

平成20年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「生体内微量物質 GGPL-Ⅲの発酵生産法および
高純度化法の開発」

研究開発成果等報告書

平成21年 3月

委託者 北海道経済産業局

委託先 北海道ティー・エル・オ一株式会社

目 次

第 1 章 研究開発の概要	
1 - 1 研究開発の背景・研究目的及び目標	3
1 - 2 研究体制	5
(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)	
1 - 3 成果概要	6
1 - 4 当該研究開発の連絡窓口	6
第 2 章 本論	
(1) G G P L III の生合成遺伝子のクローニングと発現ベクターへの組み換え	7
(2) 酵素活性の検定法の確立	1 1
(3) マイコプラズマの培養と細胞内容物の活性比較試験	1 6
(4) G G P L III の純度検定法の開発	1 8
(5) 抗原性および免疫活性の確認	1 9
(6) ワクチンとしての安全性試験の実施	2 0
(7) プロジェクトの管理運営	2 1
最終章 全体総括	2 1

第1章 研究開発の概要

本事業では、マイコプラズマ・ファーメンタンスの細胞膜を構成する糖リン脂質（Glyco Glycero Phospho Lipid、GGPL）を生合成することを目指した。GGPLは、関節リュウマチを引き起こす原因となる物質と予想する研究もある。自己免疫疾患の引き金物質との研究もある。もし、GGPLを高純度で取ることができると『ワクチン』および『診断薬』などの原料として医薬会社に販売することが考えられる。

マイコプラズマ・ファーメンタンスは、合成培地での培養は困難で、生育程度は低く、マイコプラズマ・ファーメンタンスを使用しての量産化は、困難である。そこで本事業では、解析されたマイコプラズマのゲノム情報から GGPL の生合成に関わる酵素群を想定し、遺伝子群をクローニングする。次に、クローニングした遺伝子のコドンが大腸菌型に遺伝子組換えし、その改変遺伝子を、大腸菌を宿主微生物として形質転換して酵素発現を行い、その酵素群を精製して、GGPL を酵素的に合成することを目指した。

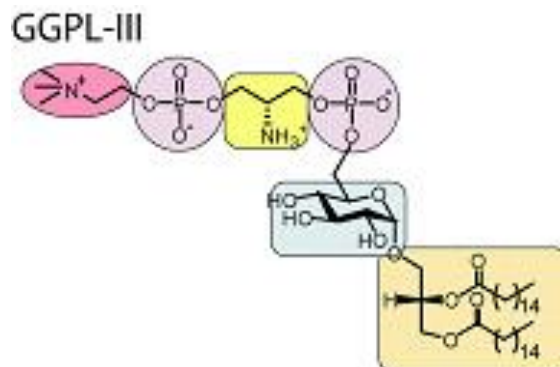
GGPL の合成に関すると考えられた遺伝子をクローニングした後、大腸菌型のコドンに改変して、大腸菌で発現させて、酵素反応を行った。その結果、GGPL の生合成に関与する酵素を2つ発見した。これらの酵素を働かせて、GGPL I の酵素的合成に成功した。GGPL には、I から III までの分子種が予想される。今回は、GGPL I の生合成は、成功したが、最終目的物である GGPL III の生合成にまでは至らなかった。

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

（研究の背景）

関節リュウマチ症の患者（32万人）の医療は、現在、根本治療法はなく、痛みに対する対症療法であり、根本治療法の開発が切望されている。一方、最近の遺伝子工学や免疫学などの進歩によってリュウマチ性疾患の原因の約40%はマイコプラズマ感染による免疫制御機構の破綻であることが明らかとなってきた。関節リュウマチは、発症までに長い進行期間という特異な性質を持ち、治療はもちろん進行中の患者（推定300万人）の早期発見（診断）が急務である。感染そのものを防ぐ、あるいは疾病を除去するために、『ワクチンを作る』ことと『感染診断薬を作る』ことが求められている。

そのためには、感染によって生ずる特異的物



質を認識することが必要である。その特異的物質としてマイコプラズマ・ファーメンタンス菌の細胞膜成分である糖リン脂質 (Glyco Glycero Phospho Lipid) GGPLⅢ (前頁の図) があげられる。これを高純度で生産することによって、『ワクチン』と『診断薬』の開発へと進むことができる。

(研究目的及び目標)

糖リン脂質なかでも GGPLⅢは、マイコプラズマ細菌の膜成分として存在する特異的な物質で、現状では、商品化はされていない。実験的に分離する方法として、マイコプラズマ細菌から抽出する方法および化学的に合成する方法がある。しかし、前者はマイコプラズマの生育度は低濃度であり、原料確保が難しいことに加えて不純物が多いために精製には手数を要する。後者は合成ステップが長く、収率はきわめて低い。いずれの方法でも GGPLⅢをもととしてワクチンや抗体製造を行うには、実用的ではなかった。

研究の具体的目標

① GGPIⅢの生合成遺伝子のクローニングと発現ベクターへの組換え

マイコプラズマのゲノム解析結果から GGPLⅢ合成に関与する遺伝子群を想定し、想定遺伝子群のクローニングを行う。クローニングした遺伝子のコドンマイコプラズマ型から大腸菌型に遺伝子を改変し、大腸菌用の発現ベクターへと組込む。目的タンパク質が発現したかどうかを確認し発現酵素を精製する。

② 酵素活性の検定法の確立

研究テーマ①で発現させた酵素が、目的の活性を持っているかを判定する方法を開発する。GGPLⅢ製造のための酵素反応では、コリンやリン酸塩、ガラクトース、ジアシルグリセロールなどを基質として用いて反応を行うが、反応生成物の検定が難しい。未知の酵素なので、今まで知られている類似した活性を持つ酵素の反応系を改変して、本事業の酵素活性の測定に使用できるかを検討する。

③ マイコプラズマの培養と細胞内容物の活性比較試験

マイコプラズマ・ファーメンタンスを培養して、細胞を集め、さらに細胞破碎を行って菌体内酵素をとりだす。マイコプラズマは、培養液での菌体濃度がきわめて低いために十分な菌体量を集められるように検討する。

④ GGPLⅢの純度検定法の開発

GGPLⅢの化学合成品を使って TOF/MS での感度の確認を行う。分子モデルの計算と合致するフラグメントが得られるか、またその感度はどれほどか、不純物と分けられるかを試験する。発酵産物の質を吟味する必要がある。GGPLⅢの生成では、そもそも立体異性体も多く、一方、発色基など持たないので、純度検定は難しい課題である。TOF/MS

や LC/MS を用いて、GGPLIII の検出条件を検討する。

⑤ 抗原性および免疫活性の確認

化学合成した GGPLIII を抗原として（現在手にはいるのは、高価であるが合成品しかない）モノクローナル抗体の作成を試みる。抗体が得られるかどうか、さらに抗体価はどれほどかを調べる。in vitro で抗マイコプラズマとしての活性があるかを試験し、潜伏期間中の治療薬となりうるかを調べる。ラビットおよびマウス動物試験の準備を開始する。

⑥ ワクチンとしての安全性試験の実施

化学合成した GGPLIII を用いて、実験動物に投与した時の症状観察や血液検査を行い、ショックを起こさないか、など、安全性について予備的な成績をえる。

⑦ プロジェクトの管理・運営

研究開発委員会を定期的で開催し、メンバー毎の研究の進捗状況を確認し、予算の執行状況等を管理するとともに、適宜各メンバーとの連携を密に、円滑な研究開発の進展を図る。研究開発の成果を取り纏め、成果報告書を作成する。

1-2 研究体制

（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者）

【事業管理者】

北海道ティー・エル・オー株式会社

① 管理員

氏名	所属・役職
末富 弘	常務取締役
大森 章	営業開発部長
笹山 亜紀	営業開発部プロジェクト担当
熊坂 克也	総務部総務経理課長
阿部 美菜	総務部総務経理担当

【再委託先】

有限会社 A-HITBIO

氏名	所属・役職
池田 順子	代表取締役社長
南田 公子	主任研究員
笹崎容子	研究員

国立大学法人 北海道大学

氏 名	所属・役職
浅野 行蔵	大学院農学研究院応用生命科学部門 分子生命科学分野応用菌学研究室 教授
曾根 輝雄	大学院農学研究院応用生命科学部門 分子生命科学分野応用菌学研究室 准教授
田中みち子	大学院農学研究院応用生命科学部門 分子生命科学分野応用菌学研究室 助手

