

平成22年 5月10日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790035

研究課題名 (和文) 感染症治療薬の開発を指向した D-Ala-D-Ala リガーゼの構造解析

研究課題名 (英文) Structural study of D-Ala-D-Ala ligase to develop new antibiotics

研究代表者

的場 康幸 (MATOBA YASUYUKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90363051

研究成果の概要 (和文) : D-サイクロセリン (DCS) 耐性の D-Ala-D-Ala リガーゼを研究対象として、本酵素の DCS 耐性機構を構造学的見地から明らかにすることを目的とした。アミノ酸配列から考えると、他の DCS 感受性 D-Ala-D-Ala リガーゼの基質結合部位に共通して存在しているチロシン残基が、本酵素ではフェニルアラニン (Phe246) となっている。本研究では、この Phe246 が DCS 耐性に寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : The aim of this study is to clarify the structural basis of D-cycloserine (DCS) resistance of DCS-resistant D-Ala-D-Ala ligase. From the amino acid sequence analysis, it was found that Tyr residue in the substrate-binding pocket, which is conserved among DCS-sensitive D-Ala-D-Ala ligases, is replaced by Phe residue in the DCS-resistant D-Ala-D-Ala ligase. In this study, it was proved that the Phe residue contributes to the DCS-resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：構造生物, 抗生物質, 酵素, ドラッグデザイン

## 1. 研究開始当初の背景

抗生物質とは、微生物によって合成され、微生物やその他の細胞等の成長を阻害する物質である。1929年、Alexander Flemingにより青カビの生産するペニシリンが発見されて以来、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリンなど、様々な抗生物質が発見された。しかし、これらの薬剤

の乱用が抗生物質の効かない耐性菌の出現をもたらしてしまったのも事実である。特に、多剤耐性菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) や、バンコマイシンに対して耐性を獲得した腸球菌 (VRE) の出現は、临床上ではもちろん、社会的にも大きな問題となっている。

VREは欧米で1988年頃から院内感染の起因菌として問題になりはじめ、日本国内では1996年に初めて確認された。VREが問題とされる理由のひとつに、バンコマイシン耐性遺伝子がプラスミドに存在することである。すなわちこのプラスミドを介して他のグラム陽性菌にも耐性が移ることが十分に考えられる。バンコマイシンは数少ないMRSAの有効治療薬と考えられているが、もしこの耐性遺伝子がMRSAに伝達されたならば、MRSAに対する治療法が無くなってしまいう可能性がある。

抗生物質は微生物の発育を阻害する物質であるが、その生産菌は自らが合成する抗生物質によって死滅することはない。これは抗生物質生産菌の自己産生物質に対する生体防御機構によるもので、これを『自己耐性 (self-resistance)』と呼ぶ。この自己耐性機構の解明は、抗生物質感受性菌がどのようにして耐性機構を獲得するのかを予測し、抗生物質耐性菌に対する新たな医薬品の開発や治療法を確立する上で重要な知見を与えると考えられる。

申請者は、D-サイクロセリン (DCS) 生産菌における自己耐性機構の解明をテーマに研究を進めてきた。DCSは、放線菌 *Streptomyces (S.) lavendulae* や *S. galyphalus* により生産される抗生物質であり、主に結核の治療薬として用いられている。DCSは結核菌に対して有効な二次選択剤であり、一次抗結核薬であるリファンピシンやイソニアジドなどとの併用が、薬剤耐性結核菌の治療において有効である。しかしながら、DCSは抗結核剤として有効ではあるものの、副作用として種々の神経障害を発現するため、臨床での処方ほとんど無い。にもかかわらず、DCSはその特徴的な構造から、新世代抗生物質開発のための有力なリード化合物の候補であるといえる。

DCSの作用機序は細胞壁合成阻害である。細菌には細胞膜の外側に細胞壁がある。この細胞壁は、細菌の形態を保ち外部の環境から細胞内を保護する役割を果たしている。細胞壁の基本構造をなすペプチドグリカンには、2種類の糖 *N*-アセチルムラミン酸 (MurNAc) と *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の繰り返し構造からなる直列と、MurNAcに結合したペプチド鎖の縦列により構成されている。ペプチドグリカンの構造は細菌の種や属により異なり、確定されていないものもあるが、D-アミノ酸を持つことが特徴的である。ペプチドグリカンの前駆体である UDP-MurNAc-pentapeptide の合成にはアラニンラ

