

理研NMR施設成果非占有利用報告書

10-200-036

平成 25 年 11 月 23 日

利用機関名	信州大学	
実施部署名	ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点 繊維学部 応用生物科学系 生物資源・環境科学課程	
実施責任者 管理職名・ 氏名	助教 / 新井 亮一	
実施部署所 在地		
実施部署連 絡先		
利用課題名 (利用目 的)	枯草菌細胞壁溶解酵素阻害タンパク質の立体構造解析及び相互作用解析	
利用実施時 期及び期間	平成 22 年 9 月 2 日～平成 23 年 10 月 12 日 当初計画どおり ・当初計画変更 (変更理由)	
利 用 施 設	NM R 装 置 (該 当部 分に ○)	利用装置① ・ () 600MHz、(○) 700MHz、() 800MHz、() 900MHz (○) 低温プローブ付 () 固体プローブ付 () サンプルチェンジャー付 利用期間 1：平成 22 年 12 月 6 日～平成 22 年 12 月 12 日 利用期間 2：平成 23 年 1 月 4 日～平成 23 年 1 月 10 日 利用期間 3：平成 23 年 8 月 29 日～平成 23 年 8 月 30 日
		利用装置② ・ () 600MHz、() 700MHz、(○) 800MHz、() 900MHz (○) 低温プローブ付 () 固体プローブ付 () サンプルチェンジャー付 利用期間 1：平成 22 年 12 月 13 日～平成 22 年 12 月 26 日 利用期間 2：平成 23 年 1 月 31 日

		利用期間 3 : 平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日
	立体 構造 解析 パイ プライン	・ 発現確認 : 利用回数 1 回
		・ フォールド判定 : 利用回数 2 回
		・ 大量調製 : 利用回数 1 回
		・ 構造決定 : 利用回数 1 回
利用満足度 (複数選択 不可)		(○) 大いに満足、() ほぼ満足、() やや不満、 () 大いに不満
成果 の 概 要	実施 内容	※実際に行った作業の概要について記載してください。 理研NMR施設の「NMR立体構造解析パイプライン」を利用して、「タンパク質合成→タンパク質試料のNMR 解析適合性の判定→安定同位体標識タンパク質試料の調整→多次元NMRデータの測定→測定データに基づくタンパク質の立体構造の決定」という一連のプロセスにより、枯草菌細胞壁溶解酵素阻害タンパク質IseAの立体構造解析を実施した。 ①発現確認:無細胞タンパク質合成技術により、対象タンパク質の発現量、可溶性の確認を行った。 ②フォールド判定:無細胞タンパク質合成技術により、タンパク質試料を調製し、当該試料が立体構造を形成していることの確認を行い、立体構造解析適合性を判定した。 ③大量調製:無細胞タンパク質合成技術により、NMR測定に必要な純度・分量の安定同位体標識タンパク質試料の調製を行った。 ④NMR 測定:各種NMR装置により立体構造解析に必要なデータ測定を行った。 ⑤構造決定:NMRスペクトルデータの解析、シグナルの帰属、構造情報(特にNOEデータ)の抽出などの作業を行い、プロトン核間の距離の情報を与えるNOE データの帰属をしながら立体構造計算を行い、IseAの立体構造を決定した。 次に、IseA と細胞壁溶解酵素 LytF との相互作用解析を行った。IseA 単独のHSQC スペクトルと、細胞壁溶解酵素を添加した場合のHSQC スペクトルを測定して比較し、化学シフトが大きく変化する残基を立体構造上にマッピングして、相互作用部位を同定した。

本課題により得られた成果、当初目標と比較	※本課題実施の結果得られた成果および当初目標に対する達成度などについて記載してください。 枯草菌 <i>Bacillus subtilis</i> の細胞表層において、DL-endopeptidase である LytE, LytF, CwlS, CwlO は枯草菌自身の細胞壁を分解し、細胞分離や細胞伸長などにおいて非常に重要な役割を担っている。細胞表層の IseA タンパク質は、これらの細胞壁溶解酵素 DL-endopeptidase の活性を阻害して細胞分離を阻害することが明らかになっているが、詳細な阻害機構は不明である。そこで IseA の酵素阻害機構を解明することを目的として、今回、理研NMR施設において IseA の立体構造解析を行った。 IseA の立体構造は、3本のαヘリックスと1本の3_{10}ヘリックス、2つのβシートから構成される新奇な単ドメイン構造を有していた(図A)。特に、β4と3_{10}の間のループを刃に見立てた弓鋸のような形の立体構造は非常に特徴的であった。IseA 構造表面上の静電ポテンシャル分布は、大部分が正に帯電しているが、β4-3_{10}ループとその周りの領域だけは、特に負に帯電していた(図B)。一方、LytF等のDL-endopeptidase 触媒ドメインでは、活性部位の谷間やその周りが正に帯電しており、IseAと相補的であることが示唆された。さらに、LytF添加時のIseAの化学シフト変化解析によって、相互作用部位は主にβ4-3_{10}ループとその近傍であることが示唆された。さらに、β4-3_{10}ループ部位のIseA変異体作製と酵素阻害実験によって、β4-3_{10}ループが酵素の阻害に重要な役割を担っていることが示された。これらの結果より、IseAのβ4-3_{10}ループが酵素の活性部位・基質結合部位の谷間に結合し、さらにその周辺部位も相互作用するような新奇な阻害機構が示唆された。 図(A) IseA の立体構造(リボン表示、N末端～C末端: 青～緑～黄～赤色) (B) IseA 表面静電ポテンシャル分布(青色: 正電荷、赤色: 負電荷)
-----------------------------	--

