

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15435

研究課題名（和文）マイコバクテリアにおける低酸素適応戦略の理解

研究課題名（英文）Understanding hypoxic adaptation strategies in Mycobacteria.

研究代表者

松尾 祐一（Matsuo, Yuichi）

熊本大学・大学院生命科学研究部（保）・助教

研究者番号：60802824

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：DHODHとSQORの機能解析に取り組んだ。遺伝子ノックダウンの結果、Mycobacterium smegmatisでは、DHODHは細胞増殖に重要な遺伝子であったが、致死性の遺伝子ではなかった。培地中にピリミジン合成系の代謝中間体であるウリジンを加えることで、遺伝子ノックダウン株の増殖が回復することから、DHODHが機能しなくても、細胞外の基質を利用することで、M. smegmatisは生存を維持することが明らかになった。そして、結核菌のSQORは、8つの硫黄原子からなるオクタチオカンを硫黄化合物として産生する可能性が示唆され、新たなタイプの酵素であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界保健機関の推計によると、世界人口の3分の1にあたる20億人が結核に感染し、そのうち毎年800万人の新たな結核患者が発生し、300万人が結核で死亡している。結核菌の治療薬に対する多剤耐性菌の流行が、公衆衛生上の世界的課題とされており、新たな治療薬の開発が望まれている。本研究では、核酸代謝と硫黄代謝に注目して研究を進め、核酸代謝は細胞の増殖に重要であることが分かった。また、結核菌は硫黄代謝に関する新たなタイプの酵素をもつことが分かった。結核菌における硫黄代謝の生理的意義については、明らかになっていないため、これらの結果は硫黄代謝を理解する基盤となり、創薬研究への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The functional of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) and sulfide:quinone oxidoreductase (SQOR) in Mycobacterium tuberculosis was analyzed. Gene knockdown based on CRISPR interference results showed that in Mycobacterium smegmatis (M. smegmatis), DHODH was arrested cell growth but not lethal gene. The addition of uridine, a metabolic intermediate of the pyrimidine synthesis system, to the culture medium restored the growth of the DHODH knockdown strain, indicating that M. smegmatis maintained survival by utilizing extracellular substrates even when DHODH was not functional. It was then suggested that SQOR of Mycobacterium tuberculosis may produce octathioacan, indicating that it is a new type of enzyme.

研究分野：細菌学

キーワード：硫黄代謝 核酸代謝 エネルギー代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Mycobacterium 属は、遅発育抗酸菌と迅速発育抗酸菌に分類される。非結核性抗酸菌症の病原体である *Mycobacterium avium* (*M. avium*) と結核菌は遅発育抗酸菌に分類され、ヒトの肺に感染し、特徴的な病変である肉芽腫を形成する。肉芽腫は結核菌を取り囲むマクロファージと T 細胞の集積体で、その内部は低酸素環境である。そして、結核菌と *M. avium* はエネルギー代謝系を再構成することで、低酸素環境下への適応を可能とする。ヒトではミトコンドリア内膜に呼吸鎖酵素が局在し ATP を産生するが、グラム陽性細菌である結核菌では細胞膜に呼吸鎖酵素が存在し ATP を産生する。低酸素環境下での結核菌は、Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH)、Sulfide quinone oxidoreductase (SQOR) が発現誘導される。DHODH は細胞膜に局在し、メナキノンとジヒドロオロト酸を基質とすることから、核酸代謝とエネルギー代謝に役割を果たし、SQOR はメナキノンと硫化水素を基質とすることから、電子伝達と硫黄代謝に役割を果たす。また、トランスポゾン変異導入法を用いた遺伝子スクリーニングにより、結核菌において DHODH は生存に必須であることが報告されている。このように、低酸素環境下で発現が誘導される DHODH と SQOR は酸素環境への適応において重要であると考えられるが、生化学的解析は行われていない。

2. 研究の目的

本研究は、低酸素環境の *Mycobacterium* 属において、電子伝達と核酸代謝に重要である DHODH と、電子伝達と核酸代謝に重要である SQOR の分子基盤を生化学的手法と構造生物学的手法により明らかにすることを目的としている。本研究で、生存に必須な遺伝子とされるこれらの分子の構造が明らかとなれば、創薬における新たな標的分子としての可能性を見出すことにつながる。現在、多剤耐性結核菌は公衆衛生上の危機となっており、結核菌治療薬の創薬開発へ向けた基盤となると期待できる。

3. 研究の方法

1. 遺伝子ノックダウンによる表現型の解析

CRISPR interference による遺伝子ノックダウンにより、核酸代謝系が与える細胞増殖への影響を解析する。

2. 組換えタンパク質の発現・精製

大腸菌を用いて、遅発育抗酸菌である *M. avium* の組換え DHODH を発現・精製し、これを用いて K_m や V_{max} などの酵素学的パラメータを解析する。