エムバイオテック 株式会社

氏 名	所属・役職
松田 和洋	代表取締役 最高科学責任者
松田 幸枝	研究員

国立大学法人 岩手大学

氏 名	所属・役職
原澤 亮	農学部獣医学科・教授

1-3 成果概要

GGPL の合成に關すると考えられた遺伝子のうち2つをクローニングした後、大腸菌型のコドンに改変して、大腸菌で発現させて、酵素反応を行った。その結果、GGPL の生合成に關与する酵素を2つ発見した。これらの酵素を働かせて、GGPL I の酵素的合成に成功した。GGPL には、I からIIIまでの分子種が予想される。今回は、改変し大腸菌で発現させた2つの酵素によって GGPL I の酵素合成に世界で初めて成功させた。しかし、最終目的物である GGPLIII の生合成にまでは至らなかった。

酵素活性を確認した2つの遺伝子は、マイコプラズマ・ファーメンタンス菌に特異的な遺伝子であることも発見し、それぞれの遺伝子配列に若干の相違が存在し、相違と病原性の關係に着目された。GGPL I の酵素合成が成功したので、近近の方向性として GGPL I の医療用素材としての利用の条件を詰めて行く。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

(有) A-HITBio 池田順子 oishii@a-hitbio.com

第2章 本論

① GGPLの生合成遺伝子のクローニングと発現ベクターへの構築（北海道大学、有限会社 A-HITBio）

GGPLの側鎖に当たる

phosphatidylcholineの想定される生合成系は、右図に示した酵素の可能差異が高い。

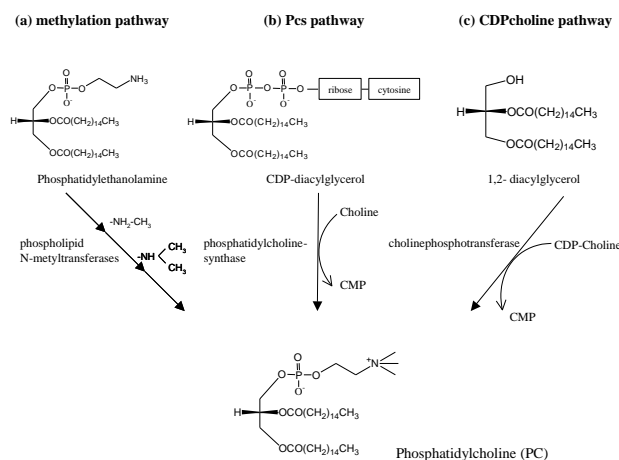


Fig. 2-2 Biosynthesis pathways of phosphatidylcholine

(a) methylation pathway; (b) Pcs pathway; (c) CDP-choline pathway

(1) GGPLs 生合成酵素をコードする2遺伝子の絞込み

マイコプラズマ・ファーメンタンス菌 PG18 株のゲノム配列 (AP009608) には 893 の遺伝子があることがわかっている。これらの遺伝子のアミノ酸配列を解析した結果、*Haemophilus influenzae* の LicD (P14184) とアミノ酸配列の相同性を持つ遺伝子 *mf1* (accession number AB457170) が得られた。LicD は CDP-choline からホスホコリン基を転移することで細胞表面の glycopolymer を生成すると推測されている。例えば、*H. influenzae* の Lipopolysaccharide, *Streptococcus pneumoniae* のリポテイコ酸などである。*H. influenzae* の *licD* と *mf1* のアミノ酸配列の相同性はアミノ酸残基の一致が 23%、類似残基を含めると 40%であった。

また、*Borrelia burgdorferi* の glucosyltransferase (NP_212588) と相同性をもつ *mf3* (accession number AB414840) が得られた。*B. burgdorferi* の glucosyltransferase は UDP-galactose から 1,2-diacylglycerol へ galactose を転移してモノガラクトシルジアシルグリセロールを生成することが報告されている (Ostberg *et al.*, 2007)。

また BLAST 検索の結果、マイコプラズマ属細菌のどの遺伝子とも相同性を持たないことが分かった。*mf1* が GGPL 合成遺伝子であれば、GGPL がマイコプラズマ・ファーメンタンス菌において特異的に合成されることは、マイコプラズマ・ファーメンタンス菌のみが *mf1* を持つためである可能性がある。

次に、*mf1* 産物である Mf1 と LicD superfamily に属する 10 タンパク質のアミノ酸配列を比較し、NJ 法にて系統樹を作成した。その結果、Mf1 は *H. influenzae* や Firmicutes に属する細菌 (*Streptococcus pneumoniae*, *S. agalactiae*, *Lactobacillus plantarum*,

Lactococcus lactis) の LicD に比べて *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC25586 (accession number NP_604143) と最も近いことが分かった(下図)。

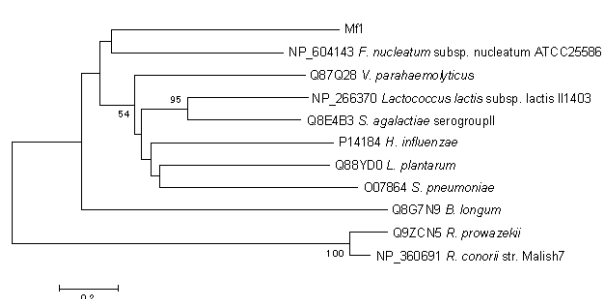


Fig. 23 Phylogenetic analysis of Mf1 and related proteins

The sequences used for the phylogenetic tree are Mf1, LicDs from *Streptococcus pneumoniae* (accession No. O07864), *Streptococcus agalactiae* serogroup III (Q8E4B3), *Lactobacillus plantarum* (Q88YD0), *Haemophilus influenzae* (P14184), *Vibrio parahaemolyticus* (Q87Q28), *Bifidobacterium longum* (Q8G7N9), *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC25586 (NP_604143), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II1403 (NP_266370) *Rickettsia prowazekii* (Q9ZCN5) and *Rickettsia conorii* str. Malish 7 (NP_360691). Numbers at nodes indicate bootstrap percentages over 50%.

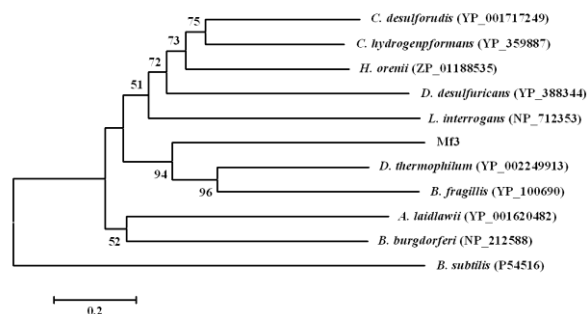


Fig. 24 Phylogenetic analysis of Mf3 and related proteins

The sequences used for the phylogenetic tree are Mf3, glycosyltransferase from *Dictyoglomus thermophilum* (accession number YP_002249913), *Bacteroides fragilis* YCH46 (YP_100690), *Candidatus Desulfuridus audaxviator* MP104C (YP001717249), *Leptospira interrogans serovar Lai* str. 56601 (NP112353), *Halothermothrix orenii* H 168 (ZP_01188535), *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* str. G20 (YP_388344), *Carboxydotiethium hydrogeniformans* Z-2901 (YP_359887), *Acholeplasma laidlawii* (YP_001620482) and *Bacillus subtilis* (P54516). Numbers at nodes indicate bootstrap percentages over 50%.

