

## 自己評価報告書

平成23年 5月 9日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2011

課題番号：20780066

研究課題名 (和文) 結核菌における特異なポリリン酸利用能の解析とその応用

研究課題名 (英文) The analysis and application of the availability of an inorganic polyphosphate specific to *Mycobacterium tuberculosis*

研究代表者

森 茂太郎 (MORI SHIGETAROU)

国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官

研究者番号：60425678

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：結核菌、ヌクレオチド、加リン酸分解、遺伝子、タンパク質

## 1. 研究計画の概要

結核菌は、ヒトに対して重篤な感染症である結核症を引き起こす病原菌である。結核菌に特異的な細胞壁構造や宿主との免疫応答に関する研究は古くから行われているものの、結核菌の病原性や生理機能の全容を解明するまでには至っていない。従って、新しい視点から結核菌の病原性や生理機能を明らかにする研究が求められている。そこで本研究課題では、結核菌が他の生物種とは異なるポリリン酸利用能を有していることに着目して、結核菌由来ポリリン酸関連酵素の酵素学的諸性質、立体構造、及び生体内での役割について詳細な解析を行うことにより、結核菌の病原性や生理機能に関する新しい知見を得ることを目的としている。また、本研究で得られた知見を応用して新規抗結核薬の開発につなげることも目標としている。

## 2. 研究の進捗状況

ポリリン酸に関連するタンパク質として、結核菌のゲノム上に存在する機能未知遺伝子である Rv2613c 遺伝子がコードするタンパク質について、大腸菌を宿主とする大量発現系を構築し、SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製を行った。得られた精製タンパク質を用いて詳細な酵素機能の解析と立体構造の決定を試みた。その結果、本タンパク質がモチーフ解析等から予想されていた加水分解活性ではなく、加リン酸分解活性を diadenosine tetraphosphate (Ap<sub>4</sub>A) 等のヌクレオチドに対して示す、新規 Ap<sub>4</sub>A 加リン酸分解酵素であること明らかにした。また、X線結晶構造解析により、本酵素の立体構造を明らかにするとともに、活性中心部位に存在しているアミノ酸残基を特定した。変異体解

析の結果から、それらのアミノ酸残基が活性発現に深く関与していることが示された。さらに、本酵素の基質結合部位を推測したところ、本酵素に特異的な4量体構造が基質結合部位の形成に必要であることが示唆された。また、活性中心部位に存在しているループ構造について、本酵素と他の Ap<sub>4</sub>A を基質とする酵素とを比較したところ、本酵素のループ構造は1残基分長いことが示された。変異体の解析から、このループ構造の特徴が基質特異性に関与していることが示唆された。このように本酵素は、他の Ap<sub>4</sub>A を基質として利用する酵素とは異なる、特異的な基質結合部位や活性中心部位の構造を持つことが示された。そのため、本酵素の活性を特異的に阻害する新規化合物のデザインが可能であることが予想された。現在は、新規抗結核薬の開発を目標として、新規阻害剤の探索を進めている。また平行して、本酵素の生体内での生理的役割を明らかにする目的で、相同組換えを用いて本酵素をコードする遺伝子を破壊した株の作製も進めている。これまでに、破壊株を作製するためのプラスミドの構築を行った。

## 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

結核菌由来ポリリン酸関連酵素の酵素学的諸性質と立体構造を明らかにする目標については既に達成している。さらに、得られた知見から新規抗結核薬候補のドラッグデザインを進める等、研究の一部は計画以上に進展している。一方で、ポリリン酸関連酵素の生体内における役割を明らかにする目標はまだ達成には至っていない。そのため、全

体の達成度として「②おおむね順調に進展している」とした。

#### 4. 今後の研究の推進方策

(1) 結核菌由来新規 Ap<sub>4</sub>A 加リン酸分解酵素の構造機能相関解析に基づいた新規抗結核薬の開発では、引き続き本酵素の活性を特異的に阻害する新規阻害剤の探索を行う。現在、約 400 万種類の化合物が登録されたデータベースを用いて探索を行っているが、必要に応じて新規化合物のデザインや合成を行うことも視野に入れている。

(2) 結核菌由来新規 Ap<sub>4</sub>A 加リン酸分解酵素の生体内での役割を明らかにする研究では、本酵素をコードする遺伝子を破壊した株の作製を引き続き行う。相同組換えを用いた手法により、ゲノム上の標的遺伝子中に変異を挿入することによって破壊株を作成し、野生株と破壊株、及び相補株における生育能の違いや生理機能の差を調べる。結核菌の培養には時間がかかるため、同じ抗酸菌種に属し、培養速度が速い *Mycobacterium smegmatis* を用いた破壊株・相補株の作製も同時に進める。

#### 5. 代表的な研究成果

(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 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親、Structural Insights into the Novel Diadenosine 5', 5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-Tetraphosphate Phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv、Journal of Molecular Biology、in Press、査読有
- ② 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親、Crystallographic analysis of 5', 5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetraphosphate Phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv、Photon Factory Activity Report、27 巻、228、2010 年、査読無
- ③ 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親、Crystallization and preliminary X-ray analysis of the diadenosine 5', 5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv、Acta Crystallogr.、F66 巻、279-281、2010 年、査読有
- ④ 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親、Purification and molecular characterization of a novel diadenosine 5', 5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv、Protein Expr.

Purif.、69 巻、99-105、2010 年、査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親、結核菌由来新規 diadenosine 5', 5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetraphosphate 加リン酸分解酵素の機能構造相関解析、第 62 回日本生物工学会大会、2010 年 10 月、宮崎市
- ② 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親、Cloning, purification, and molecular characterization of a novel diadenosine 5', 5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv、The 110<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology、2010 年 5 月、San Diego, CA, USA
- ③ 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親、結核菌由来新規 diadenosine 5', 5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetraphosphate 加リン酸分解酵素の結晶構造解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月、東京
- ④ 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、朴貞玉、荒川宜親、結核菌由来新規ヌクレオチド加水分解酵素の機能解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月、福岡
- ⑤ 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、朴貞玉、荒川宜親、結核菌由来の新規ヌクレオチド加水分解酵素に関する研究、第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月、名古屋

[その他]

結核菌由来新規 Ap<sub>4</sub>A 加リン酸分解酵素の立体構造については Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>) を参照のこと。登録番号：3AN0。