

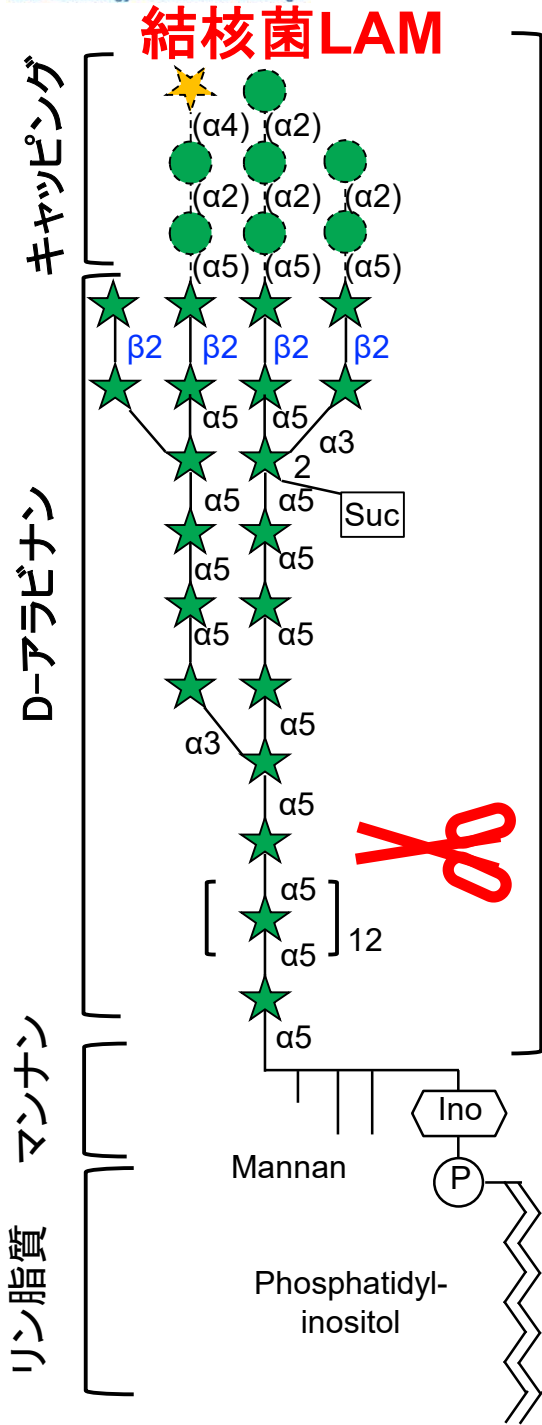
抗酸菌に特異的な 糖脂質(LAM)の分解酵素

鹿児島大学 農学部 農学科

准教授 藤田 清貴

2024年7月16日

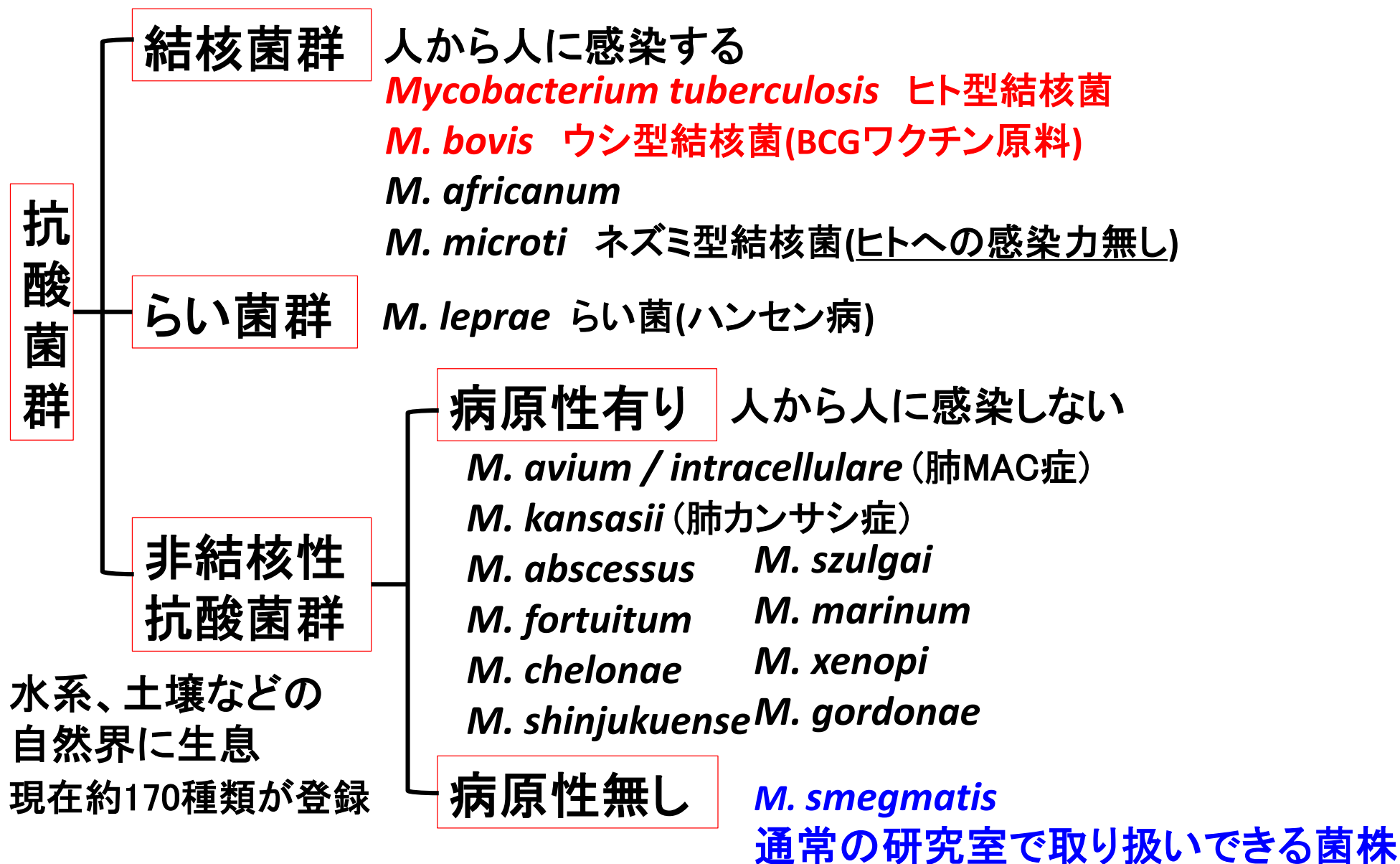
新技術の概要



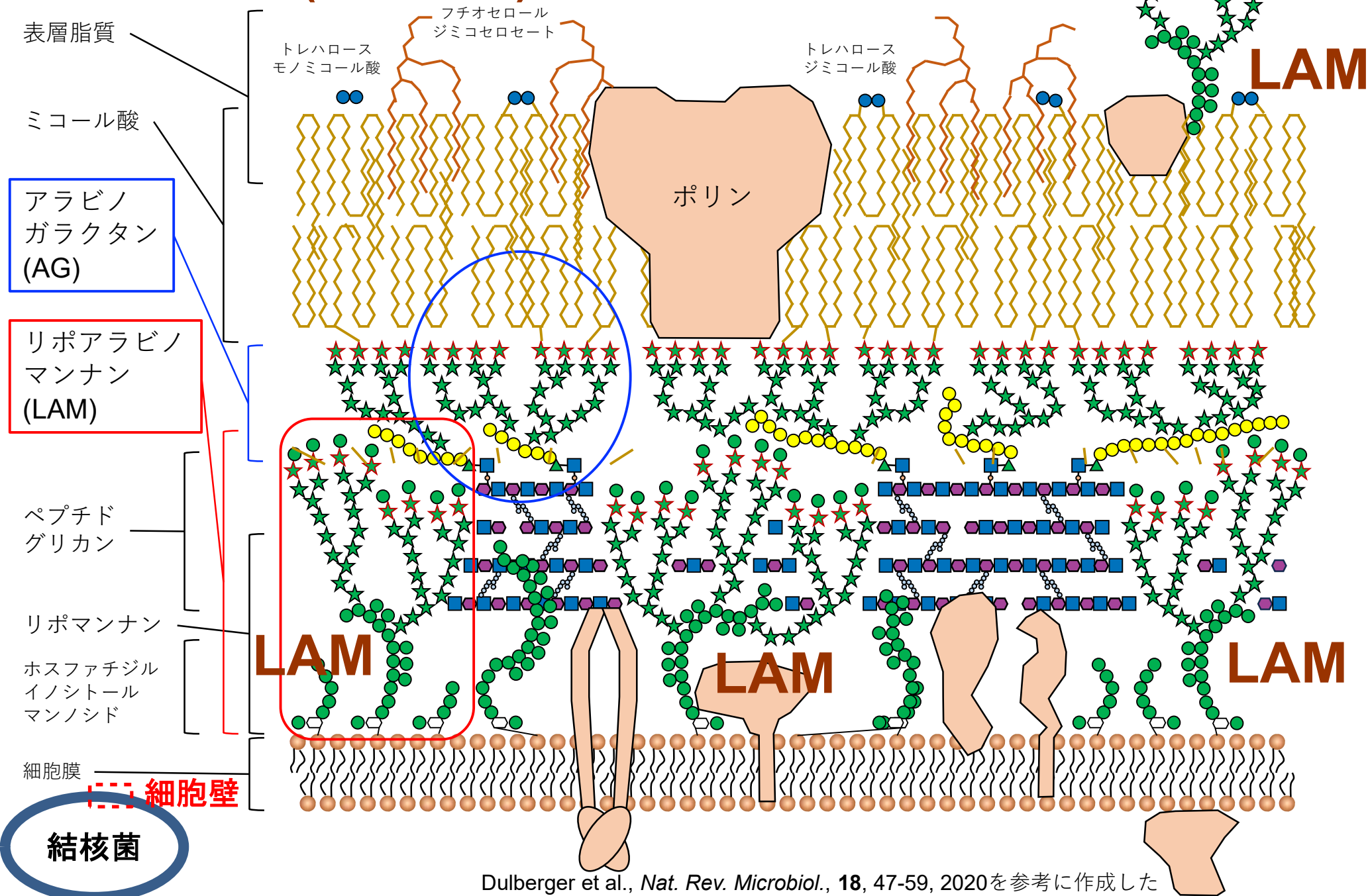
結核菌に代表される抗酸菌の細胞壁にはリポアラビノマンナン(LAM)という糖脂質が存在する。LAMは抗酸菌の種類により異なる構造を持つ。我々が開発したLAMの糖鎖部分を特異的に分解する3種類の酵素を用いることで、

- ① LAMの解析研究用の酵素製剤としての利用。
