

論文内容の要旨

氏名	と い あき ひろ 玉 井 章 弘		
学位の種類	博 士 (農学)		
学位記番号	農 第 1 5 6 号		
学位授与の日付	平 成 2 3 年 3 月 2 2 日		
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当		
学位論文題目	Studies on the domain structures of WalR, a response regulator essential for gram-positive bacterial growth, and its inhibitors		
論文審査委員 (主査)	教授	内 海 龍 太 郎	
(副主査)	教授	深 溝 慶	
(副主査)	教授	松 田 一 彦	

MRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)やVRE(バンコマイシン耐性腸球菌)等の多剤耐性細菌の出現は、既存抗生物質による感染症治療を困難なものにしている。これらの多剤耐性細菌に有効に働く新規抗菌剤の開発は急務である。MRSAやVRE、枯草菌等を含むグラム陽性細菌には、増殖に必要な二成分情報伝達機構(TCS)としてWalK/WalRが広く保存されている。WalKタンパク質は細胞膜受容体で、ATP依存的に自己リン酸化するヒスチジンキナーゼ(HK)活性を有する。WalRタンパク質は転写制御因子である。リン酸化されたWalKタンパク質からWalRタンパク質(転写制御因子)のアスパラギン酸ヘリン酸基の転移が生じる。リン酸化されたWalRタンパク質は標的遺伝子プロモーターに結合し、その遺伝子発現を制御する。MRSA等の細菌において、細胞壁代謝に関与する遺伝子群はWalK/WalR TCSによって制御されている。その結果、WalK/WalR TCSは細菌細胞増殖、分裂に必要な働きをしている。岡田等(Okada et al., J. Antibiot, 2010)はWalK阻害剤WalKmycinがWalKタンパク質を選択的に阻害し、MRSAやVREに強い抗菌性を示すことを明らかにした。後藤はWalR阻害剤として、WalrycinA, WalrycinBを見出した(Gotoh Y., Doi A., et al., J. Antibiot, 2010)。これらの結果は、WalK, WalRタンパク質に対する分子標的剤の開発によって、MRSA, VRE等の多剤耐性細菌に対する有効な新規抗菌剤の開発が可能になることを示した。

本研究では、WalRタンパク質に対する分子標的剤の開発を実施するために、WalRタンパク質の立体構造をX線結晶構造解析法により決定し、WalRタンパク質がN末端ドメインとC末端ドメイン構造を有することを明らかにするとともに、WalK/WalR情報伝達機構の構造生物学的研究を行った(第1章, 2章)。さらに、これらのドメイン構造をもとに、WalR阻害剤(walrycin B)とWalRタンパク質との結合モデルを作製し、それらの作用機構を明らかにした(第3章)。

第1章 WalRタンパク質のC末端ドメイン(DNA結合)の構造

1-1 枯草菌WalRタンパク質のDNA結合ドメイン

枯草菌のDNA結合ドメイン(BsWalR-C)は、Ser128からGlu233を含むドメインとして結晶化を行い、解像度2.4 Åで構造決定を行った(PDB entry ID 2D1V, 図1-1)。BsWalR-Cは、4つのβストランドからなる逆平行のβシート(β1-β4)、3つのαヘリックス(α1-α3)を骨格とし、特徴的なβヘアピン(β5-β6)を含んだヘリックス・ターン・ヘリックス構造であった。

1-2 黄色ブドウ球菌WalRタンパク質のDNA結合ドメイン

黄色ブドウ球菌のDNA結合ドメイン(SaWalR-C)は、Gln133からHis232を含むドメインとしてその立体構造を解像度1.87 Åで決定した(PDB entry ID 2ZXJ図1-2)。SaWalR-CにおいてもBsWalR-Cと同様に逆平行のβシート(β1-β4)、3つのαヘリックス(α1-α3)、βヘアピン(β5-β6)を含んだヘリックス・ターン・ヘリックス構造をとっており、BsWalR-CとのCA原子間比較ではr. m. s. d. 値が0.52 Åとなり、相同性の高い立体構造をとった。しかし、SaWalR-Cにおいてのみβ2-β3ストランド間(Pro144-Ala146)に310ヘリックス様式の立体構造形成がみられた。

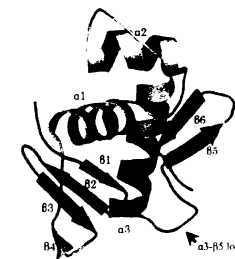


図1-1 BsWalR-C (2D1V)

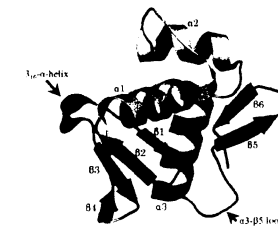


図1-2 SaWalR-C (2ZXJ)

1-3 WalRタンパク質による細胞壁合成関連遺伝子の発現制御

BsWalR-C, SaWalR-Cの立体構造をもとに、実際にWalRタンパク質が標的遺伝子プロモーターを認識して、結合できるか構造生物学的研究を行った。その結果、枯草菌・黄色ブドウ球菌のWalR-Cの α 3ヘリックスが標的DNAの大溝を認識し、 β -ヘアピン(β 5- β 6)が標的DNAの小溝を認識するようにDNAに結合した。また、WalR-Cはダイマーとして標的DNA反復配列[5'-1GT(A/T)A(A/T/C)-N5-TGT(A/T)A(A/T/C)-3']に結合することも明らかになった。さらにWalRタンパク質のアミノ酸配列比較から、枯草菌、黄色ブドウ球菌だけでなく腸球菌、化膿レンサ球菌などのグラム陽性菌には、DNA結合ドメインの α 3- β 5間のループ領域に[PS(H215/R)P]の保存された領域が存在していることが明らかになった。そこで、黄色ブドウ球菌のWalRタンパク質の[PS(H215/R)P]部位や標的遺伝子上の反復配列と相互作用しているアミノ酸にAla変異導入をおこない、ゲルシフト法により、変異WalRの標的遺伝子への結合解析を行った。その結果、[PS(H215/R)P]部位などに変異導入したWalRタンパク質(R161A, R179A, R196A, R203A, R223A, P213A, S214A, H215A)の8種の変異体において、標的遺伝子への結合能減少が確認された。これらの結果より、SaWalR-Cの[PS(H215/R)P]は標的遺伝子への結合部位として、決定された(図2)。

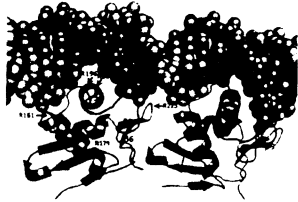


図2 WalR-CのDNA結合様式

第2章 枯草菌のWalRタンパク質のN末端ドメイン(二量体形成)の構造

WalRタンパク質の二量体形成ドメイン(WalR-N)は、解像度2.0 Åで構造決定を行い、5つの β ストランドから形成されたねじれた β シートを中心に5つの α ヘリックスが取り囲んだ α / β 構造をとっていた(PDB entry ID 2ZWM 図3-1)。

さらに結晶構造中において、WalR-Nは α 4- β 5- α 5を形成表面として、回転対称な二量体(単量体A, B)を形成していることを見出した(図3-2)。WalR-Nの二量体は、3つの塩橋(85Glu-114Lys, 97Asp-119Arg, 98Asp-112 Arg)と疎水性アミノ酸残基(89Val, 92Leu, 115Ala)によって形成されており、これらの特徴は、WalRタンパク質が含まれるOmpR/PhoBファミリーのレスポンスレギュレータータンパク質(RR)に保存され、その他のRRファミリーにおいては、保存されていない。 $(\alpha$ 4- β 5- α 5)は、黄色ブドウ球菌や腸球菌のWalRタンパク質でも保存されており、WalRタンパク質の二量体形成に関与していることが示唆された。

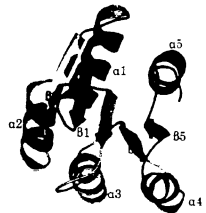


図3-1 WalR-N単量体構造

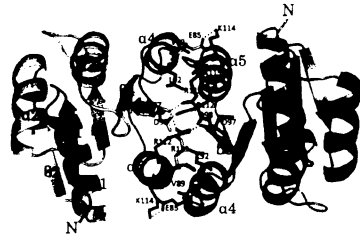


図3-2 WalR-N二量体構造

第3章 枯草菌WalRタンパク質の全長立体構造を用いたWalR阻害剤の作用機構

立体構造を明らかにしたWalRタンパク質の制御ドメイン、DNA結合ドメインと同じOmpR/PhoBファミリーであるPrrAタンパク質をテンプレートとして、WalRタンパク質の全長モデル構築を行った。この立体モデルに対してWalR阻害剤であるwalrycin Bとのドッキングシミュレーションを行った。Walrycin Bは、二量体形成ドメインにある5つのアミノ酸(Glu43, Gln46, Lys71, Asp73, Met74)から構成された空洞に結合した(図4)。



