

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790322
 研究課題名 (和文)
 分岐鎖脂肪酸によるキャリアーリピド依存型細胞壁物質合成・輸送阻害に関する研究
 研究課題名 (英文)
 Study of the inhibitory effect of branched-chain fatty acids on carrier-lipid-dependent biosynthesis and transport of bacterial cell wall materials.
 研究代表者
 新垣 隆資 (SHINGAKI RYUJI)
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：40294417

研究成果の概要：細胞膜を構成する主要脂肪酸として一部の細菌が持つメチル分岐を有した脂肪酸のある種の分子 (12-メチルテトラデカン酸ならびに 13-メチルテトラデカン酸) がグラム陽性菌に対して示す抗菌作用と、一部のグラム陰性菌が示す swarming 運動性阻害活性について解析を行い、C-55 キャリアーリピド依存的に行われる細胞壁物質や菌体外多糖様物質の合成・輸送を阻害する機構を解析した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：感染症、抗生物質、細菌、脂質、生体分子、生理活性

1. 研究開始当初の背景

医学領域における細菌学研究は病原微生物による感染症の制圧を最大の目標に、その達成に向け、感染症の診断、治療、予防の各面の発展に献身的に取り組んできた。これまでに得られた多大なその研究成果は基礎から応用に及ぶ細菌学の発展に大きく寄与するとともに、国民生活に健康と安心をもたらしてきた。

しかしながら一方においては新興感染症や薬剤耐性菌の出現による新たな課題に対してその対応を求められている。本研究は、細菌が元来備え持つ自発的なプログラムによる溶菌と細胞壁欠損の機構発現において重要な役割を担う分岐鎖脂肪酸が示す新規創薬リード物質としての可能性について解析を行う応用基礎研究である。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は分岐鎖脂肪酸の作用機構の解析である。現在推定する作用対象はグラム陽性菌特有の細胞壁物質であるタイコ酸の合成における膜プロセスにて重要な役割を担う数種の膜タンパク質であるが、これら膜タンパク質については情報生物学的に原核生物、真核生物ともに相同遺伝子産物が存在する事が分かっている。この事は、ある細菌を用いたモデル解析の結果をもとに、研究対象を横に大きく広げられる可能性を持つ事を意味している。分子遺伝学、基礎知見、ならびに情報学の系が充実しているモデル細菌研究により、迅速な作用機構の解明を目指す。

(2) 本研究の意義については、メチル分岐を持つ分岐鎖脂肪酸の生理活性に関しては、1) ミキソバクテリア (子実体形成能を持つグラム陰性環境細菌) における溶菌作用 (*J Bacteriol* 1986 **167**: 356)、2) ガン細胞の増殖阻害、アポトーシス誘導作用 (*Cancer Res* 2000 **60**: 505; *Prostate* 2003 **55**: 281)、3) 線虫分化における必要因子 (*Plos Biol* 2004, **2**:1446) 等の報告がなされている。作用機構の詳細については不明な部分が多く残されているが、分岐鎖脂肪酸は広い生物種において増殖や分化に関わる重要な役割を担っている分子であると考えられる。モデル細菌を対象としてその作用機構の解明を目指す本研究は、臨床医学上、生物学上重要な意義を持つ研究であり、その成果は病原細菌やガン細胞の増殖抑制、ならびに真核生物の発生・分化制御の理解に繋がるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) グラム陽性菌への分岐鎖脂肪酸の作用点に関する検討

① Tag0膜タンパク質への作用

原核生物ならびに真核生物のキャリアーリピド分子は鎖長の異なるポリイソプレノイド

であり、それぞれ細菌細胞壁物質の合成と輸送、ならびにタンパク質への糖鎖付加に関わっている。過去の研究において、これらの合成に関わる膜タンパク質には13アミノ酸残基から成るキャリアーリピド認識配列 (PIRS) が存在すると報告されている。そのアミノ酸配列は大腸菌ポリシアル酸合成酵素NeuEにおいてはLIILFLIFPFNFFであり、枯草菌Tag0では321-333番目のアミノ酸配列FIIFILIIIFMQIIがこれに該当すると考えられた。そこでこの配列にHis-タグを付加したペプチドを合成し、Ni-ビーズに結合させた系を用いて、各種脂肪酸との相互作用に関して検討を行った。

② グラム陽性菌への殺菌的作用の検討

抗真菌剤の一つであるアムホテリシンBは真菌に存在する膜コレステロールに特異的に結合し膜傷害を起こす事が知られている。分岐鎖脂肪酸のグラム陽性菌に対する殺菌性を膜傷害の観点から検討するため作用後における細胞外へのカリウムイオンの漏出を測定した。

