

細菌の細胞分離酵素を阻害する IseA タンパク質の新奇な立体構造を解明

～ユニークな“弓のこ型”構造を世界で初めて解明～

国立大学法人信州大学（学長 山沢清人）は、細菌の細胞分離酵素を阻害する IseA タンパク質の新奇な“弓のこ型”構造を世界で初めて解明しました。これは、信州大学繊維学部（学部長 濱田州博）の新井亮一助教（応用生物科学系 生物資源・環境科学課程）、関口順一特任教授、大学院修士2年生（応用生物科学専攻 新井研究室）の福井貞晴、小林直也らによる研究の成果です。本成果は、米国生化学・分子生物学会の学術論文誌『The Journal of Biological Chemistry』の2012年12月28日号に掲載されます。

<本研究成果のポイント>

- ・枯草菌の細胞の分離等に関わる酵素を阻害する IseA タンパク質のユニークで新奇な“弓のこ型”立体構造を、核磁気共鳴(NMR)法により世界で初めて解明
- ・IseA と酵素との相互作用解析や阻害実験、立体構造に基づくコンピューターシミュレーションなどを組み合わせて、IseA の新たな酵素阻害メカニズムを提唱
- ・今後、病原菌の増殖に不可欠な酵素を阻害する改変 IseA タンパク質を設計開発する研究を展開することにより、新たな抗菌薬の開発につながる応用が期待

<概要>

これまでに、信州大学繊維学部 関口順一特任教授らを中心とする研究グループは、枯草菌^{*1}の細胞壁^{*2}を分解する酵素^{*3}群が、細胞の分離や伸長などにおいて非常に重要な役割を果たしていることを世界に先駆けて明らかにしてきました。さらに、近年、枯草菌の細胞表層から IseA^{*4}タンパク質^{*5}を発見し、細胞壁を分解して細胞分離を行う酵素を IseA が特異的に阻害することを明らかにしました。しかしながら、IseA がどのようにして酵素の活性を阻害するのか詳しいメカニズムは全くわかっていませんでした。

そこで、新井亮一助教と関口順一特任教授らを中心とする研究グループは、IseA の阻害メカニズムを解明することを目的として、理化学研究所NMR施設において、核磁気共鳴（NMR）法^{*6}を用いて、IseA の立体構造解析を行いました。その結果、IseA の立体構造の決定に世界で初めて成功しました。

IseA の立体構造は、これまでに全く報告例がない、非常にユニークで新奇な“弓のこ型”構造であることを解明しました（図1）。特に、弓のこの刃に対応する細いひも状のループ部分が非常に特徴的な構造であることを発見しました。また、IseA と酵素の相互作用解析^{*7}や、IseA のループ部分の変異体を作製し、酵素活性の阻害を調べる実験を行ったところ、IseA のループ部分が酵素活性を阻害するために非常に重要であることが分かりました。さらに、IseA と酵素の表面形状や電荷分布などの特徴を詳細に考察して、コンピューターシミュレーションを行うことにより、IseA のループ部分が酵素の活性部位の谷間にはまり込み、広範囲に相互作用するタイプの新たな酵素阻害メカニズムモデルを提唱しました（図2）。

今後、本研究成果をもとにして、病原菌の必須酵素を阻害する改変 IseA タンパク質を設計開発する研究を展開することにより、新たな抗菌薬開発への応用が期待されます。

本研究は、日本学術振興会 科学研究費補助金 基盤研究(A) (研究代表者 関口順一) 等をはじめ、文部科学省 テニユアトラック普及・定着事業等の御支援を頂いて行われました。また、NMR 実験用サンプル調製、NMR 測定及び解析等は、理化学研究所横浜研究所NMR施設において行われました。

本研究成果は、米国生化学・分子生物学会の学術論文誌「The Journal of Biological Chemistry」の2012年12月28日号に掲載されます(<http://www.jbc.org/>)。また、IseA タンパク質の立体構造座標データは、Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>)において公開いたします(PDB ID: 2RSX)。

