

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16662

研究課題名（和文）結核菌RND型異物排出システムによる潜在的多剤耐性機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of multidrug resistance of RND-type multidrug efflux systems in Mycobacterium tuberculosis

研究代表者

山本 健太郎（Yamamoto, Kentaro）

国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・研究員

研究者番号：40832308

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）：結核菌RND型トランスポーターMmpL5が膜融合タンパク質と想定されるMmpS5の存在下で細胞膜上に固定されることを見出した。また、この固定されたMmpL5を蛍光褪色法によって解析した結果、三量体を構成することで薬剤排出活性を維持していることがわかった。さらに、精製したMmpL5とMmpS5が共沈して下ることから、MmpL5とMmpS5の直接的な結合が示唆された。

また、二成分制御系転写因子であるDevR, MtrA, NarL, PdtA発現下でMmpSL5の基質に対するMICが上昇したことから、環境刺激を二成分制御系を介して受容し、mmpSL5の発現を調整している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで仕組みが不明であった結核菌のRND型異物排出ポンプMmpSL5に着目した。その結果、MmpS5とMmpL5は直接的に相互作用を行い、1つのポンプを構築することが明らかとなった。また、大腸菌のような一般細菌と同様に環境刺激を受容し、異物排出ポンプの発現を制御していることも示唆された。これらは結核菌の基礎研究の分野に留まらず、抗結核薬が効きにくい非結核性抗酸菌症の耐性機構の解明につながることを期待できる。さらに、本研究を元に異物排出ポンプの活性阻害をするような創薬・多剤耐性菌治療への応用にも期待ができ、人々の健康増進への寄与という大きな波及効果が期待できるものである。

研究成果の概要（英文）：We found that the Mycobacterium tuberculosis RND transporter MmpL5 is fixed on the inner membrane in the presence of MmpS5, which is a putative membrane fusion protein. Photobleaching analysis of the fixed MmpL5 revealed that it maintains its drug efflux activity by forming a trimer. Furthermore, purified MmpL5 and MmpS5 were coprecipitated, suggesting direct binding of MmpL5 and MmpS5.

In addition, the MIC of substrates of MmpSL5 increased under the expression of two-component regulatory transcription factors, DevR, MtrA, NarL, and PdtA, suggesting that MmpSL5 may accept environmental stimuli via the two-component regulatory system and regulate the expression of mmpSL5.

研究分野：細菌学

キーワード：結核菌 一分子イメージング 多剤耐性 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

結核は世界三大感染症の1つであり、年間で170万人の死者を出している。また、複数の抗生物質に耐性を持つ多剤耐性株の発生も脅威となっており、2016年には60万症例が報告された。このように多剤耐性結核菌の出現は世界的な問題となっている。結核菌の多剤耐性機構の多くは薬剤の標的タンパク質の点変異で説明が可能であるが、薬剤の種類によっては耐性株の20~30%においては変異が存在しないにも関わらず耐性化を示す。このような多剤耐性化の要因の1つに薬剤の能動的排出が考えられ、この仕組みの代表格ともいえるのがRND (resistance-nodulation-cell division) 型異物排出ポンプである。典型的なRND型ポンプは以下の3つのコンポーネントから構成される。基質を捕獲・輸送する「内膜トランスポーター」、内膜トランスポーターから輸送される基質の輸送通路である「外膜チャネル」、両者を構造的・情動的に繋ぐ「膜融合タンパク質」である。膜融合タンパク質は内膜トランスポーターの基質捕獲時に生じる微細な構造変化情報を外膜チャネルへと伝達することで、外膜チャネルの入口を開口し、基質薬剤の輸送を媒介すると考えられる。このようなRND型異物排出ポンプはグラム陰性菌において広く知られているが、結核菌においてはほとんどその詳細がわかっていない。結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株では薬剤排出をはじめ、脂肪酸代謝や宿主への感染制御に関わる13種類のRND型内膜トランスポーターMmpLが発見され、その内MmpL5とMmpL7が薬剤排出能を持つことが示唆されている。また、結核菌の膜融合タンパク質と推定されるMmpS5の遺伝子はmmpL5と同一オペロン上にコードされているが、MmpL7には膜融合タンパク質に相当するような遺伝子は見つかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、以下の2つの実験を背景に結核菌の潜在的な多剤耐性機構の解明を目的とする。

