

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15277

研究課題名(和文)速育化BCGを基盤とした結核菌病原性の探究

研究課題名(英文)Analysis the virulence of Mycobacterium tuberculosis based of rapid-growing BCG

研究代表者

大原 直也(Ohara, Naoya)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70223930

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文):結核菌の大きな特徴に遅発育性、細胞内寄生性そして宿主内における長期潜伏感染(休眠様状態)がある。我々はワクチン株であるチミジル酸合成酵素ThyXの過剰発現がBCGを速育化することを見出した。ThyX過剰発現株の遺伝子発現をRNAseqにより検討したところ葉酸代謝経路上に位置する酵素の発現が上昇していた。それらの遺伝子の過剰発現株を作製して増殖速度を調べた結果、テトラヒドロ葉酸の合成量の増加がBCGの増殖速度を変化させる原因となったことが推測された。

研究成果の概要(英文):Mycobacterium tuberculosis is an intracellular pathogen, has a remarkably slow growth rate, and survives long periods of time in the host. We found that overexpression of thyX in BCG (pthyX) resulted in accelerating its growth rate. We analyzed the gene expression profiles in pthyX using RNAseq. Several genes in folate metabolism pathway were up-regulated in pthyX. We concluded that tetrahydrofolate is the key molecule in the control of the growth rate of slow-growing mycobacteria.

研究分野:細菌学

キーワード:マイコバクテリウム 増殖 葉酸代謝 結核 BCG

1. 研究開始当初の背景

結核菌の大きな特徴に遅発育性、細胞内寄生性そして宿主内における長期潜伏感染(休眠様状態)がある。これまで結核菌の種々の病原性因子の存在が明らかにされてきたが、遅発育性であることが毒素を持たない本菌の病原性に大きく寄与していると推測されてきた。しかし、遅発育性と病原性の関係性を明確にした報告は無く、未だ推測の域を出ない。我々はワクチン株である BCG を用いて抗結核剤パラアミノサリチル酸(PAS)に対する結核菌の耐性機構を解析していたところ、チミジル酸合成酵素のひとつである ThyX の発現量が BCG の増殖速度に影響することを示唆する結果を得た。なお、チミジル酸合成酵素は葉酸代謝系とチミン合成経路の間に位置する。結核菌・BCG をはじめとする抗酸菌はチミジル酸合成酵素を2種類(ThyA と ThyX)持つ。

2. 研究の目的

本研究では増殖速度が顕著に速くなった牛型結核菌ワクチン株である BCG を使用して、増殖速度と結核菌の病原性の関連性を明らかにすることを目的とする。またこの速育化菌を用いることで、これまで長期間掛かった新規抗結核菌剤候補の評価の短縮化を図る。本研究により、結核菌の病原性における遅発育性の意義が明確にされ、結核症をはじめとする抗酸菌症の新たな療法の方向性が示唆されるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株と培養

Mycobacterium bovis BCG Tokyo-172 株(以下 BCG Tokyo 株)を親株として作製したチミジル酸合成酵素 ThyA と ThyX のそれぞれの遺伝子 *thyA* と *thyX* の欠損株 *thyA* と *thyX*、およびそれぞれの遺伝子の過剰発現株 *pthyA* と *pthyX* を使用した。さらに必要に応じて他の遺伝子の過剰発現株を作製して使用した。BCG の培養には ADC 添加 Middlebrook 7H9 ブロース、ADC 添加 Middlebrook 7H10 寒天培地、および Sauton 培地を用いた。なお、培地には必要に応じて抗生物質を添加して用いた。プラスミドの構築には大腸菌 DH5 株を用いて LB ブロースおよび LB 寒天培地で培養した。なお、培地には必要に応じて抗生物質を添加して用いた。

(2) 遺伝子操作

遺伝子操作は特に記載が無い限り一般的な方法に準じて行なった。

(3) RNA の調整

BCG の全 RNA の調整には Invitrogen™ TRIzol™ Plus RNA Purification System を用い、添付のプロトコールに従って行った。なお、抽出に先立ち、菌体はビーズビーターで破碎した。抽出後の全 RNA に混入した DNA は

DNaseI で消化し、その後 QIAGEN RNeasy Mini Kit を用いて精製した。

(4) RNA-seq (遺伝子発現量解析)

