能を低下させ、宿主に耐性を付与する(45)。Serotonin *N*-acetyltransferase は、概日周期の制御に関わると考えられている melatonin の生合成の最後から 2 番目の反応を触媒しており、この系の律速段階を担っている(46)。Glucosamine-6-phosphate *N*-acetyltransferase は、リポ多糖やペプチドグリカン、キチン、GPI アンカーなど多くの重要物質の前駆体である uridine diphosphate *N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) の生合成を担っている(47, 48)。Histone acetyltransferase はクロマチン構造の変化を介して種々の遺伝子の転写制御に関わっており(49)、mycothiol synthase は放線菌における抗酸化低分子物質である mycothiol の合成の一段階を担う酵素である(50)。このように GNAT タンパク質は広範囲の生物種から見出されており、その生理的機能と基質の構造は非常に多様である。各 GNAT タンパク質間でアミノ酸配列の相同性は低いにも関わらず、立体構造における基本的なフォールディングはよく保存されており、N 末端から 2 つの α -helix、3 本の逆平行 β -strand、 α -helix、 β -strand、 α -helix、 β -strand (α 1- α 2- β 2- β 3- β 4- α 3- β 5- α 4- β 6) と続く中心構造は特に保存性が高い(51) (Fig. 3)。保存性配列 motif A が形成する P-loop は、acyl-CoA の pyrophosphate 部分と結合するループ構造であり、GNAT タンパク質に広く保存されている (51)。また、構造の中心部にある β -strand 上には β -bulge 構造があり、acyl-CoA のカルボニル基の結合および正四面中間体の負電荷を持った酸素を安定化する機能を持つ。また速度論的な反応機構としては、酵素基質三者複合体の形成を介した sequential 機構を取るものが多い。触媒反応機構としては、塩基触媒によるアミンの脱プロトン化や酸触媒によるチオレートアニオンのプロトン化が報告されている。完全に共通した触媒反応機構は存在しないが、多くの GNAT タンパク質で tyrosine (Tyr) 残基によるチオレートアニオンのプロトン化が触媒活性に関

与していると報告されている(52-57)。

Mpr1 はこれらの構造既知の GNAT タンパク質とアミノ酸配列の相同性が低く (Table 1)、立体構造も不明であった。また Mpr1 の基質 (アセチル基受容体) としては、AZC のほかに *cis*-4-hydroxy-L-proline (CHOP) が *in vitro* の実験により同定されており (58)、ともに環状二級アミンである。また生理的基質と考えられる P5C/GSA についても、両者の平衡反応の中間体 5-hydroxy-L-proline (5-HYP) が基質として認識されている可能性があり、これも環状二級アミンである (Fig. 1B)。一方、これまでに報告されている GNAT 酵素の基質はほとんどが一級アミンであり、環状アミンの *acetyltransferase* は報告されていない。これらのことから、Mpr1 は新規の構造や反応機構を有することが示唆される。

これまでに多くの GNAT タンパク質が発見され、多様な種類の基質が同定されているが、解析されていない推定 GNAT タンパク質は数多く存在する。例えば、大腸菌では 26 個の推定 GNAT タンパク質の内、機能が解析されているのは 4 個に過ぎない(51)。そのため、新しい GNAT タンパク質と予測される Mpr1 の構造や触媒反応機構の解明は、GNAT タンパク質における構造機能相関を理解し、進化的関係を議論する上で、大きな足がかりとなる。また、新規抗酸化機構の鍵酵素である Mpr1 を、立体構造や反応機構から詳しく理解することは、細胞の酸化ストレス応答を理解する上で新しいアプローチとなる。

そこで本研究では、Mpr1 の立体構造と触媒反応機構を明らかにすることを目的として行った。立体構造の決定は X 線結晶構造解析により行い、構造に基づいて構築した変異型酵素を速度論的に解析することで、触媒残基を同定した。最終的に Mpr1 の反応機構モデルを提唱した。決定した立体構造、および反応機構モデルに基づいて、GNAT スーパーファミリーにおける Mpr1 の位置付けや進化的関係、生理的機能について考察した。

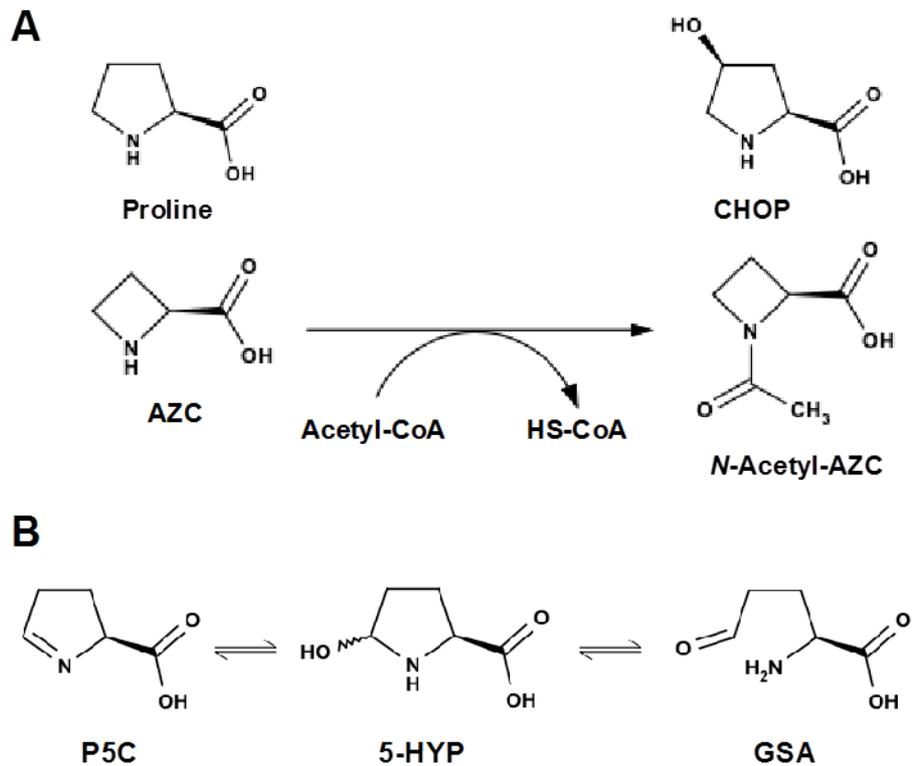


Fig. 1. Mpr1 の酵素反応と基質構造

(A) Mpr1 は、acetyl-CoA (AcCoA)をアセチル基供与体として Pro アナログ AZC をアセチル化する。また、*cis*-4-hydroxy-L-proline (CHOP)も同じくアセチル化する。AZC、CHOPともに環状二級アミンである。(B) Mpr1 の生理的基質と考えられる P5C/GSA は互いに平衡反応の互変異性体の関係にあり、中間体として環状二級アミンである 5-hydroxy-L-proline (5-HYP)を生成する。

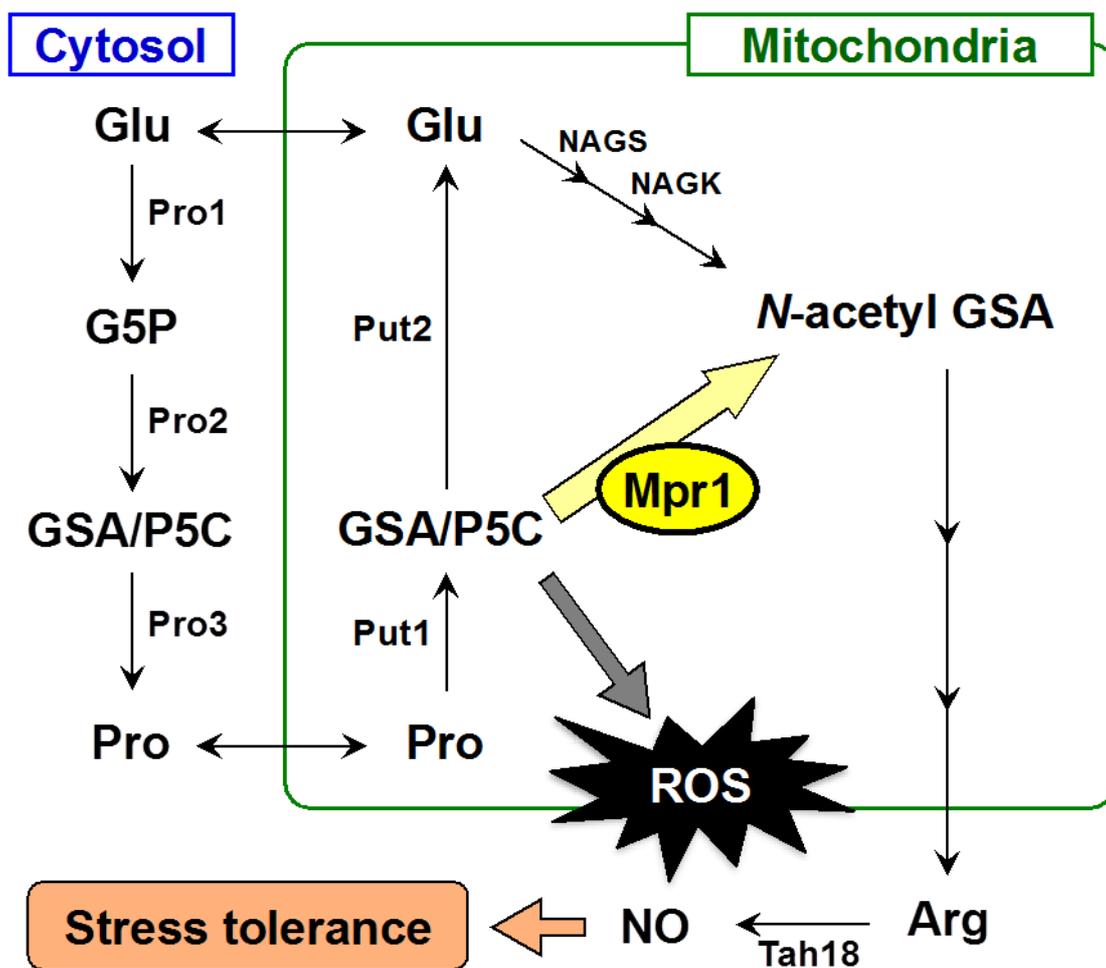


Fig. 2 Mpr1 を介した抗酸化機構

Mpr1 は Pro 代謝と Arg 代謝を連結することで Arg 合成を促進し、Arg 依存的な NO 発生を導く。NO はシグナル分子として働き、SOD などの抗酸化酵素の発現制御などを介して、酸化ストレス耐性に寄与すると考えられる。一方、P5C/GSA はミトコンドリア呼吸鎖の阻害により ROS 発生を惹起する。Mpr1 は P5C/GSA の代謝によりこれを防止する。Pro1: γ -glutamyl kinase, Pro2: γ -glutamylphosphate reductase, Pro3: P5C reductase, Put1: proline oxidase, Put2: P5C dehydrogenase, Tah18: yeast NOS(nitric oxide syntase)-like protein, G5P: glutamyl-5-phosphate, NAGS: *N*-acetylglutamate synthase, NAGK: *N*-acetylglutamate kinase.

Table 1. PDB をデータベースとした Mpr1 の BLAST 検索結果

タンパク質	ID (%)	E	QC (%)
The Antithrombin-S195a Factor Xa-Pentasaccharide Complex	32.88	0.24	31
The Antithrombin-Thrombin-Heparin Ternary Complex	32.88	0.26	31
Antithrombin-Iii	32.88	0.28	31
The Antithrombin-Factor Ixa- Pentasaccharide Complex	32.88	0.28	31
Antithrombin-Iii	32.88	0.29	31
N135q-S380c-Antithrombin-Iii	32.88	0.3	31
P14-Fluorescein-N135q-S380c-Antithrombin-Iii	32.88	0.3	31
The Intact And Cleaved Human Antithrombin Iii Complex	32.88	0.3	31
Hyperstable In-Frame Insertion Variant Of Antithrombin	32.88	0.3	31
P13 Alanine Variant Of Antithrombin	32.88	0.31	31
F420-Dependent Methylenetetrahydromethanopterin Dehydrogenase	29.31	5.4	23
Psychrotrophic Esterase Esta From Pseudoalteromonas Sp. 643a	30.88	5.7	28

PDB をデータベースとして用い Mpr1 の配列相同性検索を行った。Mpr1 に有意な配列相同性を示す構造既知タンパク質は見出せなかった。ID は identity、E は e-value、QC は query coverage を示す。この検索は、後述する PDB ID 4H89 の結晶構造が公表される前に行った。

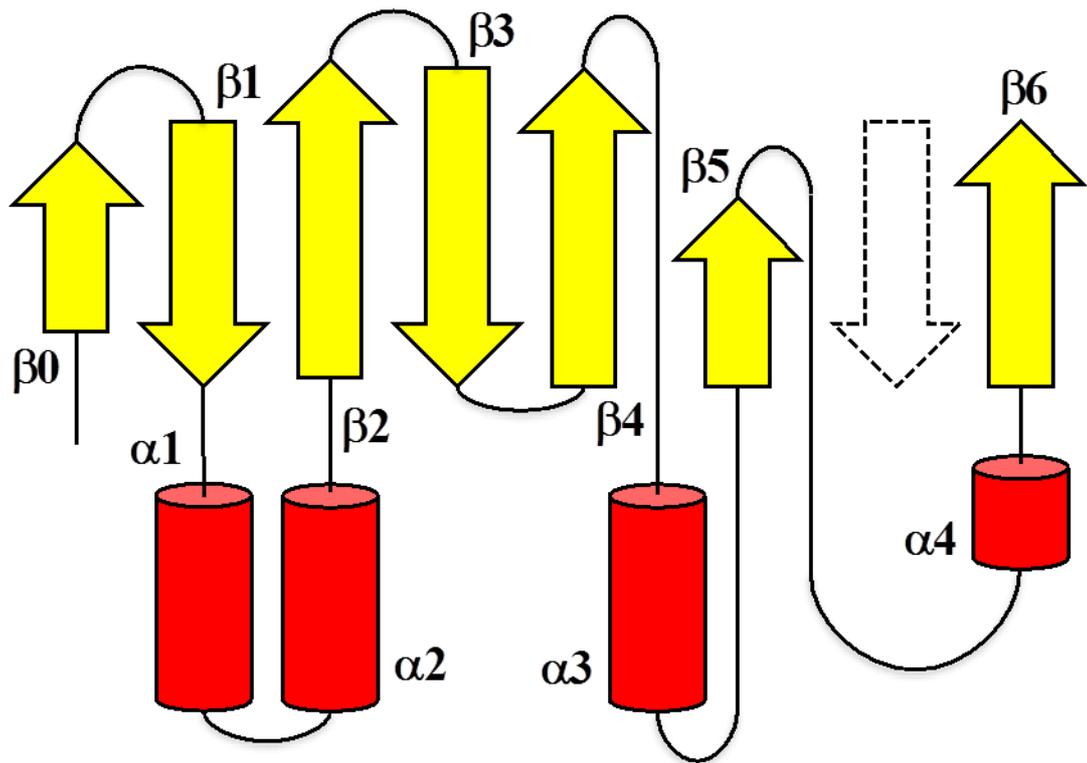


Fig. 3. GNAT タンパク質の中心構造のトポロジー

多くの GNAT タンパク質に共通する中心構造のトポロジー。赤の円筒は α -helix、黄色の矢印は β -strand を示す。 β -strand は、平行・逆平行の混合した β -sheet を形成している。点線で示した β -strand は、同一ペプチド鎖に由来する場合と、多量体中の別のペプチド鎖から供給される場合がある。

2. 材料と方法

2-1. 菌株、プラスミド、および培地

本研究で使用した菌株リストを Table 2 に示す。大腸菌 DH5 α をプラスミド構築に、BL21(DE3) およびメチオニン要求性株 B834(DE3) を *in vitro* の実験に用いるタンパク質の発現宿主として用いた。また、酵母の表現型を評価する実験では、*S. cerevisiae* Σ 1278b 株の野生株 L5685 から構築した *mpr1/2* 破壊株 LD1014 の 5-fluoroorotic acid 耐性コロニーより取得した、LD1014-ura3 を用いた。

pQE2-MPR1(SacI-Hind3) は、多コピープラスミド pQE2 (Qiagen 社) の SacI/HindIII サイト、isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導性プロモーターの下流に *MPR1* の OFR を組み込んだものであり、IPTG 誘導により N 末端に 15 アミノ酸残基 (MKHHHHHHMHAGAQ) を融合したタンパク質として Mpr1 を発現する。結晶化および *in vitro* の酵素アッセイに用いた Mpr1 の過剰発現には、このプラスミドを導入した大腸菌を用いた。pYES2-MPR1(Sc/Xh) は、多コピープラスミド pYES2 (Invitrogen 社) の SacI/XhoI サイト、ガラクトース誘導性プロモーター *GAL1* の下流に *MPR1* の ORF を組み込んだものであり、ガラクトース誘導により Mpr1 を発現する。酵母での Mpr1 の発現にはこのプラスミドを用いた。

大腸菌による結晶化用のセレノメチオニン導入 Mpr1 の発現には M9+SeMet 培地を、酵素アッセイ用の Mpr1 の発現には M9+CA 培地を用いた。また酵母の生育培地として SG 培地および SCG-U 培地を用いた。固体培地の作製には 2% 精製寒天を用いた。本研究で使用した培地の組成を Table 3 に示す。

2-2. *MPR1* 遺伝子への部位特異変異導入

MPR1 遺伝子への部位特異変異導入は QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) に準ずる方法により行った。PCR により *MPR1* 遺伝子に変異を導入し、それをプラスミドごと増幅し、*DpnI* 処理により鋳型プラスミドを消化した後、反応液を用いて *E. coli* DH5 α を形質転換した。コロニーからプラスミドを抽出して *MPR1* の配列を確認したものを、発現用プラスミドとした。

2-3. タンパク質発現、および精製

2-3-1. 結晶構造解析用 Mpr1 の発現、および精製

pQE2-MPR1(Sac1-Hind3) もしくはこれに由来する変異型 Mpr1 発現用プラスミドを導入した *E. coli* B834(DE3) 形質転換体を、M9+SeMet 液体培地を用いて、37°C で OD₆₀₀ が 0.8 になるまで培養した。培養液を 18°C まで冷却した後、IPTG を終濃度 100 μM で添加し、18°C で 18 時間タンパク質発現誘導を行った。集菌、および洗菌後、細胞ペレットを Buffer A に懸濁し、超音波破砕機 Sonifier 450 (BRANSON 社製) を用いて細胞を破砕した。破砕液を 6,000 g で 20 分間遠心した後、上清をφ 0.2 μm のフィルターで濾過し、粗酵素液とした。

