

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20780066

研究課題名（和文） 結核菌における特異なポリリン酸利用能の解析とその応用

研究課題名（英文） Analysis and application of the availability of an inorganic polyphosphate specific to *Mycobacterium tuberculosis*

研究代表者

森 茂太郎 (MORI SHIGETAROU)

国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官

研究者番号：60425676

研究成果の概要（和文）：ポリリン酸に関連するタンパク質として、結核菌由来機能未知遺伝子 *Rv2613c* がコードするタンパク質を選び、その機能と構造を解析した。その結果、本タンパク質は diadenosine polyphosphate (Ap<sub>n</sub>A) 加リン酸分解酵素であることが示された。また、本酵素は他の Ap<sub>n</sub>A を基質として利用する酵素とは異なる特徴的な 4 量体構造を形成しており、この 4 量体構造が活性の発現には必須であることを示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, the function and structure of a polyphosphate-related protein—*Rv2613c*—was analyzed. This protein is encoded by *Rv2613c*, a gene that is found in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and has unknown function. The results showed that *Rv2613c* has diadenosine polyphosphate (Ap<sub>n</sub>A) phosphorylase activity. Furthermore, *Rv2613c* was found to have a tetrameric structure that is unique among enzymes that use Ap<sub>n</sub>A as a substrate, and it was found that the formation of the tetrameric structure of *Rv2613c* is essential for its enzymatic activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	0	900,000
2009年度	800,000	0	800,000
2010年度	800,000	0	800,000
2011年度	800,000	0	800,000
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：結核菌、ヌクレオチド、加リン酸分解、遺伝子、タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

結核菌は、ヒトに対して重篤な感染症である結核症を引き起こす病原菌である。結核菌に特異的な細胞壁構造や宿主との免疫応答に関する研究は古くから行われているものの、結核菌の病原性や生理機能の全容を解明するまでには至っていない。また、結核菌の全ゲノムは 1998 年に決定されたが (*Nature* **393**, 537-544)、今なおゲノム上には機能未知遺伝子が多数残されている。従って、これら

の機能未知遺伝子の中には、結核菌の病原性や生理機能に深く関わっている遺伝子が含まれていると考えられており、機能未知遺伝子に関する詳細な研究が求められている。

一方、これまでに研究代表者らは、結核菌が他の生物種とは異なり、ポリリン酸を ATP の代わりにリン酸供与体として利用することができることを明らかにしてきた (*J. Biol. Chem.* **280**, 104-112)。結核菌のゲノム上に存在する機能未知遺伝子の一部は、こうした結

核菌に特異的なポリリン酸利用能に関わっていることも予想される。

さらに、結核菌に特異的な遺伝子やタンパク質は、新規抗結核薬の格好の標的分子として考えられている。多剤耐性結核菌の出現と拡散が世界中で大きな問題となっていることから、新規抗結核薬の開発につながる応用研究は、特に臨床現場から強く望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、ポリリン酸に関連するタンパク質として、結核菌のゲノム上に存在する機能未知遺伝子である *Rv2613c* がコードするタンパク質に着目し、その機能と構造を明らかにするとともに、機能構造相関解析を行うことにより、結核菌の病原性や生理機能に関する新しい知見を得ることを目的としている。また、本研究で得られた知見を応用して、新規抗結核薬の開発につなげることも目標としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 「*Rv2613c* の発現、精製、及び機能解析」

結核菌のゲノム上に存在する *Rv2613c* 遺伝子がコードするタンパク質について、大腸菌内で大量発現させた後、FPLC を用いて SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製を行った。HPLC を用いて精製 *Rv2613c* の酵素活性を測定し、酵素学的諸性質の決定、並びに速度論的解析を行った。

### (2) 「*Rv2613c* の結晶化と立体構造解析」

*Rv2613c* の結晶化条件は、市販の結晶化スクリーニングキットを用いて決定した。得られた結晶を用いて Photon Factory で測定を行い、回折データの収集を行った。得られたデータを基に *Rv2613c* の結晶学的諸性質を決定した。また、メチオニンをセレノメチオニンに置換した *Rv2613c* 変異体を用いた単波長異常分散法により、初期位相を決定した。その後、コンピューター上で立体構造のモデリングと精密化を繰り返すことによって、最終的なモデルを構築した。