(1) 一分子イメージングによるRND型異物排出ポンプの構築過程解明

これまでの結核菌RND型ポンプの研究は、その多くが過剰発現による排出基質の特定や表現系の解析を行うことだった。本研究では、これらの研究の基礎にあるMmpLがこれまで知られているようなRND型ポンプ複合体を形成するのか、それとも結核菌特有の仕組みを示すのかという根本的な問を解決する。

(2) 二成分制御系レスポンスレギュレーターのRND型トランスポーター発現制御機構解明

MmpLは薬剤の排出の他、代謝を含めた様々な細胞機能の維持に寄与している。このようなタンパク質群は構成的な発現ではなく、外的環境に応じて発現を制御されている可能性が高い。そこで、細菌に広く保存される細胞情報伝達システムである二成分制御系に焦点をあて、これらが結核菌RND型ポンプの発現を制御しているかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 結核菌内膜トランスポーターと緑色蛍光タンパク質GFPとの融合タンパク質を結核菌近縁種である *M. bovis* BCG に発現させる系を構築する。これを全反射蛍光顕微鏡により細胞膜上でのリアルタイムの動態解析、膜融合タンパク質の有無による拡散係数の差からRND型異物排出ポンプの構成を調べる。また、一輝点の輝度分布・褪色段階のモニタリングを組み合わせることで、トランスポーターがどのように振る舞い、分子間相互作用・多量体化するのかを可視化し、これまで不明であった結核菌RND型異物排出ポンプの複合体構築過程を明らかにする。

(2) 発光酵素ルシフェラーゼ融合レポータープラスミドをベクターとし、レポーター上流に各mmp(S)L遺伝子のプロモーター領域を挿入したプラスミドと、各RR遺伝子を挿入したプラスミドをそれぞれ構築する。これらのプラスミドを大腸菌株に形質導入し発光強度を測定、プロモーター活性を算出する。

4. 研究成果

(1) MmpL5はMmpS5存在下で抗抗酸菌薬に対する排出活性を獲得する

結核菌のMmpL5活性に対するMmpS5の影響を調べるため、両者のホモログ遺伝子を欠損させた *M. bovis* BCG 株を構築し、MmpS5の存在下または非存在下で、各株におけるベダキリン(BDQ)、クロファジミン(CFZ)、クラリスロマイシン(CLR)の最小阻害濃度(MIC)を測定した(表.1)。MmpL5をMmpS5とともに発現している株はBDQおよびCFZに対するMICが空ベクターを搭載した株に比べて大幅に高くなったが、CLRに対してはMICの上昇は認められなかった。一方、MmpL5単独発現株ではBDQとCFZに対するMICはまったく変化がなかった。これらのことから、トランスポーターMmpL5が薬剤を排出するためにはMmpS5が必要であること

Drug	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	ΔmmpS5					WT
	L5	L5-GFP	S5-L5	S5-L5-GFP	Vector	Vector
BDQ	0.125	0.125	4	4	0.125	2
CFZ	0.25	0.25	1	1	0.25	1
CLR	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16

