

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 8日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590409

研究課題名（和文） 抗酸菌のホスファチジルイノシトールの正しい生合成経路

研究課題名（英文） A revised biosynthetic pathway for phosphatidylinositol in Mycobacteria

研究代表者

森井 宏幸 (MORII HIROYUKI)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60141743

研究成果の概要（和文）：

抗酸菌のイノシトールリン脂質 (PI) の生合成経路は、これまでヒトと同じだと考えられてきた。我々は、抗酸菌ではイノシトール1リン酸が脂質成分に取り込まれ、リン酸が1つ余分に付いた中間体ホスファチジルイノシトールリン酸(PIP)を生成し、その後リン酸が取れてPIを生成することを明らかにした。ヒトではイノシトールが直接脂質成分に取り込まれるのでPIPはできない。このPI合成経路の違いから、PIP合成酵素が新規抗結核薬開発の標的になることを示した。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated a revised biosynthetic pathway for phosphatidylinositol (PI) in mycobacteria. Mycobacterial PI was synthesized from CDP-diacylglycerol (CDP-DAG) and inositol 1-phosphate via phosphatidylinositol phosphate (PIP), which was dephosphorylated to PI. PIP is not formed in the process of PI synthesis in humans because inositol reacts directly with CDP-DAG. PIP synthase in the pathway is a promising target for the development of new anti-mycobacterium drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：イノシトール、リン脂質、脂質合成

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む真核生物のホスファチジルイノシトール(PI)は、イノシトールとCDP-ジアシルグリセロールが縮合して生合成される。真正細菌(Bacteria)のPI生合成は、これまで抗酸菌でのみ調べられていて、真核生物と同じ経路で合成されると10年前に報告されていた。我々は、メタン生成古細菌で、イノシトール1リン酸とCDP-アーキオール(CDP-ジアシルグリセロールに相当)から、中間体のアーキチジルイノシトールリン酸(AIP)ができ、これが脱リン酸化されてアーキチジルイノシトール(AI、PIに相当)が生成する新規合成経路を2009年に見出した。すなわち、イノシトールリン脂質の生合成には、リン酸が取れる段階が異なる真核生物型と古細菌型の2種類ある事を示した。抗酸菌についても、ATPを加えた特殊な酵素活性測定法でPI合成酵素活性を調べているので、そのPI生合成経路は真核生物型ではなく古細菌型の可能性が高いと考えた。

2. 研究の目的

抗酸菌のホスファチジルイノシトールの生合成経路が、従来報告されている経路ではなく、我々が古細菌で見出した新しい生合成経路である事を検証する。そして、その経路が真核生物とは異なり、古細菌と真正細菌に共通する普遍的な経路なのかどうかを明らかにする。また、抗酸菌の当該酵素活性測定法を抗菌剤のスクリーニング法としても使えるように酵素活性測定条件を検討し、阻害剤を探索する。

3. 研究の方法

(1) 抗酸菌の正しいPI生合成経路の解明

①【基質の調製】1L-[¹⁴C]イノシトール1リン酸は市販されていないので、[¹⁴C]グルコース6リン酸からメタン生成古細菌のホモジネートの上清を用いて酵素的に調製した。

②【酵素の調製】非病原性の*M. smegmatis*を大量培養し、その菌体を超音波で破碎後、遠心し、その沈殿物をPercoll密度勾配遠心により細胞壁画分を得た。

③【遺伝子組換え操作】古細菌のAIP合成酵素とホモロガスな抗酸菌タンパク質の遺伝子を大腸菌で発現させた。

④【酵素活性測定】CDP-ジアシルグリセロールと[³H]イノシトールまたは[¹⁴C]イノシトール1リン酸に緩衝液を加え、酵素として*M. smegmatis*の細胞壁(またはPIP合成酵素を発現させた*E. coli*のホモジネート)を加えて反応させた後、有機溶媒可溶性生成物のラジオアイソトープをカウントした。

(2) PIP合成酵素阻害剤の探索

①【PIP合成酵素阻害剤のスクリーニング法の確立】*M. bovis*(BCG)のPIP合成酵素の遺伝子を大腸菌に導入し、その菌体の膜画分を酵素源として用いた。結核菌(*M. tuberculosis*)のPIP合成酵素のアミノ酸配列は、*M. bovis*(BCG)のそれと全く同じである。従って、BCGの遺伝子を入れた大腸菌を結核菌の阻害剤のスクリーニングに用いた。

