

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07377

研究課題名(和文) 結核菌におけるNAD代謝経路の解析とその代償的経路の解明

研究課題名(英文) Analysis of NAD metabolic pathway in Mycobacterium tuberculosis and elucidation of its compensatory pathway

研究代表者

森 茂太郎 (MORI, Shigetaru)

国立感染症研究所・細菌第二部・室長

研究者番号：60425676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では主に、NAD生合成経路に関わっている抗酸菌由来酵素の機能と構造の解析を行った。その結果、大腸菌内における結核菌由来Rv0212c、Rv1901c、Rv3199c、及びRv3393の発現条件を決定するとともに、Rv3393がヌクレオシド加水分解活性を示すことを明らかにした。また、Mycobacterium smegmatis由来ホスホリボシル二リン酸合成酵素の基質結合部位の構造がヒト由来同酵素とは異なっていることを示した。さらに、結核菌由来Rv3257cとRv3308の詳細な酵素学的諸性質を決定するとともに、M. avium由来ヌクレオチド加リン酸分解酵素の立体構造を決定した。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we mainly analyzed the functions and structures of mycobacterial enzymes involved in the NAD biosynthetic pathway. The optimal conditions for expressing Rv0212c, Rv1901c, Rv3199c, and Rv3393 of Mycobacterium tuberculosis in Escherichia coli were determined. We found that Rv3393 shows nucleoside hydrolysis activity. In addition, we showed that the structure of the substrate-binding site of phosphoribosyl diphosphate synthase from M. smegmatis differs from that of human phosphoribosyl diphosphate synthase. Furthermore, the enzymatic properties of Rv3257c and Rv3308 from M. tuberculosis and the three-dimensional structure of the nucleotide phosphorylase from M. avium were determined in detail.

研究分野：構造生物学、細菌学

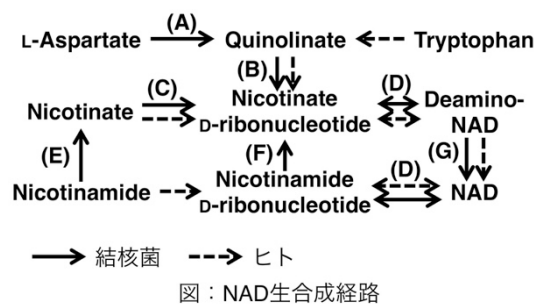
キーワード：結核菌 タンパク質 酵素 ドッキングシミュレーション

1. 研究開始当初の背景

結核菌はヒトに対して重篤な感染症である結核を引き起こす病原性細菌である。結核により今なお世界中で毎年 100 万人以上が亡くなっており、さらに最近では既存の抗結核薬に耐性を示す多剤耐性結核菌や超多剤耐性結核菌が大きな問題となっている (Global tuberculosis report 2014, WHO)。そのため、新しい抗結核薬の開発につながる研究が求められている。一方、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) は生体内において多くの酸化還元反応に必須な補酵素であることから、NAD 代謝経路は様々な疾病に対する治療薬の標的として考えられている (*Expert. Opin. Ther. Targets.*, 2007, 11:695-705)。NAD 生合成経路には大きく分けて新生経路と再生経路が存在している (右図参照)。新生経路では結核菌は L-Aspartate から NAD を合成するのに対して (経路: A→B→D→G)、ヒトは Tryptophan から NAD を合成する。さらに、NAD は生体内で利用されて Nicotinate や Nicotinamide にまで変換された後に再生経路によって再合成されるが、結核菌では Nicotinamide を Nicotinate に変換する必要がある (経路: E)。一方、ヒトではこの経路は必要ない。また、再生経路の途中にはヒトには存在しないが結核菌には存在している経路もある (経路: F)。従って、NAD 生合成経路はヒトには作用せず結核菌のみに有効な新規抗結核薬の標的として考えられている。しかしながら、結核菌の NAD 生合成経路、特にヒトには存在しない経路 (A や F) に関わるタンパク質の詳細な機能や構造はほとんど明らかにされていなかった。

