

ミニ・レビュー

肺炎クラミジアのアデニル酸キナーゼ

三浦公志郎

山口大学医学部分子制御系・微生物学講座 宇部市南小串1-1-1 (〒755-8505)

Key words : 肺炎クラミジア, アデニル酸キナーゼ, 亜鉛結合タンパク質, プロテインフォールディング

クラミジアにまつわる最近の話題

ヒトに感染症を惹起するクラミジアの主なものとして *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* がある。クラミジアの分類については、1999年にEvarettらによって新しい分類が提唱され、*C. pneumoniae* と *C. psittaci* が従来の *Chlamydia* 属から分けられて *Chlamydophila* 属とされた¹⁾。

臨床的には *C. trachomatis* が性行為感染症の原因菌としてポピュラーであることは言うまでもなく、*C. psittaci* によるオウム病は、本年鳥根県の動物園での集団感染がニュースとして報じられた。また、*C. pneumoniae* はヒト肺炎の起炎菌であり、市中肺炎の主な原因菌として3～4番目に挙げられる。さらに *C. pneumoniae* は気管支喘息の誘引となる上に、近年では動脈硬化との関連が明らかとなって注目を浴びている²⁾。以上のようにクラミジアは我々にとって身近な存在であるにもかかわらず、その生態は不明な点が多い。

クラミジアは遺伝子破壊や遺伝子導入の方法が確立していない。一方で上述のように臨床的重要性が高く、さらに偏性細胞内寄生性という生物学的にも興味深い性質から、クラミジアのゲノム解析は精力的に行われている。2002年6月現在までに *C. pneumoniae* の3株と *C. trachomatis* の2株の全ゲノム配列が既に報告され、現在 *C. psittaci* のゲノム解読も進行中である³⁾。クラミジアはゲノム解析が最も盛んに行われている生物のひとつであると言え

る。ゲノムプロジェクトによってクラミジアの持つ全遺伝子が明らかになったことは、クラミジアを理解するうえで大きな材料となった⁴⁾。ゲノムから得られる情報は膨大ではあるが、機能未知の遺伝子は全体の4割も残されており、クラミジア研究の全体から見ると、新たな問題点が明らかになっただけで残された課題ははるかに多い。

クラミジアの生活環

クラミジアは偏性細胞内寄生性で、特異な生活環を持つ細菌である(図1)⁵⁾。まず感染性で非増殖性の基本小体 (elementary body, EB) という型で宿主細胞に接着し、細胞内に取り込まれる。細胞内進入後6～8時間までに細胞内のEBは非感染性で増殖性の網様体 (reticulate body, RB) に変化し、RBは細胞質に形成された封入体 (inclusion body) の中で2分裂増殖する。このときRBは宿主細胞からATPを取り込むことからクラミジアは"energy

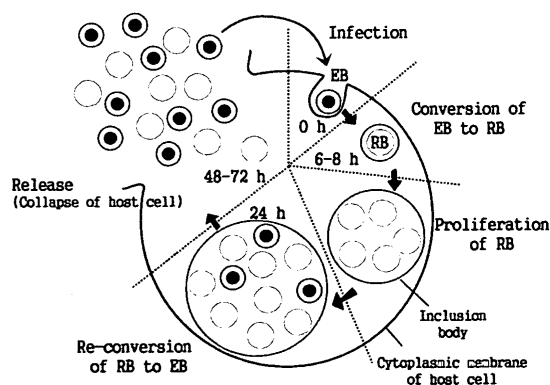


図1. クラミジアの生活環

平成14年7月1日受理

parasite"とも呼ばれている⁶⁾。感染後24時間ごろからRBは再びEBへの再変換をはじめ、48時間以降に宿主細胞の崩壊とともに細胞外に放出される。

クラミジアはゲノム上に2種類のADP/ATP translocase (Npt1, Npt2) を持ち、これらを使って宿主細胞からATPを取り込んでいるとされている。これらtranslocaseの解析の結果、Npt1は菌体外(宿主側)のATPと菌体内ADPの交換反応を行う、まさにtranslocaseだったのに対し、Npt2はATPのみならず他のヌクレオチド(NTP)をプロトン濃度勾配依存的に取り込むproton symporterだった⁷⁾。なお、もうひとつの偏性細胞内寄生性細菌であるリケッチアには1種類のtranslocaseしか存在しない⁸⁾。