M1	1	-I I K T M N E K Q T K V Y E I L K E F T E I C N K H N L D Y C A M Y G T A L G A I R H N G F I P W D D D I D L L I S I	59
P14184	1	M K K L T L R E Q Q L V L C N I L D Y F H A L C E R Y K I S Y S L G G T L I G A I R H K G F I P W D D D I D V Y M H R	60
M1	60	E T Y K - F L K E N Y R N L I V D W E T G N S F L M F P K F S - - - - - K D K D S Q K D V T E L D I F I	105
P14184	61	D E Y Q R F V D V W F Q E T H E H Y N M E T A E D I L A Q Y T G E M A K I F D C R T Q I T D A K G R K S P M F M D I F I	120
M1	106	D - - I P T T K K R I K K Y L S L K N K L G Y L N A Y S Q R K F F D I Q W G - M K I A K V L L F W T R M F K K P N Y Q K	162
P14184	121	Y D G V P N E P K I I Y P L M K K H R R I K L R F S S C K R W L R A K E N T V Q K A I L N K L S H F L E S K M Q K N L	180
M1	163	A L E T L Y E P N S N I H V I N W P F K K A T K I N I Y E N I N F F D - T I D V K F E D I K I R V P K N Y E T I F L Q	221
P14184	181	A Q F Q I K Y P I K Q C D Y I G L V L S D Y G G W Q K S Y M P K E Y F N H V I Y K E F E G R Q F Q V M N G Y H E H L T Q	240
M1	222	N Y G P N W R I P K K Y K M S E H L G M Y D M K V F C K K E R A K K N D K	258
P14184	241	Y Y G D Y M K L P P E E D Q K P H - I Q E A Y I L - - - - -	265

(2) glucosyltransferase と相同性をもつ *mf3*

B. burgdorferi の glycosyltransferase と *mf3* のアミノ酸配列の相同性はアミノ酸残基の一致が 27%、類似残基を含めると 48%であった。*mf3* の ORF は 1221 bp であり、406 のアミノ酸をコードしていると推定された。また、5ヶ所の TGA opal コドンを含むことが分かった。TGA をトリプトファンとして翻訳したアミノ酸配列を用いて疎水性領域を推測したところ疎水性領域は無かった。このことから、*mf3* は膜タンパク質ではなく可溶性タンパク質であることが示唆された。G+C 含量は 24.4% であり、マイコプラズマ属細菌の一般的な遺伝子の G+C 含量の範囲に含まれることがわかった。*mf3* のアミノ酸配列を用いて BLAST 検索を行った。その結果得られたタンパク質の配列を用いて、NJ 法による系統

樹を作成した(上図)。 *Mollicutes* に属し、マイコプラズマ属に近い *Acholeplasma laidlawii* の glycosyltransferase に比べ、 *D. thermophilum* と *B. fragillis* の glycosyltransferase が最も Mf3 に近いことが分かった。また、ドメイン検索により glycosyltransferase GTB type Super-family (cl10013) が得られたが、特異的なドメインは存在しなかった。

以上のことから、 *mf3* は 1,2-dipalmitoylglycerol に UDP-glucose から glucose を転移し、 glucopyranosyl 1,2-dipalmitoylglycerol を生成すると考えられた。

また、GGPLII を基質として *mf1* がホスホコリンを転移することで GGPLIII を生成すると考えられたが、GGPLII がどのように生成されるかは推定できなかった。

(3) *mf1* 遺伝子を組み込んだエントリークローンの作成

2つの酵素遺伝子 *mf1* と *mf3* について大腸菌で使われているコドンに系偏した。それぞれ3カ所、5カ所の塩基配列を交換した(右図)。

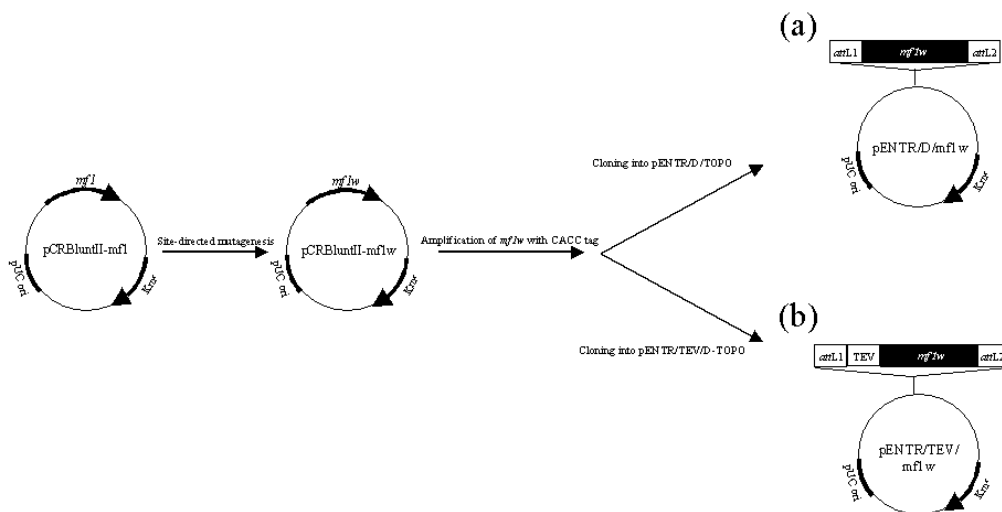


Fig. 3-3 Construction of gateway entry clones. (a) construction of pENTR/D/mf1w ;(b) construction of pENTR/TEV/mf1w. The *mf1w* gene is mutated from *mf1*. Km^r is kanamycin resistant gene.

(4) 発現クローンの構築

pENTR/Dmf1w および pENTR/TEV/mf1w を用いて発現クローンを構築した。構築手順を Fig. 3-4 に示した。発現ベクターは、pET160DEST,

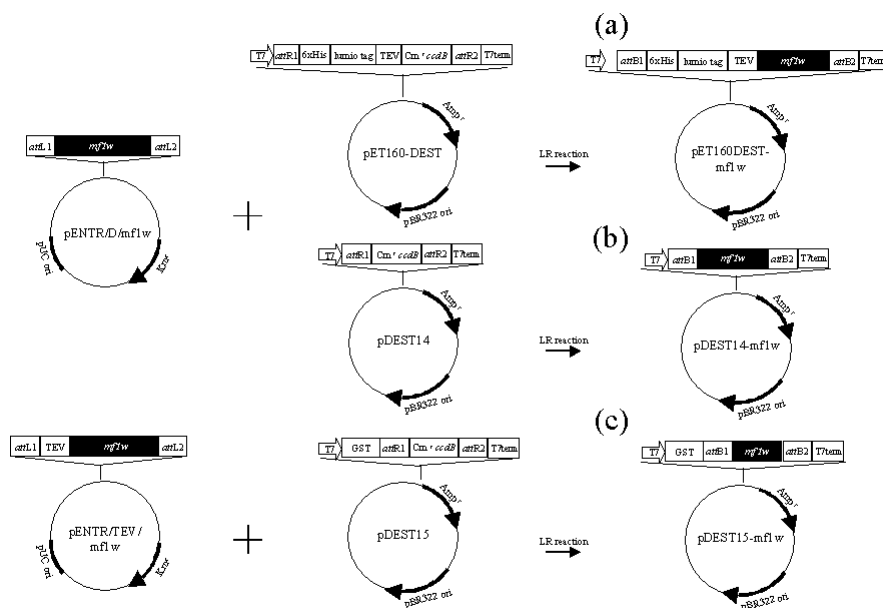


Fig. 5 Construction of destination clones for *mf1w* expression. (a) pET160DEST-mf1w; (b) pDEST14-mf1w; (c) pDEST15-mf1w.

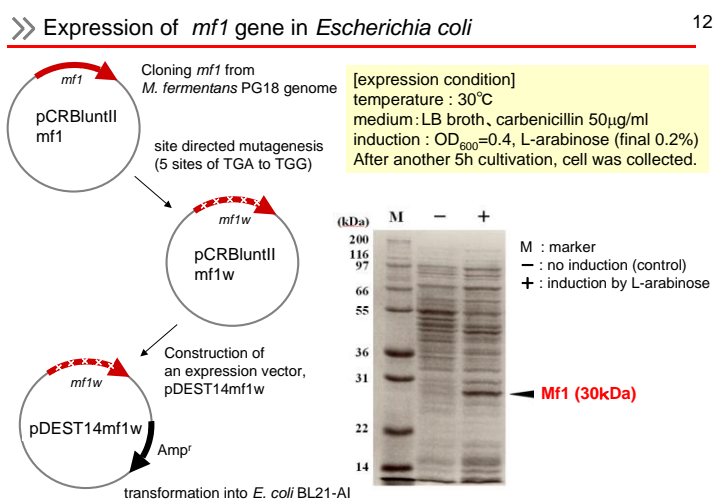
pDEST14, pDEST15 の 3 種を用いた。pET160DEST は、発現タンパクの N 末端に 6xHis タグ、lumio タグ、TEV 認識部位を付加する。pDEST14 はタグを付加しないベクターである。pET160DESTp および pDEST14 への *mf1w* 導入には pENTR/Dmf1w を用いた。pDEST15 は発現タンパクの N 末端に Glutathione S-transferase (GST) タグを付加するが、pDEST15 は GST を切断するためのプロテアーゼ認識部位を持たないため、pDEST15 は *mf1w* に TEV 認識部位を付加して発現ベクターへ *mf1w* を組換えることが必要である。

