

令和4年度（2022年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2021B11	
申請者に関する事項	氏名	松尾 祐一
	所属機関名	熊本大学大学院生命科学研究部
	職名	助教
研究課題名	ピロリ菌のエネルギー代謝が制御する病原性発現の解明	
研究期間	2021年12月1日～2023年3月31日	
本センター担当教員	山岡 吉生	

令和4年度（2022年度）研究成果の概要

【遺伝子変異株の作製】

トランスポゾン遺伝子スクリーニングでは、TCA回路を構成する遺伝子のいくつかは非必須遺伝子であったことから、遺伝子変異株の作製に取り組んだが、遺伝子変異株を得ることはできなかった。このことから、TCA回路を構成する遺伝子は必須遺伝子であることが示唆された。遺伝子変異株を用いた表現型解析が困難であったため、ケミカルバイオロジーによる解析を行うことを目的として、組み換えタンパク質を用いた生化学的解析に取り組んだ。

【組換えタンパク質の作製】

リンゴ酸キノン酸化還元酵素（Malate quinone oxidoreductase: MQO）の発現に取り組んだ、大腸菌にコドン最適化したMQO遺伝子と、大腸菌BL21株を用いて組み換えタンパク質を発現した。N末端にHisタグとSUMOタグを付加したMQOなどを発現させた結果、C末端にHisタグを付加したMQOが最も比活性が高かった（図1）。しかし、発現量は非常に少なく、ウェスタンブロッティングで確認できるほどの発現量であった。さらに、可溶化に用いる界面活性剤の同定に取り組んだが、MQOの活性を保持したまま可溶化することができなかった。最適な界面活性剤の同定については、引き続き検討を進めている。そして、イソクエン酸脱水素酵素（Isocitrate dehydrogenase: IDH）の組換えタンパク質については、MQOと同様に大腸菌にコドン最適化した遺伝子を用いて、発現条件の検討を行っている。

【ピロリ菌に対するMQO阻害剤の影響】

液体培地を用いた感受性試験により、MQO阻害剤の最小発育阻止濃度の検討を行った。その結果、ピロリ菌26695株に対する発育阻止濃度は1 mg/mlであったことから、MIC阻害剤はピロリ菌に対して発育阻害を示すことが明らかとなった。さらに、大分大学グローバル感染症研究センターの山岡教授（ゲノムワイド感染症研究分野）が保有するクラリスロマイシン耐性株の5株に対する、MQOの最小発育阻止濃度を検討したところ、0.5 - 2 mg/mlであった。このことから、MQO阻害剤の作用機序は、既存薬とは異なることが示唆された。

表1: 大腸菌を用いた組換えMQOの発現

	組換えMQO		
	コントロール膜	N末 SUMOタグ MQO	C末 Hisタグ MQO
比活性 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	0.0019	0.017	0.29