

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24780097

研究課題名(和文)ピロリ菌型メナキノン生合成経路酵素群の立体構造解析及び反応機構解明

研究課題名(英文)Structure and reaction mechanism analyses of enzymes in an alternative menaquinone biosynthetic pathway

研究代表者

新井 亮一 (ARAI, Ryoichi)

信州大学・学術研究院繊維学系・助教

研究者番号：50344023

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)：近年、放線菌や高度好熱菌、ピロリ菌等において新たなメナキノン(ビタミンK₂)生合成経路が発見された。そこで、本研究では新規メナキノン生合成経路に関わる酵素の反応機構解明を目的としてX線結晶構造解析による立体構造解析を実施した。まず、高度好熱菌由来 MqnDと生成物や生成物類似体との複合体結晶、次に、MqnD(H145A)変異体と基質cDHFLとの複合体結晶のX線結晶構造解析を行った。その結果、最高1.5 Å分解能での立体構造解析に成功し、基質や生成物の認識機構、活性部位残基の同定や詳細構造の解明等により、新規メナキノン生合成経路に関わる酵素の反応機構解明につながる十分な成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：An alternative biosynthetic pathway of menaquinone (vitamin K₂) was found in some microorganisms including *Streptomyces coelicolor* and *Thermus thermophilus*. Since the pathogenic species such as *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni* also have essential enzymes in the alternative menaquinone biosynthetic pathway, the enzymes are attractive targets for the development of chemotherapeutics. Here we report the 1.5 angstrom crystal structure of the H145A variant of MqnD from *T. thermophilus*, complexed with its substrate. The substrate with ring-closing form was bound to the active-site pocket between the two domains, a large domain and a small domain. The His145Ala variant produces no enzymatic reaction, suggesting that His145 is an essential active residue as a catalytic base. Furthermore, we solved the crystal structure of MqnD complexed with the product, one of its reaction products. These results provide new insights into the enzymatic reaction mechanism of MqnD.

研究分野：構造生物学

キーワード：メナキノン ビタミンK 生合成 酵素反応機構 X線結晶構造解析 MqnD 高度好熱菌 ピロリ菌

1. 研究開始当初の背景

メナキノン(ビタミン K_2)は、微生物にとって電子伝達系成分として生育に必須な物質である。近年、放線菌(*Streptomyces coelicolor*)やピロリ菌(*Helicobacter pylori*)、高度好熱菌(*Thermus thermophilus*)などにおいて、従来知られていた経路と異なり、フタロシンを経るメナキノンの新規生合成経路が発見された(Hiratsuka, T., *et al.*, *Science* 321, 1670-1673, 2008)。この新しいメナキノン生合成経路は、ヒトや乳酸菌等の共生腸内細菌には存在せず、胃癌の原因菌のピロリ菌(*H. pylori*)や食中毒菌のカンピロバクター菌(*Campylobacter jejuni*)などに存在することから、このピロリ菌型のメナキノン生合成経路の酵素群(MqnA, MqnB, MqnC, MqnDなど)は、副作用の少ない効果的な抗菌薬開発のターゲットになりうると思われる。

そこで、我々は、このピロリ菌型メナキノン生合成経路の酵素の一つで、基質 cyclic de-hypoxanthinyl futasine (cDHFL) を生成物 1,4-dihydroxy-6-naphthoate (DHN) に変換する酵素(図1)である MqnD の立体構造解析に取り組んできた。特に、高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 由来 MqnD の X 線結晶構造解析を行い、立体構造を初めて解明した(Arai, R., *et al.*, *J. Struct. Biol.* 168, 575-581, 2009)(PDB ID: 2CZL, 3A3U)。MqnD は、 β 構造を持つ大小2つのドメインからなり、その2つのドメインの間にポケット部位が存在し、酒石酸が結合していた。この付近に高度に保存されている残基群や酒石酸の結合部位などから、このポケットが活性部位であることを示唆した。しかし、類似な反応機構の酵素が知られていない新規な構造の酵素であるため、反応機構の詳細解明にまでは至らない状況であった。

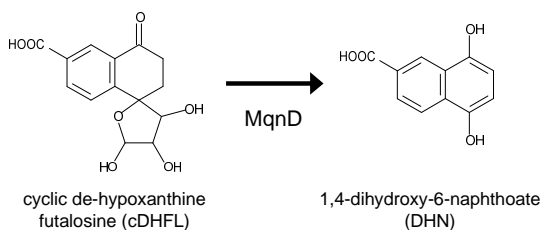


図1 MqnD 酵素反応の基質と生成物

2. 研究の目的

そこで、本研究では、まず、MqnD と基質や反応生成物との複合体結晶を作成し、X 線結晶構造解析により立体構造を解明すること、さらに活性部位変異体作製等の生化学実験も行って、MqnD の反応機構の詳細を解明することを目的とした。