- ②生成物の解析に基づいた抗酸菌の検出、あるいは抗酸菌の種類の判定が可能。
- ③低分子の末端にマンノースが付加されたLAM(Man-LAM)オリゴ糖の調製による低分子ワクチンアジュバントの開発にもつながる。

Mycobacterium属細菌の分類



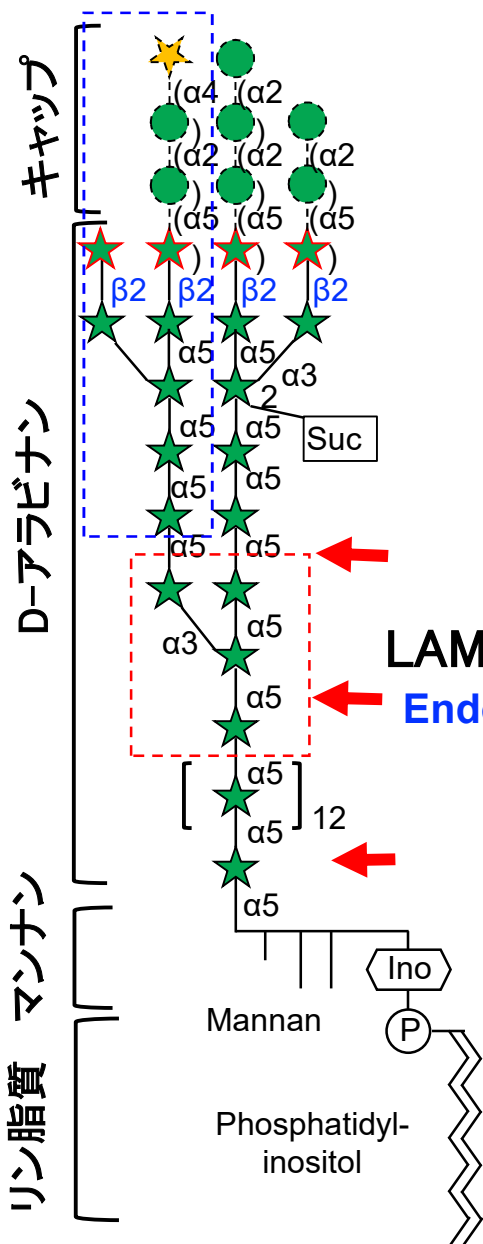
リポアラビノマンナン(LAM)糖脂質は 抗酸菌(結核菌等)に特異的な細胞壁構成成分



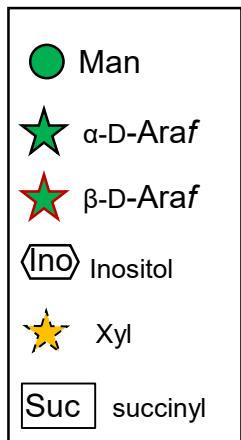
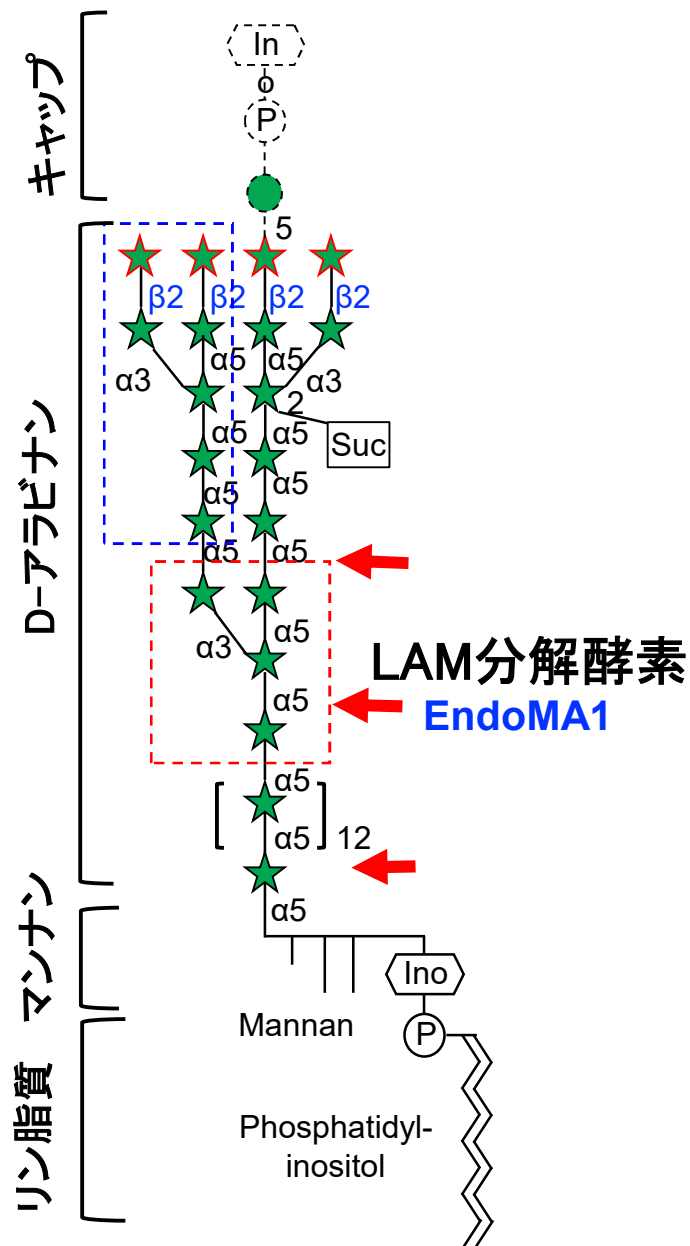
Dulberger et al., Nat. Rev. Microbiol., 18, 47-59, 2020を参考に作成した