肺炎クラミジアのアデニル酸キナーゼ (AKcpn)

アデニル酸キナーゼ (adenylate kinase, AK) は [ATP + AMP ↔ 2ADP] の化学反応を触媒し、細胞内のアデニンヌクレオチドプールの恒常性に寄与

している。細菌から哺乳類まで全ての生物がこの酵素を持ち、大腸菌や酵母の変異体は致死であることから生命維持に必須であると考えられている。AKにはその構造からLIDドメインと呼ばれる部分があり、基質が結合すると蓋が閉じるように動くと言われている (induced-fit model) ⁹⁾。

AKは、LIDドメインの長さの違いから長型と短型に分けられる。長型のLIDドメインは、短型よりも27アミノ酸残基ほど長く、既知の原核生物のAKは全て長型であるのに対し、真核生物には長型と短型の両方がある。LIDドメインの機能については必ずしも明らかではなく、なぜ長いLIDと短いLIDがあるのか、細菌のLIDがなぜ長い必要があるのか分かっていない。なお、長型のLIDドメインを短縮して短型にした酵素も酵素活性を持つことから、長いLIDドメインが触媒作用に必須ではないことがわかっている¹⁰⁾。

我々はクラミジアが宿主からATPを取り込むという特異なアデニンヌクレオチド代謝を行うことに着目し、*C. pneumoniae*のAK (AKcpn) の解析を行った。その結果、想像以上にAKcpnが特異な性質を持っていることがわかった¹¹⁾。以下にその特徴を解説する。

1. AKcpnの一次構造

AKcpn遺伝子の単離は、*C. pneumoniae* J138の

```

1 TATTTCCCGG TTCAAGCCAA AGAGACCTCT TTTCTTTTAA TTTTCTGTGT TTTCTATATT
61 TACAGTATTT TGAAAGATA TATAGTAGTC CTAGGGAAAA TCTTGGGACT CATAACGATC
121 CAATCTCTATC AGAATCTAGG TGGAAATGCT TCGGACCGCT ATAGTGCTTT GCATCTCTAGG
181 AAAAGTCTCT CTGTTTACCC ATGTCGTAGC AAAGTATTGT TAAGTTCCTG ATTTAGGGTA
241 ATGGTGACGT CAATTTAAGG AGCATTCGAA GTGACTAAGG GCTCTGTTTT TATTATTATG
S. D.
M T K G S V F I I M
301 GGGCCTCCAG GCTCAGGCAA AGGAACCCAA TCTCAATATC TTGCCAATAG AATAGGCTTA
G P P P G S G K G T Q S Q Y L A N R I G L
361 CCCACATCA GTACTGGGGA TTTATTAAGA GCGATTATTC GAGAAGGAAC TCCTAATGGA
P H I S T G D L L R A I I R E G T P N G
421 TTGAAGGCTA AAGCCTACCT AGATAAGGGT GCTTTTGTTC CTAGTGATT TGTATGGGAA
L K A K A Y L D K G A F V P S D F V W E
481 ATACTGAAAG AAAAAGTCA AAGCCAAGCC TGCTCTAAAG GATGCATTAT CGATGGGTTT
I L K E K L Q S Q A C S K G C I I D G F
541 CCGAGAACCT TAGATCAGGC GCATCAACAG GATAGTTTTC TTATGGACGT CCAATCTAAC
P R T L D Q A H L L D S F L M D V H S N
601 TACACGGTGA TTTCTCTAGA GATTTCTGAA GACGAGATCT TAAAAGAGT GTGTTCAAGA
Y T V I F L E I S E D E I L K R V C S R
661 TTTCTTTGCC CCTCCGFTTC GCGTATCTAC AACACAAGTC AGGGACATAC CGAATGTTCA
F L C P S C S R I Y N T S Q G H T E C P
L I D
721 GACTGTCATG TGCCCTTTGAT ACGGCGTCT GACGATACCC CGGAAATCAT TAAAGAAAGA
D C H V P L I R R S D D T P E I I K E R
781 TTAACAAAAT ATCAAGAAG CACAGCTCCT GTTATTGCGT ATYATGACAG CTFAGGGAAG
L T K Y Q E R T A P V I A Y Y D S L G K
841 CTATGTAGGG TTTCTCTGA AAACAAGAG GATCTTCTTT TTGAAGACAT TTTGAAATGC
L C R V S S E N K E D L V F E D I L K C
901 ATTTATAAAT ACTTTTCTCT CCTTCCAAG AAAAGTACCG AATTC
I Y K