セマーゼ (ALR), D-Ala-D-Ala リガーゼ (DDL), および、D-Ala-D-Ala 付加酵素が関与している。詳しく言えば、まずALRの作用によりL-AlaがD-Alaに変換され、続いてDDLによりジペプチドであるD-Ala-D-Alaが合成され、それがD-Ala-D-Ala付加酵素によりUDP-MurNAc-tripeptideに組み込まれ、UDP-MurNAc-pentapeptideが生成する。DCSは、D-Alaと構造類似性をもつため、ALRおよびDDLに対して拮抗阻害を示すことで細胞壁合成を阻害する。

一方、バンコマイシンは、芳香族アミノ酸を含むアミノ酸7個のペプチドにアミノ糖が付加されたグリコペプチド系抗生物質である。本抗生物質もDCSと同じく、細菌細胞壁の合成阻害作用を持つが、その作用機序は全く異なる。バンコマイシンはペプチドグリカン前駆体中のpentapeptide末端のD-Ala-D-Alaに対して、水素結合5つで結合する。このために細胞壁合成系はストップしてしまい、細菌細胞は死滅することになる。これに対して耐性菌では、D-Ala-D-Alaの部分をD-Ala-D-lactateやD-Ala-D-Serにかえることでバンコマイシンとの結合性を低下させる。バンコマイシン耐性遺伝子のひとつ *vanA* はD-Ala-D-lactateリガーゼ (VanA) をコードする遺伝子である。VanAと種々の細菌由来DDLとの間にはアミノ酸配列および三次元構造上の相同性がある。また、VanAもD-Alaを利用する酵素であり、その酵素活性はDCSによって確かに抑制されることが報告されている。

## 2. 研究の目的

本研究室ではこれまでに、DCS 生産菌 *S. lavendulae* ATCC25233 の染色体 DNA からDCSのターゲット酵素であるALRおよびDDLの遺伝子をクローニングした。また、反応速度論的解析より、両酵素はDCSによって阻害を受けにくく、自己耐性因子として機能していることを明らかにした。特に、ALRに関しては、その三次元構造を決定したことで、DCS耐性の分子メカニズムが明らかになった。

本研究では、DCS 生産菌におけるもうひとつの自己耐性因子であるDDLの三次元構造を、X線結晶構造解析の手法を用いて明らかにすることをひとつの目的とする。本構造が明らかになれば、DCS耐性メカニズムを原子レベルで明らかにできると期待される。さらに、得られた構造と、既に明らかとなっているDCS感受性菌由来DDLやD-Ala-D-lactateリガーゼであるVanAの構造情報とを組み合

わせて、DCS をリード化合物とした新規の感染症治療薬の開発に利用できる。このとき、DCS 生産菌由来 DDL や VanA も強力に結合できる化合物が取得できれば、VRE や MRSA にも有効な薬剤として期待できる。

また、本研究では DCS 耐性 DDL の三次元構造解析を第一目標とするが、構造解析には結晶が必要である。タンパク質の結晶化はいまだに理論化されておらず、結晶が作製できない場合も考えられる。このため、部位特異的変位導入法を利用し、DCS 耐性の分子メカニズムを、間接的に明らかにすることもひとつの目標とした。

### 3. 研究の方法

様々な条件で DCS 耐性 DDL (以下 DdlS と表記する) の結晶化を試みたが、いずれの場合も、構造解析に十分な反射を与える結晶を与えなかった。そこで、部位特異的変位導入法を利用し、DdlS の DCS 耐性機構を間接的に明らかにすることとした。