(2) グラム陰性菌 swarming 運動抑制作用

グラム陽性菌に対して抗菌作用を示した分岐鎖脂肪酸であるが、グラム陰性菌増殖に対しては作用を示さなかった。次に運動性に対する作用の検討を行った。大腸菌 K-12 株ならびに緑膿菌 PA01 株の swimming ならびに swarming 培地に $5 \mu\text{g/ml}$ の濃度で脂肪酸を添加し、一晚培養後の運動性抑制作用を調べた。

4. 研究成果

(1) グラム陽性菌への作用点解析

① 増殖阻害作用を示す分岐鎖脂肪酸がキャリアーリピド認識配列 (PIRS) に強く結合する結果が得られた (図1)。

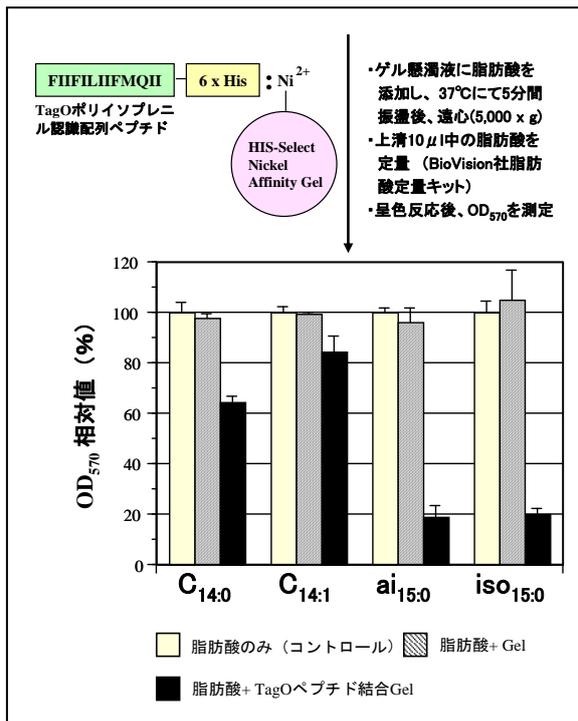


図1 各種脂肪酸とPIRS配列との結合性

また枯草菌培養において、このTagO PIRSペプチドを分岐鎖脂肪酸添加前に加えると、その作用を大きく低下させた。一方、他の膜タンパク質配列に対する結合性は他の脂肪酸と同程度であったことから、分岐鎖脂肪酸はPIRS特異的に強い結合性を示す事が示唆された。分岐鎖アミノ酸は分子内に存在するメチル基により強い疎水性を示す。分岐鎖アミノ酸に富んだ配列と、同様にメチル基を有する分岐鎖脂肪酸との強い結合性は疎水性相互作用等によるものと推察される。膜タンパク質の機能調節等に遊離型のある種の膜構成脂肪酸が関わっている可能性が示唆されるこの結果は膜工学上、意義深いものと考えられる。

② *Candida albicans*に対するアムホテリシンBの作用試験結果を参照に、黄色ブドウ球菌を用いて解析を行った結果、分岐鎖脂肪酸は*C. albicans*に対するアムホテリシンBの作用と同様に、細胞内からカリウムイオンを

漏出させる結果が得られた (図2)。

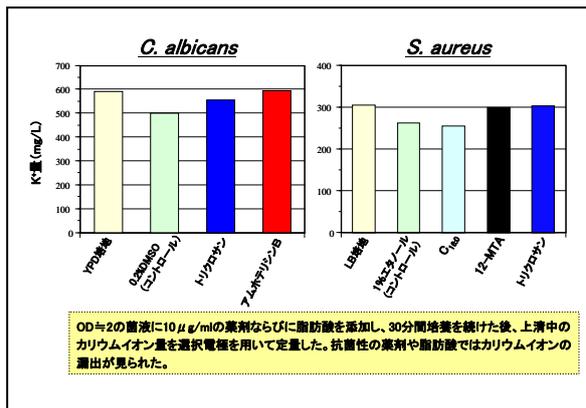


図2 抗菌性脂肪酸による細胞外へのカリウムイオンの漏出

グラム陽性菌に対して抗菌性を示す分岐鎖脂肪酸の一つである 12-メチルテトラデカン酸 (12-MTA) は黄色ブドウ球菌に殺菌的に作用するとともに細胞内のカリウムイオンを漏出させた。同様に ATP についても測定を行ったが、漏出は認められなかった。遊離型の 12-MTA はグラム陽性菌の膜構造或いは膜機能を傷害し細胞内の小分子を漏出させるよう作用する事が示唆された。さらなる解析のもと、作用の最大化、副作用の最小化を図る分子設計を行う事により、分岐鎖脂質をリード化合物とする新規抗菌剤の開発が期待される。

