

平成22年 5月24日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007 ～ 2009  
 課題番号：19510216  
 研究課題名（和文） 多様な生物活性脂質の生合成を担うミコール酸転移酵素の機能解析と改変  
 研究課題名（英文） Functional analyses and modification of mycolyltransferases that involve in biosynthesis of various bio-active lipids.  
 研究代表者  
 松永 勇（MATSUNAGA ISAMU）  
 京都大学・ウイルス研究所・准教授  
 研究者番号：00254425

研究成果の概要（和文）：マイコバクテリアのミコール酸糖脂質は、ヒトの免疫細胞に種々の生物活性を示す。本研究ではその合成酵素を用いて色々なミコール酸糖脂質を作り、その生物学的な役割を明らかにした。本糖脂質の糖部分は、その生物活性を決定づけた。ミコール酸転移酵素は種々の単糖のみならず、二糖についてもミコール酸を付加することができ、菌体からは精製困難な糖脂質も作る事ができた。作成された糖脂質の活性を調べる事は、マイコバクテリア感染症の理解を深めるのみならず、有用な糖脂質の検索に重要であった。

研究成果の概要（英文）：Mycolylglycolipids from mycobacteria show a variety of biological activities for the human immune cells. In this research, we made various mycolylglycolipids by using its biosynthetic enzymes and clarified their biological roles. The sugar moiety of each glycolipid determined its biological activities. The mycolyltransferases can transferred the mycolate not only to various type of monosaccharides, but to disaccharides, thereby produced the glycolipids that are hard to be purified from the bacteria. Studies for bioactive mycolylglycolipids should be crucial to search useful glycolipid compounds as well as to understand the mycobacterial diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：マイコバクテリア、糖脂質、ミコール酸転移酵素、生合成、生物活性

## 1. 研究開始当初の背景

ミコール酸は *Mycobacterium* 属等の抗酸菌に特徴的な超極長鎖の (*Mycobacterium* では側

鎖も含めて炭素数80余りにのぼる)  $\alpha$ -アルキル- $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸であり、細菌の細胞壁最外層でアラビノース多糖と結合し (mAra)、

細胞壁骨格を構成する他、trehalose-6,6'-dimycolate (TDM)及びtrehalose-6-monomycolate (TMM)として存在している。mAraやTDMは強く自然免疫を活性化することにより生物活性(例えば抗腫瘍活性)を示すことが知られており、実際mAraを含む細胞骨格部分は悪性腫瘍の治療剤として利用する試みが進められている。これらの生物活性には糖がミコール酸化していることが必須である。このミコール酸付加を触媒するのがantigen 85 (Ag85)とも呼ばれる「ミコール酸転移酵素」であり、本酵素は2分子のTMMを2つある基質結合部位に結合させ、片方のTMMのミコール酸をもう一方のTMM基質に転移しTDMを生成する。

一方、glucose-6-monomycolate (GMM)は、TDMやTMMと類似の構造をとるものの、生物活性の面では極めて特異な性質を併せ持つ脂質である。即ちGMMは、免疫制御の鍵となる細胞である樹状細胞上のCD1b分子に結合し、この複合体を特異的に認識できるキラーT細胞を活性化して抗酸菌感染細胞を排除させる「脂質T細胞抗原」として振る舞う。我々は*Mycobacterium avium*からのGMM産生を観察していた時、培地に加えたグルコース量に依存してGMM産生が増加すると同時に、TDM産生が減少することを見いだした。このことから我々は、GMMのTDMに対する競合的産生は、Ag85が培地に過剰に加えたグルコースを基質として利用した事によるのではないかと、という着想に至った。Ag85が単糖を利用できるという報告はない。しかし、Ag85がmAraを生成できるのであれば、Ag85の基質特異性は厳格にtrehaloseに規定されたものではないだろう。換言すれば、本酵素を利用することで、新規な生物活性を有するミコール酸糖脂質を試験管内で合成する事ができる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、Ag85が種々の生物活性をもつミコール酸糖脂質の生合成でどのように働くのかを酵素学的に明らかにし、それらの酵素活性を利用して、有用な生物活性を有する生物活性脂質の合成を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) まず*M. avium*から3種類あるAg85遺伝子をpET発現ベクターにクローニングし、C末端にHisタグの付いた組換え酵素(Ag85A, Ag85B及びAg85C)として大腸菌に発現させ、Ni-レジンカラムにより精製を行った。

