

論文の内容の要旨

論文題目 黄色ブドウ球菌由来莢膜合成酵素の構造生物学

氏名 宮房 孝光

【緒言】

黄色ブドウ球菌はヒトの皮膚上や鼻腔内に常在しているが、免疫力の低い乳児や疾病患者に感染した場合は各種の外毒素を産生し、致死的な疾患を惹起する。加えて、容易に薬剤耐性を獲得するという特徴を持っており、黄色ブドウ球菌に対する新規な戦略に基づく抗菌剤の開発が、社会的に強く求められている。

黄色ブドウ球菌の病原性に深く関わる物質として莢膜が古くから注目されている。莢膜は多糖類から構成される厚い膜で、これにより黄色ブドウ球菌は宿主の食生活から免れていると報告されている。しかし、莢膜の発現量は感染のステップに応じて動的に変化するため、莢膜そのものを標的とした薬剤設計は困難であることが示唆されている。以上より、莢膜合成酵素を標的とした研究は莢膜合成を阻害する薬剤の設計および莢膜発現の機序を解明する上で極めて重要である。

【研究目的】

黄色ブドウ球菌の主要な莢膜であるtype5、type8はともに、N-アセチルマンノサミンウロン酸、N-アセチル-L-フコサミン(L-FucNAc)、N-アセチル-D-フコサミンから構成されている。type5とtype8の合成酵素は2種の間で相同性の高い12種類を含め、それぞれ16種類が知られて

いる。その中で、L-FucNAcの合成を触媒する酵素であるCapE、CapF、CapGは莢膜合成に必須であることが報告されている。

本研究ではこれらの3つの酵素の作用機序を分子レベルで解明し、その特性評価を通して、莢膜合成の阻害剤設計に有用な情報基盤を構築することを目的とした。

出発物質であるUDP-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)から重合反応に用いられるUDP-FucNAcまでには5つの反応ステップを経るが、3つの酵素がそれぞれいくつの反応を触媒しているのかについては、CapE、CapFがそれぞれ3ステップ、1ステップを触媒するという報告とそれぞれ2ステップずつ触媒するという報告がある。

そこで、CapE、CapF、CapGのキャラクタライズを進める上で、それぞれに局在する機能の同定を目指した。また、これらの酵素はshort-chain dehydratase reductase family(SDRファミリー)というファミリーに属する蛋白質であり、一次配列から詳細な機能を予測することが困難であったため、X線結晶構造解析から立体構造を解明し、反応機構を理解することとした。また、立体構造から得られた知見を基に各酵素の変異体を作製、機能評価を行った。

【結果】

1. CapEの結晶構造解析

CapEに関しては、CapE単独の構造から、UDP-GlcNAcとの複合体、UDP-GlcNAcの6位のOH基をジアゾ基に置換した類縁体との複合体、さらにCapEの活性残基の1つである126番目のリジンをグルタミン酸に置換した変異体(K126E)とUDP-GlcNAcとの複合体を結晶化し、それぞれ2.90 Å、1.88 Å、2.10 Å、2.20 Åの回折データの収集に成功した。ホモログ蛋白質であるFlaA1(PDB ID ; 2gn4)をサーチモデルとして分子置換法を行い、構造決定に成功した。CapE単独の構造はコア領域以外のループにおいて電子密度が不明瞭で評価ができなかったため、残りの3つの構造を用いて研究を進めた。

CapEは結晶中で二量体を構成単位とする六量体構造を有していた。これは溶液状態における会合状態と合致するものである。サーチモデルとしたFlaA1は4位と6位からの脱水反応と5位のエピマー化反応を触媒している酵素であると報告されている。これは、CapEの反応経路における1ステップ目と2ステップ目の反応にあたる。しかし、FlaA1においては活性中心となりうる領域が1分子中に1つしか観察されず、2つの反応を触媒する機構は未だ明らかとなっていない。CapEとFlaA1の全体構造を比較すると、よく合致しており、CapEも活性部位は1分子中に1つしか見つからなかった。しかし、後述する活性測定の結果、少なくとも2つの反応を触媒することが明らかであるため、CapEは2つの反応を触媒する酵素であると予測した。

UDP-GlcNAcとの複合体中ではUDP-GlcNAcとNADP⁺の電子密度が観察された。しかし、NADP⁺のニコチン環の電子密度は不明瞭であった。興味深いことに隣接する164番目のチロシンには2つのコンフォメーションが観察され、そのうちの1つはニコチン環の存在する