表.1 各コンポーネントを保持する場合のMIC

が示唆された。

(2) MmpS5 が MmpL5 を細胞内膜に繋ぎ止め、三量体化させる

次に抗酸菌内膜における MmpL5-GFP の動態を調べるため、全反射蛍光顕微鏡 (TIRF) を用いて 1 分子観察を行った (図. 1-2)。その結果、MmpL5-GFP は MmpS5 が存在する場合は横方向への移動が極めて限定的であるのに対し、MmpS5 が存在しない場合は内膜全体に側方拡散した (図. 1A)。輝点の軌道を図示したものが図 1B であり、この図から MmpL5 が膜に沿ってランダムに拡散していると考えられる。また、MmpL5-GFP の移動距離を平均二乗変位 (Mean square displacement; MSD) として表した。その結果、MmpS5 存在下では MmpL5-GFP の MSD は $0.08 \times 10^{-2} \sim 0.18 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$ の範囲に分布した (平均値 $= 0.13 \times 10^{-2} \pm 0.03 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$) (図. 2A, B)。一方で、MmpS5 非存在下では、MmpL5-GFP の MSD は非常に大きく ($2.80 \times 10^{-2} \sim 9.10 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$)、平均値は $5.69 \times 10^{-2} \pm 1.84 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$ だった (図. 2A, B)。これらの MSD- Δt プロットから算出される MmpS5 存在下および非存在下の拡散係数 (D) は、それぞれ $5.8 \times 10^{-4} \pm 2.2 \times 10^{-4}$ および $3.4 \times 10^{-2} \pm 1.7 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{sec}$ だった。これらのデータは、MmpS5 が存在し MmpL5 の動きが制限されている “fixed” 状態と、MmpS5 非存在下での MmpL5 が自由拡散している “mobile” 状態との間で MmpL5 の動態が約 100 倍異なることを示している。

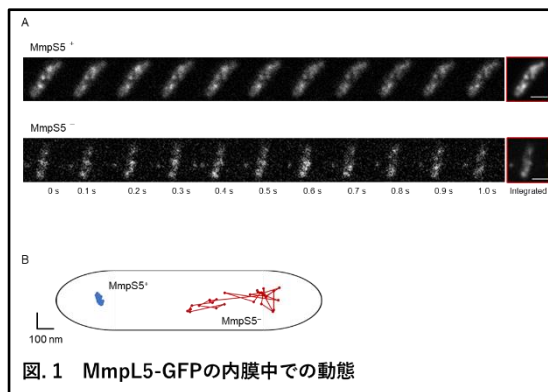


図. 1 MmpL5-GFPの内膜中での動態

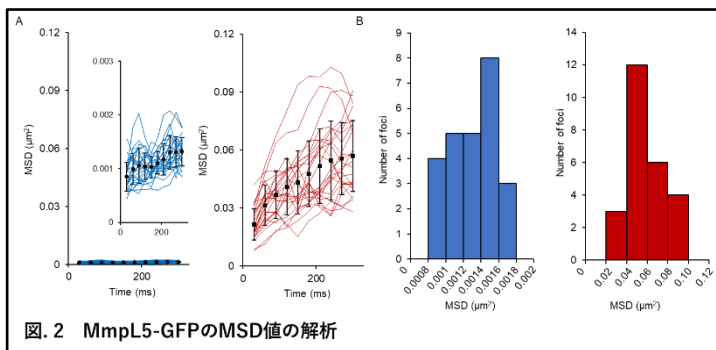


図. 2 MmpL5-GFPのMSD値の解析

(3) 固定された MmpL5 は MmpS5 存在下でホモ三量体を形成する

次に、fixed 型の MmpL5-GFP の輝点が単一分子で構成されているか、もしくはオリゴマーで構成されているかを確認するために、GFP 蛍光強度の time-course 解析を行った。エッジ検出法を用いて intensity- Δt プロットを計算した結果、輝点の強度は時間経過とともに 3 段階の蛍光褪色パターンを示した (図. 3A)。MmpS5 存在下での初期フレームにおける強度値の分布は 6,000~6,500 (a.u.) でピークを示した。本実験条件下では GFP1 分子のステップサイズは 2012 ± 243 (a.u.) に相当することから、この値は推定される単一 GFP 分子の強度よりも約 3 倍高いことを示している (図. 3B)。一方、MmpS5 非存在下では、その輝度の値は 2,000 をピークに狭い範囲にとどまった。これらの結果から、MmpL5-GFP が MmpS5 の存在下で三量体を形成し、ポンプとしての排出活性を獲得することが示唆される。

