

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21419

研究課題名(和文)結核菌の細胞内寄生機構の解明と新規治療戦略

研究課題名(英文)Analysis of intracellular parasitic mechanism of mycobacteria

研究代表者

奥 輝明 (Oku, Teruaki)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20409361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：結核菌の産生するLipoamide dehydrogenase C (LpdC) と宿主細胞のCoronin-1との相互作用が、結核菌の細胞内寄生性に関連していると考えられている。本研究では、組換え体LpdCとCoronin-1の結合性について解析を行い、両者が直接的に結合していることを明らかにした。また、Coronin-1のThr-412のリン酸化が結合を制御している可能性を示した。さらに、非病原性抗酸菌のLpdCホモログであるLpdAにCoronin-1への結合性が認められたことより、結合性以外の差異が細胞内寄生性に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The interaction between Coronin-1 in host cells and Lipoamide dehydrogenase C (LpdC) from mycobacteria is considered the cause of intracellular parasitism of pathogenic mycobacteria. In this study, we demonstrated the direct association of Coronin-1 and LpdC which are recombinant proteins by pull-down assay. And this association was indicated possible regulation by phosphorylation of Thr-412 on Coronin-1. Furthermore, we elucidated that LpdA which is *M. smegmatis* (non-pathogenic mycobacteria) homologue of LpdC also associated with Coronin-1. This result suggested that differences other than association with Coronin-1 of Lpds are involved in intracellular survival.

研究分野：生化学

キーワード：Coronin-1 結核 リン酸化 細胞内寄生 LpdC

1. 研究開始当初の背景

結核は、マイコバクテリウム属結核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* 等) に起因する最も古くから知られる感染症の1つであり、ヒトの単一感染性菌による全世界の死因第1位であり続けている。抗生物質による化学療法の開発・普及などにより、世界的な発症者・死亡者は減少し、罹患者・死亡者の多くは発展途上国に占められているが、先進国においても、免疫抑制剤の使用患者や、後天性免疫不全症 (AIDS) 患者、高齢社会などに起因し増大傾向にあることが知られている。また、交通手段の効率化・大量化・高速化により、感染者の移動が平易であることも増加の一因である。日本における結核の患者数は、先進国の中でも高い水準であり、「再興感染症」として注目されている。現在、AIDSの世界的蔓延によってヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染者が増加しているが、結核菌との重感染者の重症化が懸念されており、結核は世界規模の重要な公衆衛生問題として位置づけられている。しかしながら、結核治療には薬剤の長期投与が原則とされることや、薬剤耐性菌の出現・蔓延などにより治療が困難であることより、新規結核治療法の開発が切望されている。

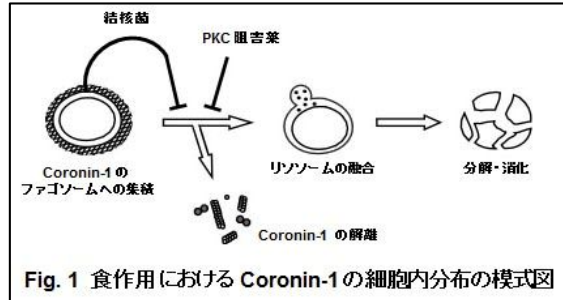
結核患者の多くは、結核菌の肺への感染が認められる (肺結核)。結核菌は肺胞マクロファージによって貪食されるにも拘わらず、マクロファージの殺菌作用に抵抗し、細胞内にて生存あるいは増殖する細胞内寄生細菌である。しかしながら、結核菌の細胞内寄生における分子機構は不明である。細胞内寄生機構の解明は、結核の新規治療法の開発に必須であると考えられた。

2. 研究の目的

食細胞は異物を認識した後、細胞内に取り込みファゴソーム (食胞) と呼ばれる小胞に内包する。その後、ファゴソームに消化酵素を多く含むリソソームが融合することで内包された異物は消化・分解される。しかしながら、結核菌を取り込んだファゴソームにはリソソーム融合が起こらず、その結果、結核菌は細胞内生存していることが知られている。これらの現象には、宿主マクロファージに発現する Coronin-1 が関与すると考えられている。Coronin-1 は貪食過程においてファゴソームに一過性に集積し、ファゴソームから解離した後リソソーム融合が起こるが、結核菌を取り込んだファゴソームでは Coronin-1 の解離が認められなかった。これらのことから、結核菌は Coronin-1 の機能を制御し、細胞内寄生性を獲得していることが示唆された。さらに、Coronin-1 に結合する結核菌成分が Lipoamide dehydrogenase C (LpdC) であることが示され、病原性因子であると考えられている。

