

組換え酵素を用いた *Mycoplasma fermentans* 特異的糖脂質 Glycoglycerophospholipid の合成

学位論文内容の要旨

糖含有グリセリン脂質 Glycoglycerophospholipid (GGPL : GGPL-I, GGPL-III)は *Mycoplasma fermentans* に特異的な膜脂質である。古くから *M. fermentans* の関与が指摘されていた、関節リウマチ(RA)患者患部組織から GGPL 抗原が検出されたこと、炎症性サイトカイン放出活性があることが報告され、GGPL が RA の発症・病態進行に関与するという仮説が提唱されている。このことから、GGPL は RA の新規バイオマーカーやワクチン素材として期待されており、その安価な生産法の確立が求められている。

本研究では酵素生産に着目し、*M. fermentans* PG18 株(基準株)のゲノム解析に基づいて探索された GGPL 合成酵素候補遺伝子をクローニング、宿主に組換え酵素を生産させ、GGPL の合成を試みた。

ゲノム解析の結果、*Haemophilus influenzae* の LicD とアミノ酸配列での相同性が 23%である遺伝子 *mf1* (accession number AB457170) が得られた。LicD は細胞表面の LPS などの glycopolymer を生成する cholinephosphotransferase と推測されている。Mf1 と LicD super family タンパク質のアミノ酸配列を比較し、系統解析を行った結果、*H. influenzae* や *Mycoplasma* が属する Firmicutes の LicD に比べ、*Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC25586 (accession number NP_604143)と最も近いことが分かった。

以上のことから、Mf1 は cholinephosphotransferase であり、 α -glucopyranosyl-1,2-dipalmitoylglycerol または GGPL-II に CDP-choline の phosphocholine を転移することで GGPL-I および GGPL-III を生成すると考えられた。

さらに、*Borrelia burgdorferi* の glycosyltransferase とアミノ酸配列での相同性が 27%である遺伝子 *mf3* (accession number AB464840) が得られた。*B. burgdorferi* の glycosyltransferase は 1,2-diacylglycerol に UDP-galactose から galactose を転移することで monogalactosyl-diacylglycerol を生成することが報告されている。Mf3 と他の glycosyltransferase のアミノ酸配列を比較した結果、Mollicutes に属する *Acholeplasma laidlawii* の glycosyltransferase に比べ、*D. thermophilum*, *B. fragilis* の glycosyltransferase が最も Mf3 に近いことが分かった。

以上のことから、Mf3 は glycosyltransferase であり、1,2-dipalmitoylglycerol に UDP-glucose の glucose を転移することで α -glucopyranosyl 1,2-dipalmitoylglycerol を生成すると考えられた。

GGPL 生合成酵素の候補として探索された *mf1* および *mf3* を *M. fermentans* PG-18 からクローニングし、大腸菌を宿主とする発現ベクターを構築した。Mycoplasma のゲノムでは一般的には終止コドンである TGA がトリプトファンをコードしているため、異種発現させるためには一般的なトリプトファンコドン TGG に変換する必要があった。そこで *mf1*, *mf3* に含まれるそれぞれ 5 ヶ所の TGA コドンに対し、*DpnI* 法による点変異導入を行った。変異導入した遺伝子 *mf1w*, *mf3w* を発現させるベクター pDEST14*mf1w*, pDEST14*mf3w* を構築し、培養温度 30℃ の条件にて、目的タンパク質が可溶性タンパク質として良好に発現することが確認された。

Mf1 粗酵素を用いて GGPL の合成を試みた。反応産物の MS 解析の結果、GGPL-I に相当するイオン ($[M+H]^+$, m/z 896) が得られ、これを MS/MS 解析に供したところ、化学合成した GGPL-I と同様にコリン (m/z 104), ホスホコリン (m/z 184), グルコースが結合したホスホコリン (m/z 328) 等のプロダクトイオンが検出され、反応産物に検出されたイオン (m/z 896) が GGPL-I であることが示唆された。しかし、GGPL-III は生成されなかった。このことから、Mf1 は GGPL-I を特異的に生成する酵素であること、または大腸菌の細胞由来の夾雑物と非特異的な反応をしている可能性が考えられた。

Mf3 粗酵素を用いて、 α -glucopyranosyl-1,2-dipalmitoylglycerol の合成を試みた。反応産物の MS 解析の結果、 α -glucopyranosyl-1,2-dipalmitoylglycerol に相当するイオン ($[M+Na]^+$, m/z 753) が検出された。

さらに、1,2-dipalmitoylglycerol を基質として Mf3, Mf1 の連続反応により GGPL-I が生成されるかを確認した。反応産物の MS 解析の結果、GGPL-I に相当するイオン ($[M+H]^+$, m/z 896) が得られ、このイオンの MS/MS 解析の結果、化学合成した GGPL-I と同様に (m/z 896) からコリン (m/z 104), ホスホコリン (m/z 184), グルコースが結合したホスホコリン (m/z 328) 等のプロダクトイオンが検出された。このことから反応産物に検出されたイオン (m/z 896) が GGPL-I であることが示され、1,2-dipalmitoylglycerol から Mf3 および Mf1 の連続反応により GGPL-I が生成されたことが示唆された。

