

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770077

研究課題名 (和文) 結核菌の銅イオンポンプの結晶化

研究課題名 (英文) Crystallization of copper pump from Mycobacteria

研究代表者

津田 岳夫 (TSUDA TAKEO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：10345233

研究成果の概要：

本研究は、結核治療の新規標的蛋白質となりうる結核菌の銅イオンポンプに着目し、その立体構造を決定するために結晶作成を試みた。そのためには、良質な蛋白質試料を大量に調製する必要があるが、天然物から行うことは不可能である。よって、遺伝子組み換え技術で大腸菌などを利用し蛋白質を調製することを目指したが、系の確立には至っていない。一方、Fe や Mn を運ぶ蛋白質の調製系は確立し、同時に研究を進めている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物学

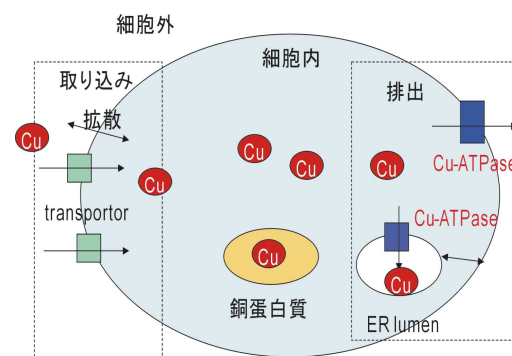
キーワード：X線結晶解析

1. 研究開始当初の背景

銅や亜鉛、鉄などの重金属イオンは、生体に必須な微量元素であるが、過剰にあると毒性を示す。重金属イオンポンプは ATP の化学エネルギーを利用して、余分な重金属イオンを細胞外へ排出する膜蛋白質である (右図 1)。銅イオンポンプに代表される重金属イオンポンプは、バクテリアから人までの幅広い種で保存されている。実際、人のウィルソン病やメンケス病という疾患は、2 種類の銅イオンポンプの変異によって引き起こされ

る。このことから、この蛋白質の重要性が分かる。

図 1 銅イオンの恒常性維持に関わる蛋白質



重金属イオンポンプの機能を理解する上で役に立つ情報である立体構造は、未だ明らかにされていない。反応機構を理解するため、世界中で複数の研究者が立体構造の決定に向け、蛋白質の調製、結晶化を試みているのが現状である。一方、同じくイオンポンプに属するカルシウムポンプでは、複数の生理的状态の立体構造が決定されており、その理解に大きな情報を与えた(下図2)。

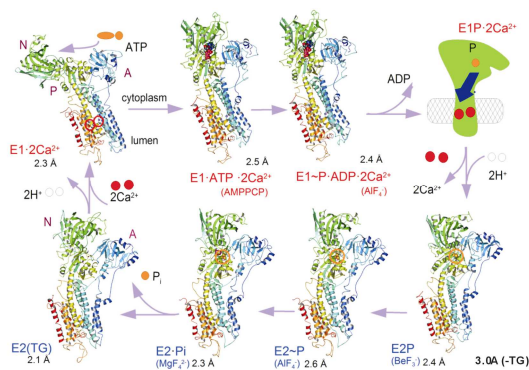


図2 カルシウムポンプの中間体の結晶構造。反応サイクル中のほとんどの状態の原子構造が決定された。

重金属イオンポンプの方は結晶構造解析が進まない理由として考えられる事は、

- ・蛋白質試料の調製が困難
- ・複数の可溶性ドメインを持つ膜蛋白質

などが、挙げられるだろう。研究の進展には、それらを解決することが、最重要課題である。

2. 研究の目的

本研究では、結核菌由来の銅イオンポンプの立体構造を解明し、その性質を明らかにすることである。細菌から人まで広く存在する銅イオンポンプの中から、結核菌の蛋白質を対象に選んだ理由について説明する。

人の疾患についての研究をするのであれば、当然、疾患関連蛋白質である人の銅イオンポンプである ATP7A や ATP7B を対象にすべきであろう。しかし、哺乳類の膜蛋白質試料の調製は非常に困難である。そこで、発現系による大量調製が比較的容易である原核生物由来の銅イオンポンプ (CopA, CopB) の中から結核菌 (*Mycobacterium* 属) 由来のものをターゲットとして選んだ。なぜなら、銅イオン恒常性が崩れれば細胞は死滅するのだから、銅イオンポンプは結核治療薬の標的蛋白

質となり得ると考えたからだ。実際に、病原菌に感染すると生体防御反応によって、貪食細胞がファゴソームの重金属イオンを枯渇させることによって、病原菌を殺そうとする。さらに結核菌では、感染した際に活性化されるゲノム領域に、銅イオンポンプの類似体であると予想された CtpV という遺伝子が存在している。つまり、結核菌が感染した後に生育するためには、銅イオンポンプは重要な役割を果たしていると考えてもよさそうだ。

過去の病気とも考えられていた結核であるが、薬剤耐性菌の出現により世界で年間に160万人以上の死者を出しており、その数は依然として感染症の中で最も多い。新規の結核治療薬の開発が早急に必要とされている。新しいクラスの薬剤群であるジアリルキノリン化合物が、結核菌の ATP 合成酵素の F0 サブユニットを標的とし、薬剤耐性菌の増殖を阻害することが2005年 Science 誌に報告された。

本計画が成功し結核菌の銅イオンポンプの立体構造が明らかになると、その阻害剤の開発に向けた有用な情報を提供できると期待される。

3. 研究の方法

結核菌の銅イオンポンプ(膜蛋白質)の結晶化に向けた流れを示す。

- (1) 発現系の構築
- (2) 精製系の構築
- (3) 結晶化条件の検討

の順である。

結晶構造解析において、膜蛋白質が対象である場合は、どのステップも非常に困難であることが知られている。今回の場合は、天然物から試料を調製することが無理である。よって、遺伝子組み換え技術を利用して、大腸菌などの異種バクテリアでの発現系を使い組換え蛋白質を大量に生産することにした。

まずは、対象にする銅イオンポンプであるが、病原性の結核菌を用いることは、一般の研究室では出来ない。そこで、病原性の弱いものや弱毒化した結核菌の仲間で、すでに遺伝子情報が公開されており入手可能なものを対象とした。実際に使用した種を以下に示す。

- ・ *Mycobacterium bovis* (BCG 株) の 3 種の銅イオンポンプ (CtpA, CtpB, CtpC)
- ・ *Mycobacterium leprae* の銅イオンポンプ
- ・ *Mycobacterium smegmatis* の銅イオンポンプ類自体
- ・ 銅イオンポンプに加え、上記の Mn や Fe を輸送する蛋白質 (Nramp 1 / MntH)

を遺伝子クローニングした。病原性の結核菌と BCG 菌由来のものは、アミノ酸配列がほとんど同じであるため、良い候補といえよう。遺伝子クローニングはゲノム DNA を鋳型として PCR 法で行ったが、結核菌遺伝子は GC に富むため、反応系やポリメラーゼの選択に関して、若干の工夫を要した。得られた遺伝子は、発現ベクターに組み込んだ。その際、アミノあるいはカルボキシル末端側に、His タグを付加させ、発現の確認やアフィニティー精製に利用した。

他の細菌(大腸菌や好熱菌など)由来の銅イオンポンプの大量調製に成功した、大腸菌を用いた発現系をまずは試した。しかし、結核菌の膜蛋白質を大腸菌で大量に発現した例は少ない。そのため、他の発現系も同時に試すことにした。選んだのは、同じくグラム陽性細菌に分類される、コリネバクテリアと乳酸菌にした。

4. 研究成果

残念ながら、期間内で結核菌の銅イオンポンプの結晶化は行なえなかった。その理由としては、大量調製系の構築が思いのほか困難であったからだ。改善に向けて行った工夫としては、

- (1) 発現する DNA 配列、プロモーター、タグ等
- (2) 培養条件(ホスト大腸菌、誘導剤濃度、温度、培地)

という、一般的なものに加え

- (3) コリネバクテリアや乳酸菌の発現系

である。

計画が上手く進まなかった理由については、遺伝子配列が GC に富む (> 70%) からだと考えられた。そこで、ホストとして GC

リッチな配列に対応した tRNA を含んだものや、低温での発現に有利な株を用いたが、改善には至らなかった。発現ホストとして、結核菌である *Mycobacterium smegmatis* を利用すると上手くいくのかもしれない。これに関しては、専用の発現ベクターの選定など問題もあるが、菌株は入手済みで試してみたい。

一方、銅イオンポンプではないが、同時進行していたその他のイオン輸送体の中で Mn や Fe を輸送すると考えられている Nramp (MntH) は、pTrc ベクターで希なコドン対応ホストを用いた時に膜画分への発現が認められた。この蛋白質は結核菌などの細菌に感染した際の抵抗性遺伝子として同定された Nramp ファミリーに属し、細菌から哺乳類まで広く保存されている。Nramp ファミリーは宿主がパラサイトを排除するためのみならず、感染した結核菌にとっても自身の Nramp はその生存に大切な役割を果たしているらしい(下図 3)。

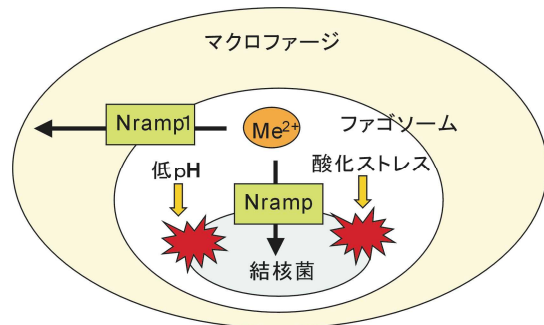


図 3 マクロファージに貪食された結核菌は、Nramp 蛋白質を使い、必須微量重金属を取り込む。

年度内で目的の達成は果たせなかった。しかし、Nramp にも重点を置き研究を進めることは、結核菌の新たな治療薬開発に向けた立体構造解析、という目的に合致している。今後は、*Mycobacterium smegmatis* を利用した銅イオンポンプの発現系構築と同時に、Nramp の精製そして結晶化スクリーニングを進めたい。

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)

Tsuda Takeo and Toyoshima
Chikashi "Nucleotide recognition by CopA,
a Cu⁺-transporting ATPase" EMBO J
査読あり,受理済み、2009年

〔学会発表〕(計 1件)

津田岳夫、豊島近「銅イオンポンプのヌク
レオチド結合様式」生化学会、2008年12月、
神戸市

6. 研究組織

(1)研究代表者

津田 岳夫 (TSUDA TAKEO)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：10345233

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし