

称号及び氏名 博士（理学） 蒲池 沙織

学位授与の日付 平成 26 年 3 月 31 日

論文名 **Structural insight into the mechanism of KatG-mediated isoniazid activation**
(KatG によるイソニアジド活性化に関する構造的洞察)

論文審査委員 主査 多田 俊治
副査 藤井 郁雄
副査 徳富 哲

論文要旨

1950 年代から、結核治療の第一選択薬として用いられているイソニアジド (INH) は、結核菌 **catalase-peroxidase (KatG)** による活性化を受けて初めて作用するプロドラッグである。KatG によって活性化された INH はラジカル種 (IN \cdot) となり、NAD との付加体 (IN-NAD) を形成し、結核菌特有の細胞膜合成を阻害する。KatG は、ヘムを補欠分子とした二機能性酵素であり、**catalase** 活性と **peroxidase** 活性を有している。両反応とも過酸化水素と反応し、ポルフィリン π カチオンラジカルや **protein-based** ラジカルを形成した **compound I** と呼ばれる中間体を生じる。その後、もう一分子の過酸化水素が反応して元の **resting** 状態になる反応が **catalase** 反応であり、他の電子供与体を基質とし、**compound II** と呼ばれる中間体の形成を経て **resting** 状態に戻る反応が **peroxidase** 反応である。

これまでに、*Haloarchcula marismorium*、*Burkholderia pseudomallei*、*Mycobacterium tuberculosis* などに由来する KatG (HmKatG、BpKatG、MtKatG) の構造が決定され、ヘムが結合した N 末端ドメインは、同じ Class I スーパーファミリーに属する **cytochrome c peroxidase (CcP)** や **ascorbate peroxidase (APX)** と高い構造相同性を持ち、ヘム近傍のアミノ酸残基は良く保存されていることが見出されている。一方、KatG 固有の特徴的な構造として、ヘム近傍にある 3 種のアミノ酸残基の側鎖が共有結合により結ばれた **Met-Tyr-Trp adduct** と呼ばれる構造が見出されており、この **adduct** が KatG の **catalase** 活性に関与していると考えられている。しかし、KatG は 2 種の反応を触媒することからその機構は複雑であり、特に **peroxidase** 触媒機構の詳細については未だ不明な点が多い。

多くの実験結果が、INH は KatG の **peroxidase** 機能によってラジカル種になる、即ち、**compound I** および **II** に電子供与体として働くことを示しているが、一方で、過酸化水素の介在が無くても **resting** 状態の KatG と反応しラジカルを形成することも報告されており、その

反応機構も不明である。そこで、本研究では、**KatG** と **INH** との反応機構の解明を目指し、先ず、**Synechococcus elongatus PCC7942** に由来する **KatG (SeKatG)** の構造を明らかにし、**Trp** ラジカル形成部位に関する各種 **KatG** の構造的相違について考察した (第一章)。次に、**INH** との反応をスペクトル法によって追跡し、**SeKatG** における **IN-NAD** 生成と、**resting** 状態の **SeKatG** と **INH** の反応を検討した (第二章)。さらに、**INH** と **SeKatG** との複合体結晶の調製と解析を試み、構造決定に成功した。これにより、電子移動経路および **INH** 活性化機構への重要な手掛かりとなる **INH** の結合部位を特定し、2種の反応経路があることを提唱した (第三章)。

第一章 Native SeKatG の構造解析

SeKatG を大腸菌で発現させ、各種クロマトグラフィーにより精製した。精製品につき結晶化を行い、放射光施設 **SPring-8** にて **2.2 Å** 分解能のデータを収集し、構造を決定した。その結果、本構造はダイマーを形成しており、これまでに報告されている **KatG** と高い構造相同性を示した (図 1)。各サブユニットは 2 つのドメインから構成され、一方の **N** 末端ドメインにのみヘムが結合していた。また、**KatG** に特有な構造である、ヘム近傍に **Met248-Tyr222-Trp94** の共有結合性の **adduct** が形成されていた。

これまでに、各種 **KatG** の **protein-based** ラジカル形成部位として幾つかの **Trp** 残基が特定されているが、由来する種によって位置や数が異なるという興味深い結果が得られている。**BpKatG** では **Trp330**、**Trp153**、**Trp139** の 3箇所が、一方、シアノバクテリアである **Synechocystis PCC6803** の **KatG (SynKatG)** では、**Trp106** のみがラジカル形成部位として特定されている。**SynKatG** の構造は報告されていない。しかし、**SeKatG** とのアミノ酸配列の相同性は約 **75%** であることから、**SynKatG** との構造相同性も極めて高いと推定される。そこで、**SeKatG** と **BpKatG** の構造の詳細な比較検討を行った。

