

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15087

研究課題名(和文)結核菌の膜輸送体の結晶構造解析に向けた大量生産系の構築

研究課題名(英文)Construction of an expression system for membrane transporters of *Mycobacterium tuberculosis*

研究代表者

梶島 佳樹 (Kabashima, Yoshiki)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：00580573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリアの膜輸送体の構造解析のための発現宿主としては大腸菌しかほぼ成功例がなく、大腸菌で発現できない膜輸送体の研究は困難である。特に結核菌を含む高GCグラム陽性菌群の膜輸送体の高発現に成功した例は極端に少ない。そこで、本研究では、医学的、学術的に重要な結核菌由来の膜輸送体の発現系の構築を試みた。発現宿主の膜構造と脂質組成に着目し、非病原性で結核菌と同属の *Mycobacterium smegmatis* を蛋白質発現の宿主とした。その結果、結核菌由来の2つの膜輸送体 CtpF と MntH の発現系を構築することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で対象とする膜輸送体はすべて、宿主マクロファージ内での結核菌の長期生存に重要である。従って、本研究により、長期にわたってヒトの細胞内で生存するために、結核菌がどのようにして宿主内の免疫系に適応しているのか、その一端が明らかになることが期待される。将来的に、これらの膜輸送体の機能解析、阻害剤の探索などの研究が進めば、新規抗結核薬の開発につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：It is difficult to study bacterial membrane transporters that cannot be expressed in *E. coli*. In particular, there have been a few cases in which high expression of membrane transporters of high GC gram-positive bacteria, including *Mycobacterium tuberculosis*, was successful. Therefore, in this study, we tried to construct an expression system of membrane transporters derived from *M. tuberculosis*. Focusing on the membrane structure and lipid compositions of the expression host, *Mycobacterium smegmatis*, which is nonpathogenic and belonging to the genus *Mycobacterium*, was used as a host for protein expression. As a result, we have been successful for expressing two membrane transporters, CtpF and MntH derived from *M. tuberculosis*.

研究分野：生物科学

キーワード：膜輸送体 結晶構造解析 結核菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* は結核の原因菌である。結核は世界中で年間、100 万を超える死者を出す感染症であり、日本でも高齢者を中心に毎年新たに 1 万 7 千人もの患者が発生しており、対策は急務である。実際に新規抗結核菌の開発を目指した結核菌由来蛋白質の立体構造解析が盛んに行われており、1349 個もの原子構造が報告されている (2019 年現在)。しかし、この内、膜輸送体の構造決定に成功したのはわずか 1 例である。多くの膜輸送体は、栄養の取り込み、エネルギーの獲得など生命の根幹を担う機能を持つため、学術的重要性はもとより、分子標的薬開発のための研究対象としても有望である。膜貫通ヘリックスを複数もつ膜輸送体の立体構造解析は、一般に難度が高い。その原因のひとつは大量発現系の構築が困難であることが挙げられるだろう。現在、バクテリア膜輸送体の構造解析のための発現ホストとしては大腸菌しかほぼ成功例がなく、大腸菌で発現できない膜輸送体の研究は困難である。特に結核菌を含むグラム陽性菌の場合は大腸菌にない細胞壁をもつ上に、高 GC 群では糖が結合した特殊な磷脂質 phosphatidylinositolmannosides (PIMs, 図 1A) を細胞膜に含むことも原因だと考えられる。特に結核菌では PIMs が磷脂質の約 70% を占め、膜輸送体の機能に重要である可能性が高い。結核菌のような特殊な膜構造をもつ生物の膜輸送体の研究の発展のためには新たな発現システムの開発が必須である。

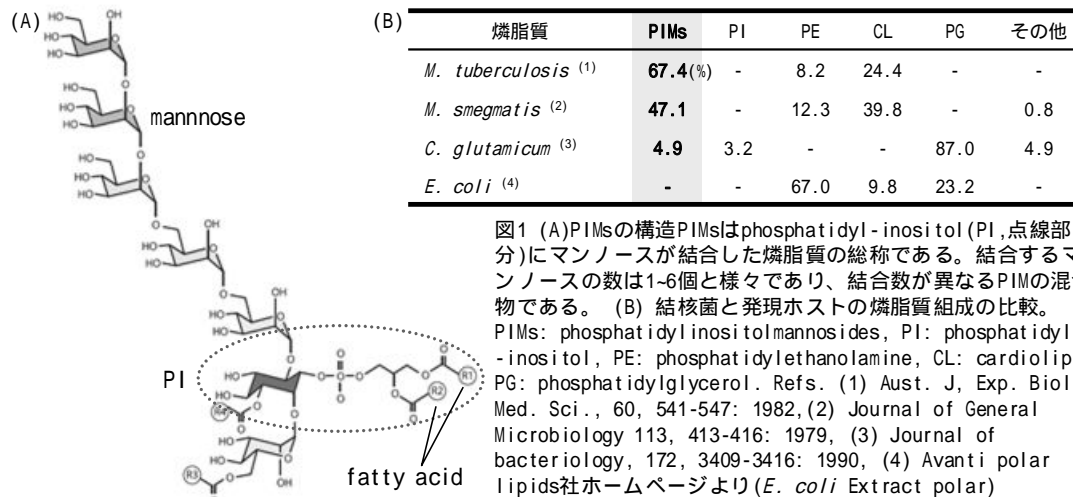


図1 (A)PIMsの構造PIMsはphosphatidyl-inositol(PI,点線部分)にマンノースが結合した磷脂質の総称である。結合するマンノースの数は1-6個と様々であり、結合数が異なるPIMの混合物である。(B) 結核菌と発現ホストの磷脂質組成の比較。PIMs: phosphatidylinositolmannosides, PI: phosphatidyl-inositol, PE: phosphatidylethanolamine, CL: cardiolipin, PG: phosphatidylglycerol. Refs. (1) Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 60, 541-547: 1982, (2) Journal of General Microbiology 113, 413-416: 1979, (3) Journal of bacteriology, 172, 3409-3416: 1990, (4) Avanti polar lipids社ホームページより(*E. coli* Extract polar)

結核菌を含む分類群であるアクチノバクテリア門(高 GC グラム陽性菌)を宿主とした発現系では、その産業的利用価値から *Corynebacterium glutamicum* の蛋白質発現系の開発が進んでいる。申請者は過去にアミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* をホストとし *C. glutamicum* 自身の膜輸送体であるシトクロム *bd* 型キノール酸化酵素の大量発現系構築に成功したものの、結核菌由来のシトクロム *bd* は生化学的な解析に必要な量は得ることができなかった (Kabashima et al 2009)。 *C. glutamicum* の磷脂質組成は結核菌と大きく異なるため、結核菌由来の膜輸送体の大量発現には適さないと考えられる (図 1B)。可溶性の蛋白質の場合でさえ、フォールディングや翻訳後修飾などの観点からも大腸菌をホストとした場合よりも、 *M. smegmatis* をホストとした方が、機能を保持した状態での発現の成功率は高いことが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、結晶構造解析に向けて、結核菌の膜輸送体を効率的に得ることができる大量発現系の構築を目的とする。現状では、バクテリア由来の膜蛋白質研究のための発現系はほぼ大腸菌しか選択肢がない。また、結核菌を含むアクチノバクテリア門に属するバクテリアの蛋白質発現系としては一番研究が進んでいる *Corynebacterium glutamicum* でさえ結核菌の膜輸送体の発現には適さない。また、対象とする膜輸送体に関しては将来的な立体構造解析と創薬の開発を目指すのでドラッグターゲットとなり得る以下、3 つの膜輸送体の発現を試みた。

(1) CtpF: 休眠期に高発現する P 型 ATPase(ポンプ蛋白質)で、アミノ酸配列から哺乳動物の骨格筋小胞体型 Ca^{2+} ポンプ(SERCA1a)と近縁であることが分かっている(identity 33%)。休眠期のイオン環境形成に寄与すると思われるが、詳細な機能は不明である。

(2) MntH: 菌体内部に Mn^{2+} を取り込む輸送体である。 Mn^{2+} は活性酸素除去酵素の補因子であり、結核菌がマクロファージ内の厳しい環境に適応するための非常に重要な膜輸送体である。 Mn^{2+} 輸送体と言われているが、輸送イオンの特異性は不明であり、近縁のホモログ蛋白質の研究からは Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} なども輸送するのではないかと考えられる。

(3) CydAB: ミトコンドリアのチトクロム酸化酵素にあたるバクテリア特有の電子伝達系酵素であり、ATP 合成のための H^+ 濃度勾配の形成に働く。チトクロム酸化酵素と比べて酸素に対する親和性は ~100 倍高い。そのため休眠期に移行する過程での低酸素環境下でエネルギー獲得に働く。ヒトに類縁の酵素はなく、薬剤の標的として有望である。

3. 研究の方法

本研究では、結核菌の膜構造の特異性を考慮し、蛋白質発現のホストとして結核菌と同属で非病原性の *Mycobacterium smegmatis* を使用した。*M. smegmatis* における蛋白質発現に使用される既存のシステムを導入するとともに、新たな発現用ベクターの開発も試みた。膜輸送体の大量発現は細胞にとって一般に毒性が強いため、恒常的に発現させるよりも化合物の添加や栄養シフトなどによって誘導できるタイプの方が有利である。したがって、*M. smegmatis* で働くプロモーターの内、生育条件により発現の ON/OFF が制御できるものを候補とした。次に、レポーターとして蛍光蛋白質 GFP を用いて蛋白質発現時の培養条件の最適化を行った。主に、培養温度や培地中の炭素源の種類を検討した。最後に、対象とした3つの膜輸送体をコードする遺伝子を *M. smegmatis* にコドン最適化した状態で人工合成し、発現実験を行った。目的蛋白質の検出、アフィニティ精製のためにタグの種類 (His, Strep-II, FLAG-tag) や融合蛋白質 (GFP, SUMO, Mistic) などの付加を検討した。

4. 研究成果

(1) *M. smegmatis* をホストとした蛋白質発現系の導入と開発

既存のシステムとして、大腸菌の T7 システムと tetR システムを *M. smegmatis* に応用した系を導入した。また、Cu⁺感受性遺伝子 *csor* のプロモーターを利用した新たな発現系の構築を試みた。Cu⁺排出ポンプをコードする *M. smegmatis* 由来 *csor* 遺伝子のプロモーター領域を *M. smegmatis*-*E. coli* シャトルベクターに挿入し、Cu⁺誘導性発現用ベクターを作製した。3つの発現用ベクターのプロモーター下流にレポーターとして GFP 遺伝子を導入し *Mycobacterium* 属細菌の合成培地である 7H9G 培地に Tween80 を添加した培地を用いて発現強度を比較した。図2に示すように、最も発現強度が高いシステムは T7 システムであった。しかし、この系では発現誘導前の発現リークが1割程度観察された(図2、赤)。この原因として、染色体上に挿入した T7 ポリメラーゼの遺伝子の発現の発現制御が厳密ではないことが挙げられる。T7 ポリメラーゼの発現を制御するプロモーターは *M. smegmatis* で働くアセトアミダーゼ遺伝子プロモーター(炭素源が枯渇し、アセトアミド存在下で誘導される)であり、培地の栄養状態に左右される。一方で、tetR システム(アンヒドロテトラサイクリン添加による発現誘導)の発現強度は T7 系と比べて低いものの、発現制御は厳密であり、誘導前の発現リークはほとんど見られなかった(図2、青)。以後の実験では発現強度が最も強い T7 系を採用したが、今後、T7 ポリメラーゼ遺伝子を tetR システム制御下に置くことにより、発現強度が高く、リークが少ないシステムに改良することができると考えられる。また *csor* プロモーター制御下での GFP の発現は見られなかった(図2、緑)。

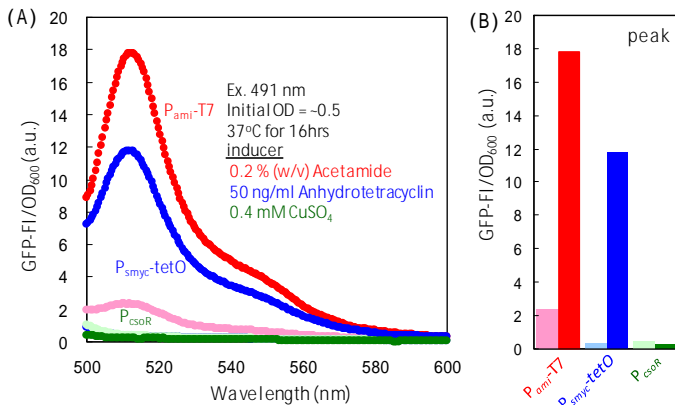


図2 GFPを用いた発現強度の比較

(2) レポーター遺伝子を用いた培養条件の検討

M. smegmatis の培養には上記に示した合成培地 (7H9G) に界面活性剤 Tween80 を添加した培地を使用する。*M. smegmatis* における T7 系では上記の通り、T7 ポリメラーゼの発現制御にアセトアミダーゼ遺伝子プロモーターを利用している。アセトアミダーゼは培地中の炭素源(一般的にはグルコースを使う)が枯渇し、アセトアミドが存在する条件下で発現誘導されるため、培地中の栄養条件などに大きく左右される可能性がある。そこで、GFP をレポーターとして培

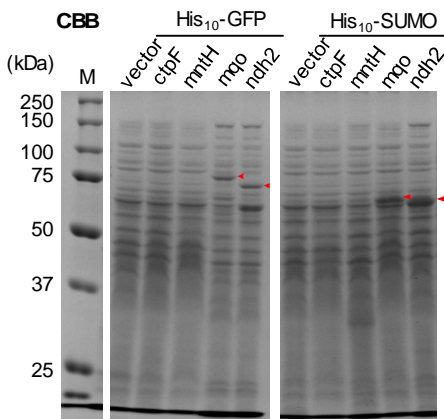


図3 膜画分のSDS-PAGE像

養条件を最適化するため、培養温度(30、37)、炭素源の種類、添加物の検討(複合培地の利用)の3点について検討した。については30で培養すると増殖速度が低下したが、GFPの発現量は37で培養したときと大きな変化はなかった。についてはGFPをレポーター遺伝子として発現誘導条件の検討を行った結果、培地中の炭素源としてコハク酸を使用した時に発現量が多い傾向にあった。については、ペプトンや酵母抽出物などの添加は菌体量を増やすものの、目的蛋白質の発現量を大幅に減少させることが分かった。

(3) 結核菌由来の膜輸送体の発現実験

人工合成した結核菌由来の CtpF, MntH を *M. smegmatis* 発現用プラスミド pYUB1062 (T7 プロモーター制御下) に挿入した。目的蛋白質の N/C 末端にアフ

イニティタグとして His10, Strep-II, FLAG タグなど、または目的蛋白質の簡便な検出のために GFP タグを付加した。(2)で最適化した条件下で発現を誘導したところ、CtpF の N 末端に His10 + GFP を付加したコンストラクトについて GFP の蛍光観察により発現を確認することができた。MntH についても同設計で GFP の蛍光が確認できたがその強度は CtpF の 1/10 程度であった。また、一般的に蛋白質の安定化に働く SUMO タグ (small ubiquitin like modifier) の N 末端への付加による発現量の増加は見られなかった。

本研究でターゲットとした CtpF と MntH は膜貫通ヘリックスが 10 本以上から構成されており特に発現難度が高い。従って、発現実験のコントロールとして膜表在性蛋白質の発現実験も並行して行った。ドラッグターゲットとして研究報告があるエネルギー代謝系の酵素、NDH2 (II 型 NADH 脱水素酵素) と MQO (リンゴ酸:キノーラ酸化還元酵素) の発現も試みた。His10+GFP/SUMO を N 末端に付加したコンストラクトを作製し、他の膜輸送体と同条件で発現を誘導したところ、CBB 染色で NDH2/MQO 由来のバンドを確認することができた (図 3)。ウェスタンブロットによる定量では GFP よりも SUMO 付加した時の発現量の方が約 2 倍多かった。これらの酵素はヒトには存在しないタイプなので、特異的阻害剤の研究により将来的な創薬への応用も期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Yoshiki Kabashima, Haruo Ogawa, Ayami Nakaji and Chikashi Toyoshima (2017) Crystal structures of calcium pump in complex with sarcolipin/phospholamban. The 15th International Conference on Na,K-ATPase and Related Transport ATPases Otsu Sep 24-30, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。