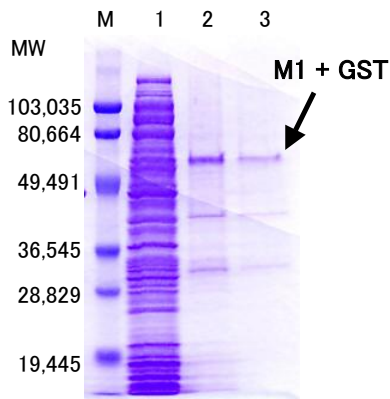
(5) 大腸菌における *mf1* 遺伝子の発現

タンパク質発現の宿主として *Escherichia coli* BL21(DE3)、*E. coli* BL21-AI、*E. coli* Rosetta 2 を用いた。培養は LB 培地で行った。抗生物質は *E. coli* BL21(DE3) および BL21-AI の培養には Carbenicillin、Rosetta2 の培養には Carbenicillin および Chloramphenicol を添加した。培養後、得られた上清を可溶性画分とした。沈殿に 15 μ l の 8 M 尿素溶液を加え、溶解したものを不溶性画分とした。その結果、不溶性画分には予想サイズ (Mf1 が 31 kDa、タグ部位 4 kDa をあわせて 35 kDa) と同じ大きさのバンドが確認されたが、可溶性画分には確認されなかった (Fig. 3-5 (B))。このことから生成された目的タンパク質 Mf1 が不溶性の凝集体となっていることが示唆された。その結果、不溶性画分には予想サイズ (Mf1 が 31 kDa、タグ部位 4 kDa をあわせて 35 kDa) と同じ大きさのバンドが確認されたが、可溶性画分には確認されなかった。このことから生成された目的タンパク質 Mf1 が不溶性の凝集体となっていることが示唆された。発現量が少ないことがわかった。このことから、*mf1w* には適していないことがわかった。

(6) pDEST15mf1w を用いた *mf1w* の発現

pDEST15mf1w は *mf1w* を誘導する際、L-arabinose を使用する。IPTG とは異なり、誘導剤非存在下では基底レベルの発現はおこらない。また、GST-Mf1 の融合タンパク質として生成され、アフィニティカラムを用いた精製が容易である。*E. coli* BL21-AI/pDEST15mf1w を培養温度 37°C にて *mf1w* の発現を行った。培養 1.25 時間後 OD₆₀₀ が 0.4 に達し、L-arabinose を終濃度 0.2% となるよう添加した。L-arabinose を添加しない場合に比べ、添加すると生育が抑制された。(左図)





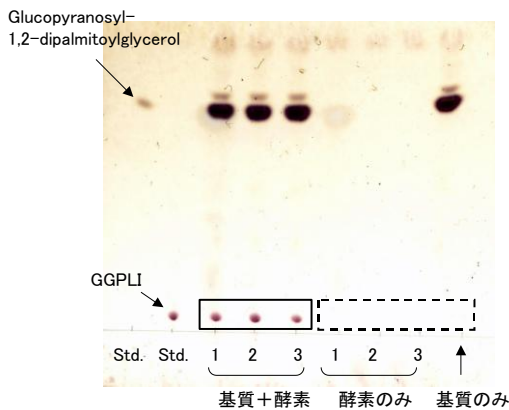
M: マーカー, 1: 粗酵素液,
2: GSTrap HP 後, 3: HiTrap Q XL 後

各精製ステップのタンパク溶液の
SDS-PAGE

発現させた Mf1 タンパク質をカラムクロマトグラフィーで精製を進めた。左図は、GST タグを融合した発現タンパクの例を左図に示したが、目的タンパク質は、36 倍の純度向上が、可能となった。

② 酵素活性の検定法の確立 (有限会社 A-HITBio)

(1) *mf1* の cholinephosphotransferase 活性測定



Std.: スタンダード, 1: 粗酵素液,
2: GSTrap HP 後, 3: HiTrap Q XL 後

各精製ステップの
M1 酵素反応生成物のTLC 解析

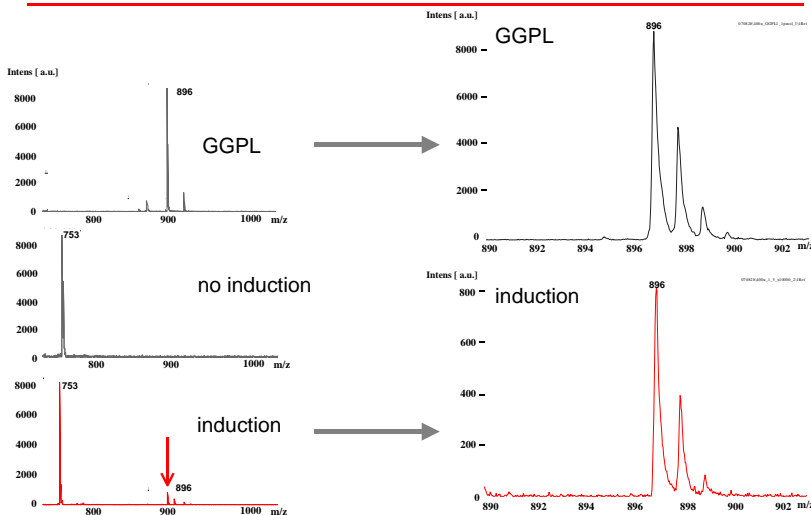
発現した酵素の活性を調べた。

粗酵素液とした *E. coli* BL21-AI/pDEST14mf1w から調製した粗酵素を用いて反応を行った。反応液の組成は、50 mM Tris-HCl (pH8.0)、10 mM MgCl₂、1 mM CDP-choline、1 mM UDP-glucose、6 mM

α -glucopyranosyl-1,2-dipalmitoylglycerol、および Mf1 粗酵素 400 μ g を混合して 100 μ l とし、37 $^{\circ}$ C、16 時間反応を行った。反応後、クロロホルム・メタノール (2:1) 溶液を 400 μ l 添加し、10 秒間激しく攪拌した。この混合液を 4 $^{\circ}$ C、15,000g、

» Analysis of Mf1 reaction product by MALDI-TOFMS

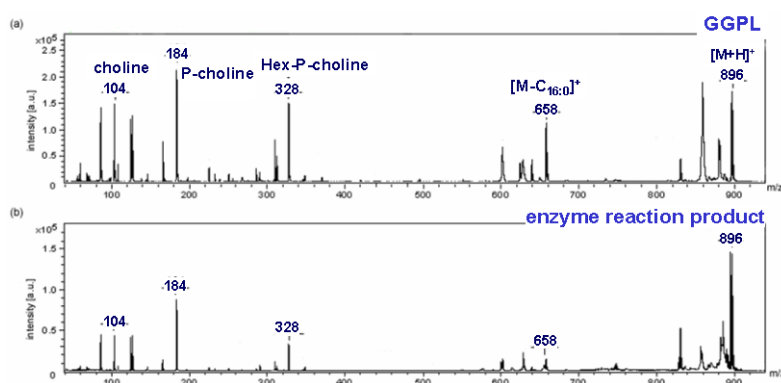
14



5 分間遠心分離をし、クロロホルム・メタノール層を回収した。回収したクロロホルム・メタノール層を乾固し、TLC および質量分析に供した。TLC を用いても酵素生成物が明確に見ることが出来る。さらに、質量分析によって、分子種としても目的の GGPL が精製していることを確認できた。

GGPL I と酵素反応産物中のイオン(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)といった同様のプロダクトイオンが検出された。

>> Analysis of Mf1 reaction product by MSMS

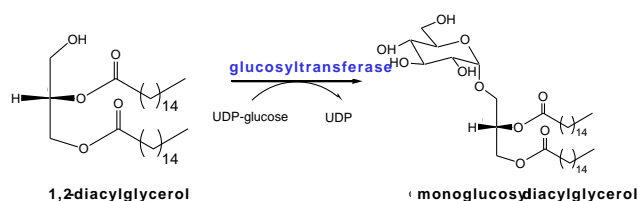


GGPL was synthesized from glucopyranosyl dipalmitoylglycerol and CDP-choline.

