

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15095

研究課題名(和文)モノADPリボシル化毒素に不可欠な2種類の特異性を理解する

研究課題名(英文)Two kinds of specificities essential for mono-ADP-ribosyltransferase reaction.

研究代表者

吉田 徹 (YOSHIDA, Toru)

京都産業大学・総合生命科学部・研究員

研究者番号：30724546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ADPリボシル化反応はタンパク質の翻訳後修飾反応と考えられてきたが、近年になって、DNAもまたADPリボシル化されることが分かってきた。本研究では、GDPをADPリボシル化する酵素ScARPに着目し、ScARPによるGDPの認識機構を分子レベルで明らかにした。その結果、ADPリボシル化酵素は、タンパク質およびDNAを同じ仕組みを利用して認識していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来明らかにされてこなかった、DNAを基質とするADPリボシル化酵素の基質認識機構を解明した。これは、毒素として機能するものが多いADPリボシル化酵素について、その毒性発揮機構を理解する上で重要である。また本研究では、基質特異性だけでなく、どのように基質中の特定の原子が認識されてADPリボシル化されるのか、についても解明することが出来た。これは、ADPリボシル化酵素だけでなく、全ての翻訳後修飾酵素がどのように特定のアミノ酸のみを修飾するのかを理解する上で重要である。

研究成果の概要(英文)：ADP-ribosylation is an important post-translational modification of protein. However, recent researches show that DNA is also ADP-ribosylated. ScARP from *Streptomyces coelicolor* ADP-ribosylates guanine. In this study, I revealed how ScARP recognizes GDP using X-ray crystallography. The ternary complex structure of ScARP, GDP, and NAD show that the recognition mechanisms of protein and DNA are common.

研究分野：生化学、構造生物学

キーワード：ADPリボシル化 基質特異性 X線結晶構造解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原性細菌が産生する毒素である mono-ADP リボシル基転移酵素 (mART) は、NAD⁺ を利用して基質に ADP リボースを付加する。様々な種類が知られているが、みなよく似た構造を示す。しかし、その基質は様々であり、さらに、ADP リボシル基を付加する分子もまた様々である。例えば、mART である Ia は、基質タンパク質であるアクチンの Arg177 を ADP リボシル化する。その一方で、mART である C3 は、基質タンパク質である RhoA の Asn41 を ADP リボシル化する。様々な mART がどのように異なる基質を識別しているのか、また、どのように ADP リボースを付加するアミノ酸残基を識別しているのかはよく分かっていない。

これまで、ADP リボースを付加するアミノ酸残基は、mART に保存された ARTT-loop と呼ばれるモチーフによって決定されると考えられてきた。ARTT-loop は ϕ -X-X-Q/E-X-E (ϕ : Phe, Tyr, or Trp) の 6 アミノ酸で構成されるモチーフであり、4 番目のアミノ酸残基としてグルタミンを持つ mART はアスパラギンを、グルタミン酸を持つ mART はアルギニンを、それぞれ ADP リボシル化する。そのため、グルタミン側鎖がアスパラギン側鎖を、グルタミン酸側鎖がアルギニン側鎖を、2 本の水素結合により認識していると考えられてきた。

ARTT-loop による認識を立証するために、今まで Ia-Actin-NAD 複合体、さらに、C3-RhoA-NAD 複合体の結晶構造が明らかにされてきた。C3 においては仮説通り、ARTT-loop の 4 番目のアミノ酸であるグルタミンが、RhoA の Asn41 と水素結合を形成していた。しかし Ia においては、ARTT-loop の 4 番目のアミノ酸であるグルタミン酸は、アクチンの Arg177 と離れていた。また、Arg177 は Ia のどのアミノ酸とも相互作用していなかった。そのため、ARTT-loop による認識が様々な mART に対して成り立つのかどうかは議論の余地がある。

2. 研究の目的

近年、タンパク質ではなく DNA もまた ADP リボシル化されることが分かってきた。そこで本研究では、DNA (グアニン) を基質として利用する mART である ScARP について、基質 DNA との複合体の構造を明らかにすることで、その基質認識機構を解明することを目的とした。本研究により、構造のよく似た様々な mART がどのように基質特異性を発揮しているのか、また、どのように ADP リボシル基を付加するアミノ酸残基 (DNA を基質とする場合は官能基) を識別しているのか、という 2 点の理解を目指す。

