

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 9 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860329

研究課題名(和文) 結核菌のニューキノロン耐性に係る遺伝子変異の解析及び結晶構造解析

研究課題名(英文) Functional and structural analysis of DNA gyrase from Beijing strain M. tuberculosis

研究代表者

金 玄 (Kim, Hyun)

国立感染症研究所・その他部局等・主任研究官

研究者番号：90648817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：キノロン系抗菌薬は結核症の治療に有用であり、その標的部位はDNAジャイレースである。近年、キノロン系抗菌薬に耐性を示す結核菌の出現が問題となっており、DNAジャイレースの変異が耐性菌出現の要因となっている。DNAジャイレースの変異と耐性獲得機構の詳細な関連性を明らかにするためには、DNAジャイレースの立体構造情報が必要不可欠である。それで本研究では、結核菌由来DNAジャイレース上のアミノ酸置換とキノロン耐性との関係を明らかにすることで結核菌由来DNAジャイレースの立体構造を決定するとともに詳細な構造と機能の相関を明らかにすることを目的とした。

研究成果の概要(英文)：Emergence of multidrug-resistant (MDR) tuberculosis is becoming an increasing public health problem and poses a serious threat to TB control. Therefore, novel anti-TB drugs are needed urgently. The outbreak of MDR-TB leads fluoroquinolones to becoming an important second-line anti-TB agent. The major target of FQs is DNA gyrase consisted of two subunits GyrA and GyrB. FQs-gyrase interaction site is thought to be located at QRDRs in GyrA and GyrB where the majority of mutations conferring resistance to FQs exist. Recently, FQs-resistant M. tuberculosis is dramatically increased. However, the mechanisms of correlation between MtDNA gyrase and FQs-resistance are still not clearly understood. In this study, we examined and investigated an association between FQs and mutants GyrA subunits from Beijing strain by using inhibition assays. Furthermore, we demonstrated the different structures of MtDNA gyrases, between H37Rv and Beijing strain DNA GyrA (N-term) from structural analysis.

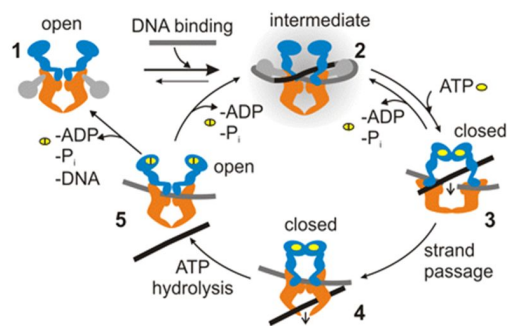
研究分野：細菌学、薬剤耐性結核学

キーワード：結核菌 薬剤耐性菌 X線回折 立体構造解析 DNAジャイレース ニューキノロン

1. 研究開始当初の背景

(1) 結核は全世界で毎年約 960 万人の新規登録患者と、約 150 万人の死亡者を出している重要な慢性感染症である (Global tuberculosis control 2015, WHO)。近年、薬剤に耐性を示す結核菌 (多剤耐性及び超多剤耐性結核菌を含む) が報告されるようになり、耐性獲得機構の解明が急務となっている。

(2) キノロン系抗菌薬は結核症の治療に有用であり、その標的部位は DNA ジャイレースである。DNA ジャイレースは細菌が持つ DNA トポイソメラーゼ II 型の一つであり、細菌の DNA 複製には欠かせないため生育には必須である。結核菌由来の DNA ジャイレースは GyrA、GyrB と呼ばれる 2 種類のサブユニット 2 組の 4 量体を形成しており、活性の発現には多量体の形成が必要である。DNA ジャイレースの A サブユニットは二本鎖 DNA の巻き戻しに関与しており、キノロン結合部位である Quinolone Resistance-Determining Regions (QRDRs) を持っている。B サブユニットは ATP 加水分解活性を有しており、DNA ジャイレースの活性化を誘導する機能を担っている (参照、図 1)。近年、キノロン系抗菌薬に耐性を



Gubaev, A et al. 2011. Proc Natl Acad Sci USA 34:14085-14090.