DDL は 2 つの D-Ala を連結してジペプチド D-Ala-D-Ala を生成する酵素である。DDL の反応機構においては、まず初めに、1 つ目の D-Ala が酵素に結合し、そのカルボキシル基が ATP からリン酸基を受け取り活性化される。続いて、2 つ目の D-Ala が酵素に結合し、そのアミノ基が、1 つ目の D-Ala の活性化されたカルボキシル基を求核攻撃し、D-Ala-D-Ala を生成する。Fig. 1 には既に明らかにされている、代表的な DCS 感受性菌である大腸菌由来 DDL (以下 DdlB と表記する)、ADP および POB による三者複合体の構造を示した。POB とは、DDL による D-Ala-D-Ala 生成過程における遷移状態アナログである。

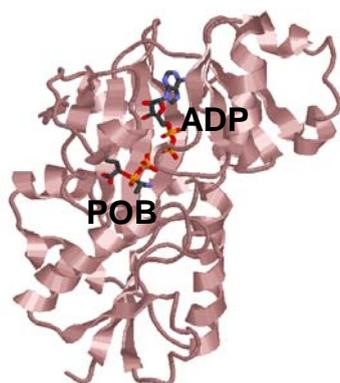


Fig. 1. DdlB/ADP/POB の三者複合体構造

また Fig. 2 に DdlB 活性中心における遷移状態アナログ POB の結合様式を示した。POB の赤丸で示した部分は、2 つの D-Ala の結合部位に対応すると考えられる。DdlB/ADP/POB の複合体構造において、Tyr210 残基は 2 つ目

の D-Ala 結合部位に存在している。また、本残基のフェノール性水酸基と、POB の酪酸部分メチル基との距離は 3.4 Å であり、極めて近い。DCS 耐性に寄与するアミノ酸残基を予測するにあたり、活性中心に存在しているアミノ酸残基のうちで、DCS 感受性菌で保存されており、かつ、DCS 耐性菌でのみ異なっているアミノ酸残基に着目した。DCS 生産菌由来 DdlS と数種類の DCS 感受性菌由来 DDL のアミノ酸配列のアラインメントによると、DdlB の Tyr210 残基は DCS 感受性菌由来 DDL において保存されているが、DdlS では Phe246 残基になっている。

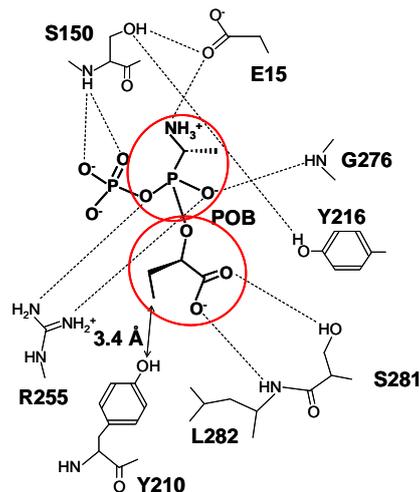


Fig. 2. POB の結合様式

そこで、本アミノ酸残基が DdlS の DCS 耐性に何らかの影響を与えている可能性があると考え、DdlS の Phe246 残基を Tyr に置換した変異体 (DdlS F246Y と命名) を作製した。また、逆に、DdlB の Tyr210 残基は DCS 感受性に関与しているのではないかと考え、DdlB の Tyr210 残基を Phe に置換した変異体 (DdlB Y210F と命名) を作製した。

まず、DdlS および DdlB を大量発現させた大腸菌と、1 アミノ酸変異を導入した DdlS F246Y および DdlB Y210F を発現させた大腸菌の DCS 耐性を調べた。具体的には、それぞれの遺伝子を T7 プロモーター下に連結したプラスミドを導入した *E. coli* BL21(DE3) pLysS を使用した。これら的大腸菌を 100 μg/mL アンピシリン、34 μg/mL クロラムフェニコール、1 mM IPTG、および、各濃度の DCS (0~1600 μg/mL) を含む LB 培地に植菌し、37°C にて 12 時間培養した。その培養液の吸光度を 600 nm で測定した。

さらに、DdlS および DdlB と、1 アミノ酸変異を導入した DdlS F246Y および DdlB Y210F を精製し、共役酵素法を用いて酵素反応速度論的解析を行った。

