

平成 21 年 4 月 16 日現在

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007～2008

課題番号:19590454

研究課題名(和文) 結核菌蛋白質MDP1のリボゾーム結合能に由来する翻訳阻害と薬剤耐性機構

研究課題名(英文) Ribosome-binding dependent induction of translational suppression and acquiring drug resistance caused by *M. tuberculosis* protein, MDP1

研究代表者 松本 壮吉(MATSUMOTO SOHKICHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号:30244073

## 研究成果の概要:

抗酸菌に特異的なヒストン様蛋白質である Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) の薬剤感受性にかかわる作用を調べた。その結果、MDP1 は抗酸菌の薬剤感受性に関わることが判明した。この作用は MDP1 分子による直接的な薬剤の競合阻害ではなく、リボゾームに結合することによって生じる構造変化や、複数の薬剤代謝経路を遺伝子発現を介して制御する作用によるものであると推察された。

## 交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:細菌学(含真菌学)

キーワード:潜伏感染、薬剤耐性、抗酸菌、リボゾーム、結核

## 1. 研究開始当初の背景

現在、結核菌は、人類の32%に一部休眠状態で潜伏感染しているといわれている。成人型肺結核の多くが潜伏感染菌による内因性の再燃であり、毎年200万人が結核で死亡している。さらに近年では現行の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌の出現により、結核はもはや過去の病気とはいえない状況である。また、ヒト型結核菌はヒト以外の生体や自然環境中で生育するのは困難であり、ヒトは結核菌の唯一の宿主と考えられていることから、結核菌の宿主からの完全な駆逐が待ち望まれている。

実際、現行の結核治療は最短でも6ヶ月を要するとされており、長期にわたる治療は患者への負担も大きく、また薬剤の選択と投与方法を誤ると薬剤耐性菌の出現にもつながりかねない。そこで、結核菌の薬剤耐性獲得機構を解明し、耐性菌出現を防ぐことにより速やかな除菌を可能とすることが結核治療において重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

抗酸菌における薬剤耐性メカニズムを解明することにより、新規結核治療法の開発への糸口をさぐることを目的とする。

### 3. 研究の方法

【薬剤感受性試験】速育型抗酸菌である *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 株およびそれを親株とした MDP1 欠失株、さらにその株に MDP1 を入れ戻した MDP1 相補株を培養し、600 nm における吸光度が 0.04 になるように菌液を調製した。この菌液 10<sup>8</sup>・1 を、さまざまな濃度の薬剤を含む培地 90<sup>8</sup>・1 に接種し、一定時間 37°C にて培養した。その後、寒天培地に接種し生菌数を測定することで薬剤への感受性を比較した。

【リボゾーム結合試験】*M. smegmatis* MDP1 欠失株を培養し、回収した菌体を石英砂にて破碎し、得られた抽出物を遠心して沈殿を回収した。その後、ショ糖密度勾配遠心にてリボゾーム画分を回収した。得られたリボゾームは組換え MDP1 の存在下もしくは非存在下にて <sup>3</sup>H-streptomycin と反応させた。その後、リボゾーム非結合 <sup>3</sup>H-streptomycin を除去し、リボゾームに結合した <sup>3</sup>H の量を定量した。

【RNA 抽出】*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 株および MDP1 欠失株をそれぞれの条件で培養し、細胞を遠心して集め、1ml の TRIzol で再懸濁した。そして、菌を BeadBeater で物理的に破碎した。0.2ml のクロロホルムを加えた後、菌の懸濁液を遠心し、上清を回収した。フェノールクロロホルム抽出は抽出された核酸からタンパク質を除くために行った。含まれた DNA を取り除くために DNaseI で処理し、それぞれのサンプルの total RNA を RNeasy mini spin column を用いて精製した。

【マイクロアレイ解析】DNA マイクロアレイはロシュ・ダイアグノスティクス株式会社のなんでもアレイを用いた。ハイブリダイゼーションには MAUI hybridization system を用い、スキャニングは GenePix Scanner 4000B を用いて行った。得られたデータは GeneSpring GX にて解析した。