### (3) 「*Rv2613c* の機能構造相関解析」

*Rv2613c* の立体構造解析結果と diadenosine polyphosphate ( $Ap_nA$ ) 加水分解酵素の立体構造情報から、*Rv2613c* の活性発現に重要な役割を果たしていると考えられるアミノ残基を推定した。選んだアミノ酸残基を置換した変異体を作成してその活性を野生株の活性と比較することによって、*Rv2613c* の活性発現に重要なアミノ酸残基を特定した。

## 4. 研究成果

### (1) 「*Rv2613c* の機能解析」

*Rv2613c* はアミノ酸配列上にヒスチジン残基を3つ含む Histidine triad motif が存在しているため、基質である  $Ap_nA$  に対して加水分

解活性を示すことが予想されていた。しかしながら、本研究で *Rv2613c* の大量発現株の構築と精製を行い、その酵素活性を測定したところ、リン酸存在下において基質である  $Ap_nA$  に対して加リン酸分解活性を示すことが明らかとなった (図1)。従って、*Rv2613c* は加水分解酵素ではなく、加リン酸分解酵素であることが初めて示された。

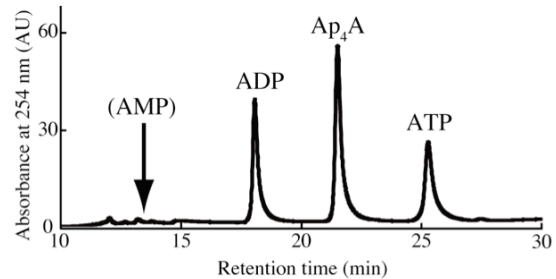


図1: HPLC による *Rv2613c* の活性測定結果 ( $Ap_4A$  を基質として ATP と ADP を生成する加リン酸分解反応を示すが、加水分解反応の場合の生成物である AMP は生成しない。)

*Rv2613c* はリン酸の鎖長がそれぞれ 4 と 5 である  $Ap_4A$  と  $Ap_5A$  に対して高い活性を示した。また、至適 pH は 8.0、至適温度は 30°C であり、活性の発現には 2 価の金属イオンが必須であった。さらにゲルろ過カラムの結果より、*Rv2613c* は溶液中で 4 量体を形成して活性を保持していることが示された。

### (2) 「*Rv2613c* の立体構造解析」

X 線結晶構造解析により、*Rv2613c* の立体構造を決定した。*Rv2613c* は C 末端側に  $\alpha/\beta$  ドメイン構造を有しており、これまでに  $Ap_nA$  加水分解酵素において見いだされていた  $\alpha/\beta$  ドメイン構造と非常に良く似ていた (図2)。その一方、活性中心部位に存在している3つのアミノ酸残基 (*Rv2613c* では Asn-139、Gly-146、及び Ser-147 残基) の種類が、*Rv2613c* と  $Ap_nA$  加水分解酵素とは異なっていた (図3)。また、 $Ap_nA$  加水分解酵素は 2 量体であるのに対して、*Rv2613c* は溶液中と同様に結晶中でも 4 量体を形成していた (図4)。

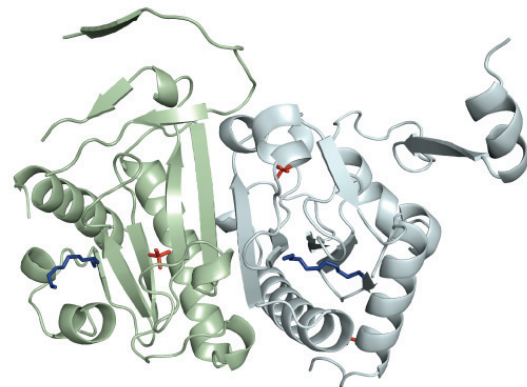


図2: *Rv2613c* の立体構造 (サブユニット2個分の立体構造。)