粗酵素液を Buffer A で平衡化した Ni-affinity カラム (HiPrep FF 16/10, GE Healthcare Bio-Science 社) にアプライして His-tag 付き Mpr1 を吸着させ、80 mM imidazole を含む Buffer A により夾雑タンパク質を洗い流した。その後、imidazole 濃度の直線的グラジエント (80-500 mM) により吸着タンパク質を要出し、Mpr1 の活性が検出される画分を回収した。回収した Mpr1 を Dialysis Membrane (和光純薬社) を用いて透析し、TAGZyme buffer にバッファー交換した。続いて、Mpr1 溶液を限外濾過フィルター Amicon Ultra 10K (Millipore 社) を用いて約 0.4mg/mL まで濃縮し、Mpr1 タンパク質 1 μg あたり、50 mU の DAPase (Qiagen 社)、3.6 U の Qcyclase (Qiagen 社) および終濃度 47 μM のシステアミン塩酸塩を加え、20°C で 1 時間インキュベートし His-tag を切除した。その後、酵素処理液の 3 倍量の Buffer A を加えて pH を塩基性に調整し、Buffer A で平衡化した Ni-affinity カラムに再びアプライした。imidazole 濃度の直線的グラジエント (0-500 mM) によって得た溶出液の内、タグフリー Mpr1 を含む画分を集め、透析によって Buffer DEAE にバッファー交換した後、Buffer DEAE で平衡化した陰イオン交換カラム (HiPrep DEAE FF 16/10, GE Healthcare Bio-Science 社) に吸着させた。夾雑タンパク質を Buffer DEAE で洗い流した後、NaCl 濃度の直線的グラジエント (0-500 mM) によりタグフリー Mpr1 を溶出し、透析により 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) にバッファー交換した。限外濾過フィルターによってタンパク質濃度を 4mg/mL に調整したものを、液体窒素で凍結後-80°C で保存し、結晶化用サンプルとした。タンパク質調製に用いたバッファーを Table 5 に示す。

2-3-2. 酵素アッセイ用 Mpr1 の発現、および精製

pQE2-MPR1(Sac1-Hind3) もしくはこれに由来する変異型 Mpr1 発現用プラスミドを導入した *E. coli* BL21(DE3) 形質転換体を、M9+CA 液体培地を用いて、37°C で OD₆₀₀ が 0.5 になるまで培養した。培養液を 18°C まで冷却した後、IPTG を終濃度 100 μM で添加し、18°C で 18 時間タンパク質発現誘導を行った。集菌、

および洗菌後、細胞ペレットを Buffer A に懸濁し、超音波破碎機 Sonifier 450 を用いて細胞を破碎した。破碎液を 6,000 g で 20 分間遠心した後、上清をφ 0.2 μm のフィルターで濾過した。

粗酵素液を Buffer A で平衡化した Ni-affinity カラム (Ni Sepharose 6 Fast Flow, GE Healthcare Bio-Science 社) にアプライして His-tag 付き Mpr1 を吸着させ、80 mM imidazole を含む Buffer A により夾雑タンパク質を洗い流した。その後、500 mM imidazole を含む Buffer A により His-tag 付き Mpr1 を溶出し、精製サンプルとした。

2-4. 精製サンプルの評価

2-4-1. サンプル純度の評価

精製タンパク質を SDS-PAGE で分離後、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色により、各サンプルの純度を評価した。

2-4-2. 分子量の測定

本研究科の設備である matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) 質量分析計 Autoflex-N (BRUKER 社製) を用いて、分子量を測定した。

2-4-3. N 末端アミノ酸配列分析

本研究科の設備であるプロテインシーケンサー Precise 492cLC (Applied Biosystems 社製) を用いて、N 末端のアミノ酸配列を解析した。

2-5. 結晶化

2-5-1. 結晶化スクリーニング

Mpr1 の結晶化スクリーニングは、MRC 結晶化スクリーニングプレート (96 ウェル・2 ドロップ) (Molecular Dimensions 社) と Index HT (Hampton Research 社) を用いて行った。各ウェルには 100 μL のリザーバー溶液と 4 μL のドロップを加えて密封し、シットティングドロップを用いた蒸気拡散法により 20°C で結晶化させた。ドロップには Mpr1 の他、各種リガンドを加え、共結晶の取得も試みた。

2-5-2. 結晶化条件の最適化

結晶化条件の最適化は 24 ウェル結晶化用プレート Cryschem crystallization plate (Hampton Research 社) を用い、シッティングドロップ法により 20°Cで行った。

2-6. データ収集、構造決定、精密化

2-6-1. Leu87SeMet-Mpr1

まず、結晶を段階的に 25 %の PEG400 を含むリザーバー溶液に移し、100 K で凍結させた。結晶の質を確認する予備実験として、Rigaku R-AXIS VII 検出器と Rigaku FR-E X 線発生装置を用いて X 線回折データを収集した。予備実験の結果から良質であると判断した結晶を、大型放射光施設 (SPring-8) の BL41LU ビームラインで Rayonix MZ225HE CCD 検出器を用いて、X 線回折データを収集した。全てのデータのプロセッシング、スケーリングは HKL-2000 (59)を用いて行った。位相計算は、セレンのピーク波長で収集したデータを用いて単波長異常分散 (SAD) 法により行った。セレンの位置は SOLVE (60)で決定し、初期位相の改良とモデル構築は RESOLVE (61)を用いて行った。構築モデルの精密化は、Coot (62)と Refmac (63)で行った。モデルは 2.1 Å の分解能まで精密化した。

2-6-2. 野生型 Mpr1 (WT-Mpr1)

WT-Mpr1 の X 線回折データは、先行研究 (64)にて収集したものを用いた。1.5-2.0 mg/mL のタンパク質濃度で、100 mM BisTris-HCl (pH 5.1-5.5), 200 mM MgCl₂, 25 % PEG3350 の条件で 20°Cにて結晶化させた後、50 mM AZC および 25 % PEG400 を含む溶液にソーキングし、X 線回折データを収集した。WT-Mpr1 の構造は、Leu87SeMet-Mpr1 の構造をサーチモデルとして、PHASER (65)を用いて分子置換法 (MR) により決定した。MR の解を得た後、ARP/wARP (66)を用いて構造モデルを再構築した。WT-Mpr1 の結晶は twin fraction 0.29 の部分的な merohedral twin であった。構造の精密化は、Coot と Refmac を、twin refinement は Refmac を用いて行った。

WT-Mpr1 と CHOP の複合体の回折データは、Mpr1 結晶を 10 mM CHOP、20 % PEG400 および 15 % glycerol を含む溶液に 20°Cで 1 時間ソーキングし、収集した。X 線回折データの収集は、大型放射光施設 (Photon Factory) BL-17A ビームラインで ADSC Quantum 270 検出器を用いて行った。構造決定は分子置換法で行い、構造精密化は Coot と Phenix を用いて行った。

2-7. 超遠心分析

An-60 Ti ローターを備えた超遠心分離機 Optima XLA(Beckman Coulter 社製)を用いて、超遠心分析を行った。WT-Mpr1 を終タンパク質濃度 100 μM になるように 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) に溶解し、30,000 rpm で遠心しながら、10 分おきに吸光度を測定した。

2-8. Acetyltransferase 活性の測定

Mpr1 の acetyltransferase 活性の測定は、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、および各濃度の AZC、AcCoA、Mpr1 を含む溶液組成で 30°Cにて行った。分光光度計 DU-800 (Beckman Coulter 社製) を用いて AcCoA の thioester 結合に由来する 232 nm の吸光度 (モル吸光係数 $\epsilon = 6,500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) の減少を経時的に 1 分間測定し、反応初速度を求めた。比活性の測定、速度論的パラメータの決定、速度論的反応機構の解析、阻害様式の解析には、本方法で測定した初速度を用いた。

Mpr1 の新規リガンドのスクリーニングでは、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)、100 μM AcCoA、5 mM リガンド候補物質、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Mpr1 を含む溶液組成で Mpr1 の acetyltransferase 活性を検出した。生成物である CoA のチオール基と DTNB が反応して生成する安定な 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid (MNA) を、目視により確認、または分光光度計 DU-800 により測定した。

速度論的パラメータの pH 依存性を評価する実験では、緩衝液として 50 mM の Tris-HC もしくは MES-Na を用いた。

2-8-1. Mpr1 の新規リガンドの探索

一次スクリーニングでは、候補物質を加えた反応溶液を 1 分間室温でインキュベートし、溶液の呈色 (黄色) を目視で確認した。さらに、候補物質中に阻害剤がある可能性を検証するため、終濃度 5 mM の AZC を加えて室温 1 分間反応後の呈色を確認した。一次スクリーニングには Table 6 に記載した候補物質溶液を用いた。

二次スクリーニングでは、MNA のモル吸光係数 $\epsilon (15,570 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$ を用いて、1 分間 30°C で反応させ初速度を求めた。

2-8-2. 比活性の測定

比活性の測定は、100 μM AcCoA および 5 mM AZC 存在下で行った。1 U は 1 分間に分解する AcCoA の物質量 (μmol) として定義し、比活性はタンパク質量 (mg) でノーマライズした U/mg 単位で算出した。

2-8-3. 速度論的パラメータの決定

AcCoA に対する見かけの速度論的パラメータは、5 mM AZC 存在下で AcCoA 濃度を変化させた時の初速度から算出した。AZC に対する見かけの速度論的パラメータは、100 μM AcCoA 存在下で AZC 濃度を変化させた時の初速度から算出した。速度論的パラメータの算出は、GraphPad Prism version 6 for Mac (GraphPad Software, <www.graphpad.com>) を用いて、下記の式に従いカーブフィッティング法で行った。WT-Mpr1 の解析には Eq. 2 を、変異型 Mpr1 の解析には Eq. 1 を用いた。

$$\text{(Eq. 1)} \quad v = \frac{V \times [S]}{K_m + [S]}$$

$$\text{(Eq. 2)} \quad v = \frac{V \times [S]}{K_m + [S] \times \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right)}$$

2-8-4. 二基質反応の速度論的解析

AZC および AcCoA の濃度を変化させて初速度を測定し、Lineweaver-Burk プロットを用いて、Mpr1 による二基質反応の速度論的機構を解析した。

2-8-5. 阻害剤の阻害様式の解析

阻害剤と AZC の濃度を変化させて初速度を測定し、Lineweaver-Burk プロットを用いて、阻害様式を解析した。

2-9. 変異型 Mpr1 の *in vivo* 機能解析

S. cerevisiae LD1014ura3 株 (*mpr1/2* 破壊株) に、野生型もしくは変異型 *MPR1* を保持する pYES2-MPR1(Sc/Xh)、もしくは空ベクター pYES2 を導入し、下記の解析に用いた。

2-9-1. 酵母の AZC 耐性の評価

上記の形質転換体を SCG-U 液体培地で 30°C にて対数増殖期 ($OD_{600} = 1.0 \sim 2.0$) まで培養し、SG もしくは SG+5 mM AZC 固体培地にスポットして、30°C で 4 日間培養し、表現型を評価した。

2-9-2. 酵母細胞内の P5C 含量の測定

上記の形質転換体を SCG-U 液体培地で 30°C にて 28 時間培養し、その後さらに 39°C で 5 時間インキュベートした。集菌後、細胞ペレットを 0.9 % NaCl で洗浄して 1N HCl に懸濁し、100°C で 20 分間加熱して P5C を抽出した。サンプルを遠心分離後、400 μ L の上清と 200 μ L の 2.4 N 過塩素酸水溶液、2 % ninhydrin 水溶液を混合し、100°C で 15 分間加熱した。遠心分離後、上清を捨て、残った沈殿をエタノールに溶解した。エタノール溶液の 510 nm における吸光度を測定し、P5C-ninhydrin 複合体の濃度を算出した (モル吸光係数 $\epsilon = 16,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (67)。

Table 2. 使用した菌株

Strain	Genotype
<i>E. coli</i>	
DH5a	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)
B834 (DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm met</i> (DE3)
<i>S. cerevisiae</i>	
L5685	<i>MATa ura3-52 trp1 MPR1 MPR2</i>
LD1014	<i>MATa ura3-52 trp1 mpr1::URA3 mpr2::TRP1</i>
LD1014ura3	<i>MATa ura3-52 trp1 mpr1::URA3 mpr2::TRP1 ura3</i>

Table 3. 培地組成

M9+SeMet
4 % glucose, 100mM Na/K-phosphate (pH 6.9), 4.3 mM NaCl 9.3 mM NH ₄ Cl, 3 mM MgSO ₄ , 0.3 μM FeCl ₃ , 0.5 μM MnCl ₂ 100 μM CaCl ₂ , 100 μg/mL ampicillin 60 μg/mL L-selenomethionine
M9+CA
0.4 % glucose, 65 mM Na/K-phosphate, 8.6 mM NaCl 18.7 mM NH ₄ Cl, 1 mM MgSO ₄ , 100 μg/mL ampicillin 2 % casamino acid
SG
2 % galactose 0.67 % yeast nitrogen base without amino acid (Difco)
SCG-U
2 % galactose 0.67 % yeast nitrogen base without amino acid (Difco) 0.002 % adenine, 0.04 % L-leucine, 0.0008 % p-aminobenzoic acid, 0.008 % L-arginine, L-aspartic acid, L-glutamine, glycine, inositol, L-methionine, L-phenylalanine, L-serine, L-alanine, L-tryptophan, L-asparagine, L-cysteine hydrochloride, L-glutamic acid, L-histidine, L-isoleucine, L-lysine, L-proline, L-threonine, L-tyrosine, L-valine

Table 4. 変異導入用プライマー

Primer	Sequence
T74A (+)	5'-aagtggcaagGCctatccacaat-3'
T74A (-)	5'-attgtggataGGCcttgccactt-3'
N125A (+)	5'-catcaagcccGCctatgctccgc-3'
N125A (-)	5'-gcggagcataGGCgggcttgatg-3'
H132A (+)	5'-gctccgcgttgctcgGCTaattgcaatgctggc-3'
H132A (-)	5'-gccagcattgcaattAGCcgagcaacgaggc-3'
N135A (+)	5'-gcataattgcGCCgctggctttc-3'
N135A (-)	5'-gaaagccagcGGCgcaattatgc-3'
N135D (+)	5'-gcataattgcGATgctggctttc-3'
N135D (-)	5'-gaaagccagcATCgcaattatgc-3'
N172A (+)	5'-ctctatctttGCCcttgctttg-3'
N172A (-)	5'-caaagacaagGGCaaagatagag-3'
N178A+	5'-gttaccGCTcaagctagttgg-3'
N178A-	5'-ccaactagcttgAGCggtaac-3'
N178D (+)	5'-gttaccGATcaagctagttgg-3'
N178D (-)	5'-ccaactagcttgATCggtaac-3'
W185F (+)	5'-ttggaaaataTTTgacaaattaa-3'
W185F (-)	5'-ttaattgtcAAAatatttccaa-3'
L87M (+)	5'-aaacagggattcATGaattattggtt-3'
L87M (-)	5'-aaaccaataattCATgaatccctggtt-3'
L99M (+)	5'-gctgtcgttggtATGcaaaccgatgag-3'
L99M (-)	5'-ctcatcggttgCATaacaacgacagc-3'
L164M (+)	5'-tgggcaccattgATGggctataaatac-3'
L164M (-)	5'-gtatttatagccCATcaatggtgcca-3'
I193M (+)	5'-aacttcagagaATGggactggtgcct-3'
I193M (-)	5'-aggcaccagtccCATtctctgaaagt-3'

変異導入に用いたプライマー。大文字の配列はミスマッチ配列であり、この部分に変異を導入し、アミノ酸を置換した。

PCR 反応条件：

鋳型プラスミド	3×10^{-15} mol
Primer forward	0.6 μ L
Primer reverse	0.6 μ L
5 \times reaction buffer	2 μ L
dNTP mix (2 mM each)	2 μ L
KOD -plus- (1U/ μ L) (TOYOBO)	0.4 μ L
25 mM MgCl ₂	1.2 μ L
滅菌水	適宜
<hr/>	
	20 μ L

94°C	2 min	} 18 cycles
98°C	10 sec	
Tm 値 - 5°C	30 sec	
68°C	1 min/ 1 kb	

Table 5. タンパク質調製に用いたバッファー

Buffer A
20 mM Na-phosphate (pH 7.4), 500 mM NaCl
TAGZyme buffer
20 mM N-phosphate (pH 7.0), 150 mM NaCl
Buffer DEAE
50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 10 mM imidazole, 10 % glycerol

Table 6. Mpr1 の新規リガンドのスクリーニングに用いた候補物質

溶液	溶液組成
#1	glycine (Gly), L-alanine (Ala), L-serine (Ser), L-threonine (Thr), β -alanine (β -Ala)
#2	L-histidine (His), L-lysine (Lys), L-arginine (Arg), L-ornithine (Orn)
#3	L-valine (Val), L-leucine (Leu), L-isoleucine (Ile), L-phenylalanine (Phe)
#4	γ -aminobutyric acid (GABA), L-tyrosine (Tyr), L-tryptophan (Trp), L-methionine (Met), L-asparagine (Asn), L-aspartic acid (Asp)
#5	L-proline (Pro), L-pyroglutamic acid (pGlu), <i>trans</i> -4-hydroxy-L-proline (T4HYP)

Mpr1 のリガンド候補物質。アッセイ時の終濃度はすべて 5 mM になるように調製した。

3. 結果

3-1. Mpr1 の新規リガンドの探索

本研究の結晶構造解析では、基質フリーの酵素および基質やリガンドとの複合体の構造決定を目的とした。そのため、まず AZC, AcCoA, CHOP 以外のリガンド（基質および阻害剤）を探索した。

3-1-1. 一次スクリーニング

Mpr1 および AcCoA を含む溶液に、候補物質溶液（Table 6）を加え一分間反応させた後、目視にて溶液の呈色（黄色）を評価した（Table 7）。一次スクリーニングの結果、どの候補物質溶液を添加しても Mpr1 の反応は検出されなかった。更に、AZC 添加後の呈色反応を確認したところ、溶液#1~4 では呈色により Mpr1 の反応が検出されたが、溶液#5 では AZC 添加後も呈色が起こらなかった。この結果から、溶液#5 に含まれる物質が、Mpr1 による AZC のアセチル化反応を阻害していることが示唆された。

3-1-2. 二次スクリーニング

一次スクリーニングの結果から、溶液#5 に Mpr1 の阻害剤が含まれている可能性が示された。5 mM AZC を基質として加えた反応溶液に、Pro, pGlu, T4HYP を阻害剤として 5 mM 加えて、比活性を測定した（Table 8）。Pro および T4HYP の添加は、AZC に対する比活性に影響を及ぼさなかったが、pGlu の添加は比活性を 50 % 以下に低下させた。このことから、pGlu が Mpr1 の阻害剤であることが示唆された。

3-1-3. 阻害様式の決定

pGlu による Mpr1 反応の阻害の様式を決定するため、Lineweaver-Burk プロットによる阻害様式の決定を試みた（Fig. 4）。各阻害剤濃度において作製した直線は、縦軸上の 1 点で交わっている。このことから、Mpr1 による AZC アセチル化を pGlu が競合的に阻害していることが明らかとなった。阻害剤の基質結合部位への結合は、現象として競合阻害を引き起こす。pGlu は AZC と同様に環状の Pro アナログであるため、基質結合部位に結合することが予想される。後述の Mpr1 の結晶化では、pGlu をリガンドの 1 つとして用い、共結晶の取得を試みた。

3-2. 組換え酵素の精製

先行研究では分子置換法により Mpr1 の構造決定を試みたが、十分な配列の同一性を示すモデル分子を見出せず、構造決定はできなかった (64)。そのため、本研究ではセレノメチオニン (SeMet) 標識タンパク質を用いた単波長異常分散法 (Se-SAD) による構造決定を試みた。WT-Mpr1 には N 末端 (Met1) と C 末端付近 (Met228) にのみ Met 残基が存在する。これらの領域に導入した SeMet 残基は結晶中でディスオーダーすることが予想され、位相決定には効率的でないと考えられる。そこで、二次構造を形成していると予測される領域の leucine (Leu) もしくは isoleucine (Ile) 残基を Met 残基に置換し、SeMet 標識タンパク質を調製した。

3-2-1. SDS-PAGE による純度の評価

精製した組換え Mpr1 の純度を SDS-PAGE と CBB 染色により評価した。結晶化用のサンプルは、10 µg ロードしても夾雑タンパク質は検出できず、結晶化に十分な純度であると判断した (Fig. 5)。