LAMの末端構造は抗酸菌により異なる

結核菌
M. tuberculosis
M. bovis BCG



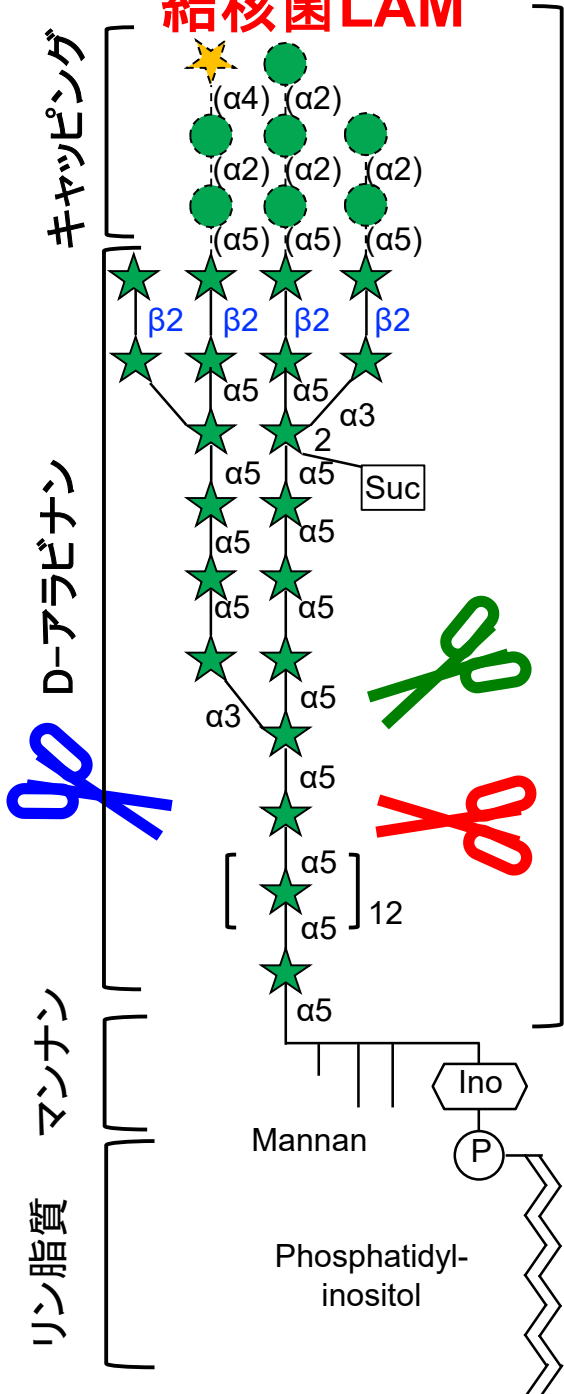
非結核性抗酸菌
(病原性無し)
M. smegmatis
スメグマ菌



LAM分解酵素はLAMの末端構造に影響されず切断可能

従来技術とその問題点

結核菌LAM



LAM分解酵素とはLAMの端のアラビナン部分を分解する酵素である。

既に実用化されているものには、バクテリアから抽出した酵素を精製しての利用がある。

Cellulomonas endoarabinanase

from *Cellulomonas* sp.

Sun M.Z. et al., *Protein J.*, 31, 51 (2012)

Msm-arabinanase

from *Mycobacterium smegmatis*

Xin Y., et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1473, 267(1999)

Endo-D-arabinase

from *Microbacterium arabinogalactanolyticum*

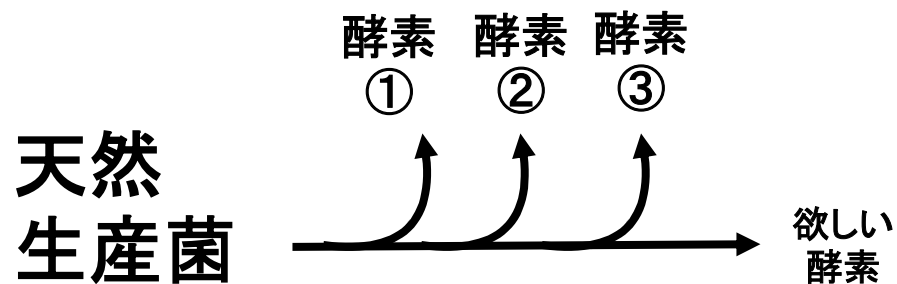
(我々の研究対象) 一般土壌細菌

S. Kotani, A. Misaki, et al., *Biken J.*, 14(4), 379-87 (1971)

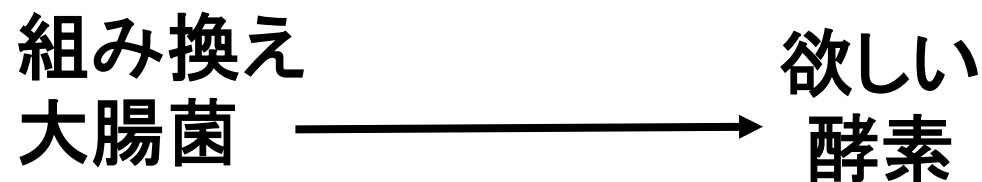
精製操作が煩雑であることから、広く利用されるまでには至っていない。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来、LAM分解酵素は生産菌からの培養されてきた。従来技術の問題点であった酵素精製の困難性が、LAM分解酵素のクローニングと大腸菌での高発現の成功による、効率化・簡便化に成功した。



複数の酵素を生産・精製が大変



大量生産・精製が容易

nature communications



Article

<https://doi.org/10.1038/s41467-023-41431-2>

Identification and characterization of endo- α -, exo- α -, and exo- β -D-arabinofuranosidases degrading lipoarabinomannan and arabinogalactan of mycobacteria

Microbacterium(土壌細菌)はLAMのD-arabinan鎖を分解代謝するために必要な酵素群を持っている

Received: 5 April 2023

Accepted: 29 August 2023

Published online: 19 September 2023

Check for updates

Michiko Shimokawa^{1,10}, Akihiro Ishiwata^{2,10}, Toma Kashima^{3,10},
Chiho Nakashima³, Jiaman Li³, Riku Fukushima³, Naomi Sawai¹, Miku Nakamori¹,
Yuuki Tanaka¹, Azusa Kudo¹, Sae Morikami¹, Nao Iwanaga¹, Genki Akai³,
Nobutaka Shimizu⁴, Takatoshi Arakawa⁵, Chihaya Yamada⁶,
Kanefumi Kitahara¹, Katsunori Tanaka^{2,7}, Yukishige Ito^{2,8},
Shinya Fushinobu^{3,9} & Kiyotaka Fujita¹

