

論文の内容の要旨

論文題目 黄色ブドウ球菌 MvaA タンパク質のペプチドグリカン合成への寄与

氏名 安川 淳一朗

【背景と目的】

メバロン酸はイソプレノイドの前駆体であり、多様な生体分子の構成成分となる。イソプレノイドの生合成経路は、メバロン酸が中間体となるメバロン酸経路、および非メバロン酸経路 (GAP-pyruvate 経路)の2つが知られている。黄色ブドウ球菌や、ヒトなど多くの動物は、メバロン酸経路だけを持つ。これらの生物においては、メバロン酸経路がイソプレノイド生合成の律速経路であり、様々な生体分子を生合成する上で必要な経路である。一方で、細菌の分子遺伝学的解析において一般的に用いられてきた大腸菌や枯草菌はメバロン酸経路を持たず、非メバロン酸経路だけを持つ。そのため、細菌におけるメバロン酸経路の意義および役割についての理解は充分になされていない。

HMG-CoA レダクターゼはメバロン酸経路の律速酵素であり、HMG-CoA を還元してメバロン酸を合成する反応を触媒する(図 1)。病原性細菌である黄色ブドウ球菌においては、*mvaA* 遺伝子が、HMG-CoA レダクターゼをコードする遺伝子として存在する。また、遺伝子破壊実験により、黄色ブドウ球菌の *mvaA* 遺伝子は増殖に必要であるとされている。よって、HMG-CoA レダクターゼである MvaA タンパク質は黄色ブドウ球菌に対する抗菌治療薬の標的分子の有力な候補である。しかしながら、*mvaA* 遺伝子の変異株を用いた遺伝学的解析の報告はなく、メバロン酸およびメバロン酸から合成されるイソプレノイドが、黄色ブドウ球菌の増殖に必須なメカニズムは明らかではなかった。



図1 HMG-CoA レダクターゼが触媒する反応

本研究の目的は、*mvaA* 遺伝子が担う黄色ブドウ球菌の増殖に必須なメカニズムの解明、ならびに MvaA タンパク質の酵素活性に寄与するアミノ酸の同定である。本研究では黄色ブドウ球菌の *mvaA* 遺伝子に変異を有する温度感受性変異株を初めて分離し、ペプチドグリカン合成ならびに黄色ブドウ球菌の増殖へ与える寄与を遺伝学的に解析した。さらに、野生型ならびに変異型 MvaA タンパク質を精製し、アミノ酸変異が酵素活性に与える影響を生化学的に解析した。

【結果】

1. *mvaA* 遺伝子の温度感受性変異株の分離

一般に、温度感受性変異株は、細菌の増殖および生存に必須な遺伝子の役割を明らかにする上で有用である。菌の増殖に必須な遺伝子である *mvaA* がコードする HMG-CoA レダクターゼの分子機構を理解する上で、温度感受性変異株は重要な材料となると考えられる。しかし、どの細菌においても HMG-CoA レダクターゼをコードする遺伝子の温度感受性変異株が分離された報告例は無かった。当研究室では黄色ブドウ球菌の温度感受性変異株を用いた細菌の増殖に必須な遺伝子の網羅的解析を行ってきた。私は、黄色ブドウ球菌の *mvaA* 遺伝子に変異を有する温度感受性変異株に着目し、その解析に着手した。本研究では、3 株の *mvaA* 遺伝子変異株を用いた。これらの株の温度感受性は、野生型 *mvaA* 遺伝子を有するプラスミドの導入によって抑圧された(図 2)。また、それら 3 株のゲノム DNA の *mvaA* 遺伝子において、それぞれ、M77I、A335V、C366Y というアミノ酸変異を導く一塩基置換変異が生じていた。ファージトランスダクション法を用いて、野生株に *mvaA* 遺伝子変異株の *mvaA* 遺伝子の変異を導入し

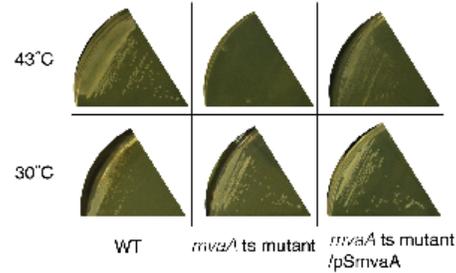


図2 黄色ブドウ球菌の *mvaA* 遺伝子の温度感受性変異株および、*mvaA* プラスミド導入株の温度感受性

WT(RN4220)、*mvaA* ts mutant(*mvaA* 遺伝子変異(M77I)温度感受性変異株)、及び *mvaA* ts mutant /pSmvaA の、43°Cおよび 30°Cでの寒天培地上での増殖を示す。

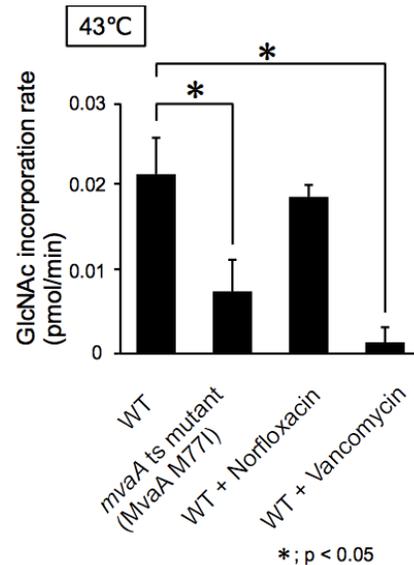


図3 *mvaA* 遺伝子変異株(M77I)におけるペプチドグリカン合成能の低下

WT(RN4220)および *mvaA* ts mutant(*mvaA* 遺伝子変異株(M77I))生菌のペプチドグリカンの合成能を ^{14}C ラベルした GlcNAc が一定時間内に菌体酸不溶性画分へ取り込まれる量で評価した。Vancomycin はペプチドグリカン合成阻害剤、Norfloxacin は DNA ジャイレース阻害剤。

た株は、温度感受性となった。以上の結果は、MvaA タンパク質の 77 番目のメチオニン、335 番目のアラニン、及び 366 番目のシステインのアミノ酸置換を導く一塩基置換変異が、温度感受性の原因であることを示唆する。なお、*mvaA* 温度感受性変異株において置換が生じている 77 番目のメチオニンは、基質である HMG-CoA との相互作用に関する三次元立体構造解析からは必須アミノ酸とは予想されないアミノ酸であった。私は、*mvaA* 遺伝子変異株(MvaA M77I)について、以下の検討を行った。

2. *mvaA* 遺伝子のペプチドグリカン合成への寄与

HMG-CoA レダクターゼはメバロン酸経路の律速酵素であり、HMG-CoA を還元してメバロン酸を合成する。メバロン酸から生合成されるイソプレノイドはペプチドグリカンの基質となることが知られている。そこで私は、高温条件下において、*mvaA* 遺伝子変異株(MvaA M77I)のペプチドグリカン合成能が低下しているか検証を試みた。その結果、*mvaA* 遺伝子変異株(MvaA M77I)においては、高温条件下で、野生株と比べ、放射標識したGlcNAcの取り込みが低下しており、ペプチドグリカン合成能が低下していることがわかった(図3)。細菌のペプチドグリカン合成変異株の温度感受性は高浸透圧条件下で抑圧されることが知られている。*mvaA* 遺伝子変異株(MvaA M77I)の温度感受性も、高濃度のSucrose、あるいはNaCl添加により抑圧された(図4)。また、MvaAタンパク質が有するHMG-CoA レダクターゼ活性により生成されるメバロン酸の培地への添加により、*mvaA* 遺伝子変異株(MvaA M77I)の温度感受性は抑圧された(図5)。以上の結果は、黄色ブドウ球菌のメバロン酸合成酵素であるHMG-CoA レダクターゼにより生成されるメバロン酸が、ペプチドグリカン合成の基質となり、菌の増殖に寄与することを示唆する。さらに、私は、このMvaA の77番目のメチオニンの変異により、HMG-CoA レダクターゼ活性が低下しているか次に検討した。

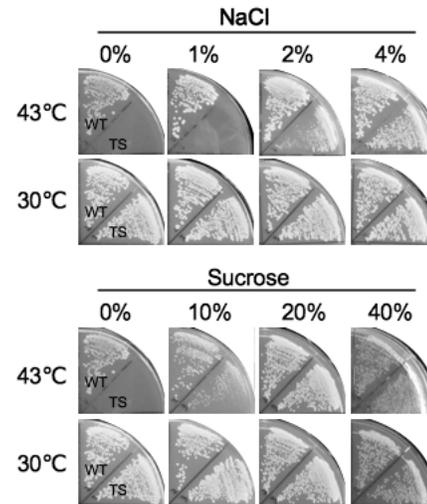


図4 *mvaA* 遺伝子変異株(MvaA M77I)の温度感受性に対する高浸透圧条件の影響

WT(RN4220)およびTS(*mvaA* 遺伝子変異株(M77I))の、43°Cあるいは30°CにおけるNaClあるいはSucrose添加寒天培地上での増殖を示す。