一方、抗結核薬として用いられているピラジナミドは Nicotinamide の構造類縁体であり、Rv2043c タンパク質 (pncA: 経路 E) によって菌体内で活性化される。そのため、結核菌は pncA の酵素活性を失活または変化させて (すなわち pncA 遺伝子を変異させて) ピラジナミド耐性を獲得している (*Antimicrob. Agents*

Chemother., 2000, 44:528-532)。しかしながら、この pncA は NAD 再生経路において重要な役割を担っていることから、pncA 変異株では代償的経路を働かせることによって NAD の生合成を補っていると考えられる。しかしながら、結核菌における NAD 生合成経路の代償的経路については何も明らかにされていなかった。



2. 研究の目的

これまでに本申請者は、先行する研究課題において結核菌の NAD 生合成経路に関わるタンパク質 (Rv1596 と Rv1330c タンパク質) の詳細な機能を解析してきた。そこで本研究課題では、引き続き NAD 生合成経路に関わっているが機能や構造が未知であるタンパク質についてその機能と構造の相関を解析することにより、結核菌における NAD 生合成経路の全体を明らかにすることを目的の 1 つとした。

もう 1 つの本研究課題の目的は、結核菌において NAD 生合成経路の代償として働いている経路を解明することであった。本研究課題では pncA 変異株を用いて、代償的に働いている経路 (遺伝子・タンパク質) を同定するとともに、その機能や生理的な役割を解明することを 2 つ目の目的とした。

そして、これら 2 つの研究で得られた成果によって、結核菌における NAD 生合成の全体像を明らかにするとともに、NAD 代謝経路を標的とした新規抗結核薬の開発に結びつけることを最終的な研究目標とした。

3. 研究の方法

本申請課題では、上記の研究背景と目的に基づき、大別して次の3つの研究を行った。

(1) 標的タンパク質の機能解析：結核菌における NAD の生合成に関わるタンパク質のうち、詳細な機能がまだ解析されていない Rv0212c, Rv1901c, Rv3199c, 及び Rv3393 タンパク質、並びに NAD 生合成に関連する Rv3257c と Rv3308 タンパク質について、pCold ベクター (TaKaRa 社) を用いた大腸菌内での発現系の構築を行なった。また、pCold ベクターを用いた系では大腸菌内で可溶性タンパク質として発現しなかったタンパク質については、タグ [トリガーファクター (TF) タンパク質] を付加させた状態での発現系の構築を行なった。発現条件を決定した後、FPLC を用いて SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製を行なった。TF タグを付加させて発現させたタンパク質については、タグを切断する条件の検討も行なった。精製したタンパク質について、HPLC や分光光度計を用いた酵素学的機能の解析を行なった。

(2) 標的タンパク質の構造解析：NADの生合成において重要な基質の1つであるホスホリボシル二リン酸 (PRPP) の合成に関わる抗酸菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 由来PRPP合成酵素における基質結合部位の詳細な構造について、ドッキングシミュレーションを用いた解析を行なった。また、その結果についてヒト由来PRPP合成酵素との比較検討を行なった。

さらに、NAD生合成に関連する抗酸菌由来酵素である *M. avium* 由来ヌクレオチド加リン酸分解酵素の立体構造の決定も試みた。本酵素は野生型では結晶化が困難であったが、2次構造予測で disorder 領域として予想された N 末部分 (約20残基) を削除した変異型を用いることにより、結晶化を行うことが可能であった。得られた結晶を用いた X線結晶構造解析により、*M. avium* 由来ヌクレオチド加リン酸分