3. 構造生物学的解析

結晶化スクリーニングキットにより組換えタンパク質を結晶化した後に、SPRing-8 などの大型放射光施設で X 線回折データを測定し、結晶構造を決定する。キノン、及び、基質との共結晶を解析することにより、原子レベルで反応機構を解析する。

4. 研究成果

1. 遺伝子ノックダウンによる表現型の解析

CRISPR interference により、*Mycobacterium smegmatis* の DHODH のノックダウンを行った。その結果、細胞増殖が抑制されるが、致命的ではないことが分かった。さらに、培地にピリミジン合成系の中間代謝物であるウリジンを加えたところ、細胞増殖が回復することから、細胞外のウリジンを利用することで、ピリミジン合成を行うことが分かった。

2. 組換えタンパク質の発現、および精製

大腸菌を用いた組換えタンパク質の発現、および精製に取り組んだ。DHODH は、複数のタグを付加した組換えタンパク質を、複数の大腸菌を用いて発現実験の検討を行ったが、封入体を形成し、安定して膜画分に局在する DHODH を得ることができなかった。一方、SQOR は大腸菌を用いた組み換えタンパク質の発現系を構築し、高純度での精製方法を確立した (図 1)。

3. SQOR の生化学的解析

ヒト SQOR は、Flavin adenine dinucleotide (FAD) を補欠族分子としてもち、硫化水素の電子をキノンへと受け渡し、硫黄原子は硫黄受容体であるグルタチオン、CoA などに硫黄を受け渡す。こ

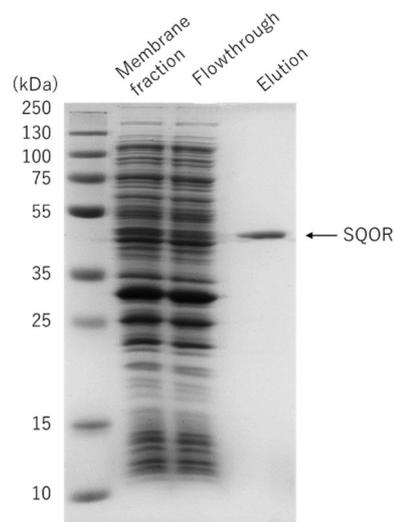


図1. 組換えSQORの精製

のように、ヒト SQOR では、硫化水素、キノン、および硫黄受容体が基質となる。一方、結核菌 SQOR は FAD を補欠族分子としてもち、硫化水素とキノンを基質とし、硫黄受容体を必要としないことが分かった。このことから、SQOR は 8 つの硫黄原子からなるオクタチオカンが硫黄化合物として産生する可能性が示唆された。また、ヒト SQOR の反応中間体である電荷移動錯体がみられないことから、結核菌 SQOR では電荷移動錯体を形成しないか、または検出できないほど一瞬であることが示唆された。

4. 構造生物学的解析

組換え SQOR の結晶化条件を検討し、結晶化条件を確立した(図 2)。そして、2.0Å の結核菌 AQOR の結晶構造を得ることに成功した。その結果、結核菌の SQOR は至適温度が 80 以上の超好熱性細菌である *Aquifex aeolicus* と構造に近いことが明らかとなった。結核菌 AQOR の 160 番目のシステインと、338 番目のシステインが FAD と近接しており、これまでに報告のある SQOR と同様に 2 つのシステインを介して、硫化水素の電子を受け渡すことが示唆された。

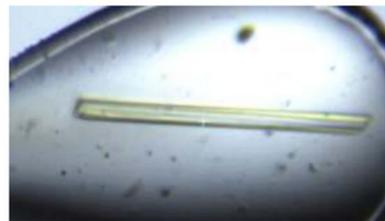


図2. 組換えSQORのタンパク質結晶

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Bundutidi M. G., Ando Y., Matsuo Y., Nakatani Y., Kiel H., Cook G. M., Sakura T., Hamano S., Hirayama K., Kita K., Inaoka D. K.
2. 発表標題 Expression of trypanosomal acetate: succinate CoA transferase is sufficient to develop resistance to the ATP synthase inhibitor bedaquiline in Mycobacterium smegmatis
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第47回討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾祐一、稲岡健ダニエル、北潔
2. 発表標題 結核菌Sulfide quinone oxidoreductase の生化学的解析
3. 学会等名 第6回抗酸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾祐一、稲岡健ダニエル、北潔
2. 発表標題 結核菌Sulfide quinone oxidoreductase の生化学的解析
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------