図4 Walrycin BとWalRのドッキングモデル

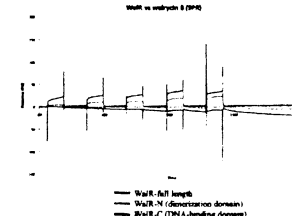


図5 Walrycin Bと各WalRドメインとの分子間相互作用

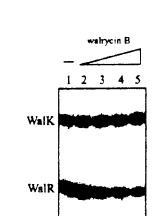


図6 WalRのwalrycin Bによるリン酸化阻害

結合モデルの評価を行うため、表面プラズモン共鳴法による分子間相互作用解析を行った。WalRタンパク質の全長(1-235 a.a.)をセンサーチップ上にアミンカップリング法による固定化を行い、解析を行った結果(図5)、全長のWalRタンパク質とwalrycin BはKD(解離定数) = 140 μ Mで結合した。またWalRタンパク質の二量体形成ドメイン(1-121a. a.)およびDNA結合ドメイン(122-235 a. a.)でもそれぞれ発現精製を行ったタンパク質を用いて同様の解析を行った。その結果、walrycin Bは、二量体形成ドメインにKD = 200 μ Mで結合し、DNA結合ドメインには結合しなかった。さらにWalKタンパク質からのリン酸基転移を利用したWalRタンパク質のリン酸化実験を行った結果、walrycin Bは、WalRタンパク質のリン酸化を阻害した(図6)。以上のことから、walrycin Bの作用機構として、WalRタンパク質の二量体形成ドメインに結合したwalrycin Bは、WalKタンパク質からのリン酸基転移を阻害するが、予測された結合サイトはWalRタンパク質のリン酸化部位(D53)から約24 Åはなれていたため、リン酸化部位を直接阻害するのではなくWalR-WalRタンパク質間相互作用を阻害するような機構が示唆された。

結論

1, WalRタンパク質のDNA結合ドメインの立体構造決定とDNA結合部位

(主論文)

DNA結合ドメイン(WalR-C)の結晶化を行い、X線結晶構造解析法によって立体構造決定を行った。WalR-Cは、DNA認識にかかわる特徴的な構造を保持し、これまでに推測されていたOmpR/PhoBファミリーのレスポンスレギュレーター的作用機構をWalRタンパク質が取り得ることが立体構造解析から証明された。またWalRタンパク質のDNA結合ドメインの立体構造を用いて、WalRタンパク質のDNA結合様式を明らかにした。複合体モデルからDNA結合に関わるアミノ酸残基が予測され、またこれらのアミノ酸への変異導入を行ったWalRタンパク質のゲルシフト法解析から、DNA結合能の低下がみられたことから、DNA認識に関わるアミノ酸を立体モデルから明らかにした。

2, WalRタンパク質の二量体形成ドメインの立体構造

レスポンスレギュレーターWalRタンパク質の二量体形成ドメイン(WalR-N)の結晶化を行い、X線結晶構造解析法によって立体構造決定を行った。WalR-Nは、活性に重要な二量体(α 4- β 5- α 5)を結晶構造中で形成しており、WalRタンパク質の制御機構として二量体形成することを結晶構造から証明した。

3, WalRタンパク質の立体モデルとwalrycin Bとの作用機構

WalRタンパク質の二量体形成ドメイン、DNA結合ドメインの立体構造をもとにwalrycin Bのドッキングモデルを作製し、作用機構を明らかにした。walrycin Bは、N末端側にある二量体形成ドメインに存在する空洞に結合する事で、WalRタンパク質のリン酸化を阻害する事が示唆された。

論文審査結果の要旨

細菌は物理的、化学的な様々な環境ストレスに対して適応する能力を保有している。この適応能力をつかさどる情報伝達機構として、ヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーターからなる二成分制御系が存在する。

二成分制御系は、クオラムセンシング機構と共に、細菌の主な情報伝達機構となっている。典型的な二成分制御系の機構として、環境シグナルによって、膜貫通領域を含むヒスチジンキナーゼはヒスチジン残基で自己リン酸化し、さらに対を形成したレスポンスレギュレーターは、アスパラギン酸残基に、ヒスチジンキナーゼからのリン酸基転移がおこることでリン酸化する。多くのレスポンスレギュレーターは、リン酸化されることで活性化し、DNA結合による下流遺伝子への転写制御を行うことで、環境変化に対応した応答をおこなっている。これまでに多くの二成分制御系が見出されているが、その中で細菌の増殖に必須な二成分制御系は限られており、WalK/WalR、YhcS/YhcR81、HP165/HP166、MtrB/MtrAなどがある。既知抗生物質の標的であるペプチドグリカン合成阻害などでは、すでに多くの耐性菌が出現し、また社会問題に発展している。既知抗生物質の標的とは異なる細菌に必須な二成分制御系を標的とした阻害剤開発は、新規抗生物質として発展し、さらに、近年問題となっている耐性を持った細菌にも有効な抗生物質となることが期待される。