をアプライしターゲット上で混合、自然乾燥させた。マトリックス溶液は以下のように調製した。2,5-dihydroxy-benzonic acid (2,5-DHB) 2.5mg を 990ml のメタノールで溶解し、これを DHB 溶液とした。次に sodium trifluoroacetate (TFA-Na) 1.25mg を 1 ml のメタノールで溶解し、これを TFA-Na 溶液とした。TFA-Na 溶液 10ml を DHB 溶液 990ml に加え、マトリックス溶液として使用した。分析の結果、GGPL III に相当するイオン([M+H]⁺, m/z 1049)が得られた。一方、コントロールおよび誘導処理した菌体から調製した Mf1 粗酵素の反応産物には GGPL III に相当するイオンが検出されなかった。このことから、反応により GGPL III が生成されていないことが分かった。

(2) Glycosyltransferase *mf3* 遺伝子

>> Is glucosyltransferase an upstream enzyme in GGPL biosynthesis ?



1,2-diacylglycerol 3-glucosyltransferase of the other bacteria

- *Bacillus subtilis* mono, di-, tri-, tetraglucosyl diacylglycerol
- *Acholeplasma laidlawii* : monoglucosyl diacylglycerol (related species of *Mycoplasma*)

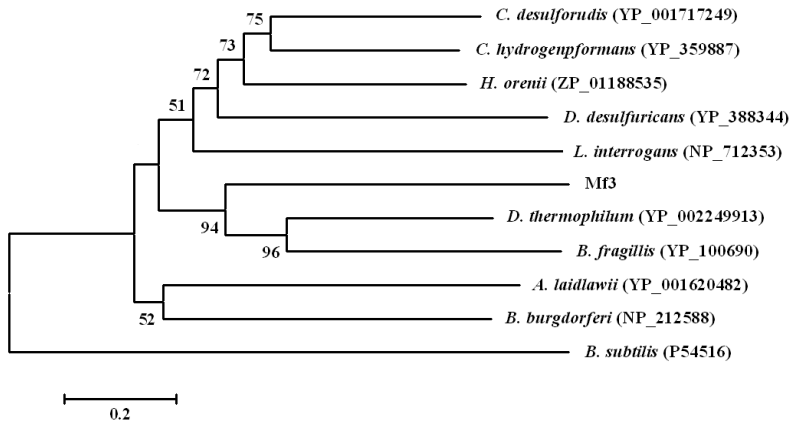
15

TOF/MS 分析は、エムバイオテック社で行い Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA) を用いて行った。乾固させた試料を 500 ml のクロロホルム・メタノール溶液(2:1)で溶解後、メタノールで 100 倍に希釈した。希釈試料 1 ml をターゲットプレートにアプライした。同ターゲット上にマトリックス溶液 1 ml

B. burgdorferi の

glycosyltransferase と *mf3* のアミノ酸配列の相同性はアミノ酸残基の一致が 27%、類似残基を含めると 48%であった。*mf3* の ORF は 1221 bp であり、406 のアミノ酸をコード

していると推定された。また、5ヶ所の TGA opal コドンを含むことが分かった。TGA をトリプトファンとして翻訳したアミノ酸配列を用いて疎水性領域を推測したところ疎水性領域は無かった。このことから、*mf3* は膜タンパク質ではなく可溶性タンパク質であることが示唆された。

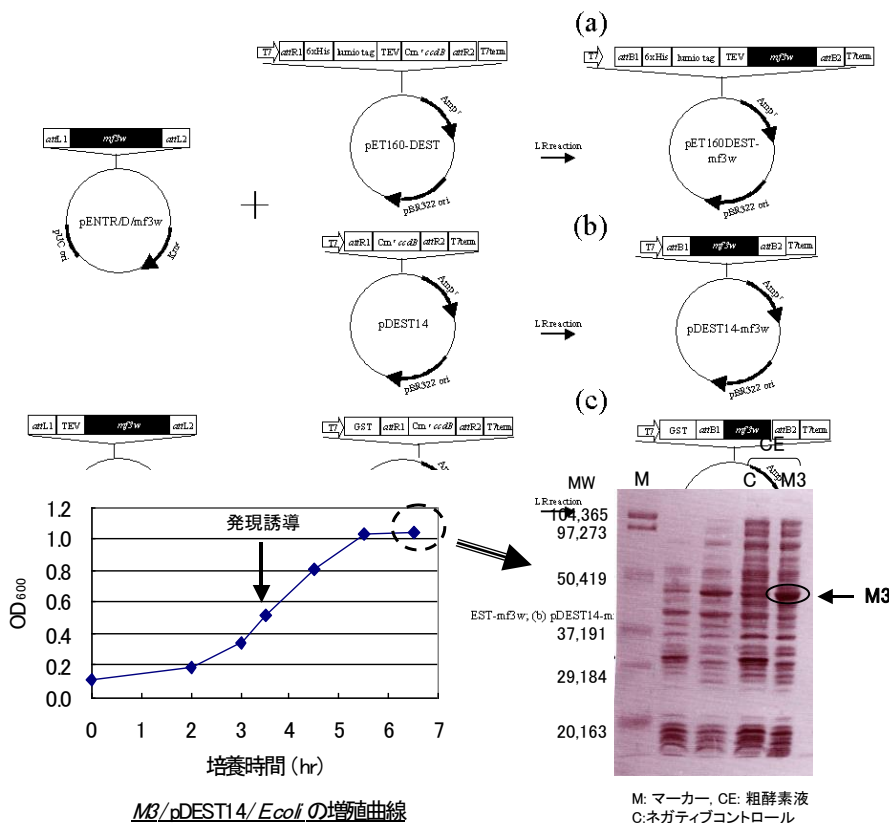


G+C 含量は 24.4% であり、マイコプラズマ属細菌の一般的な遺伝子の G+C 含量の範囲に含まれることがわかった。*mf3* のアミノ酸配列を用いて BLAST 検索を行った。その結果得られたタンパク質の配列を用いて、NJ 法による系統樹を作成した(上図)。

Mollicutes に属し、マイコプラズマ属に近い *Acholeplasma laidlawii* の glycosyltransferase に比べ、*D. thermophilum* と *B. fragillis* の glycosyltransferase が最も Mf3 に近いことが分かった。また、ドメイン検索により glycosyltransferase GTB type Super-family (cl10013) が得られたが、特異的なドメインは存在しなかった。

以上のことから、*mf3* は 1,2-dipalmitoylglycerol に UDP-glucose から glucose を転移し、glucopyranosyl 1,2-dipalmitoylglycerol を生成すると考えられた。