RNA-seq は北海道システムサイエンス社に委託した。次世代シーケンサー Illumina HiSeq を使用し、Paired-End 法 100 塩基読み取りにより沿海配列データを取得した。得られたデータは、ベースコール、フィルタリング、および Index 配列による振り分けを行うことで処理した。

(5) 定量 RT-PCR

定量 RT-PCR を行うために全 RNA を鋳型とし、ランダムヘキサマープライマーを用いた逆転写反応を行うことで cDNA を作製した。次に作製した cDNA を鋳型として、CFX Connect™リアルタイム PCR 解析システム(バイオラッド)を使用して各遺伝子特異的プライマーを用いた定量 PCR を行った。

4. 研究成果

BCG Tokyo 株(親株) *thyA*、*thyX*、*pthyA*、および *pthyX* の5株の増殖を比較したところ、ADC 添加 Middlebrook 7H9 ブロースと ADC 添加 Middlebrook 7H10 寒天培地のいずれを用いた場合においても、*thyX* 過剰発現株である *pthyX* の増殖速度が他の4株と比較して顕著に促進された。この理由を調べるために、*pthyX* と親株の間で発現している遺伝子を RNA-seq により比較した。*pthyX* ではタンパク質合成、DNA の複製や細胞壁の合成に関わる酵素の遺伝子が増加していたが、これらは結果的に発現量が増加したと考えられる。葉酸代謝系および関連の代謝経路では、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子 *dfrA*、アミノメチルトランスフェラーゼ遺伝子 *gcvT*、およびセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ遺伝子 *glyA* の発現量が *pthyX* で増加していた。また *thyA* とともに、コバラミン依存性メチオニン合成酵素の遺伝子 *metH* の発現も上昇していた。逆にメチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼとメテニルテトラヒドロ葉酸シクロ加水分解酵素、ホルミルテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ、メチオニル-tRNA ホルミルトランスフェラーゼ、およびコバラミン非依存性メチオニンシンターゼの各遺伝子の発現は低下していた。以上の結果は定量 RT-PCR を行うことで確認した。

次に発現量の上昇していた遺伝子について、これらは増殖が促進された結果、その発現量が増加したのか、あるいは結核菌や BCG の増殖を促進させる原因となる可能性があるのかについて検討した。特に *dfrA*、*gcvT*、および *glyA* に着目し、各遺伝子を自身のプロモーター領域と共にクローニングし、大腸菌抗酸菌シャトルベクターに挿入した。作製したプラスミドを BCG Tokyo 株に電気穿孔法にて導入し、得られた株をそれぞれ *pdfra*、*pgcvT*、および *pglyA* とした。これらの増殖

速度を検討したところ、pgcvT と pglyA の増殖速度は親株である BCG Tokyo 株の増殖速度と大きな差は認められなかった。しかし、と比較したところ、pdfra の増殖速度は BCG Tokyo 株よりも顕著に促進された。

ジヒドロ葉酸レダクターゼはジヒドロ葉酸 (DHF) をテトラヒドロ葉酸 (THF) に転換する。一方、アミノメチルトランスフェラーゼあるいはセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼが働くとテトラヒドロ葉酸 (THF) は 5,10-メチレン-THF に変換される。メチレントラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼとメチルトラヒドロ葉酸シクロ加水分解酵素は 5,10-メチレン-THF を 5,10-メチレン-THF に転換し、さらに 10-ホルミル-THF に転換する。ホルミルテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼとメチオニル-tRNA ホルミルトランスフェラーゼは 10-ホルミル-THF をさらに他の分子に転換する酵素である。ThyX とジヒドロ葉酸レダクターゼの共通点は THF を合成する酵素であることから、菌体における THF の量が増加することが BCG の増殖速度を促進させることに繋がったと推測している。そして、gcvT、および glyA は THF が過剰に蓄積されたために、それを解消する目的で発現量が増加したと考えられる。上述した他の酵素の遺伝子については、ThyX が過剰に働き 5,10-メチレン-THF が主に THF に転換されることになった結果、それぞれの酵素の基質が減少したことによってそれぞれの遺伝子の転写量が減少したと考えられる。