3-2-2. セレノメチオニン取り込みの確認

結晶化用 Mpr1 が十分にセレノメチオニンを取り込んでいるかを確認するために、MALDI-TOF 質量分析にて分子量を測定した (Table 9)。計算分子量における WT-Mpr1 と各 SeMet 標識 Mpr1 の差は 158.74 であり、すべての SeMet 標識 Mpr1 は検出分子量において、これとほぼ一致する WT-Mpr1 との分子量差を示した。

3-2-3. His-tag 除去の確認

結晶化用 Mpr1 の His-tag が除去されていることを確認するために、N 末端のアミノ酸配列を決定した (Table 10)。すべてのサンプルにおいて、N 末端のアミノ酸配列は、His-tag 除去後に残るクローニングアーティファクト由来の配列 Gly-Ala-Gln であった。このことから、His-tag が除去され、すべてのサンプルが同一の N 末端を有していることが確認できた。

3-3. 結晶化

3-3-1. 結晶化スクリーニング

結晶化スクリーニングの結果、Table 11 に示す条件で結晶の生成が確認できた。

3-3-2. 結晶化条件の最適化

スクリーニングから得られた結晶化条件をもとに、タンパク質濃度、沈殿剤濃度、リガンド濃度等を微調整して、結晶化条件を最適化した。その結果、100 mM BisTris (pH 5.5), 240 mM MgCl₂, 20.5 % PEG3350, 50 mM AZC, 4 mg/mL Leu87SeMet-Mpr1 という条件で、十分な大きさの結晶を再現性よく取得することができた (Fig. 6)。この結晶は実験室系 X 線発生装置を用いた予備実験から単結晶であることが示唆され、分解能は 2.4 Å であった。

3-4. 構造決定

SPring-8 の BL41XU ビームラインで、上記条件で得られた Leu87SeMet-Mpr1 の結晶の X 線回折データを収集し、Se-SAD 法により 2.1 Å 分解能で Leu87SeMet-Mpr1 の立体構造を決定した。また、先行研究 (64) で収集した WT-Mpr1 の X 線回折データを用い、Leu87SeMet-Mpr1 構造をモデルとした分子置換法にて、WT-Mpr1 の立体構造を決定した。一方、WT-Mpr1 の結晶を CHOP 溶液にソーキングしてから取得した回折データを用いて、Mpr1-CHOP 複合体の構造を決定した (Table 12)。

3-5. 全体構造

Mpr1 の立体構造には、8 本の β -strand と 6 本の α -helix が含まれており、構造の中心には 8 本の β -strand から形成された 1 枚の β -sheet が存在する。このフォールディングは、既知の GNAT acetyltransferase と類似しており、特に 2 番目の α -helix から 7 番目の β -strand までの構造 ($\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 4$ - $\beta 6$ - $\alpha 5$ - $\beta 7$) は、既知の GNAT タンパク質と共通の構造である (Fig. 7, 8)(51)。このことから、Mpr1 が GNAT スーパーファミリーに属することが立体構造からも明らかとなった。

3-6. Mpr1 の会合状態の解析

Mpr1 の溶液中での会合状態を解析するために超遠心分析を行った。溶液中では 52-56 K 程度の分子量に相当する状態で存在することが示された。Mpr1 の単量体の分子量は約 26.5 K であるため、溶液中では 2 量体を形成していることが明らかとなり (Fig. 9)、これも多くの GNAT タンパク質と同様であった (51)。また、基質である AZC の存在は、会合状態に影響しなかった。

3-7. 構造既知タンパク質との立体構造比較

Mpr1 の結晶構造と既知のタンパク質の立体構造を比較するために、Dali サーバー (68) を用いて、Mpr1 と構造の類似したタンパク質を検索した (Table 13)。Mpr1 と立体構造が類似するタンパク質として上位にヒットしたものはすべて細菌由来であり、1.8-2.8 Å の平均二乗偏差 (root mean square deviation: rmsd) 値を示した。一方、真核生物由来のタンパク質構造で Mpr1 と最も構造が似ているものは、検索の結果では 147 位に過ぎず、rmsd 値も 3.2 Å であった。この結果から、Mpr1 は真核生物由来の *N*-acetyltransferase よりも、相対的に細菌由来の *N*-acetyltransferase に類似していることが示された。

3-8. 基質結合部位の構造

Mpr1-CHOP 複合体の CHOP 周辺の構造から、Asn135 の側鎖および Asn172 と Leu173 の主鎖アミドが CHOP のカルボキシル基と、また Phe138 の主鎖アミドが水分子を介して CHOP のアミノ基と相互作用していることが明らかになった (Fig. 10A)。さらに、Tyr75 の側鎖芳香環炭素原子は CHOP の C γ との van der Waals 相互作用により環状二級アミンの認識に寄与していることが示唆された (Fig. 10B)。

一方、今回の試みでは AcCoA との複合体構造を得られなかったため、Mpr1 と立体構造が類似しているタンパク質の内、AcCoA との複合体構造が決定されており (69)、また Mpr1 と同様に二量体であることが報告されている (70)

Enterococcus faecium 由来の aminoglycoside 6'-*N*-acetyltransferase の構造 (PDB ID code 1B87) を用いて、Mpr1 における AcCoA 結合部位の予測を行った。

Mpr1-CHOP 複合体の構造と 1B87 の構造を重ね合わせたところ、2 番目から 8 番目の β -strand と 2 番目から 5 番目の α -helix がよく重なっており、特に AcCoA 周辺は重なり度合いが高かった (Fig. 11)。AcCoA の pyrophosphate 部分は GNAT スーパーファミリーに共通する保存性 motif A に結合することが報告されている

が(51)、Mpr1 の motif A に相当するアミノ酸残基 (Arg145, Gly146) は重ね合わせモデルにおいて AcCoA の pyrophosphate 部分と近い位置にあった (Fig. 12)。このことから、1B87 構造を用いた Mpr1 における AcCoA 結合部位の予測が妥当であると判断した。

重ね合わせから構築した Mpr1-CHOP-AcCoA の複合体モデル中では、Phe138 の主鎖アミドの NH 基と Asn178 および Trp185 の側鎖が AcCoA のカルボニル基の近くに位置していた (Fig. 12)。多くの GNAT タンパク質では、Mpr1 の Phe138 に相当する保存性の疎水性残基の主鎖アミドと、Trp185 に相当する保存性 Tyr 残基のフェノール性水酸基が触媒残基として機能することが報告されている (51)。これは、Mpr1 においても Phe138 と Trp185 が触媒として機能することを示唆している。

さらに、Mpr1 は特徴的な局所構造を有していることが分かった。Ribosomal protein acetyltransferase、aminoglycoside *N*-acetyltransferase、serotonin *N*-acetyltransferase、glucosamine-6-phosphate *N*-acetyltransferase、histone acetyltransferase、mycothiol synthase など多くの GNAT タンパク質では、触媒残基を含む β -strand に β -bulge 構造を有しており、これが正四面中間体の安定化に寄与すると考えられている (51)。Mpr1 では Phe138 を含む 5 番目の β -strand がこれに相当するが、興味深いことに Mpr1 は β -bulge 構造を形成していなかった (Fig. 13)。Mpr1 の場合、 β -bulge を形成しないことによって基質である環状二級アミンの結合により生じる立体障害を低減させる効果があると考えられる。 β -bulge を有さないことによる基質認識の様式は、Mpr1 が既知の GNAT タンパク質とは異なるタイプの酵素であることを示唆している。

3-9. Mpr1 による二基質反応の速度論的解析

Mpr1 による二基質反応の反応機構を理解するため、AZC および AcCoA の濃度を変化させて初速度を測定し、Lineweaver-Burk プロットを用いて解析した (Fig. 14)。その結果、異なる AcCoA 濃度下で作製した各直線は一点で交わった。このことから、Mpr1 による反応は Mpr1-AZC-AcCoA の酵素基質三者複合体を経由する sequential 機構で進行することが示された。これは多くの GNAT タンパク質で見られる反応機構と共通であった (51)。

3-10. 変異型 Mpr1 の解析

Mpr1 における CHOP 結合部位および AcCoA 結合予測部位から、触媒反応や基質認識に関与していると考えられるアミノ酸残基、および AcCoA 周辺に存在し Mpr1 ホモログ間で保存性の高いアミノ酸残基を置換し、その酵素活性を評価することで触媒残基の同定を試みた (Fig. 15)。

3-10-1. 変異型 Mpr1 の比活性の測定

WT-Mpr1 および変異型 Mpr1 の比活性を測定した (Fig. 16)。Thr74Ala-および His132Ala-Mpr1 は WT-Mpr1 の 50-60 % 程度の活性を維持していたが、Asn125Ala-、Asn135Ala-、Asn172Ala-、Asn178Ala-および Trp185Phe-Mpr1 では、著しく比活性が低下し、Asn135Asp-および Asn178Asp-Mpr1 では活性は検出できなかった。

3-10-2. 変異型 Mpr1 の速度論的パラメータ

比活性測定の結果、特に Asn135、Asn178 および Trp185 のアミノ酸置換は顕著な活性の低下を示したため、速度論的パラメータを取得し、より詳細に解析した (Table 14)。

Asn135 を Ala に置換すると、見かけの K_m 値は WT-Mpr1 の 20 倍に上昇した。このことは、Asn135 が基質認識に重要であることを示しており、これは結晶構造中で Asn135 の側鎖に CHOP が結合していたことと合致する (Fig. 10)。また、Asn135Asp-Mpr1 は活性を示さなかったが、結晶構造中で Asn135 の側鎖が CHOP のカルボキシル基と結合していることはこれと一致し、さらに Asn135 の側鎖が基質のカルボキシルアニオンを認識していることを示唆している。Asn125 と Asn172 は互いに相互作用しており、Asn172 は Asn135 に結合していることが、結晶構造から示された (Fig. 12)。これらの残基の Ala 置換が活性を著しく低下させることから、Asn125 および Asn172 は Asn135 の位置や配向を適したものにすることで、その機能を支持していると考えられた。

一方、Asn178 の Ala 置換により見かけの k_{cat} 値は WT-Mpr1 の約 40 分の 1 に低下したことから、Asn178 の側鎖が触媒活性に重要な機能を果たしていることが示された。複合体モデル中では、Asn178 の側鎖は AcCoA の硫黄原子と相互作用可能な距離に位置しており (Fig. 12)、この結果と一致する。多くの GNAT タンパク質では、Mpr1 の Trp185 に相当する保存性 Tyr 残基のフェノール性水酸基が、正四面中間体の分解後に生じるチオレートアニオンをプロトン化することが示唆されている(52-57)。このプロトン化は触媒反応に必須であると考えられるが、Mpr1 では Trp185 は保存されていないため(Fig. 15)、Trp185 は触媒残基ではないと結論した。チオール基とカルボキシルアミド基の pK_a 値

(dimethylsulfoxide 中にて 17.0、および 25.5) を考えると、Asn178 が直接チオレートプロトン化するのは考えにくい。一方、Asn178Asp-Mpr1 が活性を示さなかったことから、この位置に負電荷が存在することは触媒反応に好ましくないとと言える。

以上の結果から、Asn178 によるチオレートアニオンの安定化、および Asn178 に結合した水によるチオレートアニオンのプロトン化が、触媒活性の駆動力であると結論付けた。

3-11. 速度論的パラメータの pH 依存性

Asn135 が基質のカルボキシル基を認識・結合していることを裏付けるため、Mpr1 の AZC に対する見かけの K_m 値の pH 依存性を評価した (Fig. 17)。AZC に対する K_m 値は反応溶液の pH が酸性側にシフトするに従って上昇し、pH が 6 以下程度になると 200 mM 前後まで上昇した。Asn135Ala の AZC に対する K_m 値は 400 mM 程度であり、反応溶液の酸性化により Asn135 のアミドの基質認識への寄与が無くなったと考えられる。Mpr1-CHOP 複合体の構造では CHOP のカルボキシル基が Asn135 の側鎖アミドと水素結合可能な距離に存在すること、また Asn135Asp-Mpr1 が活性を示さなかったことと併せて、Asn135 の側鎖アミドが基質のカルボキシルアニオンを認識・結合していると結論づけた。

3-12. 触媒反応機構

構造解析および生化学的解析の結果に基づいて、Mpr1 の反応機構モデルを構築した (Fig. 18)。まず、Asn135 の側鎖アミド、および Asn172、Leu173 の主鎖アミドが基質 (AZC, CHOP) のカルボキシルアニオンを認識してこれを結合し、一方で AcCoA が Mpr1 に結合する。AZC が AcCoA カルボニル炭素に求核攻撃し、正四面中間体が生成する。正四面中間体は Phe138 の主鎖アミドの NH 基により安定化される。正四面中間体の分解後、チオレートアニオンと *N*-acetyl AZC が生成する。チオレートアニオンは Asn178 の側鎖アミドにより安定化され、その後、Asn178 に結合した水分子によりプロトン化される。最終的に、CoA と *N*-acetyl AZC が酵素から放出される。

3-13. 変異型 Mpr1 発現酵母の AZC 耐性の評価

S. cerevisiae LD1014ura3 株 (*mpr1/2* 破壊株) で WT-, Asn135Asp-および Asn178Asp-Mpr1 をそれぞれ発現させ、スポット試験にて AZC 耐性を評価した (Fig.19)。WT-Mpr1 発現株は顕著な AZC 耐性を示したのに対し、変異型 Mpr1 を発現した株は空ベクターを保持した株と同様に、AZC に感受性であった。このことから、Mpr1 分子内の Asn135 および Asn178 が酵母細胞内における AZC の解毒に必須であることが示された。

3-14. 変異型 Mpr1 発現酵母の P5C 含量の測定

酵母が高温ストレスに曝されると、proline oxidase Put1 が誘導されるが P5C dehydrogenase Put2 は誘導されないため、P5C 含量が増加する (Fig. 2) (41)。また、P5C はミトコンドリア呼吸鎖の阻害により ROS を発生し毒性を発揮するが、Mpr1 はこれをアセチル化により解毒する (44)。そこで Asn135 および Asn178 が P5C/GSA 代謝においても重要な機能を担っていることを確認するため、高温処理 (39°C、5 時間) 後の細胞内 P5C 含量を測定した (Fig. 20)。WT-Mpr1 を発現する株では、空ベクターを導入した株よりも P5C 含量が 40% 低下していた。また、変異型 Mpr1 を発現する株では P5C 含量は WT-Mpr1 発現株よりも増加しており、Asn178Asp-Mpr1 発現株では空ベクター導入株と同レベルの P5C 含量を示した。この結果から、Asn135 および Asn178 が AZC 耐性だけでなく P5C/GSA 代謝にも必須であることが示された。また、P5C/GSA 代謝には Mpr1 タンパク質そのものではなく、その acetyltransferase 活性が必要であることも明らかになった。

Table 7. Mpr1 の新規リガンド探索における一次スクリーニング結果

溶液	溶液組成	呈色反応	
		+ Candidates	+ AZC
#1	Gly, Ala, Ser, Thr, β -Ala	-	+
#2	His, Lys, Arg, Orn	-	+
#3	Val, Leu, Ile, Phe	-	+
#4	GABA, Tyr, Trp, Met, Asn, Asp	-	+
#5	Pro, pGlu, T4HYP	-	-

DTNB、AcCoA、Mpr1 を含む反応溶液に候補物質溶液、さらに続いて AZC を加えた時の反応を、呈色反応で検出した。各候補物質および AZC の終濃度は 5 mM であった。
+: 溶液が黄色を呈した、-: 溶液の色に変化は無かった。

Table 8. 阻害剤候補物質の阻害活性の測定

Candidates	Inhibitor	AZC	Specific activity (U/mg)
-	-	+	18.0
Pro	+	-	N. D.
	+	+	20.3
pGlu	+	-	N. D.
	+	+	8.9
T4HYP	+	-	N. D.
	+	+	17.1

Mpr1 による AZC アセチル化活性に及ぼす候補物質の阻害効果を示す。1 U は、1 分間に 1 μmol の生成物を生じる単位として定義した。Candidates の欄には阻害剤の候補物質を記している。N. D. は活性が検出限界(0.006 U/mg)以下であったことを示す。

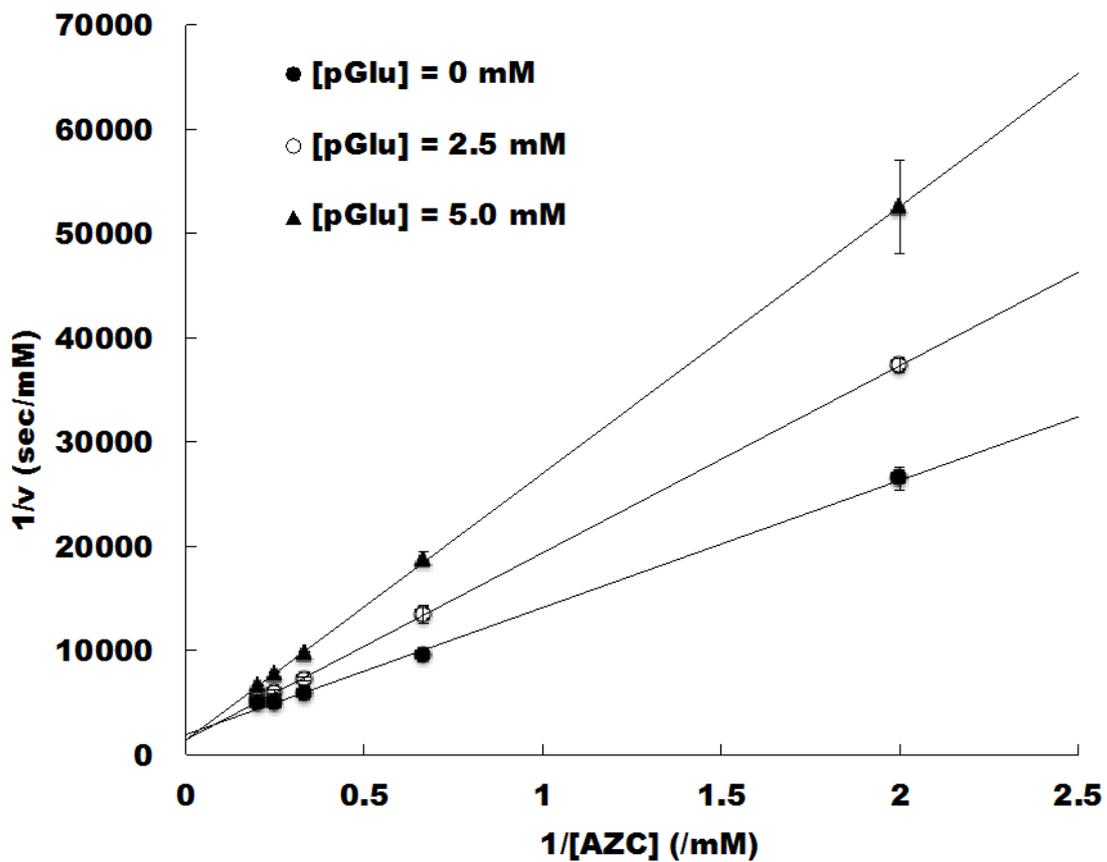


Fig. 4. Lineweaver-Burk プロットによる阻害様式の解析

各 AZC および pGlu 濃度で測定した初速度を用いて Lineweaver-Burk プロットを作製した。独立して 3 回の測定を行い、平均および標準偏差を算出した。異なる pGlu 濃度下で作製した直線は縦軸上で交わり、pGlu による阻害が競合阻害であることを示している。