### 4. 研究成果

*M. smegmatis* 野性株、MDP1 欠失株および MDP1 相補株についてストレプトマイシンに対する薬剤感受性試験を行った結果、MDP1 欠失によりタンパク合成阻害剤であるストレプトマイシンに対する感受性が増強することがわかった。これまでの研究により MDP1 にはリボゾーム結合能があることがわかっている。一方ストレプトマイシンは細菌のリボゾーム上の 23s rRNA に結合し、リボゾーム上でのポリペプチド鎖の合成の開始を阻害することでタンパク質の合成を阻害する作用がある、そこで、MDP1 はストレプトマイシンと競合的にリボゾームに結合することで薬剤の作用を阻害しているのではと考え、精製リボゾームを用いてストレプトマイシンの結合に対する MDP1 の影響を調べたとこ

ろ、MDP1 による薬剤の結合阻害は認められなかった。以上のことから、MDP1 が直接的に薬剤の作用部位への結合を阻害しているのではなく、MDP1 が薬剤感受性に関わる何らかの遺伝子群の発現を調節しているためである可能性が示唆された。

そこで、他のタンパク合成阻害剤についても MDP1 による影響を調べたところ、ストレプトマイシンと同じアミノグリコシド系抗生物質であるアミカシンでも MDP1 欠失により感受性が増強されることがわかった。それに対して、エリスロマイシンやクラリスロマイシンなどのマクロライド系抗生物質においては、反対に感受性の減弱が観察された。

次に、マイクロアレイ解析を行い MDP1 欠失による遺伝子発現の変化を調べたところ、aminoglycosides/tetracycline-transport integral membrane protein (MSMEG\_3069)、MATE efflux family protein (MSMEG\_2631)、small multidrug resistance family protein (MSMEG\_3670) などの遺伝子の発現が MDP1 欠失により減少することがわかったが、ストレプトマイシンの低度耐性にかかわるといわれている methyltransferase Gid (MSMEG\_6940) については発現に変化がなかった。

以上の結果から、MDP1 がリボゾームに結合することでの構造変化に加えて、アミノグリコシド系抗生物質についてはこれらの遺伝子の発現の低下による薬剤排出機能の低下によって感受性の増強が起こるのではないかと推察される。マクロライド系抗生物質も、同様の機構が考えられるため、さらなる解析を行う予定である。

### 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6件)

1. Okazaki M, Ohnishi H, Ohkusu K, Hata H, Fujiwara N, Matsumoto S, Nishiuchi Y, Yonetani S, Fukugawa Y, Yamamoto M, Wada H, Sugawara K, Sejimo A, Kawamura C, Ebina A, Ezaki T, Goto H, and Watanabe T. *Mycobacterium kyorinense* sp. nov., a novel slowly growing *Mycobacterium* sp. related to *Mycobacterium celatum* isolated from three patients with infections. *Int J Syst Evol Microbiol* in press. (査読有り)
2. Tateishi, Y., Y. Hirayama, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura, J. Kang, A. Shibata, K. Hirata, S. Kitada, R. Maekura, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2009. Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from

immunocompetent patients. *Microb Pathog* 46:6-12. (査読有り)

3. Saiga, H., J. Nishimura, H. Kuwata, M. Okuyama, S. Matsumoto, S. Sato, M. Matsumoto, S. Akira, Y. Yoshikai, K. Honda, M. Yamamoto, and K. Takeda. 2008. Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J Immunol* 181:8521-8527. (査読有り)

4. Nishimura, J., H. Saiga, S. Sato, M. Okuyama, H. Kayama, H. Kuwata, S. Matsumoto, T. Nishida, Y. Sawa, S. Akira, Y. Yoshikai, M. Yamamoto, and K. Takeda. 2008. Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J Immunol* 180:4032-4039. (査読有り)

5. Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, K. Kobayashi, M. Makino, S. Matsumoto, H. Ogura, and S. Maeda. 2008. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J Bacteriol* 190:3613-3621. (査読有り)

6. Katsube, T., S. Matsumoto, M. Takatsuka, M. Okuyama, Y. Ozeki, M. Naito, Y. Nishiuchi, N. Fujiwara, M. Yoshimura, T. Tsuboi, M. Torii, N. Oshitani, T. Arakawa, and K. Kobayashi. 2007. Control of cell wall assembly by a histone-like protein in Mycobacteria. *J Bacteriol* 189:8241-8249. (査読有り)