mf3 遺伝子のクローニングおよび大腸菌を宿主とした種々の発現ベクターを構築した



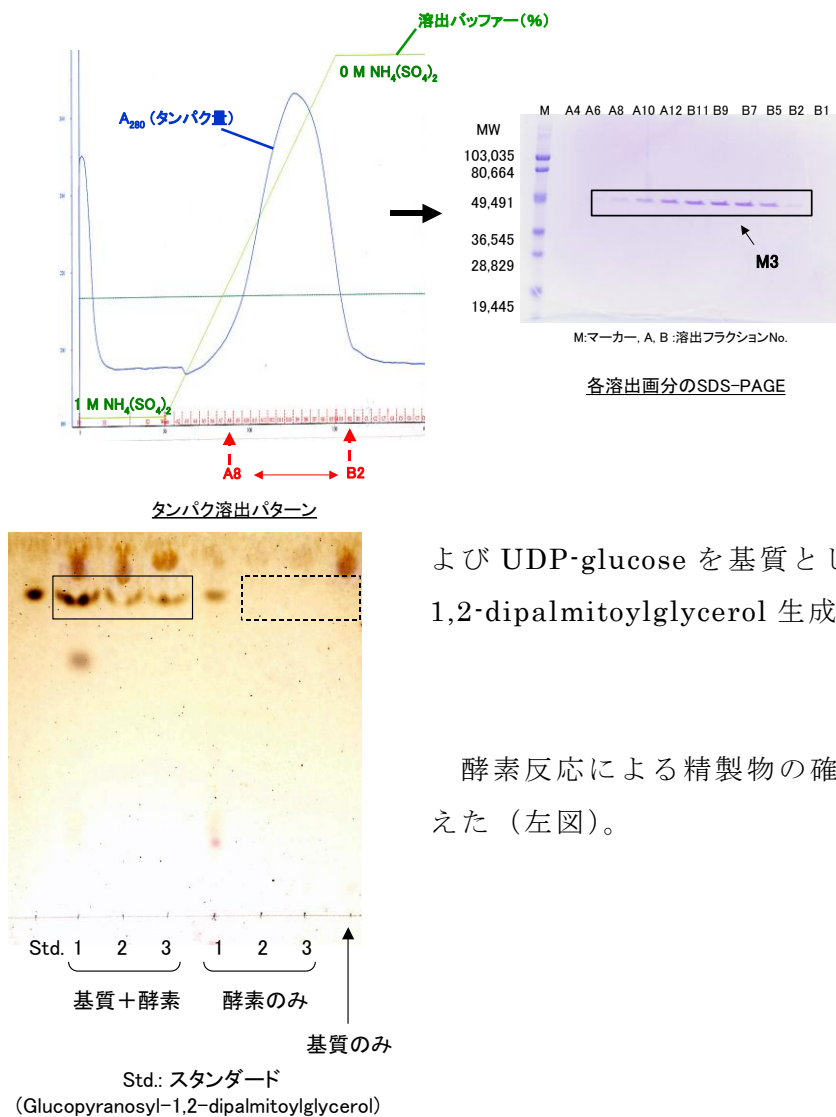
(左図)。次に構築された発現ベクターを宿主大腸菌に形質転換し、最適発現条件、および最適宿主ベクター系を検討した。

発現ベクター

pDEST14mf3w を用いて Mf3 タンパク質は、旺盛に発現した(次図)。

M3/ pDEST14/ *E. coli* の粗酵素液の SDS-PAGE

本条件では、目的外のタンパク質の濃度も、比較して濃度が高い事も解る。



次にカラムクロマトグラフィーによって Mf3 タンパク質の精製を行い、2ステップの精製で、ほぼ純粋品を得ることができた(左図)。

発見させた *mf3* タンパク質粗酵素を用いて

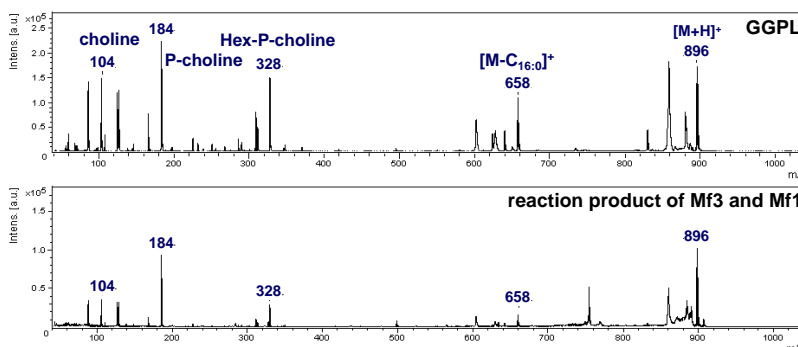
1,2-dipalmitoylglycerol および UDP-glucose を基質として glucopyranosyl 1,2-dipalmitoylglycerol 生成反応を行った。

酵素反応による精製物の確認は、TLC によってもおこなえた(左図)。

各精製ステップの M3 酵素反応生成物のTLC解析

さらに確かめるために TOF/MS によって、分子量、分子開列による確認を行った(下図)。

Analysis of Mf3 and Mf1 reaction products by MSMS 26

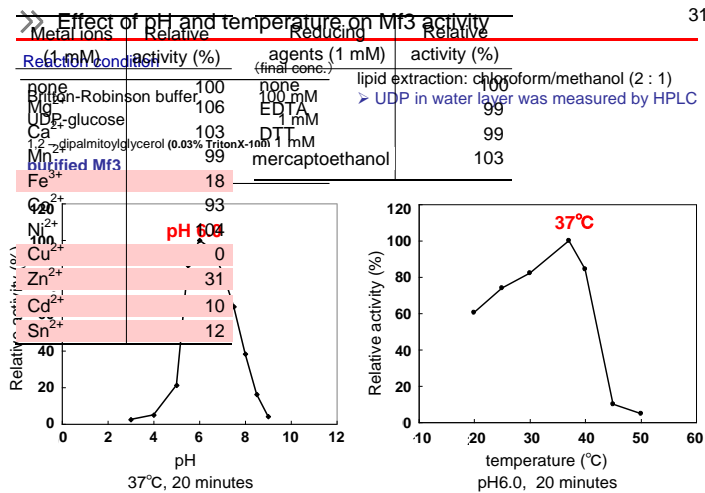


GGPL was synthesized from DPG, UDP-glucose and CDP-choline.

TLC の解析および質量分析により、精製された *mf3* は、1,2-Dipalmitoylglycerol から Glucopyranosyl-1,2-dipalmitoylglycerol を生成することが分かった。

(3) 酵素学的性質の試験

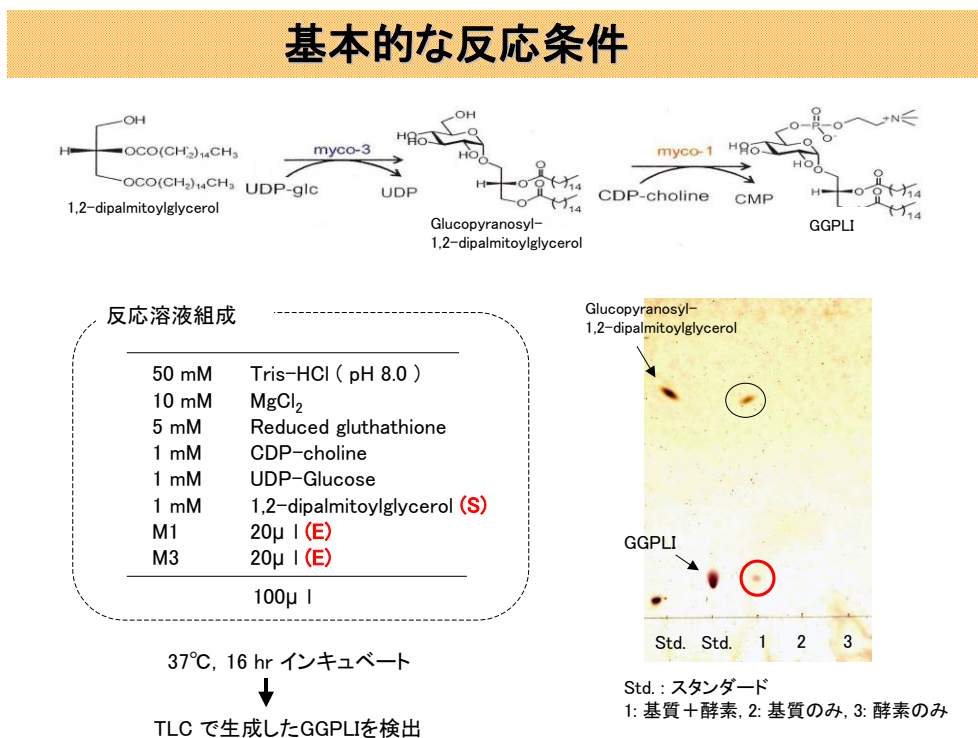
mf3 酵素の至適 pH および温度を調べた。下記のように pH6 に鋭いピークを持った性質を示し、反応系を pH6 に保つことが重要であることが解った。



反応系の金属イオンによる影響を調べたところ、銅、亜鉛、カドミウム、セレン、鉄などによって強く阻害されることも判った（上表）。

(4) *mf3* および *mf1* 酵素を同時に入れての反応試験

次に *mf3* および *mf1* 酵素を同時に入れて反応を行った（次図）。



反応は、速やかに進行して、GGPL I を製造することができた。

さらに、反応条件の改良方法として、TritonX100 などの界面活性剤を入れて、基質がより解け合って反応性が向上する氏試験を行ったところ反応性は、向上した。これは、基質が、疎水性であるため、界面活性剤のミセル化作用によって基質と酵素の接触のチャンスが増大したためだと考えられる。

③ マイコプラズマの GGPL 生合成遺伝子の比較試験 (岩手大学)

