

## 解糖系酵素エノラーゼの新たな翻訳後修飾を発見

タンパク質のヒスチジン残基で生じるメチル化修飾の新たな基質として、解糖系酵素エノラーゼのサブユニットである $\gamma$ -enolaseを同定しました。また、このメチル化が生じるヒスチジン残基を特定し、これが $\gamma$ -enolaseの二量体形成や活性発現に重要であることを明らかにしました。

タンパク質は、翻訳（生合成）後の化学修飾により、機能の多様性がもたらされます。その一つであるメチル化修飾は、一般にリジン残基やアルギニン残基に起こるとされていますが、近年、ヒスチジン残基にも起こることが分かってきました。また、ヒスチジンメチル化が広範なタンパク質に生じていることも示唆されています。一方で、生体組織内でどのようなタンパク質が、どのヒスチジン残基でメチル化修飾されるか、その詳細は不明でした。

本研究グループは、マウスの骨格筋および脳組織を用いて、生化学的手法によるタンパク質の分画と分析化学的手法を組み合わせた解析から、ヒスチジン残基がメチル化修飾される新たな基質として、解糖系酵素エノラーゼのサブユニットである $\gamma$ -enolaseを同定しました。また、3種類の異なるアミノ酸配列を持つエノラーゼ（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ）のうち、脳神経系特異的に発現する $\gamma$ -enolaseの190番目のヒスチジン残基がメチル化されることを明らかにしました。

さらに、立体構造予測計算から、 $\gamma$ -enolaseのメチル化を受けるヒスチジン残基が、サブユニット二量体形成時の分子間水素結合に重要である可能性が推測され、その部位での分子間水素結合を阻害した $\gamma$ -enolaseでは、二量体形成能および酵素活性が低下することを見いだしました。加えて、これまでに哺乳類で同定されている3種類のヒスチジンメチル化酵素のいずれも、 $\gamma$ -enolaseのメチル化反応を触媒しませんでした。以上のことから、今回同定した $\gamma$ -enolaseは、新たなヒスチジンメチル化酵素を探索するための、独自性の高い研究材料となることが期待されます。

### 研究代表者

筑波大学生命環境系

加香 孝一郎 講師

筑波大学生存ダイナミクス研究センター（TARA）

深水 昭吉 教授

## 研究の背景

タンパク質は、翻訳（生合成）後にさまざまな化学修飾を受けることが知られています。このような化学的修飾は、「翻訳後修飾<sup>注1)</sup>」と呼ばれ、タンパク質相互作用や酵素活性、構造の変化などを通してタンパク質の機能に多様性をもたらします。タンパク質のメチル化修飾は、主にリジン残基やアルギニン残基に起こることが知られていましたが、近年、ヒスチジン残基も反応の標的となることが分かってきました。また、最近のタンパク質の網羅的研究により、ヒスチジンメチル化は広範なタンパク質に生じる現象であることが示唆されています。しかしながら、2種類のヒスチジンメチル化 ( $N\tau$ -メチル化と  $N\pi$ -メチル化) のうち (図1)、 $N\tau$ -メチル化修飾を受けるタンパク質の報告は3種類に限られていました。

## 研究内容と成果

本研究では、マウス組織を用いて、生体内でメチル化修飾されるタンパク質の新たな同定方法を確立し、解析を行いました (図2)。その結果、4例目となるヒスチジン  $N\tau$ -メチル化タンパク質を報告しました。すなわち、マウス脳組織において、解糖系酵素エノラーゼ<sup>注2)</sup>のサブユニット (酵素やタンパク質などの多量体を形成する単一分子) である  $\gamma$ -enolase の190番目のヒスチジン残基で  $N\tau$ -メチル化修飾されること、また、この部位でのメチル化修飾が、エノラーゼの3種類のアイソザイム<sup>注3)</sup> ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) のうち、脳神経系で特異的に発現する  $\gamma$ -enolase のみで起こることを明らかにしました。

さらに、立体構造予測計算から、 $\gamma$ -enolase の190番目のヒスチジン残基が、サブユニット二量体形成時の分子間水素結合に重要である可能性を見いだしました (図3)。この部位にアミノ酸変異を導入して、分子間水素結合ができないようにしたところ、 $\gamma$ -enolase の二量体形成能および酵素活性が低下することを突き止めました。以上の結果は、 $\gamma$ -enolase の構造変化と活性発現に、メチル化修飾の標的となる190番目のヒスチジン残基が重要であることを示しています。

加えて、 $\gamma$ -enolase は、哺乳類の既知のヒスチジンメチル化酵素 (SETD3, METTL18, METTL9) のいずれにもメチル化修飾されなかったことから、マウスの脳組織において、新規ヒスチジンメチル化酵素の存在が示唆されました。

## 今後の展開

タンパク質のヒスチジン残基のメチル化修飾は、リジン残基とアルギニン残基に続く第3のメチル化修飾として近年注目されています。しかしながら、その酵素化学的解析や生物学的意義の解明に不可欠である触媒酵素やその基質の報告例が、第1・第2のメチル化修飾に比べて非常に少なく、研究の進展を遅らせている大きな要因となっています。本研究による、新たなヒスチジンメチル化基質である  $\gamma$ -enolase の発見は、解糖系におけるヒスチジンメチル化の重要性の理解や、新規ヒスチジンメチル化酵素の探索のための有用な手掛かりとなることが期待されます。

参考図

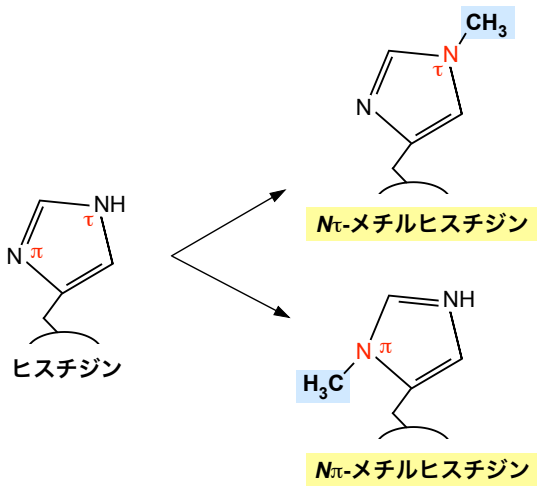


図1：ヒスチジン残基のメチル化修飾

ヒスチジン残基のメチル化修飾は、側鎖イミダゾール環の異なる2つの窒素原子に起こり、主鎖から遠い窒素原子がメチル化された  $N\tau$ -メチルヒスチジンと、主鎖に近い窒素原子がメチル化された  $N\pi$ -メチルヒスチジンが生成される。

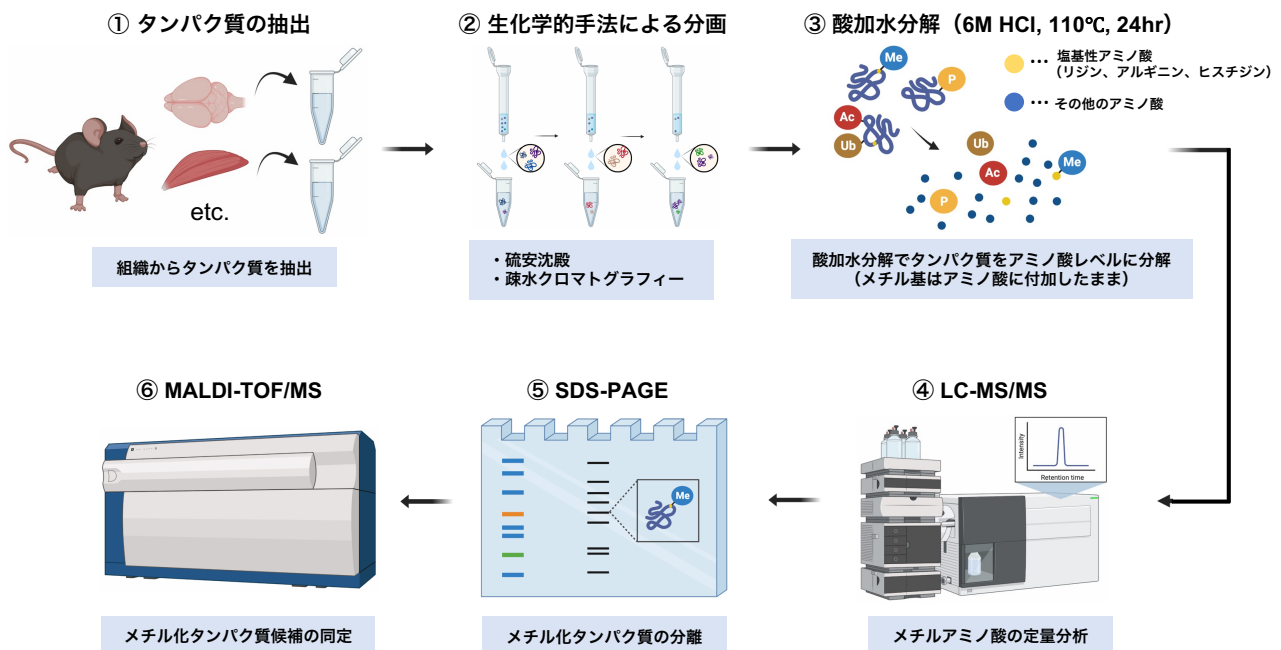


図2：メチル化基質の探索方法の概念図

生化学的手法（硫酸沈殿・疎水クロマトグラフィー）によるタンパク質の分画と、分析化学的手法（LC-MS/MS・MALDI-TOF/MS）を組み合わせることで、メチル化基質を同定する手法を開発した。