3. 研究の方法

mART である ScARP、基質 DNA、NAD の 3 者複合体の結晶構造解析に取り組んだ。ScARP はシグナル配列を除いた領域を大腸菌を用いて発現させ、精製した。基質となる DNA は guanosine, GMP, GDP, GTP など複数の種類を試みた。NAD⁺ を用いると反応が進行してしまうので、アナログである NADH を用いた。複合体構造から明らかになった重要なアミノ酸については、その重要性を生化学実験によって確認した。具体的には、重要なアミノ酸の変異体を精製し、反応が進行するかどうかを HPLC によって確認した。

4. 研究成果

(1) ScARP、GDP、NADH の 3 者複合体の結晶構造解析

ScARP、GDP、NADH の 3 者複合体の結晶構造を 1.6 Å の分解能で明らかにした。結晶化の際は、品質の悪い結晶をもとにした microseed matrix screening を行うことで、最終的に空間群の異なる 2 種類の高分解能結晶を得ることが出来た。両方の結晶を構造解析した結果、一方は ScARP、NADH の 2 者複合体結晶であり、もう一方が 3 者複合体であった。3 者複合体の構造から、ARTT-loop の 4 番目のアミノ酸残基であるグルタミン残基が、基質 GDP において ADP リボースを付加されるアミノ基を、2 本の水素結合によって認識していることが明らかになった (図 1)。これは、ARTT-loop による認識機構の仮説を裏付けるものである。

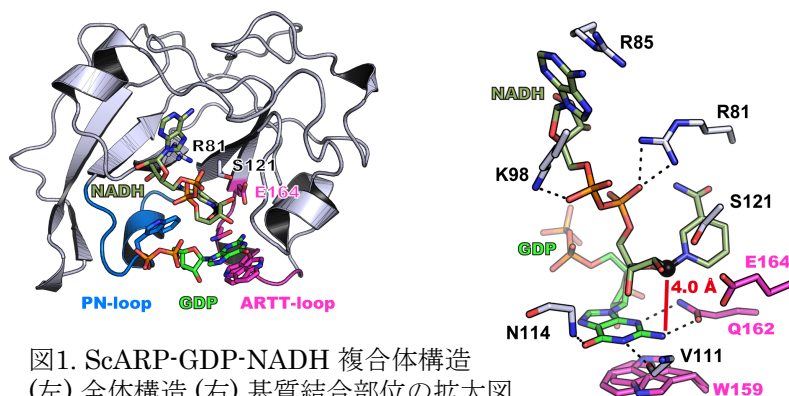


図1. ScARP-GDP-NADH 複合体構造
(左) 全体構造 (右) 基質結合部位の拡大図

(2) ScARP と C3 の比較

本研究により、タンパク質を標的とする C3 と、DNA を標的とする ScARP について、基質認識機構を比較することが初めて可能となった。驚くべきことに C3 と ScARP は、ARTT-loop を介した同じ仕組みにより、ADP リボースを付加するアミノ酸残基 (ScARP の場合はアミノ基) を認識していた。これは、ARTT-loop による ADP リボースを付加するアミノ酸残基 (ScARP の場合はアミノ基) の識別が、mART において普遍的である可能性を示唆している。

(3) 今後の展望

ScARP と C3 において ARTT-loop の役割が明らかになったが、Ia における役割ははっきりしないままである。また、システインやスレオニンを ADP リボシル化する mART も知られており、それらアミノ酸残基がどのように識別されているのかはほとんど分かっていない。今後、これらの mART の研究を進めることで、構造のよく似た様々な mART がどのように基質特異性を発揮しているのか、また、どのように ADP リボシル基を付加するアミノ酸残基 (DNA を基質とする場合は官能基) を識別しているのか、という 2 点の理解がさらに深まると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida Toru, Tsuge Hideaki	4. 巻 293
2. 論文標題 Substrate N2 atom recognition mechanism in pierisin family DNA-targeting, guanine-specific ADP-ribosyltransferase ScARP	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13768 ~ 13774
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.AC118.004412	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshida Toru, Tsuge Hideaki
2. 発表標題 Substrate and target atom recognition mechanism of guanine-specific ADP-ribosyltransferase
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshida Toru, Tsuge Hideaki
2. 発表標題 Substrate recognition and reaction mechanism of DNA-targeting guanine-specific ADP-ribosyltransferase
3. 学会等名 International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave"（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大学のニュースに研究成果を紹介
https://www.kyoto-su.ac.jp/news/20180807_400n_news.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----