

赤痢アメーバのゲラニルゲラニル転移酵素 II 型と Rab escort protein の特徴

熊谷 正広¹, 牧岡 朝夫¹, 竹内 勤², 野崎 智義^{3,4} (¹慈恵医大・熱帯医学, ²慶大・熱帯医学・寄生虫学, ³群大・院医・国際寄生虫病, ⁴PRESTO, 科技団)

Molecular characterization of a protein geranylgeranyltransferase type II and a Rab escort protein from *Entamoeba histolytica*

Masahiro KUMAGAI¹, Asao MAKIOKA¹, Tsutomu TAKEUCHI² and Tomoyoshi NOZAKI³

(¹Dept. Trop. Med., Jikei Univ. Sch. Med., ²Dept. Trop. Med. & Parasitol., Keio Univ. Sch. Med., ³Dept. Parasitol. Gunma Univ. Grad. Sch. Med., ⁴PRESTO, JST)

SUMMARY

Rab proteins function as molecular switches of signal transduction for intracellular vesicular transport. For Rab proteins to function, they must be post-translationally geranylgeranylated and attach to an intracellular membrane. Protein geranylgeranyltransferase type II (GGT-II) catalyzes this modification with the aid of a Rab escort protein (REP). We have been studying the prenyltransferases of *Entamoeba histolytica* (*Eh*), an enteric protozoan parasite of humans, in their biological similarity and differences as well as the feasibility of using them as a target for chemotherapy. We report here on their GGT-II and REP. The alpha (GGT-II α) and beta (GGT-II β) subunits and REP from *Eh* consist of 317, 315 and 480 amino acid residues, respectively, and have characteristic conserved domains. These proteins are phylogenetically independent of those from other organisms. Recombinant GGT-II expressed in *Escherichia coli* was purified as a complex of both subunits. An anti-*Eh* GGT-II α and an anti-*Eh* REP rabbit serum did not react with rat GGT-II α and rat REP, respectively. REP-dependent geranylgeranylation of Rab by recombinant *Eh* GGT-II was confirmed using [³H] geranylgeranyl pyrophosphates. There was a difference in substrate specificity between amoebic GGT-II and rat GGT-II. In conclusion, GGT-II and REP from *Eh* are very different from those of mammals in phylogeny, antigenicity and substrate specificity.

[目的] Ras スーパーファミリーの低分子量 G タンパク質のひとつである Rab タンパク質は、細胞内小胞輸送に関する細胞内情報伝達の分子スイッチとして働いているが、その機能を発現するためには、ゲラニルゲラニル(GG)化と呼ばれる翻訳後脂質修飾を受けて輸送小胞の膜に結合することが必須である。この修飾を触媒するのがタンパク質ゲラニルゲラニル転移酵素 II 型(GGT-II) であり、Rab escort protein (REP) の存在下で Rab を GG 化することが知られている。我々は、薬剤の標的としての可能性を考えて、また、生物の多様性に対する興味から、赤痢アメーバ(*Eh*)のプレニル転移酵素の研究をしており、これまで、3種のプレニル転移酵素のうちファルネシル転移酵素とゲラニルゲラニル転移酵素 I 型について解析し報告した。今回は、赤痢アメーバの GGT-II と REP について、クローニングし、系統解析を行ない、組換えタンパク質を発現させ、基質特異性について調べた結果を報告する。

[材料と方法] NCBI の *Eh* のゲノム・データベースを用いて、相同検索により GGT-II の α サブユニット (GGT-II α) と β サブユニット (GGT-II β)、REP の遺伝子の N 末端と C 末端の配列を見つけ、PCR プライマーを設計し、*Eh* の cDNA ライブラリーをテンプレートとして PCR で増幅し、クローニングを行なった。近隣結合法による系統樹は ClustalW と TreeView を用いて作成した。*Eh*GGT-II、*Eh*REP は、発現プラスミドを作成して大腸菌に発現させ、付加したヒスチジン・タグを用いて精製した。酵素活性は組換え *Eh*Rab への [3 H]ゲラニルゲラニル・ピロリン酸の取り込みによって測定した。ラットの GGT-II と REP は市販品を用いた。

[結果と考察] *Eh* の GGT-II α 、 β 、REP は、それぞれ 317、315、480 アミノ酸からなり、それぞれのタンパク質に特有のドメイン配列が認められた。他種生物との相同性は、GGT-II α で 14~34%、GGT-II β で 42~49%、REP で 18~23% だった。近隣結合法による系統樹では、哺乳類であるヒトとラットはクレードを作るが、*Eh* は酵母と同様に他種生物とクレードを作らず、独自に進化したものと考えられた。SDS-PAGE を行なったところ、大腸菌に発現させた *Eh*GGT-II の組換えタンパク質は、40 kD の GGT-II α と 36 kD の GGT-II β との複合体として精製されたことが確認された。REP は 58 kD であった。イムノブロットでは、抗 *Eh*GGT-II α 血清と抗 *Eh*REP 血清は、それぞれ *Eh*GGT-II α 、*Eh*REP と反応したが、ラット GGT-II α とは反応せず、抗原性の違いが認められた。組換え *Eh*GGT-II は、REP 依存性の GG 化活性を示した。基質特異性を調べたところ、ラット GGT-II は *Eh*GGT-II より高率に *Eh*Rab11C を GG 化した。以上のことから、*Eh* の GGT-II は、系統的にも、抗原性に関しても、哺乳類の GGT-II と著しく異なっていることが明らかとなった。また、*Eh*GGT-II と哺乳類の GGT-II では、基質特異性の違いがあることが示唆された。最近、ヒト GGT-II の特異的阻害剤が開発されたという報告があり、今後、そのような阻害剤を用いて、*Eh*GGT-II の薬剤標的としての可能性を検討する予定である。

[文献]

- 1) Zhang, F.L. and Casey, P.J. (1996) *Annu. Rev. Biochem.*, 65: 241-269.
- 2) Kumagai, M., Makioka, A., Takeuchi T. and Nozaki T. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279: 2316-2323.
- 3) Makioka, A., Kumagai, M., Takeuchi T. and Nozaki T. *Mol. Biochem. Parasitol.*, in press.