

2005年8月19日
独立行政法人 理化学研究所

プラスミド DNA の維持に關与する蛋白質複合体の構造を解析

- バクテリアの細胞死を誘導する新規抗生物質の開発のターゲット -

◇ポイント◇

- ・バクテリアのトキシンとアンチトキシンの複合体構造とトキシン蛋白質単独の立体構造の決定
- ・アンチトキシンによるトキシンの構造変化とその RNA 切断機構の解明
- ・院内感染原因菌に対抗する新たな抗生物質の開発が期待される

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、プラスミド DNA※1 がバクテリアの中で安定に維持保守される機構に關与する蛋白質複合体の立体構造を決定し、その分子メカニズムを解明しました。理研中央研究所花岡細胞生理学研究室の花岡文雄主任研究員、鎌田勝彦先任研究員による研究成果です。

院内感染菌などのバクテリアは様々な抗生物質耐性遺伝子を獲得したプラスミド DNA を保持しています。そのプラスミド DNA は、トキシンとアンチトキシンと呼ばれる二種類の蛋白質によって、バクテリアの中で維持保守されています。今回研究グループは、大腸菌宿主に存在する YoeB トキシン単独と、YoeB トキシンと YefM アンチトキシンの蛋白質複合体を結晶化し、放射光施設(Photon factory と SPring-8)のビームラインを用いて、それらの立体構造を決定しました。その結果、YefM アンチトキシンの二量体構造が、RNA 切断酵素である YoeB トキシンの活性部位に立体構造変化を誘導することで、その活性を阻害することが分かりました。これらの構造情報に基づいた生化学的解析から、YoeB トキシンがどのようにして RNA 鎖の塩基を認識し切断するのかを明らかにすることが出来ました。

アンチトキシンのトキシンへの結合を妨げることが出来れば、バクテリア自身の、またはそのプラスミド DNA が持っているトキシンの RNA 切断活性を顕在化し、バクテリアの細胞死を誘導することが可能であると考えられます。院内感染菌が保持するプラスミド DNA の維持機構に着目した新規の抗生物質※2 の開発は、医療面で大いに貢献できると考えます。

本研究成果は、米国の科学雑誌「Molecular Cell」(8月19日付)に掲載されます。

1. 背景

大腸菌などのバクテリアは小型の環状 DNA であるプラスミドを保持しています。その DNA が細胞分裂を通じて維持される仕組みがあり、トキシン（毒）とアンチトキシン（解毒剤）の二種類の蛋白質によって制御されます（図 1）。まずバクテリアに入ったプラスミドはトキシンとアンチトキシン蛋白質を同時に供給します。これらは通常安定な複合体を形成し、トキシンの活性を抑えています。しかし、細胞分裂が進む過程で、プラスミドを保持しないバクテリアが生じると、不安定なアンチトキシンが宿主バクテリアの有する蛋白質分解酵素によって徐々に分解され、比較的安定な

トキシンが活性化されて、生存に必要な機能を阻害して細胞死を誘導します。その結果、プラスミドを保持しているバクテリアだけが生き残っていきます。

一部の腸球菌※3では、様々な抗生物質耐性遺伝子を自身のプラスミドに取り込み、このような二種類の蛋白質を使って、そのプラスミドを維持し続ける戦略をとっています。このため、ほとんどの抗生物質が効かないバクテリアの繁殖が院内感染を引き起こし、社会問題となっています。アンチトキシン蛋白質の不安定性と、トキシン蛋白質のバクテリアへの毒性を分子構造的に理解することが、様々な抗生物質耐性遺伝子を持つプラスミドをコントロールすることにつながります。

2. 研究手法と成果

近年のバクテリアゲノムの研究から、バクテリア染色体にもトキシンとアンチトキシンの二種類の遺伝子セットがいくつも存在することが明らかになりました。我々は、大腸菌の遺伝子産物である YoeB (トキシン) と YefM (アンチトキシン) の蛋白質複合体と YoeB 蛋白質単独の結晶を作製し、X線結晶解析によって立体構造を決定しました。これらの蛋白質は、バンコマイシン耐性遺伝子だけでなく様々な抗生物質耐性遺伝子を持つ腸球菌のプラスミドのものとよく似ており、プラスミド DNA がコードするトキシン-アンチトキシンも同様な分子メカニズムで働いていると考えられます。

