SURE 静岡大学学術リポジトリ
Shizuoka University REpository

光合成膜脂質合成経路を標的としたシアノバクテリア特異的阻害剤の開発

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2019-05-13 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 粟井, 光一郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/00026521

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月 １５ 日現在

機関番号：１３８０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2016～2017
課題番号：１６Ｋ１２６０９

研究課題名（和文）光合成膜脂質合成経路を標的としたシアノバクテリア特異的阻害剤の開発

研究課題名（英文）Development of a specific growth inhibitor for cyanobacteria, targeting the pathway for a photosynthetic membrane lipid.

研究代表者
粟井　光一郎（Awai, Koichiro）

静岡大学・電子工学研究所・准教授

研究者番号：８０４３１７３２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：シアノバクテリア特有の光合成膜脂質合成経路を阻害する化合物の開発を目的として，化合物ライブラリを用いたハイスループットスクリーニングに適したタンパク質の選抜，活性測定系の開発を計画した。すでに活性が確認されていたシアノバクテリアSynechocystis sp. PCC 6803由来の糖脂質合成酵素（MgdA）を用いたところ，SN比が低かったため，より高活性のMgdAを探索し，好熱性シアノバクテリア由来のMgdAが，およそ2倍の活性を示すことがわかった。今後，このタンパク質にtagを付けたものを精製することで，比活性の高い酵素画分を得て，蛍光試薬を用いた検出系を確立したい。

研究成果の概要（英文）：To develop compounds that inhibit the cyanobacteria specific synthetic pathway for photosynthetic membrane lipid, selection of proteins suitable for high-throughput screening with a chemical library and development of an assay system were conducted. First, a glycolipid synthase (MgdA) from the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 was tested but the SN ratio was not enough high for the screening. Among six MgdA proteins examined, MgdA of a thermophilic cyanobacteria showed approximately twice as much activity compare to that of Synechocystis sp. PCC 6803. This MgdA protein of thermophilic cyanobacteria is now expressed in E. coli with tag for affinity purification. Using this tagged protein, we would like to establish a detection system using a fluorescent probe.

研究分野：植物脂質生理学

キーワード：チラコイド膜　ガラクト脂質　シアノバクテリア　阻害剤　膜貫通タンパク質

１．研究開始当初の背景

光合成反応を行うチラコイド膜は，他の生体膜と異なり，リン脂質に乏しく糖脂質がおよそ 9 割を占める。そのうちジアシルグリセロール（DAG）骨格にガラクトースを 1 分子もつモノガラクトシルジアシルグリセロール（MGDG）が 5 割，2 分子持つジガラクトシルジアシルグリセロール（DGDG）が 3 割を占める。この脂質組成は植物葉緑体から，葉緑体と共通起源を持つと考えられているシアノバクテリアまで保存されていることから，これらの糖脂質は光合成膜に重要であると考えられてきた。

しかし，シアノバクテリアと植物では，これらガラクト脂質の合成経路が異なる。植物は糖転移酵素 MGD 1 により DAG にガラクトースを付加する 1 ステップの反応で MGDG を合成する。一方，シアノバクテリアではまず糖転移酵素 MgdA によりグルコースを付加することでモノグルコシルジアシルグリセロール（GlcDG）を合成し，糖異性化酵素 MgdE によって MGDG を合成する 2 ステップ反応を取る。このシアノバクテリア型 MGDG 合成経路はシアノバクテリア特有であり，他の生物に相同遺伝子は見つかっていない。また，*mgdA* 遺伝子は必須遺伝子であり，その破壊株は致死であることがわかっている。そこで，このシアノバクテリア型 MGDG 合成経路をターゲットとした阻害剤をスクリーニングすることによりシード化合物を選定し，それをもとにシアノバクテリアを特異的に駆除する化合物の開発を計画した。シアノバクテリア型ガラクト脂質合成経路に関わる遺伝子はすべて研究代表者が同定しており，その利用による阻害剤開発は世界に類を見ない研究である。

２．研究の目的

シアノバクテリアは光合成による大気環境の維持や一次生産者として重要な役割をはたしている一方，大量発生による環境汚染（アオコ被害）や毒素による家畜被害が問題となっている。また，家庭用アクアリウムや水族館の水槽，ゴルフ場の芝生でもシアノバクテリアの発生が景観を損ねるため，これらを除去する薬剤のニーズは高い。しかし，これまでシアノバクテリアを特異的に駆除する薬剤は開発されておらず，市販薬は過酸化水素水など他生物に影響のある化合物が主成分となっている。本研究では，シアノバクテリア特異的な光合成膜糖脂質合成経路を阻害する化合物の開発を目的とし，化合物ライブラリを用いたハイスループットスクリーニングの実施と結晶構造解析を基盤とした薬剤デザインを行い，リード化合物を選定することを目指した。

３．研究の方法

（１）目的糖転移酵素の調製

シアノバクテリアには少なくとも 6 目にわたる多様な種が存在するため，幅広い種に対する薬剤の有効性を検討する必要がある。単離培養できる種は限られているが，計画当初，代表的なクロオコッカス目の *Synechocystis* sp. PCC 6803 とネンジュモ目の *Anabaena* sp. PCC 7120 を用いることを計画した。この 2 種は目レベルで異なるため，薬剤の作用幅の確認に最適である。ガラクト脂質合成酵素は，上記 2 種由来の膜タンパク質全長を組み換え大腸菌で発現させる系を確立しており，アイソトープを用いた活性の確認もできていた。そこで，これらの組換え体を大腸菌で発現させるための条件検討を行った。加えて，膜貫通部位を除いたコンストラクトを作成し，大量発現・精製系の確立を行った。

（２）ハイスループットスクリーニング法の確立

ハイスループットスクリーニング（HTS）を実行するため，微量高速のガラクト脂質合成酵素アッセイ系の構築を試みた。従来の TLC 法による反応生成物検出法では微量高速化は困難なため，東京大学創薬機構の長野哲雄教授らが HTS 用に開発した方法を適用した。本研究の目的酵素 MgdA の反応は，DAG に UDP-Gal のガラクトースを転移するが，その際副産物として UDP が生成する。この UDP を検出するため，まず UDP を NDP kinase を用いて ADP に変換する。次に生成した ADP を基質とする ADP hexokinase でグルコースをグルコース-6-リン酸にする。グルコース-6-リン酸をグルコノラクトン-6-リン酸に変換するグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの反応により生成する NADPH を利用してレサズリンを蛍光物質であるレゾルフィンへと変換し，その蛍光を測定することで酵素活性を定量する。予備実験から，GlcDG 合成酵素（MgdA）を発現する大腸菌の粗抽出液の膜画分で活性が測定できると判明していた。そこで本研究では，この手法の最適化をおこなった。

（３）高活性 MgdA タンパク質の単離

HTS を行うためには，高活性型の MgdA の取得が有利となる。そこで，系統学的に距離のある mgdA 遺伝子を種々のシアノバクテリアから単離し，それぞれの発現ベクターを構築して，酵素活性の被殻を行った。

（４）MgdA の結晶構造解析

結晶構造がわかれば，モデリングにより反応ポケットに収まる阻害剤の予測が可能となる。そこで，上記（１）の膜貫通領域を除いた MgdA を大量発現，精製することで結晶化することを計画した。

４．研究成果

本研究では，シアノバクテリア特有の光合成膜脂質合成経路を阻害する化合物の開発を目的として，化合物ライブラリを用いたハイスループットスクリーニングの実施と結晶構造解析を基盤とした薬剤デザインを行い，リード化合物を選定することを計画した。

申請当初は既に *in vitro* での活性が確認されているシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来の糖脂質合成酵素（MgdA）を大腸菌で発現させ，ハイスループットスクリーニングに利用することを計画していたが，測定の結果 SN 比が低く，ハイスループットスクリーニングに利用するための低容量で安定して活性を検出することが難しいことがわかった。そこで，より高活性の MgdA を得るため，シアノバクテリア 5 種から合計 6 つの *mgdA* 遺伝子を単離し，それぞれ大腸菌用の発現ベクターに組み込み，大腸菌膜での糖脂質合成活性（糖脂質の蓄積）を調べた。その結果，好熱性シアノバクテリアである *Thermosynechococcus vulcanus* 由来の MgdA（TvMgdA）が，これまでの *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来の MgdA と比べ，およそ 2 倍の活性を示すことがわかった（図１，２）。

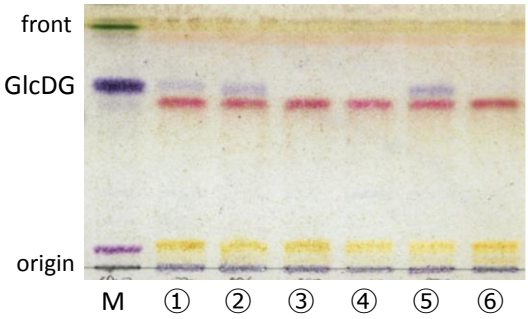

図１. 大腸菌膜での GlcDG の蓄積。TLC で展開後（溶媒：hexane/THF/2-propanol/dH2O = 50/0.5/35/3），α- ナフトールで染色している。⑤が *Thermosynechococcus vulcanus* 由来の MgdA（TvMgdA）を示す。