(2) 上で調製した酵素のうち最も精製酵素が多く回収できたAg85Aについて、酵素学的性質を検討した。特にミコール酸を渡す側の基質(ドナー基質)と、受け取る側の基質

(アクセプター基質)の基質特異性については詳しく検討した。

(3) (2)をふまえて、Ag85A, Ag85B及びAg85Cの3つの酵素で酵素学的に違いがあるか否かについて調べた。その際、速度論的な僅かな違いよりも寧ろ基質特異性が大きく異なる様なことがあるかどうかについて、より注目した。

(4) 他種のマイコバクテリア(本研究では、らい菌を用いた)のAg85についても、組換え酵素の性質を比較・検討した。らい菌酵素を用いた理由は、当初本酵素にGMM特異的な産生機構があるかも知れないと想定したからである。

(5) (4)の検討の結果、予想に反してらい菌酵素が*M. avium*の酵素に比べて高GMM産生能を示すような事はなかった。寧ろ、ドナー基質のアシル鎖部分に対する特異性が厳しい事を示す結果を得たので、既に解けている結晶構造などを参考にしてそれぞれの酵素に変異を導入し、機能改変を試みた。

(6) *M. avium*の酵素は飽和量のglucose存在下に、ほぼ純粋にGMMを生成する事がわかったので、GMMとTDMの機能の差をマクロファージに対するnitric oxide synthase誘導能を指標に比較した。

(7) GMM以外にAg85で生成できるミコール酸糖脂質として、arabinoseまたはarabinobioseにひとつミコール酸が付加した化合物に注目した。それぞれ酵素反応によってできた生成物を純化し、樹状細胞に対する活性を調べた。

## 4. 研究成果

(1) *M. avium*にはAg85遺伝子が4つある(A, B, C及びD)。しかしAg85Dは活性中心に変異がありミコール酸転移酵素としては不活性である事が知られているので、残り3つ(Ag85A, Ag85B及びAg85C)を組換え酵素として調製した。まずそれぞれの酵素に活性があることを、*M. avium*のTMMを基質に用いてTDMの生成を観察する事で確かめた。その結果、3つの酵素はほぼ同程度のTDM生成能を示した。この事より、少なくとも*in vitro*においては上記の酵素のTMM基質利用能に違いがない事が示された。

(2) 酵素が最も多く調製できたAg85Aについて、その基質特異性を詳細に調べた。(1)の結果から本酵素がTMMをドナー基質として使えることは明らかである。過去の報告によるとAg85はTMMのミコール酸を、ミコール酸化されていないtrehaloseに転移することができる。そこでTMMからグルコースが1分子とれたGMMがドナー基質にならないかどうかを、trehaloseをアクセプター基質として用いて調べた。その結果、GMMとtrehaloseを基質にしても、TMMは生成しなかった。ま

た TDM と trehalose を用いても TMM の生成は見られなかった。転移できるアシル鎖については *M. avium* の炭素鎖長 85 から *Corynebacterium* の炭素鎖長 32 のミコール酸、更には鎖長 12 のラウリン酸まで利用でき特異性を認めなかった。また trehalose を sucrose に代えた sucrose monolaurate もドナー基質にすることができた。これらの事から、Ag85 のドナー基質になるためには、アシル化された二糖である必要がある事が示唆された。