```

図2. AKcpn遺伝子の塩基配列

破線で囲まれた配列がAKcpn遺伝子のORF (642 bp) である。翻訳開始コドンはGTGで (太字)、その上流にリボゾーム結合サイト (S. D.) と考えられる配列がある (二重下線)。ORFのコードするアミノ酸残基を各コドンの下に示した。下線部はLIDドメインで、そこに円で囲った4つのシステイン残基からなる亜鉛結合モチーフが存在する。黒いボックスはストップコドン。

システイン残基数	種 (遺伝子名)	全長 (アミノ酸)	亜鉛結合モチーフ*
9	<i>C. pneumoniae</i> (AKcpn)	213	有
8	<i>Chlamydia trachomatis</i>	245	有
5	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	217	有
	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	214	有
	<i>Mycoplasma capricolum</i>	213	有
	<i>Thermotoga maritima</i>	220	有
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	217	有
	Rat (AK2)	238	無
4	<i>Rickettsia prowazekii</i>	213	有
	<i>Bacillus subtilis</i>	217	有
	<i>Lactococcus lactis</i>	215	有
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	215	有
	<i>Halobacterium halobium</i>	216	有
	<i>Pyrococcus abyssi</i> (adkE)	220	有
	Human (AK2)	239	無
	Mouse (AK2)	232	無
	Others, fungi		無

* 亜鉛結合モチーフは4つのシステイン残基のかわりにヒスチジン残基などを含むものがある。

表1. システイン残基を4つ以上含むAK

ゲノム・ライブラリーを大腸菌の温度感受性AK変異株CV2に導入し、相補されたクローンを選択することで容易に得られた。このクローンから得られたプラスミドの塩基配列を決定し、その結果1つのopen reading frame (ORF) が同定された(図2)。遺伝子から予測された一次構造から、AKcpnは原核生物に共通した長型であることがわかった。さらに一次構造上興味深いことが2つ見つかった。ひとつは、全長213アミノ酸中に9つものシステイン残基を持っていたことで、もうひとつはその9つの中のLIDドメインに含まれる4つのシステイン残基が亜鉛結合モチーフを形成していることだった。

既知のAKのうち亜鉛結合モチーフを持つものを中心にシステイン残基の数を表にまとめた(表1)。全システイン残基数はAKcpnが9つ、*C. trachomatis* AKが8つであるのに対し、それ以外のAKは少なくとも調べた範囲内で全て5つ以下で、クラミジアのAKが群を抜いている。なぜクラミジアに特異的にAKのシステイン残基が多いのか、現在のところ不明である。AKcpnの立体構造を大腸菌AKなどとのホモロジー・モデリングから分子シミュレーションした結果、亜鉛結合モチーフ以外の5つのシステイン残基のうち4つが2組のジスルフィド結合をしていると予測された(三浦ら、未発表データ)。一般に細胞内は還元状態に保たれていることから、菌体内に局在すると考えられるAKcpnが2つものS-S結合を持つ可能性があるのは興味深い。