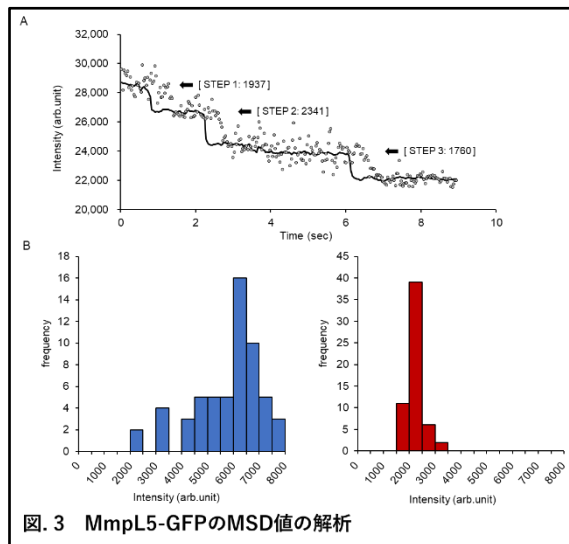


図. 3 MmpL5-GFPのMSD値の解析

(4) MmpS5 と MmpL5 の直接的結合は基質薬剤の存在下で促進される

さらに、MmpS5 と MmpL5 が直接的に相互作用している証拠を得るために、MmpS5 は大腸菌、MmpL5 は *M. smegmatis* を宿主とした発現・精製系を構築し、タンパク質相互作用の解析を行った。MmpS5- ΔTM (膜貫通領域を欠如している) と MmpL5 をそれぞれ His-tag でラベルし精製し、これらのタンパク質を超遠心分離すると MmpS5- ΔTM は遠心後の上清側に、MmpL5 は沈殿側に分画された。しかし、MmpS5- ΔTM と MmpL5 を混合してから超遠心分離を行うと、MmpS5- ΔTM が沈殿画分に存在することがわかった。コントロール群として野生型 *M. smegmatis* の全膜画分を MmpS5 と混合して泳動を行ったが、MmpS5 は上清画分に分画されたままだった。これらの結果は MmpS5 と MmpL5 の直接的

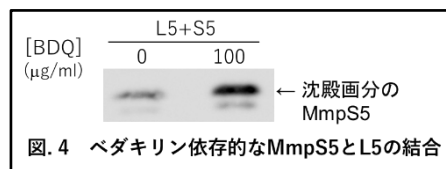


図. 4 ベダキリン依存的なMmpS5とL5の結合

な結合を示唆している。また、MmpL5 が排出する基質である BDQ を MmpS5 と MmpL5 のタンパク質混合液に添加すると、BDQ の濃度依存的に沈殿画分に分画される MmpS5 の量が増加した (図. 4)。これは排出する基質の存在が MmpS5-MmpL5 複合体の安定化、もしくは複合体構築を促進している可能性を示している。

(5) 二成分制御系により MmpSL5 の発現は制御されている

pLux ルシフェラーゼアッセイシステムを用いて、結核菌の二成分制御系レスポンスレギュレーター (RR) の全てについて *mmpS5-mmpL5* の発現調整機能を持っているかどうかを検証した。具体的には *mmpSL5* のプロモーターを搭載した pLux システムを構築した大腸菌において、結核菌 RR をアラビノース誘導型のプラスミドを用いて発現させ、各 RR による転写活性を調べた。その結果、DevR, MtrA, NarL, PdtA の 4 つが *mmpS5-mmpL5* プロモーターを活性化する可能性が示唆された (1.3 倍以上の発光輝度の上昇を目安とした) (図. 5)。さらに、これらの RR をプラスミド上から *M. bovis* BCG に強制発現させ BDQ と CFG に対する MIC を測定した。その結果、DevR, MtrA, PdtA 発現 BCG において、ベダキリンに対する MIC が二倍に上昇、また、NarL 発現 BCG ではクロファジミンに対する MIC も上昇した。このことから薬剤排出ポンプである MmpSL5 は環境刺激を二成分制御系を介して受容し、その発現を調整している可能性が示唆された。この結果をさらに強化するために、RR と当該プロモーター領域の DNA 配列との結合を解析する必要がある。