次に Ag85A のアクセプター基質としてどんなものが利用できるか、について検討した。C85TMM をドナー基質とし、アクセプター基質として glucose、mannose、arabinose、又は xylose を用いると、前 3 者ではほぼ同等量の生成物(それぞれ GMM, mannose monomycolate, arabinose monomycolate) を生成したが、xylose を用いても全く生成物は確認できなかった。ミコール酸が転移している位置はいずれも 1 級アルコール基であった。よって arabinose の場合は arabinofuranose のかたちをとっている事が推測された。しかし xylose が基質にならない事を合わせ考えると、ミコール酸が転移される水酸基と隣接する水酸基 (arabinose、xylose の場合は 3 位) の立体配置が重要であるのかも知れない。いずれにしてもミコール酸転移酵素はある種の単糖にミコール酸を転移できる事が示された。特にこれまで生合成系が知られていなかった、脂質 T 細胞抗原として重要な GMM の生成を本酵素が担う事を明らかにした点は後の研究に大きく寄与した。

(3) これまで Ag85A 及び B はバクテリア内で主に TDM 生成を、また Ag85C は細胞壁多糖体であるアラビノガラクトン末端の arabinose へのミコール酸転移を担っているとの報告がある。よってそれぞれの酵素が基質特異性を異にしている可能性があるので、本研究では各酵素の GMM 産生効率に違いがあるかについて検討した。しかし TDM 生成能の場合と同様に GMM についても、その生成能は酵素によってほとんど違いが無かった。

Ag85A による GMM 生成は基質として加えた glucose の濃度に依存して増加するだけでなく、反対に TDM の生成を減少させる。これはアクセプター-TMM と glucose が転移されるミコール酸を競合的に奪い合っている為と考えれば非常によく説明できる。各 glucose 濃度における GMM と TDM の産生量比は、酵素実験と菌を glucose 添加培地で培養した時とで極めて良い一致を示した。即ち *M. avium* が GMM を産生するのは、どの Ag85 を用いても只生育環境中の glucose 濃度に依存する事が明らかとなった。またこの GMM 産生は、生育環境中の glucose が菌増殖による消費で枯渇しないかぎり、ヒトなどの宿主がもつ生

理的濃度の glucose で十分起こりうる事が示され、マイコバクテリア感染症における脂質 T 細胞抗原の有り様に関して重要な知見を公表する事ができた。

(4) GMM に反応性の T 細胞株は、ハンセン病患者から樹立されたものである。この事は我々に、らい菌の Ag85 に GMM を特異的に産生する機構があるのではないかと、もしそうならそれを利用して GMM 特異的生成酵素を作成できるのではないかとという事を想起させた。そこでらい菌ゲノム DNA から、らい菌の Ag85A 遺伝子をクローニングし *M. avium* の場合と同様に組換え酵素の発現を大腸菌で試みた。しかしその発現はおもわしく無かった。らい菌 Ag85A が大腸菌で低発現なのは大腸菌における低使用頻度コドンを用いているからだと考え、それらのいくつかに変異を導入し高使用頻度コドンに改変した。その結果、発現量は数十倍に増加し解析に必要な酵素量を確保する事ができた。

この酵素の性質を *M. avium* の Ag85A と比較した。意外なことに、*M. avium* 由来の C85TMM や *Corynebacterium* の C32TMM を基質にした時、らい菌酵素は *M. avium* のそれに比べて著しく TDM 生成能が低かった。これはアクセプター基質として glucose を用いた時も同様で、予想に反してらい菌酵素が GMM を生成し易いというような結果を得る事はできなかった。しかし興味深い事に、側鎖をもつミコール酸ではなく直鎖で炭素鎖長の短いラウリン酸をもつ trehalose monolaurate (TML) をモデル基質に用いると、両酵素は trehalose dilaurate、glucose monolaurate のいずれについても同等の生成能を示した。この事は、らい菌酵素が単にアシル鎖転移活性が低くて TDM や GMM を生成できなかったわけではなく、ミコール酸をもつ基質をドナー基質として利用しがたいように設計されている事を示唆している。

(5) 我々は(4)の結果に関心をもち、らい菌酵素がどのような仕組みでミコール酸をもつドナー基質を排除しているのか、それは変異導入で解除し得るものなのか、について検討した。まず既に結晶構造が解けている結核菌の Ag85A の構造を参照して、結核菌、*M. avium* 及びらい菌のアミノ酸配列を比べることで、この排除機構に関わりのありそうな酵素内部の構造を探した。これにより我々はらい菌酵素の Leu130 に注目する事になった。この残基は結核菌と *M. avium* では Ser であり、その側鎖がミコール酸の  $\alpha$  分枝鎖が結合すると想定されているトンネル内腔に突き出ている。そこで我々は、らい菌酵素の Leu130 が本当にミコール酸基質の結合をじゃましているか否かを変異導入によって確かめた。*M. avium* 酵素の Ser130 を Leu に変えると、C32TMM を基質にした時の活性は著し

く低下した。しかしこの時、TMMを基質にしたときの活性は野生型と同等に保たれた。これとは逆に、らい菌酵素の Leu130 を Ser に改変すると TMM に対する親和性が増すとともに、TDM の生成量が増加する結果を得た。これらの事から、らい菌酵素では確かにドナー基質の利用がミコール酸部分を結合し難くすることで制限されているのが明らかになり、その原因は Ser 残基が Leu になっているためだとわかった。これまで、分枝鎖脂肪酸であるミコール酸の  $\alpha$  側鎖が酵素の内腔にあるトンネルに結合することはモデリングによって示唆されていたが、本研究はこれを実証的に明らかにするとともに、後で言及する様に、らい菌が TDM をはじめとするミコール酸糖脂質を作れない分子機構を明らかにする事で、らい菌の宿主内における生存戦略の一端を示唆することができた。

(6) TDM と GMM の産生は、その生成機構から必然的に、互いに競合的である。古くより TDM は強いアジュバントとしてマクロファージなどの自然免疫系を構成する細胞を刺激することが知られているが、産生機序のうえで競合的な GMM はマクロファージに対してどのように働くのであろうか。本研究ではマクロファージ中で殺菌に重要な一酸化窒素 (NO) の誘導能について両化合物を比較した。マウス骨髄から誘導したマクロファージをプライミングすると同時に、TDM または GMM による刺激を行うと、TDM では誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) が強く誘導されてくるのに対し、GMM はこれをほとんど誘導しなかった。これに対応するように、TDM 刺激マクロファージは NO を産生したが、GMM 刺激ではごく少量の NO 産生しか検出し得なかった。*M. avium* について TDM と GMM をそれぞれ主につけている菌を使って、マクロファージによる貪食されやすさを比較したが両者に差は認めなかった。また TDM または GMM でコートしたビーズを用いて同様の実験を行ったが結果は同じであった。

以上の結果から、我々は次の様なモデルを考えている。*M. avium* の様な環境常在菌は、自然環境中では非常に glucose の限られた状態にあり、主として TDM を産生している。これが動物宿主に感染すると、菌が持っていた TDM に対して宿主の自然免疫応答が起り、菌を排除しようとする。しかしながら、この初期の免疫応答を免れた菌がいる場合には、菌は宿主のグルコースを使って TDM の代りに GMM を作り宿主の自然免疫応答を免れようとする。このような菌の宿主免疫からの「回避」に対して、宿主は CD1 を介した GMM を標的とした特異的免疫応答を発動し、菌を排除しようとする。らい菌の場合はこれとは少し様相を異にしている。らい菌はミコール酸転移酵素が TMM を利用し難くすることで、そもそも

TDM や GMM の産生自体を抑えて自然免疫と獲得免疫両方から逃れようとしている様にみえる。それなら酵素自体を欠失してしまえばよいようなものだが、それが起こっていないところから考えるとミコール酸糖脂質はマイコバクテリア細胞壁の機能を維持するのに最小限度は必要なのかも知れない。此の様にマイコバクテリアの感染現象における、これまで提唱された事がないスキームを提唱することができた。

この理論はマイコバクテリアの生存戦略をよく説明するが、精製された GMM による特異的免疫誘導を企図した「脂質ワクチン」を考えると、別の問題点が浮かび上がってくる。即ち GMM がそれ自体アジュバントとして働かないのであれば、GMM という化合物と相性の良い別のアジュバントを考えてやらなければ、結核菌を排除できる程の GMM 特異的免疫を効率よく誘導するのは恐らく困難であろうと言う点であり、これは今後の課題である。

(7) 更に我々は、本酵素が二糖或は三糖にミコール酸を付加できるか検討した。糖の種類はマイコバクテリア細胞壁にある arabinose 多糖体に注目し、arabinobiose と arabinotriose を用いた。本酵素は arabinose と arabinobiose にはミコール酸を付加する事ができたが、arabinotriose にはミコール酸を付加しなかった。マイコバクテリアでミコール酸は、非常に複雑な構造をしている arabinose 多糖体に結合した状態で存在する。それ故菌から単糖或は二糖にミコール酸がついた糖脂質を純粋に取り出す事は非常に難しい。本研究ではそれらを試験管内で作り出すことに成功した。次に、それらを精製して生物活性を調べた。これまでマイコバクテリア感染が、アトピーなどのアレルギーを抑制するとの報告がある。そこでアレルギーを惹起する T 細胞の誘導に関与すると考えられている OX40 ligand の発現をマウス骨髄から誘導した樹状細胞を使って調べてみた。その結果、arabinobiose、次いで arabinose を頭部にもつミコール酸糖脂質で発現の抑制を示唆する結果を得た。よってこれらの糖脂質は抗アレルギー活性をもつ可能性が示唆された。

## 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 4 件)

① Matsunaga I, Moody DB. Mincle is a long sought receptor for mycobacterial cord factor. *J. Exp. Med.* 206, 2865-2868 (2009). 査読有

② Nakao H, Matsunaga I, Morita D, Aboshi

T, Harada T, Nakagawa Y, Mori N, Sugita M. Mycolyltransferase from *Mycobacterium leprae* excludes mycolate-containing glycolipid substrates. J. Biochem. 146, 659-665 (2009). 査読有

③ Otsuka A, Matsunaga I, Komori T, Tomita K, Toda Y, Manabe T, Miyachi Y, Sugita M. Trehalose dimycolate elicits eosinophilic skin hypersensitivity in mycobacteria-infected Guinea pigs. J. Immunol. 181, 8528-8533 (2008). 査読有

④ Matsunaga I, Naka T, Talekar RS, McConnell MJ, Katoh K, Nakao H, Otsuka A, Behar SM, Yano I, Moody DB, Sugita M. Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in mycobacteria. J. Biol. Chem. 283, 28835-28841 (2008). 査読有

[学会発表] (計3件)

① 松永勇, 中尾瞳, 森田大輔, 杉田昌彦. らい菌のミコール酸転移酵素によるミコール酸糖脂質合成. 第82回日本生化学会大会. 2009年10月22日. 神戸国際展示場.

② 松永勇, 中崇, 加藤久美子, 中尾瞳, 大塚篤司, 矢野郁也, 杉田昌彦. ミコール酸転移酵素による脂質T細胞抗原の生合成. 第81回日本生化学会大会. 2008年12月14日. 神戸国際展示場.

③ Otsuka A, Matsunaga I, Miyachi Y, Sugita M. Eosinophilic skin reactions to glycolipids define a novel form of hypersensitivity in mycobacterial infection. 第38回日本免疫学会総会. 2008年12月1日. 国立京都国際会館

[その他]

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/SugitaLab.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松永 勇 (MATSUNAGA ISAMU)  
京都大学・ウイルス研究所・准教授  
研究者番号：00254425

### (2) 研究分担者

杉田 昌彦 (SUGITA MASAHIKO)  
京都大学・ウイルス研究所・教授  
研究者番号：80333532

### (3) 連携研究者

森 直樹 (MORI NAOKI)  
京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・  
准教授  
研究者番号：30293913