図1. DNAジャイレースの活性

示す結核菌の出現が世界中で問題となっており、DNA ジャイレースのアミノ酸変異が耐性菌出現の要因となっていることが知られている。キノロン耐性結核菌の多くでは QRDRs にアミノ酸変異が存在しているが、その以外の部位にアミノ酸変異が存在している例も少なくない。しかしながら、これまで

の研究においては DNA ジャイレース上の変異部位同定までが主に行われており、アミノ酸変異とキノロン耐性機構との関連を明らかにする研究は進んでいない。そのため、DNA ジャイレースの変異とキノロン耐性獲得機構の詳細な関連性を明らかにするためには、DNA ジャイレース変異体の立体構造情報が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、キノロン耐性結核菌の遺伝子変異検出を基盤とした迅速なニューキノロン感受性試験を可能とするために、キノロンのターゲットである結核菌の DNA ジャイレース上のアミノ酸置換とキノロン耐性との関係を明らかにすることで結核菌由来 DNA ジャイレースの結晶化を行い、得られた結晶を用いた X 線結晶構造解析により、その立体構造を決定するとともに詳細な構造と機能の相関を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 北京株の変異株由来結核菌 DNA ジャイレース A サブユニット遺伝子構築、発現及び精製: 実験用株である結核菌 H37Rv 株とキノロン耐性株である結核菌北京株から、DNA ジャイレースである GyrA の N 末端部分 (502 アミノ酸残基分) をコードする遺伝子をそれぞれ PCR 反応によって増幅させた後、発現用ベクターに挿入したプラスミドを構築した。作製したプラスミドをそれぞれ発現用の大腸菌 (Rosetta-gami2(DE3)pLysS) に導入して発現系を構築し、IPTG 誘導による目的タンパク質の過剰発現が確認された株について大量培養を行った後、菌体を集菌した。超音波破碎装置を用いて細胞内画分を抽出した後、FPLC を用いて 2 種類のカラム (ニッケルガロースカラムアフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィー) 操作により、SDS-PAGE 上でほぼ目的タンパク質のみ

が検出される状態になるまで、H37Rv 株由来 GyrA (N 末端) と北京株由来 GyrA (N 末端) の精製を行った。

(2) 北京株の変異株由来結核菌 DNA ジャイレースの酵素活性：野性型及び変異型 DNA ジャイレースは Relaxed DNA 及び Supercoiled DNA を用いた DNA Supercoiling assay 及び DNA Cleavage assay で活性を評価した。さらに色々なキノロンを加え阻害実験も行った。

(3) 北京株由来結核菌 DNA ジャイレースの結晶化：得られた精製 H37Rv 株由来 GyrA (N 末端) と北京株由来 GyrA (N 末端) について、市販の結晶化スクリーニングキットを用いて、約 1,000 種類の結晶化条件の中から最適な結晶化条件を決定した。得られた結晶を用いて高エネルギー加速器研究機構で X 線回折データの収集を行い、結晶学的諸性質を決定した。

#### 4. 研究成果

(1) 変異型 (H37Rv標準株と 北京株)の組換えDNAジャイレースを用いて酵素学的諸性質を決定することとともに、キノロン耐性獲得機構との関連についての解析。変異型DNAジャイレースは活性を持つことを確認した。さらにキノロンを加えた阻害実験を行った結果、キノロン耐性決定領域 (QRDRs) 外側に存在している2つのアミノ酸残基 (74番目と

95番目のアミノ酸残基)がキノロン耐性獲得に重要な役割を果たしていることを明らかにした (参照、図2)。

(2) 北京株由来結核菌 DNA ジャイレースの精製と結晶化。組換え DNA ジャイレースはニッケルガロースカラムアフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーを用いて2段階で精製を行った (参照、図3-A)。精製した H37Rv 株由来 GyrA (N 末端) と北京株由来 GyrA (N 末端) のそれぞれについて、結晶化条件のスクリーニングを行った。その結果、X 線測定が可能な結晶を作製することができた (参照、図3-B)

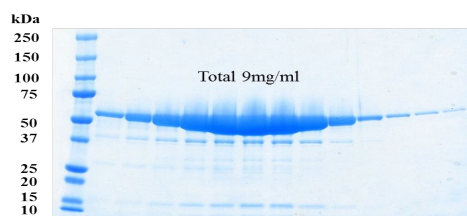


図3-A. Purification of Osaka WT DNA gyrase using FPLC

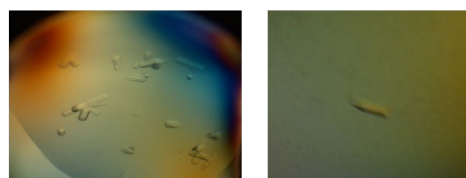


図3-B. Crystal structure of Osaka WT DNA gyrase

(3) 北京株由来結核菌の結晶構造解析。H37Rv株由来GyrA (N末端) と北京株由来GyrA (N末端) の結晶は主に空間群C222<sub>1</sub>に属していることが示された。さらに、収集したX線回折データから結晶学的諸性質と統計値を求めた結果、得られた結晶は立体構造の決定に適していることが示された。そこで、すでに報告されている結核菌標準株 (H37Rv株) 由来GyrA (N末端部分) の構造情報 (PDB番号: 3IFZ) を用いて、分子置換法による北京株由来GyrA (N末端部分、502アミノ酸残基) の立体構造決定を実施した。CCP4プログラム、並びにPHENIXプログラムを用いてモデルの構築と精密化を行い、最終的に2.1Åの分解能で