構造解析の結果、YoeB-YefM 複合体は 1:2 の組成で構成される三量体を形成していました (図 2)。YoeB は RNA※4 を切断する酵素 (リボヌクレアーゼ※5) と似ていましたが、予測される活性部位の構造は大きく異なっていました。一方、YefM は以前に報告されたことのない新規の構造を取っていました。YefM 二量体構造の一方の分子は片方を支えるのに徹し、支えられた方はその末端のペプチド鎖で YoeB を包み込むように結合するという、極めてユニークな複合体構造をしていました。

様々な遺伝学および生化学的実験結果から、YoeB には実際にリボヌクレアーゼ活性があり、グアニンとアデニン塩基の 3'側を切断することが明らかとなりました。また、RNA 切断に関与する YoeB のアミノ酸も特定することが出来ました。

さらに YoeB 単独の構造解析の結果、YoeB の活性部位の構造はバクテリアの分泌型リボヌクレアーゼ Sa などに見られる典型的なコンフォメーションを有していたことから、YefM は YoeB の活性部位の構造を積極的に変化させることで、そのリボヌクレアーゼ活性を阻害していることが分かりました (図 3A と B)。これらの構造的情報に基づいて、YoeB がどのようにグアニンとアデニン塩基を認識して RNA 鎖を切断するのかを理解することが出来ました (図 3C)。

3. 今後の期待

このようなトキシンとアンチトキシン蛋白質を用いた制御系は、抗生物質の耐性遺伝子を獲得したバクテリアだけを選択的に生き残らせるように働いています。構造的にトキシンとアンチトキシン複合体の形成を阻害することで、トキシンの RNA 切断活性を上昇させ、バクテリア自身の細胞死を誘導出来ると考えられます (図 4)。特に、アンチトキシンに注目した新しい概念の抗生物質の開発は、感染菌治療への利用が大いに期待出来ると考えています。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

中央研究所 花岡細胞生理学研究室

前任研究員 鎌田 勝彦

Tel : 048-467-9532 / Fax : 048-462-4673

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 プラスミド DNA

宿主であるバクテリアのゲノム DNA とは物理的に独立して自律複製し、安定に存在できる遺伝因子。

※2 抗生物質

微生物が産生し他の微生物の増殖を抑制する物質がその定義であったが、現代は天然物を起源とするものだけでなく全合成物をも定義として含めている。その恩恵は人間の営みの中で計り知れないが、近年バクテリアが抗生物質を分解し無毒化する因子を獲得し、抗生物質の効かない耐性菌の出現が問題となっている。

※3 腸球菌

ヒトや動物の腸の常在菌で全ての人が多かれ少なかれ持っている。一部のものではあるが、バンコマイシン（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の治療に用いられる抗生物質）に対し耐性を獲得している。それらは臨床治療に汎用されている抗生物質が効かない場合が多く、院内感染症の原因となっている。

※4 RNA

リボ核酸の総称。DNA の遺伝情報は一度、RNA に転写され、それが蛋白質に翻訳される。

※5 リボヌクレアーゼ

RNA 分解酵素。RNA 鎖を切断する様式は様々だが、一本鎖または二本鎖 RNA を末端から順に切断するエキソヌクレアーゼタイプと、真ん中から切断するエンドヌクレアーゼタイプとに大別される。YoeB トキシンの場合、一本鎖 RNA を真ん中から切断する。

