

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

森井 宏幸¹・小川 みどり²・福田 和正²・谷口 初美²

¹産業医科大学・医学部・生体物質化学、²産業医科大学・医学部・微生物学

〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1 電話: 093-603-1611

Fax: 093-693-9921 E-mail: h-morii@health.uoeh-u.ac.jp

抗結核薬開発のための新規標的部点を、本研究で発見した新しいリン脂質生合成経路から提起する。結核菌を含むすべての抗酸菌は、細胞膜の上に脂質に富んだ細胞壁を持ち、この特異な細胞壁が病原性や酸・アルカリに対する抵抗性に関与する。抗酸菌の細胞壁合成の出発物質であるリン脂質のホスファチジルイノシトール(PI)の生合成経路は、この 10 年間、ヒトを含む真核生物のそれと同様であると考えられてきた。しかし、その活性は、真核生物の PI 生合成活性と比べて著しく低く、酵素活性測定法にも疑問が持たれた。そこで、抗酸菌 PI の生合成経路を詳しく調べ直し、それが、ヒトとは異なる新しい経路であることを発見した。PI は、真核生物には広く分布しているが、真正細菌の中では、放線菌など抗酸菌類縁の限られた細菌のみに分布している。従って、抗酸菌の PI 生合成に関わる特異な酵素の阻害剤の探索は、ヒトやヒトに必要な常在細菌には影響の少ない、結核菌及びその類縁病原性菌を特異的に阻害できる薬剤の開発につながると考えられる。

1. はじめに

結核は、世界の人口の約3分の1が感染しており、新規結核患者数は年間約900万人、死亡者数は年間約180万人という、単独の病原体による感染症としては、現在でも最大級のものである。日本は、先進国でありながら、いまだに毎年約2万5千人の新規感染患者が発生している中蔓延国である。結核の治療にはイソニアジド、リファンピシン、ストレプトマイシンなどの限られた抗結核薬が用いられる。しかしながら、近年、これら抗結核薬に対する多剤耐性菌の増加が問題となっている。さらに、結核菌以外の抗酸菌による、有効な薬がなく治療困難な非結核性抗酸菌症の増加が大きな問題となっており、有効な治療薬の開発が待たれている。

結核菌を含むすべての抗酸菌は、脂質に富んだ細胞壁を有し、この特異な細胞壁構造が病原性や酸・アルカリに対する抵抗性に関与することが知られている。その構成成分のうち、リポアラビノマンナンは宿主の免疫系を回避するために重要な働きをする。このリポアラビノマンナン生合成のスタート物質が、リン脂質のホスファチジルイノシトール(PI)である[1]。

ヒトを含む真核生物の PI は、以下のような経路で合成される。

- (1) グルコース 6 リン酸 → イノシトール 1 リン酸
- (2) イノシトール 1 リン酸 →
イノシトール + Pi (無機リン酸)
- (3) CDP-ジアシルグリセロール+イノシトール→
ホスファチジルイノシトール(PI) + CMP

1999 年、抗酸菌の細胞壁の前駆体である PI も、真核生物と同じ経路で合成されると報告された[2]。しかし、その比活性は、酵母の PI 合成比活性の 0.014%しかなく、酵素反応液中に、ATP が加えられていた。

これに対して、筆者らは、メタン生成古細菌（以下メタン菌）では、以下の新規合成経路でイノシトールリン脂質が合成されることを最近見出した[3]。((1)の反応は共通)

- (2') CDP-アーキオール+イノシトール 1 リン酸→
アーキチジルイノシトールリン酸(AIP) + CMP
- (3') アーキチジルイノシトールリン酸(AIP) →
アーキチジルイノシトール(AI) + Pi
(CDP-アーキオールは CDP-ジアシルグリセロールのジエーテル型アナログ)

本研究では、抗酸菌についてもメタン菌と同様の酵素活性測定法で調べ、抗酸菌のPIは、これまで考えられてきた合成経路ではなく、メタン菌と同様の経路で合成されることを明らかにした。

