

令和元年6月11日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01815

研究課題名(和文) 金属依存性デアセチラーゼの触媒反応メカニズムの解明と阻害剤の開発

研究課題名(英文) Catalytic mechanism of metal-dependent deacetylase and its inhibitor

研究代表者

中村 努 (Nakamura, Tsutomu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：10357668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：CE-14ファミリーに属するデアセチラーゼPhDacと基質アナログとの複合体の立体構造を解明した。それにより、PhDacの基質認識と反応機構を明らかにした。PhDacの基質認識に関わるアミノ酸残基がCE-14ファミリー一般に空間的に保存されていたことから、この基質認識メカニズムがCE-14ファミリー一般に共有されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グラム陰性菌の細胞壁にはN-アセチルグルコサミン誘導体が含まれており、その脱アセチル化酵素(デアセチラーゼ)の阻害剤は抗菌活性が期待される。また、DAAIはD-アミノ酸の工業生産のさいの高額分割に利用可能であり、そのD-アミノ酸は化粧品や食品成分として注目されている。本研究成果は、これらの酵素の利用の基礎となるものである。また、金属依存性デアセチラーゼ一般のメカニズム解明に指針を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：We solved the tertiary structure of PhDac, which is categorized into CE-14 family, complexed with its substrate analog. This clarified the mechanism of substrate recognition and catalysis of PhDac. The amino acid residues involved in specific interaction with the substrate were spatially conserved in other CE-14 deacetylases, indicating that the substrate recognition mechanism was common in this family proteins.

研究分野：タンパク質科学、酵素学、構造生物学

キーワード：脱アセチル化酵素 反応中間体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

亜鉛を金属補因子とし N-アセチルグルコサミンのアセチル基を加水分解する一連の酵素は、立体構造解析をもとに、正四面体オキシアニオン中間体の安定化機構が推定されていた。しかし、明らかになっていた立体構造はすべて単体の構造であり、基質やアナログとの相互作用が構造解析により直接明らかになってはいなかった。また、CE-14 ファミリーのデアセチラーゼは非還元末端の N-アセチルグルコサミン残基に作用するのであるが、それを説明するメカニズムは提唱もされていなかった。

研究開始当初、我々は *Pyrococcus* 属の超好熱性古細菌 2 種の Dac (アポ型) の立体構造を解明したところであり、結晶中に含まれるリン酸イオンの電子密度から、正四面体オキシアニオン中間体の安定化機構を推定したところであった。

### 2. 研究の目的

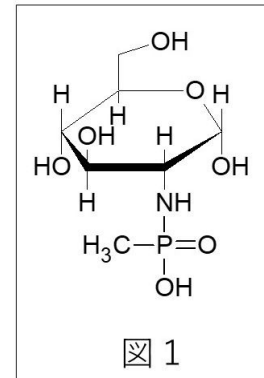
本研究は、N-アセチル基を加水分解する 2 種類の酵素 Dac と DAA をターゲットとし、その触媒気候と基質認識機構を明らかにすることを目的とした。また、デザインした阻害剤の利用法を検討するために、阻害剤としての機能を解明することをも目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Dac について

CE-14 ファミリーのデアセチラーゼは、基質の分子構造の一部に N-アセチルグルコサミンを含む。そのため、ファミリー酵素共通の反応中間体アナログとして、MPG を設計・合成した (図 1)。本研究では、*Pyrococcus horikoshii* 由来 Dac (PhDac) を MPG と共結晶化し、X 線結晶構造解析を行った。二糖基質を用いた時の Dac 触媒反応は、分子動力学計算によりシミュレーションした。

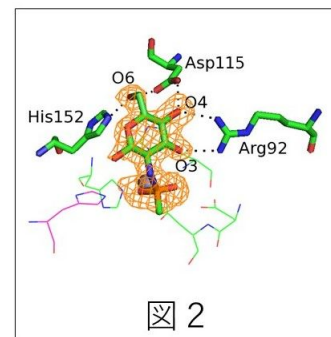
PhDac の酵素活性は、N-アセチルグルコサミンを基質とし、アミド部分に由来する光吸収をモニターすることによって測定した。それにより、MPG の阻害剤としての効果を測定した。



#### (2) DAA について

*Thermomicrobium roseum* 由来 DAA (Tr\_DAA) の酵素活性は、反応によって遊離する酢酸を酵素法で定量することによって測定した。大腸菌内で発現させた Tr\_DAA から変性条件下 EDTA により金属を除き、リフォールディング時の透析液に金属を添加することによって最適な補因子金属を探索した。また、複数の N-アセチル-D-アミノ酸存在下における酵素活性より、最適な基質を探索した。