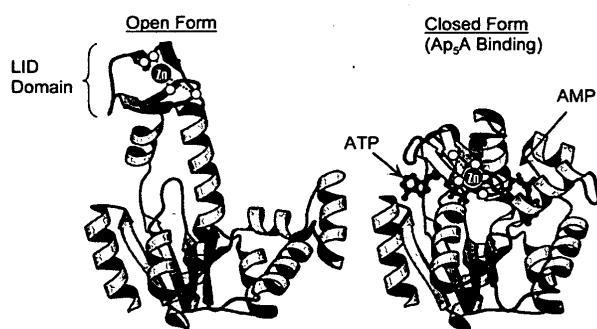


図3. 予想されるAKcpnの立体構造
大腸菌AKの三次元構造をもとに、AKcpnの立体構造を類推した。LIDドメインの4つのシステイン残基(白丸)に亜鉛イオン(黒丸)が結合している。AKは基質の結合によってopen form(左)からclosed form(右)に立体構造が変化するといわれている(induced-fit model)。ここではAKの阻害剤である P^1, P^5 -di(adenosine-5')-pentaphosphate (Ap_5A) が結合した図を示している。矢印はそれぞれの基質の結合部位を示す。

2. 構造亜鉛とその機能

AKcpnはそのLIDドメインに4つのシステイン残基からなる亜鉛結合モチーフを含んでいた(図2)。大腸菌から精製した組換えAKcpnについて原始吸光分析を行ったところ、亜鉛が検出された。次に p -(hydroxymercuri) benzenesulfonic acid (PMPS) と4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR) を用いて亜鉛の定量とそれが結合しているシステイン残基数の測定を行った。PMPSは亜鉛に置き換わってシステイン残基の硫黄原子に結合し(PMPSの水銀原子とのメルカプチド結合を250 nmの吸光度で定量)、亜鉛イオンを放出する。放出された亜鉛イオンはPARと結合し、これを500 nmの吸光度で定量することができる。結果、AKcpnと亜鉛の存在比が1:1であり、亜鉛とシステイン残基の比が1:4だった。このことからAKcpnの1分子あたり亜鉛1原子が含まれ、その亜鉛が4つのシステイン残基に結合していることがわかった。なお、PMPSによって亜鉛が放出されたAKcpn(アポ酵素)が活性を保持していたことから、この亜鉛は酵素の触媒作用には関与せずタンパク質の構造にかかわる構造亜鉛であることがわかった。

亜鉛が結合している4つのシステイン残基は、LIDドメインにある亜鉛結合モチーフの4つのシステイン残基であると予想された。PMPSを結合させて亜鉛を放出したAKcpnをトリプシン消化し、これに含まれるペプチドを質量分析計で測定することで、PMPSが亜鉛結合モチーフの4つのシステイン残基に結合していたことがわかった。さらに亜鉛結合モチーフのシステイン残基を他のアミノ酸に置換した変異AKcpnタンパク質は亜鉛を結合していなかった。これらのことから、亜鉛がLIDドメインの4つのシステイン残基に結合していると結論した。その模式図を図3に示す。

亜鉛を含むAKは、肺炎クラミジアのAKcpnだけではない。*Bacillus stearothermophilus*のAKなど、いくつかの細菌のAKはそのLIDドメインに亜鉛を含むことが知られている。またデータベースに登録されているAK遺伝子の配列情報から、高温で生育する古細菌のAKにもそのLIDドメインに亜鉛結合モチーフが見つかった(表1)。実験的にもAKに含まれる亜鉛が酵素の熱安定性に働いていたことから、亜鉛を含むAKは高温環境への適応の結果であ

ると考えられた¹²⁻¹⁵⁾。確かにAKcpnにおいても亜鉛が熱安定性に寄与しているという実験結果は得られたが、クラミジアがその生活環において頻繁に高温環境に曝されるとは考えにくく、我々は亜鉛に他の働きがあるのではないかと考えた。