②阻害剤候補化合物として、PIP合成酵素の水溶性基質であるイノシトール1リン酸の構造類似体を有機合成した。

③阻害剤候補化合物のPIP合成酵素活性への影響を調べた。

(3) PIP(AIP) 合成酵素の分布

新規生成経路が、真正細菌と古細菌において普遍的に存在する事を示すために、PIP(AIP) 合成酵素の真正細菌と古細菌における分布を調べた。真正細菌は、*Streptomyces avermitilis*、*Propionibacterium acnes*、*Corynebacterium glutamicum*、*Rhodococcus equi* の4属4種、古細菌は *Sulfolobus solfataricus* と *Aeropyrum pernix* の2属2種、コントロールとして真核生物の *Saccharomyces cerevisiae* と *Homo sapiens* の2属2種について、それぞれの PIP 合成酵素、AIP 合成酵素、PI 合成酵素とホモログなタンパク質の人工合成遺伝子を pET21a(+)ベクターに挿入したプラスミドを構築し (GenScript 社)、大腸菌に導入した。それぞれの酵素の遺伝子を発現させた組み換え体の膜画分を酵素源として、イノシトールリン脂質の生合成酵素活性を調べた。

4. 研究成果

(1) 抗酸菌の正しい PI 生合成経路の解明

抗酸菌 PI の生合成経路を詳しく調べ直し、それが、ヒトとは異なる以下に示した新しい経路であることを明らかにした。抗酸菌ではイノシトール1リン酸が脂質成分に取り込まれ、リン酸が1つ余分に付いた中間体ホスファチジルイノシトールリン酸(PIP)を生成し、その後リン酸が取れてPIを生成した。ヒトではイノシトールが直接脂質成分に取り込まれるのでPIPはできない(図1)。

(2) PIP 合成酵素阻害剤の探索

抗酸菌 PI の新規合成経路から、基質であるイノシトール1リン酸の構造類似体が阻害剤になると予想して4種類の化合物を合成した。そして、合成品のすべてが PIP 合成酵素活性を阻害することを確認した。合成した4種の化合物のうち、最も阻害効果の高かったのは ±Ino-C-P (図2)であり、2種については抗酸菌の生育阻害効果も確認した。興味深い結

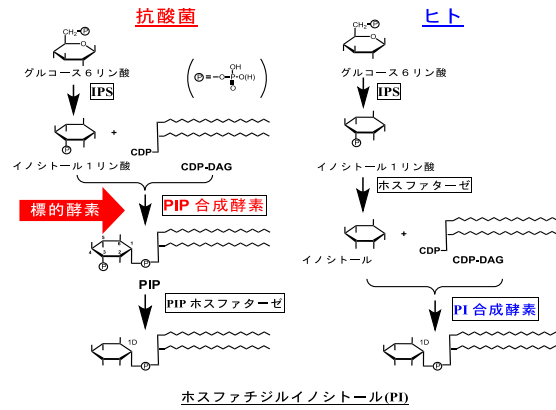


図1 抗酸菌とヒトのPI生合成経

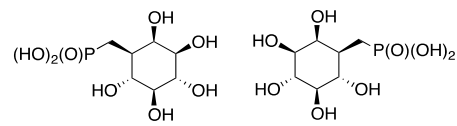


図2 ±Ino-C-P の構造

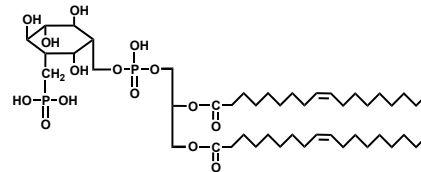


図3 PI-C-P の構造

果として、酵素反応により ±Ino-C-P が反応して新規生成物 PI-C-P(図3)ができた。この生成物は、±Ino-C-P よりも強く PIP 合成酵素活性を阻害した。PI-C-P が 0.1 mM で 29%、0.25 mM で 45% PIP 合成酵素活性を阻害した。

(3) PIP(AIP) 合成酵素の分布

真正細菌 *S. avermitilis*、*P. acnes*、*C. glutamicum*、*R. equi* の4種、古細菌 *S. solfataricus* と *A. pernix* の2種の目的遺伝子を導入した組換え体については、6種すべて PIP(AIP) 合成酵素活性を確認し、イノシトールは取り込まれなかった。*S. cerevisiae* と *H. sapiens* の2種については、PI 合成酵素活性を確認したが、イノシトール1リン酸は取り込まれなかった。PIP、AIP、PI 合成酵素のアミノ酸配列から系統樹を書くとの図4のようになった。