*Pyrococcus abyssi* 由来 DAA (Pab\_ndaD) は、大腸菌における外来遺伝子発現のためのモデルタンパク質として用いた。大腸菌ゲノム中に同遺伝子をクローニングし、それによる発現量を従来のプラスミド発現量と比較した。



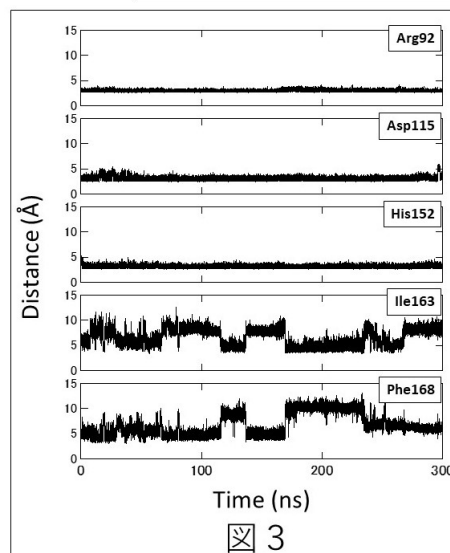
### 4. 研究成果

#### (1) Dac について

PhDac と MPG の複合体の立体構造を高分解能 (1.8 Å) で解明することができた。それにより、糖基質の水酸基と PhDac 基質結合部位のアミノ酸側鎖との特異的な相互作用が明らかになった。すなわち、Arg92, Asp115, His152 が 3 位、4 位、6 位の水酸基と水素結合していた (図 2)。このことから、Dac が非還元末端の N-アセチル基にのみ作用するメカニズムが解明された。これらのアミノ酸残基は CE-14 デアセチラーゼ一般に空間的に保存されていたことから、このメカニズムが CE-14 ファミリーデアセチラーゼ一般に適用できることが明らかになった。

分子動力学による PhDac と二糖基質 (ジアセチルキトビオース) の相互作用解析では、非還元末端側の糖残基が、結晶解析で明らかになった単糖基質の結合と同様に相互作用していた。還元末端側の糖残基は、PhDac の分子間クレフトに位置し、シミュレーション計算時間内に動きがあり (図 3) 特異的な相互作用を持たなかった。このことから、PhDac と二糖基質の結合は非還元末端側残基のみの相互作用で保たれていることが明らかになった。

MPG の阻害効果については、等モル比で酵素に結合すること、不可逆的に結合・阻害することが明らかになった。



## (2) DAA について

Tr\_DAA の金属補因子は Zn が最適であり、Mn, Co でも活性を保持した。N-アセチル-D-アミノ酸に対する特異性は、N-Ac-D-Lys, N-Ac-D-Asn, N-Ac-D-Arg などの親水性アミノ酸誘導体を基質とすることが明らかになった。Tr\_DAA は再現性よく結晶化するが、X線結晶構造解析では金属イオン付近の電子密度が不明瞭で、サンプル調製と結晶化の条件を改良する必要があった。Pab\_ndaD を大腸菌ゲノムに 1 コピー挿入して発現させると、プラスミドによる発現に比べて可溶性画分への発現が多かった。この方法による遺伝子発現量は、ゲノム中に挿入する箇所には依存せず、5 コピー程度までは挿入する遺伝子のコピー数に応じて増加することが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計5件)

Himiyama, T., Oshima, M., Uegaki, K., and Nakamura, T.  
“Distinct molecular assembly of homologous peroxiredoxins from *Pyrococcus horikoshii* and *Thermococcus kodakaraensis*”  
Journal of Biochemistry, in press  
DOI: 10.1093/jb/mvz013

Nakamura, T., Koma, D., Oshima, M., Hoshino, H., Ohmoto, T., and Uegaki, K.  
“Application of chromosomal gene insertion into *Escherichia coli* for expression of recombinant proteins”  
Journal of Bioscience and Bioengineering 126, 266-272 (2018)  
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.02.016

Nakamura, T., Oshima, M., Yasuda, M., Shimamura, A., Morita, J., and Uegaki, K.  
“Alteration of molecular assembly of peroxiredoxins from hyperthermophilic archaea”  
Journal of Biochemistry 162, 415-422 (2017)  
DOI: 10.1093/jb/mvx045

