

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890114

研究課題名（和文） マイコバクテリアの細胞壁生合成に関わる候補遺伝子の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of candidates genes for mediating mycobacterial cell wall biosynthesis

研究代表者

福田 剛士（FUKUDA TAKESHI）

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：00506470

研究成果の概要（和文）：マイコバクテリアの免疫回避機構として、脂質に富む細胞壁の糖脂質群が重要な要因の一つとして示唆されている。それら糖脂質の生合成に関わるとされる酵素の活性を下降制御したマイコバクテリア変異株を用いて、防御機構における糖脂質群の生理学的な意義を明らかにする。本研究では、LM/LAM の生合成に関わる酵素の遺伝子改変をおこなったマイコバクテリア変異株を作成し、宿主の免疫に対する防御機構に関わるとされる LM/LAM について、細胞壁の構造における役割を調べた。

研究成果の概要（英文）：All species of mycobacteria have a repertoire of phosphatidylinositol (PI)-based glycolipids, known as lipoarabinomannan (LAM) and lipomannan (LM) as components of the plasma membrane and cell wall. LM and LAM are major immunomodulatory molecules of the *M. tuberculosis* cell wall, but their role as the components of cell wall structure remains elusive. We investigated the unclear role of LM and LAM as the components of cell wall

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：マイコバクテリア、GPI アンカー型糖脂質、細胞壁、酵素、細菌

## 1. 研究開始当初の背景

現在、世界人口の約 1/3 が結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) に感染しており、年間約二百万人が結核を原因として死亡している。結核菌は、ヒトのマクロファージが貪食した後、分解されることなく細胞内に

潜伏し感染が成立する。その脂質に富む細胞壁が、マクロファージの食作用から結核菌を防御していることが感染成立の重要な要因の一つと考えられている。その細胞壁を維持し、かつ宿主からの免疫反応を防ぐのに重要な役割を担っていると考えられている細胞

壁構成成分として glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー型糖脂質、phosphatidylinositol mannosides (PIM) と lipomannan (LM), lipoarabinomannan (LAM) がある。PIM の生合成経路については、かなり解明が進んでおり、また LM/LAM の生合成経路についてもその詳細が解明されつつある。しかし、生合成に関わるとされているいくつかの酵素については機能が未解明であり、それらについては PIM と LM/LAM の生合成経路への関わりを解明することは、結核菌のヒトへの感染機構の解明や結核症に対する薬剤開発へ大きな意義を持つ。

ほとんどのマイコバクテリア属は、細胞膜 (Plasma membrane; PM) にて、まず PIM と LM/LAM の前駆物質である phosphatidylinositol (PI) の生合成を行う。そして PI を出発物質として AcPIM2 の生合成がなされる。さらに、この AcPIM2 を元に、AcPIM6 および LM/LAM の生合成へといたる。すでにマイコバクテリア研究のモデル生物となっている *M. smegmatis* と近縁種のコリネバクテリウム属にて、PI から AcPIM2 までの生合成に関わる酵素として PimA、Acyltransferase (AcylT) 及び PimB' が同定されている。一方、所属研究室が、*M. smegmatis* を用いた無細胞 PIM 生合成アッセイ系をすでに確立させており、AcPIM6 が AcPIM2 に4個のマンノースを順次付加することによって産生される事を明らかにし、ポリプレノールリン酸マンノース (PPM) がマンノース供与体であることを示した。また、PIM と LM/LAM の合成経路が AcPIM4 を境に分岐する事も明らかにし、PIM の生合成に関わる5番目のマンノース転移酵素 PimE を同定した。所属研究室にて哺乳動物細胞の GPI 生合成に関わるマンノース転移酵素 PIG-M が報告されているが9、マイコバクテリウム属にて6種のホモログ (PIG-Mhomolog; Pmh) が、すでに確認されており機能解析が進められている。PimE (Pmh2) 以外に、2種のホモログ、Pmh3 と Pmh6 については LAM の前駆物質である LM の生合成に関わるマンノース転移酵素として同定された10,11。また、PimE 欠損株においては、AcPIM4 が生合成の停止した AcPIM6 の代わりに細胞壁にて機能している可能性が示唆されるなど、PIM、LM/LAM の生合成経路や生理的意義の一端が明らかとなり、関与する酵素も次々と同定され始めている。未解明の酵素の機能解析を行うことにより、PIM/LM/LAM の生理的意義のさらなる検証をすることが急務となっている。