解酵素の立体構造を決定した。

(3) NAD 生合成経路の代償的経路の解明：抗結核薬であるピラジナミドを用いた突然変異誘発によって、*pncA* 遺伝子に変異した結核菌の作出を試みた。

4. 研究成果

本申請課題では、上記の研究背景と目的に基づき、大別して次の3つの研究を行った。

(1) 標的タンパク質の機能解析：結核菌由来 Rv0212c, Rv1901c, Rv3199c, Rv3393, Rv3257c, 及び Rv3308 タンパク質について、pCold ベクターを用いた大腸菌内での発現を試みた。その結果、Rv3393, Rv3257c, 及び Rv3308 タンパク質については可溶性タンパク質として発現させることが出来た。そこで、Rv3393, Rv3257c, 及び Rv3308 タンパク質について FPLC を用いた精製と HPLC や分光光度計を用いた機能解析を行なった。その結果、Rv3393 タンパク質は、アミノ酸配列のモチーフ解析から予想された通りヌクレオチド加水分解活性を有することを明らかにした。また、Rv3257c と Rv3308 タンパク質がホスホマンノムターゼであることを明らかにするとともに、Rv3308 タンパク質はマンノース1リン酸に加えてグルコース1リン酸も基質として利用可能であるのに対して、Rv3257c タンパク質はマンノース1リン酸への基質特異性が非常に高いことを示した。さらに、Rv3257c タンパク質の至適 pH が中性付近であったのに対して、Rv3308 タンパク質の至適 pH は酸性側に偏っていることを明らかにした。これらのことから、結核菌の菌体内においては Rv3308 タンパク質よりも Rv3257c タンパク質がホスホマンノムターゼとして機能していることが推測された。

一方、Rv0212c, Rv1901c, 及び Rv3199c タンパク質については、pCold ベクターを用いた系では大腸菌内において可溶性タンパク質として発現しなかった (全て封入体として発現した)。そこで、TF タンパク質を付加させたところ、大腸菌内においてこれらのタンパク質を

可溶性タンパク質として発現させることが出来た。また、SDS-PAGE上で単一バンドになるまで精製を行なった。今後、これらの精製タンパク質を用いることによって、これまで機能未知であったRv0212c、Rv1901C、及びRv3199cタンパク質の機能解析が進むことが期待される。

(2) 標的タンパク質の構造解析：ドッキングシミュレーションによって、抗酸菌 (*M. smegmatis*) 由来PRPP合成酵素における基質との詳細な結合様式を明らかにした。また、その結果についてヒト由来PRPP合成酵素と比較した結果、抗酸菌由来PRPP合成酵素の立体構造の全体構造はヒト由来PRPP合成酵素の立体構造と非常によく似ているが、基質結合部位の構造には両酵素の間で差があることを見出した。特に抗酸菌由来PRPP合成酵素の基質結合部にのみヒスチジン残基が存在しており、さらにこの残基は基質の結合に大きく関わっていることが示唆された。したがって、本研究課題で得られた知見を基にして抗酸菌由来PRPP合成酵素のみに働く新規阻害剤のデザインが可能であることが予想された。PRPP合成酵素は新規薬剤のドラッグターゲットの1つとして考えられていることから、本研究課題で得られた知見はPRPP合成酵素を標的とした薬剤の開発に結びつくことが期待される。

また、2次構造予測でdisorder領域として予想されたN末部分(約20残基)を削除した変異型を用いることによって、NAD生合成に関わる抗酸菌由来酵素である*M. avium*由来ヌクレオチド加リン酸分解酵素の立体構造を決定した。本酵素の全体構造や、活性中心部位の構造は結核菌由来ヌクレオチド加リン酸分解酵素と非常に良く類似していた(右図参照)。したがって、これまでに本研究代表者が同定している結核菌由来ヌクレオチド加リン酸分解酵素の新規阻害剤は、*M. avium*由来ヌクレオチド加リン酸分解酵素の活性も阻害することが

予想された。ヌクレオチド加リン酸分解酵素は新規薬剤のドラッグターゲットの1つとして考えられていることから、本研究課題で得られた知見は、結核菌だけではなく非結核性抗酸菌にも有効な新規薬剤の開発に結びつくことが期待される。

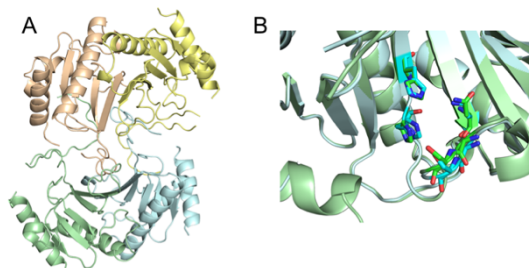


図
A) *M. avium* 由来ヌクレオチド加リン酸分解酵素の立体構造
B) 活性中心部位の構造比較
(青; *M. avium* 由来同酵素, 緑; 結核菌由来同酵素)