本研究では、Coronin-1 と LpdC の結合性に

注目し、結核菌の細胞内寄生機構の解明を目指している。これまでに、Coronin-1 がファゴソームから解離する際にリン酸化されていること、細胞のプロテインキナーゼ C (PKC) 阻害薬処理により Coronin-1 がファゴソームから解離しないこと、Coronin-1 には 2 カ所のリン酸化部位が存在すること (Ser-2, Thr-412)、貪食過程において Thr-412 のリン酸化が起こることなどを明らかにしている (Fig. 1)。



3. 研究の方法

(1) 組換え型タンパク質の作製

M. bovis BCG および *M. smegmatis* よりゲノム DNA を調製した後、PCR 法にてそれぞれ LpdC または LpdA の遺伝子をクローニングし、Glutathione-S-transferase (GST) 融合型タンパク質 (GST-LpdC, GST-LpdA) の発現プラスミドを構築した。大腸菌にて発現させた後、グルタチオンアガロースを用いて精製した。

ポリヒスチジン (His) 融合型 Coronin-1 (His-Coronin-1) は、大腸菌にて発現させた後、ニッケルセファロースを用いて精製した。

(2) 抗 LpdC 抗体および抗 GST 抗体の作製

精製した GST-LpdC とフロイントアジュバントを混合しエマルジョンを作製した後、BALB/c マウスの腹腔に投与した。血清抗体価の上昇を確認し、脾細胞と骨髄腫細胞 (PA1) を融合させた。HAT 培地による選択と限界希釈により、抗 LpdC 抗体 (IgG1/k)、抗 GST 抗体 (IgG2a/k) 産生ハイブリドーマを樹立した。

(3) GST プルダウン法

グルタチオンアガロースに精製 GST 融合タンパク質を結合させた後、HL60 細胞のホモジネートや *M. bovis* BCG の培養上清などを加え両者の結合性を評価した。

(4) ELISA 法

抗 Coronin-1 抗体にて、HL60 ホモジネートより Coronin-1 をキャプチャーした後、GST 融合タンパク質を加え、ビオチン標識化抗 GST 抗体にて検出した。また、GST-LpdC をプレートに直接コーティングし、各種抗体を添加した後、HL60 ホモジネートを加え、ビオチン標識化抗 Coronin-1 抗体にて検出した。

4. 研究成果

精製 GST-LpdC に HL60 細胞のホモジネートを混合し結合性を評価した。その結果、作製した組換え体 LpdC に Coronin-1 結合活性があることが明らかになった (Fig. 2)。

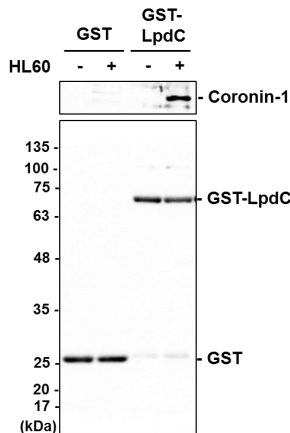


Fig. 2 GST-LpdC と Coronin-1 の結合

次に、上述の GST-LpdC を用いてモノクローナル抗体[clone 3F6]を作製した (Fig. 3A)。この抗体を用いて、*M. bovis* BCG 培養上清中の LpdC と GST-LpdC の結合性を評価した。その結果、組換え体 Coronin-1 に LpdC 結合活性があることが明らかになった (Fig. 3B)。

Coronin-1 と LpdC の結合はコレステロール依存性であると考えられているが、本結果より、コレステロールが必ずしも必要でないことが示された。また、His-Coronin-1 と GST-LpdC を用いた結合実験においても両者の結合が認められた (未掲載データ)。

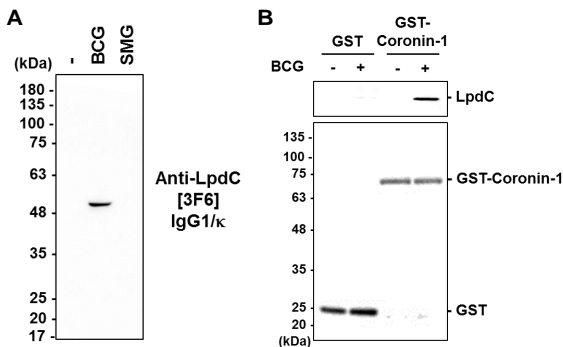


Fig. 3 GST-Coronin-1 と LpdC の結合

Coronin-1 のリン酸化と LpdC の結合性の関係を明らかにするために、HL60 細胞を刺激し Coronin-1 をリン酸化させた後、GST-LpdC との結合実験を行った。これまでに、Coronin-1 には、2 カ所のリン酸化部位が存在すること、Calyculin A 処理により Thr-412 がリン酸化されること、Calyculin A および PMA 処理により Ser-2 および Thr-412 がリン酸化されることを明らかにしている。

