

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660068

研究課題名(和文) プロテオ族腸内細菌の選択的生育阻害を目指したパントテン酸代謝経路の研究

研究課題名(英文) Artificial arrest of synthesis of pantothenate to inhibit growth of gamma proteobacteria

研究代表者

仁木 宏典 (NIKI, Hironri)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：70208122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：パントテン酸からCoAまでの合成経路は極めて厳密に制御される。バクテリアは主要なパントテン酸の供給源である。バクテリアのパントテン酸はアスパラギン酸の脱炭酸化反応により生じるがこれを司る aspartate -decarboxylase (PanD) はこれまで自己活性化されると考えられてきたが、大腸菌などの一部のバクテリアは PanZ という因子により活性化されることを見出した。この活性には最終産物であるCoAにも依存している。PanD-PanZ 複合体の構造からこの相互作用や活性化がCoAに依存していることを明らかにした。特にPanZがCoA依存的に、PanDに阻害的にも機能することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Coenzyme A (CoA) is an ubiquitous and essential cofactor, synthesized from the precursor pantothenate. Vitamin biosynthetic pathways are normally tightly regulated, including the pathway from pantothenate to CoA. However, no regulation of pantothenate biosynthesis has been identified. We have recently described an additional component in the pantothenate biosynthetic pathway, PanZ, which promotes the activation of the zymogen, PanD, to form aspartate -decarboxylase (ADC) in a CoA-dependent manner. Here we report the structure of PanZ in complex with PanD, which reveals the structural basis for the CoA dependence of this interaction and activation. In addition, we show that PanZ acts as a CoA-dependent inhibitor of ADC catalysis. This inhibitory effect can effectively regulate the biosynthetic pathway to pantothenate, and thereby also regulate CoA biosynthesis.

研究分野：微生物遺伝学

キーワード：パントテン酸 補酵素A

### 1. 研究開始当初の背景

補酵素 A (CoA) は様々な代謝経路において機能し、さらにタンパクのアセチル化修飾においては基転移反応のアセチル基供与体としての役目を担っている。補酵素 A はパントテン酸から合成されるが、高等生物にはパントテン酸を合成する能力がなく植物や菌類からの供給を受けている。ヒトの場合、腸内細菌は食物と共に重要なパントテン酸の供給源となっている。

細菌では、アミノ酸の一種であるアスパラギン酸から脱炭酸化反応を経て  $\beta$ -アラニン を合成し、この  $\beta$ -アラニンからパントテン酸が合成される。この脱炭酸化反応を行う酵素が PanD である。

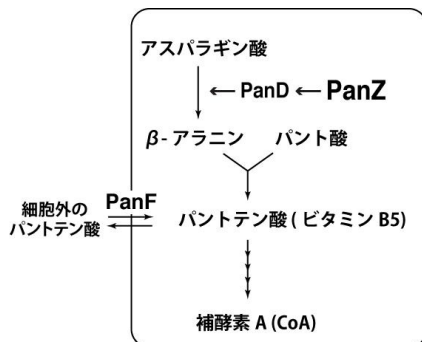


図 1: パントテン酸及び補酵素 A の合成経路

PanD はピルボイル酵素と呼ばれる特殊な酵素の仲間である。一般に、ピルボイル酵素は翻訳された直後は不活性型であるが、ペプチド鎖中のセリン残基の N 端側で切断され、そこにピルボイル基が生じて活性型となるような酵素である。これまでピルボイル酵素の活性化には他の因子を必要とせず、自律的なペプチドの切断と末端の修飾が生じ活性化すると考えられてきた。しかし、大腸菌において PanD の活性化に他の因子が必須であることを発見した (Nozaki et al., 2012)。大腸菌の機能未知遺伝子群についてその生物学的な機能を解明しようとして研究していたところ、これまで機能未知とされていた *yhhK* 遺伝子が PanD の活性化に必須であることを見いだした。そして *yhhK* 遺伝子を新たに *panZ* と名付けた。PanZ は、その構造がアセチル CoA トランスフェラーゼに類似し、実際に CoA と結合する。しかし、トランスフェラーゼ活性はない。アセチル CoA はアスパラギン酸から始める CoA 合成の最終産物の一つである。アセチル CoA の PanZ への結合の意義として、最終産物による合成経路の制御、いわゆるフィードバック制御が考えられた。しかし、CoA や PanZ がどのようにして PanD の活性化を制御しているかについてはまだ明らかになっておらず、PanD の活性制御については未知の部分が多く残されていた。

### 2. 研究の目的

アスパラギン酸の脱炭酸化反応を経て  $\beta$ -ア

ラニンを合成し、この  $\beta$ -アラニンからパントテン酸を合成するというパントテン酸合成経路は細菌に固有な代謝経路である。したがって、パントテン酸合成経路を標的とした薬剤はヒトには無害で細菌のみに効く抗菌剤として働くのではないかと以前から関心を持たれていた。私たちはパントテン酸合成の制御因子 PanZ を発見し、実際に PanZ の遺伝子を破壊することにより PanD の阻害し、その結果細菌の生育を止められることを実証した。PanZ の機能をなんらかの薬剤で阻害できれば細菌の生育を止めることができるのである。また、PanZ は大腸菌やコレラ菌等のプロテオバクテリアという特定の病原性腸内細菌にのみ存在する。このことから、PanZ を叩くことにより、体内の細菌叢を乱さず、大腸菌やコレラ菌等の病原性細菌だけを駆除することも可能である。このように PanZ を標的にすれば細菌種特異的抗菌剤の開発が可能となる。

本研究では、パントテン酸の前駆物質である  $\beta$ -アラニンの合成酵素 PanD の活性を制御する PanZ の機能の全貌を明らかにして、PanZ を標的とした病原性腸内細菌に特異的な抗菌剤開発の基盤の確立をめざすものである。

### 3. 研究の方法

本研究計画では PanZ による PanD の活性制御機構を明らかにすることを目的として、

PanD のアセチル化が PanD の活性に与える影響の解析

PanD にアセチル基を転移する酵素の同定

PanZ 及び PanD の生化学的解析を行う。

PanZ が抗菌薬の標的としてふさわしいかを評価する目的で、PanZ 及び PanF の二重変異株の作製と表現型の解析を行う。

PanD のアセチル化が PanD の活性に与える影響の解析。PanD の C 末端側のアセチル化が PanD の定常期での活性の低下に関与しているのかを明らかにする目的で、アセチル化部位と思われるリジン残基を、アセチル化状態をミミックするグルタミンまたは脱アセチル化状態をミミックするアルギニンに置換した変異株を作製した。

これらの株の対数増殖期と定常期の細胞抽出液に、放射性同位体で標識したアスパラギン酸を加える。標識したアスパラギン酸が  $\beta$ -アラニンに変換される量を調べることに、それぞれの抽出液中の PanD の活性を測定できる。もしアセチル化が定常期での活性の低下に関与しているのであれば、いずれかの変異株において定常期でも活性に変化がなくなることが予想される。

PanD にアセチル基を転移する酵素の同定。PanD の C 末端側がアセチル化されることが予備的な実験により明らかとなっている。このアセチル化を行う酵素の実態を明らかにしたい。アセチル基転移酵素の候補としては、大腸菌に 24 種類存在する GNAT (Gcn5-related

N-Acetyltransferase) ドメインを持つタンパク質があげられる。これらの GNAT ドメインを持つタンパク質をコードする遺伝子をそれぞれ欠損させた菌株を作製して、それらの菌株から精製した PanD がアセチル化されるかどうかを調べる。

また PanZ の結晶構造解析から、PanZ と PanD の結合による PanD の活性化のメカニズムを解明する。このとき CoA と結合した PanZ の構造についても調べる。

#### 4. 研究成果

パントテン酸は細菌の菌体から排出され、パントテン酸を合成できない変異体はこれを取り込んで生育が可能になる。取り込みはパントテン酸のトランスポーターである PanF が担っている。そこで、PanZ と PanF の二重遺伝子破壊株を作成し、この変異株では生育がパントテン酸に依存するかどうか調べた。

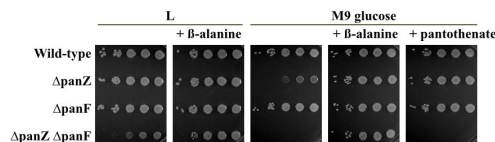


図2 PanZ と PanF の二重遺伝子破壊株の栄養要求性

変異株は富栄養である L 培地では全て増殖した。しかし、PanZ と PanF の二重遺伝子破壊株では増殖の低下が見られ、 $\beta$ -アラニンの添加で生育の改善が見られた。L 培地中には、 $\beta$ -アラニンが含まれているもののその量が少ないために  $\beta$ -アラニンの添加を必要としたのであろう。一方、合成培地である M9 培地では PanZ と PanF の二重遺伝子破壊株は全く生育できない。これに  $\beta$ -アラニンの添加すると生育できるようになるが、パントテン酸の添加では生育は解消できなかった。この結果から PanF の欠損によりパントテン酸の取り込みができなくなっていることが明らかになった。以上のことから、PanZ と PanF の両者の機能を阻止すると、パントテン酸の欠乏を招き、大腸菌の生育を止めることができることがわかった。しかしながら、 $\beta$ -アラニンが環境中にあると生育を回復することから  $\beta$ -アラニン取り込みの経路が別にあるらしい。PanD-PanZ 経路の阻害によるパントテン酸の欠乏で大腸菌の生育を抑えるためには、 $\beta$ -アラニン取り込みも阻害する必要がある。

PanZ の過剰発現によって、合成培地である M9 培地では大腸菌の生育が阻害された。pBAD24-panZ プラスミドを持つ菌体はグルコースを含む培地では適度な PanZ の生産を行い、 $\beta$ -アラニンを添加せずとも生育できる。しかし、アラビノースを含む培地では PanZ を過剰に生産するようになり、生育できない

ようになる。この阻害は、培地中に  $\beta$ -アラニンの添加することにより解消され、生育できるようになることから、PanZ の過剰に生産により  $\beta$ -アラニンの合成が止まったと考えられた。

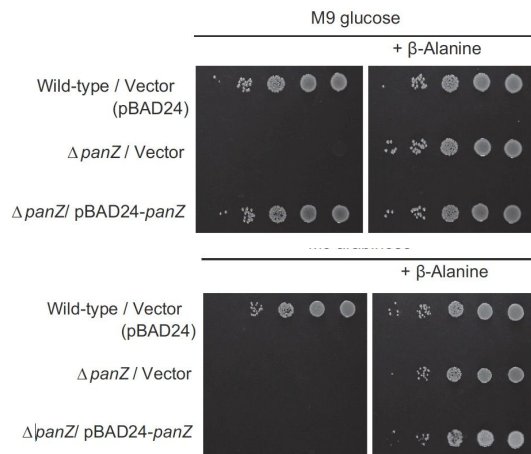


図3 PanZ 過剰発現による  $\beta$ -アラニンの栄養要求性

おそらく PanZ が過剰生産されると PanZ は強く PanD に結合し、その結果 PanD の酵素の機能が阻害されるのであろう。

PanD と PanZ の結合を結晶構造から明らかにした。PanD は 4 量体を形成し、それぞれの PanD に PanZ は結合する。このとき、PanZ はアセチル CoA に結合する必要がある。PanZ のアセチル CoA への結合は、アセチル CoA の濃度に依存する。アセチル CoA-PanZ と PanD の複合体を形成することで PanD は活性型へと成熟するが、これが酵素として機能するためにはアセチル CoA-PanZ が解離す

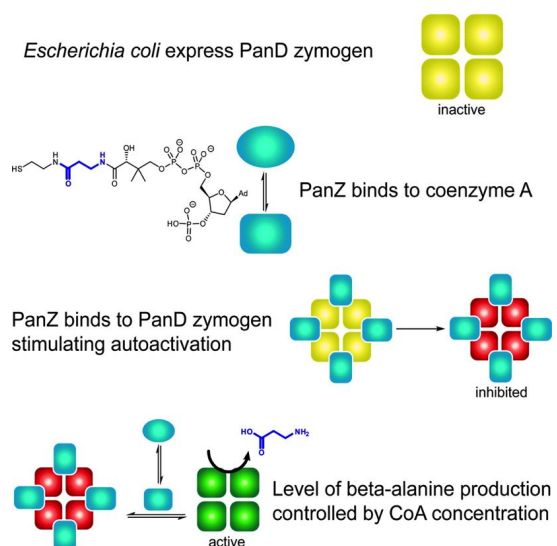


図4 アセチル CoA に結合状態に依存した PanZ の PanD の活性化制御機構

る必要がある。この解離のためには PanZ に結合しているアセチル CoA が離れなければならない。以上のように、PanZ は PanD を活性化するのであるが、その活性化の調節はアセチル CoA の濃度に依存している。アセチル CoA 濃度が高い時には、アセチル CoA が PanZ から離れにくいいため、PanD は活性化されても依然としてアセチル CoA-PanZ が結合し酵素として働けない。細胞内でアセチル CoA 濃度が高い状態とは、CoA が大量に存在するときで、そのようなときには CoA を合成する必要はないので合成の初段階である PanD の働きを抑えるのである。

補酵素 CoA の代謝経路では、最終産物であるアセチル CoA が合成の初段階を制御するフィードバック制御により合成量の調節が図られていることが明らかとなった。アセチル CoA-PanZ と PanD の結合の構造学的な解明は、この結合を増強する化合物などの探索にも寄与する。仮にこのような化合物により、アセチル CoA の濃度に関わらず PanZ と PanD の結合を強くすることができれば細菌内での補酵素 CoA の代謝を止め、しいては細胞そのものの生育を止めることが期待できる。

#### 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 1 件)

Diana C.F. Monteiro, Vijay Patel, Christopher P. Bartlett, Shingo Nozaki, Thomas D. Grant, James A. Gowdy, Gary S. Thompson, Arnout P. Kalverda, Edward H. Snell, Hironori Niki, Arwen R. Pearson7correspondenceemail, Michael E. Webb, The Structure of the PanD/PanZ Protein Complex Reveals Negative Feedback Regulation of Pantothenate Biosynthesis by Coenzyme A, *Chemistry & Biology*, 査読有、22, 2015, pp.492-503

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

仁木 宏典 (NIKI, Hironori)(国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授)

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

研究者番号：70208122