2. 方法

抗酸菌のホスファチジルイノシトール(PI)の生合成を非病原性の抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* の細胞壁または抗酸菌のホスファチジルイノシトールリン酸(PIP)合成酵素を発現させた大腸菌のホモジネートを酵素として調べた。これらの酵素を用いて、1L-[¹⁴C]イノシトール 1 リン酸または[³H]イノシトールを基質として、CDP-ジアシルグリセロール(CDP-DAG)と反応させ、脂質画分に取り込まれたアイソトープラベルを調べた。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 リン酸からメタン菌のホモジネートの上清を用いて、酵素反応により調製した。

3. 結果と考察

メタン菌の酵素活性測定法と同様に、CDP-DAG と [¹⁴C]イノシトール 1 リン酸を基質にして、*M. smegmatis* の細胞壁を酵素として反応させると、PIP と PI が生成された。これら 2 つの生成物は FAB-MS と TLC により同定した。さらに、*M. smegmatis* の細胞壁の酵素作用で PIP から PI が生成し、その逆反応は起こらないことを確認した。すなわち、抗酸菌では CDP-DAG とイノシトール 1 リン酸から PIP が生成し、これが脱リン酸化されて PI が生成する(図 1、実線矢印)。結核菌の PIP 合成酵素の塩基配列は、*Mycobacterium bovis* BCG のそれと全く同じである。BCG を含む 4 種の抗酸菌の PIP 合成酵素の遺伝子を大腸菌で発現させ、高い PIP 合成活性を検出した。他方、大腸菌の組換え体を酵素に使

うと、[³H]イノシトールは PI へ取り込まれなかった。

すなわち、結核菌を含む抗酸菌では、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。一方、ヒトでは、遊離のイノシトールが脂質成分に取り込まれるので PIP はできない。そこで、抗酸菌の中間体 PIP の合成酵素(図 1、A)を阻害する物質を見つけることができれば、ヒトには影響せず、結核菌を含む抗酸菌の生育を特異的に阻害できる選択毒性の高い薬剤の開発につながると考えられる。

4. 今後の展望

40年ぶりに、新規抗結核薬の開発が試みられ、臨床試験が行われている。しかし、これも基本的に、従来の抗結核薬と標的部点が同じである。我々が古細菌の脂質研究から発見したPI合成経路は、新規抗結核薬の開発に新たな視点を提供するものである。

ホスファチジルイノシトール (PI) は、真正細菌の中では、放線菌など抗酸菌類縁の限られた細菌のみに分布している。従って、ヒトだけでなく、生体に必要な常在細菌にも影響の少ない、抗酸菌及びその類縁病原性菌に特異的な薬剤を創薬できると期待される。現在、このアイデアに基づいて、結核菌PIP合成酵素の阻害物質のスクリーニング法を開発中である。

参考文献

- [1] Morita Y S, *et al.*: *Biochem. J.*, 378, 589-597 (2004)
- [2] Salman M, *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta*, 1463, 437-450 (1999)
- [3] Morii H, *et al.*: *J. Biol. Chem.*, 284, 30766-30774 (2009)

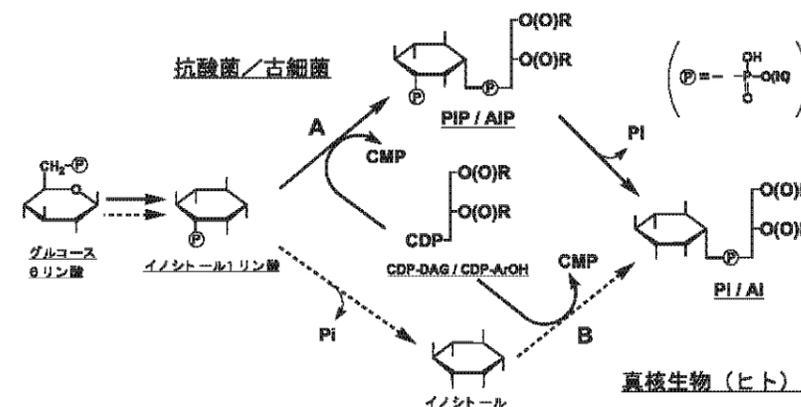


図 1. 抗酸菌、古細菌、真核生物の PI/AI の生合成経路
A, PIP 合成酵素(抗酸菌);
B, PI 合成酵素(ヒト).