先ず、近位 **Trp** 残基 (**BpKatG**: **Trp330**) に着目した。この部位におけるラジカル形成の有無については、同族の **CcP** や **APX** においても議論がなされている。**CcP** ではラジカルが形成されるのに対し、**APX** ではラジカルは形成されない。この要因として陽イオンの存在の有無が注目され、**APX** では近位 **Trp** 残基から約 **8 Å** 離れた位置に **K+** の結合が見出されている。陽イオンは、静電ポテンシャルを増加させ、その結果として **Trp** カチオンラジカルの不安定化を引き起こしているものと考えられた。**SeKatG** においても、**APX** と同様に、近位 **Trp** と約 **8 Å** の距離に **Na+** の結合を見出した。**Na+** の結合に関与するアミノ酸残基は **SynKatG** においても保存されていることから、**Na+** の結合により近位 **Trp** においてラジカル形成が困難であったと考えられる。**SeKatG** および **SynKatG** では **Na+** と配位結合可能な距離に **Asp** 残基の側鎖が存在するが、**BpKatG** ではその位置を **Ser** 残基が占めており、そのため **Na+** が結合しなかったものと考えている。

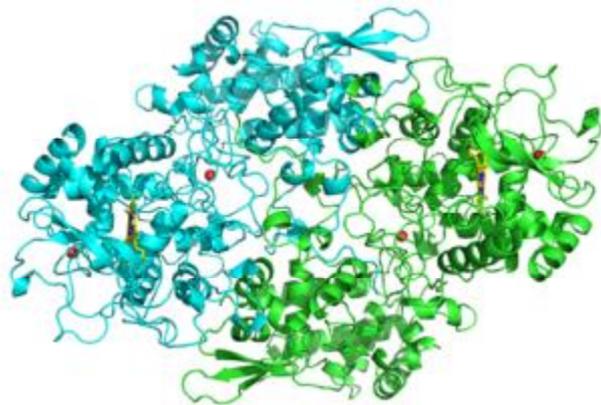


図 1 : **SeKatG** 全体構造(黄 : Heme、赤 : **Na+**)

もう一つ特徴的な **Trp** ラジカル形成部位として、**SynKatG** においてのみラジカルが形成される **Trp106** が挙げられる。**BpKatG** でのこの **Trp** は電子移動経路としての役割とされている。この周囲を構成するアミノ酸残基の構造を比較すると、もう一方のサブユニットの **C** 末端ドメインに存在するアミノ酸残基の違いが関与している可能性が示唆された。**SeKatG** では **Ile659** であるのに対して **BpKatG** では **Gly** であった。図2に示したように、側鎖が張り出していることから **SeKatG** の **Trp649** および **Gln289** の側鎖の向きが **BpKatG** とは

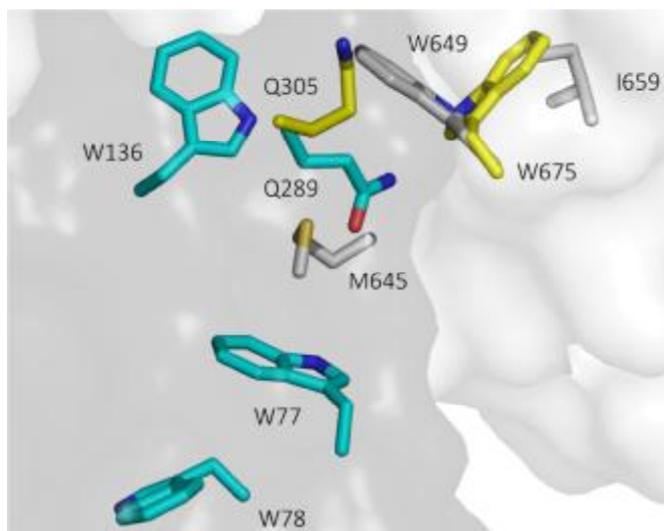


図2 : **SeKatG** **Trp106** 付近の構造比較
(シアン、白 : **SeKatG** 黄 : **BpKatG**)

