

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 5 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860331

研究課題名(和文)結核菌オートファゴソーム形成におけるPE\_PGRS62の役割

研究課題名(英文)The role of PE\_PGRS62 in autophagosome formation by Mycobacterium tuberculosis

研究代表者

祝 弘樹(Hiroki, Iwai)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：70443116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エピソーマルなpUV15由来プラスミドを使用したTetRにコントロールされたPE\_PGRS62タンパク質を誘導発現する結核菌を作りました。容易に十分な蛍光発光を与えるために、エピトープタグ(5×Myc)を付加しました。赤い蛍光タンパク質(3×mCherry)は結核菌 PE\_PGRS62で互換性を持つpMV306由来プラスミドによって同時発現されました。3×mCherryを発現した結核菌の表面にPE\_PGRS62-5×Mycの局在を観察しました。結核菌PE\_PGRS62が菌体外へ存在しており、エフェクタータンパク質として機能することを示唆します。

研究成果の概要(英文)：The localization studies of PE\_PGRS62 in *M. smegmatis* were reported, but its localization using microscopes is not examined in *M. smegmatis* and *M. tuberculosis*. Because over expression of PE\_PGRS62 affects the growth of them. To examine the localization of PE\_PGRS62, we created an *M. tuberculosis* strain expressing PE\_PGRS62 protein using TetR controlled gene expression system, an episomal pUV15 derivative (HygR). PE\_PGRS62 was tagged with a repeat epitope-tags (5×Myc) to give the enough fluorescent signal with ease. A repeat red-fluorescent protein (3×mCherry) was co-expressed by a compatible pMV306 derivative (ZeoR) with the episomal plasmid in *M. tuberculosis*. PE\_PGRS62 deletion mutant, which was removed HygR gene. We observed the surface localization of PE\_PGRS62-5×Myc on 3×mCherry-expressed *M. tuberculosis*. This present study strongly suggests that PE\_PGRS62 is surface exposed in *M. tuberculosis* and functions as an effector into the extracellular environment.

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。しかし、PE\_PGRS ファミリータンパク質の機能はほとんどわかっていない。PE\_PGRS タンパク質は結核菌が有する5つのタイプ VII 分泌装置のひとつ ESX-5 システムの基質分子であることが推定されている。これまでの研究から、PE\_PGRS33 (Rv1818c) が N 末端の PE 領域を介して結核菌の細胞壁に局在し、別の PE\_PGRS ファミリータンパク質のひとつである PE\_PGRS30 は病原性タンパク質として同定され、PE\_PGRS タンパク質の機能が断片的に明らかとなってきた。

## 2. 研究の目的

結核菌はマクロファージ内でタイプ VII 分泌機構を介して、結核菌ファゴソームにポア形成を誘導し、ダメージを受けた結核菌ファゴソームが新たにオートファゴソームに包みなおされると考えられている。我々の研究グループで新たに結核菌病原性タンパク質 PE\_PGRS62 (別名 Rv3812) を同定した。予備的な実験を行ったところ、PE\_PGRS62 はオートファゴソーム形成に重要な役割を担う LC3 と結合した。したがって、本研究では PE\_PGRS62 がどのようにオートファゴソーム形成を制御しているかを明らかにすることを研究目的とする。

また、PE\_PGRS62 の誘導発現できる結核菌を作製する。菌体での局在、分泌性について調べる。

## 3. 研究の方法

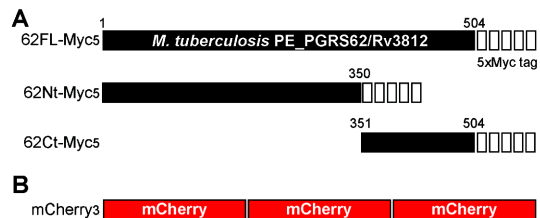
PE\_PGRS62 が有している推定のトランスメンブレン領域 (TM) が、宿主細胞内で働いているかどうかを、オートファゴソームとリソソームの融合阻害と関係づけて調べる。

PE\_PGRS62 を誘導発現させるため、pUV15 を用いた無水テトラサイクリン発現系を構

築した。これまでに PE\_PGRS62 を過剰発現させると菌の発育に影響がでることが分かっていたことから、無水テトラサイクリンで PE\_PGRS62 を誘導発現させた際に結核菌が生育できることを確認した (7H10/ADC 液体培地で培養、OD530 を測定した)。

しかしながら、誘導発現した PE\_PGRS62 を検出することが難しかったため、検出感度を上げる目的で PE\_PGRS62 に5回繰り返し Myc タグを融合した。これまでの研究から、無水テトラサイクリン誘導には 72~96 時間刺激が必要であることが示唆されていたが、1~2 週間の無水テトラサイクリン刺激により効率的に PE\_PGRS62 を発現できることがわかった。

種々の PE\_PGRS62-Myc5 と同時に赤色蛍光タンパク質を発現させるため、1 コピーで十分な蛍光を得られる 3 回繰り返し mCherry を作製した (下図)。



## 4. 研究成果

PE\_PGRS62 株が弱毒化し、肺での増殖が遅延することを明らかにし、病原性タンパク質として同定した。

次に、GFP を発現した結核菌を J774 マクロファージに感染させた。この実験でマクロファージ内の結核菌は、初期エンドソームマーカー EEA1 と共局在しないことを観察した。その一方で、結核菌はトランスゴルジマーカー TGN46、リソソームマーカー CD63 およびオートファゴソームのマーカー LC3 のそれぞれと共局在した。

J774 マクロファージに GFP-PE\_PGRS62 を安定的に発現させ、免疫沈降を行って PE\_PGRS62 と宿主タンパク質との結合性を調べた。結核菌 PE\_PGRS62 タンパク質はオ

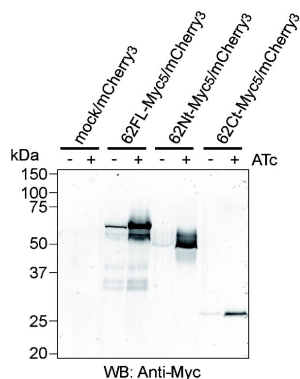
オートファゴソーム形成に重要な役割を担っている LC3 と結合することを見出した。

293T 細胞に GFP-PE\_PGRS62 と変異体 GFP-PE\_PGRS62 を過剰発現させた。GFP-PE\_PGRS62 タンパク質の発現は 293T 細胞内に小胞形成を誘導した。N 末端領域を欠損した GFP-PE は小胞形成を誘導せず、C 末端領域を大幅に欠損させた N 末端領域の GFP-PE はより小さい小胞を誘導した。これらの結果から、PE ドメインが小胞形成を誘導することが示唆された。また、C 末端の 3 つの推定膜貫通領域を欠損した GFP-TM を発現させると巨大な膜構造物の形成された。

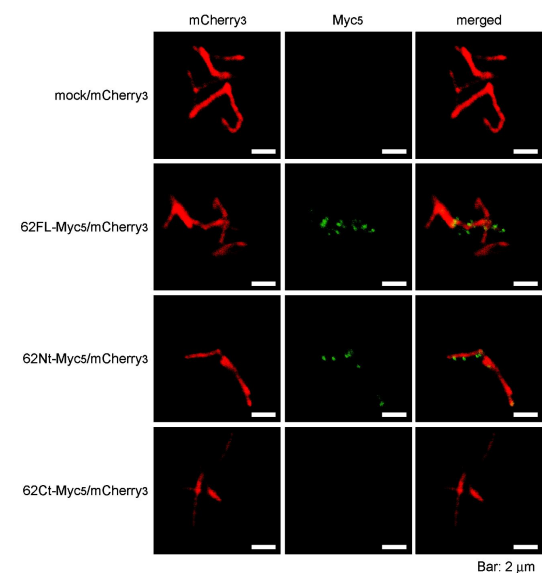
PE\_PGRS62 の TM が、実際に宿主細胞内で働いていることが分かった。TM を持たない PE\_PGRS62 TM を発現した場合に巨大なベシクル内に GFP-PE\_PGRS62 TM が発現しており mCherry-LC3B や mCherry-CD63 が共局在した。全長の PE\_PGRS62 が発現した宿主細胞内ではベシクルの淵に GFP-PE\_PGRS62 が発現しており、そのベシクルへの mCherry-LC3B や mCherry-CD63 の共局在が抑制されていた。

タンパク質過剰発現系ではなく、結核菌が発現した PE\_PGRS62 によりオートファジーが抑制されるかどうか調べるために無水テトラサイクリン発現誘導系を構築した。

PE\_PGRS62 の全長、N 末端、C 末端を誘導発現させるため、100 ng/ml の無水テトラサイクリン刺激し、菌体抽出液を作製した。抗 Myc タグ抗体 (CST ジャパン、9B11) でウェスタンブロッティングをおこなった (下図)。