亜鉛結合モチーフのシステイン残基を置換した幾つかの変異タンパク質は、亜鉛を含まないだけでなく酵素活性を失っていた。ホロ酵素から*in vitro*で亜鉛を除いたアポ酵素は活性を保持するにもかかわらずこれらの変異タンパク質が活性を持たないことから、変異タンパク質の立体構造に問題があると考えられた。実際に変異AKcpnは野生型AKcpnに比べてトリプシンに対する感受性が高かった。これらのことは、AKcpnの亜鉛が熱安定性のみならずタンパク質の立体構造構築に関わっていることを示唆していた。

そこで*in vitro*でAKcpnを変性後に再フォールディングさせる実験を行った(図4)。その結果、ホロ酵素は再フォールディングで約20%の活性が回復したが、アポ酵素は変性状態からの活性の回復が見られなかった。しかしZnCl₂存在下でアポ酵素の再フォールディングを行うと、活性が30%まで回復した。この実験からAKcpnの再フォールディングには亜鉛が必要であることがわかった。

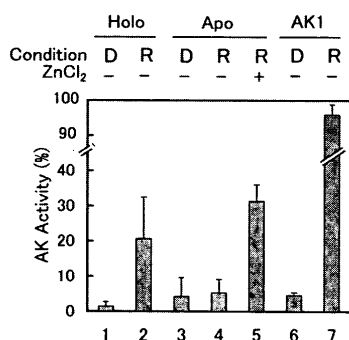


図4. *in vitro*でのAKcpnの変性 (denaturation) と再フォールディング (renaturation)

4.5 Mの塩酸グアニジン中で変性させた活性 (D) とそれを10倍に希釈して25℃で2時間置いた活性 (R) を、ホロ酵素 (Holo) とアポ酵素 (Apo)、ブタAK1 (短型で亜鉛を含まないAK) についてそれぞれの変性前の活性を100%として表した。ブタAK1が効率よく再フォールディングして活性がほぼ完全に戻る (lane 7) のに対し、ホロAKcpnは20%ほどしか戻らなかった (lane 2)。さらにアポ酵素は全く活性の回復が見られず (lane 4)、0.5 μM ZnCl₂ 存在下で再フォールディングさせると30%まで活性が回復した (lane 5)。

タンパク質のフォールディングは非常に複雑で、「タンパク質の立体構造はそのアミノ酸の一次配列により一意的に決定される」としたAnfinsenのドグマ¹⁶⁾以来30年以上の時間が過ぎたにもかかわらず未だに一次構造から三次元立体構造を正確に予測することはできていない。少なくとも幾つかのタンパク質のフォールディング過程では、まず折りたたみ核 (folding nucleus) と呼ばれる局所的な立体構造ができて、それをきっかけにタンパク質全体が折りたたまれるという段階的フォールディングが起こることが知られている¹⁷⁻²⁰⁾。タンパク質全体の立体構造の予測は、この順序だったフォールディングの理解抜きには不可能だと思われる。しかし現在のところ折りたたみ核に関する知見は乏しく、一次配列から折りたたみ核を予想することができない。これがタンパク質の三次元立体構造を予測できない一因であると考えられる。今回我々が得た実験結果は、AKcpnのLIDドメインが折りたたみ核であり、亜鉛がLIDドメインのシステイン残基に結合することが折りたたみ核形成に必須であることを示唆している。真核生物の転写因子にみられるzinc-finger proteinのペプチドを用いた実験から局所のフォールディングに亜鉛が必要であるという結果がある²¹⁾。現在までにタンパク質全体のフォールディングについて亜鉛の関与が明らかにされたのはAKcpnのみではあるが、これらのことは一般に亜鉛を含むタンパク質において亜鉛がそのフォールディングに寄与していることを示唆している²²⁾。AKcpnはこの分野の研究対象として格好の材料になるのではないかと考えている。

3. 酵素学的特徴

大腸菌から精製した組み換えAKcpnタンパク質を用いて酵素学的解析をおこなった結果、AMPに対する基質親和性が従来知られていた他種の細菌のAKと大きく異なっていた (表2)。AKcpnのATPに対する基質親和性は大腸菌のAK (AKeco) と比較すると同等かむしろそれより高い (Km (ATP)