異なっている。このため、**SeKatG** では π 電子に富んだユニークな構造モチーフが形成されている。同様のモチーフは **SynKatG** にも存在するものと思われ、このことが安定なラジカル形成に影響を与えたものと推定された。**C** 末端ドメインは、活性には必須ではあるもののその役割については未だ明らかとされていないが、本結果から、**KatG** 内におけるラジカル形成部位の相違に影響を与えている可能性が示唆された。

第二章 **SeKatG** と **INH** の反応解析

SeKatG と **INH** の反応について検討した。まず、**SeKatG** と **INH** との反応によりラジカル種が生じることを、ラジカル補足剤として **NBT** を用い、**560 nm** における吸光度の変化により調べた。その結果、**pH 8.0** で塩化マンガンを溶液に加えた系で、**SeKatG** と **INH** の反応からラジカル種の発生を確認することができた。一方、**pH 7.0** では、今回測定した時間内ではラジカル種の形成を検出することはできなかった。次に、生じたラジカル種が **IN \cdot** であることを確認するため、**IN-NAD** 形成反応を追った。**326 nm** における吸光度変化を調べた結果、ラジカルを生成した同条件で **IN-NAD** の生成を確認することができた。引き続き、**INH** との反応において、**350 - 700 nm** における吸収スペクトルの変化を調べた。**SeKatG** の **resting** 状態におけるヘム由来ソーレー帯の吸収ピーク波長は、これまで種々の **KatG** で報告されているものと同様 **405 nm** 付近であった。しかし、興味深いことに、その溶液に **INH** を添加すると、約 **16%** のピーク強度の減少が見られた。このような変化は、塩化マンガンを加えたラジカル形成条件においても、また、ラジカル形成の見られなかった **pH 7.0** についても同様に生じた。この現象は **BpKatG** でも見出されたことが、近年、報告されている。本研究の結果、**INH** はラジカル形成反応とは無関係にヘムポケットに電子環境変化を与えることが示唆された。

SeKatG と **INH** の相互作用を **ITC** で検討した。その結果、吸収スペクトルの結果に相応するように **pH 7.0** における **INH** の **SeKatG** への結合が確認された。これらの結果は、ラジカル産生が見られない条件 (**pH 7.0**) でも **INH** は **SeKatG** と結合し、且つその時のヘムポケットの電子環境変化はラジカル生成時と同様であることを示唆している。一方、**SeKatG** と **NAD**

の結合は ITC では確認することはできなかった。しかし、NAD を添加した吸収スペクトルでは、405 nm におけるピーク強度が 6.5%ほど減少することが見出された。この結果は、NAD の SeKatG との結合はかなり弱い、しかし相互作用はしていることを意味しているものと考えられた。NAD が、INH と同様にヘムポケットに影響を与えることは、これまで報告されておらず、興味深い知見である。

第三章 SeKatG - INH 複合体の構造解析

SeKatG-INH 複合体結晶の調製を、共結晶化法および浸漬法により試みた。その結果、pH 6.5 - 7.0 の条件下、浸漬法により複合体の結晶を得ることに成功した。SPring-8 にてデータ収集を行い、2.12 Å 分解能の構造を決定した。解析の結果、3 個所に INH の結合が見出された。一つは、Trp78 近傍である (図 3)。この INH は二量体間に存在し、そのピリジン環窒素原子がもう一方のサブユニットの Arg662 と水素結合を形成していた。Trp78 は、シアノバクテリアにおける protein-based ラジカル形成部位である。本結果は、蛋白表面に形成された Trp ラジカルにより INH の活性化反応が開始されることを示唆している。もう一つ、重要な位置に INH の電子密度を見出した。それは、ヘムポケットへの入り口に存在し、ポルフィリン環と水分子を介して結合した INH である (図 4)。KatG では、peroxidase に比べてヘムポケットへの入り口がループ挿入によって狭くなっており、INH のヘムポケット内部での結合は考えにくいことが挙げられてきた。このことは、INH はヘムポケットには直接入り込まないが、水分子を介して、ヘムポケットの外側からヘムに電子を供与し得る機構の存在を示唆しており、peroxidase 反応に関わる基質の一般的な相互作用部位ではないかと考えられる。以上のことから、KatG による INH 活性化には 2 種の反応経路が存在しているものと結論した。本結果は、さらに、INH 抵抗性菌で見出された MtKatG-S315T 変異体における INH 活性化能の大きな低下の合理的な解釈を可能とし、新たな抗結核薬の創製の可能性を示している。