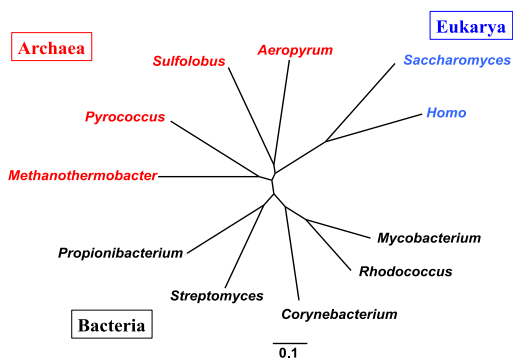


図4 PIP(AIP)、PI合成酵素ホモログの系統解析

PIを含む真正細菌は、放線菌など抗酸菌類縁の有効な治療薬の少ない細菌に限られている。これらの抗酸菌類縁菌に対する薬剤のスクリーニングおよび開発も達成できる事が期待される。さらに、PIの分布は、少数の真正細菌に限られているので、生体に必要な常在細菌叢には影響のない、抗酸菌特異的な薬剤を創薬できることが期待される。

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 Hiroyuki Morii, Tatsuo Okauchi, Hiroki Nomiya, Midori Ogawa, Kazumasa Fukuda and Hatsumi Taniguchi, Studies of inositol 1-phosphate analogues as inhibitors of the phosphatidylinositol phosphate synthase in mycobacteria, J. Biochem., 査読有, Vol. 153, 2013, 257-266 DOI: 10.1093/jb/mvs141

② Hiroyuki Morii, Midori Ogawa, Kazumasa Fukuda, Hatsumi Taniguchi and Yosuke Koga, A revised biosynthetic pathway for phosphatidylinositol in Mycobacteria, J. Biochem., 査読有, Vol. 148, 2010, 593-602 DOI: 10.1093/jb/mvs093

[学会発表] (計6件)

① 森井宏幸、小川みどり、福田和正、谷口初美、真正細菌および古細菌におけるイノシトールリン脂質の新規生合成経路の普遍性、日本農芸化学2013年度大会、2013年3月27日、東北大学(仙台)

② 森井宏幸、小川みどり、福田和正、谷口初美、結核菌のホスファチジルイノシトールリン酸(PIP)合成酵素の活性測定条件、第84回日本生化学会大会、2011年9月22日、国立京都国際会館(京都)

③ 森井宏幸、古賀洋介、真正細菌/古細菌のイノシトールリン脂質生合成経路は真核生物型とは異なる、第53回脂質生化学研究、2011年5月12日、ホテル東京ガーデンパレス(東京)

④ 森井宏幸、小川みどり、福田和正、谷口初美、古賀洋介、抗酸菌のホスファチジルイノシトールの正しい生合成経路、第83回日本生化学会大会、2010年12月10日、神戸ポートアイランド(神戸)

⑤ 森井宏幸、小川みどり、福田和正、谷口初美、結核菌とヒトのホスファチジルイノシトールの生合成経路は異なる、第62回日本生物工学会大会、2010年10月28日、ワールドコンベンションセンター(宮崎)

⑥ Kazumasa Fukuda, Hiroyuki Morii, Midori Ogawa and Hatsumi Taniguchi, Function analysis of the putative phosphatidylinositol phosphate synthases of Mycobacterium species, 45th US-Japan conference on tuberculosis and leprosy, 2010年7月13日、Cambridge, MA(アメリカ)

[産業財産権]

○出願状況(計3件)

①

名称: 新規な抗酸菌生育阻害剤

発明者: 森井宏幸、岡内辰夫、小川みどり、

福田和正、谷口初美
権利者：産業医科大学
種類：特願
番号：2012-208591
出願年月日：2012年9月21日
国内外の別：国内

②

名称：新規な抗酸菌生育阻害剤
発明者：森井宏幸、岡内辰夫、小川みどり、
福田和正、谷口初美
権利者：産業医科大学
種類：特願
番号：2011-119506
出願年月日：2011年5月27日
国内外の別：国内

③

名称：抗酸菌生育阻害剤の候補化合物のスクリーニング方法及び該方法により得られる抗酸菌生育阻害剤
発明者：森井宏幸
権利者：産業医科大学
種類：特願
番号：2009-272247
出願年月日：2010年11月30日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森井 宏幸 (MORII HIROYUKI)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60141743

(2) 研究分担者

小川 みどり (OGAWA MIDORI)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号：40320345