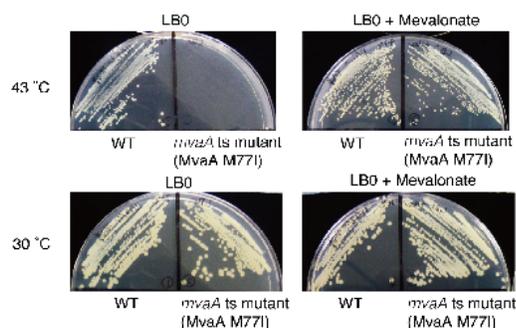


図5 メバロン酸添加培地における *mvaA* 遺伝子変異株(MvaA M77I)の温度感受性

WT(RN4220)および *mvaA* ts mutant(*mvaA* 遺伝子変異株(M77I))の、43°Cあるいは30°Cにおける1mMメバロン酸添加寒天培地上での増殖を示す。

3. MvaA タンパク質の生化学的解析

mvaA 遺伝子変異株(MvaA M77I)から調製した粗抽出液中のHMG-CoAレダクターゼの比活性は、野生株のそれと比べて低下していた。さらに私は、黄色ブドウ球菌の野生型および変異型MvaAタンパク質を、それぞれリコンビナントタンパク質として大腸菌で発現させ、精製した(図6A)。変異型MvaAタンパク質は、野生型MvaAタンパク質と比べ、基質であるHMG-CoAレダクターゼ及びNADPHに対する親和性は変わらないが、最大反応速度は5分の1以下に低下していた(図6B)。以上の結果は、MvaAタンパク質の77番目のメチオニンのアミノ酸置換が、MvaAタンパク質の酵素活性を低下させることを示唆する。

【まとめと考察】

本研究において私は、黄色ブドウ球菌のHMG-CoAレダクターゼであるMvaAタンパク質をコードする*mvaA*遺伝子の温度感受性変異株を分離し、1) MvaAタンパク質がペプチドグリカン合成に寄与すること2) MvaAタンパク質のM77I変異が活性を低下させることを明らかにした。

メバロン酸は、ペプチドグリカンの前駆体となるイソプレノイドの前駆体である。また、イソプレノイドは、ペプチドグリカンの前駆体である。しかし、これまでに、細菌のHMG-CoAレダクターゼがペプチドグリカンの合成に寄与するという報告はない。細菌のHMG-CoAレダクターゼの温度感受性変異株を分離し、解析したのは本研究が初めてである。温度感受性変異株を用いることにより、HMG-CoAレダクターゼが、ペプチドグリカン合成に必要であることが明らかとなった。すなわち、HMG-CoAレダクターゼは黄色ブドウ球菌の増殖に必要なペプチドグリカンの前駆体の供給を担う酵素である。

本研究において初めて、77番目のメチオニンのイソロイシンへの置換が、MvaAタンパク質の酵素活性を低下させることを示した。HMG-CoAレダクターゼの立体構造からは、このアミノ酸残基の機能は予測されなかった。黄色ブドウ球菌のHMG-CoAレダクターゼにおける77番目のメチオニン残基は、黄色ブドウ球菌だけでなく、多くの真核生物のHMG-CoAレダクターゼにおいても保存されている。したがって、この残基がメチオニンとして保存されていることが、HMG-CoAレダクターゼの酵素活性にとって普遍的に重要であることが予想される。

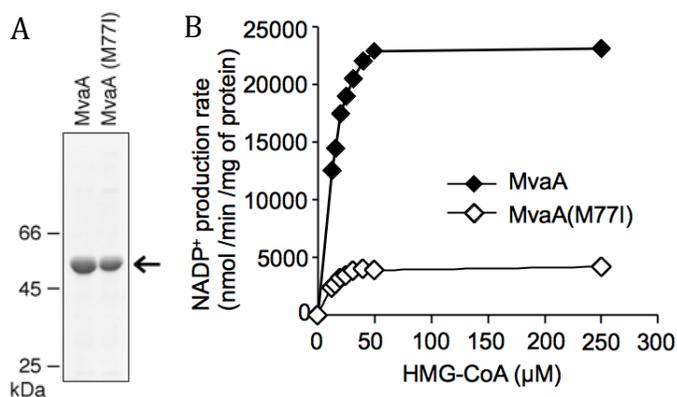


図6 黄色ブドウ球菌 MvaA タンパク質の活性測定

(A)活性測定に用いたリコンビナント MvaA タンパク質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の CBB 染色像 (B)野生型 MvaA および MvaA M77I リコンビナントタンパク質の HMG-CoA レダクターゼ触媒活性について、反応の基質である HMG-CoA の濃度と、生成物である NADP⁺の産生速度との関係。