結核菌で生存に必須と推測されている以外、未解明な Pmh について機能解析を行い PIM/LM/LAM の生合成においてどのような役割を担っているのかを解明する。中でも詳細

の不明な Pmh4 と Pmh5 について発現低下制御変異株の作成を行うことにより、PIM/LM/LAM の生合成停止を誘導する。生合成停止が行われた変異株の細胞壁構成成分の生合成推移のモニターを行う事により生合成のどの段階で Pmh4, 5 が機能しているか検討する。またこれらの機能欠失によって、細胞壁形成にどのような影響を与えるかについて解明する。

## 2. 研究の目的

マイコバクテリアの免疫回避機構として、脂質に富む細胞壁の糖脂質群が重要な要因の一つとして示唆されている。それら糖脂質の生合成に関わるとされる酵素の活性を下降制御したマイコバクテリア変異株を用いて、防御機構における糖脂質群の生理学的な意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(全体の概要) PIM と LM/LAM の生合成に関わると推測される酵素の内、未解明の Pmh について機能解析を行う。AcPIM2 から AcPIM4 まで、あるいは AcPIM5 から AcPIM6 までの生合成に関わっている可能性と AcPIM4 から LAM までの生合成に関わっている可能性がある。目的とする Pmh の発現低下した変異導入株を用いて、PIM と LM/LAM の生合成への影響を検討し、マイコバクテリウム属の脂質に富んだ細胞壁領域の形成メカニズムにおいてどのような生理的意義があるのかを解明する。

Pmh の生存に必須であると推測されている Pmh4 と Pmh5 について、*M. smegmatis* を用いて発現低下制御が可能な変異株を作成し、PIM/LM/LAM の生合成の変化をモニターする。通常、生存に必須な遺伝子の欠損株にて生化学的に検証することは、変異株が生育出来ないために不可能である。一方、発現低下制御を行うならば、変異株の遺伝子発現を任意に制御できるので、各種の生化学的な実験を行う事が可能な事が本法の利点である。発現制御に用いる手法、Tet-off プロモーターシステムは、テトラサイクリン誘導体 (Anhydrotetracycline; atc) を菌体増殖中の培地に添加することによって、Pmh4 と Pmh5 の発現を下降制御する方法で、*M. smegmatis* の生存に必須なタンパク質発現を約 96% 抑えることが報告されている。

作成手順として、まず *M. smegmatis* のゲノム DNA を鋳型として Pmh4 と Pmh5 の遺伝子の 5' フラグメント増幅を PCR にて行う。マイコバクテリア用 Tet-off ベクターに各遺伝子フラグメントを別個に導入する。Pmh をコードした Tet-off ベクターをエレクトロポレーション法を用いて *M. smegmatis* に導入し相同組換えにて染色体 DNA へ組み込む。得られた変異株に対して、さらにテトラサイクリ

ン・リプレッサー発現用のエピゾーマルベクターの導入も行うことによって、Tet-off プロモーターシステムを用いた発現下降制御変異株の作成が完了する。

(1) PIM と LM/LAM の生合成に関わると推測される酵素の内、未解明の酵素について機能解析を行う。AcPIM2 から AcPIM4 まで、あるいは AcPIM5 から AcPIM6 までの生合成に関わっている可能性と AcPIM4 から LAM までの生合成に関わっている可能性がある。目的とする Pmh の発現低下した変異導入株を用いて、PIM と LM/LAM の生合成への影響を検討し、マイコバクテリウム属の脂質に富んだ細胞壁領域の形成メカニズムにおいてどのような生理的意義があるのかを解明する。実験手順は、以下の通りである。

得られた Pmh4 と Pmh5 の各変異体株については、atc 添加後の細胞増殖を、親株との比較を行うことによって検討する。親株との増殖差が明らかであることを検証後、増殖減少の一定時間毎に菌体回収を行い、PIM/LM/LAM のどのステップで生合成が停止しているかを検討する。PIM はクロロホルム・メタノール・水混合液によって抽出後、水ブタノール二層分離によって精製し、薄層クロマトグラフィで分離した後、オルシノール染色法によって検出する。LM/LAM は、フェノール処理によって抽出し、疎水性カラムクロマトグラフィによって精製、SDS-PAGE によって分離し、シッフ法を用いた糖鎖の蛍光ラベリングによって検出する。これらの手法はすでに一般的な手法として確立している。上記の検討の後、異常蓄積している生合成の中間体が同定できたならば、その中間体が関与する生合成のステップの異常をさらに詳細に検討する。具体的には放射性同位元素で標識されたイノシトールやマンノースを用いたパルスチェイス代謝標識法を用いて特定の生合成ステップの異常を検出したり、無細胞系を確立して放射性同位元素で標識された GDP-マンノースや PPM の取り込み異常を検出したりすることによって検討することが出来る。