	K_m (μM)			V_{max} (μmol/min/mg)	
	ATP	AMP	ADP	ATP	AMP
AKcpn	24	330	330	420	220
AKeco	50	38	92	1,040	430

表2. AKcpnとAKecoの酵素学的特性

が低い) のに対して、AMPに対する親和性は非常に低かった (K_m (AMP) が約9倍)。

K_m (AMP) が高いということは、菌体内のAMP濃度が高いか、もしAMP濃度が低ければ $[ATP + AMP \leftarrow 2ADP]$ の一方向のみの反応を促進していることを示唆している。大腸菌でも真核生物の細胞においても一般に、ATPの濃度に比較するとADPとAMPの濃度は低く抑えられている。ところが、クラミジア細胞内のAMP濃度が高いという報告があり^{23, 24)}、AKcpnの K_m (AMP) が高いのは菌体内の高いAMP濃度と関連があると考えられる。また、他の細菌と異なりクラミジアの解糖系の酵素がAMPによるアロステリック調節を受けないという実験結果²⁵⁾は、他の生物と異なりクラミジアにおいては少なくとも解糖系に対してAMPが飢餓のシグナルにはなっていないことを示唆しており、AMP濃度が高いことと矛盾しない。

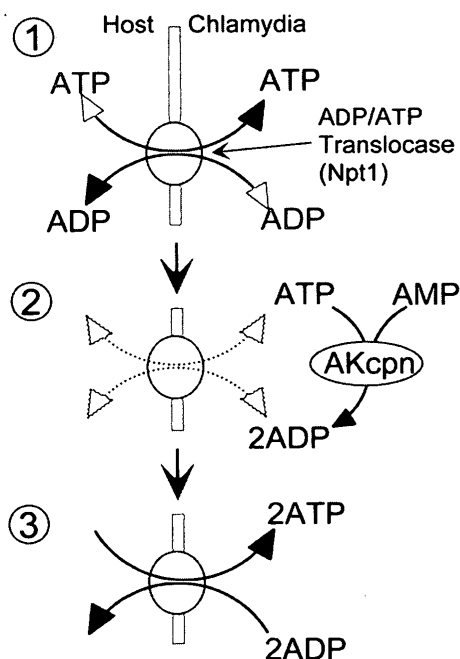


図5. クラミジアのATP取り込みモデル

クラミジアの菌体内はAMP濃度が高く保たれており、それを使ってATP/ADP translocaseとAKcpnが以下のシステムで宿主細胞のATPを効率よく取り込んでいると考えられる。①クラミジアはATP/ADP translocaseによってATPを菌体内に取り込んでいる。このtranslocaseは逆反応も起こるので、より多くのATPを取り込むためには多くのADPが必要である。②取り込まれたATPは、AKcpnがAMPを使って2分子のADPに変換する。③生じた2分子のADPは、translocaseによって2分子のATPに変換される。以上②-③を繰り返すことで、AMPから安定的にADPを供給し、ATPを効率よく取り込むことができる。

では、なぜクラミジアの細胞内AMP濃度が高いのだろうか? その理由はクラミジアの特異なアデニンヌクレオチド代謝にあるのではないかと我々は考えている。前述のようにクラミジアはADP/ATP translocase (Npt1) を使って、宿主細胞のATPを自らの菌体内のADPと交換することによって得ている。このtranslocaseは濃度勾配によっては逆反応も触媒するため⁷⁾、効率よくATPを得るためには細胞内に常時ADPが必要になる。ここで細胞内にAMPが大量にあると、取り込んだ一部のATPを使ってAKcpnがADPを供給する。AKによって1分子のATPから2分子のADPが生じるとそれをtranslocaseが2分子のATPに変換し、以下同様に $[2 \text{分子のATP}] \rightarrow [4 \text{分子のADP}] \rightarrow [4 \text{分子のATP}]$ というように効率よくATPを取り込むことができる (図5)。つまりADP/ATP translocaseを通してATPを効率的に取り込むためにはADPが必要で、AKcpnは菌体内に高濃度に存在するAMPからADPを供給する働きを持っているのではないかと考えられた。