[学会発表] (計 21 件)

1. 松本 壮吉、小林 和夫。From the functions of a protein to molecular pathogenesis of mycobacteria, 日本細菌学会雑誌, 64:1. 第 8 2 回日本細菌学会総会 (名古屋、2009 年 3 月 12-14 日)
2. 立石 善隆、平山 幸雄、尾関 百合子、西内 由紀子、吉村 満美子、小林 和夫、松本 壮吉。急速な臨床経過に合致した高病原性 *Mycobacterium avium-intracellulare* complex 菌株の同定。日本細菌学会雑誌, 64:1. 第 8 2 回日本細菌学会総会 (名古屋、2009 年 3 月 12-14 日)
3. 平山 幸雄、吉村 満美子、尾関 百合子、菅原 勇、小林 和夫、松本 壮吉。結核菌の増殖に対するヒアルロン酸の作用。日本細菌学会雑誌, 64:1. 第 8 2 回日本細菌学会総会 (名古屋、2009 年 3 月

12-14 日)

4. 西内 由紀子、松本 壮吉、立石 善隆、鈴木 定彦。生活環境に分布する *Mycobacterium avium* complex と臨床分離株の多型解析。日本細菌学会雑誌, 64:1. 第 8 2 回日本細菌学会総会 (名古屋、2009 年 3 月 12-14 日)
5. 藤原 永年、中田 登、中 崇、水野 淨子、合田 麗奈、牧野 正彦、吉村 満美子、松本 壮吉、前田 伸司。*Mycobacterium intracellulare* 由来血清型 7, 12, 13 型糖ペプチド脂質の構造類似性とオリゴ糖解析。日本細菌学会雑誌, 64:1. 第 8 2 回日本細菌学会総会 (名古屋、2009 年 3 月 12-14 日)
6. 岡 真優子、小林 和夫、松本 壮吉。結核菌感染マイクロファージにおける hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  の作用機構。日本細菌学会雑誌, 64:1. 第 8 2 回日本細菌学会総会 (名古屋、2009 年 3 月 12-14 日)
7. 鈴木 大介、永田 年、辻村 邦夫、松本 壮吉、小出 幸夫。DNA ワクチンを用いた *Mycobacterium* DNA-binding protein 1 (MDP1) のマウス T 細胞エピトープの同定。日本細菌学会雑誌, 64:1. 第 8 2 回日本細菌学会総会 (名古屋、2009 年 3 月 12-14 日)
8. 仁木 誠、吉村満美子、小林 和夫、松本 壮吉。抗酸菌の薬剤感受性における MDP1 の調節機構の解析。日本細菌学会雑誌, 64:1. 第 8 2 回日本細菌学会総会 (名古屋、2009 年 3 月 12-14 日)
9. 尾関 百合子、原田 誠、西内 由紀子、山本 三郎、小林 和夫、松本 壮吉。抗結核薬スクリーニング系の確立と実践。日本細菌学会雑誌, 64:1. 第 8 2 回日本細菌学会総会 (名古屋、2009 年 3 月 12-14 日)
10. MATSUMOTO Sohkiichi. Proteciton of DNA by mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) by preventing the iron-induced Fenton reaction. (USA. 2008 July 8-10)
11. 松本 壮吉、尾関 百合子、吉村 満美子、藤原 永年、西内 由紀子、立石 善隆、小林 和夫。Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) に見いだされた Ferritin-super family 蛋白質様活性。第 6 1 回日本細菌学会関西支部総会 (京都、2008 年 11 月 8 日)
12. Suzuki Daisuke, NAGATA Toshi, MATSUMOTO Sohkiichi, KOIDE Yukiko. MDP1 タンパクのマウス T 細胞エピトープの解析/ Characterization of murine T-cell epitopes in Mycobacterial DNA-binding protein 1. 日本免疫学会雑誌 38 巻、第 38 回日本免疫学会総会 (京都、2008 年

- 12月1-3日)
13. 松本 壮吉、尾関 百合子、西内 由紀子、藤原 永年、吉村 満美子、小林 和夫。Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)による増殖と細胞壁合成の同調メカニズム。結核、83:3。第83回日本結核病学会(東京、2008年4月24-25日)
  14. 平山 幸雄、吉村 満美子、尾関 百合子、菅原 勇、青木 俊明、西内 由紀子、小林 和夫、松本 壮吉。ヒアルロン酸の結核病巣における産生と局在。結核、83:3。第83回日本結核病学会(東京、2008年4月24-25日)
  15. 仁木 誠、吉村満美子、松本 壮吉、和田 崇之、小林 和夫。抗酸菌の薬剤感受性におけるMDP1の調節機構の解析。結核、83:3。第83回日本結核病学会(東京、2008年4月24-25日)
  16. 平山 幸雄、吉村 満美子、尾関 百合子、菅原 勇、青木 俊明、西内 由紀子、小林 和夫、松本 壮吉。結核病巣におけるヒアルロン酸の産生と局在。日本細菌学会雑誌、63:1。第81回日本細菌学会総会(京都、2008年3月24-26日)
  17. 藤原 永年、中田 登、前田 伸司、中崇、水野 浄子、牧野 正彦、松本 壮吉、矢野 郁也。Mycobacterium intracellulare 由来血清型 7,12 型 glycopeptidolipid 糖鎖合成遺伝子の機能解析。日本細菌学会雑誌、63:1。第81回日本細菌学会総会(京都、2008年3月24-26日)
  18. 尾関 百合子、小林 和夫、松本 壮吉。結核菌感染における制御性T細胞の役割(2)日本細菌学会雑誌、63:1。第81回日本細菌学会総会(京都、2008年3月24-26日)
  19. 西内 由紀子、松本 壮吉、立石 善隆。家庭浴室由来 Mycobacterium avium complex の多型性と臨床分離株との同一性。日本細菌学会雑誌、63:1。第81回日本細菌学会総会(京都、2008年3月24-26日)
  20. 松本 壮吉、奥山 めぐみ、尾関 百合子、内藤 真理子、西内 由紀子、藤原 永年、吉村 満美子、小林 和夫。抗酸菌における増殖と細胞壁合成の同調機構。日本細菌学会雑誌、63:1。第81回日本細菌学会総会(京都、2008年3月24-26日)
  21. 仁木 誠、吉村満美子、和田 崇之、小林 和夫、松本 壮吉。抗酸菌の遺伝子発現および薬剤感受性におけるMDP1の役割。日本細菌学会雑誌、63:1。第81回日本細菌学会総会(京都、2008年3月24-26日)

○取得状況(計2件)

1. 出願番号:特願2008-172640, 発明者:山本 法明、松本 壮吉, 発明の名称:MDP1による微生物を凝集および/または沈殿させる方法, 出願人:コニカミノルタホールディングス株式会社、公立大学法人大阪市立大学, 出願日:2008年7月1日
2. 出願番号:特願2008-277012、発明者:松本 壮吉、山本 法明、発明の名称:MDP1を用いた炭水化物を有する物質の分離方法 出願人:コニカミノルタホールディングス株式会社、出願日:2008年10月28日

[その他]

1. 松本 壮吉、小林 和夫、結核ワクチン研究の現状と展望、臨床検査 Vol 52 p1149-1153, 2008
2. 松本 壮吉、結核における特異性炎の形成メカニズムと結核対策研究の現在、医学のあゆみ、Vol 223 p611-614, 2007
3. 松本 壮吉、尾関 百合子、小林 和夫、結核菌の新規病原因子MDP1の感染病態への関わり、感染 炎症 免疫 Vol 37 p98-101, 2007
4. 松本 壮吉、平山 幸雄、小林 和夫、結核菌の潜伏感染と内因性再燃の分子機構、新感染症学、日本臨床 65巻 増刊号 p 124-128、2007

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 壮吉(MATSUMOTO SOHKICHI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授  
(研究者番号 30244073)

(2)研究分担者

吉村 満美子(YOSHIMURA MAMIKO)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・助教  
(研究者番号 20438229)

(3)連携研究者

なし