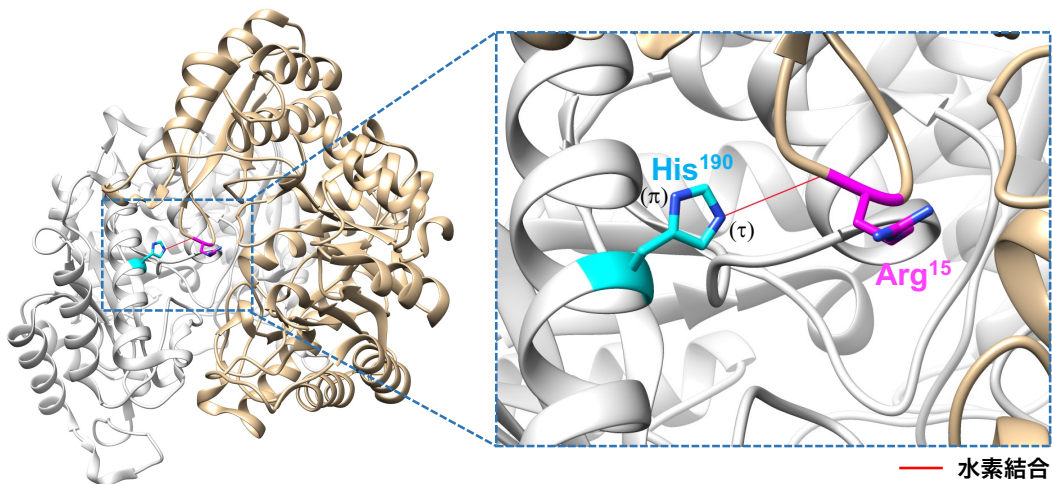


図3： $\gamma$ -enolase 二量体モデルの立体構造予測計算と分子間水素結合

マウス  $\gamma$ -enolase 二量体モデルの立体構造予測計算から、片方の単量体  $\gamma$ -enolase (図中：銀色) の 190 番目のヒスチジン残基  $N\tau$ -位窒素と、もう一方の単量体  $\gamma$ -enolase (図中：金色) の 15 番目のアルギニン残基カルボニル酸素との間で分子間水素結合が形成されることが推測された。この推測に基づいて、190 番目のヒスチジンを介した分子間水素結合が形成できない変異体  $\gamma$ -enolase の作製・解析を行い、二量体形成およびエノラーゼ活性の発現にこのヒスチジン残基が重要であることを見いだした。

#### 用語解説

##### 注1) 翻訳後修飾

生合成されたタンパク質に付加されるさまざまな化学修飾のこと。これにより、タンパク質の化学的特性や構造が変化し、多様な機能を持つようになる。リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化などが知られている。

##### 注2) エノラーゼ

エノラーゼは、解糖系において 2-ホスホグリセリン酸をホスホエノールピルビン酸に変換する反応を触媒する。3種類のアイソザイム ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) が存在し、 $\alpha$ -enolase は全身性に、 $\beta$ -enolase は骨格筋特異的に、 $\gamma$ -enolase は脳神経系特異的に発現する。それぞれ、 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\alpha\gamma$  の二量体を形成してエノラーゼ活性を発揮する。

##### 注3) アイソザイム

アイソザイムは、酵素としての活性がほとんど同じである一方で、アミノ酸配列が異なり、タンパク質分子として別種である酵素 (またはそのサブユニット) を指す。

#### 研究資金

本研究は、日本学術振興会の科学研究費補助金 (科研費) : (基盤研究 A) (23H00321 : 深水昭吉)、基盤研究 (B) (20H029947 : 大徳浩照) および、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の革新的研究開発支援事業 (CREST) 「プロテオスタシスの理解と革新的医療の創出」研究開発領域の研究開発課題「不可逆的タンパク質メチル化を介した進行性および加齢性心腎障害の分子基盤」(JPgm1410010 : 深水昭吉) の支援によって実施されました。

## 掲載論文

【題名】  $\gamma$ -enolase (ENO2) is methylated at the  $N\tau$  position of His-190 among enolase isozymes.  
(エノラーゼアイソザイムの中で、 $\gamma$ -enolase は His-190 で  $N\tau$  メチル化修飾を受ける)

【著者名】 Fumiya Kasai<sup>†</sup>, Koichiro Kako<sup>†</sup>, Syunsuke Maruhashi, Toru Uetake, Yuan Yao, Hiroaki Daitoku, and Akiyoshi Fukamizu

<sup>†</sup>These two authors contributed equally to this work

【掲載誌】 *The Journal of Biochemistry*

【掲載日】 2023年6月8日（オンライン先行公開）

【DOI】 10.1093/jb/mvad042

## 問合わせ先

【研究に関すること】

深水 昭吉（ふかみず あきよし）

筑波大学生存ダイナミクス研究センター（TARA） 教授

TEL: 029-853-6070

Email: akif@tara.tsukuba.ac.jp

URL: [http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp/Top\\_iweb/Welcome.html](http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp/Top_iweb/Welcome.html)

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報局

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp