

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26712012

研究課題名(和文) 高選択的新規抗生物質開発を目指した特殊制限酵素の構造基盤解明と薬剤探索

研究課題名(英文) Structural and functional analyses for the novel restriction enzyme R.PabI and its homologues in pathogenic bacteria.

研究代表者

宮園 健一 (Miyazono, Kenichi)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：90554486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヘリコバクター属やカンピロバクター属に特異的なhalf pipe型制限酵素に着目し、その構造と機能の解析をおこなった。超好熱古細菌*Pyrococcus abyssi*由来half pipe型制限酵素とDNAの複合体構造をX線結晶構造解析法で決定することにより、half pipe型制限酵素が、DNAグリコシラーゼ活性によって作用する酵素(制限DNAグリコシラーゼ)であることを世界で初めて明らかにした。また、病原菌由来half pipe型制限酵素の構造決定にも成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the structure and function of the half pipe superfamily restriction enzyme, which is conserved in pathogenic bacteria such as *Helicobacter* and *Campylobacter* and in some hyperthermophilic archaea. The crystal structures of R.PabI, which is the first half pipe superfamily restriction enzyme found in the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus abyssi*, in complexes with substrate, product, and nonspecific DNAs showed that R.PabI cleaves not a phosphodiester bond but an N-glycosidic bond in DNA, indicating that R.PabI cleaves DNA using DNA glycosylase activity. This is the first example of restriction enzymes that functions by using other than endonuclease activity (restriction DNA glycosylase). We also determined the crystal structures of half pipe super family restriction enzymes from pathogenic bacteria.

研究分野：構造生物学

キーワード：制限酵素 タンパク質 結晶構造解析 DNAグリコシラーゼ

1. 研究開始当初の背景

half pipe 型制限酵素は、新規の DNA 結合モチーフを有する配列特異的 DNA 分解酵素であり、研究代表者が初めてその構造を決定した。この酵素は二量体を形成し、その界面に形成される塩基性の溝 (half pipe) 領域で DNA を認識し、金属イオン非依存的に DNA 対し作用することが知られていた。

half pipe 型制限酵素の特徴として、生物種間の保存性が極めて低い新奇酵素であることがあげられる。これまでにゲノム解析されている生物の中では、数種の古細菌と *Helicobacter* 属、*Campylobacter* 属のみがこの酵素遺伝子を有しており、*H. pylori* における研究ではその酵素活性が実際に確認されている。*Helicobacter* 属、*Campylobacter* 属は人類にとって病原菌であり、前者は胃炎・胃潰瘍・胃がんの原因菌として、後者は食中毒菌として知られている。これらの病原菌のみを選択的に殺菌できる化合物を作ることができれば、その利用価値は極めて高い。そのため、half pipe 型制限酵素の高い新奇性に着目し、「half pipe 型制限酵素による DNA の認識・切断機構の構造基盤解明」を行うことにより、「*Helicobacter* 属や *Campylobacter* 属に対し非常に種選択性の高い抗生物質を設計」することができるのではないかと考えられた。

細菌の制限修飾系は、配列特異的に DNA を分解する制限酵素と、同じ配列を分解から保護する DNA メチル化酵素とからなる。制限酵素と比較してメチル化酵素は生物種間の保存性が高いため、高選択的な新規抗生物質の開発のためには対象とできない。一方 half pipe 型制限酵素は生物種間の保存性が極めて低い酵素である。この酵素の DNA 配列選択性や DNA 分解機構に関わる構造基盤を詳細に理解し、それらを狂わすような化合物を設計することができれば (スター活性を誘引するような化合物を作ることができれば)、ゲノムの破壊を通じてこれらの病原菌を選択的に殺菌できるようになると期待された。

2. 研究の目的

(1) half pipe 型制限酵素の DNA 切断メカニズム解明

超好熱古細菌 *Pyrococcus abyssi* 由来新奇制限酵素 R.PabI に代表される half pipe 型制限酵素は、他の多くの DNA 分解酵素とは異なり、 Mg^{2+} 等の二価金属イオン非依存的に DNA 鎖を分解できるという特徴的な活性を持つことが知られていた。しかしながら、この half pipe 型制限酵素特有な DNA 切断が、どのような分子基盤によって行われているかは明らかにされていなかった。そこで、R.PabI と DNA の相互作用を構造生物学的手法により解析し、R.PabI による DNA 切断メカニズムの全容解明を行うことを目的とした。

(2) 病原菌由来 half pipe 型制限酵素の構造

学的解析と制御

half pipe 型制限酵素は、非常に種間の保存性が低い酵素群であり、*Helicobacter* 属や *Campylobacter* 属といった、人類に対し病原性を示す細菌群と、一部の古細菌でのみ存在が確認されている。そこで、これらの特殊な制限酵素による DNA 切断機構にかかわる構造基盤を解明し、その活性を制御する化合物を、構造情報を基に設計することを目的とした。

3. 研究の方法

大腸菌の異種タンパク質発現系を利用し、R.PabI、*H. pylori* 由来 half pipe 型制限酵素、*C. coli* 由来 half pipe 型制限酵素の大量調製を行った。制限酵素は、大量発現させたときの細胞毒性が極めて強いため、野生型の R.PabI は、同じ配列を認識し DNA のメチル化を触媒するメチル化酵素との共発現によって取得した。また、点変異導入により活性を弱めた変異体タンパク質として大量発現させた。得られたタンパク質を精製し、活性測定試験及び構造解析実験に利用した。各酵素の活性は、ゲルシフトアッセイ、DNA 分解活性試験等により評価した。各酵素の立体構造は、X 線結晶構造解析法により決定した。

4. 研究成果

(1) half pipe 型制限酵素 R.PabI の構造・機能解析

half pipe 型制限酵素の、金属イオン非依存的な DNA 分解メカニズムを解明するため、R.PabI と産物 DNA の複合体構造解析を X 線結晶構造解析法により行った。結果、3.0 Å の分解能で、R.PabI-DNA 複合体の構造決定に成功した (図 1)。

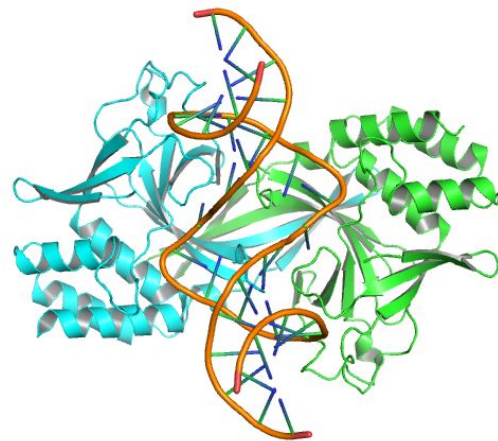


図 1 R.PabI-DNA 複合体結晶

構造解析の結果、R.PabI は、その構造の特徴である half pipe 領域を用い二本鎖 DNA を認識することが明らかになった。R.PabI による DNA 認識は、多くの DNA 結合タンパク質で見られるような、DNA 二重らせんに対するタンパク質の結合とは大きく異なり、R.PabI の結合により、DNA 二重鎖の塩基対間の水素結合が解離していることが明らかになった。また

この部位の立体構造を精査することにより、R.PabI が結合している DNA 鎖において、R.PabI 認識配列の一つであるアデニンの N-グリコシド結合が解離していることが明らかとなった。R.PabI を用いた酵素活性測定試験を行うことにより、R.PabI によるアデニンの脱離は、加水分解反応によって起こっていることが明らかとなった。以上の結果から、R.PabI は、エンドヌクレアーゼ活性で DNA に損傷を与える通常の制限酵素とは異なり、DNA グリコシラーゼ活性により DNA に損傷を与える新奇酵素であることが示された(図 2)。

制限酵素は、エンドヌクレアーゼ活性によって DNA に損傷を与える酵素群(制限エンドヌクレアーゼ)であると考えられていたが、本研究により、一部の制限酵素は DNA グリコシラーゼ活性によって作用すること(制限 DNA グリコシラーゼ)を世界で初めて発見できた。

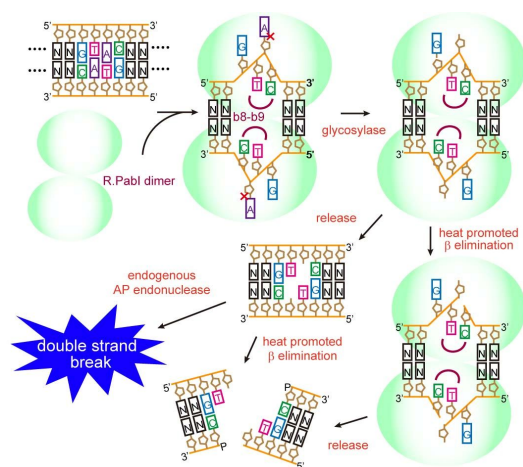


図 2 R.PabI による DNA 分解機構
(*Nat Commun.* 5, 3178 (2014))

(2) R.PabI による目的配列探索機構

制限酵素をはじめとした多くの配列特異的 DNA 結合タンパク質は、その認識配列をそれ以外の配列の中から効率よく探索する機構(facilitated diffusion)を持つことが知られている。R.PabI による目的配列探索機構を解明するため、R.PabI と目的配列を含まない二本鎖 DNA の複合体構造を、X 線結晶構造解析法により決定した。

R.PabI は、その認識配列と結合する際は、二量体としてふるまうが、それ以外の非特異的な配列を持つ二本鎖 DNA に対しては、ドーナツ型の四量体構造をとって二本鎖 DNA に結合することが、構造解析の結果示された(図 3)。R.PabI 変異体を用いたゲルシフトアッセイや酵素活性測定試験により、この配列非特異的の二本鎖 DNA 依存的な R.PabI₄ 量体形成が、R.PabI の facilitated diffusion に重要であることが示唆された。R.PabI は、4 量体として DNA 鎖上を移動し、その認識配列部位において二つの 2 量体へと別れ、酵素活性を示すことが示唆された。