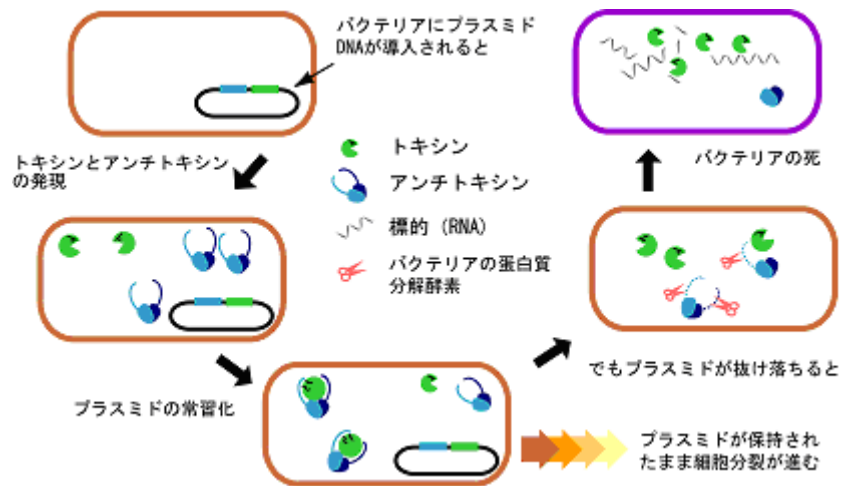


図1 プラスミド DNA がトキシンとアンチトキシンによってバクテリアの中で維持保守される機構

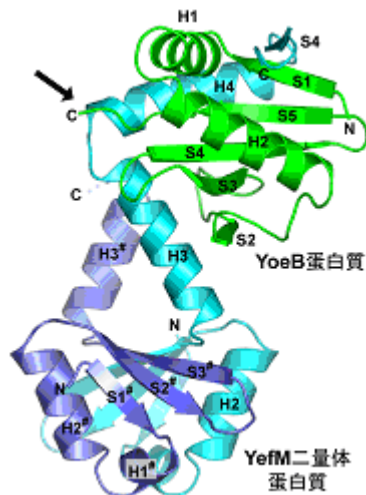


図2 YoeB (緑) と YefM 二量体 (青と水色) の複合体構造 矢印の方向は図3に示す YoeB 活性部位の視点を示した。

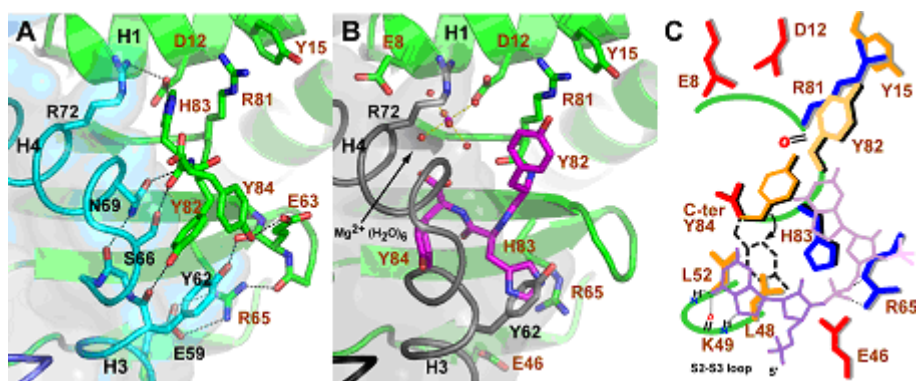


図3 YoeB 活性部位のコンフォメーション変化 (A) YefM 結合型構造。(B) YefM 非結合型構造。黒と灰色で示した YefM は比較のために示した。(C) RNA が切断さ

れるときの活性部位のモデル図。

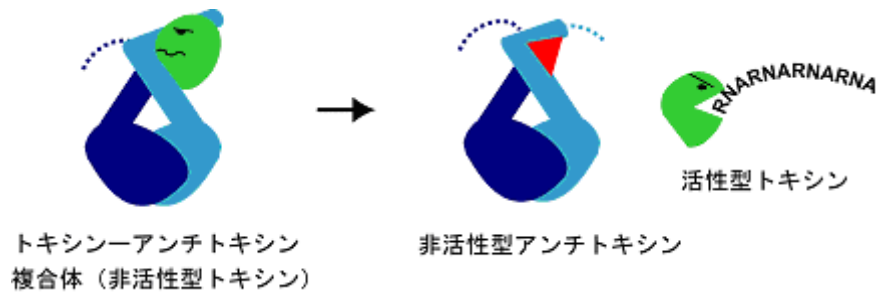


図 4 バクテリアの細胞死を誘導させるための新規抗生物質 (赤三角) の概念図