また、ピロリ菌型メナキノン生合成経路の他の酵素の大量発現、精製、結晶化及び X 線結晶構造解析を順次行い、本生合成経路の酵素の構造基盤及び反応機構を解明すること、

将来的にこれらの成果をピロリ菌等の病原菌特異的な抗菌薬の探索・開発に役立てることを最終的な目標とした。

3. 研究の方法

(1) 高度好熱菌由来 MqnD の基質及び生成物複合体の X 線結晶構造解析

我々のグループが世界に先駆けて結晶化及び立体構造解析(Arai, R., *et al.*, *J. Struct. Biol.* 168, 575-581, 2009)に成功した MqnD の酵素反応機構を詳細に解明するために、高度好熱菌 MqnD と基質や生成物との複合体結晶を作製し、X 線結晶構造解析を行った。基質の cyclic de-hypoxanthine futasine (cDHFL) や反応生成物 1,4-dihydroxy-6-naphthoate については、市販されておらず入手が大変困難であったが、北海道大学の大利徹教授との共同研究を通して、貴重な試料を入手できた。基質が反応せずに結合した状態を保つため、MqnD の予想活性残基である His145 を Ala や Ser に置換した MqnD 変異体を作製した。この MqnD 変異体結晶に基質をソーキング(浸漬)することにより基質複合体結晶を作製した。そして、高エネルギー加速器研究機構(KEK)放射光施設 Photon Factory(PF)の構造生物ビームラインにおいて、高分解能 X 線回折データを収集し、分子置換法を用いて立体構造を解析した。これをもとに、基質認識機構や活性残基の立体配置より、MqnD の詳細な反応機構の構造基盤について考察した。

(2) ピロリ菌型メナキノン生合成酵素の大量発現、精製、結晶化及び X 線結晶構造解析

MqnD 以外のピロリ菌型メナキノン生合成経路への関与が予想されている酵素について、特に、ピロリ菌由来のプリンヌクレオシドホスホリラーゼ(PNP)の大量発現、精製、結晶化、X 線結晶構造解析を行った。大量発現・精製及び結晶化スクリーニング後、結晶化条件を最適化し、KEK PF の構造生物ビームラインにおいて、X 線回折データを収集し、分子置換法により立体構造を行った。

4. 研究成果

(1) 高度好熱菌由来 MqnD の基質及び生成物複合体の X 線結晶構造解析

まず、高度好熱菌由来 MqnD と生成物や生成物類似体との複合体結晶、次に、MqnD(H145A)変異体と基質 cDHFL との複合体結晶の X 線結晶構造解析を行った。その結果、最高 1.5 分解能での立体構造解析に成功し、生成物や基質等は、ドメイン間のポケット部位に環状構造を保って結合していた(図2)。詳細な活性部位残基の構造解析より、基質のフラノース五員環が閉じた状態のまま酵素に認識結合することが示唆された。また、MqnD(H145A)変異体では、基質 cDHFL の反応段階の進行が見られないことや基質の結合認識状況から、His145 が触媒塩基として働い

て、プロトンの引き抜きから反応が開始される脱離反応機構である可能性が推察された。さらに、MqnD 結晶中で基質と一定時間反応させた後に液体窒素で凍結し、X 線結晶構造解析を行ったところ、結晶中でも酵素反応が進行し、生成物 1,4-dihydroxy-6-naphthoate の電子密度が確認されるとともに、反応の途中過程を示唆する新たな電子密度も発見し、MqnD 酵素反応機構に関する新奇な知見が得られた。

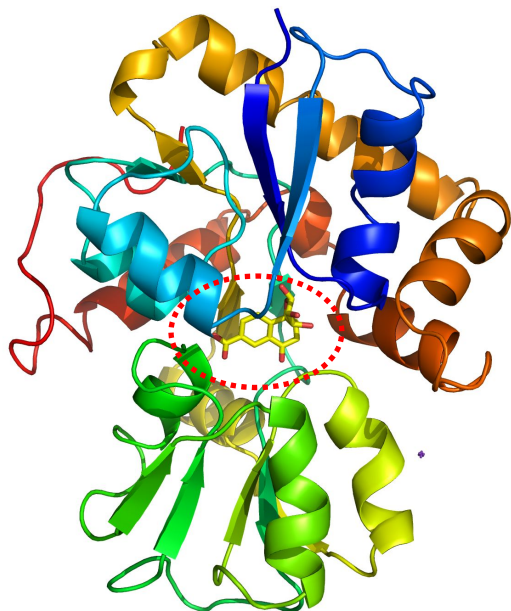


図2 MqnD(H145A)変異体と基質の複合体結晶構造

(2) ピロリ菌由来プリンヌクレオシドホスホリラーゼのX線結晶構造解析

また、ピロリ菌型メナキノン生合成酵素の一つとして、ピロリ菌由来プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) のX線結晶構造解析にも成功した。 / 構造を持つ分子が6量体を形成し、直径100、高さ60の円盤型(ドーナツ型)の全体構造をとっていた(図3)。各モノマーは10本のシートの周りに7本のヘリックスが位置する構造を持ち、交互に上下反転しながら6量体に会合して

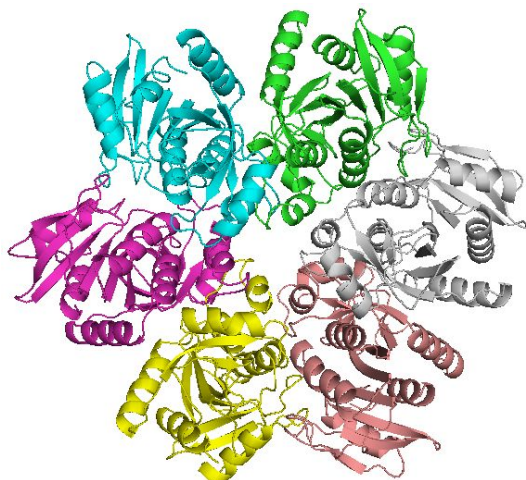


図3 ピロリ菌由来 PNP の結晶構造

いることを明らかにした。

以上の結果、新規メナキノン生合成経路に関わる酵素の反応機構解明につながる十分な成果が得られたことより、現在、これらの成果をとりまとめた複数の学術論文を執筆中である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計13件)

小林 直也, 新井 亮一, 人工タンパク質で「かたち」をつくらう ブロック遊びしようよ! , 生物工学会誌, 94, 270 (2016) 査読有

https://www.sbj.or.jp/sbj/sbj_vol94_no05.html

小林 直也, 新井 亮一, 二量体形成新規人工タンパク質を用いたタンパク質ナノブロック開発による自己組織化ナノ構造複合体の創製, 分子研レターズ, 73, 30-31 (2016) 査読無

https://www.ims.ac.jp/publications/letters73/73_123.pdf

Ueda, M., Shimosaka, M., Arai, R. Expression, purification, crystallization and X-ray diffraction analysis of ChiL, a chitinase from *Chitiniphilus shinanonensis*. *Acta Cryst.*, F71, 1516-1520 (2015) 査読有 DOI:10.1107/S2053230X15022001

Kobayashi, N., Yanase, K., Sato, T., Unzai, S., Hecht, M.H., Arai, R. Self-assembling nano-architectures created from a protein nano-building block using an intermolecularly folded dimeric de novo protein. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 11285-11293 (2015) 査読有 DOI:10.1021/jacs.5b03593

Bai, X., Sakaguchi, M., Yamaguchi, Y., Ishihara, S., Tsukada, M., Hirabayashi, K., Ohkawa, K., Nomura, T., Arai, R. Molecular cloning, gene expression analysis, and recombinant protein expression of novel silk proteins from larvae of a retreat-maker caddisfly, *Stenopsyche marmorata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 464, 814-819 (2015) 査読有 DOI:10.1016/j.bbrc.2015.07.041

Ueda, M., Shimosaka, M., Arai, R. Crystal structure of ChiL, a chitinase from *Chitiniphilus shinanonensis*. *Photon Factory Activity Report*, 32, B, 206, (2015) 査読無

http://pfwww.kek.jp/acr/2014pdf/part_b/pf14b0206.pdf

Komatsu, M., Jinhua Dong, J., Ueda, H., Arai, R. Crystal structure of Fab fragment of an anti-osteocalcin

C-terminal peptide antibody KTM219. *Photon Factory Activity Report*, 32, B, 205, (2015) 査読無
http://pfwww.kek.jp/acr/2014pdf/part_b/pf14b0205.pdf
Shiono, T., Nomura, T., Nishiya, Y., Arai, R. Crystal structure of glycine oxidase from *Geobacillus kaustophilus*. *Photon Factory Activity Report*, 32, B, 204, (2015) 査読無
http://pfwww.kek.jp/acr/2014pdf/part_b/pf14b0204.pdf
Ohishi, S., Shiono, T., Nishiya, Y., Nomura, T., Arai, R. Crystal structure of glycine oxidase from *Bacillus thuringiensis*. *Photon Factory Activity Report*, 31, B, 274, (2014) 査読無
http://pfwww.kek.jp/acr2013pdf/part_b/pf13b0274.pdf
Tabata, N., Kodera, T., Arai, R., Shida, T. Recognition Model of a Uracil Residue in DNA by AP Endonuclease from *Methanothermobacter thermautotrophicus*, *Photon Factory Activity Report*, 30, B, 287 (2013) 査読無
http://pfwww.kek.jp/acr2012pdf/part_b/pf12b287.pdf
小林直也, 新井亮一 バイナリーパターンデザインによるデノボタンパク質WA20のドメインスワップ二量体構造, 酵素工学会誌, 69, 19-25 (2013) 査読無
http://www.enzyme-eng.com/modules/pico02/index.php?content_id=76
Arai, R., Fukui, S., Kobayashi, N., Sekiguchi, J. Solution structure of IseA, an inhibitor protein of DL-endopeptidases from *Bacillus subtilis*, reveals a novel fold with a characteristic inhibitory loop. *J. Biol. Chem.* 287, 44736-44748 (2012) 査読有 DOI:10.1074/jbc.M112.414763
Arai, R., Kobayashi, N., Kimura, A., Sato, T., Matsuo, K., Wang, A.F., Platt, J.M., Bradley, L.H., Hecht, M.H. Domain-swapped dimeric structure of a stable and functional de novo 4-helix bundle protein, WA20. *J. Phys. Chem. B*, 116, 6789-6797 (2012) 査読有 DOI: 10.1021/jp212438h

〔学会発表〕(計67件)

新井 亮一, 小松 美沙紀, 池田 早希, 松尾 京子, 大利 徹 「メナキノン生合成系酵素 MqnD の基質複合体及び生成物複合体の立体構造解析」 酵素工学会第74回講演会, 2015年10月16日, 東

京大学(東京都文京区)
新井 亮一, 池田 早希, 小松 美沙紀, 松尾 京子, 大利 徹 「高度好熱菌由来メナキノン生合成酵素 MqnD-基質・生成物複合体のX線結晶構造解析および酵素反応機構」 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月26日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
Arai, R., Komatsu, M., Ikeda, S., Matsuo, K., Dairi, T. Crystal Structure of a Menaquinone Biosynthetic Enzyme, MqnD, Complexed with its Substrate and Product. 15th IUBMB & 24th FAOBMB-TSBMB Conference, October 23-25, 2014, Taipei, Taiwan.
新井 亮一, 池田 早希, 小松 美沙紀, 松尾 京子, 大利 徹 「高度好熱菌由来メナキノン生合成酵素 MqnD-基質(cDHFL)複合体のX線結晶構造解析」 第8回バイオ関連化学シンポジウム, 2014年9月12日, 岡山大学(岡山県岡山市)
新井 亮一, 松尾 京子, 大利 徹, Crystal structures of MqnD, a menaquinone biosynthetic enzyme from *Thermus thermophilus*, complexed with the product, 1,4-dihydroxy-6-naphthoate, and its analogs. 第3回モデル生物丸ごと一匹学会, 2013年9月21日, 大阪大学(大阪府大阪市)
Arai, R., Matsuo, K., Dairi, T. Crystal structures of MqnD, a menaquinone biosynthetic enzyme, complexed with the product, 1,4-dihydroxy-6-naphthoate, and its analogs. 4th International Symposium on Diffraction Structural Biology 2013 (ISDSB2013), 2013年5月27日, 名古屋市中小企業振興会館(愛知県名古屋市)
松尾 京子, 石北 央, 大利 徹, 新井 亮一 「新規メナキノン生合成経路酵素 MqnD の生成物・類似体複合体のX線結晶構造解析」 日本農芸化学会2013年度大会, 2013年3月26日, 東北大学(宮城県仙台市)

〔産業財産権〕
出願状況(計2件)

名称: ドメインスワップ二量体人工タンパク質
発明者: 新井 亮一, 木村 尚弥, 小林 直也
権利者: 信州大学
種類: 特許
番号: 特願 2016-101203
出願年月日: 平成 28 年 5 月 20 日
国内外の別: 国内
(*「特願 2015-103357」の出願に基づく優先権主張)

名称：ドメインスワップ二量体人工タンパク質

発明者：新井 亮一，木村 尚弥，小林 直也

権利者：信州大学

種類：特許

番号：特願 2015-103357

出願年月日：平成 27 年 5 月 21 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://fiber.shinshu-u.ac.jp/arai/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

新井 亮一 (ARAI, Ryoichi)

信州大学・学術研究院繊維学系・助教

研究者番号：50344023