

細菌ヒスチジンキナーゼの H-box を標的とする新規抗生物質、waldiomycin

○清水 莉子<sup>1</sup>、江口 陽子<sup>1</sup>、犬飼 洋一<sup>1</sup>、枳尾 尚哉<sup>2</sup>、岡島 俊英<sup>3</sup>、新家 粧子<sup>1</sup>、深溝 慶<sup>1</sup>、  
五十嵐 雅之<sup>4</sup>、木川 隆則<sup>5</sup>、内海 龍太郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>近大・院・農、<sup>2</sup>廣大、<sup>3</sup>阪大・産研、<sup>4</sup>微化研、<sup>5</sup>理研

【目的】細菌の二成分情報伝達システム(two-component system: TCS)はヒスチジンキナーゼ (HK) と対となるレスポンスレギュレーター (RR) からなり、細菌の病原性、増殖、バイオフィーム形成等の遺伝子発現の制御も担っていて、新規抗菌剤の標的として有効である。HK は細胞外のセンサードメイン、細胞内 2 量体化(DHp)ドメインと ATP 結合(CA)ドメインを構成成分として共通に有し、DHp ドメインは、2 本のヘリックス(I, II)からなり、それらがサブユニットとなりホモ二量体(4 ヘリックスバンドル構造)を形成している。本研究から見出した新規抗生物質、waldiomycin<sup>(1)</sup> は細菌 HK の DHp ドメインと相互作用し、自己リン酸化活性を阻害することが知られている。本研究では立体構造が既知である大腸菌の HK EnvZ DHp ドメインを用いて、waldiomycin による EnvZ DHp ドメインの内の標的部位を明らかにしようとした。

【方法】<sup>15</sup>N-EnvZ DHp を調製し、NMR による <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-HSQC スペクトルを用いた waldiomycin 滴定実験を行い、waldiomycin との相互作用の有無、また、相互作用領域を特定した。特定した相互作用領域を中心にアミノ酸残基のアラニン変異体を用いて、waldiomycin による自己リン酸化阻害活性(IC<sub>50</sub>)を測定した。IC<sub>50</sub> 測定において waldiomycin に耐性化を示した変異体を <sup>15</sup>N-EnvZ DHp 変異体として調製し、waldiomycin 滴定実験を行い、相互作用の変化を観測した。

【結果】<sup>15</sup>N-EnvZ DHp を用いての waldiomycin 滴定実験を行った結果、ヘリックス I 内の自己リン酸化ヒスチジン残基およびその近接領域である H-box と、ヘリックス II の C 末端に保存された疎水性アミノ酸を含む X-region を中心に明らかなクロスピーク強度の減衰が見られ、相互作用が確認された。H-box、X-region に位置するアミノ酸残基のアラニン変異体を用いて、waldiomycin による自己リン酸化阻害活性(IC<sub>50</sub>)を測定した結果、H-box 内の変異体 S242A、D244A、T247A、P248A は waldiomycin に顕著な耐性化を示した。これら 4 種の <sup>15</sup>N-EnvZ DHp 変異体を用いて、waldiomycin 滴定実験を行った結果、シグナル強度の減衰は観測されず、waldiomycin 結合能が明らかに弱くなったと考えられた。これらの結果は DHp ドメイン内に共通に保存された H-box 内の S242、D244、T247、P248 は waldiomycin の結合に重要なアミノ酸残基であることを示した。

【考察】waldiomycin は H-box、X-region を含む他のクラス I HK に対して、自己リン酸化活性を阻害した。H-box を保持しないクラス II HK CheA や、ヘリックス II の C 末端が短く X-region を保持しないクラス II HK NtrB には自己リン酸化阻害を示さなかった。これらの結果は waldiomycin がクラス I HK の DHp ドメインのヘリックス I の H-box とヘリックス II の X-region への結合により、CA ドメインの HK 触媒作用を阻害するという我々のモデルを強く支持した。現在、HK の DHp ドメインに作用するキナーゼ阻害剤はまだ報告されておらず、waldiomycin は DHp ドメインの H-box を標的とする最初のヒスチジンキナーゼ阻害剤であることが明らかとなった。

【文献】 1. Igarashi M., Watanabe T., Hashida T., Umekita M., Yanagida Y., Kino H., Kinoshita N., Sawa R., Nishimura Y., Utsumi R., Nomoto A. *J. Antibiot.* **66**,459-464 (2013).