これは現時点ではモデルに過ぎないが、クラミジアがATPを取り込むために巧妙なトリックを持っているはずで、それを解明することはクラミジア感染症の病態を明らかにすると同時に治療への応用も期待できると考えている。

おわりに

*C. pneumoniae*のアデニル酸キナーゼ (AKcpn) の解析は、当初予想した以上に興味深い結果を我々に与えてくれた。LIDドメインに結合した亜鉛の解析はタンパク質のフォールディングに言及し、酵素学的解析はAKcpnが偏性細胞内寄生性で"energy parasite"と呼ばれるクラミジアのエネルギー代謝の根幹に関わることを示唆した。これらの結果はそれぞれの研究分野でさらなる発展の余地を残しており、将来クラミジア感染症の予防や治療のために役立つことを願っている。

謝 辞

このたび中村賞の榮譽を賜り、本稿掲載の機会を与えてくださいました山口大学医学会の先生方皆様と、本研究のご指導を賜った前山口大学医学部第二生化学教授 中澤 淳 先生、現山口大学医学部生殖・発達・感染医科学（微生物学）教授 白井睦訓先生、ならびに本研究に数々のご協力をいただいた諸先生方に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Evol Microbiol* 1999; **49**: 415-440.
- 2) 尾内一信, 古村 速. クラミジア・ニューモニエ感染症の臨床 動脈硬化病変との関連. 副島林造, 松島敏春編 実地医家のためのクラミジア・ニューモニエ感染症. 医薬ジャーナル社, 大阪, 2002; 110-125.
- 3) 藤 英博, 三浦公志郎. 細菌のゲノム解読と臨床への利用 クラミジア. *臨床と微生物* 2001; **28** (6) : 773-778.
- 4) 三浦公志郎, 藤 英博, 白井睦訓. クラミジア・ニューモニエの細菌学的特長 ゲノム解析からわかったこと. 副島林造, 松島敏春編 実地医家のためのクラミジア・ニューモニエ感染症. 医薬ジャーナル社, 大阪, 2002; 40-51.
- 5) 松本 明. クラミジア学入門. 大学教育出版, 2000.
- 6) Moulder JW. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev* 1991; **55** (1) : 143-190.
- 7) Tjaden J, Winkler HH, Schwoppe C, Van Der Laan M, Mohlmann T, Neuhaus HE. Two nucleotide transport proteins in *Chlamydia trachomatis*, one for net nucleoside triphosphate uptake and the other for transport of energy. *J Bacteriol* 1999; **181** (4) : 1196-1202.
- 8) Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Ponten T, Alsmark UC, Podowski RM, Naslund AK, Eriksson AS, Winkler HH, Kurland CG. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 1998; **396** (6707) : 133-140.
- 9) Schulz GE, Muller CW, Diederichs K. Induced-fit movements in adenylate kinases. *J Mol Biol* 1990; **213** (4) : 627-630.
- 10) Rose T, Brune M, Wittinghofer A, Le Blay K, Surewicz WK, Mantsch HH, Barzu O, Gilles AM. Structural and catalytic properties of a deletion derivative (Δ 133-157) of *Escherichia coli* adenylate kinase. *J Biol Chem* 1991; **266** (17) : 10781-10786.
- 11) Miura K, Inouye S, Sakai K, Takaoka H, Kishi F, Tabuchi M, Tanaka T, Matsumoto H, Shirai M, Nakazawa T, Nakazawa A. Cloning and characterization of adenylate kinase from *Chlamydia pneumoniae*. *J Biol Chem* 2001; **276** (16) : 13490-13498.
- 12) Glaser P, Presecan E, Delepierre M, Surewicz WK, Mantsch HH, Barzu O, Gilles AM. Zinc, a novel structural element found in the family of bacterial adenylate kinases. *Biochemistry* 1992; **31** (12) : 3038-3043.
- 13) Gilles AM, Glaser P, Perrier V, Meier A, Longin R, Sebald M, Maignan L, Pistotnik E, Barzu O. Zinc, a structural component of adenylate kinases from gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 1994; **176** (2) : 520-523.
- 14) Perrier V, Burlacu-Miron S, Bourgeois S, Surewicz WK, Gilles AM. Genetically engineered zinc-chelating adenylate kinase from *Escherichia coli* with enhanced thermal stability. *J Biol Chem* 1998; **273** (30) : 19097-19101.