(3) NAD生合成経路の代償的経路の解明：結核菌の生育速度が非常に遅いことなどから、*pncA*遺伝子変異株の取得に時間がかかったが、ピラジナミドを用いた突然変異誘発によってピラジナミドに耐性を示す結核菌を複数取得することができた。今後、これらの株を用いることによって、結核菌におけるNAD生合成経路の代償的経路の解明が進むことが期待される。

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) Biochemical and structural investigations on phosphoribosylpyrophosphate synthetase from *Mycobacterium smegmatis*. Donini S, Garavaglia S, Ferraris DM, Miggiano R, Mori S, Shibayama K, Rizzi M. PloS one, 12(4):e0175815, 2017.

(2) Purification and functional characterization of diadenosine 5',5''-P(1),P(4)-tetrphosphate phosphorylases from *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium avium*. Honda N, Kim H,

Rimbara E, Kato A, Shibayama K, Mori S. Protein expression and purification, 112:37-42, 2015.

〔学会発表〕（計 8 件）

(1) Shigetarou Mori, Naoko Honda, Hyun Kim, Emiko Rimbara, and Keigo Shibayama. The catalytic activities of diadenosine polyphosphate phosphorylases from mycobacteria. The 52nd US-Japan Mycobacteria Panel Meeting, Niigata, 2018 年. 口頭発表.

(2) Shigetarou Mori, Naoko Honda, Hyun Kim, Emiko Rimbara, Keigo Shibayama. The development of novel structure based inhibitors of diadenosine phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* IUMS2017, Singapore, 2017 年. ポスター発表.

(3) 森茂太郎, 本田尚子, 金玄, 林原絵美子, 柴山恵吾. 結核菌由来 diadenosine tetraphosphate 加リン酸分解酵素の新規阻害剤と抗結核菌活性. 日本農芸化学会2017年度大会, 京都, 2017 年. 口頭発表.

(4) Shigetarou Mori, Hyun Kim, Emiko Rimbara, and Keigo Shibayama. Molecular characterization of a nicotinate phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. US-Japan Cooperative Medical Science Program Mycobacterial Panel Meeting, Korea, 2017年. 口頭発表.

(5) 森茂太郎. 立体構造から分かること・できること：結核菌由来NADキナーゼとヌクレオチド加リン酸分解酵素の機能構造相関解析. 第1回抗酸菌研究会, 沖縄, 2016年. 口頭発表.

(6) Shigetarou Mori, Hyun Kim, Keigo Shibayama. Identification of novel katG mutations causing isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and the development of a new anti-tuberculosis

drug. The 13rd Japan-Taiwan Symposium on Infectious Diseases, Taiwan, 2016年. 口頭発表.

(7) 森茂太郎, 本田尚子, 金玄, 林原絵美子, 柴山恵吾. 結核菌由来 diadenosine tetraphosphate 加リン酸分解酵素の新規阻害剤とその抗結核菌作用. 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪, 2016 年. ワークショップでの口頭発表.

(8) Shigetarou Mori, Naoko Honda, Hyun Kim, Emiko Rimbara, and Keigo Shibayama. Design of a new inhibitor of diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis*, and its antimycobacterial activity. US-Japan Cooperative Medical Science Program Mycobacterial Panel Meeting, USA, 2016 年. 口頭発表.

〔その他〕
ホームページ等

(1) Shigetarou Mori. *Mycobacterium avium* 由来ヌクレオチド加リン酸分解酵素のN末端削除変異体の結晶化と結晶学的諸性質. Photon Factory Activity Report 2016 #34 Part B, No.174.

(2) Shigetarou Mori. Crystallographic analysis of diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv complexed with ADP. Photon Factory Activity Report 2015 #33 Part B, No.314.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 茂太郎 (MORI Shigetarou)

国立感染症研究所・細菌第二部・室長

研究者番号：60425676