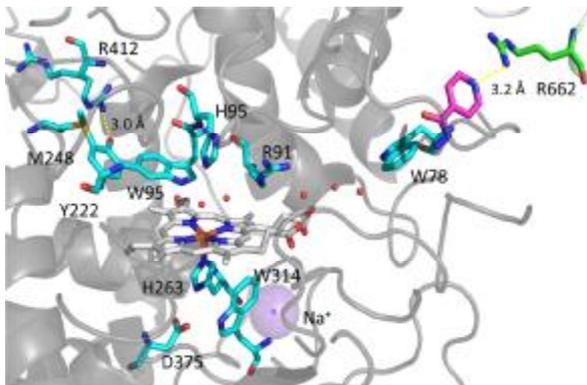


図 3 SeKatG における INH 結合部位 ①
(シアン：サブユニット 1、緑：サブユニット 2、マゼンタ：INH、紫：Na⁺、赤：H₂O)

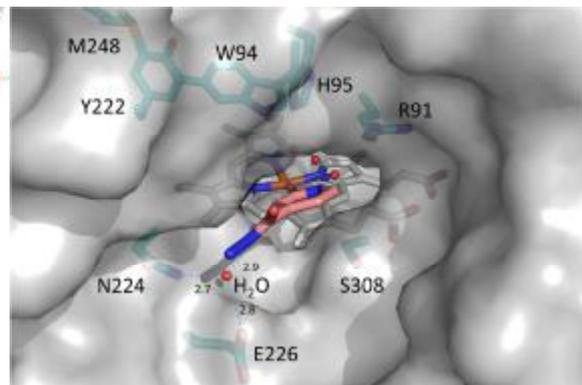


図 4 SeKatG における INH 結合部位 ②
(ピンク：INH、赤：H₂O)

審査結果要旨

ポルフィリン金属錯体の一つであるヘムは、蛋白質・酵素の補欠分子として、酸素運搬、電子伝達、酸化還元、有機基質への酸素添加などの多彩で重要な働きを担っている。

本学位論文は、過酸化水素消去の役割を担う二機能性ヘム酵素 **catalase-peroxidase(KatG)** の機能につき、特異的な抗結核薬イソニアジド(**INH**)の活性化機構の観点から論じたものである。**INH** は結核菌の有する **KatG** の **peroxidase** 機能によってラジカル種となり、**NAD** との付加体を形成し、結核菌特有の細胞膜合成を阻害すると言われている。しかし、**KatG** は二種の反応を触媒することからその反応機構は複雑であり、反応中間体や経路など未だ詳細は不明である。

第1章では、**Synechococcus elongatus PCC7942** に由来する **KatG (SeKatG)** の **native** 構造について報告している(**2.2 Å** 分解能)。近位 **Trp** 残基の近傍に **Na⁺**の結合を見出し、ラン藻由来 **KatG** では陽イオンによる静電ポテンシャル増加がラジカルの不安定化を引き起こしていると結論している。さらに、**C** 末端ドメインに π 電子に富んだユニークな構造モチーフの形成を見出し、蛋白質表面の **Trp** での **protein-based** ラジカルの寿命が比較的長くなっている可能性を示した。

第2章では、スペクトル法による **SeKatG** と **INH** の反応解析について報告している。**Mn²⁺** 存在下、ラジカル形成と共に **NAD** 付加体が生成されることを確認している。一方、ヘム由来ソーレー帯の吸収ピーク強度が、**INH** および **NAD** の添加によりラジカル形成反応とは無関係に減少することを見出し、それらがヘムポケットに電子環境変化を与える可能性を示した。

第3章では、**SeKatG-INH** 複合体の構造を報告している(**2.12 Å** 分解能)。様々な条件を試行し、複合体結晶の調製に成功している。3箇所 **INH** 分子に相当する電子密度を見出し、そのうちの1箇所は **protein-based** ラジカルの形成部位であり、もう1箇所はヘムポケットへの入口部位であった。前者はタンパク表面に形成されたラジカル部位を、後者は電子伝達に重要な役割を演じている水分子ネットワークを介してヘムに電子を供与し、反応を開始する2種類の反応機構の存在を明快に示した。

以上のように、本論文は、ラン藻由来酵素 **KatG** につきX線結晶構造解析と分光学的実験によりラジカル形成部位に関する新たな知見を得ており、さらに **INH** との複合体の構造解析に成功し2種の活性化反応経路の存在を明らかにするなど特筆すべき優れた成果を上げ、構造生物学および分子生物学の研究に大きく貢献している。したがって、本学位論文審査委員会は、当該論文が博士(理学)の学位を授与するに相当すると結論した。