細菌の情報伝達機構である二成分制御系のレスポンスレギュレーターの多くは、DNA結合型のエフェクタードメインが保存されている。このグループは、大きくOmpR/PhoB、NarL/FixJ、NtrC/DctDサブファミリーの3つに分類され、多くのレスポンスレギュレーターが含まれるOmpR/PhoBファミリーでは、標的遺伝子に結合するため、DNA結合ドメインの二量体化や多量体を形成する事が必要であるが、リン酸基転移によるリン酸化がこの構造変化とどのように関係しているのかは、未だ明らかとなっていない。レスポンスレギュレーターの結晶化による構造解析から、全長構造が決定すれば、この問題を明らかにすることが可能であると考えられる。しかしながらこのファミリーのタンパク質にみられる二量体形成ドメインとDNA結合ドメインの間に存在する可変式のループ領域が影響し、全長の結晶化を困難にしている。これまでに報告されている転写因子のDNA結合型としては60%がOmpR、NarL、NtrCファミリーに属しており、それ以外は6%程度である。最近の研究から、DNA結合型の制御とは異なるタンパク質結合型、RNA結合型などが報告されている。多くの転写因子が含まれるDNA結合型の中では、ヘリックス・ターン・ヘリックス様式(HTH)についての研究が盛んである。HTHは、一般的に20アミノ酸残基から構成され、2つの α ヘリックスが120°Cずれて交差している。HTHモチーフを構成する α ヘリックスのうち、2番目の α ヘリックスは、認識ヘリックスと呼ばれ、HTHモチーフがDNAに結合する場合にこのヘリックスがDNAの大溝を認識している。このHTHモチーフの立体構造はOmpR/PhoB、NarL/FixJファミリータンパク質において、構造解析が進んでいる。またさらにOmpR/PhoBファミリーでは、ウィングと呼ばれる β ヘアピンとHTHモチーフが一つとなった様式(wHTH)でDNA認識を行う。また、転写因子のN末端側の二量体形成ドメインは、 α / β モチーフが広く保存されている。とくに α 4- β 5- α 5からなる二量体形成ドメインは、OmpR/PhoBファミリーに広く保存され、このファミリーにおいていくつか明らかとなっている二量体形成面では、疎水性のパッチと塩橋が形成されている。また、これまでに明らかとなった立体構造から、 α 4- β 5- α 5で形成される二量体は、活性型と考えられ、非活性型となる二量体とは大きく構造が異なっている。しかしながら、この活性型の二

量体を形成することと、リン酸化の影響や活性型の二量体がC末端側のDNA結合ドメインにどのように影響するかは、未だ明らかとなっていない。これまでに明らかとなったOmpR/PhoBファミリーに含まれるレスポンスレギュレーターの全長構造としてDrrD、DrrB、PmrA、MtrAが報告されている。この4つの立体構造を比較すると、それぞれ二量体形成ドメイン、DNA結合ドメイン間をつなぐリンカー領域の長さが異なっており、4つともドメインの配置に違いが見られた。このドメインの配置の仕方には、リンカー領域の長さが関係している可能性があり、短いリンカー領域または長いリンカー領域のどちらを取るかによって全長構造におけるドメインの配置がある程度予測可能であると考えられる。

分子標的であるWalRタンパク質は、このOmpR/PhoBファミリーに属しており、低G+C含有のグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌、腸球菌など病原菌に広く保存されている。WalK/WalR二成分制御系は、これまで細菌によってはYycG/YycF、VicK/VicR、MicA/MicBなどと呼ばれ、その役割について不確かな部分も存在したが、WalRの制御下遺伝子が細胞壁代謝に関与する事が次第に明らかとなってきた。WalK/WalR二成分制御系は、細菌の増殖に必須なので、抗菌剤の標的として非常に魅力的である。そこでWalK/WalRを標的とした阻害剤のスクリーニング系開発を行い、新規阻害剤候補の単離、同定に成功している。WalR阻害剤として単離されたwalrycin Bは、WalRを標的とした阻害剤として世界初であり、この阻害剤の作用機構を詳細に解析することは、新規抗生物質開発に非常に有益であると考えられる。しかし、標的分子であるWalRの立体構造は明らかとなっていなかったため、X線結晶化構造解析による立体構造決定を行った。枯草菌、黄色ブドウ球菌のWalRタンパク質を標的に行った結晶化条件の検討から4つのドメインにおいて結晶化に成功し、立体構造決定をおこなった。得られた立体構造から、これまで明らかとなっていなかったWalRタンパク質の制御機構である標的DNAに対する結合様式が明らかとなった。また、結晶構造中で見られたWalRタンパク質の二量体形成は、 α 4- β 5- α 5が構造保持に関わっており、WalRタンパク質の活性型としてOmpR/PhoBファミリータンパク質に見られる二量体を形成し、さらにこの二量体形成によって、DNA結合ドメインは、標的遺伝子に結合することが可能となる事が示唆された。結晶構造から決定したドメイン構造をもとに初めてWalRタンパク質の全長構造を明らかにし、また、その制御機構を分子構造から証明したことは、今後の新規阻害剤設計において非常に有益な情報となる。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認められる。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会などの所定の手続きを経たうえ、平成23年2月9日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。