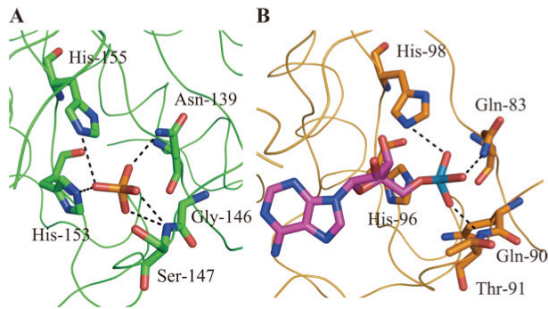


図 3 : Rv2613c (A) と Ap<sub>n</sub>A 加水分解酵素 (B) の活性中心部位

(Rv2613c ではリン酸が、Ap<sub>n</sub>A 加水分解酵素では AMW が活性中心部位に結合している。Rv2613c では Asn-139、Gly-146、及び Ser-147 残基が位置している部位に、Ap<sub>n</sub>A 加水分解酵素ではそれぞれ Gln-83、Gln-90、及び Thr-91 残基が位置している。)

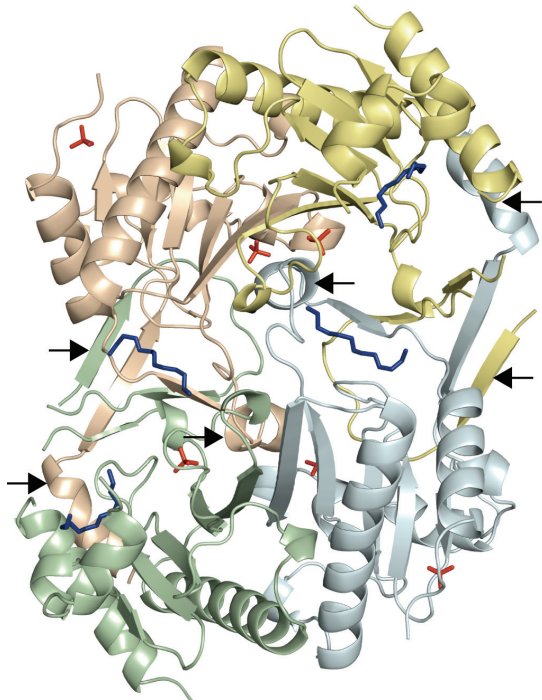


図 4 : Rv2613c の四量体構造 (図 2 で示したサブユニット 2 個分ずつが矢印の部分で結合している。)

### (3) 「Rv2613c の機能構造相関解析」

Rv2613c の活性中心部位に存在するアミノ酸残基、Asn-139、Gly-146、及び Ser-147 残基をそれぞれ置換した変異体を作製した。その結果、Asn-139 残基を Ala 残基 (N139A)、もしくは Ap<sub>n</sub>A 加水分解酵素と同様の Gln 残基 (N139Q) に置換したところ、その活性は完全に失われた (Table 1)。また、Gly-146 残基を Ap<sub>n</sub>A 加水分解酵素と同様の Gln 残基 (G146Q) に置換した変異体、並びに Ser-147 残基を Ala 残基 (S147A)、もしくは Ap<sub>n</sub>A 加水分解酵素と同様の Thr 残基 (S147T) に置

換した変異体の活性は、野生型を比較して著しく低下していた (Table 1)。従って、Asn-139、Gly-146、及び Ser-147 残基は Rv2613c の活性発現に重要な役割を果たしており、特に Asn-139 残基は活性の発現に必須であることが明らかとなった。

Table 1 野生型と変異体の活性

Enzyme	Activity (U/mg)
Wild-type	8.69
N139A	Not Detected (ND)
N139Q	ND
G146Q	1.19
S147A	0.96
S147T	1.92
W160A	ND

さらに G146Q 変異体の活性測定を行った結果、Ap<sub>4</sub>A を基質とした場合に生成物として ATP と ADP 以外に AMP も検出された (図 5)。このことから、G146Q 変異体は加リン酸分解活性だけではなく加水分解活性も一部示す様になったと考えられた。従って、Gly-146 残基は Rv2613c の加リン酸分解活性を規定している重要な残基であることが示唆された。