#下川 倫子, #石渡 明弘, #鹿島 騰真, 中島 千穂, 李家漫, 福島 陸,
澤井 未視, 中森 美紅, 田中 悠暉, 工藤 亜津紗, 森上 紗衣, 岩永 菜央,
赤井 元気, 清水 伸隆, 荒川 孝俊, 山田 千早, 北原 兼文, 田中 克典,
伊藤 幸成, *伏信 進矢, *藤田 清貴。(#筆頭著者、*責任著者)

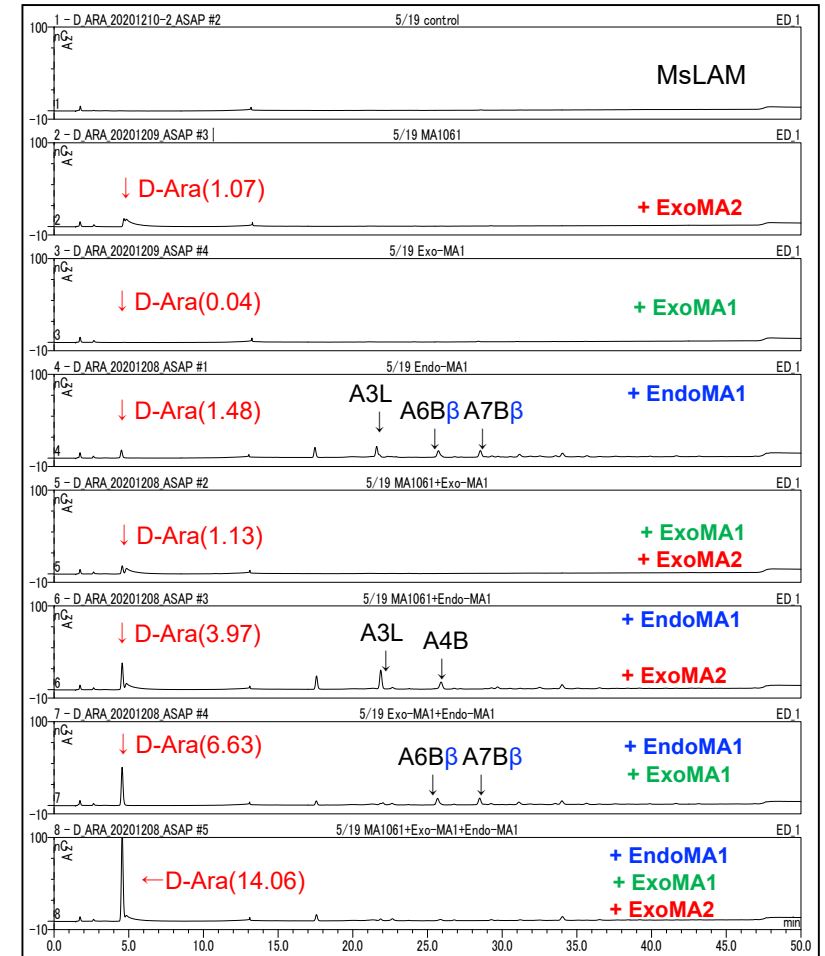
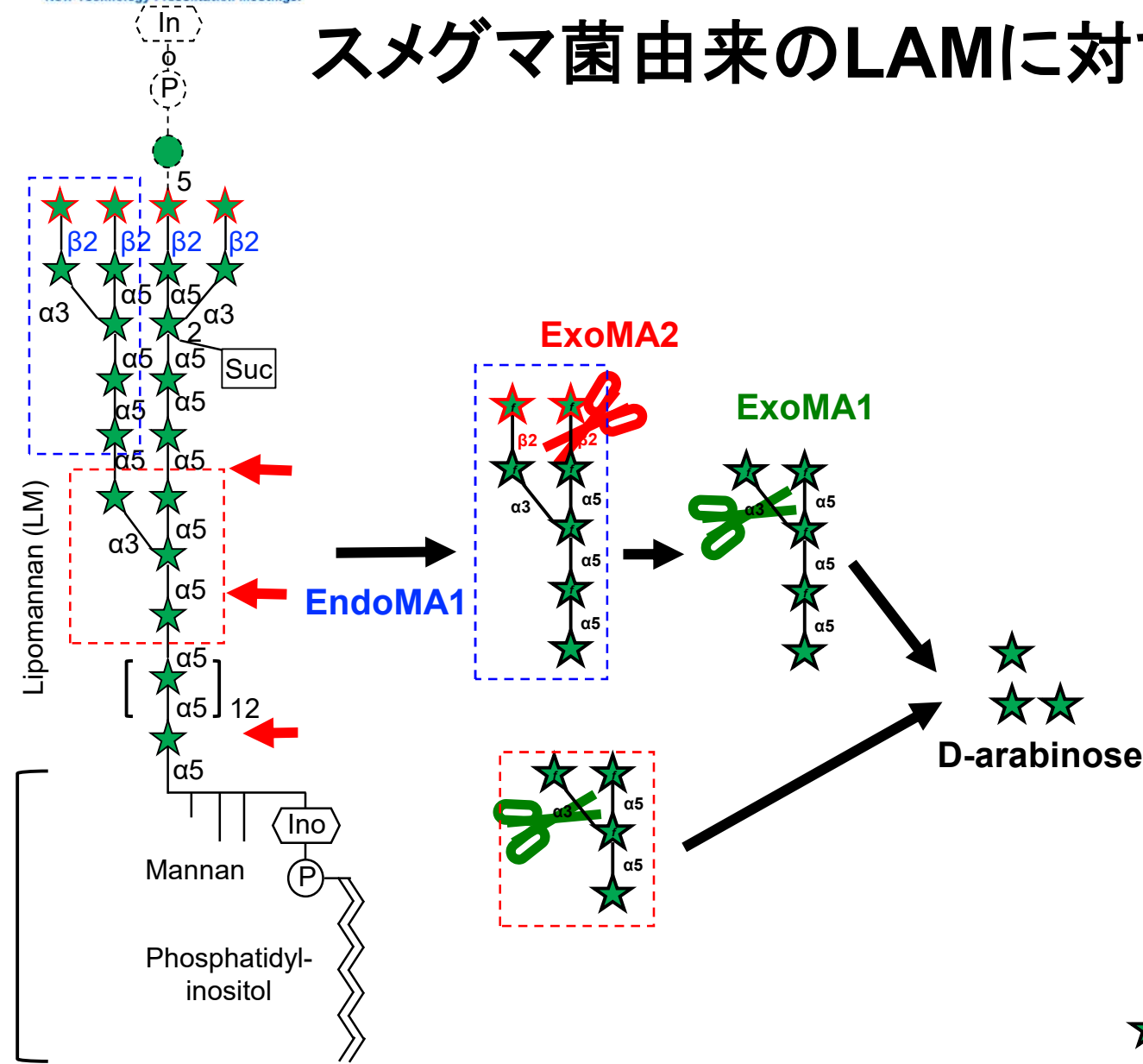


本技術に関する知的財産権

EndoMA1	発明の名称	新規D-アラビナン分解酵素
ExoMA1	発明者	藤田清貴、隅田泰生
	出願人	国立大学法人鹿児島大学、株式会社スディックスバイオテック
	出願番号	2017-141706 (特許第7493751号)
ExoMA2	発明の名称	糖質分解酵素、抗酸菌の検出キット及び抗酸菌の検出方法.
	発明者	藤田清貴
	出願人	国立大学法人 鹿児島大学
	出願番号	2021-147456