本研究に関係する主要な代謝経路を図 1 に示す。

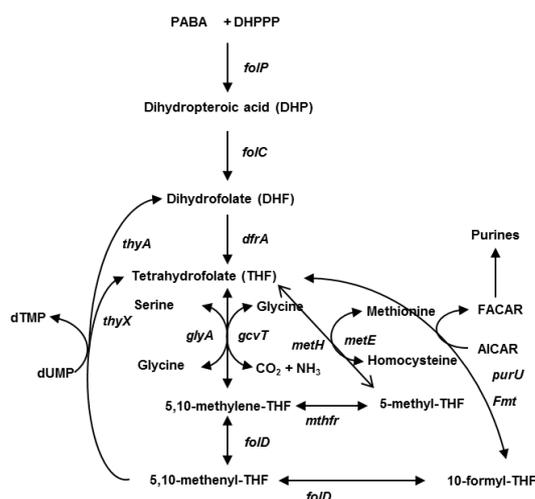


図 1 . 本研究に関係する主要な代謝経路

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 0 件)

[学会発表](計 10 件)

大原直也 他、チミジル酸合成酵素遺伝子過剰発現による BCG の増殖速度の促進とその機序の解明、第 93 回日本結核病学会総会、2018 年 6 月 23 日 - 24 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

中山真彰、橘理人、大原直也 他、Investigation of genes involved in promoting the growth rate of BCG、第 91 回日本細菌学会総会、2018 年 03 月 27 日 ~ 2018 年 03 月 29 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

中山真彰、橘理人、大原直也 他、BCG Rv3405c による Rv3406 の遺伝子発現抑制機構の解析、第 91 回日本細菌学会総会、2018 年 03 月 27 日 - 2018 年 03 月 29 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
Nakayama M, Tachibana M, Ohara N et al., Inhibitory mechanism of JTY3476 expression by JTY3475 in BCG Tokyo、The 52nd US-Japan Mycobacteria Panel Meeting 2018 in Niigata、2018 年 03 月 15 日 - 2018 年 03 月 16 日、新潟大学 (新潟県新潟市)

中山真彰、橘理人、大原直也 他、BCG に存在する転写抑制因子 Rv3405c の解析、第 70 回日本細菌学会中国・四国支部総会、2017 年 10 月 14 日 - 2017 年 10 月 15 日、広島大学 (広島県東広島市)

中山真彰、橘理人、大原直也 他、BCG ThyA, ThyX 変異株の解析、第 59 回歯科基礎医学会学術集会・総会、2017 年 09 月 16 日 - 2017 年 09 月 18 日、松本歯科大学 (長野県塩尻市)

中山真彰、大原直也 他、BCG Tokyo 172-1 に存在するサブポピュレーション I 型と II 型に関する新たな知見、第 87 回実験結核研究会、2017 年 03 月 22 日、国立国際医療研究センター (東京都新宿区)

中山真彰、大原直也 他、BCG Tokyo RD16 領域に存在する JTY_3475c は JTY_3476 の遺伝子発現を負に制御する、第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 03 月 19 日 - 2017 年 03 月 21 日、仙台国際会議場 (宮城県仙台市)

中山真彰、大原直也 他、チミジル酸合成酵素 ThyX の過剰発現は BCG の増殖を促進する、第 69 回日本細菌学会中国・四国支部総会、2016 年 10 月 15 日 - 2016 年 10 月 16 日、岡山大学 (岡山県岡山市)

大原直也 他、BCG thyX を用いた抗酸菌の PAS 耐性機序の解析、第 91 回日本結核病学会総会、2016 年 05 月 26 日 - 2016 年 05 月 27 日、県立音楽堂、ホテル日航金沢 (石川県金沢市)

[図書](計 1 件)

大原直也、結核菌の分子遺伝学と病原性、医薬ジャーナル社、結核 改訂版、2017、

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.cc.okayama-u.ac.jp/oral_microbiology

6. 研究組織

(1)研究代表者

大原 直也 (OHARA, Naoya)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：70223930

(2)研究分担者

中山 真彰 (NAKAYAMA, Masaaki)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10579105

大原 直子 (OHARA, Naoko)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：80301365

橘 理人 (TACHIBANA, Masato)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20636831

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

小崎 弘貴 (KOSAKI, Hirotaka)
竜門 亜矢子 (RYUMON, Ayako)