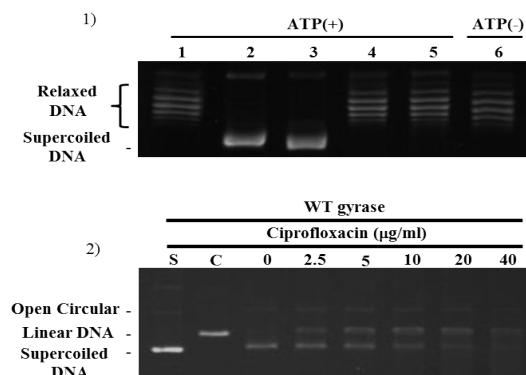


図2. Supercoiling assay and Cleavage assay  
1) DNAジャイレース supercoiling 活性  
2) DNAジャイレース cleavage 活性

北京株由来GyrA (N末端部分) の立体構造を決定した。決定した北京株由来GyrA (N末端部分) の立体構造をH37Rv株由来GyrA (N末端部分) の立体構造と比較すると、N末端部分の構造が異なっていることを明らかにした (参照、図4)。

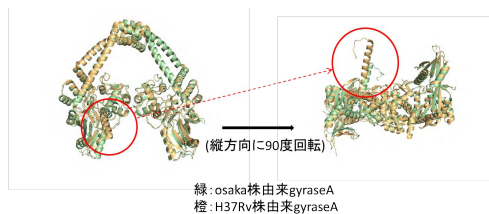


図4. 結核菌osaka株由来GyrA (N末端部分) と結核菌H37Rv株由来GyrA (N末端部分) の構造比較

(4) 本研究において結核菌由来 DNA ジャイレースの立体構造を決定し、その詳細な構造と機能の相関を明らかにすることはキノロン系抗菌薬に対する耐性獲得機構の解明に結びつくことが期待される。さらに将来的には、得られた成果を利用することによって、キノロン耐性結核菌の迅速な検出法の開発や既存のキノロン系抗菌薬を改良した新規抗結核薬の開発に発展することが期待される。今後、キノロン耐性を示す北京株の変異株由来GyrA変異体の立体構造をX線結晶構造解析によって決定し、GyrAのnative体との構造比較を行う予定である。また、GyrA変異体とDNA並びに各種キノロン系抗菌薬 (Ciprofloxacin, Moxifloxacin 及び Sitafloxacin 等) との複合体の立体構造解析も試みる。

## 5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計10件)

Ruchirada Changkwanyeon, Tomoyuki Yamaguchi, Siriporn Kongsoi, Kanjana Changkaew, Kazumasa Yokoyama, Hyun Kim, Orasa Suthienkul, Masaru Usui, Yutaka Tamura, Chie Nakajima, Yasuhiko Suzuki. Impact of mutations in DNA gyrase genes

on quinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Drug testing and Analysis, 査読有、2016、

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dta.1937/abstract;jsessionid=824C38154DD25620F638CF954F5F4240.f01t04>

Ruchirada Changkwanyeon, Masaru Usui, Siriporn Kongsoi, Kazumasa Yokoyama, Hyun Kim, Orasa Suthienkul, Kanjana Changkaew, Chie Nakajima, Yutaka Tamura, Yasuhiko Suzuki. Characterization of *Campylobacter jejuni* DNA gyrase as the target of quinolones, Journal of Infection and Chemotherapy, 査読有、Vol. 21, No. 8, 2015、pp. 604-609、<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2015.05.003>.

Naoko Honda, Hyun Kim, Emiko Rimbara, Atsushi Kato, Keigo Shibayama, Shigetaro Mori. Purification and functional characterization of diadenosine 5,5'''-P1,P4-tetraphosphate phosphorylases from *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium avium*, Protein expression and purification, 査読有、Vol. 112, 2015, pp. 37-42、<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2015.04.010>.

Shigetaro Mori, Hyun Kim, Emiko Rimbara, Keigo Shibayama. Roles of Ala-149 in the catalytic activity of diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有、Vol. 79, No. 2, 2015, pp. 236-238、

<http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2014.973364>.

鈴木定彦、山口智之、金 玄、横山和正、中島千絵。結核研究からハンセン病研究へ：分子生物学的見地から、日本ハンセン病学会雑誌、査読有、Vol. 83、No. 3、2014、pp. 21-27、  
[https://www.jstage.jst.go.jp/browse/hansen/83/0/\\_contents/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/hansen/83/0/_contents/-char/ja/)。

Hyun Kim, Keigo Shibayama, Emiko Rimbara, Shigetarou Mori. Biochemical characterization of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and inhibition of its activity by pyrazinamide、PLoS One、査読有、Vol. 9、No. 6、2014、pp. e100062、  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0100062>。

Hyun Kim, Yeongjin Hong, Keigo Shibayama, Yasuhiko Suzuki, Nobutaka Wakamiya, Youn Uck Kim. Functional analysis of the receptor binding domain of SARS coronavirus S1 region and its monoclonal antibody、Genes and Genomics、査読有、Vol. 36、No. 3、2014、pp. 387-397、DOI : 10.1007/s13258-014-0186-9。

Emiko Rimbara, Shigetarou Mori, Hyun Kim, Keigo Shibayama. Role of -glutamyltranspeptidase in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection、Microbiology and Immunology、査読有、Vol. 57、No. 10、2013、pp. 665-673、DOI : 10.1111/1348-0421.12089。

Emiko Rimbara, Mari Matsui,

Shigetarou Mori, Satowa Suzuki, Masato Suzuki, Hyun Kim, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Keigo Shibayama. Draft genome sequence of *Helicobacter fennelliae* strain MRY12-0050, isolated from a bacteremia patient、Genome Announcements、査読有、Vol. 1、No. 4、2013、pii. e00512-13、DOI : 10.1128/genomeA.00512-13。

Emiko Rimbara, Shigetarou Mori, Hyun Kim, Mari Matsui, Satowa Suzuki, Shunji Takahashi, Satoshi Yamamoto, Masaya Mukai, Keigo Shibayama. *Helicobacter cinaedi* and *H. fennelliae* transmission in a hospital from 2008 to 2012、Journal of Microbiology、査読有、Vol. 51、No. 7、2013、pp. 2439-2442、DOI : 10.1128/JCM.01035-13。

[学会発表](計10件)

金 玄 他、Identification of *katG* gene mutations associated with isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*、第89回日本細菌学会総会、平成28年3月、大阪府・大阪市

金 玄 他、ピラジナミド耐性結核菌のキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの機能解析についての研究、第87回日本ハンセン病学会総会・学術大会、平成26年9月、埼玉県・所沢市

Hyun Kim 他、Enzymatic activity of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and inhibition of its activity by pyrazinamide、14th International Union of Microbiological Societies Congresses (IUMS)、平成26年7-8月、モンテリオール(カ

ナダ)

森茂太郎 他、*Mycobacterium avium* 由来 MAV\_3489 と *M. smegmatis* 由来 MSMEG\_2932 の機能と構造、第87回日本細菌学会総会、平成26年3月、東京都・江戸川区

Ruchirada Changkwanyeeun 他、Impact of mutations in DNA gyrase genes on fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*、第87回日本細菌学会総会、平成26年3月、東京都・江戸川区

金 玄 他、結核菌DNAジャイレースにおけるキノロン耐性決定領域外に見出されたアミノ酸置換のキノロン剤耐性への影響、第87回日本細菌学会総会、平成26年3月、東京都・江戸川区

Hyun Kim 他、Enzymatic activities of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv、53<sup>rd</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)、平成25年9月、デンバー（アメリカ）

Shigetarou Mori 他、Structural Insights into a Novel Diadenosine Tetraphosphate Phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis*、US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan、平成25年8月、北海道・札幌市

金 玄 他、結核菌DNAジャイレース上の菌系統特異的アミノ酸多型のキノロン剤耐性への影響、第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会、平成25年5月、埼玉県・大宮市

金 玄 他、結核菌DNAジャイレースにおけるキノロン耐性決定領域外に見出されたアミノ酸置換のキノロン剤耐性への影響、第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会、平成25年5月、埼玉県・大宮市

[その他]

(1) 「結核菌由来キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラ - ゼの機能とピラジナミドの新規作用機序の解析に関する研究」を行い、抗結核薬の一つであるピラジナミドの新しい作用機序として、ピラジナミドが結核菌のキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラ - ゼの活性を阻害することを明らかにした（主な発表論文等 番、学会発表 、 、 番参照）。

(2) 本研究課題実施期間中、他の業務としてBCG ワクチンや精製ツベルクリンの国家検定実験(品質評価など)も実施した。

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

金 玄 (KIM, Hyun)

国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官

研究者番号：90648817