スメグマ菌由来のLAMに対する分解活性

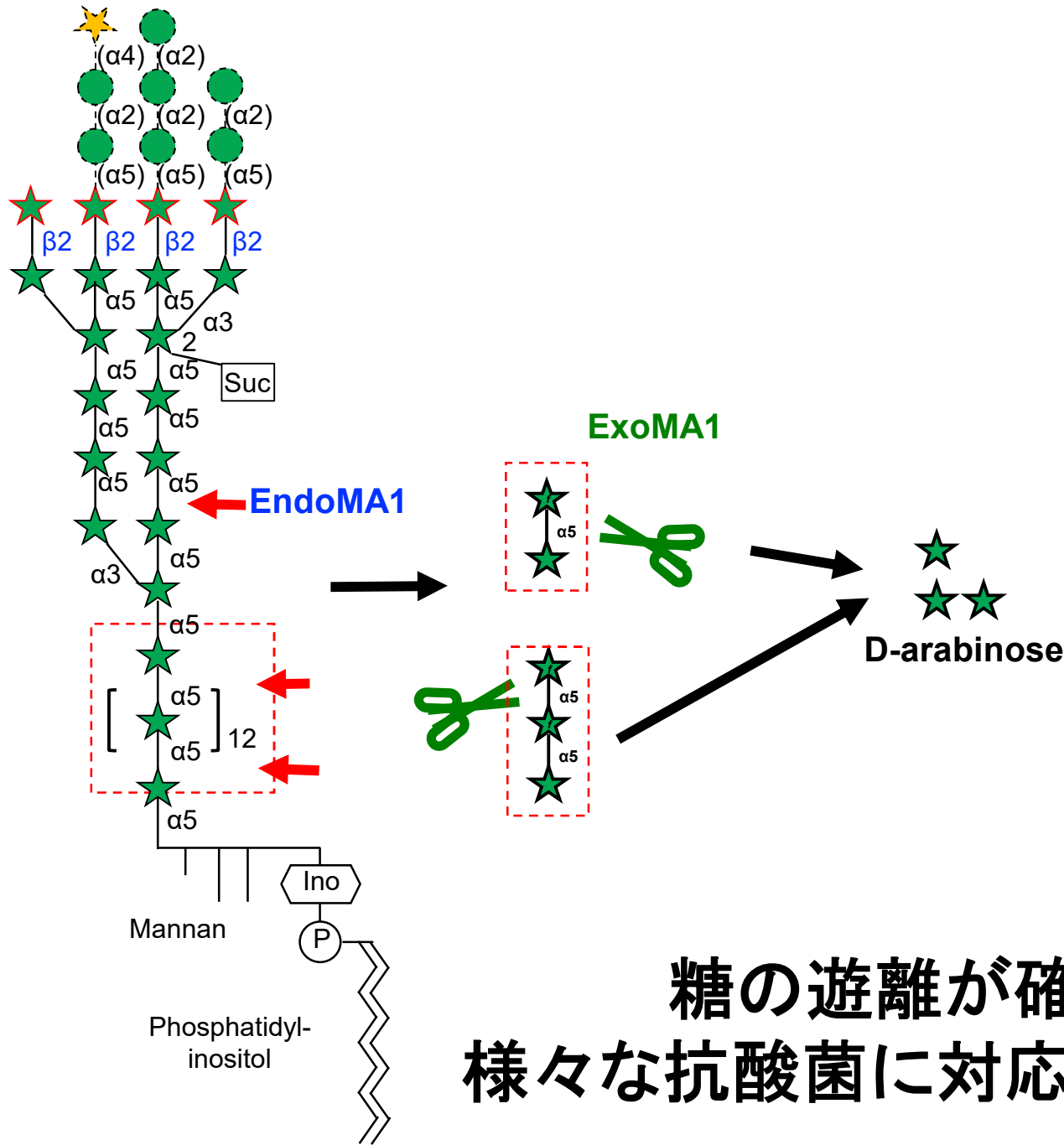
My. Smegmatis LAM



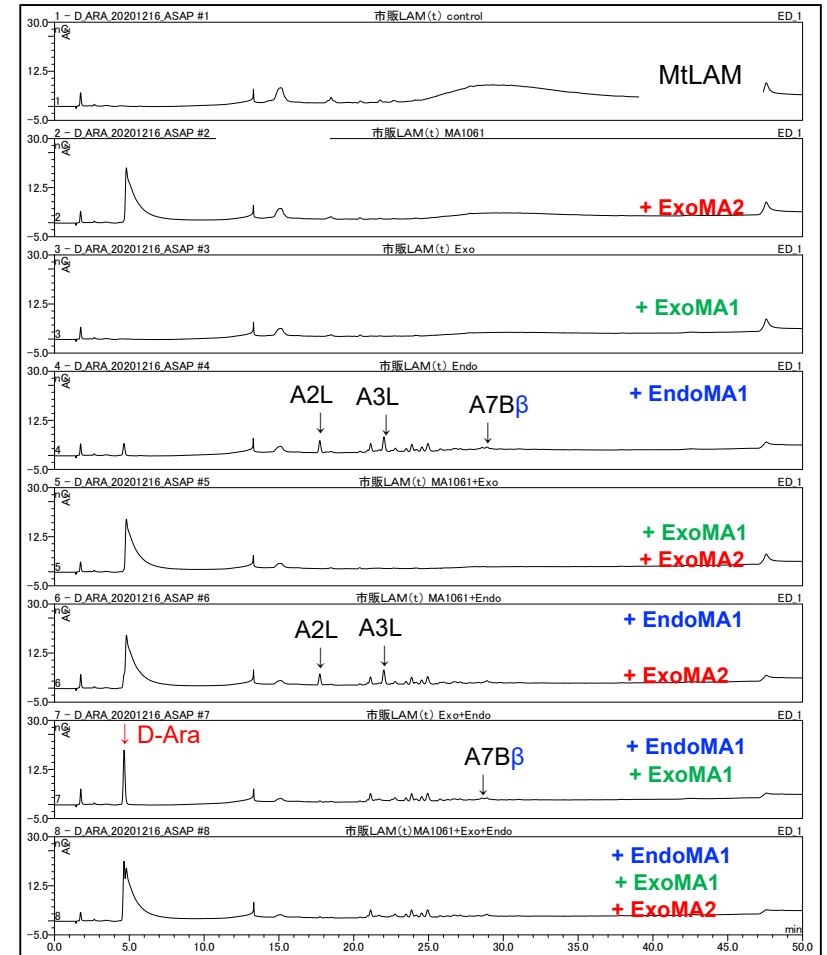
三種の酵素の組み合わせによりD-arabinanを分解できた

結核菌由来のLAMに対する分解活性

結核菌LAM



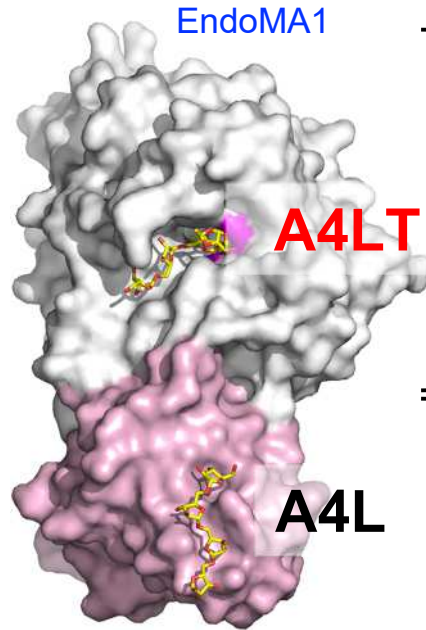
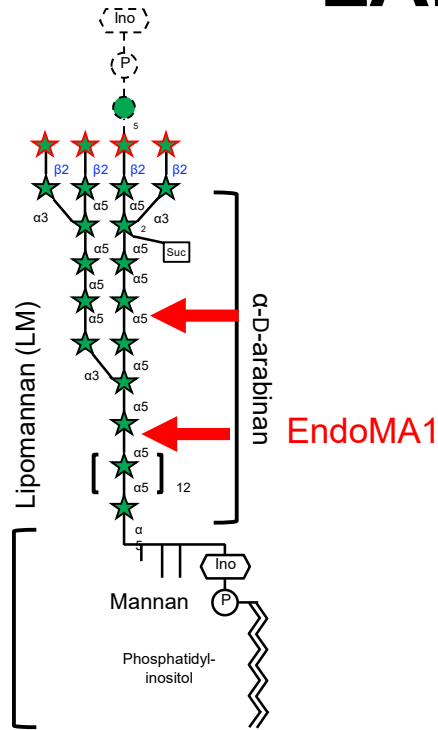
My. tuberculosis LAM



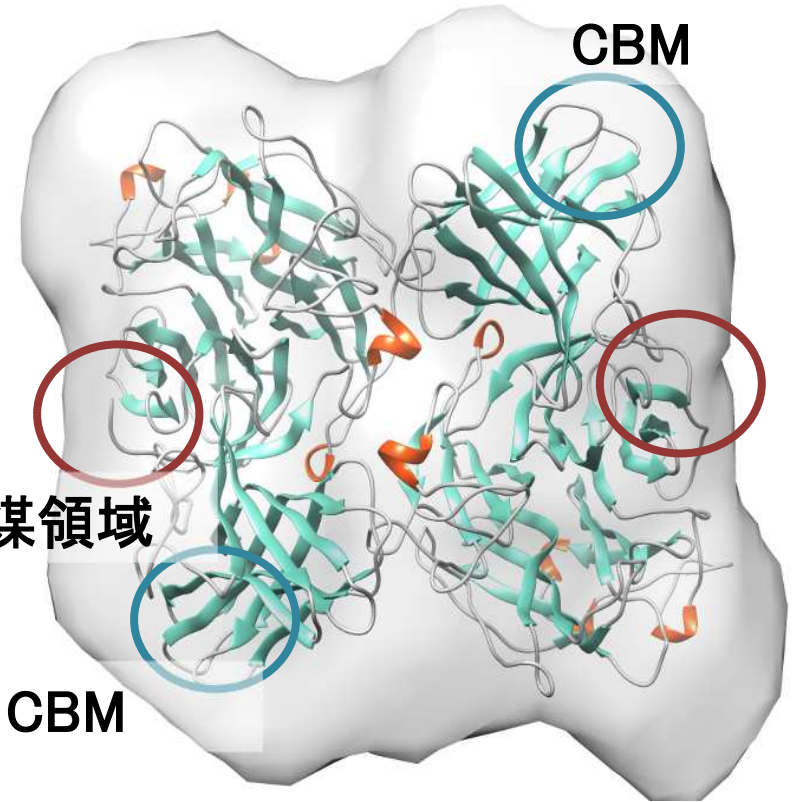
糖の遊離が確認できたことから
様々な抗酸菌に対応可能であることがわかる

三種類の分解酵素①

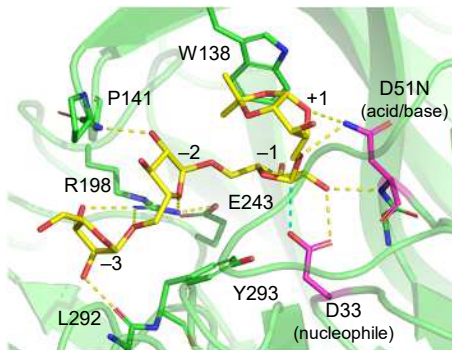
LAMの内部分解酵素EndoMA1



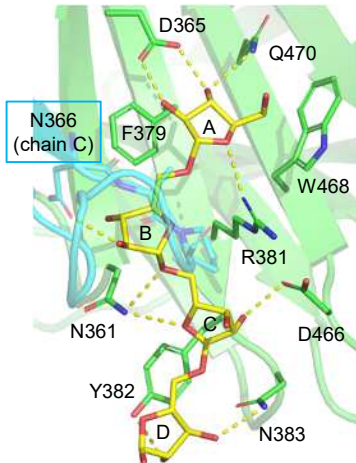
5-bladed β -propeller fold



active site



putative CBM site



CBM

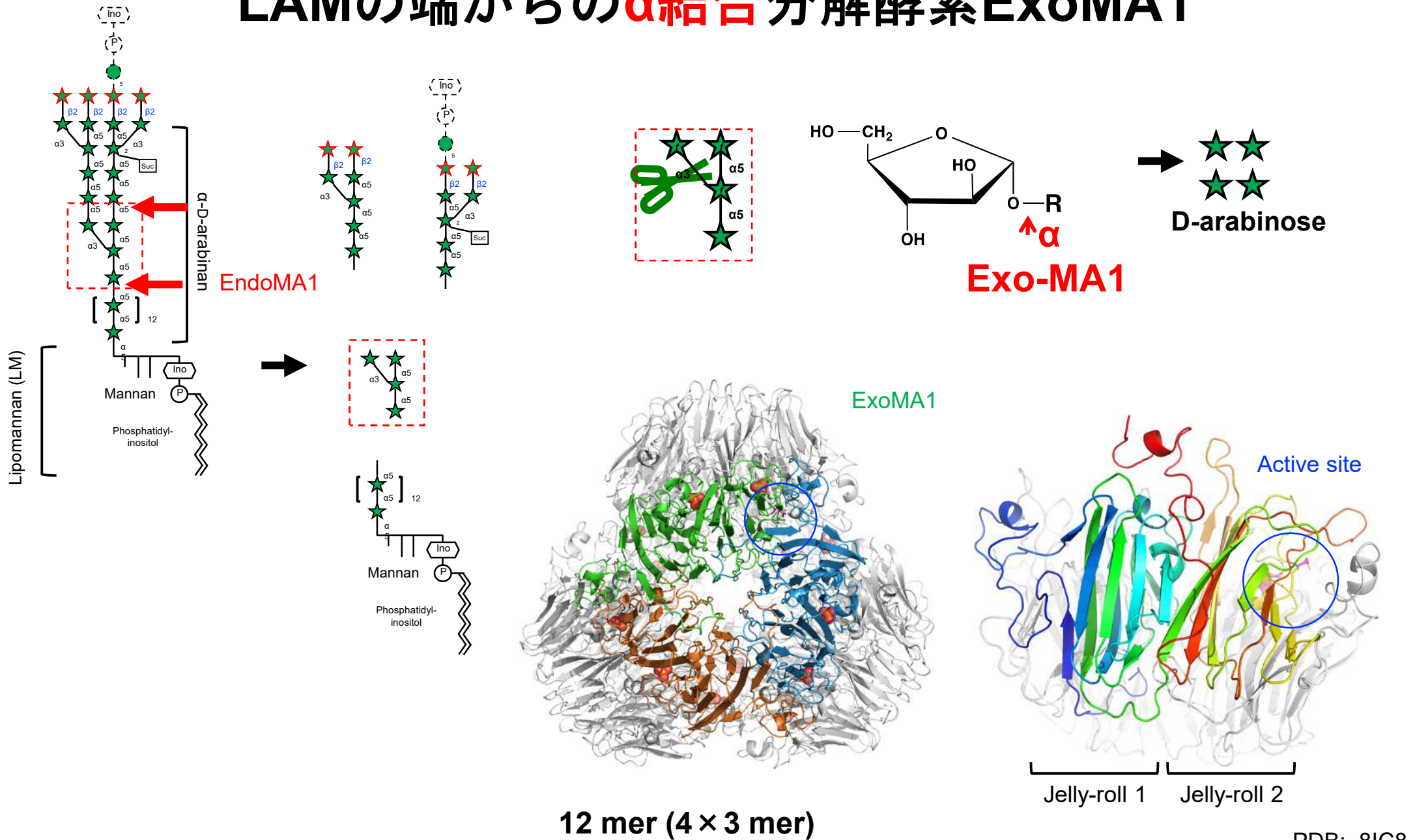
β -sandwich fold

PDB: 8HHV 8IC1(complex)

Endo-MA1は触媒ドメインとCBMドメインで構成された二量体酵素

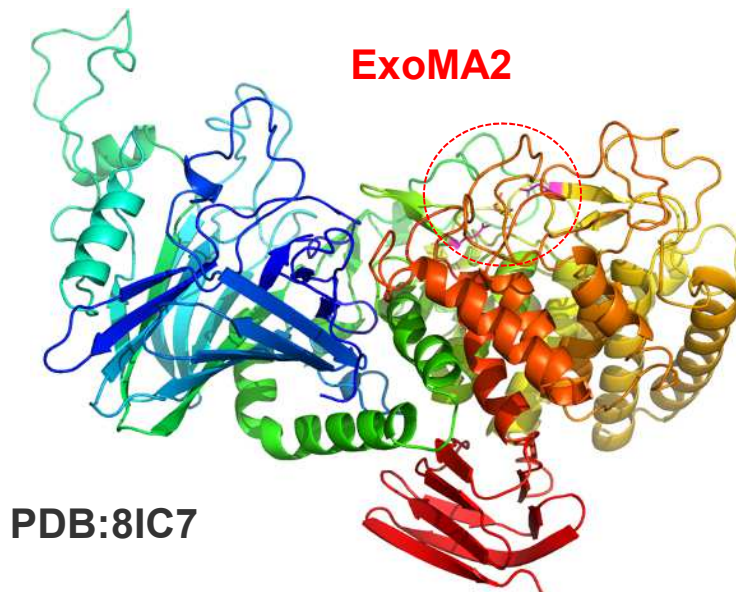
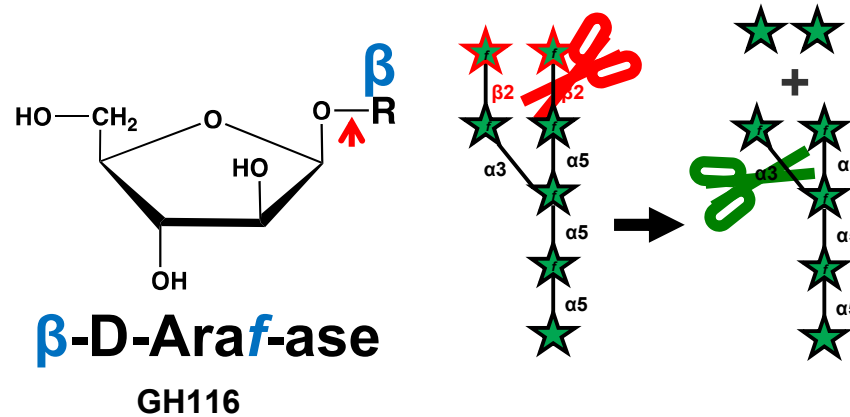
三種類の分解酵素②

LAMの端からのα結合分解酵素ExoMA1



三種類の分解酵素③

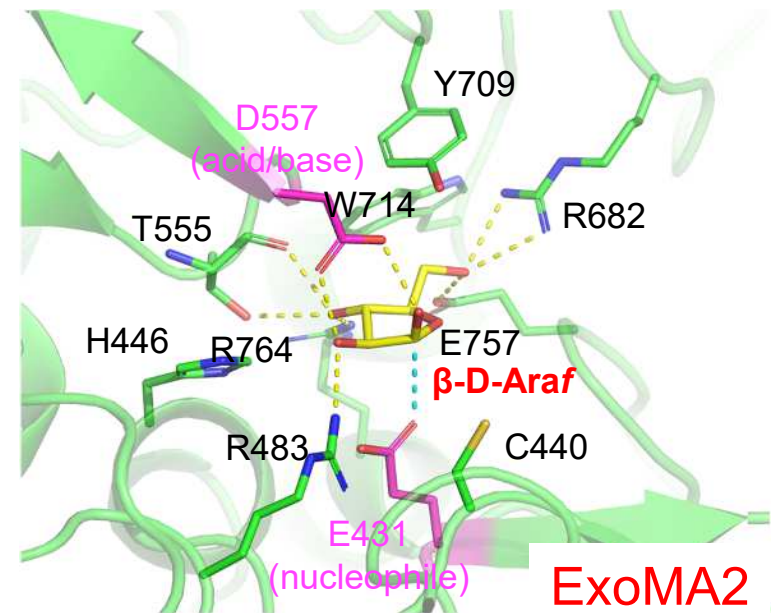
LAMの端からの β 結合分解酵素 ExoMA2



Active sites

Magenta sticks :
the catalytic residues

Yellow sticks :
the ligands

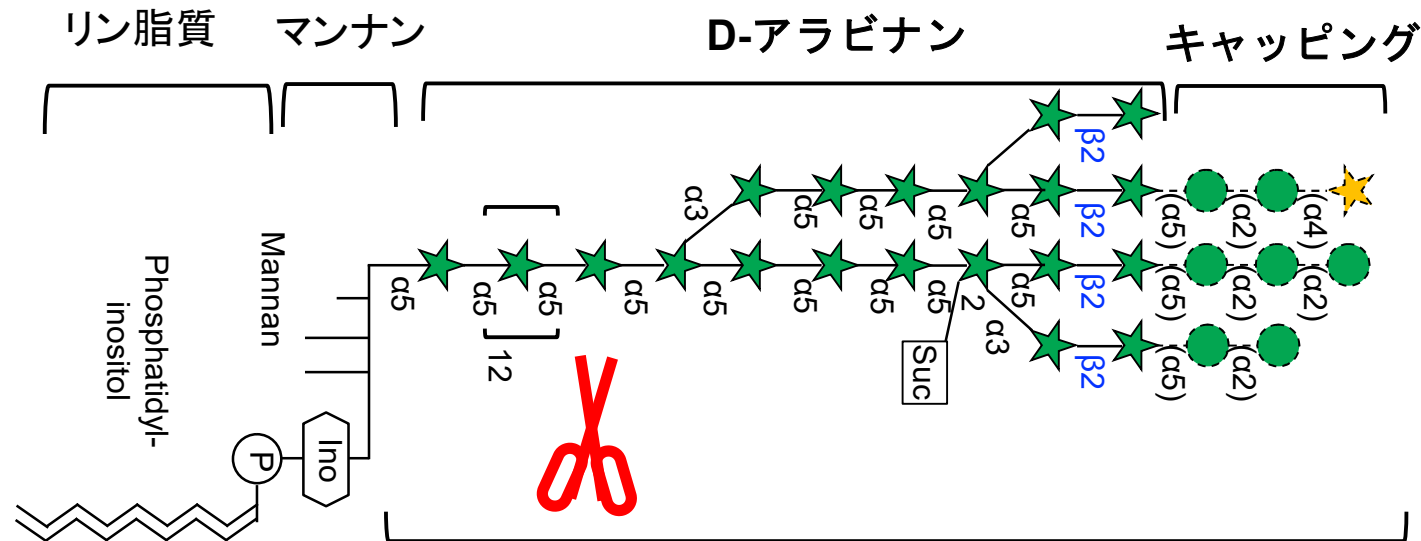


β -sandwichドメインと catalytic (α/α)₆ barrelドメイン

想定される用途①

LAMの解析研究用の酵素製剤としての利用。

結核菌マンノースキャップ-LAM



マンノースキャップ-LAMを切る酵素がendo-D-arabinaseであり、Cellulomonas由来の酵素精製法は報告されている。(M.-Z. Sun, et al. Protein J., 31, 51-58 (2012))

しかし、組換え体が存在しないため、研究者は各自で精製して使用する必要があった。

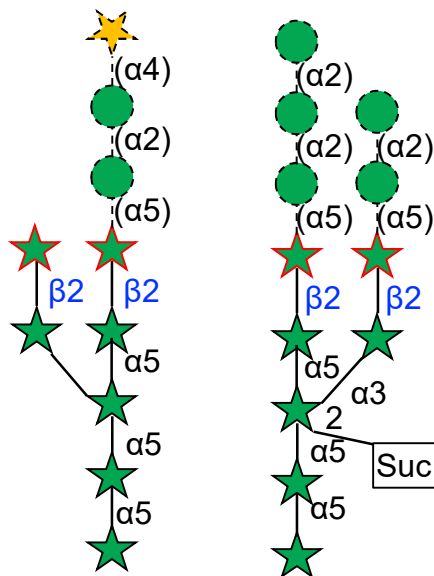
組み換え酵素が市販されれば研究の効率化が期待される。

想定される用途②

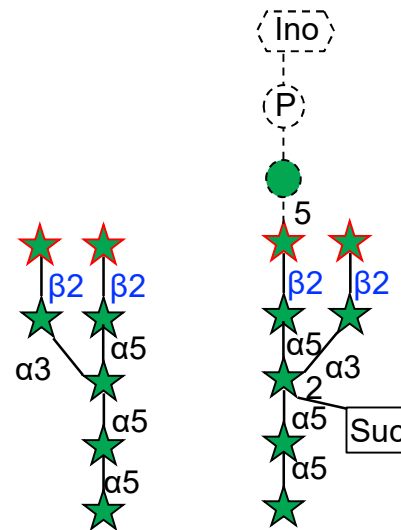
生成物の解析に基づいた抗酸菌の検出、あるいは抗酸菌の種類
の判定が可能。

- ・ LAMのキャップ構造が抗酸菌の種類によって特徴
があるため、分解産物の糖鎖構造によって、抗酸
菌の種類が可能であると考えられる。

結核菌LAM



スメグマ菌LAM

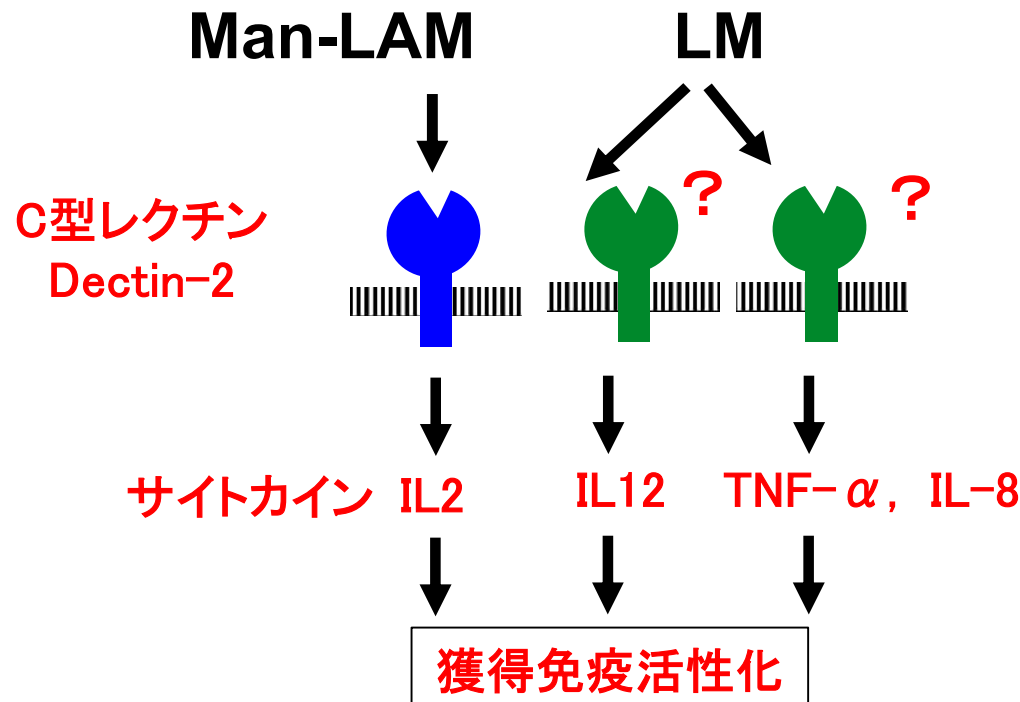


精度の高い
検出技術の一つ

想定される用途③

低分子の末端にマンノースが付加されたLAM(Man-LAM)オリゴ糖の調製による低分子ワクチンアジュバントの開発にもつながる。

フロイント完全アジュバント(FCA)は、**結核死菌**を含む油である。FCAは、極めて強力なアジュバントだが肉芽腫を引き起こす恐れがあるため、ヒトワクチンへの使用が認められていない。



LAMの種類によってマクロファージの抗原認識機構が異なるため、酵素を用いたLAM分解によってアジュバント特性を変化させることができるかもしれない。

実用化に向けた課題

- ① LAMの解析研究用の酵素製剤としての利用。
→大腸菌の異種発現系を用いたLAM分解酵素の大量発現系を開発済み。
- ②生成物の解析に基づいた抗酸菌の検出、あるいは抗酸菌の種類
の判定が可能。
→抗体を用いた既存の手法との比較を必要とする。抗酸菌毎の分解物のプロファイルの構築が十分できていないため、今後精度を高める必要がある。
- ③低分子の末端にマンノースが付加されたLAM(Man-LAM)オリゴ糖の調製による低分子ワクチンアジュバントの開発にもつながる。
→実際に有効性があるかを確認する試験が必要。

企業への期待

- LAMの解析用途としてのEndoMA1などの組み換え酵素の製造販売を希望。
- また、用途開発の余地はあると思われるため、今後の抗酸菌の検出用途の試薬開発への協力を希望。

企業への貢献、PRポイント

- 本技術は結核菌だけでなく非結核性抗酸菌症の原因となっている抗酸菌の全てに適用が可能なため、用途開発を進めることで検出技術向上に貢献できる。
- 本格導入にあたっての技術指導等

産学連携の経歴

- 2017年 スティックスバイオテック社 隅田泰生現鹿
児島大学特任教授と共同特許出願

お問い合わせ先

国立大学法人 鹿児島大学
南九州・南西諸島域イノベーションセンター
知的財産・リスクマネジメントユニット

〒890-0065 鹿児島市郡元1-21-40
TEL: 099-285-7043
FAX: 099-285-3886
E-Mail: tizai@kuas.kagoshima-u.ac.jp



鹿児島大学公式マスコットキャラクター

さっしん