#### 4. 研究成果

DdlS を発現する大腸菌では、100  $\mu\text{g/mL}$  の DCS 存在下で培養しても増殖阻害は認められないが、DdlS F246Y を発現する大腸菌では DCS に対する耐性が低下した。また、DdlB を発現する大腸菌では、500  $\mu\text{g/mL}$  の DCS 存在下で培養するとほとんど増殖できなかったが、DdlB Y210F を発現する大腸菌はその濃度で十分に生育した。これらの結果より、DdlS の Phe246 残基を Tyr に置換すると DCS 耐性が失われること、逆に、DdlB において、対応する位置にある Tyr 残基を Phe に置換すると DCS 耐性が獲得されることがわかった。従って DdlS の Phe246 残基は DCS 耐性に関与していると強く示唆された。

酵素反応速度論的解析の結果を **Table 1** に示す。DDL は 2 つの D-Ala を連結して D-Ala-D-Ala を生成する酵素であるが、1 番目の D-Ala に対するミカエリス定数 ( $K_{m1}$ ) は極めて小さいため、求めることができなかった。また、表中の  $K_{m2}$ ,  $K_i$  および  $k_{cat}$  はそれぞれ、2 番目の D-Ala に対するミカエリス定数、DCS の競合阻害定数、酵素の最大反応速度定数を示している。

**Table 1. 速度論的解析の結果**

	DdlS	DdlS F246Y	DdlB	DdlB Y210F
$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	120	770	1200	500
$K_{m2}$ (mM)	1.8	21	1.6	1.9
$K_i$ (mM)	4.0	2.3	0.12	0.23
$k_{cat}/K_{m2}$	68	37	790	270
$K_i/K_{m2}$	2.2	0.11	0.077	0.12

触媒効率を表す  $k_{cat}/K_{m2}$  を比較すると DdlS および DdlS F246Y の間に大きな差は認められない。しかしながら、Phe246 残基を Tyr に置換することで、 $k_{cat}$  および  $K_{m2}$  の両方に顕著な増加が認められた。Phe246 残基は 2 番目の D-Ala 結合部位に位置すると考えられる。この残基を Tyr に置換することで、水酸基が導入され、基質結合ポケットが小さくなる。これが原因で、D-Ala に対する親和性が減少するため  $K_{m2}$  が増加し、また同時に、生成物である D-Ala-D-Ala との親和性も下がることで最大反応速度が増加したものと考えられる。DCS に対する  $K_i$  に関して言及すると、野生型に比べ変異体において 2 倍程度の減少しか認められないが、 $K_i/K_{m2}$  で比較すると 20 倍も減少していた。すなわち、本変異体においては、真の基質である D-Ala との親和性を基準にしたときの DCS との親和性が顕著に増加しており、これが原因で、DCS 耐性が消失したものと思われる。

DdlB および DdlB Y210F について得られた各パラメーターを比較すると、いずれも DdlS において認められたような顕著な差は認め

られない。しかしながら、本変異体の場合、DCS に対する親和性が減少しており、これが原因で *in vivo* における DCS 耐性がもたらされたと考えられる。

これらの結果から、2 番目の D-Ala 結合部位にある DdlS の 246 番目もしくは DdlB の 210 番目に Phe 残基が存在すると、DCS に対する親和性が低くなり、DCS 耐性を獲得する。逆に、Tyr 残基が存在すると DCS に対する親和性が高くなり、DCS に対する感受性が増加すると結論づけられる。

以上の結果から、DCS の結合様式が予測できる。すなわち、DCS は 2 番目の D-Ala と同じ配向で基質結合部位に結合する。DdlB の場合には、Tyr210 残基のフェノール性水酸基と DCS の五員環中の酸素原子との距離が非常に近くなり、水素結合の形成が可能になる。このため、DCS との親和性が高くなり、DCS による阻害を受けやすくなる。一方、Tyr210 残基を Phe に置換した DdlB Y210F では、DCS と相互作用し得る置換基が消失したため、DCS との親和性が低くなるものと考えられる。また、DdlS においては、Phe246 残基を Tyr に置換すると、基質結合ポケットが小さくなり、真の基質である D-Ala との親和性が著しく低下する。しかしながら、その基質アナログである DCS に対する親和性が減少せず、むしろ増加する傾向を示すのは、置換された Tyr 残基の水酸基と DCS の間に水素結合が形成されるためであると考えられる。