2つの遺伝子およびもう一つの遺伝子の存在をコレクションしている、あるいは入手可能な他のマイコプラズマ株で調べ、これら3つの遺伝子が、マイコプラズマ・ファーメンタンスに特異的かどうかを遺伝子解析法を用いて調べる。マイコプラズマ・ファーメンタンスの病気との関係を裏付ける情報となりうる。

phosphocholine 含有 glycolipid がすべてのマイコプラズマ・ファーメンタンス菌株に存在したと Ben-Menachem ら (FEMS Microbiol. Lett. **199**: 137-1412001.)が、既に報告している。GGPL が、関節リュウマチ炎などの病気の起因物質であるというなら、それを産生する微生物が、特定の病原性微生物である可能性がある。本項では、生合成遺伝子の存在について、本事業で明らかとなった GGPL I を合成できた2つの酵素遺伝子 Mf1 と Mf3 について、種々のマイコプラズマ属微生物についてその存在を調べた。

使用したマイコプラズマ属菌は、各国の臨床分離された株も含めたマイコプラズマ・ファーメンタンス 20 株であり、株名 KL4, KL8 は、関節リュウマチ患者からの分離株、GIM は、ヒト関節からの分離株、E10, K7, Z62 は白血病患者の骨髄からの分離株、BRO はヒト尿道からの分離株、#5, #29 は AIDS 患者の尿沈殿物からの分離株、AOU は AIDS 患者血液からの分離株、M39, M51, M52 M64, M70, M73 はヒト呼吸器からの分離株、2059, 28AC, A6 および C5 は細胞培養汚染株として分離された株である。加えて、他の種のマイコプラズマ属菌 *M. genitalium* G37, *M. pneumoniae* Mac, *M. pneumoniae* FH, *M. penetrans*, *M. orale*, *M. buccale* CH20247, *M. primum* HRC92, および *M. hominis* PG21 を供試菌として用いた。いずれも、国立感染症研の供与株である。

それぞれの遺伝子の検索には、プライマーとして下記のセットを用いた。

primers

mf1F (5'-ATAATAAAACTATGAATGA-3'),

mf1R (5'-CTATTTGTCATTTTCTT-3'),

mf3F (5'-ATGATATGAAAGTTTTTTGTAAAAAAGAAAGG-3'),

mf3R (5'-TTATTTTTTATAATGTTCAATAATTTTTTTTGTATTT-3'),
MCGpF (5'-ACACCATGGGAGCTGGTAAT-3') and
MCGpR (5'-CTTC A/T TCGACTT T/C CAGACCCAAGGCAT-3').

その結果、調べたマイコプラズマ属菌の中で、マイコプラズマ・ファーメンタンス以外の株においては、*mf1* と *mf3* 遺伝子のいずれも PCR での増幅は見られず、両遺伝子が存在しないか、存在したとしても大きく配列が異なっていると判定された。

一方、マイコプラズマ・ファーメンタンスに属する 20 株においては、いずれの株でも *mf1* 遺伝子の PCR 増幅産物は、明確に現れた。マイコプラズマ・ファーメンタンスにおいては、*mf1* 遺伝子がいずれも存在しているといえる。しかもその配列は、極めて似かよっていた。それら 20 株の *mf1* 遺伝子の全配列を決めて相同性を調べてみると、4 つのパターンしかなかった (下図)。即ち、関節リュウマチ患者から分離された株も含めて調べた 16 株が同一の塩基配列であった下図の一番下の段に示した配列でありパターン D とした。本事業で用いた基準株である PG18 は、M39 株とともにパターン A としたが、D とは 8 カ所の違いがあった。

PG18 and M39	61-TYKFLKENYRNLIVDWETGNSFLMFPKFSKDKDSQKDVTF-100	201-AAATTACAGAAATTTAATTGTAGACTGAGAAACACCAAC-240	291-TGCAACTTTT-300
M52	61-TYKFLKENYRNLIVDWETGNSFLMFPKFSKDKDSQKDATF-100	201-AAATTACAGAAATTTAATTGTAGACTGAGAAACACCAAC-240	291-TGCAACTTTT-300
#5	61-TYKFLKENYRNLIVDWETGNSFLMFPKFSKDKDSQKDATF-100	201-AAATTACAGAAATTTAATTGTAGATTGAGAAACACCAAC-240	291-TGCAACTTTT-300
Other Strains	61-TYKFLKENYRNLIVDWETGNSFLMFPKFSKDKDSQKDATF-100	201-AAATTACAGAAATTTAATTGTAGATTGAGAAACACCAAC-240	291-TGCAACTTTT-300

Fig. 1. The part of *mf1* posttranslational amino-acid sequence data of *M. fermentans* PG18 reference strain and 20 strains tested.

mf3 遺伝子に関しては、M64 株および M73 株で、PCR 増幅産物は見られなかったが、他の *M. fermentans* 株においては、いずれもはっきりした PCR 増幅産物が観察され、しかもそれらの塩基配列は、全く同様であった。

これらの結果から、Mf1 遺伝子の相違および *mf3* 遺伝子の有無によって、糖リン脂質の量や組成の違いに興味を持たれるとともに病原性の相違があるのかに興味を持たれる。

Tableb . Origin of *M. fermentans* strains and *mf1*, *mf3*, *MCGp* sequence type and PCR type based on the major part of the IS1550 element.

Origin	Strain	Year of isolation	<i>mf1</i> sequence	<i>mf3</i> sequence	<i>MCGp</i> sequence	IS1550 PCR type (1)
Genital ulcer	PG18 ^T	1955	A	+		B
Rheumatoid arthritis	KL4	1990	D	+		A
	KL8	1990	D	+		B
Joint fluid	GIM	1995	D	+		A
Leukemic bone marrow	E10	1960-1969	D	+		A
	K7	1960-1969	D	+		A
	Z62	1960-1969	D	+		A
Urethral isolate	BRO	1990	D	+		A
AIDS patients	#5	1995	C	+		B
	#29	1995	D	+		B
urine	AOU	1990	D	+		A
urine	M39	1990-1995	A	+		B
blood	M51	1990-1995	D	+		B
Respiratory tract	M52	1990-1995	B	+		B
	M64	1990-1995	D	-		B
	M70	1990-1995	D	+		B
	M73	1990-1995	D	-		B
	A6	1982-1992	D	+		B
	C5	1982-1992	D	+		B
Cell culture	2059	1982-1992	D	+		A
	28AC	1982-1992	D	+		B

④ GGPL の純度検定法の開発 (エムバイオテック株式会社)

GGPL を医療品材料として利用するためには、化合物の純度が問題となる。平成 19 年度までに光散乱検出器を用いた方法で、40 倍感度を向上して検出に成功している。平成 20 年度は、分析条件をさらに検討するとともに、GGPL 合成を担う酵素の反応生成物中の不純物などについて光散乱検出器を用いて検討する。

GGPLⅢは脂溶性の脂質部位と極性の強い糖、リン酸基、アミノ基をもつ特異な構造を有し、かつ分子量が1000以上あるためガスクロでの分析は困難と考えられる。また、サンプル量も少ないためGPC等、多量のサンプルを要する分析も難しいことから、平成19年度はHPLCでの分離をさらに検討した。GGPLⅢはその構造上、カルボキシル基は有するものの紫外線吸収は弱いため、検出器として光散乱検出器(ELSD)とELSDと紫外線吸収検出器(UV)を用いて検討を行った。HPLCカラム、溶離液組成、温度等について種々の検討を行い、分離条件を開発し結果を下図に示した。

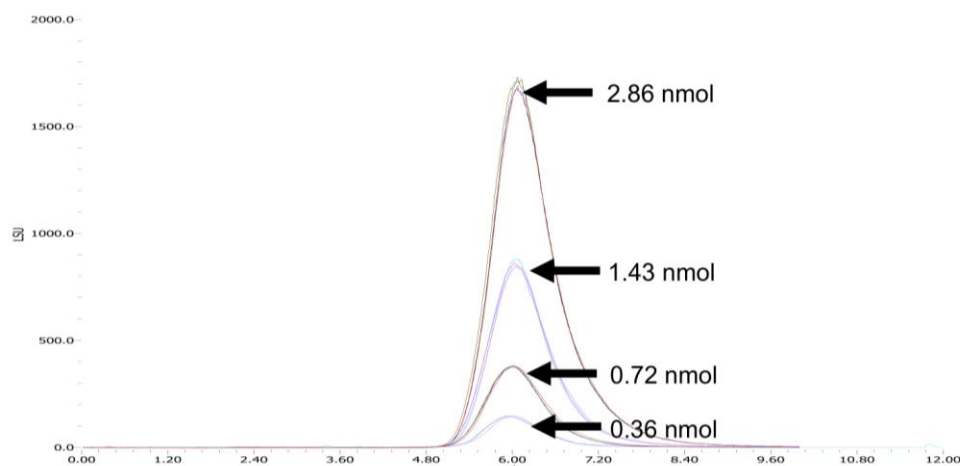


図 標準品 GGPLIII の HPLC 分析 (ELSD)