	当初目標は、「細胞壁溶解酵素阻害機構を構造生物学的に解明するために、まず、NMR 法を用いて、細胞壁溶解酵素阻害タンパク質 IseA の構造解析を行い、次に、IseA と細胞壁溶解酵素との相互作用解析を行う。これにより、IseA の立体構造の決定と細胞壁溶解酵素相互作用部位の同定を行うこと」であったが、これらは、得られた成果により十分に達成された。特に、IseA の立体構造は、弓鋸型の新規なフォールド構造だったことより、期待を上回る成果と言ってもよいと考えられる。さらに、他の生化学・分子生物学的実験の結果と組み合わせることにより、細胞壁溶解酵素阻害機構について、新たな阻害機構を提唱することができた。 そこで、以上の成果をまとめて、下記の論文発表を行った。 Ryoichi Arai, Sadaharu Fukui, Naoya Kobayashi and Junichi Sekiguchi, Solution Structure of IseA, an Inhibitor Protein of DL-Endopeptidases from <i>Bacillus subtilis</i>, Reveals a Novel Fold with a Characteristic Inhibitory Loop. <i>The Journal of Biological Chemistry</i>, Vol. 287, No. 53, pp. 44736–44748, 2012. さらに、以下のように、研究成果のプレスリリースを行い、新聞やwebニュース等により、研究成果が報道された。 ・信州大学区繊維学部ホームページ 平成24年12月25日 「生物資源・環境科学課程 新井亮一助教ら 枯草菌の分裂を阻害するIseAタンパク質の構造解明」 http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/textiles/news/2012/12/50284.html ・信濃毎日新聞 平成24年12月26日 朝刊 「IseAタンパク質」構造解明 信大繊維学部助教ら 抗菌薬に応用目指す ・信州民報 平成25年1月9日 上田市信大繊維学部 世界で初 新井亮一助教らの研究グループ IseAタンパク質の立体構造解析に成功 ・マイナビニュース(Web site) 平成24年12月25日 「信州大、細胞分離酵素を阻害するタンパク質の新奇な「弓のこ型」構造を発見」 http://news.mynavi.jp/news/2012/12/25/187/ * Yahoo! JAPANニュース(Web site)やlivedoor NEWS (Web site)、exiteニュース (Web site)などにも配信されて記事が掲載された。 http://www.excite.co.jp/News/it_biz/20121225/Cobs_ie_201212_post-911.html
--	--

今後の展開、課題	※本課題の結果を踏まえた今後の展開方針および目的達成に向けた今後の課題などについて記載してください。 近年、細胞壁溶解酵素が細菌の伸長・分裂・増殖等の基本プロセスに必須な役割を担うことが分かってきており、新規な抗菌剤開発の標的酵素として期待されている。そこで今後の展開としては、阻害機構を原子レベルで解明し、新規阻害剤・抗菌剤開発に応用することを目指していく。そこで、IseAと細胞壁溶解酵素との複合体の立体構造解析を行い、より詳細な阻害機構を解明することが今後の課題である。複合体の場合、分子量が大きくなるので NMR 法での立体構造解析が困難になるため、主に、X 線結晶構造解析を行う予定である。また、これと並行して、病原菌由来 D,L-エンドペプチダーゼの立体構造解析を行う。さらに、これらの構造解析結果をもとにして、病原菌の細胞壁溶解酵素を標的として、IseA を改変デザインした新規阻害タンパク質を開発し、将来的に新たな抗菌剤への応用を目指していく。
成果公開延期の希望の有無	() あり : (○) なし 「あり」の場合理由：
利用における感想 (改善要望等を含む)	※本施設を利用して良かった点、改善してほしい点、提案事項など、施設利用の感想を記載してください。 理研 NMR 施設の「NMR 立体構造解析パイプライン」の高度な技術を利用して、非常に迅速に IseA の立体構造決定ができ、大変良かったと思います。 この場を借りて、心より御礼申し上げます。 また、改善・提案事項などは特にありません。ただ、研究費も比較的少ない地方大学のユーザーとしては、もしできれば、もう少し利用料金が安くなると大変ありがたいと思います。
利用周辺環境に関する希望	特にありません。

今後の利用 形態の予定	() 成果の非公開を前提とした「外部利用」(有料)を考えている。 () その他理研との共同研究等 具体的に
今後期待するその他のサービス	(○) NMR 装置利用の教育 (これまで NMR を使用した経験の無い方に対する教育も含む) () NMR 装置利用の技術的なサポート () その他 具体的に
その他	(上記の項目以外でご意見等お願いします。) 特にありません。

本報告書については、印刷または必要な編集・加工を行った上で公開します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての資料作成または発表をお願いする場合があります。

特許取得等の理由により公開の延期を希望する場合は必ず事前にご相談ください。