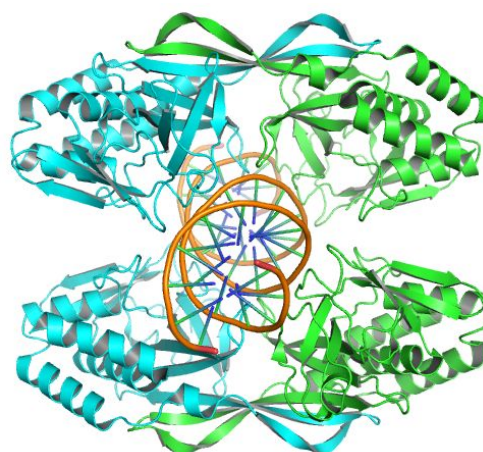


図 3 R.PabI-非特異的の二本鎖 DNA 複合体

(3) R.PabI-基質 DNA 複合体の構造解析

(1)及び(2)の研究により、R.PabI が目的配列を認識する前段階の構造、及び R.PabI と反応産物の複合体構造を明らかにすることができた。R.PabI による DNA 切断機構の全容を解明するために、活性部位に変異を導入し不活性化した R.PabI を用い、R.PabI-基質 DNA 複合体の構造解析を行った。その結果、R.PabI-基質 DNA 複合体の立体構造を 2.4 分解能で決定することに成功し、その特徴的な立体構造を明らかにすることに成功した。

(4) 病原菌由来 half pipe 型制限酵素の構造解析

大腸菌の異種タンパク質発現系を利用することにより、*H. pylori* 由来 half pipe 型制限酵素、*C. coli* 由来 half pipe 型制限酵素の大量調製を可能とした。また、これらのタンパク質の結晶化に成功し、*H. pylori* 由来 half pipe 型制限酵素結晶からは 3.5 分解能の X 線回折データを、*C. coli* 由来 half pipe 型制限酵素結晶からは、3.0 分解能の X 線回折データを取得できた。これらの X 線回折データを用いることにより病原菌由来 half pipe 型制限酵素の構造を決定することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Wang D, Miyazono K, Tanokura M. Tetrameric structure of the restriction DNA glycosylase R.PabI in complex with nonspecific double-stranded DNA. *Sci. Rep.* 6, 35197 (2016). 査読あり、DOI: 10.1038/srep35197
2. 宮園健一, 田之倉優. DNA グリコシラーゼ活性により作用を示す制限酵素の発見, 平成 26 年度低温センター年報 34-38 (2015). 査読なし
<http://www.crc.u-tokyo.ac.jp/publication/annualreport/parts/AnnualRepo>

- rt2014.pdf
3. Miyazono K, Tanokura M. Sequence-Specific DNA Glycosylase Found in a Restriction-Modification System. Photon Factory Activity Report 2013, Part A Highlight and Facility Report #31: 52-53 (2014). 査読なし
http://pfwww.kek.jp/acr2013pdf/part_a/partA_full_text.pdf
 4. Miyazono K, Furuta Y, Watanabe-Matsui M, Miyakawa T, Ito T, Kobayashi I, Tanokura M. A sequence-specific DNA glycosylase mediates restriction-modification in *Pyrococcus abyssi*. *Nat Commun.* 5, 3178 (2014). 査読あり,
DOI: 10.1038/ncomms4178

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 王徳龍・宮園健一・田之倉優、制限酵素 R.PabI と非特異的二本鎖 DNA の複合体立体構造解析、平成 27 年度日本結晶学会年会、2015 年 10 月 17 日-18 日、大阪府立大学(大阪府 堺市)
2. Miyazono K, Furuta Y, Watanabe-Matsui M, Miyakawa T, Ito T, Kobayashi I and Tanokura M. A sequence-specific DNA glycosylase mediates restriction-modification in *Pyrococcus abyssi*. The 29th European Crystallographic Meeting. 2015 年 8 月 23 日-28 日、ロヴィニ(クロアチア)
3. 宮園健一・田之倉優、DNA グリコシラーゼ活性により作用を示す制限酵素の発見、東京大学第 6 回低温センター研究交流会、2015 年 3 月 4 日、東京大学浅野キャンパス(東京都 文京区)
4. 王徳龍・宮園健一・田之倉優、制限酵素 R.PabI と非特異的二本鎖 DNA の複合体立体構造解析、平成 26 年度日本結晶学会年会、2014 年 11 月 1 日-3 日、東京大学農学部(東京都 文京区)
5. Miyazono K, Furuta Y, Watanabe-Matsui M, Miyakawa T, Ito T, Kobayashi I and Tanokura M. Sequence-specific DNA glycosylase found in a restriction-modification system. 23rd Congress and general assembly of the International Union of Crystallography. 2014 年 8 月 6 日-12 日、トロント(カナダ)

〔図書〕(計 0 件)

特になし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

特になし

取得状況(計 0 件)

特になし

〔その他〕

東京大大学院農学生命化学研究科プレスリリース

<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2016/20161015-1-.html>

<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2014/20140130-1.html>

東京大学 UTokyo Research

<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/a-new-concept-for-restriction-enzymes/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮園 健一(MIYAZONO, Ken-ichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号: 90554486