実験結果より、Thr-412 がリン酸化された Coronin-1 には LpdC が結合しないことが明らかになった (Fig. 4)。

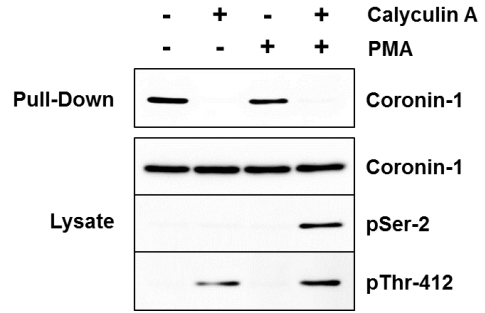


Fig. 4 Coronin-1 のリン酸化と LpdC への結合性

これまでの結果より、Coronin-1 と LpdC の結合は Thr-412 のリン酸化によって制御されている可能性が示された。そこで Thr-412 付近 (407-418 番目のアミノ酸) をエピトープとする抗 Coronin-1 抗体 (412pep) を前処理した His-Coronin-1 を用いて、LpdC との結合性について解析した。

その結果、本抗体により Coronin-1 の LpdC への結合は阻害されることが明らかになった (Fig. 5)。

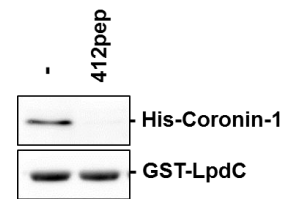


Fig. 5 抗 Coronin-1 抗体による結合阻害

非病原性の抗酸菌である *M. smegmatis* は LpdC のホモログである LpdA を産生することが知られている。両タンパク質はアミノ酸レベルで約 70% の相同性を示し、その差異はコレステロールへの結合性であると考えられている。本研究 Fig. 3 において、Coronin-1 と LpdC の結合にコレステロールを必要としないことが明らかになったため、Coronin-1 と LpdA の結合性について ELISA 法により解析した。その結果、LpdA は LpdC と同様に Coronin-1 に結合することが明らかになった (Fig. 6)。

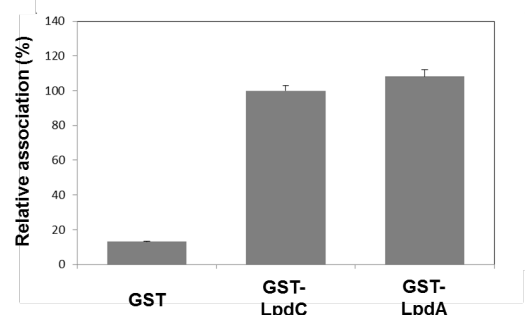


Fig. 6 LpdA, LpdC の Coronin-1 への結合

今回作製した抗LpdC抗体 [3F6]によるLpdCと Coronin-1 の結合阻害活性について ELISA 法にて解析した。その結果、この結合性は抗LpdC 抗体の存在下において変化は認められなかった (Fig. 7)。

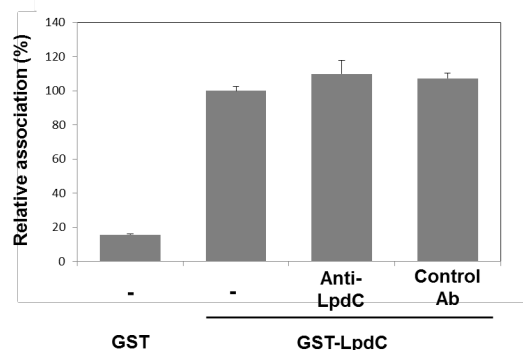


Fig. 7 抗LpdC抗体による結合阻害

これらの結果より、結核菌の産生するLpdCおよび組換え型LpdCが直接的にCoronin-1へ結合することが示された (Fig. 2, 3)。LpdCは、非病原性抗酸菌の産生するLpdAと異なりコレステロール結合コンセンサス配列を有することによりCoronin-1に結合するなどの機能的差異を発現していると考えられている。しかしながら、上述の結果およびLpdAへのCoronin-1の結合性 (Fig. 6)が認められたことより、未知の分子制御機構の存在が示唆された。実際にLpdCに3カ所存在するコレステロール結合配列を1カ所ずつLpdA型に変異させた変異型LpdCのCoronin-1への結合性に変化は認められなかった (未掲載データ)。結核菌と非病原性抗酸菌におけるこれらタンパク質の発現量や菌体外への分泌量など不明な点が多いため、これらの解析が今後必要になると考えられた。

Coronin-1とLpdCの相互作用を阻害することで、正常な貪食 (リソソーム融合) を進行させられると考え、LpdCに対するモノクローナル抗体を作製したが、今回得られた抗体 (3F6)は阻害活性を有さなかった (Fig. 7)。本抗体は、LpdC (465 アミノ酸残基) のC末端 (231-465 アミノ酸) 領域に結合することが明らかになったが (未掲載データ)、Coronin-1との結合領域を特定した上で、再度抗体を作製すべきだと考えた。一方、Coronin-1に対するモノクローナル抗体 (412pep) は、この相互作用を阻害したが (Fig. 5)、Coronin-1の正常な機能も阻害してしまう可能性があるため、治療法や予防法には向かないと考えられた。

Coronin-1がファゴソームから解離する際にThr-412のリン酸化が起こること、LpdCを産生する結核菌を取り込んだファゴソームからはCoronin-1が解離しないことより、Coronin-1のリン酸化とLpdCの結合について解析を行った。その結果、Thr-412がリン酸化したCoronin-1にはLpdCが結合しないことが示された (Fig. 4)。そこで、トレオニ

ン残基をアスパラギン酸残基に置換したリン酸化模倣体 Coronin-1 (T412D) を作製し、LpdCとの結合実験を行った。予想に反して、変異体 Coronin-1は野生型と同様にLpdCに結合した (未掲載データ)。アミノ酸置換によるリン酸化模倣では本現象は観察できない、またはCalyculin AがCoronin-1以外に与える影響に因るものか、詳細な解析が必要であると考えられた。

Thr-412をアラニン残基に置換した非リン酸化体 (T412A) Coronin-1を食細胞に発現させ貪食実験を行うことで、結核菌の感染モデルになると考えたが、この細胞では被食ビーズの取り込みが著しく低下していた。また、ビーズにGST-LpdCを固相化することによるモデル作製を試みたが、抗GST抗体を介した固相化方法や結合量に起因するためか、Coronin-1がファゴソームに維持されるモデルにはならなかった (未掲載データ)。

本研究によって明らかになった結果および課題を解明することで、結核菌感染における分子機構を明らかにして、新規治療法および予防法の開発に従事したい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

C. Kurisaka, T. Oku, S. Itoh, T. Tsuji, Role of sialic acid-containing glycans of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in the interaction between MMP-9 and staphylococcal superantigen-like protein 5, *Microbiol. Immunol.*, 2018, 62:168-175

Y. Ando, T. Oku, T. Tsuji, Platelet Supernatant Suppresses LPS-Induced Nitric Oxide Production from Macrophages Accompanied by Inhibition of NF- κ B Signaling and Increased Arginase-1 Expression, *PLoS One*, 2016, 11:e0162208

DOI: 10.1371/journal.pone.0162208

[学会発表] (計6件)

奥 輝明, 辻 勉, マスト細胞の活性化とCoronin-1のリン酸化の関係, 日本薬学会 第138年会, 2018年3月25-28日 (金沢)

奥 輝明, 相馬光里, 栗坂知里, 辻 勉, 黄色ブドウ球菌SSL5に対する抗体産生ハイブリドーマの樹立とその性質, 日本薬学会 第138年会, 2018年3月25-28日 (金沢)

Y. Ando, T. Oku, T. Tsuji, Attenuation by platelets of macrophage inflammatory responses to bacterial endotoxin, 2016 Mogan Mountain International Summit on

Green Pharmaceuticals, 2016年11月3-4日(浙江省, 中国)

奥 輝明, 安藤祐介, 辻 勉, IgE 依存的マスト細胞刺激時における Coronin-1 のリン酸化に關与する PKC アイソフォームの解析, 第 89 回 日本生化学会大会, 2016年9月25-27日(仙台)

T. Oku, Y. Ando, T. Tsuji, Coronin-1 regulates the Fc RI-mediated mast cell functions, International Congress of Immunology 2016, 2016年8月21-26日(メルボルン, 豪州)

T. Oku, T. Tsuji, An immunocyte-specific actin-binding protein Coronin-1 -phosphorylation and functional roles-, ISCA-Japan RCSI-Hoshi University Joint Seminar, 2016年4月21-22日(ダブリン, アイルランド)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥 輝明 (OKU, Teruaki)
星薬科大学・薬学部・講師
研究者番号: 20409361

(2) 研究協力者

安藤祐介 (ANDO, Yusuke)
金子 豊 (KANEKO, Yutaka)
並木俊和 (NAMIKI, Toshikazu)
平井 聡 (HIRAI, Satoshi)