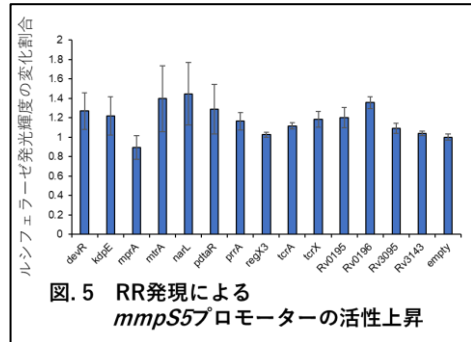


図. 5 RR発現による *mmpS5*プロモーターの活性上昇

結核菌は外環境中からの刺激を受容し異物排出ポンプ MmpS5-MmpL5 複合体を発現、構築することが示唆された (図. 6)。この際、MmpS5 は MmpL5 と直接結合することで MmpL5 のホモ三量体化を促し、複合体を細胞膜中に固定させる役目を担っている。また、この複合体形成は基質となる薬剤の存在下でより促進することが示唆される。さらなる研究は必要ではあるものの、本研究成果により異物排出ポンプによる結核菌の多剤耐性化の仕組みの一端が明らかになった。これらを活用することで、MmpL の三量体化や MmpS と MmpL の結合を阻害するような新たな抗結核薬 (もしくは抗抗酸菌薬) の開発に繋がるのが期待される。

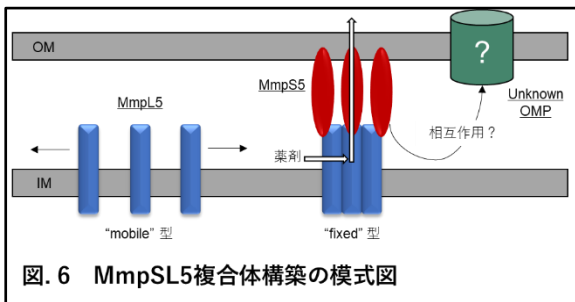


図. 6 MmpSL5複合体構築の模式図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Kentaro, Nakata Noboru, Mukai Tetsu, Kawagishi Ikuro, Ato Manabu	4. 巻 6
2. 論文標題 Coexpression of MmpS5 and MmpL5 Contributes to Both Efflux Transporter MmpL5 Trimerization and Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00518-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00518-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kentaro Yamamoto, Noboru Nakata, Tetsu Mukai, Manabu Ato
2. 発表標題 Molecular imaging to study intracellular dynamics of the RND-type xenobiotic efflux transporter MmpL in Mycobacterium tuberculosis
3. 学会等名 第93回日本細菌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川端 美希子, 山本 健太郎, 田島 寛隆, 阿戸 学, 川岸 郁朗
2. 発表標題 結核菌異物排出系複合体コンポーネント間の相互作用
3. 学会等名 第105回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 健太郎, 辻村 祐佑, 鳥越 祥太, 阿戸 学
2. 発表標題 留置カテーテルに形成されるバイオフィルムに起因した全身播種性NTM症マウスモデルの構築
3. 学会等名 第105回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 健太郎, 辻村 祐佑, 鳥越 祥太, 前田 百美, 深野 華子, 星野 仁彦, 阿戸 学
2. 発表標題 非結核性抗酸菌症におけるヒト様病態を反映した動物モデルの構築とin vivoイメージングの応用
3. 学会等名 In vivoイメージングフォーラム2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関