- 15) Burlacu-Miron S, Perrier V, Gilles AM, Pistochnik E, Craescu CT. Structural and energetic factors of the increased thermal stability in a genetically engineered *Escherichia coli* adenylate kinase. *J Biol Chem* 1998; **273** (30) : 19102-19107.
- 16) Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 1973; **181** (4096) : 223-230.
- 17) Abkevich VI, Gutin AM, Shakhnovich EI. Specific nucleus as the transition state for protein folding: evidence from the lattice model. *Biochemistry* 1994; **33** (33) : 10026-10036.
- 18) Fersht AR. Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92** (24) : 10869-10873.
- 19) Itzhaki LS, Otzen DE, Fersht AR. The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analysed by protein engineering methods: evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding. *J Mol Biol* 1995; **254** (2) : 260-288.
- 20) Baldwin RL, Rose GD. Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. *Trends Biochem Sci* 1999; **24** (2) : 77-83.
- 21) Miura T, Satoh T, Takeuchi H. Role of metal-ligand coordination in the folding pathway of zinc finger peptides. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1384** (1) : 171-179.
- 22) Cox EH, McLendon GL. Zinc-dependent protein folding. *Curr Opin Chem Biol* 2000; **4** (2) : 162-165.
- 23) Hatch TP, Al-Hossainy E, Silverman JA. Adenine nucleotide and lysine transport in *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol* 1982; **150** (2) : 662-670.
- 24) Tipples G, McClarty G. The obligate intracellular bacterium *Chlamydia trachomatis* is auxotrophic for three of the four ribonucleoside triphosphates. *Mol Microbiol* 1993; **8** (6) : 1105-1114.
- 25) Iliffe-Lee ER, McClarty G. Glucose metabolism in *Chlamydia trachomatis*: the 'energy parasite' hypothesis revisited. *Mol Microbiol* 1999; **33** (1) : 177-187.

Adenylate Kinase from *Chlamydia pneumoniae*

Koshiro MIURA

*Dept of Microbiology, and Reproductive, Pediatric and Infectious Science,
Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1 Minami-kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

SUMMARY

Chlamydiae proliferate only within the infected host cells and are thought to be "energy parasites," because they take up ATP from the host cell as an energy source. We isolated from *Chlamydia pneumoniae* the gene encoding adenylate kinase (AK) that contributes to the homeostasis of the intracellular adenine nucleotide pool in many organisms. K_m values for AMP and for ADP of the purified *C. pneumoniae* AK (AKcpn) were significantly higher than the reported values of other AKs, suggesting correlation with high concentration of chlamydial intracellular AMP. According to these findings, a new model of ATP import mechanism by *Chlamydia* was proposed. AKcpn contains 1 g atom of zinc per mole of 24,000-dalton protein. Mass spectrometric analysis of AKcpn and analysis of properties of mutated AKcpn strongly suggested that zinc is associated with four cysteine residues in the LID domain of the enzyme. Although the apo-AKcpn that lost zinc retained AK activity, it was more thermolabile and sensitive to trypsin digestion than the holo-AKcpn, indicating that the zinc in AKcpn contributes to thermal stability of the protein. Moreover, the recovery *in vitro* of the AK activity during the renaturation process of the denatured apo-AKcpn was dependent on zinc. These results indicate that zinc in AKcpn, although not essential for the catalysis, stabilizes the enzyme and probably plays a crucial role in proper folding of the protein.