

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19102

研究課題名(和文) ラメラ封入体様オルガネラを発生させる結核菌PE_PGRS62の役割

研究課題名(英文) Biogenesis of lamellar body-like organelles in host cells expressing Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS62

研究代表者

祝 弘樹 (Iwai, Hiroki)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員(移行)

研究者番号：70443116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：PE_PGRS62は結核菌のグリシンの豊富なPE_PGRSタンパク質のひとつで、病原性因子と考えられている。GFP-PE_PGRS62を発現した2つのII型肺胞上皮細胞(AEC II) A549細胞とT7細胞がラメラ封入体様のベシクルを有していた。ベシクルは多重膜構造で脂質を含有していた。PE_PGRS62はABCA3とベシクル上で共局所した。ABCA3は、AEC IIのラメラ封入体限界膜のマーカータンパク質である。これらの結果は、PE_PGRS62がAEC IIで脂質を含んでいるラメラ封入体様のベシクルを生み出すことを示唆した。

研究成果の概要(英文)：PE_PGRS62 is a member of the M. tuberculosis PE_PGRS family of glycine-rich proteins, and thought to be a virulent factor. We described here that two type II alveolar epithelial cell (AEC II)-like cell lines, A549 and T7, expressing GFP-PE_PGRS62 possessed lamellar body-like vesicles. The vesicles contained lipid with multi-membrane structures. PE_PGRS62 was co-localized on the vesicles with the ATP-binding cassette transporter ABCA3, a marker of a lamellar body limiting membrane of AEC II. These results suggest that PE_PGRS62 generates lamellar body-like vesicles containing lipid in AEC II.

研究分野：細菌学

キーワード：結核菌

1. 研究開始当初の背景

結核菌ゲノム解析からグリシンに富む PE_PGRS タンパク質の存在が明らかになった。結核菌タンパク質 PE_PGRS62 が宿主オートファジーを抑制することがわかってきた (論文投稿中)。これまでに結核菌の標的細胞のうちマクロファージについて調べて来たが、II 型肺胞上皮細胞内で PE_PGRS62 が特徴的な細胞内局在を示すことが観察された。

2. 研究の目的

結核菌の病原性因子として同定した PE_PGRS62 を肺胞上皮 II 型細胞内で発現させ、その局在を調べる。

3. 研究の方法

哺乳類細胞発現ベクターを用いて GFP-PE_PGRS62 を HeLa 細胞に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察する。

レトロウイルスベクターを用いて GFP-PE_PGRS62 の遺伝子を A549 細胞や T7 細胞に導入し、高発現株を限界希釈法でクローニングする。

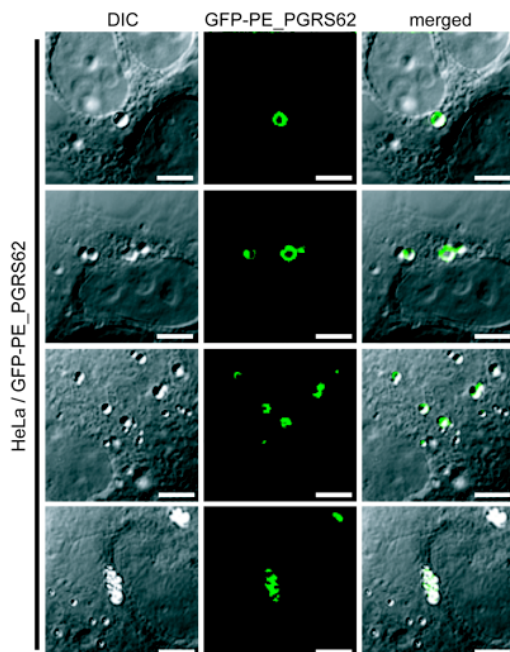
得られた A549/GFP-PE_PGRS62 を観察するために、抗 GFP 抗体による染色を行い、GFP-PE_PGRS62 の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察する。