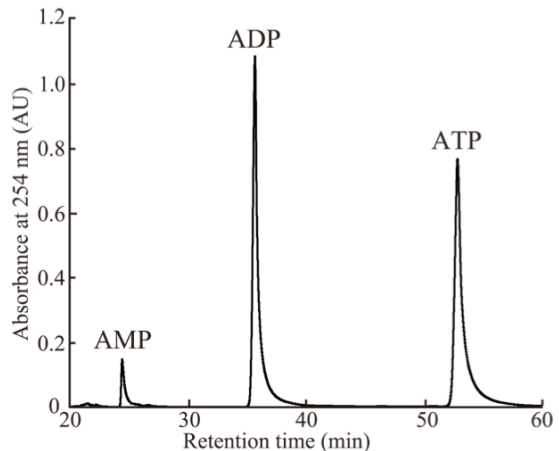


図 5 : HPLC による G146Q 変異体の活性測定結果

一方、コンピューター上で Rv2613c の立体構造に基質である Ap<sub>4</sub>A を結合させてみたところ、Rv2613c はサブユニット間の結合を利用して基質結合部位を形成していることが示された (図 6)。さらに、活性中心部位が存在しているサブユニットとは別のサブユニット上にある Trp-160 残基が基質結合部位の形成に関与していることが推測された。そこで、この Trp-160 残基を Ala 残基 (W160A) に置換したところ、その活性は完全に失われ



た (Table 1)。従って、4 量体構造を利用した基質結合部位形成と Trp-160 残基が Rv2613c の活性発現に必須であることが示された。

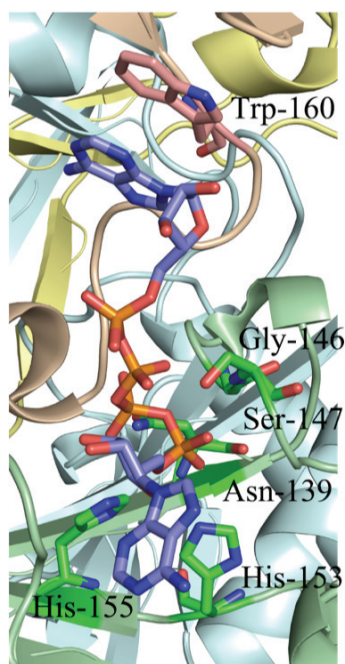


図 6 : Rv2613c における基質結合部位の予想図

#### (4) 「応用研究と今後の展望」

Rv2613c の機能構造相関解析結果より、Rv2613c の特徴的な 4 量体構造と Trp-160 残基が活性の発現に必須であることが示された。これまでの報告から、Rv2613c 以外の  $A_p_nA$  を基質として利用する酵素 (加リン酸分解酵素・加水分解酵素) は単量体、もしくは 2 量体でその活性を保持していること、並びに Trp-160 残基は Rv2613c 以外の酵素間では保存されていないことから、Rv2613c の 4 量体構造、特に Trp-160 近傍の構造を標的的部位とすることによって、Rv2613c の活性を特異的に阻害する化合物のデザインが可能であることが予想された。そこで、コンピューター上で Trp-160 残基近傍の構造に特異的に結合する化合物を探索したところ、複数の化合物が候補として見いだされた。

Rv2613 遺伝子を破壊すると結核菌の生育能は著しく低下するため、Rv2613c の活性を特異的に阻害する化合物は新規抗結核薬の候補として期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Shigetarou Mori, keigo Shibayama, Jun-Ichi Wachino, and Yoshichika

Arakawa. Structural insights into the novel diadenosine 5',5'''- $P^1,P^4$ -tetrphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Journal of Molecular Biology*, 410:93-104, 2011. 査読あり. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.04.059

- ② Shigetarou Mori, keigo Shibayama, Jun-Ichi Wachino, and Yoshichika Arakawa. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the diadenosine 5',5'''- $P^1,P^4$ -tetrphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Acta Crystallographica Section F*, 66:279-281, 2010. 査読あり. DOI: 10.1107/S174430910905444X

- ③ Shigetarou Mori, keigo Shibayama, Jun-Ichi Wachino, and Yoshichika Arakawa. Purification and molecular characterization of a novel diadenosine 5',5'''- $P^1,P^4$ -tetrphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Protein Expression and Purification*, 69:99-105, 2010. 査読あり. DOI: 10.1016/j.pep.2009.09.010

[学会発表] (計 8 件)

- ① °森茂太郎, 柴山恵吾, 和知野純一, 荒川宜親. 結核菌由来新規 diadenosine 5',5'''- $P^1,P^4$ -tetrphosphate 加リン酸分解酵素の活性発現に関わる構造的要因の解明. 第 63 回日本生物工学大会, 2011 年 9 月 26 日, 東京農工大学(東京都).

- ② °Shigetarou Mori, keigo Shibayama, Jun-Ichi Wachino, and Yoshichika Arakawa. Structural Insights into the Novel Diadenosine Tetrphosphate Phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2011 年 9 月 10 日, 札幌コンベンションセンター(北海道).

- ③ °森茂太郎, 柴山恵吾, 和知野純一, 荒川宜親. 結核菌由来新規 diadenosine 5',5'''- $P^1,P^4$ -tetrphosphate 加リン酸分解酵素の機能構造相関解析. 第 62 回日本生物工学会大会, 2010 年 10 月 29 日, 宮崎シーガイア(宮崎県).

- ④ °森茂太郎, 柴山恵吾, 和知野純一, 荒川宜親. 結核菌由来新規 diadenosine 5',5'''- $P^1,P^4$ -tetrphosphate 加リン酸分解酵素の構造と機能の相関解析. 第 93 回日本細菌学会関東支部総会, 2010 年 10 月 21 日, 京王プラザホテル(東京都).

- ⑤ °Shigetrou Mori, keigo Shibayama, Jun-Ichi Wachino, and Yoshichika Arakawa. Cloning, purification, and molecular characterization of a novel diadenosine 5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-tetrphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. The 110<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology, 2010年5月27日, San Diego Convention Center (USA).
- ⑥ °森茂太郎, 柴山恵吾, 和知野純一, 荒川宜親. 結核菌由来新規 diadenosine 5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-tetrphosphate 加リン酸分解酵素の結晶構造解析. 日本農芸化学会 2010年度大会, 2010年3月29日, 東京大学(東京都).
- ⑦ °森茂太郎, 柴山恵吾, 和知野純一, 朴貞玉, 荒川宜親. 結核菌由来新規ヌクレオチド加水分解酵素の機能解析. 日本農芸化学会 2009年度大会, 2009年3月29日, 福岡国際会議場(福岡県).
- ⑧ °森茂太郎, 柴山恵吾, 和知野純一, 朴貞玉, 荒川宜親. 結核菌由来の新規ヌクレオチド加水分解酵素に関する研究. 第82回日本細菌学会総会, 2009年3月13日, 名古屋国際会議場(愛知県).

[その他]

ホームページ等

- ① Shigetrou Mori, keigo Shibayama, Jun-Ichi Wachino, and Yoshichika Arakawa. Crystallographic analysis of diadenosine 5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-tetrphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Photon Factory Activity Report 2009 #27 Part B (2010), P228.
- ② Shigetrou Mori, keigo Shibayama, Jun-Ichi Wachino, and Yoshichika Arakawa. Crystal structure of a novel diadenosine 5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-tetrphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Photon Factory Activity Report 2010 #28 Part B (2011), P260.
- ③ Shigetrou Mori, keigo Shibayama, Jun-Ichi Wachino, and Yoshichika Arakawa. Crystal Structure of a Novel Diadenosine 5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-Tetrphosphate Phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. PDB ID: 3ANO, 2011年5月18日.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

森 茂太郎 (MORI SHIGETAROU)

国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究

官

研究者番号 : 60425676

### (2)研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3)連携研究者

( )

研究者番号 :