(2) グラム陰性菌のswarming抑制

分岐鎖脂肪酸は緑膿菌ならびに大腸菌の swarming 運動を抑制した (図3)。その抑制作用は swimming 運動は抑制しない事から鞭毛運動を直接阻害しているのではなかった。我々のグループは大腸菌 K-12 株の遺伝子破壊株セットを用いた解析により、swarming 運動には 216 の遺伝子産物が関わっており、中でも LPS や ECA (腸内細菌共通抗原) が重要な役割を担う事を報告した (Inoue, Shingaki et al., 2007 J Bacteriol 189 950-957.)。

分岐鎖脂肪酸の swarming 抑制作用様式は ECA 欠損株のそれらと類似しており、swarming 培地上に観察される wetting 物質を消失させた。ECA 合成酵素群のいくつかは枯草菌のタイコ酸合成系のものと相同性があり、同じ作用点を示す可能性がある。現在引き続き、各種脂肪酸による swarming 培地上への wetting 物質ならびにサーファクタントの分泌抑制について解析を行っている。

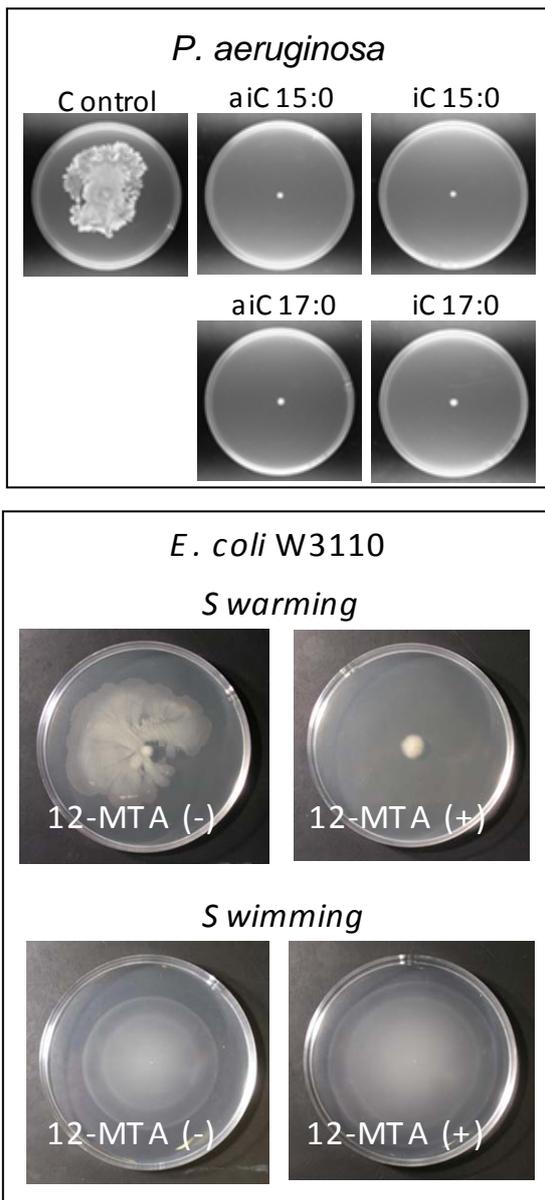


図3 分岐鎖脂肪酸による緑膿菌ならびに大腸菌の swarming 抑制

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 2 件)

- ① Inoue, T., Shingaki, R. & Fukui, K. Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. FEMS Microbiology letters Vol. 281 81-86. (2008) 査読有
- ② 新垣隆資、井上哲圭、福井一博 Methyl branched-chain lipids inhibit gram-positive bacterial growth and gram-negative bacterial swarming motility. 19th SYMPOSIUM ON MICROBIAL SCIENCES SYMPOSIUM PAPERS 80-81. (2007) 査読無

[学会発表] (計 4 件)

- ① *井上哲圭、新垣隆資、福井一博 長鎖脂肪酸の緑膿菌 swarming 運動およびサーファクタント産生への影響 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 12 日、名古屋市
- ② *新垣隆資、井上哲圭、福井一博 抗菌性分岐鎖脂肪酸による膜プロセス阻害の検討 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 25 日、京都市
- ③ *新垣隆資、井上哲圭、加藤慶二郎、福井一博 分岐鎖ならびに不飽和脂肪酸の細菌への作用 第 60 回日本細菌学会中国・四国支部総会 2007 年 10 月 14 日
- ④ *新垣隆資、笠原康裕、井上哲圭、福井一博 メチル分岐鎖脂質の細菌への多彩な作用に関する研究 第 19 回微生物シンポジウム 2007 年 9 月 8 日 東京都

文京区

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新垣 隆資 (SHINGAKI RYUJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40294417

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(3) 研究協力者

笠原 康裕 (KASAHARA YASUHIRO)

北海道大学・低温科学研究所・准教授

研究者番号：20273849

井上 哲圭 (INOUE TETSUYOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20223258