以上のことから、*M. fermentans* の GGPL-I 生合成経路では、Mf3 による 1,2-dipalmitoylglycerol への glucose 転移、および Mf1 による phosphocholine 転移により GGPL-I が生成されていることが示唆された。*M. fermentans* から *mf1* および *mf3* を欠損させることで実際に生合成に関与しているかを解析することが可能であると考えられる。

本研究では、*M. fermentans* PG-18 株のゲノム解析に基づいて探索された酵素遺伝子 *mf1* および *mf3* を、大腸菌を宿主として発現させることで、1,2-dipalmitoylglycerol からの GGPL-I の合成に成功した。また、*mf1* は既知の *Mycoplasma* 属細菌の遺伝子と相同性を持たないことから、GGPL-I が *M. fermentans* 特異的に存在することが、*mf1* をもつためであると示唆された。今後、酵素学的解析を行うことで効率的な GGPL-I 合成が可能となり、酵素による実生産法の確立が期待される。また、GGPL-III 合成酵素遺伝子の探索も待たれる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 野 行 蔵
副 査 教 授 田 村 具 博
副 査 准教授 曾 根 輝 雄
副 査 助 教 田 中 みち子

学 位 論 文 題 名

組換え酵素を用いた *Mycoplasma fermentans* 特異的糖脂質 Glycoglycerophospholipid の合成

本論文は本文 132 頁，図 46，表 8，4 章からなり，参考論文 1 編が付されている。

Glycoglycerophospholipid (GGPL : GGPL-I, GGPL-III)は *Mycoplasma fermentans* の特異的膜脂質である。関節リウマチ(RA)患者患部組織から検出されたこと，炎症性サイトカイン放出活性があることが報告され，RA の発症・病態進行に関与するという仮説が提唱されている。RA のバイオマーカーやワクチン素材としても期待されており，安価な生産法が求められている。本研究では酵素生産に着目し，*M. fermentans* PG18 株のゲノム解析に基づいて探索された GGPL 合成酵素候補遺伝子を用いて組換え酵素を生産し，GGPL の合成を試みた。

Haemophilus influenzae の LicD とアミノ酸配列相同性が 23%である *mf1* (accession number AB457170), *Borrelia burgdorferi* の glycosyltransferase とアミノ酸配列相同性が 27%である *mf3* (AB464840) が得られた。LicD は細胞表面の LPS など glycopolymer を生成する cholinephosphotransferase と推測されている。glycosyltransferase は 1,2-diacylglycerol に galactose を転移することで monogalactosyl-diacylglycerol を生成することが報告されている。Mf1 は α -glucopyranosyl-1,2-dipalmitoylglycerol または GGPL-II に phosphocholine を転移して GGPL-I および GGPL-III を，Mf3 は 1,2-dipalmitoylglycerol に glucose を転移して α -glucopyranosyl 1,2-dipalmitoylglycerol を生成すると予測した。

mf1, *mf3* を *M. fermentans* PG-18 からクローニングした。*Mycoplasma* のゲノムでは一般的には終止コドンである TGA がトリプトファンをコードしているため，*mf1*, *mf3* に含まれる各 5 ヶ所の TGA コドンに点変異導入を行った。この遺伝子を用いて発現ベクターを構築し，

可溶性タンパク質として良好に発現することを確認した。

Mf1 を用いて GGPL の合成を試みた。反応産物の MS 解析の結果、GGPL-I に相当するイオン($[M+H]^+$, m/z 896)が得られ、MS/MS 解析に供したところ、化学合成した GGPL-I と同様に コリン(m/z 104), ホスホコリン(m/z 184), グルコースが結合したホスホコリン(m/z 328)等のプロダクトイオンが検出され、GGPL-I であることが示唆された。しかし、GGPL-III は生成されなかった。このことから、Mf1 は GGPL-I を特異的に生成する酵素であることが示唆された。

Mf3 を用いて、 α -glucopyranosyl-1,2-dipalmitoylglycerol の合成を試みた。MS 解析の結果、目的産物に相当するイオン($[M+Na]^+$, m/z 753)が検出された。

さらに、1,2-dipalmitoylglycerol を基質として Mf3, Mf1 の連続反応により GGPL-I が生成されるかを確認した。MS, MSMS 解析の結果、GGPL-I であることが示唆された。よって 1,2-dipalmitoylglycerol から Mf3 および Mf1 の連続反応により GGPL-I が生成されたことが示された。

M. fermentans のゲノム解析に基づいて探索された *mf1* および *mf3* を発現させた酵素を用いて、1,2-dipalmitoylglycerol からの GGPL-I 合成に成功した。また、既知の *Mycoplasma* 属細菌の遺伝子と相同性を持たないことから、*mf1*, *mf3* をもつため GGPL が *M. fermentans* 特異的であると示唆された。

Mf3 精製酵素を用いて特性解析を行った結果、pH6.0 および 37℃が最適であり、鉄、亜鉛、銅、カドミウム、スズにより活性が著しく阻害された。

今後反応系の検討を行うことで効率的な GGPL-I 合成が可能となり、酵素による実生産法の確立が期待される。

これらの研究結果のうち、Mf1 については原著論文一報が英文学術誌 Current Microbiology 誌に受理された（掲載予定）。Mf3 については英文学術誌 Journal of Bioscience and Bioengineering 誌に投稿中である。また、Mf1 および Mf3 を用いて GGPL を製造する方法（特願 2008-235783）として特許出願を行った。

よって、審査員一同は、石田訓子が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。