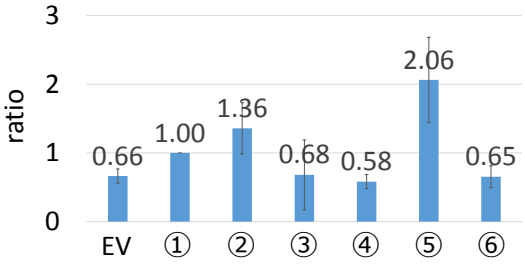

図２. *Synechocystis* sp. PCC 6803MgdA の活性との比較。*Synechocystis* sp. PCC 6803MgdA の活性を 1 としたときの他のシアノバクテリア由来の MgdA 活性を示す。エラーバーは SE（n = 3）。EV は空ベクターのみを入れた大腸菌の値。

そこで，TvMgdA を発現させた大腸菌から膜画分を抽出し，蛍光試薬を用いた検出系で活性を測定したところ，やはり SN 比が十分ではないことがわかった。TvMgdA は好熱性シアノバクテリア由来のため，この酵素を含むタンパク質溶液を熱処理し，他のタンパク質を不活化することを試みたが，大きな効果は見られなかった。次に，活性をより効果的に見るため，大腸菌内での GlcDG の蓄積ではなく，細胞粗抽出液に高濃度の基質を加える

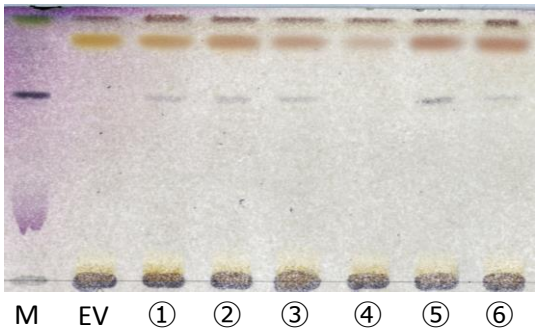

図 3. 大腸菌粗抽出液を用いた糖脂質合成活性。大腸菌破砕液に UDP-Glc および DAG を加え，反応後に脂質を抽出し，TLC で展開した（溶媒：acetone/toluene/dH2O = 90/30/5）。染色は α-ナフトールを用いた。

ことを試みた（図３）。その結果，ほぼすべてのシアノバクテリア由来の MgdA で活性を検出することが出来たが，大腸菌生細胞での糖脂質蓄積による活性の検出と大きな差は見られなかった。SN 比の改善が見られなかったのは，大腸菌膜画分に UDP-Glc を用いた酵素活性を持つものがあるためだと思われたが，それを特異的に阻害または取り除くことは難しいと考えられたため，MgdA を粗精製することを計画した。しかし，MgdA の N 末端に His-tag を付加した融合タンパク質を作製し活性を測定したところ，活性が検出されなくなってしまった。現在，C 末端に His-tag を融合した MgdA を作製しており，この融合タンパク質で活性が検出されれば，粗精製を行うことで SN 比を上げたい。

これと並行して，MgdA の膜貫通部位を除いたコンストラクトを作成し，可溶化を試みたところ，貧栄養培地で低温誘導することで可用性画分にタンパク質が得られることが分かった。この可溶性タンパク質を用いて，大量培養，精製を行い，結晶構造解析をするための材料としたい。ただし，この画分を用いて活性測定をしたが，残念ながら活性は検出されなかったため，今後は活性を持ったうえで可溶化できる方法を，上記の全長 His-tag 付きタンパク質を用いた解析で進めていきたい。

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）

〔学会発表〕（計　２件）

Keisuke Ando, Koichiro Awai, “Strategy to survive in extreme habitats: Galactolipid synthesis in thermophilic cyanobacteria”. 7th Asian Symposium on Plant Lipid （2017 年）

安藤 圭祐，粟井 光一郎「シアノバクテリア特異的阻害剤の開発を目指した高活性糖脂質合成酵素の選抜」第 18 回静岡ライフサイエンスシンポジウム （2017 年）

６．研究組織

(1)研究代表者

粟井光一郎（AWAI, Koichiro）
静岡大学・電子工学研究所・准教授
研究者番号：８０４３１７３２

(2)研究分担者

山崎　俊正（YAMAZAKI, Toshimasa）
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度解析センター・チーム長
研究者番号：４０３６０４５８