これらの知見は、今後出現する可能性のある DCS 耐性菌に対して、有効な薬剤をデザインするのに役立つと考えられる。

#### 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. Kumagai T, Koyama Y, Oda K, Noda M, Matoba Y, Sugiyama M. Molecular cloning and heterologous expression of a biosynthetic gene cluster for an anti-tubercular agent D-cycloserine produced by *Streptomyces lavendulae*. *Antimicrobiol. Agents Chemother.* **54**: 1132-1139, 2010. 査読有り
2. Oda K, Matoba Y, Noda M, Kumagai T, Sugiyama M. Catalytic mechanism of bleomycin-N-acetyltransferase proposed on the base of its crystal structure. *J. Biol. Chem.* **285**: 1446-1456, 2010. 査読有り
3. Kumagai T, Kihara H, Watanabe W, Noda M, Matoba Y, Sugiyama M. A novel tyrosine-phosphorylated protein inhibiting the growth of *Streptomyces* cells. *Biochem. Biophys. Res.*

Commun. 385: 534-538, 2009. 査読有り

[学会発表] (計 10 件)

1. 小山 佑介, 熊谷 孝則, 野田 正文, 的場 康幸, 杉山 政則. D-サイクロセリン生合成遺伝子クラスターのクローニングと機能解析. 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月 28-30 日
2. 宇田 成利, 的場 康幸, 小田 康祐, 野田 正文, 熊谷 孝則, 杉山 政則. D-サイクロセリン生合成に関与する 4 種類のタンパク質 DcsB, DcsC, DcsD および DcsG の機能解析. 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月 28-30 日
3. 小田 康祐, 的場 康幸, 野田 正文, 熊谷 孝則, 杉山 政則. D-サイクロセリン生合成に関与する酵素セリン O-アセチルトランスフェラーゼの構造生物学的研究. 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月 28-30 日
4. 熊谷 孝則, 木原 春日, 渡邊 稚子, 野田 正文, 的場 康幸, 杉山 政則. 放線菌 *Streptomyces coelicolor* に存在するチロシンリン酸化タンパク質の同定と機能解析. 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月 28-30 日
5. 小田 康祐, 的場 康幸, 野田 正文, 熊谷 孝則, 杉山 政則. D-サイクロセリン生合成に関与するセリン O-アセチルトランスフェラーゼの構造解析. 第 61 回日本生物工学会大会, 名古屋, 2009 年 9 月 23-25 日
6. 小山 佑介, 熊谷 孝則, 的場 康幸, 野田 正文, 杉山 政則. D-サイクロセリン生合成遺伝子クラスターを構成する遺伝子の構造と機能の解析. 2009 年度日本放線菌学会大会, 秋田, 2009 年 7 月 16-17 日
7. 小田 康祐, 的場 康幸, 野田 正文, 熊谷 孝則, 杉山 政則. *Streptomyces verticillus* の自己耐性因子ブレオマイシン N-アセチル化酵素の反応機構と基質阻害機構の解明. 2008 年度日本放線菌学会大会, 山梨, 2008 年 7 月 10-11 日
8. 小山 佑介, 熊谷 孝則, 的場 康幸, 野田 正文, 杉山 政則. *Streptomyces lavendulae* ATCC11924 からの D-サイクロセリン耐性遺伝子周辺領域のクローニングとその機能解析. 2008 年度日本放線菌学会大会, 山梨, 2008 年 7 月 10-11 日
9. 小田 康祐, 的場 康幸, 野田 正文, 熊谷 孝則, 杉山 政則. 構造学的知見に基づいたブレオマイシン N-アセチルトランスフェラーゼの反応機構の解明. 平成 20 年度日本蛋白質科学会, 東京, 2008 年 6 月 10-12 日
10. 中山 亮, 的場 康幸, 野田 正文, 熊谷 孝則, 西村 基弘, 杉山 政則. ピューロマイシンハイドラーゼの X 線結晶構造解

析. 平成 20 年度日本蛋白質科学会, 東京, 2008 年 6 月 10-12 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

的場 康幸 (MATOBA YASUYUKI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 90363051

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし