

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16646

研究課題名（和文）呼吸酵素から解き明かす結核菌の低酸素適応と慢性感染

研究課題名（英文）Hypoxia adaptation of Mycobacterium tuberculosis based on respiratory enzymes.

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ジヒドロオロト酸脱水素酵素（DHODH）は、結核菌の生存において必須の遺伝子である。本研究では、組換えタンパク質の作製に試み、組換えDHODHの発現と精製を行うことで、組換えDHODHの粗精製標品を得ることができた。そして、結核菌DHODHはキノンとジヒドロオロト酸を基質とし、フマル酸とNADHを電子受容体として利用しないことから、結核菌は2型DHODHであることが明らかとなった。さらに、ヒトDHODH阻害剤は結核菌DHODHに全く作用しないことから、反応機構が両種間で異なることが示唆された。したがって、結核菌DHODH阻害剤はヒトへの毒性が少なく、創薬標的分子として有望である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結核菌は世界3大感染症の一つであり、世界中で多くの人々が感染している。近年、既存の抗結核薬に効果が見られない、薬剤耐性菌の流行が懸念されており、新たな治療薬の開発が望まれている。本研究で得られた成果は、結核菌のジヒドロオロト酸脱水素酵素（DHODH）の阻害剤を探索し、原子レベルでDHODHの反応機構を明らかにすることにつながる。薬剤耐性菌は公衆衛生所の危機であり、本研究は新たな薬剤開発の基盤へとつながる。

研究成果の概要（英文）：Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) is an essential gene in Mycobacterium tuberculosis. In this study, the purification system of recombinant DHODH was established.

Recombinant DHODH demonstrated that dihydroorotate and quinone were utilized as a substrate and an electron acceptor. On the other hand, fumarate and NADH were not used as an electron acceptor. Therefore, Mycobacterium tuberculosis DHODH was classified into type II DHODH. Furthermore, Requinar, human DHODH inhibitor, didn't inhibit Mycobacterium DHODH.

研究分野：細菌学

キーワード：結核菌 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

結核菌は 3 大感染症のひとつであり、世界人口の約 20% が感染しているとされ、肺結核の病原体として知られている。ヒトの肺に感染した結核菌は、肉芽腫を形成し、長期間において無症状である潜伏感染となる。そして、宿主であるヒトの低栄養状態、または免疫力低下が契機となり一部の結核菌感染者では、結核菌が再活性化し、肺結核を引き起こす。このように、結核菌は長期間において特殊な環境である肉芽腫内で生存している。肉芽腫はマクロファージと T 細胞の集積体であり、内部は低酸素環境である。そして、結核菌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。近年、結核菌の低酸素適応にとって、ATP 産生維持と、NADH 再酸化と、プロトン駆動力が必須であることがわかった。低酸素環境での結核菌はコハク酸脱水素酵素、プロトンポンプ機能をもたない 2 型 NADH 脱水素酵素 (NDH-2)、リンゴ酸：キノン酸化還元酵素 (MQO) と、ジヒドロオロト酸脱水素酵素 (DHODH) が還元型キノンを生成し、Cytochrome bd が還元型キノンを酸化し、プロトンをペリプラズムへと移行させる。そして、プロトン駆動力を利用して ATP 合成酵素が ATP を産生する。また、NDH-2 で再酸化された  $\text{NAD}^+$  は解糖系と TCA 回路に供給され、MQO により生成されたオキサロ酢酸は TCA 回路に供給され、DHODH により生成されたオロト酸はピリミジン生合成に供給される。したがって、生存に必須な遺伝子である MQO と DHODH は複数の代謝経路に関与しており、創薬において有用な標的分子である可能性を秘めている。本研究は、結核菌の MQO と DHODH の生化学的解析により、各酵素の反応機構を明らかにすることを目的として、研究を進め、創薬開発の基盤とすることを目的としている。

### 2. 研究の目的

(1) 組換え酵素を作製し、各呼吸酵素の生化学的特徴を明らかにする

結核菌は遅発育性抗酸菌で、BSL3 の病原体であることから、大量培養を行い結核菌から目的のタンパク質を精製することは困難である。したがって、大腸菌を用いて組換えタンパク質の発現と精製に試みることにより、組換えタンパク質を用いた生化学的解析を行う。これにより、結核菌の MQO と DHODH の酵素学的特徴を明らかとする。

(2) 阻害剤を同定する

各酵素は生存に必須であると報告されている。したがって、各酵素に対する阻害剤は、薬剤標的分子としての可能性をもっており、創薬研究へと展開することができる。そのために、本研究では、創薬研究の基盤として、MQO と DHODH に対する阻害剤を同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 組換えタンパク質の発現と精製

コドンが大腸菌に最適化した結核菌 MQO 遺伝子 (MtMQO) と、結核菌 DHODH 遺伝子 (MtDHODH) を合成した後に、pET システムのベクターに各結核菌遺伝子のクローニングを行った。これを発現ベクターとして、大腸菌を用いて発現させた。さらに、組み換えタンパク質の N 末端には 6xHis タグが設計されていることから、Ni レジンを用いたアフィニティー精製を行った。

(3) 組換え MtDHODH の生化学的解析

DHODH にはジヒドロオロト酸を基質として電子を電子受容体へと受け渡す機能を有し、1 型 DHODH と 2 型 DHODH に分類される。1 型 DHODH は、フマル酸または  $\text{NAD}^+$  を電子受容体として利用する。また、2 型 DHODH は、キノンを電子受容体として利用する。本研究では、組換え MtDHODH を用いて、電子受容体の検討を行った。