GFP-PE_PGRS62 の発現により出現した細胞内オルガネラを透過型電子顕微鏡により観察する。

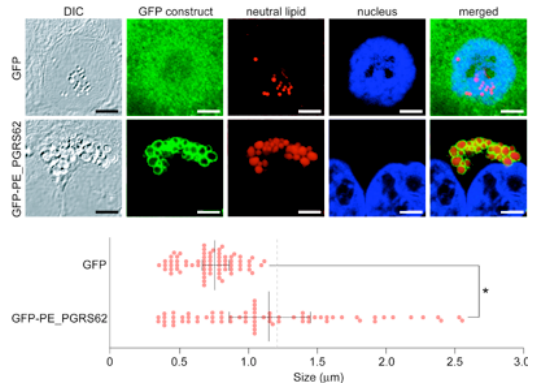
GFP-PE_PGRS62 の発現により出現した細胞内オルガネラを脂質染色および抗 ABCA3 抗体染色を行い、ラメラ封入体様オルガネラとして同定する。

4. 研究成果

GFP-PE_PGRS62 は HeLa 細胞内でベシクル形成を誘導することを見出した (下図)。



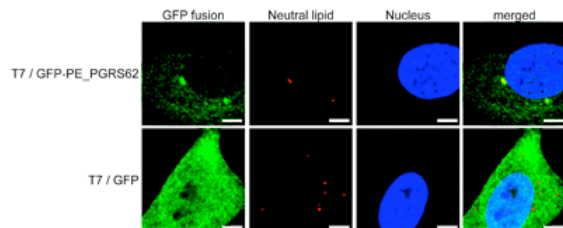
結核菌の標的細胞はマクロファージと II 型肺胞上皮細胞である。マクロファージで GFP-PE_PGRS62 発現させた場合には、その発現量が少ないために細胞内局在の解析は困難であった。そこで、II 型肺胞上皮細胞株であるヒト A549 細胞とマウス T7 細胞を用いた解析を検討した。GFP-PE_PGRS62 発現した A549 内では、核の近傍に GFP-PE_PGRS62 の集積が観察された (下図、緑)。



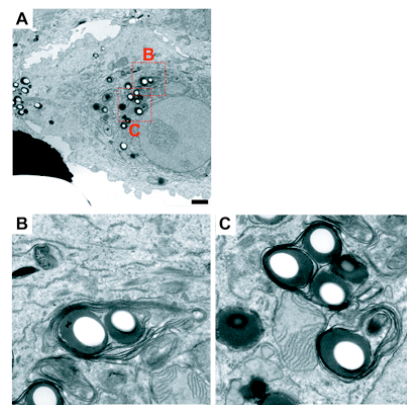
このベシクルの含有物は脂質であった (上図、赤)。

ベシクルのサイズを測定したところ、GFP 発現した A549 内では 0.35-1.12 μm であったが、GFP-PE_PGRS62 発現した A549 内では 0.35-2.59 μm であった (上図)。1.2 μm 以上のベシクルは GFP 発現した A549 内にはなかったが、GFP-PE_PGRS62 発現した A549 内で 37% 存在した。

同様の脂質含有ベシクルは GFP-PE_PGRS62 発現した T7 細胞内でも観察された (下図)。

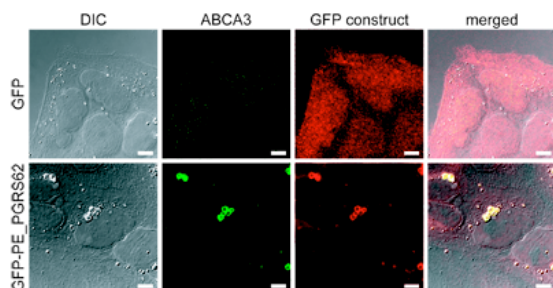


GFP-PE_PGRS62 の発現により形成されたベシクルを観察するために GFP-PE_PGRS62 発現した A549 細胞を透過型電子顕微鏡で観察した (下図)。



形成されたオルガネラは多重膜を有しており、そのベシクルのサイズ分布からラメラ封入体であることが示唆された。

GFP-PE_PGRS62 の発現により出現した細胞内オルガネラを抗 ABCA3 抗体で染色したところ、陽性であったためラメラ封入体様オルガネラとして同定した（下図）。



5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

1. Mizukoshi F, Miyoshi-Akiyama T, Iwai H, Suzuki T, Kiritani R, Kirikae T, Funatogawa K. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Tochigi prefecture, a local region of Japan. *BMC Infect Dis.* 2017 May 25;17(1):365.
2. Matsumura K, Iwai H, Kato-Miyazawa M, Kirikae F, Zhao J, Yanagawa T, Ishii T, Miyoshi-Akiyama T, Funatogawa K, Kirikae T. Peroxiredoxin 1 Contributes to Host Defenses against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2016 Oct 15;197(8):3233-3244.
3. Watanabe S, Matsumura K, Iwai H, Funatogawa K, Haishima Y, Fukui C, Okumura K, Kato-Miyazawa M, Hashimoto M, Teramoto K, Kirikae F, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. A Mutation in the 16S rRNA Decoding Region Attenuates the Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2016 Jul 21;84(8):2264-73.
4. Iwai H, Kato-Miyazawa M, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. CASTB (the comprehensive analysis server for the *Mycobacterium tuberculosis* complex): A publicly accessible web server for epidemiological analyses, drug-resistance prediction and phylogenetic comparison of clinical isolates. *Tuberculosis (Edinb).* 2015 Dec;95(6):843-4.

〔学会発表〕（計 5 件）

1. Shinya Watanabe, Kazunori Matsumura, Hiroki Iwai, Keiji Funatogawa, Yuji

Haishima, Chie Fukui, Kayo Okumura, Masako Kato-Miyazawa, Masahito Hashimoto, Kanae Teramoto, Fumiko Kirikae, Tohru Miyoshi-Akiyama, Teruo Kirikae A Mutation in the 16S rRNA Decoding Region Attenuates the Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* Keystone Symposia, New Developments in Our Basic Understanding of Tuberculosis (A5), January 14-18, 2017, Fairmont Hotel Vancouver, Vancouver, Brithish Columbia, Canada

2. 松村 和典, 祝 弘樹, 加藤-宮澤 雅子, 切替 富美子, 趙 吉子, 柳川 徹, 石井 哲郎, 船渡川 圭次, 秋山 徹, 切替 照雄, Analysis of PRDX1 which contributes to host defenses against *Mycobacterium tuberculosis*, 第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月 19~21 日、仙台国際センター展示棟
3. 渡邊 真弥, 松村 和典, 祝 弘樹, 船渡川 圭次, 加藤 雅子, 切替 富美子, 秋山 徹, 崔 龍洙, 切替 照雄カナマイシン耐性に寄与する 16S リボゾーム RNA の解読領域の 変異と結核菌の弱毒化、第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月 19~21 日、仙台国際センター展示棟
4. 水越 文徳、秋山 徹、祝 弘樹、桐谷 礼子、切替 照雄、船渡川 圭次、栃木県内で分離された結核菌の全ゲノム解読を用いた分子疫学的解析、関東・東京合同地区獣医師大会 三学会 日本獣医公衆衛生学会、2016 年 9 月 11 日、ホテル KSP（神奈川県川崎市）
5. 祝 弘樹、中野 美和、松村 和典、宮本 友司、向井 徹、牧野 正彦、Cox Jeffery, 船渡川 圭次、秋山 徹、切替 照雄 Rv3812-encoded PE_PGRS62 protein is surface-exposed in tubercle bacilli、第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 3 月 23~25 日、大阪府、大阪国際交流センター

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

祝 弘樹 (IWAI, Hiroki)

国立国際医療研究センター研究所・感染症制
御研究部・上級研究員

研究者番号：70443116

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()