Nakamura, T., Yonezawa, Y., Tsuchiya, Y., Niiyama, M., Ida, K., Oshima, M., Morita, J., Uegaki, K.  
“Substrate recognition of N,N -diacetylchitobiose deacetylase from *Pyrococcus horikoshii*”  
Journal of Structural Biology 195, 286-293 (2016)  
DOI: 10.1016/j.jsb.2016.07.015

Nakamura, T., Niiyama, M., Hashimoto, W., Ida, K., Abe, M., Morita, J., and Uegaki, K.  
“Multiple crystal forms of N,N -diacetylchitobiose deacetylase from *Pyrococcus furiosus*”  
Acta Crystallographica Section F 71, 657-662 (2015)  
DOI: 10.1107/S2053230X15005695

### [学会発表](計15件)

下澤 勇弥、西矢 芳昭、佐々本 康平、氷見山 幹基、中村 努  
「リンゴ酸デヒドロゲナーゼの構造変化と基質認識メカニズムの関係」  
日本農芸化学会 2019 年度大会 (2019)

佐々本 康平、森芳 邦彦、大本 貴士、上垣 浩一、西矢 芳昭、中村 努  
「*Caldanaerobacter subterraneus* 由来 CE-4 酵素のドメインマッピング」  
日本農芸化学会 2019 年度大会 (2019)

Nakamura, T., Himiyama, T., Oshima, M., and Uegaki, K.  
“Decameric and dodecameric structures of archaeal peroxiredoxins”  
AsCA2018, Auckland, New Zealand (2018)

中村 努、駒 大輔、大嶋 真紀、星野 英人、大本 貴士、上垣 浩一  
「大腸菌染色体挿入による組換えタンパク質発現」  
第 18 回日本蛋白質科学会年会 (2018)

Nakamura, T., Oshima, M., and Uegaki, K.  
“Molecular assembly of peroxiredoxin”  
42nd FEBS Congress, Jerusalem, Israel (2017)

中村 努、大嶋 真紀、上垣 浩一  
「ペルオキシレドキシンの会合状態の変換」  
第 17 回日本蛋白質科学会年会 (2017)

Nakamura, T., Oshima, M., and Uegaki, K.  
“Conversion of molecular assembly of peroxiredoxin”  
24th Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography,  
Hyderabad, India (2017)

Nakamura, T.  
“Designing an inhibitor of CE-14 deacetylase by crystallographic study”  
NSTDA-AIST Joint Symposium on Bio-Innovations, Bangkok, Thailand (2017)

Nakamura, T., Yonezawa, Y., Tsuchiya, Y., Niiyama, M., Oshima, M., and Uegaki, K.  
“Substrate recognition of CE-14 family enzymes”  
AsCA2016 (Asian Crystallographic Association), Hanoi, Vietnam (2016)

中村 努、大嶋 真紀、上垣 浩一  
「ペルオキシレドキシンの分子集合」  
日本結晶学会平成 28 年度年会(2016)

中村 努、米澤 康滋、土屋 裕子、新山 真由美、大嶋 真紀、上垣 浩一  
「CE-14 ファミリー酵素の基質結合」  
第 16 回日本蛋白質科学会年会 (2016)

中村 努、新山 真由美、井田 くるみ、大嶋 真紀、森田 潤司、上垣 浩一  
「CE-14family デアセチラーゼの基質認識」  
日本農芸化学会 2016 年度大会 (2016)

Nakamura, T., Abe, M., and Inoue, T.  
“Hypervalent sulfur compound in protein reaction”  
Pacifichem2015, Honolulu, USA (2015)

Nakamura, T., Niiyama, M., and Uegaki, K.  
“Crystal structure and multiple crystal forms of archaeal N,N -diacetylchitobiose  
deacetylase”  
AsCA2015 (Asian Crystallographic Association), Kolkata, India (2015)

中村 努、新山 真由美、井田 くるみ、森田 潤司、上垣 浩一  
「N,N -ジアセチルキトビオースデアセチラーゼの基質認識」  
第 15 回日本蛋白質科学会年会 (2015)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：N , N ' - ジアセチルキトビオースデアセチラーゼ阻害剤及び新規化合物  
発明者：中村 努、上垣 浩一  
権利者：産業技術総合研究所  
種類：特許  
番号：6416001

取得年：2018 年  
国内外の別： 国内

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：上垣 浩一  
ローマ字氏名：UEGAKI, koichi  
所属研究機関名：近畿大学  
部局名：農学部  
職名：教授  
研究者番号（8桁）: 00356544

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：中山 敦好  
ローマ字氏名：NAKAYAMA, atsuyoshi  
  
研究協力者氏名：松村 浩由  
ローマ字氏名：MATSUMURA, hiroyoshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。