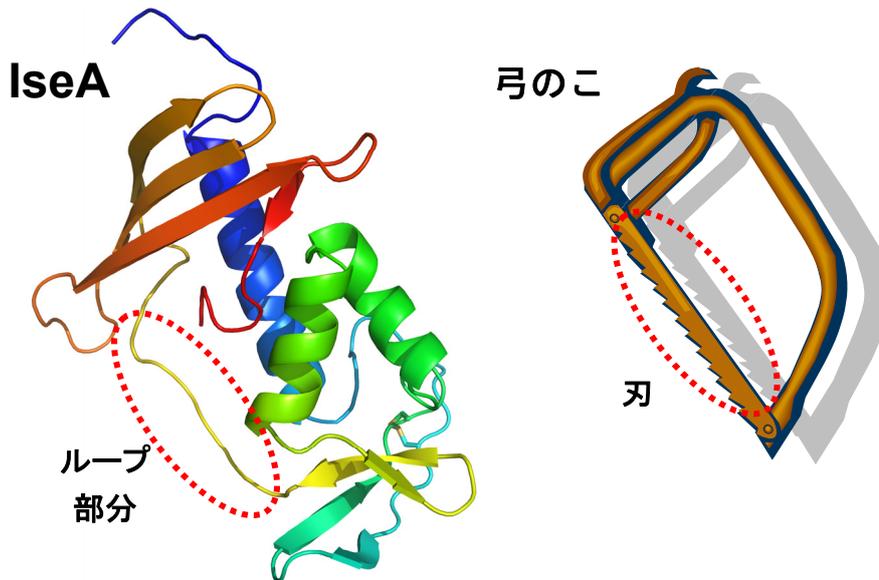


図1 IseA タンパク質の“弓のこ型”立体構造

赤点線部が弓のこの刃と対応するループ部分

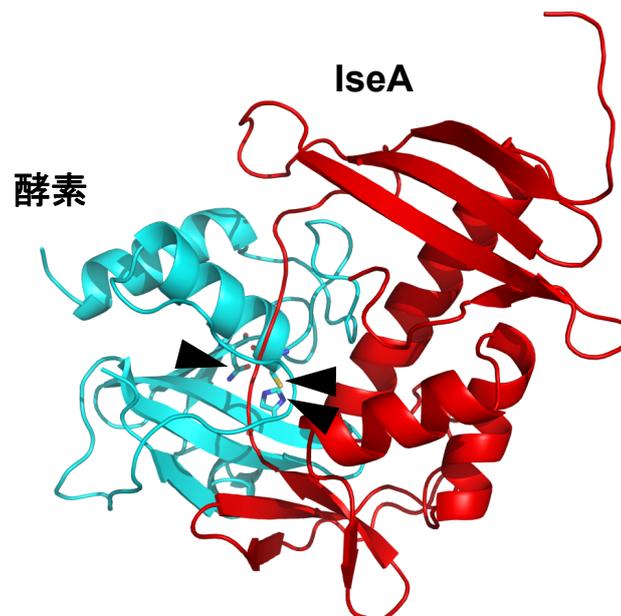


図2 IseA の酵素阻害メカニズムモデル

黒矢印で示す部分が酵素の活性部位のアミノ酸残基

ループ部分が酵素の活性部位の谷間にはまり込み広範囲に相互作用

<詳細>

1. 背景

細菌は、外界から身を守るために細胞表層に丈夫な細胞壁を持っています。これまでに、信州大学繊維学部 関口順一特任教授らを中心とする研究グループは、枯草菌^{*1}の細胞壁^{*2}を分解する酵素^{*3}群が、細胞の分離や伸長などにおいて非常に重要な役割を果たしていることを世界に先駆けて明らかにしてきました。さらに、近年、枯草菌の細胞表層から IseA^{*4}タンパク質^{*5}を発見し、細胞壁を分解して細胞分離を行う酵素を IseA が阻害することを明らかにしました。

しかしながら、IseA が、どのようにして、酵素の活性を阻害するのか詳細なメカニズムは全くわかっていませんでした。そこで、構造生物学が専門の新井亮一助教と応用微生物学が専門の関口順一特任教授らを中心とする研究グループは、IseA の阻害メカニズムを詳細に解明することを目的として、約4年以上前から IseA の立体構造解析に取り組んできました。

2. 研究手法と成果

様々な試行錯誤の末に、理化学研究所NMR施設において、核磁気共鳴（NMR）法^{*6}による IseA の立体構造解析を行い、IseA の立体構造の決定に世界で初めて成功しました。

その結果、IseA は、これまでに全く報告例がない、非常にユニークで新奇な“弓のこ型”の立体構造であることを解明しました（図1）。特に、弓のこの刃に対応する細いひも状のループ部分が非常に特徴的な構造であることを発見しました。次に、NMR 法を用いて、IseA と酵素との相互作用解析^{*7}を行ったところ、IseA はループ及びその近傍部において、酵素と相互作用していることを明らかにしました（図3）。さらに、遺伝子工学・分子生物学実験により、この IseA のループ部分のアミノ酸を置換した変異体を作製し、酵素活性の阻害を調べる生化学実験を行ったところ、このループ部分が酵素活性を阻害するために不可欠な役割を担っていることが分かりました。