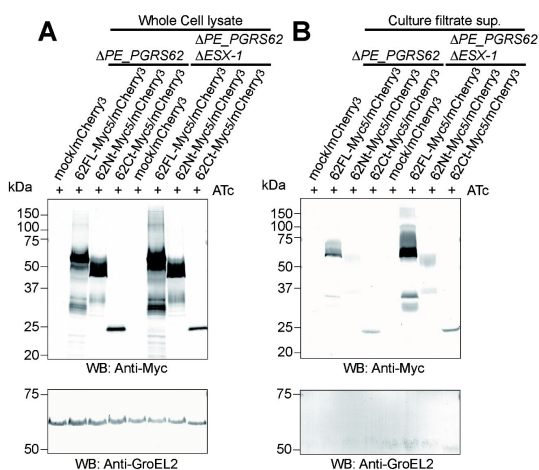
ウェスタンブロット解析で PE\_PGRS62-Myc5 の誘導発現を確認できたので、次にコンフォーカルレーザー顕微鏡解析を行った。小川培地で 2~3 週間培養後、マイコブロスで 2~3 週間培養した結核菌を、Tween80 を含まないソートン培地 (無水テトラサイクリン含有) で 2 週間培養した。この菌を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBS で洗浄後に 5% スキムミルク / TBS-T でブロッキングした。抗 Myc タグ抗体 (CST ジャパン、9B11) で染色し、コンフォーカルレーザー顕微鏡解析を行った (下図)。



以上の解析から、PE\_PGRS62 は N 末端領域を介して、結核菌の細胞表面に局在することが明らかとなった。

PE\_PGRS62 の分泌性を調べた。海外の研究グループが、非結核性抗酸菌 *M. smegmatis* に PE\_PGRS62 を発現させ、iNOS やフォゴソーム成熟が抑制されることを報告した。*M. smegmatis* は ESX-5 を有さないが ESX-1 を有しているため PE\_PGRS62 が ESX-1 依存的に分泌することを予想している。他の研究グループは PE\_PGRS が ESX-5 (Rv1798 など) から分泌すると考えている。したがって、PE\_PGRS62 (別名 Rv3812) の遺伝子座の近い ESX-1 (本研究では Rv3871) について調べた。PE\_PGRS62 と Rv3871 のダブルミュータントに PE\_PGRS62 を発現させた。小川培地で培養を行い、得ら

れた菌体を、無水テトラサイクリンを含むソートン培地に移し1週間培養した。この培養で浮遊している菌体を新しい無水テトラサイクリンを含むソートン培地に移し、更に1週間培養した。この培養液の菌体を遠心で除去後に、完全に菌体を除去した上清を得るために、5umのフィルター、0.2umのフィルター処理を行った（5umのフィルター処理は0.2umのフィルター詰まりを防止するために行った）。得られた上清をアミコンで濃縮し、ウェスタンブロット解析を行った（下図）。



菌体成分であるGroEL2は上清になかったが、PE\_PGRS62はESX-1非存在化でも分泌していた。したがって、PE\_PGRS62はESX-1以外の分泌装置から分泌されることが示唆された。

#### 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3件)

1. 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). In Press
2. Iwai H, Funatogawa K, Matsumura K, Kato-Miyazawa M, Kirikae F, Kiga K,

Sasakawa C, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. MicroRNA-155 knockout mice are susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* infection. Tuberculosis (Edinb). 2015 May;95(3):246-50. doi: 10.1016/j.tube.2015.03.006.

3. Miyoshi-Akiyama T, Satou K, Kato M, Shiroma A, Matsumura K, Tamotsu H, Iwai H, Teruya K, Funatogawa K, Hirano T, Kirikae T. Complete annotated genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* (Zopf) Lehmann and Neumann (ATCC35812) (Kurono). Tuberculosis (Edinb). 2015 Jan;95(1):37-9. doi: 10.1016/j.tube.2014.10.007.

〔学会発表〕(計2件)

1. 祝弘樹、船渡川圭次、松村和典、加藤雅子、切替富美子、気駕恒太郎、笹川千尋、秋山徹、切替照雄 Micro-RNA 155 mediates CD4+ T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* 第88回日本細菌学会総会、2015年3月26～28日、長良川国際会議場
2. 祝弘樹、肺胞II型上皮細胞の恒常性機能を利用した結核菌の感染戦略 第8回細菌学若手コロッセウム、2014年8月6～8日、ホテルニセコいこいの村

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rincgm.jp/individual/lab03/>

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：