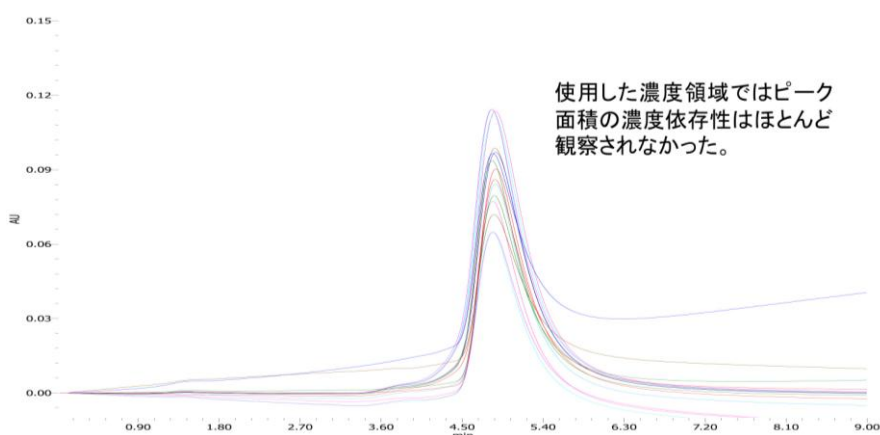


図 標準品 GGPLIII の HPLC 分析 (UV)

< H P L C 測定条件 >

カラム : Waters C4 1.0 X 150 mm、移動層 : 100% メタノール、注入量 : 5 μ l

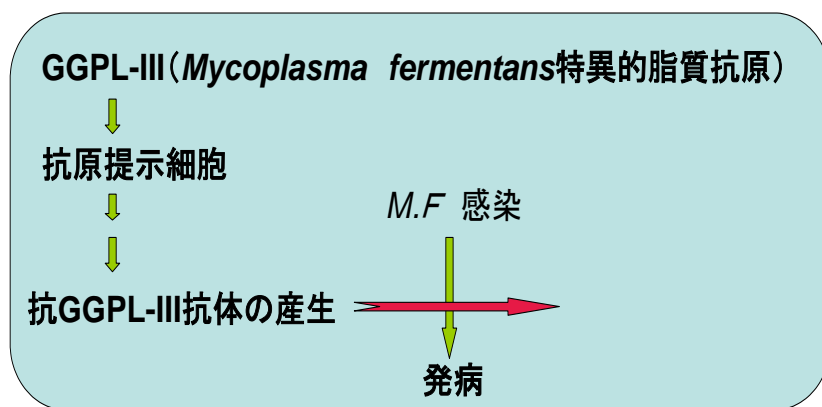
流量 : 0.05 ml/min、温度 : 40 $^{\circ}$ C (内部、外部)、検出器 : ELSD、UV (215nm)

各 GGPLIII 濃度とそのピーク面積の関係をグラフにプロットした結果、GGPLIII 濃度依存的にピーク面積が増大し検量線の作成ができた。ELSD において、そのピーク面積のダイナミックレンジが広いことから、GGPL-III を HPLC 分析で検出するには、ELSD が適当であると考えられる。

⑤ 抗原性及び免疫活性の確認 (ワクチンとしての有用性の確認) (エムバイオテック株式会社)

GGPLIII は、マイコプラズマ・ファーメンタンスに特異的に存在する脂質抗原である。松田らは、既に、マイコプラズマ・ファーメンタンス菌体から抽出し、GGPLIII を主成分とした脂質精製物でマウスを免疫したときに、GGPLIII に対する抗体が出来ることを明ら

かにしている。GGPLⅢが、抗原提示細胞、抗体産生細胞に作用して、抗 GGPLⅢ抗体が作られると考えられる。産生した抗 GGPLⅢ抗体が、感染したマイコプラズマ・ファーマンタンスの増殖抑制作用などにより、感染症の発症を予防できる可能性がある。即ち GGPLⅢをワクチンとして開発することが期待されている（下図）。



GGPLⅢの免疫賦活薬としての可能性

本研究課題は、合成した GGPLⅢが、抗 GGPLⅢ抗体を産生するかどうか。(GGPLⅢの抗原性)。および GGPLⅢを投与した時に、マイコプラズマ・ファーマンタンス感染による疾患モデルで効果を示すかどうか。を検討し、GGPLⅢの免疫賦活薬（ワクチン）としての有用性を明らかにすることである。

GGPLⅢをマウスに投与した時、血清中の抗体価が上昇することから、合成 GGPLⅢ が抗原性を有することを確認した。GGPLⅢを抗原として、平成19年度までに、マウスに投与で、血清中に抗GGPLⅢ抗体価を検出し、IgM、IgG の明らかな上昇が認められた。この抗血清が、マイコプラズマ・ファーマンタンスの代謝阻害作用を示したことから、抗 GGPLⅢ抗体が抗マイコプラズマ作用をもつ可能性が示された。

薬効評価のための動物モデルについて検討した。その結果マイコプラズマ・ファーマンタンスをウサギに1回感染させたときに、気道内感染の場合、2羽中1羽で肺炎像が観察されたこと、膝関節腔内感染の場合、3羽中2羽において、関節炎像が観察されたが、発症頻度が低いこと、比較的弱い炎症であることから、ワクチンなどの薬効評価を行う場合のモデルとしては不十分であると考えられた。

⑥ ワクチンとしての安全性試験の実施（エムバイオテック株式会社）

実験動物への投与によって安全性を確かめた。GGPL のワクチンとしての有効用量の検討および安全性の検討を行った。最適な条件は更に検討が必要であることが判った。マイコプラズマ・ファーマンタンスを3回感染させることにより、明らかな肺炎の発症と、1例ではあるが関節炎が認められた。肺組織切片の病理組織学的検討の結果、全例に肺の炎

症像が観察された。経後脚膝蓋関節腔内投与群においては 1/3 羽で顕著な関節炎像が認められた。関節炎像が見られた膝蓋関節においては、滑膜上皮細胞の多層化、上皮直下の形質細胞浸潤に加え、数ヶ所においてリンパ球の集ぞくが認められた。他の臓器における病変は無かった。

⑦ プロジェクトの管理・運営（北海道ティー・エル・オー株式会社）

研究開発委員会を平成20年9月、12月、平成21年3月の3回開催し、メンバー毎の研究の進捗状況を確認し、予算の執行状況等を管理するとともに、適宜各メンバーとの連携を密に、円滑な研究開発の進展を図った。

研究開発の成果を取り纏め、成果報告書を作成した。

最終章 全体総括

GGPL の合成に関すると考えられた遺伝子をクローニングした後、大腸菌型のコドンに改変して、大腸菌で発現させて、酵素反応を行った。その結果、GGPL の生合成に関与する酵素を2つ発見した。これらの酵素を働かせて、GGPL I の酵素的合成に成功した。GGPL には、I から III までの分子種が予想される。今回は、GGPL I の生合成は、成功したが、最終目的物である GGPL III の生合成にまでは至らなかった。

今後、GGPL I の製造によって当初目的の関節リュウマチなどの自己免疫疾患の発症鍵物質となる可能性があるものの、臨床的なデータの蓄積が不足している。病院との連携を深めて、臨床データの取得を図り、本事業終了時までの技術開発成果を社会貢献に生かせるかを判断するデータ蓄積を行う。加えて、当初目的の GGPL III の製造に関しては、より感染性が高いと考えられるマイコプラズマ・ファーメンタンス株の遺伝子情報を活用して、生合成遺伝子の発見を早めるとともに、本菌以外でも同様の活性を持つ生物の酵素を探索する予定である。