さらに、IseA と酵素の表面形状や電荷分布等の立体構造上の特徴を詳細に考察して、ドッキングシミュレーション^{*8}も行いました。以上の結果を総合して、弓のこの刃に対応する IseA のループ部分が酵素の活性部位の谷間の奥まではまり込み、広範囲に相互作用することにより反応を妨害するタイプの新たな阻害メカニズムモデルを提唱しました（図4）。

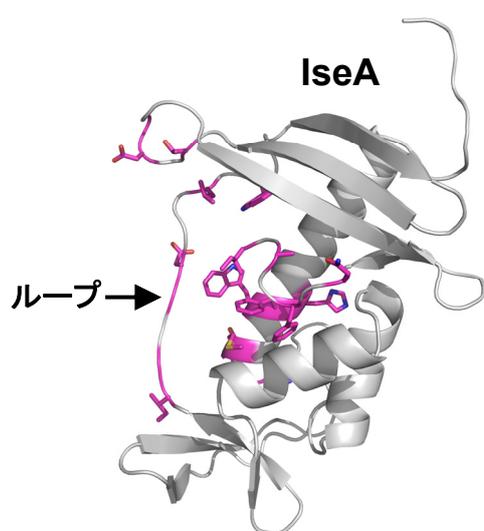


図3 IseA の酵素との相互作用部位

紫色のアミノ酸残基が結合部位を表す

IseA のループ及びその近傍で酵素と相互作用

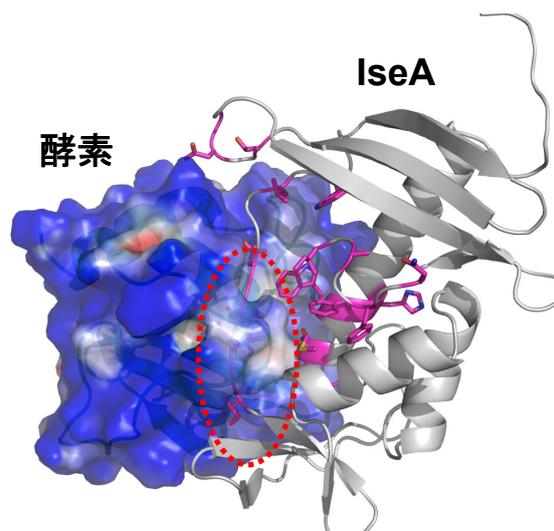


図4 IseA の酵素阻害メカニズムモデル

(酵素を表面表示モデルで表示)

IseA のループ部分が酵素活性部位(赤点線部)の奥に入り込み、IseA と酵素は広範囲に相互作用

3. 今後の期待

近年、従来の抗生物質が効かない多剤耐性菌が増えてきていることが大きな問題となっており、新しいタイプの抗生物質や抗菌薬が常に求められています。また、最近の研究の進展により、細菌の細胞壁を分解する酵素群の中に細菌の増殖に不可欠なものがあり、特に病原性に関係するものもあることが明らかになってきました。そこで、そのような病原菌の酵素を阻害するタンパク質・ペプチドや化合物等を開発すれば、病原菌の増殖を抑える新たな抗菌薬となる可能性が考えられます。

今後、本研究成果をもとにして、病原菌の酵素を阻害する改変 IseA タンパク質を設計開発するタンパク質工学研究を展開することにより、全く新しいタイプの抗菌薬開発への応用が期待されます。

<発表論文情報>

The Journal of Biological Chemistry, Vol. 287, No. 53, pp. 44736–44748, December 28, 2012

Solution Structure of IseA, an Inhibitor Protein of DL-Endopeptidases from *Bacillus subtilis*, Reveals a Novel Fold with a Characteristic Inhibitory Loop

Ryoichi Arai*, Sadaharu Fukui, Naoya Kobayashi and Junichi Sekiguchi* (*Corresponding Author)

Website: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M112.414763>

<IseA 立体構造座標情報公開>

Protein Data Bank (PDB) ID: 2RSX

Website: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2RSX>

<謝辞>

本研究のNMR実験用サンプルの調製、NMR測定及び解析等は、理化学研究所横浜研究所NMR施設(<http://www.ynmr.riken.jp/>)において行われたものであり、理化学研究所生命分子システム基盤研究領域の靱康子氏、原田拓志氏、柳楽武志氏、佐藤真奈美氏、李華氏、枡尾尚哉氏、小柴生造氏、渡部暁氏、木川隆則氏に心より感謝申し上げます。また、本研究の初期に貢献して頂きました信州大学卒業生の北浦想史氏(エイチビィアイ株式会社)、及び、本研究の遂行にあたり貴重な御意見等を頂きました橋本昌征氏(台湾国立成功大学特任助教)と佐藤高彰氏(信州大学繊維学部准教授)に心より感謝致します。