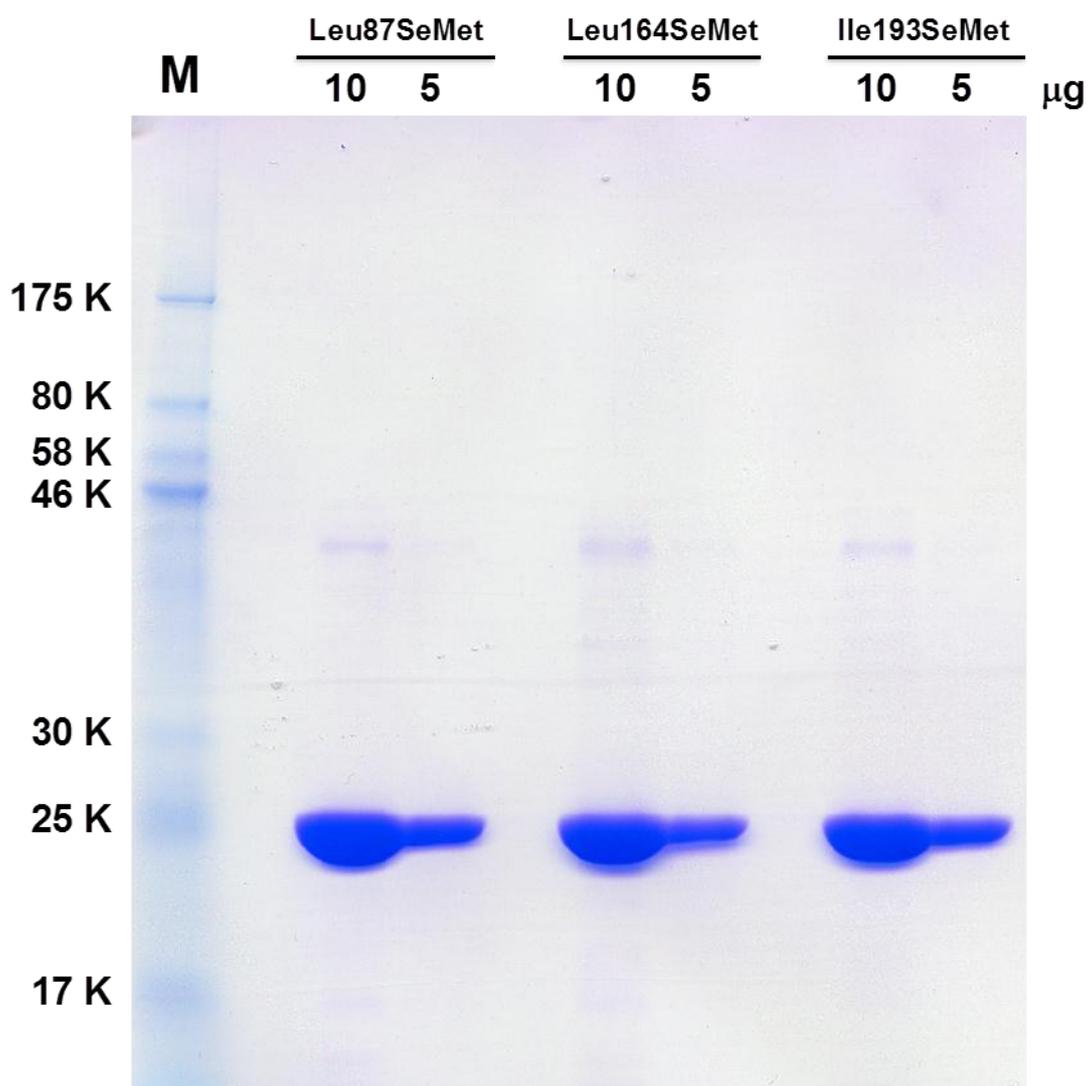


Fig. 5. 結晶化用サンプルの純度の確認

結晶化用サンプルを SDS-PAGE で分離後、CBB 染色した。M は分子量マーカーを、各値はロードしたタンパク質量をそれぞれ示す。

Table 9. MALDI-TOF 質量分析の結果

Mpr1	検出分子量 (m/z)	計算分子量
WT	26484.808	26488.77
Leu87SeMet	26642.980	26647.51
Leu164SeMet	26643.630	26647.51
Ile193SeMet	26647.245	26647.51

WT-Mpr1 の計算分子量は、GENETYX-MAC (GENETYX CORPORATION 社)を用いて平均分子量として算出した。SeMet 標識 Mpr1 の計算分子量は、Met の分子量 149.21、Leu および Ile の分子量 131.17、SeMet の分子量 196.106 を用い、2 残基の Met と 1 残基の Leu または Ile が SeMet に置換されたと仮定して、WT-Mpr1 の計算分子量に 158.728 を加えて求めた。

Table 10. N 末端解析

Position	Leu87SeMet	Leu164SeMet	Ile193SeMet
1st	Gly	Gly	Gly
2nd	Ala	Ala	Ala
3rd	Gln	Gln	Gln

プロテインシーケンサーによる N 末端解析結果をまとめた。すべてのサンプルにおいて、N 末端から Gly-Ala-Gln 配列が示された。

Table 11. 結晶化スクリーニングの結果

Protein	Solution composition
Leu87SeMet	100 mM BisTris-HCl (pH 6.5), 200 mM NaCl, 25 % PEG3350
	100 mM BisTris-HCl (pH 5.5), 200 mM NaCl, 25 % PEG3350
	100 mM HEPES-Na (pH 7.5), 200 mM MgCl ₂ , 25 % PEG3350
	100 mM BisTris-HCl (pH 6.5), 200 mM NaCl, 25 % PEG3350, 50 mM AZC
	100 mM BisTris-HCl (pH 5.5), 200 mM NaCl, 25 % PEG3350, 50 mM AZC
	100 mM HEPES-Na (pH 7.5), 200 mM MgCl ₂ , 25 % PEG3350, 2 mM AcCoA
Leu164SeMet	100 mM BisTris-HCl (pH 6.5), 200 mM NaCl, 25 % PEG3350
	100 mM BisTris-HCl (pH 6.5), 200 mM MgCl ₂ , 25 % PEG3350
	100 mM HEPES-Na (pH 7.5), 200 mM MgCl ₂ , 25 % PEG3350
	100 mM BisTris-HCl (pH 6.5), 200 mM MgCl ₂ , 25 % PEG3350, 200 mM AZC
	100 mM HEPES-Na (pH 7.5), 200 mM MgCl ₂ , 25 % PEG3350, 200 mM AZC
Ile193SeMet	100 mM BisTris-HCl (pH 6.5), 200 mM NaCl, 25 % PEG3350
	100 mM BisTris-HCl (pH 6.5), 200 mM NaCl, 25 % PEG3350
	100 mM BisTris-HCl (pH 6.5), 200 mM NH ₄ -acetate, 25 % PEG3350
	100 mM HEPES-Na (pH 7.5), 200 mM NH ₄ -acetate, 25 % PEG3350
	100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 200 mM NH ₄ -acetate, 25 % PEG3350
	100 mM BisTris-HCl (pH 6.5), 200 mM NaCl, 25 % PEG3350

スクリーニングの結果、ここに記載した条件において結晶の生成が確認できた。スクリーニングは 2 mg/mL のタンパク質濃度で行った。

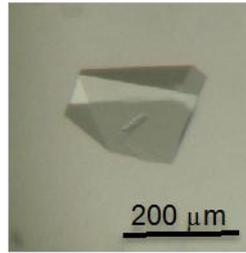


Fig. 6. 最適化条件から得た Leu87SeMet-Mpr1 の結晶

100 mM BisTris (pH 5.5), 240 mM MgCl₂, 20.5 % PEG3350, 50 mM AZC, タンパク質濃度 4 mg/mL の条件で得られた Leu87SeMet-Mpr1 の結晶。

Table 12. X 線回折データ収集と精密化における統計値

Data	Mpr1 (Se-Met)	Mpr1 (wild-type)	Mpr1-CHOP
Data collection			
Wavelength (Å)	0.9792	0.9793	0.9851
Space group	$P3_112$	$P3_112$	$P2_1$
a, b, c (Å), β (°)	83.6, 83.6, 192.4, 83.9, 83.9, 193.8, 80.3, 229.3, 84.8, 120	120	90.9
Resolution (Å) *	50-2.10 (2.18-2.10)	48.3-1.90 (2.00-1.90)	56.9-2.30 (2.40-2.30)
Measured reflections	87,002	490,882	507,672
Unique reflections	45,346	61,875	134,196
Redundancy	5.8 (5.2)	7.9 (7.7)	3.8 (3.5)
Completeness (%)	99.1 (96.3)	100.0 (100.0)	99.0 (99.0)
$I/(\sigma I)$	42.5 (9.9)	26.0 (7.1)	8.0 (2.5)
R_{merge} (%)	5.9 (21.4)	6.0 (28.7)	9.8 (45.3)
Refinement			
Resolution (Å)	50.0-2.1	48.3-1.9	50.0-2.3
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ †	0.198/0.250	0.166/0.187	0.166/0.215
Atoms			
Protein	5,500	5,300	21,779
Ligand	–	43	203
Water	198	228	602
B-factor (Å ²)			
Protein	12.6	30.4	38.1
Ligand	–	34.6	56.2
Water	12.0	35.8	34.6
R.m.s. deviations			
Bond lengths (Å)	0.015	0.008	0.014
Bond angles (°)	1.39	1.02	1.36
Twin law		h, k, l and $-h, -k, l$	
Twin fraction		0.27	

* 丸括弧内の値は最外郭分解能での統計値を示す。

† R_{free} は、回折データの内ランダムに取り出した 5% をテストセットとして計算した。

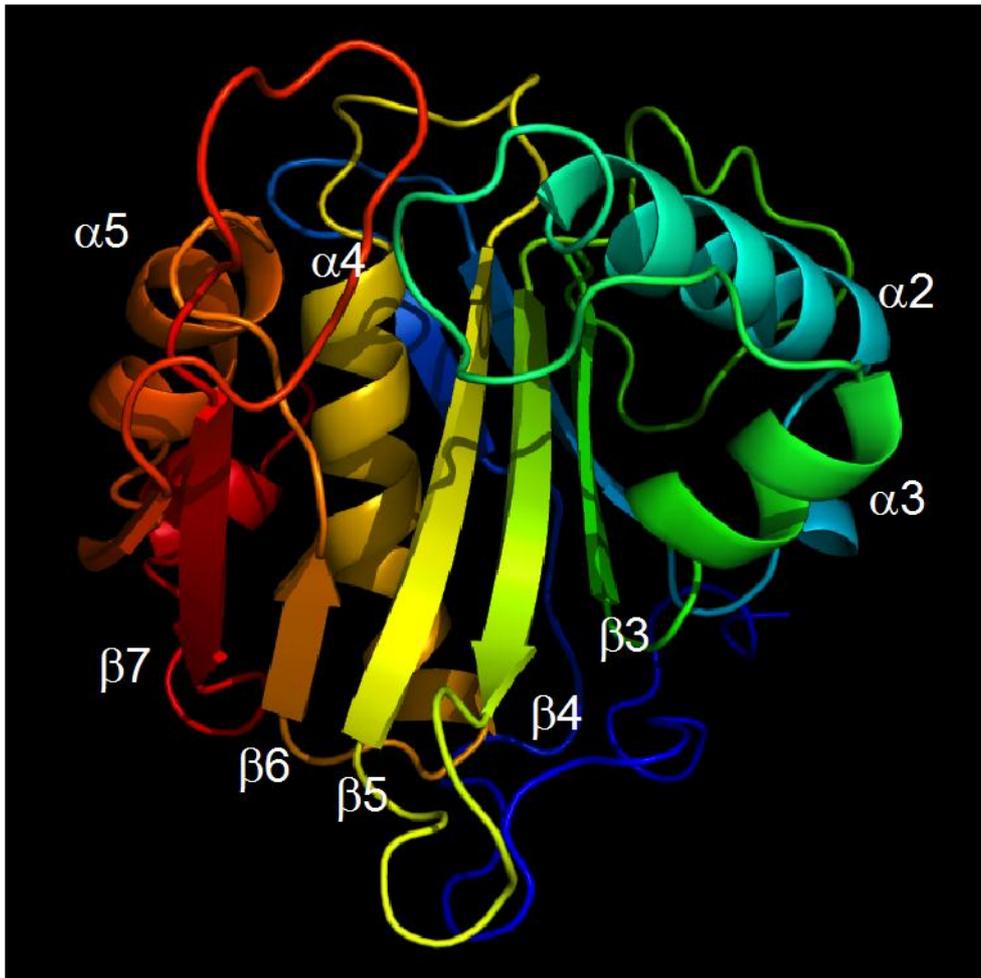


Fig. 7. Mpr1 の結晶構造

N末端(青)からC末端(赤)にかけてカラースペクトルで示したMpr1単量体のcartoonモデル。白字はそれぞれの二次構造を示している。

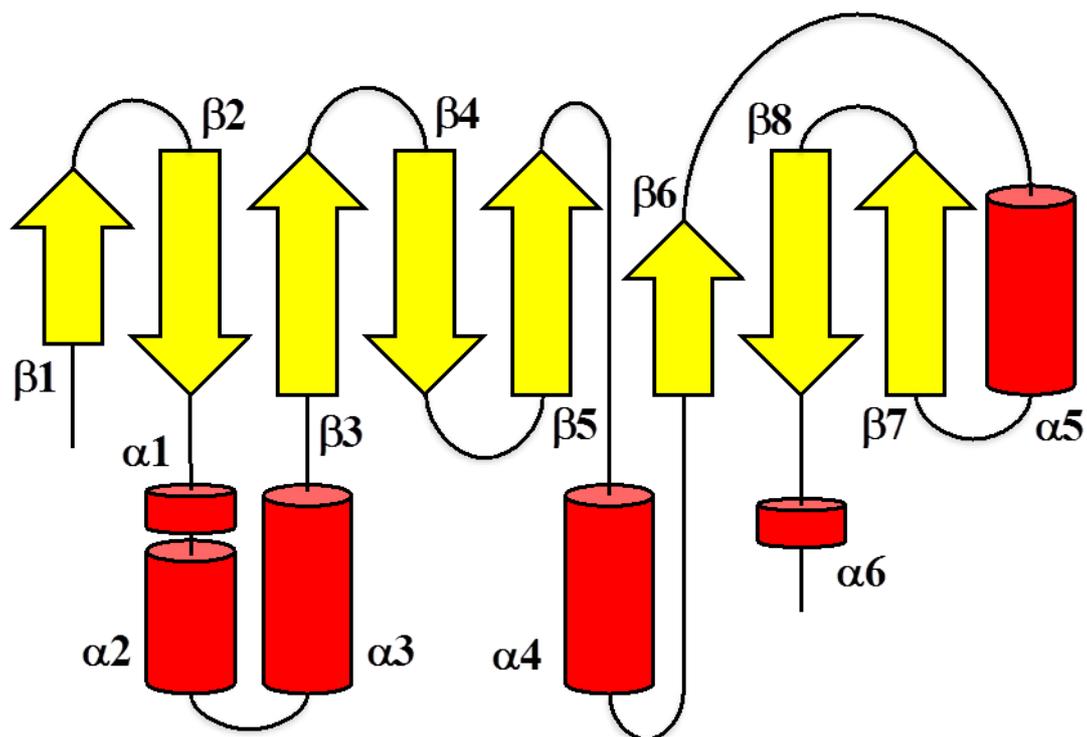


Fig. 8. Mpr1 の立体構造のトポロジー

Mpr1 の構造のトポロジー。赤の円筒は α -helix を、黄色の矢印は β -strand をそれぞれ示す。 β -strand は、平行・逆平行の混合した β -sheet を形成している。全体のフォールディングは GNAT タンパク質に共通する中心構造 (Fig. 3) と類似性が高い。

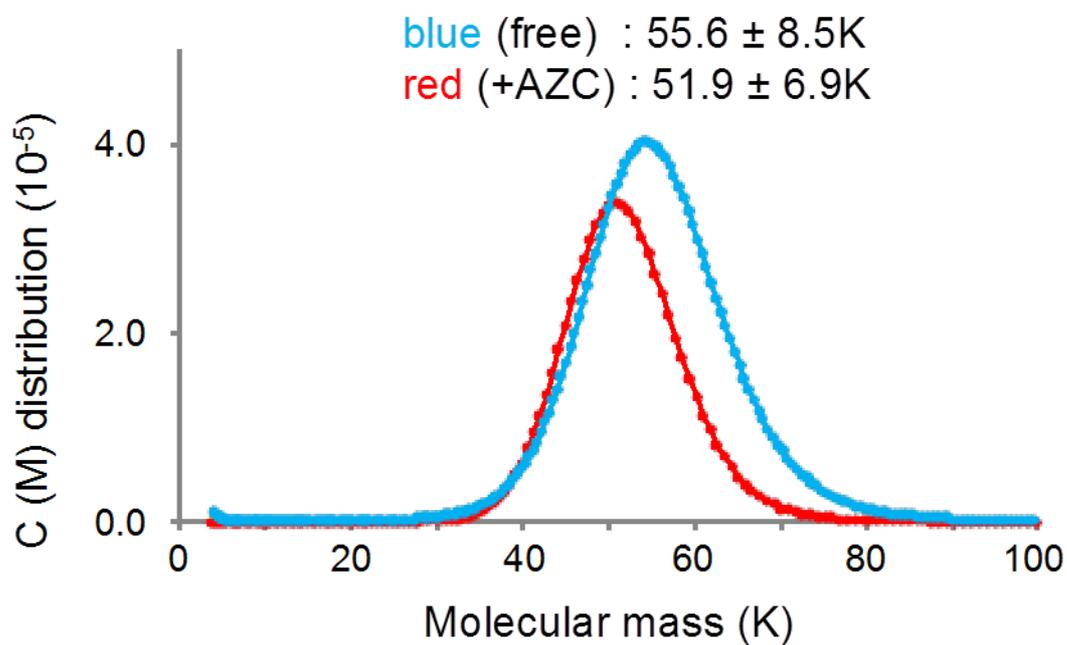


Fig. 9. 超遠心沈降法による Mpr1 の会合状態の解析

Mpr1 の溶液中会合状態の超遠心分析。基質である AZC の有無にかかわらず、Mpr1 は溶液中では二量体に相当する分子量を示した。

Table 13. Dali サーバーを用いた立体構造相同性検索

Rank	PDB ID	rmsd	Host
1	3DR6	2.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> str. LT2
2	3DR8	2.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> str. LT2
3	1VHS	2.4	<i>Bacillus subtilis</i>
5	1YVO	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
6	2JLM	2.3	<i>Acinetobacter baylyi</i>
8	2J8M	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9	2J8R	2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
14	2J8N	2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
16	1YR0	2.1	<i>agrobacterium tumefaciens</i>
20	3LD2	2.2	<i>Streptococcus mutans</i> UA159
23	2BL1	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
28	2GE3	2.4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
34	1GHE	2.7	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>
37	1J4J	2.7	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>
38	2I79	2.8	<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4
45	2CNM	2.6	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> str. LT2
50	2AE6	2.4	<i>Enterococcus faecalis</i> V583
59	2CNT	2.7	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> str. LT2
61	1N71	2.2	<i>Enterococcus faecium</i>
65	2A4N	2.3	<i>Enterococcus faecium</i>
71	1B87	2.3	<i>Enterococcus faecium</i>
147	4FD7	3.2	<i>Aedes aegypti</i>
153	3TFY	3.2	<i>Homo sapiens</i>
168	2OB0	3.2	<i>Homo sapiens</i>