(4) ハイスループット酵素アッセイ系の構築

阻害剤の探索を行うために、96 ウェルプレートを用いた酵素アッセイ系の構築を行った。各ウェルには、組換え MtDHODH と基質であるジヒドロオロト酸、デシルユビキノンと酸化還元指示薬である 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCIP) を加え、酵素反応を行った後に、DCIP の吸光度を測定することにより、酵素アッセイ系を構築した。

### 4. 研究成果

(1) 組換えタンパク質の発現

まず、BL21 (DE3) 株を用いて発現条件の検討を行った。その結果、低温誘導においても、組換えタンパク質は封入体を形成した。さらに、発現条件を検討したところ、ある大腸菌株において、組換えタンパク質が大腸菌膜に局在して発現する誘導条件を見出すことができた。

## (2) 組換えタンパク質の精製

組換えタンパク質を発現させた大腸菌から膜画分を調整し、酵素活性を測定した。その結果、組換え MtDHODH の比活性は、 $1.96 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  と極めて高かった。しかし、組換え MtMQO の比活性は  $0.02 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  と極めて低かった。そして、界面活性剤による組換え MtDHODH の可溶化条件を検討し、酵素活性を保持したまま、可溶化することができる界面活性剤を見出すことができた。さらに、組み換えタンパク質の N 末端には 6xHis タグが設計されていることから、Ni レジンを用いたアフィニティー精製を行い、比活性が  $7.20 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  の粗精製標品を得ることができた (図 1)。1L の培養から約 2.5mg の粗精製画分を得ることができた。今後はさらに精製純度を高め、結晶構造解析を行うことにより、原子レベルで酵素反応機構を明らかにすることが期待できる。

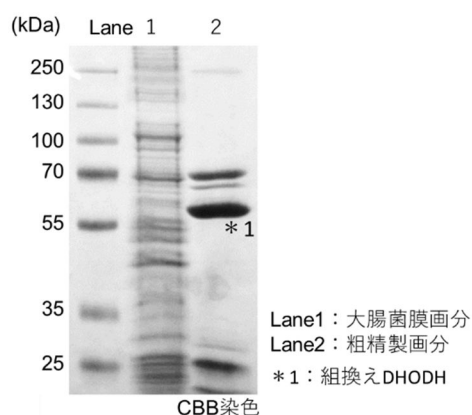


図1: 結核菌の組換えDHODHの粗精製

## (3) 組換え MtDHODH の生化学的解析

DHODH にはジヒドロオロト酸を基質として電子を電子受容体へと受け渡す機能を有し、1 型 DHODH と 2 型 DHODH に分類される。1 型 DHODH は、フマル酸または  $\text{NAD}^+$  を電子受容体として利用し、2 型 DHODH は、キノンを電子受容体として利用する。そして、組換え MtDHODH を用いて、電子受容体の検討を行った。その結果、キノンを電子受容体として利用することがわかり、MtDHODH は 2 型であることが明らかとなった。また、ヒトの 2 型 DHODH 阻害剤であるプレキナールは、MtDHODH を阻害しないことが明らかとなった。したがって、阻害剤感受性が異なることから、MtDHODH の活性部位の構造は、ヒト DHODH と異なることが示唆された。つまり、結核菌 DHODH 特異的な阻害剤の同定が期待できる。

## (4) 阻害剤の探索

96 ウェルプレートを用いたアッセイ系を用いて、組換え MtDHODH の阻害剤の探索を行った。これまでに様々な生物が有する呼吸酵素のキノ結合部位を阻害する約 400 個の化合物ライブラリーを用いた。その結果、 $20 \mu\text{M}$  の濃度では酵素を阻害する化合物は同定できなかった。原因として、MtDHODH は DCIP に電子を直接受け渡すことから、DCIP を用いたアッセイ系では化合物の阻害効果を正確に評価することが困難であることがあげられる (図 2)。したがって、現在はレサズリンを用いた酵素アッセイ系による、阻害剤の同定を試みている。

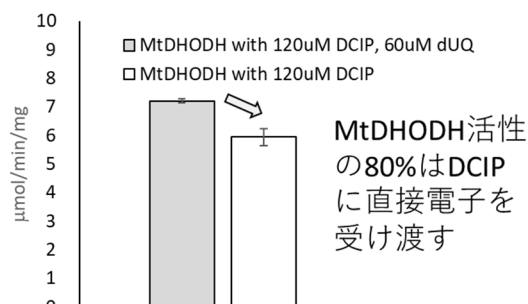


図2: MtDHODHの電子受容体

## <引用文献>

1. Sato D, Hartuti E.D., Inaoka D.K., Sakura T., Amalia E., *et al.* Structural and Biochemical Features of *Eimeria tenella* Dihydroorotate Dehydrogenase, a Potential Drug Target. *Genes (Basel)*. 2020. 7;11(12):1468. doi: 10.3390/genes11121468.
2. DeJesus M.A. *et al.* Comprehensive Essentiality Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Genome via Saturating Transposon Mutagenesis. *mBio*. 2017. 17;8(1):e02133-16. doi: 10.1128/mBio.02133-16.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安東優里, 松尾祐一, 望月恒太, 中谷義雄, Greg Cook, 北潔, 稲岡ダニエル健
2. 発表標題 寄生虫の酵素を用いたベダキリンの作用機序解析
3. 学会等名 第13回 細菌学若手コロセウム
4. 発表年 2019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
---------	---------