(2) すでにマイコバクテリア研究のモデル生物となっている *M. smegmatis* と近縁種のコリネバクテリウム属にて、PI から AcPIM2 までの生合成に関わる酵素として PimA、AcylT 及び PimB' が同定されている。しかし、これらの酵素は予想される膜貫通領域が無く、どのように PM に局在しているのかは明らかではない。これらの酵素が膜貫通領域を有しないのに、どのような作用機序にて細胞膜に局在しているのかについて詳細を解明する。手法としては、各酵素についてエピソードタグをつけて過剰発現させ、すでに確立されているシヨ糖密度勾配遠心法を用いて

PM への局在を検証する。

#### 4. 研究成果

(1) 「細胞壁生合成に関わる酵素、Pmh の発現低下する変異株の作成」

菌体の PIM/LM/LAM の生合成経路において生存に必要な遺伝子発現を任意に制御することにより、生菌にて直接的に生合成へ影響を与えて未解明な酵素の機能を検証する。成果として、PIM/LM/LAM の生合成に関わる Pmh4-6 の内、結核菌による免疫回避機構において重要な因子の LM/LAM の生合成に関わる酵素、Pmh6 について発現下降制御株の構築を行った。獲得した変異株を用いて生化学的検証を開始した。

(2) 「PIM の生合成に関わる酵素である AcylT 及び PimB' の局在の解明」これらの酵素は予想される膜貫通領域が無く、どのように細胞膜に局在しているのかは明らかではない。これらの酵素が膜貫通領域を有しないのに、どのような作用機序にて細胞膜に局在しているのかについて検証した。成果として、AcylT 及び PimB' の過剰発現株の構築を行った。獲得した変異株についてシヨ糖密度勾配遠心法を用いて局在する細胞膜画分を採取し、生化学的検証を開始した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Chubert B. C. Sena, Takeshi Fukuda, Kana Miyanagi, Sohkiichi Matsumoto, Kazuo Kobayashi, Yoshiko Murakami, Yusuke Maeda, Taroh Kinoshita, Yasu S. Morita, Controlled expression of branch-forming mannosyltransferase is critical for mycobacterial lipoarabinomannan biosynthesis, The Journal of biological chemistry, 査読有、Vol. 285, 2010, pp. 13326-13336

[学会発表] (計 4 件)

① 福田 剛士、木下 タロウ、森田 康裕、マイコバクテリアのリポアラビノマンナン生合成抑制によるリポマンナン様産物の蓄積と増殖へ与える影響  
第 83 回日本細菌学会総会 P1-056、平成 22 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜

② 福田 剛士、前田 裕輔、木下 タロウ、森田 康裕、マイコバクテリアのリポアラビノマンナン生合成抑制による未知産物の蓄

積とその蓄積が増殖へ与える影響  
第 82 回日本生化学会大会  
特記事項；ポスター（4P-064）・口頭発表  
（4T18p-18）平成 21 年 10 月 24 日、神  
戸ポートアイランド

③ 福田 剛士、木下 タロウ、森田 康裕、  
マイコバクテリアのリポアラビノマンナン  
生合成の抑制が増殖に与える影響、  
第 82 回日本細菌学会総会 P2-055、平成 21  
年 3 月 13 日、名古屋国際会議場

④ 福田 剛士、前田 裕輔、木下 タロウ、  
森田 康裕、マイコバクテリアの GPI 型糖脂  
質生合成に関わる酵素の細胞内局在、  
BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第  
81 回日本生化学会大会 合同大会  
特記事項；ポスター（2P-0008）・口頭発表  
（2T23-3）平成 20 年 12 月 10 日、神戸  
ポートアイランド

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 剛士 (FUKUDA TAKESHI)  
大阪大学・微生物病研究所・特任研究員  
研究者番号：00506470