検索結果の一部を示す。ここに示したタンパク質はすべて *N*-acetyltransferase である。破線より上に示したタンパク質はすべて細菌由来で、破線より下に示したタンパク質は真核生物由来であった。この検索は、後述する PDB ID 4H89 の結晶構造が公表される前に行った。

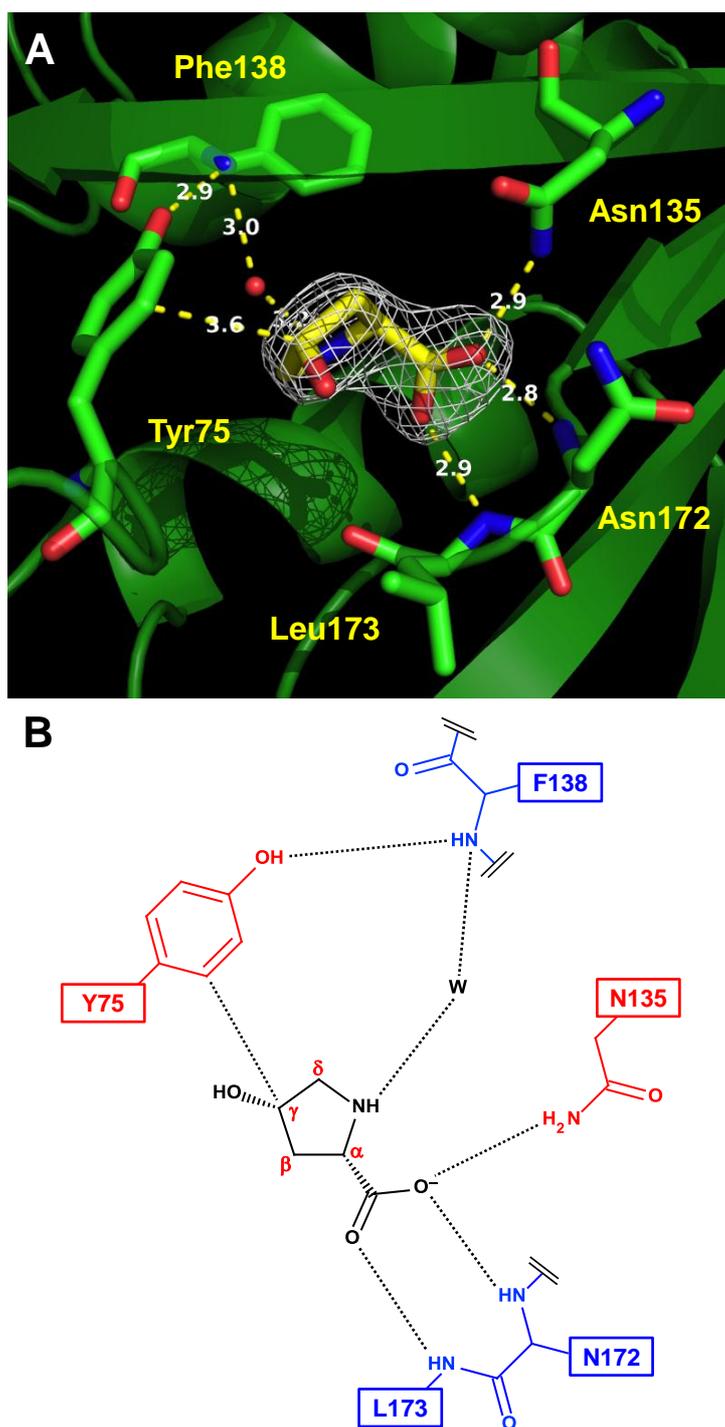


Fig. 10. CHOP 認識部位

(A) σ 値を2.5とした simulated-annealing $|Fo|-|Fc|$ マップ。Tyr75, Asn135, Phe138, Asn172, Leu173 と CHOP をスティックモデルで表示した。白字は相互作用の距離を、赤い球体は水分子を、メッシュは CHOP の電子密度を示している。(B) CHOP 結合の模式図。赤で示したアミノ酸残基は側鎖で、青で示した残基は主鎖で、それぞれ CHOP と結合した。「W」は水分子を、CHOP 上の文字は炭素原子のナンバリングを示している。

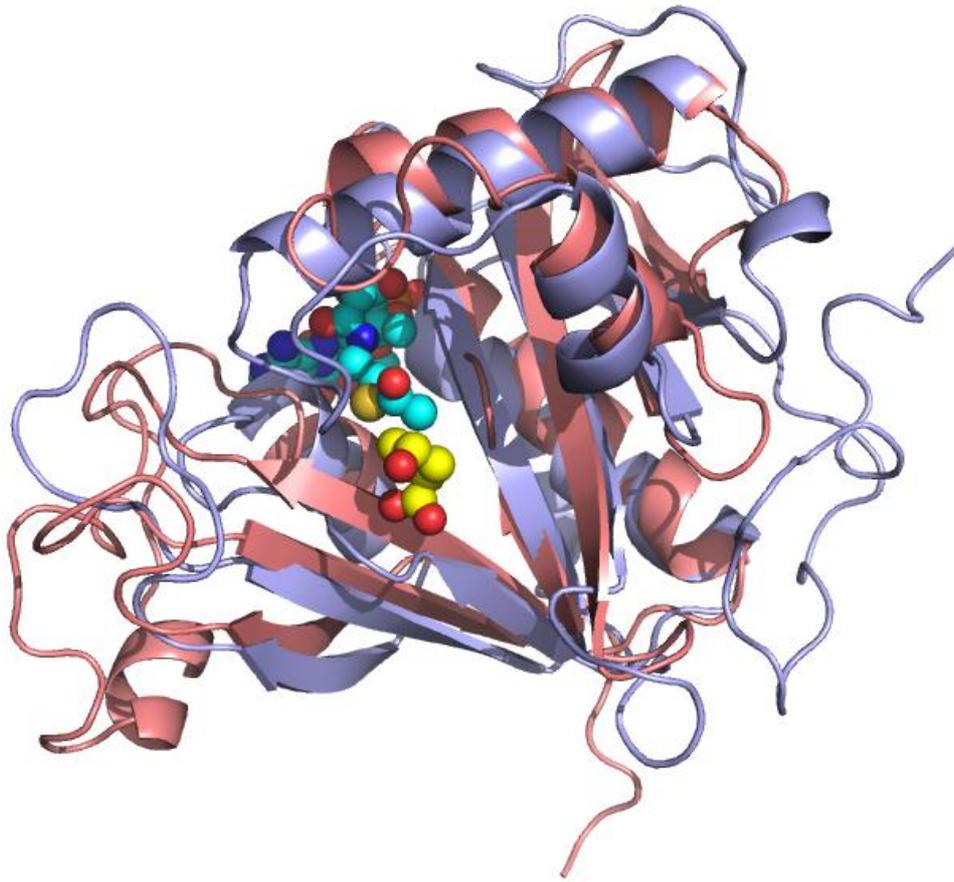


Fig. 11. Mpr1 と 1B87 の立体構造の重ね合わせ

Mpr1 (青) と 1B87 (赤) の立体構造を cartoon モデルで、Mpr1 に結合している CHOP と 1B87 構造に由来する AcCoA は sphere モデルで、それぞれ表示している。

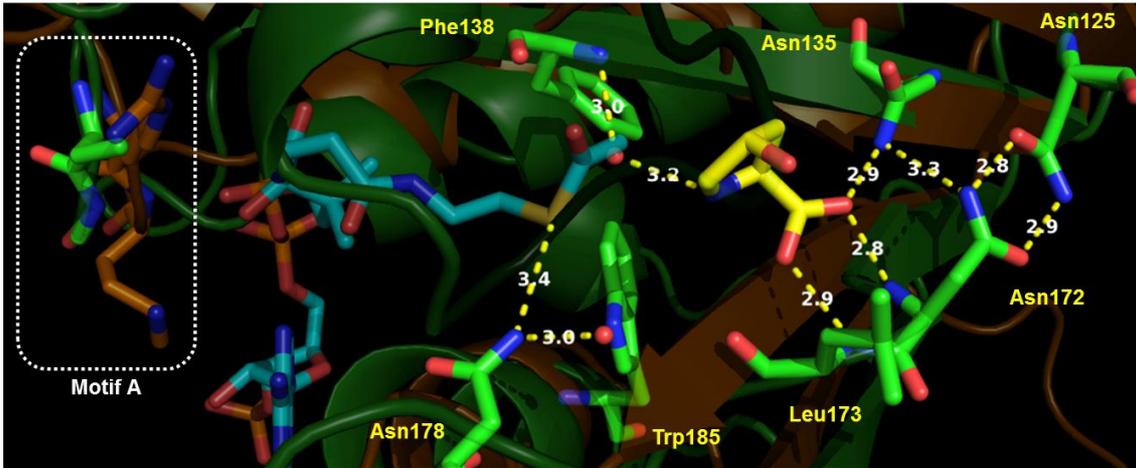


Fig. 12. Mpr1 と 1B87 の重ね合わせモデルにおける AcCoA 周辺部

Mpr1 構造と 1B87 構造を重ね合わせた図。Mpr1 (緑) と 1B87 (オレンジ) を cartoon モデルで、一部のアミノ酸残基と AcCoA、CHOP を stick モデルでそれぞれ表示した。保存性 motif A に相当するアミノ酸残基を点線で囲んで示している。

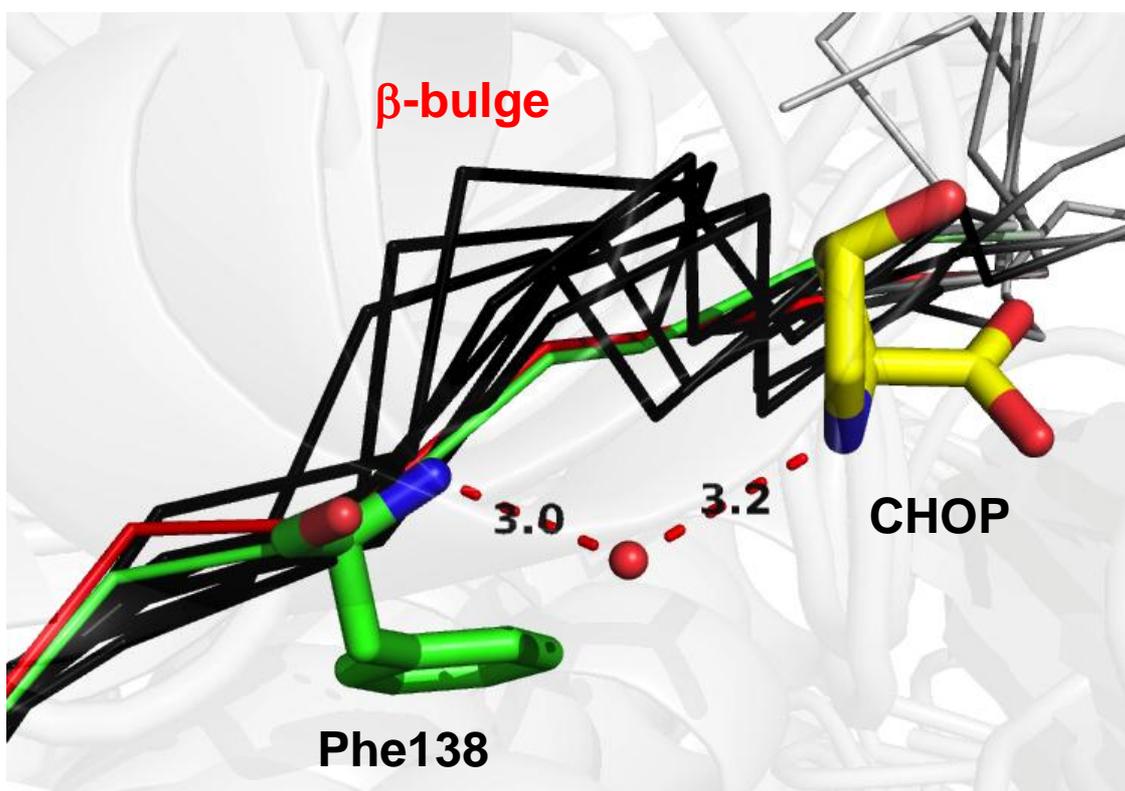


Fig. 13. 保存性 β -bulge 構造の有無

Ribosomal protein acetyltransferase (2CNS)、aminoglycoside *N*-acetyltransferase (1M4I、および 1B87)、serotonin *N*-acetyltransferase (1CJW)、glucosamine-6-phosphate *N*-acetyltransferase (1I1D)、histone acetyltransferase (1FY7)、mycothiol synthase (1OZP) および推定 acetyltransferase (4H89)の立体構造を Mpr1 の構造と重ね合わせ、Mpr1 の β 5に相当する領域を ribbon モデルで示した (丸括弧内は PDB ID)。Mpr1 の Phe138 と CHOP は stick モデルで示した。Mpr1 の β 5 を緑色で、4H89 の β 5 相当領域を赤色で、その他のタンパク質の β 5 相当領域を黒色で、また水分子を赤い球体でそれぞれ示した。他のタンパク質では明確な隆起構造 (β -bulge) が観察されるが、Mpr1 と 4H89 では β -bulge 構造を形成していなかった。

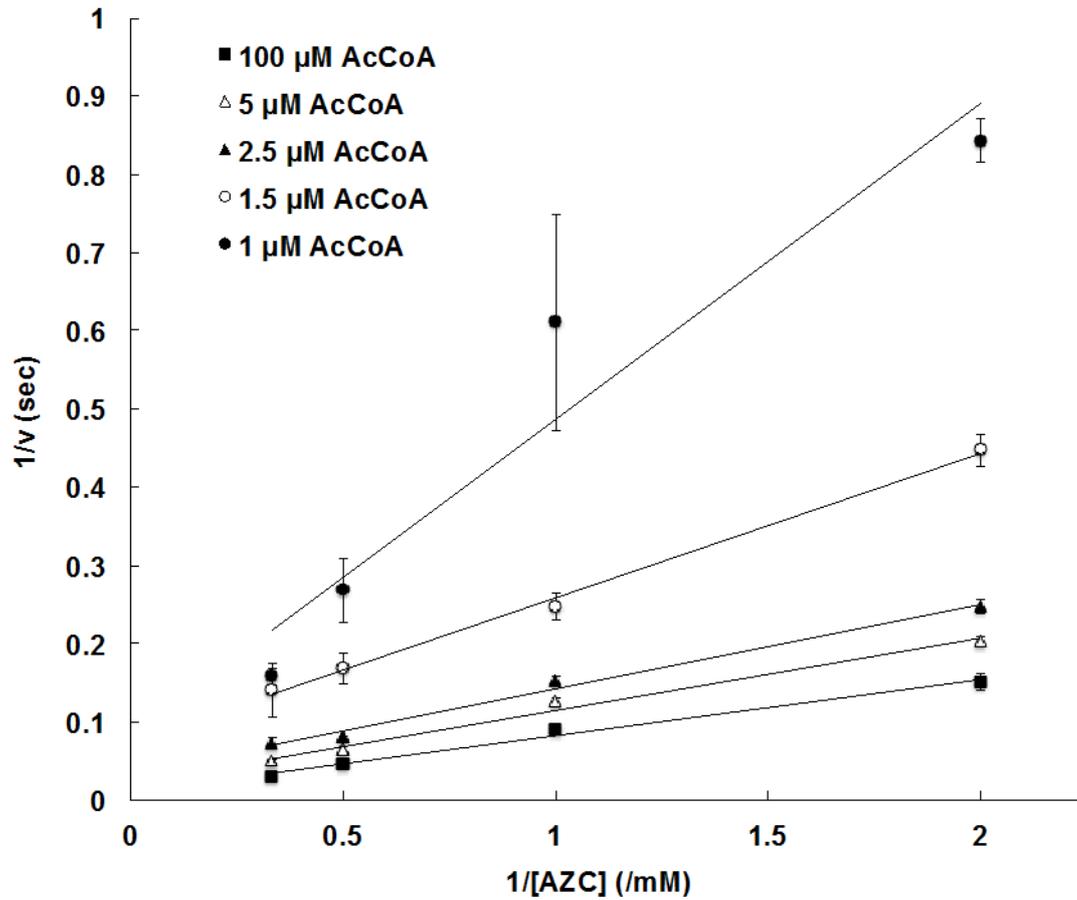


Fig. 14. Mpr1 による二基質反応の速度論的反応機構

各基質濃度で測定した初速度を用いて Lineweaver-Burk プロットを作製した。独立して3回の測定を行い、平均および標準偏差を算出した。

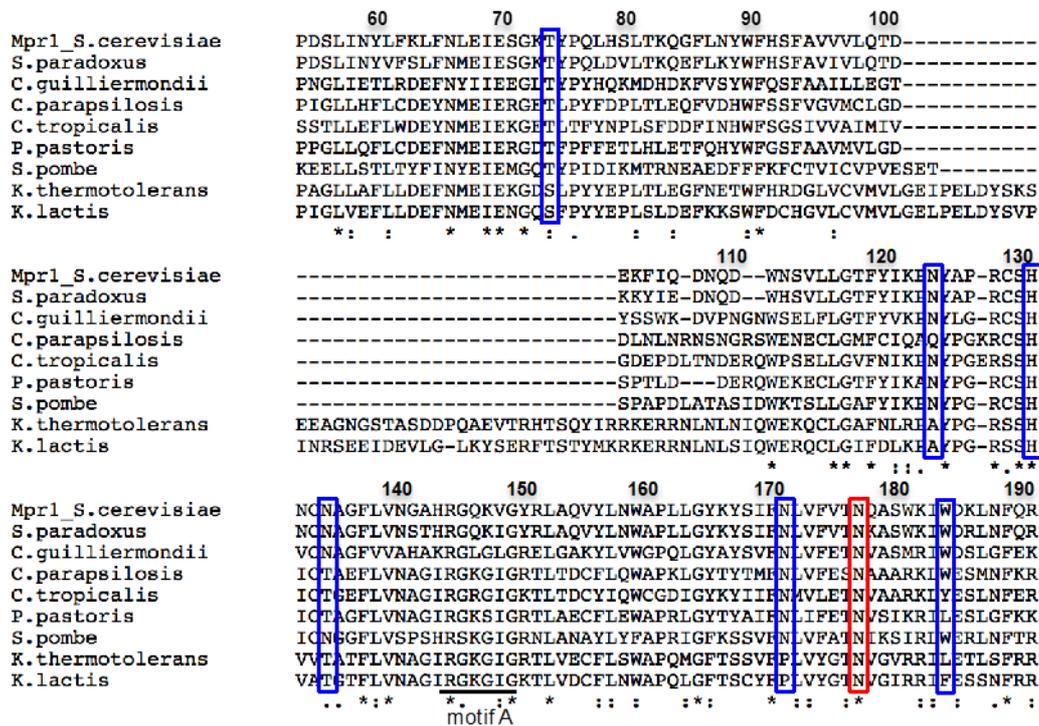


Fig. 15. Mpr1 ホモログ間でのマルチプルアライメント

Mpr1 ホモログ (*S. cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces thermotolerans* および *Kluyveromyces lactis* に由来する) のマルチプルアライメント。アスタリスク、コロン、ドットはそれぞれ保存性が完全に一致、高い、弱いことを示している。本研究でアミノ酸置換を導入した残基を青線で、Asn178 残基を赤線でそれぞれ囲んで示した。

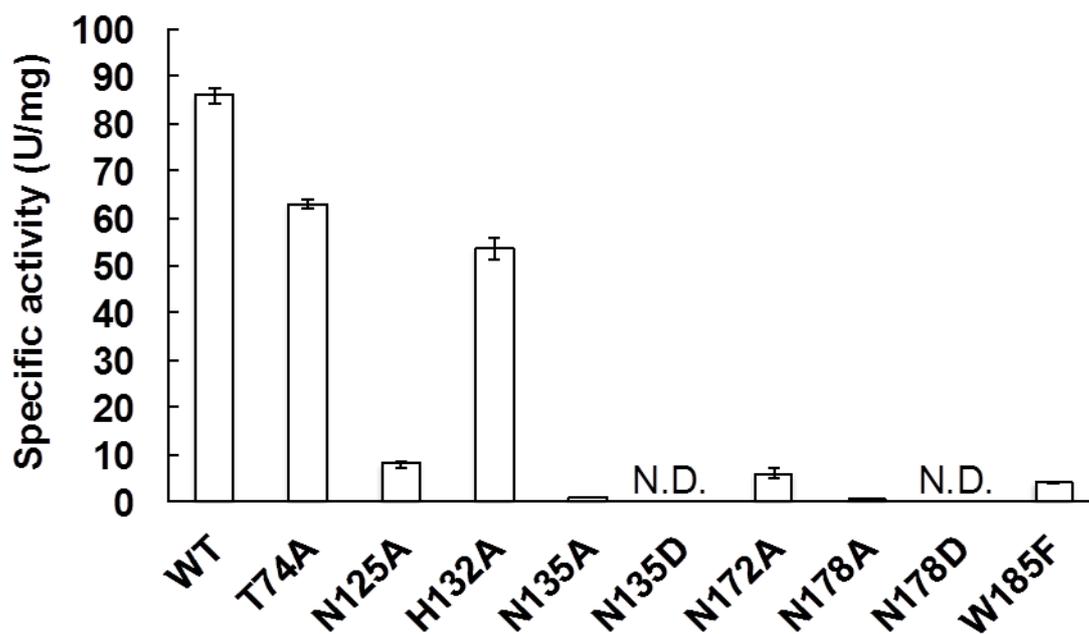


Fig. 16. WT および変異型 Mpr1 の比活性測定

WT および変異型 Mpr1 の比活性 (U/mg) を示す。独立して3試行の測定を行い、平均および標準偏差を算出した。N.D.は活性が検出限界 (0.003U/mg) 以下であることを示す。

Table 14. WT および変異型 Mpr1 の速度論的パラメータ

	k_{cat} (sec ⁻¹)	K_{mAZC} (mM)	K_{iAZC} (mM)	K_{mAcCoA} (μM)
WT	287.2 (26.7)	20.9 (2.4)	3.0 (0.3)	4.3 (0.6)
N135A	38.6 (10.6)	407.0 (91.2)		2.2 (0.5)
N135D			N.D.	
N178A	7.2 (1.2)	135.8 (24.6)		7.3 (0.2)
N178D			N.D.	
W185F	37.0 (3.4)	132.9 (10.6)		1.8 (0.2)

見かけの k_{cat} 、 K_{m} および K_{i} 値を示す。独立して 3 試行の解析を行い、平均および標準偏差を算出した。N.D. は活性が検出限界 (0.003U/mg) 以下であることを示す。

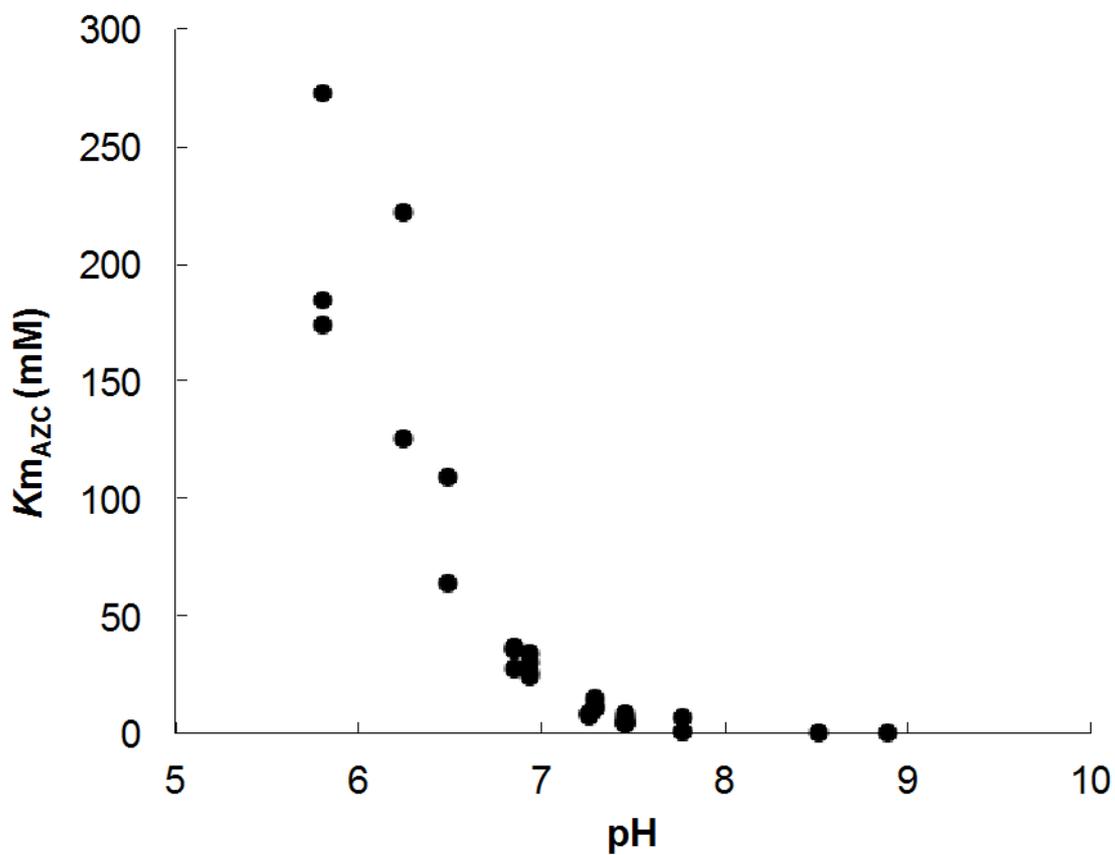


Fig. 17. AZC に対する K_m 値の pH 依存性

pH を変化させて Mpr1 の AZC に対する見かけの K_m 値を測定し、 K_m 値の pH 依存性を評価した。反応溶液の pH が酸性側にシフトするに従い、AZC に対する K_m 値は急激に上昇した。

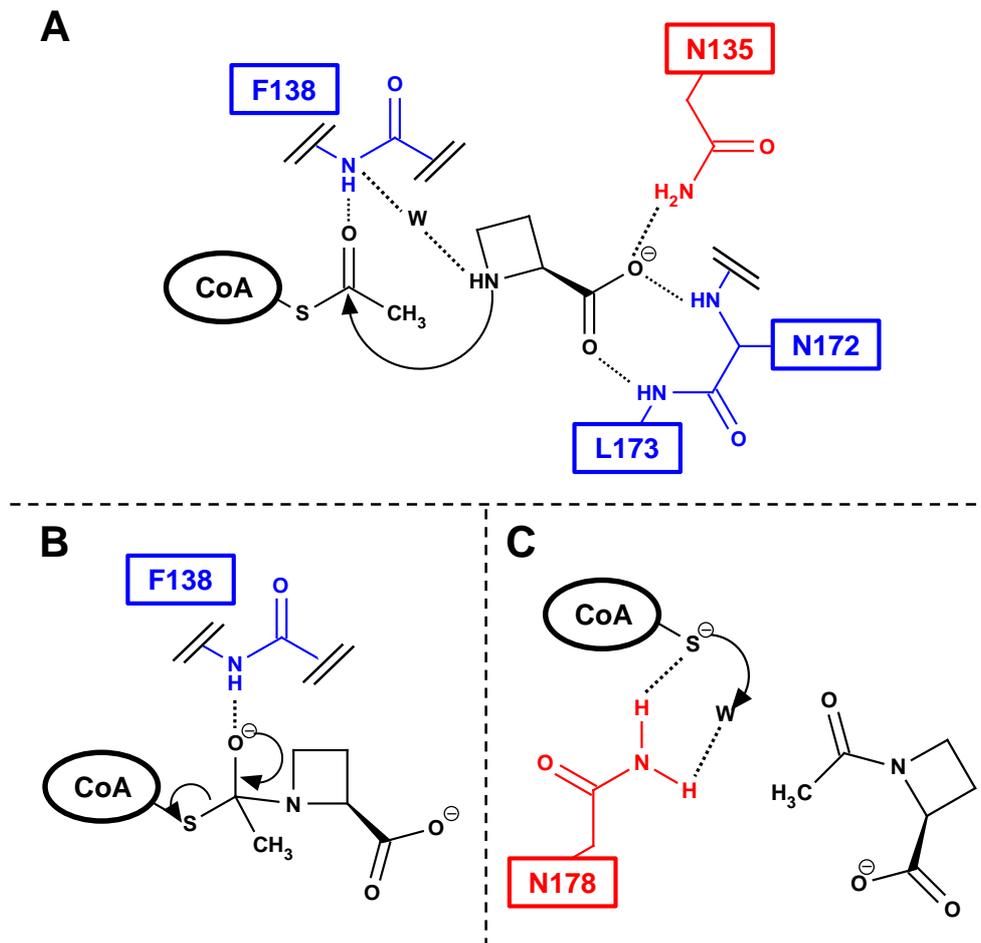


Fig. 18. Mpr1 の反応機構モデル

(A) AZC が Asn135 の側鎖アミド、Asn172 および Leu173 の主鎖アミドに認識され、Mpr1 に結合する。(B) 正四面中間体は Phe138 の主鎖アミド N-H 基により安定化される。(C) 中間体分解後に生じるチオレートアニオンは Asn178 の側鎖アミドにより安定化され、その後 Asn178 に結合した水によりプロトン化される。W は分子を、点線は相互作用を、矢印は電子移動を表す。赤のアミノ酸残基は側鎖で、青の残基は主鎖により、基質と相互作用する。

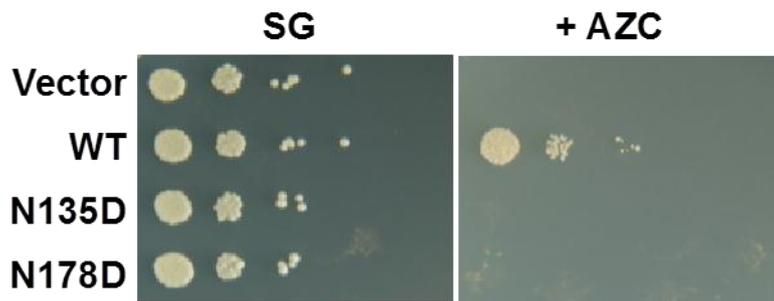


Fig. 19. 変異型 Mpr1 発現酵母の AZC 耐性の評価

S. cerevisiae LD1014ura3 株 (*mpr1/2* 破壊株) に空ベクター、もしくは WT、Asn135Asp および Asn178Asp-Mpr1 の発現プラスミドを導入し、galactose による発現誘導後、10 倍希釈系列を作り最少培地にスポットして AZC 耐性を評価した。写真は 30°C で 100 時間培養したもの。各スポットは約 10^5 -10 個の細胞 (左から右) を含む。独立して 3 回実験を行い、すべて同様の結果であった。

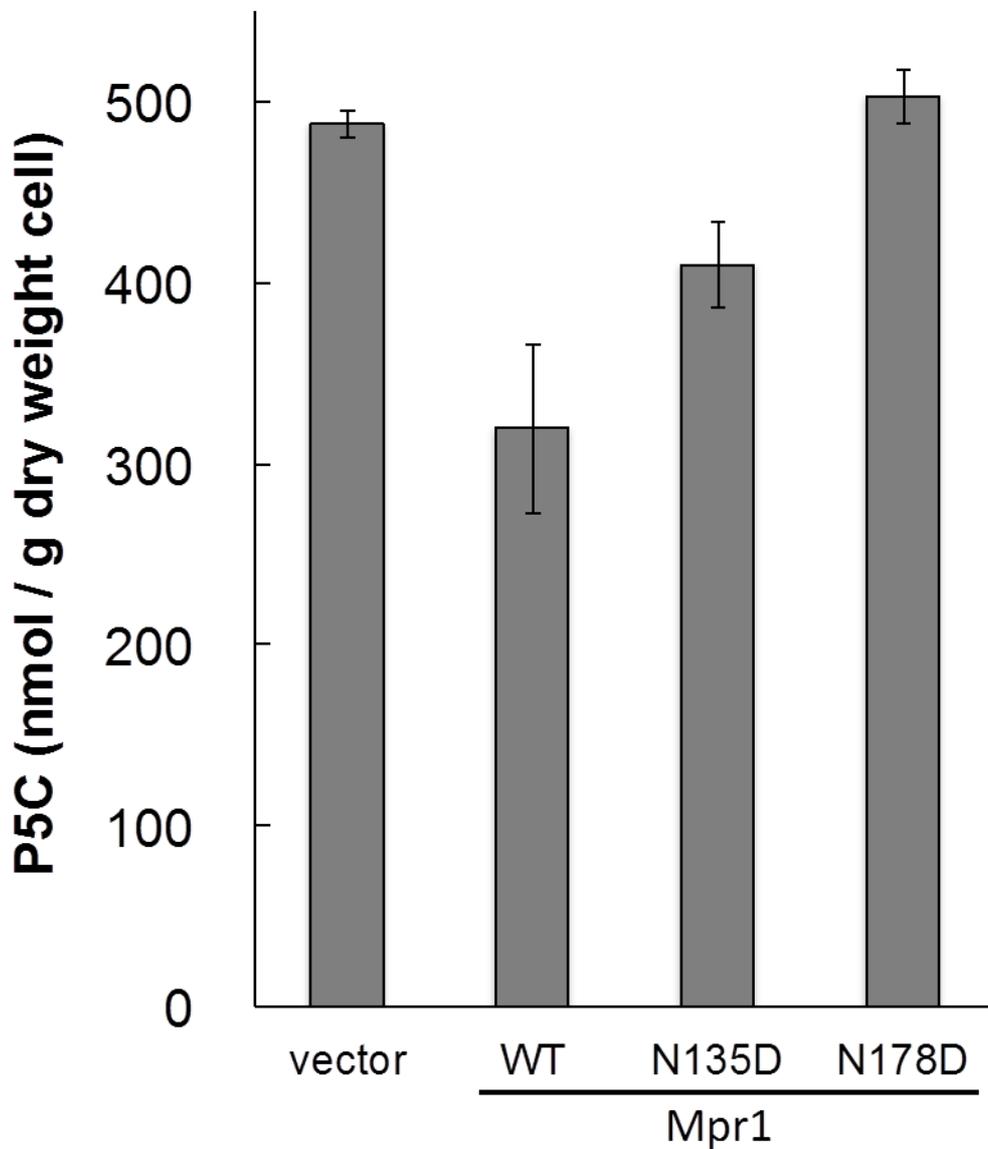


Fig. 20. 変異型 Mpr1 発現酵母の P5C 含量の測定

S. cerevisiae LD1014ura3 株 (*mpr1/2* 破壊株) に空ベクター、もしくは WT、Asn135Asp- および Asn178Asp-Mpr1 の発現プラスミドを導入し、galactose による発現誘導 (30°C、28 時間) 後、39°C で 5 時間の高温ストレス処理を行い、P5C を抽出・定量した。独立して 2 回の測定を行い、平均および標準偏差を算出した。

4. 考察

本研究では、酵母の新規 *N*-acetyltransferase である Mpr1 の結晶構造、基質認識機構および速度論的反応機構を明らかにし、反応機構モデルを提唱した。Mpr1 は既知の GNAT タンパク質とアミノ酸配列の相同性は低いが、立体構造は多くの GNAT タンパク質に共通するフォールディングを有していた。また、Mpr1 の基質特異性は既知の GNAT タンパク質のものとは大きく異なっている。これらのことは、Mpr1 が GNAT スーパーファミリーの新しいメンバーであることを示唆している。

ほとんどの GNAT タンパク質において、Mpr1 の Phe138 に相当する残基は疎水性な性質を有しており、その主鎖アミドの NH 基が正四面中間体の安定化により触媒活性に寄与していることが報告されている(51)。これは、Phe138 を含む領域の疎水性と機能が、Mpr1 を含む多くの GNAT タンパク質で保存されていることを示している。しかし、この領域で同じく GNAT タンパク質に共通の構造である β -bulge 構造(51)は、Mpr1 には見られなかった。既知の GNAT タンパク質の β -bulge に相当する領域は、Mpr1 では 5 番目の β -strand であるが、この周辺のアミノ酸残基 (Ala136, Phe138, Leu139, Val140) は Mpr1 ホモログ間で保存されており、また 5 番目の β -strand 形成に関わる残基数も保存されている。 β -bulge 構造は隆起部を形成する分、 β -strand よりも多くのアミノ酸残基により形成されるため (Fig. 13)、Mpr1 ホモログは β -bulge 構造を形成していないことが考えられる。このことから、 β -bulge を持たない構造は Mpr1 に特有かつ保存されていることが示唆された。

Mpr1 によるアセチル化反応において、Asn178 の側鎖アミド基が触媒残基として機能していることが示唆された。他の多くの GNAT タンパク質では、Tyr 残基のフェノール性水酸基が、正四面中間体分解後に生じるチオレートアニオンをプロトン化することで、触媒として機能することが報告されている(52-57)。また、活性中心に Tyr が存在しない GNAT タンパク質では、プロトン化により触媒活性に寄与する残基はなく、チオレートアニオンは水分子によりプロトン化されると結論されている(51)。しかし、今回の変異型酵素を用いた解析結果は、Asn178 が触媒活性に重要であることを示している。また、他の GNAT タンパク質では Mpr1 の Asn178 に相当する残基は保存されていないが (Fig. 21)、Mpr1 ホモログ間では Asn178 は完全に保存されている(Fig. 15)。このことから、Asn 残基による触媒反応は Mpr1 に特有であると考えられる。これら 2 つの特徴 (触媒反応に Asn178 が関与すること、および β -bulge 構造を有していないこと) は、既知の GNAT タンパク質では報告されておらず、Mpr1 の基質である環状二級ア

ミンの構造や求核性と何らかの関連があると考えられる。 β -bulge 構造を形成しないことは、基質結合に起因する立体障害を緩和するという点で有利だと考えられる。しかし、Asn 残基による触媒反応は、チオレートアニオンの直接のプロトン化が困難であることなどから、酵素反応には不利に働くと考えられる。通常、環状二級アミンは一級アミンよりも高い求核性を有する。Mpr1 の非効率的な触媒機構は、高い求核性を持つ基質を適切な速度で代謝するために必要である可能性がある。このような特徴は、Mpr1 が環状二級アミン *N*-acetyltransferase という新しい GNAT タンパク質の一群を形成することを示唆している。

WT-Mpr1 の速度論的パラメータに着目すると、AZC に対する K_m 値(21 mM) が基質阻害の阻害定数 K_i 値(3 mM) を大きく上回っている(Table 14)。このような特徴も、AZC が生理的な基質ではないことに起因するだけでなく、反応速度を適切に調節するために必要である可能性がある。Mpr1 による Pro/Arg 代謝の連結は NO の合成を導くが、過剰な NO 産生は ROS との反応による peroxynitrite の生成を引き起こし、細胞にとって有毒である(71)。Mpr1 の反応速度の制御は、NO の毒性から細胞を保護するために必要である可能性がある。

最近、細菌の *Kribbella flavida* 由来の推定 *N*-acetyltransferase の結晶構造 (PDB ID: 4H89) が決定された。4H89 は、アミノ酸配列(同一性: 29%)と立体構造(rmsd 値: 1.8 Å) のどちらにおいても Mpr1 と高い相同性を示した(Fig. 21)。また Mpr1 の活性残基である Asn135、Phe138、Asn178、および基質のカルボキシル基を認識する小ループ構造が 4H89 においても保存されていた(Fig. 22)。これらのことは、4H89 も Mpr1 と同様の機構によって反応を触媒すること、また 4H89 の基質は同定されていないが、4H89 が Mpr1 と同様の基質特異性を有することを示唆している。これは、Mpr1 が進化的に細菌由来の *N*-acetyltransferase に近いということだけでなく、Mpr1 依存的なストレス耐性機構が酵母以外の微生物にも存在する可能性を提示している。

酵母を用いた実験から、Asn135 と Asn178 が AZC 耐性だけでなく P5C/GSA 代謝にも重要であることを示した。興味深いことに、Asn135Asp-Mpr1 と Asn178Asp-Mpr1 は *in vitro* の解析ではともに AZC *N*-acetyltransferase 活性を示さなかったにもかかわらず、Asn135Asp-Mpr1 発現株は Asn178Asp-Mpr1 発現株よりも低い P5C 含量を示した (Fig. 20)。この違いは、2つの基質(AZC と P5C/GSA) に対する Asn135 の機能が異なることを示唆している。Asn135 は基質のカルボキシル基と結合していると考えられるので、基質のその他の部分(アミノ基や水酸基)の認識に他のアミノ酸残基や主鎖部分が寄与しており、その違いが Asn135 の寄与の大きさの違いに繋がっていると考えられる。

以前、当研究室では高い AZC 耐性を示す変異型 Mpr1 (Lys63Arg および

Phe65Leu) を取得した (72)。興味深いことに、Lys63Arg-Mpr1 発現酵母は WT-Mpr1 発現株よりも高い酸化ストレス耐性を示した。また、Phe65Leu-Mpr1 は WT-Mpr1 に比べて熱安定性が大きく向上していた。結晶構造中、Phe65 は疎水的な領域に埋没していた(Fig. 23)。このことから、Leu への置換が疎水的領域でのパッキングを改善したことにより、Phe65Leu-Mpr1 の安定性が向上したと考えられる。しかし、Lys63 はタンパク質表面に存在しており、また Lys63 周辺には活性部位などの重要な領域が存在しないこと(Fig. 23)から、Mpr1 の結晶構造から Lys63Arg-Mpr1 の表現型を説明することは現段階では困難である。

Mpr1 による抗酸化機構は、P5C/GSA をアセチル化することによって発現する。しかし、先行研究の *in vitro* の実験により示した P5C/GSA に対する見かけの K_m 値が 7 mM (38)だったのに対し、今回の測定結果から見積もられる細胞内 P5C/GSA モル濃度は 50 μ M 程度である(Fig. 20)。このことは Mpr1 だけでは生理機能を果たすのに十分でなく、他のタンパク質や低分子物質など何らかの因子が必要であることを示唆している。実際、他の GNAT タンパク質でも、タンパク質パートナーや低分子補因子が機能発現に必要である例が報告されている。例えば、酵母 histone acetyltransferase Rtt109 は histone H3 の Lys56 の ϵ -アミノ基をアセチル化するために、histone chaperone Aft1 および Vps75 との相互作用が必要である(73, 74)。また、*Salmonella* 属細菌の aminoalkylphosphonic acid N-acetyltransferase PhnO は酵素活性を発揮するのに 2 価金属イオンを要求する(75)。以上のことから、Mpr1 がその生理機能を果たすためには、タンパク質や低分子化合物など何らかの因子が必要であると考えられる。

Mpr1 の構造や反応機構を理解することは、応用研究の面でも重要である。Mpr1 は様々な生物種に AZC 耐性を付与することから、既に *MPR1* 遺伝子と AZC を組み合わせた選択マーカーが、酵母や植物の形質転換用に開発されている(76-78)。また最近当研究室では、変異型 Mpr1 発現酵母が WT-Mpr1 発現酵母に比べて、より高い酸化ストレス (エタノール、冷凍解凍、乾燥) 耐性を示すことを明らかにした (79, 80)。活性や安定性を向上させた変異型 Mpr1 の構築は、より効率的なセレクションシステムやストレス耐性の高い産業酵母の開発に貢献できる。さらに、Mpr1 ホモログは酵母やカビなどの真菌類にしか存在しないため、Mpr1 活性を阻害する物質の探索は新しいアプローチの抗真菌薬の開発につながる可能性がある。

阻害剤として見出した pGlu は、生体内ではグルタチオン(GSH)の分解産物として生成する(81)。GSH は広く生体内の酸化還元反応に関わっており、最も重要な非酵素的抗酸化機構の 1 つを担っている。一方、Mpr1 を介した抗酸化機構において、NO がシグナル分子として生成するが、過剰の NO はスーパーオキシ

ドアニオンと反応して非常に毒性の強い peroxynitrite に変換されるため(71)、細胞内 NO 濃度の調節は生体にとって極めて重要である。pGlu 濃度の調節やストレスとの関連性は詳しく解析されていないが、pGlu による Mpr1 の阻害は Pro 代謝、Arg 代謝、GSH 代謝を連結した統合的な抗酸化系が存在する可能性を示している(Fig. 24)。また、pGlu は動物細胞内および生体内で ROS の発生や生体高分子の酸化を引き起こすことが報告されている(82, 83)。また、GSH 代謝異常の患者では pGlu が蓄積されるが、pGlu が神経毒性や脳のエネルギー代謝異常を引き起こすという報告もある(84, 85)。Mpr1 の一次構造ホモログは真菌類にしか存在しないが、立体構造の類似したタンパク質は存在する可能性があり、そのようなタンパク質は Mpr1 と同様の機能を持つ可能性が高い。

Salmonella enterica 由来の aminoglycoside N-acetyltransferase は β -strand を交換した二量体を形成する。 β -strans 交換は histone acetyltransferase 四量体では観察されていたが、他の aminoglycoside N-acetyltransferase では報告されていなかった(86)。興味深いことに、この *Salmonella* aminoglycoside N-acetyltransferase は、自身の α -N アセチル化や histone のアセチル化を触媒することが報告されているが(86)、histone acetyltransferase との配列相同性は低い。これは、配列が大きく異なっても立体構造が類似している場合、機能が類似するということを示している。従って、ヒトをはじめとする哺乳類に Mpr1 の立体構造・機能ホモログが存在する可能性が十分あると考えられる。そのため、酵母をモデルとして Mpr1 と pGlu を介した ROS 制御機構を詳しく理解することは、将来的に GSH 代謝異常やそれに伴う pGlu 蓄積症の病態生理の理解につながる可能性がある。一方、P5C/GSA の合成酵素である proline oxidase は、ガン細胞のアポトーシスやガン発生に関連することが報告されており(87)、ガン研究への新しいアプローチにつながる可能性もある。

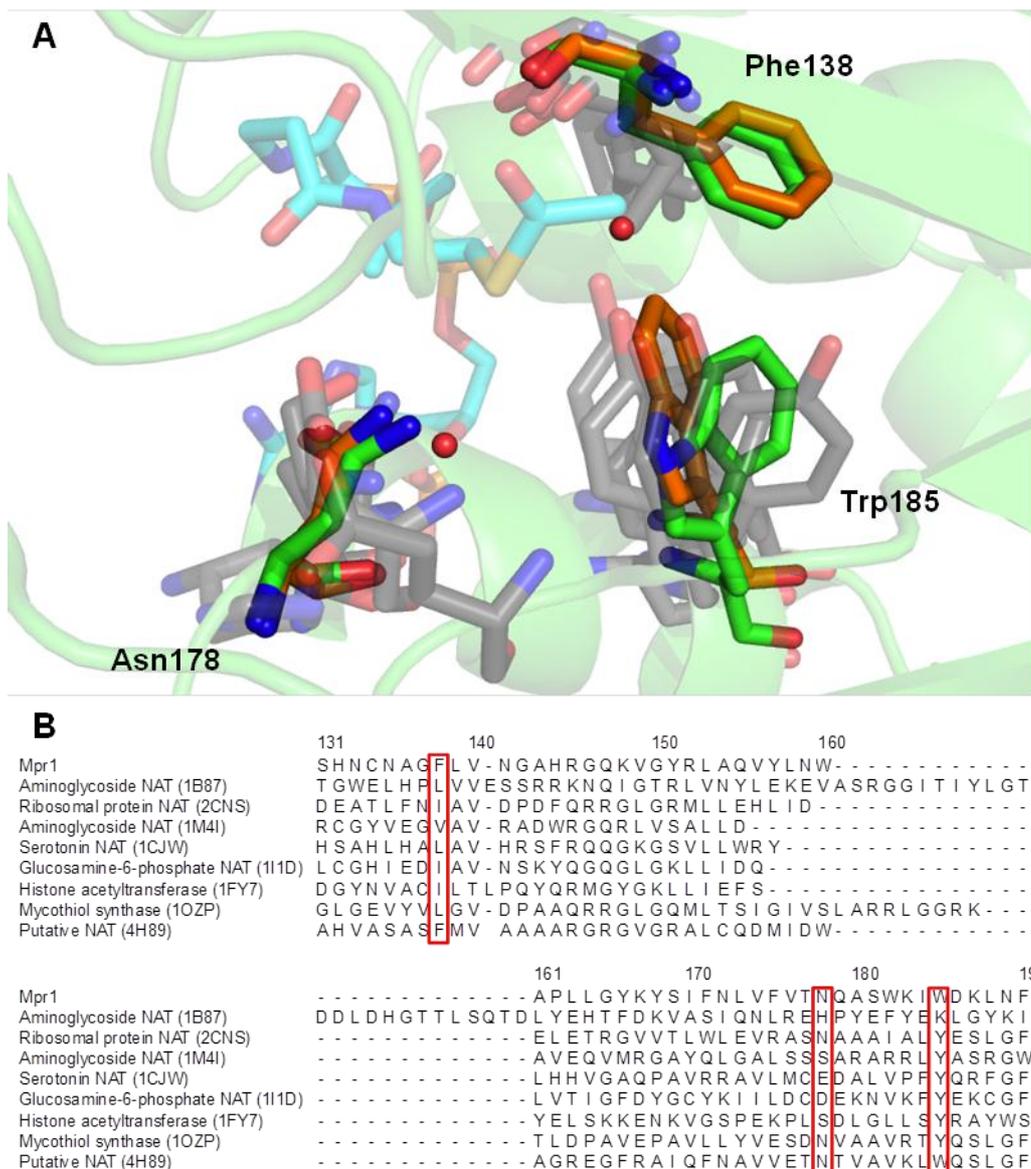


Fig. 21. Mpr1 と既知の GNAT タンパク質との構造、および配列比較

(A) Mpr1 (緑) の構造と他の GNAT タンパク質構造との比較。 *Kribbella flavida* の推定 *N*-acetyltransferase (PDB ID: 4H89)をオレンジで、他のタンパク質を灰色でそれぞれ示した。Mpr1 と 4H89 の構造を cartoon モデルで、Mpr1 の Phe138、Asn178 および Trp185 に相当する残基と 1B87 構造に属する AcCoA を stick モデルでそれぞれ示した。(B) Mpr1 と他の GNAT タンパク質との構造の重ね合わせに基づくマルチプルアライメント。Mpr1 の Phe138, Asn178, Trp185 に相当するアミノ酸残基を赤枠で示した。Mpr1, 4H89 以外のタンパク質: aminoglycoside 6'-*N*-acetyltransferase (1B87), ribosomal S18 *N*- α -protein acetyltransferase RimI (PDB ID: 2CNS), aminoglycoside 2'-*N*-acetyltransferase (1M4I), serotonin *N*-acetyltransferase (1CJW), glucosamine-6-phosphate *N*-acetyltransferase (1I1D), histone acetyltransferase (1FY7), mycothiol synthase (1OZP) (丸括弧内は PDB ID)。

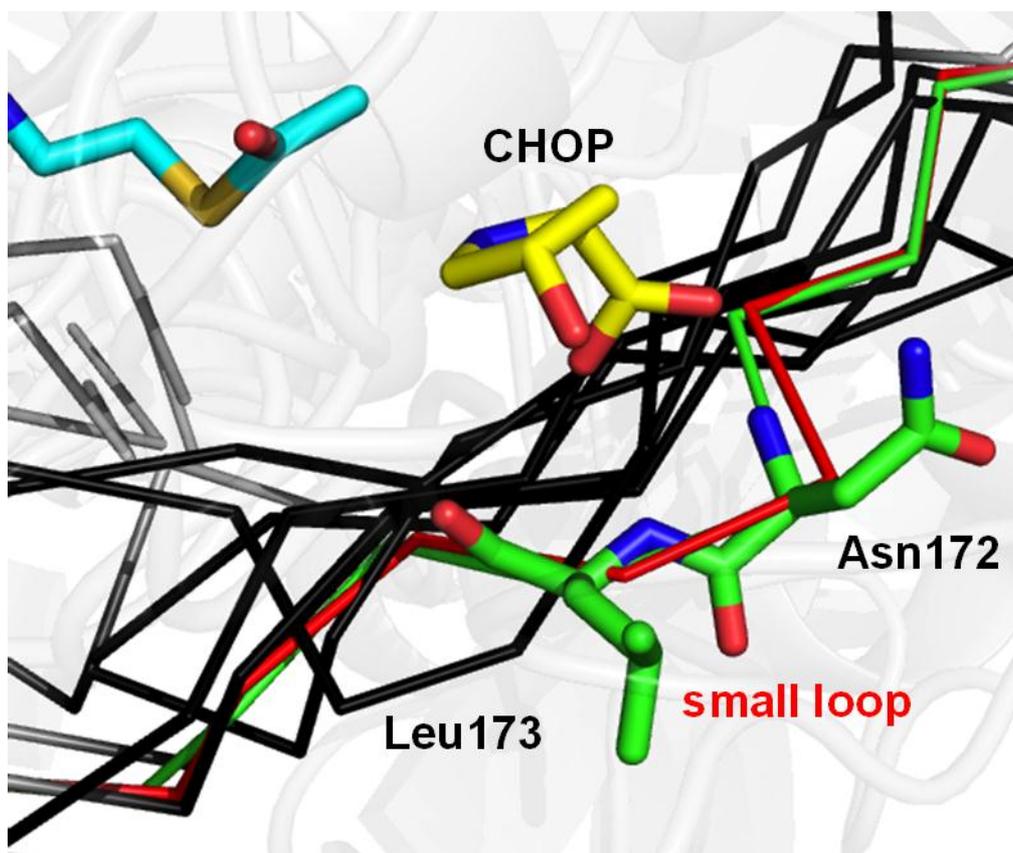


Fig. 22. Mpr1 における基質認識のための小ループ構造

Ribosomal protein acetyltransferase (2CNS)、aminoglycoside *N*-acetyltransferase (1M4I、および 1B87)、serotonin *N*-acetyltransferase (1CJW)、glucosamine-6-phosphate *N*-acetyltransferase (1I1D)、histone acetyltransferase (1FY7)、mycothiol synthase (1OZP) および推定 acetyltransferase (4H89)の立体構造を Mpr1 の構造と重ね合わせ、ribbon モデルで示した(丸括弧内は PDB ID)。Mpr1 の Asn172 と Leu173、CHOP、1B87 構造中の AcCoA は stick モデルで示し、Mpr1 を緑色で、4H89 を赤色で、その他のタンパク質を黒色でそれぞれ示した。Mpr1 と 4H89 では CHOP のカルボキシル基を認識するような小ループ構造を形成しているが、他のタンパク質では類似の構造は観察されなかった。

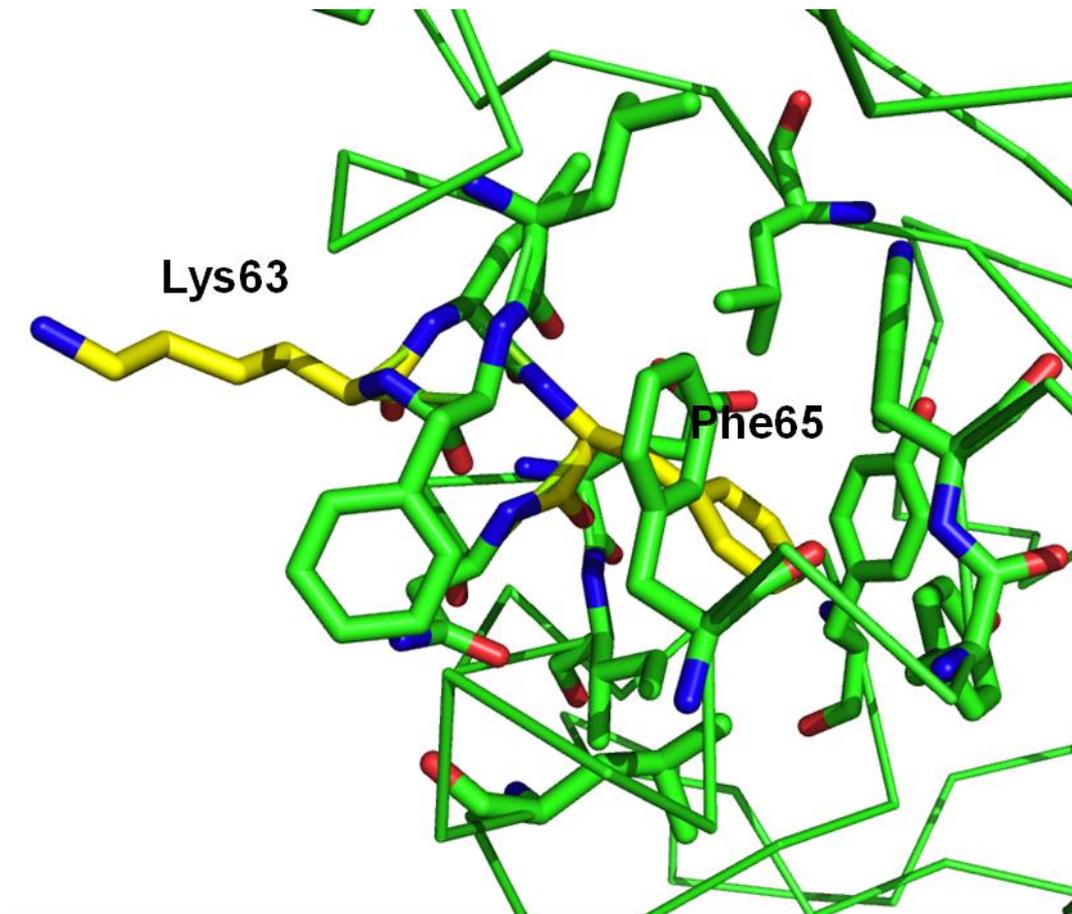


Fig. 23. Mpr1 構造中における Lys63 および Phe65 残基

Mpr1 (緑) を ribbon モデルで表示し、Lys63, Phe65 および Phe65 の周辺残基を stick モデルで示した。Lys63 と Phe65 は黄色で示した。Phe65 周辺には Phe、Try、Trp、Leu などの疎水性残基が多く存在し、Phe65 は疎水的環境に置かれている。一方、Lys63 はタンパク質表面に露出し、相互作用が可能なアミノ酸残基は Lys63 周辺には見られなかった。

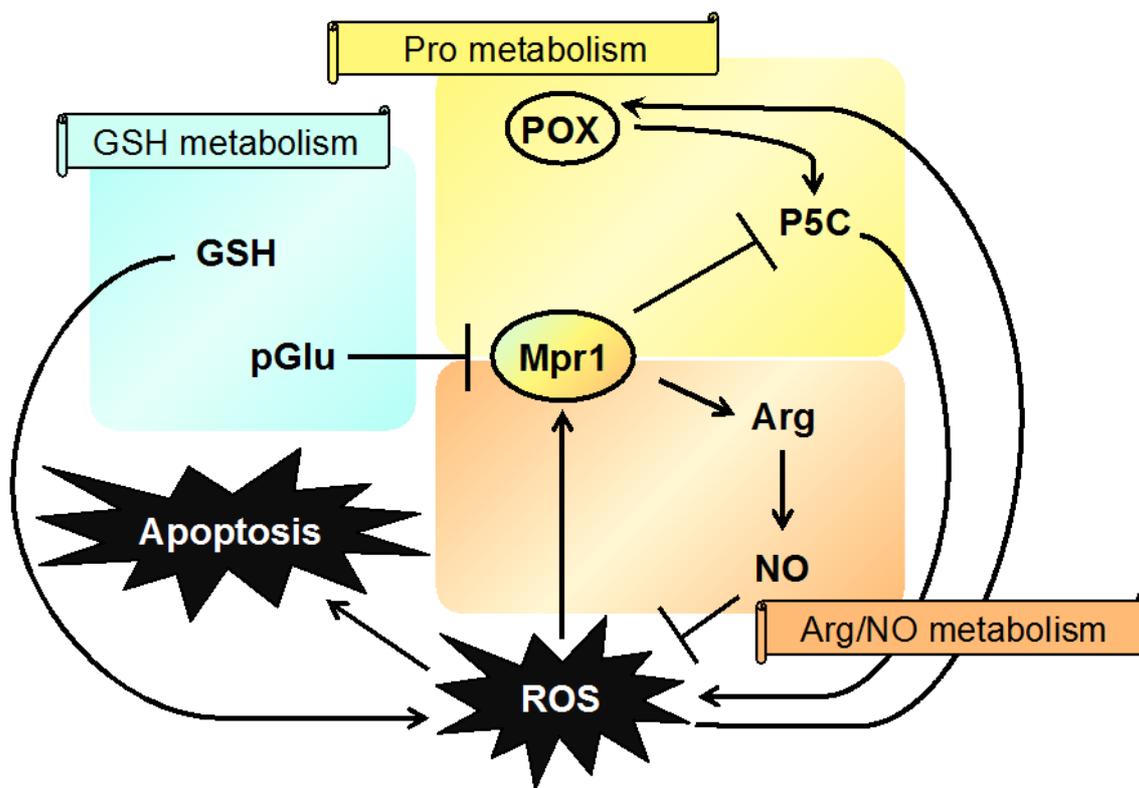


Fig. 24. Pro・Arg/NO・GSH代謝を介した統合的抗酸化機構モデル

Mpr1はPro代謝とArg/NO代謝を連結する抗酸化酵素である。また、GSH代謝産物であるpGluによるMpr1の阻害を介して、Pro代謝・Arg/NO代謝・GSH代謝が統合的に制御されている可能性がある。POX: proline oxidase。

5. 総括

- 酵母の新規抗酸化酵素である *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の立体構造を、X線結晶構造解析により決定した。
- Mpr1-CHOP 複合体構造から、Asn135 の側鎖アミドと Asn172 と Leu173 の主鎖アミドが基質のカルボキシル基と結合し、Tyr75 が環状二級アミンの認識に寄与していることを明らかにした。また、既知の GNAT タンパク質に保存されている β -bulge 構造の欠如が、基質である環状二級アミンの認識に有利であることが示唆された。
- 変異型酵素の解析、速度論的パラメータの pH 依存性から、Mpr1 は基質のカルボキシルアニオンを認識・結合していることを明らかにした。
- AZC をモデル基質とした速度論的解析により Mpr1 の二基質反応が sequential 機構で進行することを明らかにした。
- 結晶構造と変異型酵素を用いた解析から、触媒反応に関わる残基として Asn178 を同定し、触媒反応機構モデルを構築した。
- 変異型酵素を発現する酵母の解析から、同定した活性残基が生理機能にも重要であることを明らかにした。
- 立体構造上 β -bulge を形成しないこと、また Asn 残基依存的な触媒反応機構から、Mpr1 は新しい GNAT タンパク質であることが示唆された。

6. 謝辞

本研究の遂行ならびに論文の作製にあたり、終始熱心にご指導いただいた奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 ストレス微生物科学研究室の高木博史教授に、厚くお礼申し上げます。また、吉田信行助教、大津巖生助教、森ヶ崎進博士、笹野佑博士をはじめとする「ストレス微生物科学研究室」の皆様にも深くお礼申し上げます。

さらに、同研究科 構造生物学研究室の箱嶋敏雄教授、平野良憲助教、また福井県立大学 生物資源学部の日弁隆雄教授、伊藤貴文講師には、結晶構造解析におきまして丁寧かつ熱心に指導いただきました。心よりお礼申し上げます。

平成 25 年 6 月 10 日

7. 参考文献

1. Lu T. and Finkel T. (2008) Free radicals and senescence. *Exp. Cell Res.* 314: 1918-1922.
2. Grompone. G. *et al.* (2012) Anti-Inflammatory Lactobacillus rhamnosus CNCM I-3690 Strain Protects against Oxidative Stress and Increases Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.* 7: e52493.
3. Lee SH., Lee SK., Paik D. and Min KJ. (2012) Overexpression of fatty-acid- β -oxidation-related genes extends the lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Oxid. Med. Cell. Longevity* 2012: 854502.
4. Brieger K., Schiavone S., Miller FJ. Jr. and Krause KH. (2012) Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med. Wkly.* 142: w13659.
5. Waris G. and Ahsan H. (2006) Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J. Carcinog.* 5: 14.
6. Levine AJ. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331.
7. Coso S. *et al.* (2012) NADPH oxidases as regulators of tumor angiogenesis: current and emerging concepts. *Antioxid. Redox Signaling* 16: 1229-1247.
8. Sorce S. and Krause KH. (2009) NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid. Redox Signaling* 11: 2481-2504.
9. Block ML., Zecca L. and Hong JS. (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 57-69.
10. Papaharalambus CA. and Griendling KK. (2007) Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc. Med.* 17: 48-54.
11. Kaneto H., Katakami N., Matsuhisa M. and Matsuoka TA. (2010) Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators Inflammation* 2010: 453892.
12. Fatehi-Hassanabad Z., Chan CB. and Furman BL. (2010) Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 636: 8-17.
13. Grisham MB. (2004) Reactive oxygen species in immune responses. *Free Radical Biol. Med.* 36: 1479-1480.
14. Corvilain B., van Sande J., Laurent E. and Dumont JE. (1991) The H₂O₂-generating system modulates protein iodination and the activity of the pentose phosphate pathway in dog thyroid. *Endocrinology* 128: 779-785.

15. Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S. and Mittler R. (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell Environ.* 33: 453-467.
16. Scott B. and Eaton CJ. (2008) Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Curr. Opin. Microbiol.* 11: 488-493.
17. Dwyer DJ., Kohanski MA. and Collins JJ. (2009) Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 12: 482-489.
18. Costa V. and Moradas-Ferreira P. (2001) Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med.* 22: 217-246.
19. Witt SN. and Flower TR. (2006) alpha-Synuclein, oxidative stress and apoptosis from the perspective of a yeast model of Parkinson's disease. *FEMS Yeast Res.* 6: 1107-1116.
20. Pereira C., Bessa C., Soares J., Leão M. and Saraiva L. (2012) Contribution of yeast models to neurodegeneration research. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012: 941232.
21. Shima J. and Takagi H. (2009) Stress-tolerance of baker's-yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 53: 155-164.
22. Ding J. *et al.* (2009) Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 253-263.
23. Davidson J. F., Whyte B., Bissinger P. H. and Schiestl R. H. (1996) Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 5116-5121.
24. Moraitis C. and Curran B. P. (2004) Reactive oxygen species may influence the heat shock response and stress tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21: 313-323.
25. Moraitis C. and Curran B. P. (2007) Can the different heat shock response thresholds found in fermenting and respiring yeast cells be attributed to their differential redox states? *Yeast* 24: 653-666.
26. Lushchak V. I. (2010) Oxidative stress in yeast. *Biochemistry (Mosc)* 75: 281-296.
27. Herrero E., Ros J., Belli G. and Cabiscol E. (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1780: 1217-1235.
28. Jamieson D. J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1511-1527.
29. Takagi H., Shichiri M., Takemura M., Mohri M. and Nakamori S. (2000)

- Saccharomyces cerevisiae* □1278b has novel genes of the *N*-acetyltransferase gene superfamily required for L-proline analogue resistance. *J. Bacteriol.* 182: 4249-4256.
30. Shichiri M., Hoshikawa C., Nakamori S. and Takagi H. (2001) A novel acetyltransferase found in *Saccharomyces cerevisiae* □1278b that detoxifies a proline analogue, azetidine-2-carboxylic acid. *J. Biol. Chem.* 276: 41998-42002.
 31. Kimura Y., Nakamori S. and Takagi H. (2002) Polymorphism of the *MPR1* gene required for toxic proline analogue resistance in the *Saccharomyces cerevisiae* complex species. *Yeast* 19: 1437-1445.
 32. Nomura M., Nakamori S. and Takagi H. (2003) Characterization of novel acetyltransferases found in budding and fission yeasts that detoxify a proline analogue, azetidine-2-carboxylic acid. *J. Biochem.* 133: 67-74.
 33. Wada M. et al. (2008) Distribution of L-azetidine-2-carboxylate *N*-acetyltransferase in yeast. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 72: 582-586.
 34. Bessonov K., Bamm VV. and Harauz G. (2010) Misincorporation of the proline homologue Aze (azetidine-2-carboxylic acid) into recombinant myelin basic protein. *Phytochemistry* 71: 502-507.
 35. Fowden L. (1956) Azetidine-2-carboxylic acid: a new cyclic imino acid occurring in plants. *Biochem. J.* 64: 323-332.
 36. Fowden L. and Bryant M. (1959) Nitrogenous compounds and nitrogen metabolism in the Liliaceae. 5. The metabolism of azetidine-2-carboxylic acid. *Biochem. J.* 71: 210-217.
 37. Troxler RF. and Brown AS. (1974) Metabolism of L-azetidine-2-carboxylic acid in the alga *Cyanidium caldarium*. *Biochim. Biophys. Acta* 366: 341-349.
 38. Nomura M. and Takagi H. (2004) Role of the yeast acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 12616-12621.
 39. Du X. and Takagi H. (2005) *N*-acetyltransferase Mpr1 confers freeze tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *J. Bacteriol.* 138: 391-397.
 40. Du X. and Takagi H. (2007) *N*-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 1343-1351.
 41. Nishimura A., Kotani T., Sasano Y. and Takagi H. (2010) An antioxidative mechanism mediated by the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1: oxidative

- stress-induced arginine synthesis and its physiological role. *FEMS Yeast Res.* 10: 687-698.
42. Nishimura A., Kawahara N. and Takagi H. (2013) The flavoprotein Tah18-dependent NO synthesis confers high-temperature stress tolerance on yeast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430: 137-143.
 43. Pauwels K., Abadjieva A., Hilven P., Stankiewicz A. and Crabeel M. (2003) The *N*-acetylglutamate synthase/*N*-acetylglutamate kinase metabolon of *Saccharomyces cerevisiae* allows co-ordinated feedback regulation of the first two steps in arginine biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 270: 1014-1024.
 44. Nishimura A., Nasuno R. and Takagi H. (2012) The proline metabolism intermediate Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate directly inhibits the mitochondrial respiration in budding yeast. *FEBS Lett.* 586(16): 2411-2416.
 45. Llano-Sotelo B., Azucena EF Jr., Kotra LP., Mobashery S. and Chow CS. (2002) Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chem. Biol.* 9: 455-463.
 46. Zheng W. and Cole PA. (2002) Serotonin N-acetyltransferase: mechanism and inhibition. *Curr. Med. Chem.* 9: 1187-1199.
 47. Mio T., Yamada-Okabe T., Arisawa M. and Yamada-Okabe H. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* GNA1, an essential gene encoding a novel acetyltransferase involved in UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J. Biol. Chem.* 274: 424-429.
 48. Olsen LR. and Roderick SL. (2001) Structure of the *Escherichia coli* GlmU pyrophosphorylase and acetyltransferase active sites. *Biochemistry* 40: 1913-1921.
 49. Grant PA. and Berger SL. (1999) Histone acetyltransferase complexes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10: 169-177.
 50. Newton GL., Buchmeier N. and Fahey RC. (2008) Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72: 471-494.
 51. Vetting MW. *et al.* (2005) Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* 433: 212-226.
 52. Vetting MW., Bareich DC., Yu M. and Blanchard JS. (2008) Crystal structure of RimI from *Salmonella typhimurium* LT2, the GNAT responsible for N(alpha)-acetylation of ribosomal protein S18. *Protein Sci.* 17: 1781-1790.
 53. Vetting MW., Hegde SS., Javid-Majd F., Blanchard JS. and Roderick SL. (2002) Aminoglycoside 2'-*N*-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* in

- complex with coenzyme A and aminoglycoside substrates. *Nat. Struct. Biol.* 9: 653-658.
54. Hickman AB., Namboodiri MA., Klein DC. and Dyda F. (1999) The structural basis of ordered substrate binding by serotonin *N*-acetyltransferase: enzyme complex at 1.8 Å resolution with a bisubstrate analog. *Cell* 97: 361-369.
 55. Peneff C., Mengin-Lecreulx D. and Bourne Y. (2001) The crystal structures of Apo and complexed *Saccharomyces cerevisiae* GNA1 shed light on the catalytic mechanism of an amino-sugar *N*-acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 276: 16328-16334.
 56. Dutnall RN., Tafrov ST., Sternglanz R. and Ramakrishnan V. (1998) Structure of the histone acetyltransferase Hat1: a paradigm for the GCN5-related *N*-acetyltransferase superfamily. *Cell* 94: 427-438.
 57. Vetting MW., Roderick SL., Yu M. and Blanchard JS. (2003) Crystal structure of mycothiol synthase (Rv0819) from *Mycobacterium tuberculosis* shows structural homology to the GNAT family of *N*-acetyltransferases. *Protein Sci.* 12: 1954-1959.
 58. Hoa BT. *et al.* (2012) Production of *N*-acetyl *cis*-4-hydroxy-L-proline by the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1. *J. Biosci. Bioeng.* 114: 160-165.
 59. Otwinowski Z. and Minor W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276: 307-326.
 60. Terwilliger TC. and Berendzen J. (1999) Automated MAD and MIR structure solution". *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 55: 849-861.
 61. Terwilliger TC. (2000) Maximum likelihood density modification. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 56: 965-972.
 62. Emsley P. and Cowtan K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 60: 2126-2132.
 63. Murshudov GN., Vagin AA. and Dodson EJ. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 53: 240-255.
 64. Hibi T., Yamamoto H., Nakamura G. and Takagi H. (2009) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of *N*-acetyltransferase Mpr1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Crystallogr.* F65: 169-172.
 65. McCoy AJ. *et al.* (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40: 658-674.
 66. Perrakis A., Harkiolaki M., Wilson KS. and Lamzin VS. (2001) ARP/wARP and molecular replacement. *Acta Crystallogr.* D57: 1445-1450.

67. Ravikumar H., Devaraju KS. and Shetty KT. (2008) Effect of pH on spectral characteristics of P5C-ninhydrin derivative: Application in the assay of ornithine amino transferase activity from tissue lysate. *Indian J. Clin. Biochem.* 23: 117-122.
68. Holm L. and Rosenström P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* 38: W545-W549.
69. Wybenga-Groot LE, Draker K, Wright GD, Berghuis AM. (1999) Crystal structure of an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase: defining the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily fold. *Structure* 7: 497-507.
70. Burk DL, Ghuman N, Wybenga-Groot LE, Berghuis AM. (2003) X-ray structure of the AAC(6')-Ii antibiotic resistance enzyme at 1.8 Å resolution; examination of oligomeric arrangements in GNAT superfamily members. *Protein Sci* 12: 426-437.
71. Ferrer-Sueta G, Radi R (2009) Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem. Biol* 4: 161-177.
72. Iinoya K., Kotani T., Sasano Y. and Takagi H. (2009) Engineering of the yeast antioxidant enzyme Mpr1 for enhanced activity and stability. *Biotechnol. Bioeng.* 103: 341-352.
73. Fillingham J. *et al.* (2008) Chaperone control of the activity and specificity of the histone H3 acetyltransferase Rtt109. *Mol. Cell. Biol.* 28: 4342-4353.
74. Berndsen CE. *et al.* (2008) Molecular functions of the histone acetyltransferase chaperone complex Rtt109-Vps75. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 948-956.
75. Errey JC. and Blanchard JS. (2006) Functional annotation and kinetic characterization of PhnO from *Salmonella enterica*. *Biochemistry* 45: 3033-3039.
76. Ishchuk OP., Abbas CA. and Sibirny AA. (2010) Heterologous expression of *Saccharomyces cerevisiae* *MPR1* gene confers tolerance to ethanol and L-azetidine-2-carboxylic acid in *Hansenula polymorpha*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37: 213-218.
77. Ogawa-Mitsuhashi K., Sagane K., Kuromitsu J, Takagi H. and Tsukahara K. (2009) *MPR1* as a novel selection marker in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 26: 587-593.
78. Tsai FY., Zhang XH., Ulanov A. and Widholm JM. (2010) The application of the yeast N-acetyltransferase *MPR1* gene and the proline analogue L-azetidine-2-carboxylic acid as a selectable marker system for plant transformation. *J. Exp. Bot.* 61: 2561-2173.
79. Sasano Y., Takahashi S., Shima J. and Takagi H. (2010) Antioxidant N-acetyltransferase Mpr1/2 of industrial baker's yeast enhances fermentation ability after air-drying stress in bread dough. *Int. J. Food Microbiol.* 138: 181-185.

80. Sasano Y. *et al.* (2012) Enhancement of the proline and nitric oxide synthetic pathway improves fermentation ability under multiple baking-associated stress conditions in industrial baker's yeast. *Microb. Cell Fact.* 11: 40.
81. Lu SC. (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* 30: 42-59.
82. Pederzoli CD. *et al.* (2007) 5-Oxoproline reduces non-enzymatic antioxidant defenses in vitro in rat brain. *Metab. Brain Dis.* 22: 51-65.
83. Pederzoli CD. *et al.* (2010) Acute administration of 5-oxoproline induces oxidative damage to lipids and proteins and impairs antioxidant defenses in cerebral cortex and cerebellum of young rats. *Metab. Brain Dis.* 25: 145-154.
84. Rieke GK., Scarfe AD. and Hunter JF. (1984) L-pyroglutamate: an alternate neurotoxin for a rodent model of Huntington's disease. *Brain Res. Bull.* 13:443-456.
85. Silva AR. *et al.* (2001) L-pyroglutamic acid inhibits energy production and lipid synthesis in cerebral cortex of young rats *in vitro*. *Neurochem. Res.* 26: 1277-1283.
86. Vetting MW., Magnet S., Nieves E., Roderick SL. and Blanchard JS. (2004) A bacterial acetyltransferase capable of regioselective *N*-acetylation of antibiotics and histones. *Chem. Biol.* 11: 565-573.
87. Liu Y., Borchert GL., Surazynski A. and Phang JM. (2008) Proline oxidase, a p53-induced gene, targets COX-2/PGE2 signaling to induce apoptosis and inhibit tumor growth in colorectal cancers. *Oncogene* 27: 6729-6737.