本研究は、文部科学省及び日本学術振興会の科学研究費補助金 基盤研究(A)(研究代表者 関口順一、研究分担者 新井亮一、22248008)、新学術領域研究(天然変性蛋白質領域公募研究、新井亮一、22113508、24113707)、若手研究(B)(新井亮一、24780097)や、文部科学省テニユアトラック普及・定着事業(若手研究者の自立的な研究環境整備促進事業)「ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点」等の御支援を頂いて行われました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

<用語説明>

※1 枯草菌

枯草菌(こそうきん)は、土壌中や、空気中に飛散している常在細菌の一種。学名は *Bacillus subtilis*。好気性のグラム陽性桿菌で、芽胞を形成する。枯れた草の表面などからも分離されることが多いためにその名が付けられた。稲わらを用いた伝統的な納豆は、煮沸した稲わらを使って煮た大豆を包んで製造するが、これは煮沸によって雑菌が死滅し、枯草菌の一種である納豆菌の芽胞だけが生き残る性質を利用したものである。また、一部の枯草菌が作るサチライシンなどのタンパク質分解酵素が洗剤に利用されるなど、代表的な有用微生物の一つに挙げられる。また、微生物学・分子生物学研究分野において、

グラム陽性細菌のモデル生物としても非常に重要で、遺伝子研究や遺伝子組換えによる有用微生物の開発にも用いられている。

※2 細胞壁

細胞壁は、植物や菌類、細菌類の細胞の外にみられる強固な構造体で、細胞を保護している。グラム陽性細菌の細胞壁は、主に糖鎖とペプチドからなるペプチドグリカンの丈夫な分厚い層によって構成されている。多くの細菌は、細胞が伸長や分離するときなどに、細胞壁を部分的に分解する必要があり、細胞壁を分解する酵素を持っている。

※3 酵素

生体でおこる化学反応に対して触媒（特定の化学反応の反応速度を速める物質で、自身は反応の前後で変化しないもの）として機能するタンパク質。酵素は、消化・吸収・代謝などの生体内のあらゆる反応過程に関与しており、生きるために必要不可欠なタンパク質である。

※4 IseA

信州大学繊維学部 関口順一特任教授らを中心とする研究グループによって、枯草菌の細胞表層から発見されたタンパク質の一種。IseA が、枯草菌の細胞壁を分解する酵素の DL-エンドペプチダーゼを特異的に阻害して、細胞分離を妨害することを世界で初めて解明し、2008 年に学術誌に報告している (Yamamoto, H., et al. *Mol. Microbiol.* **70**, 168-182, 2008)。

※5 タンパク質

タンパク質とは、約 20 種類のアミノ酸が鎖状に多数連結（重合）してできた高分子化合物であり、生物の重要な構成成分の一つである。生体内で様々な機能を担っており、不可欠な生体分子である。今回の研究対象である IseA や酵素もタンパク質の一種である。

※6 核磁気共鳴（NMR）法

核磁気共鳴（Nuclear Magnetic Resonance, NMR）は、外部静磁場に置かれた原子核が固有の周波数の電磁波と相互作用する現象である。その核磁気共鳴を用いて分子の構造や運動状態などの性質を調べる分析方法が、核磁気共鳴（NMR）法である。タンパク質や有機化合物等の物質の構造を決定するための代表的な実験手法の一つである。

※7 相互作用解析

物質と物質がどれくらいの強さでどのように結合するのかを実験的に調べること。今回は、IseA が酵素とどの部分によって結合するのか、その相互作用について NMR 法を用いて解析した。

※8 ドッキングシミュレーション

ある分子と標的分子との結合状態をコンピューター計算により予測すること。今回は、IseA と酵素との結合状態の構造を GRAMM-X というコンピュータープログラムを用いて予測を行った。

<本件に関するお問い合わせ先>

(研究内容)

信州大学繊維学部 応用生物学系 生物資源・環境科学課程 助教

新井 亮一

〒386-8567 長野県上田市常田 3-15-1

TEL&FAX: 0268-21-5881

E-mail: rarai@shinshu-u.ac.jp

新井研究室ウェブサイト: <http://fiber.shinshu-u.ac.jp/arai/>

(報道担当)

信州大学繊維学部 庶務グループ

藤澤 みどり

〒386-8567 長野県上田市常田 3-15-1

TEL: 0268-21-5307, FAX: 0268-21-5318

信州大学繊維学部 研究支援・会計グループ

赤川 雅志

〒386-8567 長野県上田市常田 3-15-1

TEL: 0268-21-5307, FAX: 0268-21-5318

※信州大学繊維学部のウェブサイトにも本記事のカラー版 PDF ファイルを掲載致しますので、ダウンロード頂けます。

信州大学繊維学部ウェブサイト: <http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/textiles/>