はずの領域に侵入していた。また、K126EにおいてはUDP-GlcNAcは観察できずアポ体の構造を有していたが、この活性中心にはニコチン環が観察されており、164番目のチロシンはそれと平行に位置するコンフォメーションをとっていた。さらに、基質類縁体との複合体中にはNADP+が全く観察されず、164番目のチロシンはニコチン環の存在するはずの領域に位置するコンフォメーションのみを有していた。これらのデータは164番目のチロシンのコンフォメーション変化が補酵素の配置を変化させていることを強く示唆しており、活性中心の再構成を期待させるものである。

また、全体構造に着目すると、K126Eにおいて284番目のアスパラギン酸から305番目のチロシンまでの領域の電子密度が確認されなかった。この領域は、残り2つの構造中では六量体の界面に位置していた。126番目のグルタミン酸を含む、その他の領域では有意な構造変化がないため、この構造の違いは変異導入に由来するものではなく、結晶化条件の違いによるものと考察しており、K126Eで観察されなかったループは溶液中では大きな構造変化を取りうる領域であることが示唆された。

2. CapEの機能解析

CapE、CapFの活性測定にはHPLCを用いた。反応混合物を分離し、それらのピーク面積を比較することで評価を行った。CapEの反応後に2つのピークが得られるが、それらを既報の論文に沿って1ステップ目の反応産物、2ステップ目の反応産物と見なした。

上記の164番目のチロシンをフェニルアラニン、アラニンに置換したところ、フェニルアラニン変異体はほとんど活性が変化しなかったのに対し、アラニン置換体は完全に活性を失った。以上の結果より、164番目のチロシンの嵩高さが活性に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、アラニン置換体の不活化したことから、芳香環がニコチン環の配向を厳密に制御していること示している。

また、284番目のアスパラギン酸から305番目のチロシンまでの領域のうち、3つのチロシンをアラニンに置換したところ(Y290A、Y293A、Y305A)、Y290AとY305Aにおいては1ステップ目の反応効率が著しく低下しているのに対して、Y293Aにおいては1ステップ目の反応効率には変化がないにも関わらず、2ステップ目の反応効率が有意に低下していた。この結果は、これらの領域が活性に寄与していることを示すとともに、CapEの活性中心の再構成に影響を与えていることを示唆している。

3. CapFの結晶構造解析

CapF はセレノメチオニン置換体を結晶化し、単波長異常分散法により位相決定した。分解能 2.45 Å の回折データにより構造決定に成功した。CapF はホモ二量体を形成しており、単量体は N 末端ドメインと C 末端ドメインがループを介して亜鈴状につながった構造を有していた。N 末端ドメインはロスマンフォールドという典型的な SDR ファミリー

の構造を有しており、還元活性を保持することが予測された。一方、C末端ドメインはキユピンフォールドをとっており構造からの機能予測は不可能であった。

4. CapFの機能解析

CapFの2つのドメインに対する機能の局在を明らかにするために、CapFの分割変異体を用いた機能解析を行った。分割変異体として1番目のメチオニンから244番目のロイシンを切り出したN末端ドメイン、255番目のメチオニンから369番目のロイシンまでを切り出したC末端ドメインを作製した。また、二量体構造を維持したC末端ドメインとして、94番目のセリンと103番目のチロシンをアラニンに置換した変異体を作製した。

これらを用いた機能解析の結果より、C末端ドメインは二量体化した状態で3ステップ目を触媒しており、N末端ドメインが4ステップ目を触媒していることが明らかとなった。

【考察】

X線結晶構造解析の結果より、CapEは補酵素、活性残基の配置を変化させることで1つの活性ポケットを複数の反応に対して使い分けているということが示唆された。このような活性中心の再構成機構については2011年に好熱古細菌において報告があるが、一般的な環境に生息する生物種においては本研究の報告が初めてである。

また、CapFについて構造解析から2つのドメインを有していること、機能解析からそれぞれのドメインに機能が存在していることが明らかとなった。

総合すると、CapEとCapFは4つの反応を2つずつ触媒していることが明らかとなった。同様の反応を触媒する酵素群としてRmlB、RmlC、RmlDが知られているが、これらはそれぞれ1つ、2つ、1つの反応を触媒している。即ち、CapEとCapFはRmlCの触媒する反応を分割して有しているということである。その生物学的な意義については今後さらなる研究が必要であるが、Rml群がCap群と比較して広く保存されていることを考慮すると、CapE、CapFは黄色ブドウ球菌に特異的に作用する薬剤を設計するうえで標的蛋白質として適していることは間違いない。