

機関番号：13802

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790415

研究課題名（和文）ファゴソームから Rab GTPase をかい離させる結核菌因子の探索

研究課題名（英文）Exploring the factors of Mycobacterium tuberculosis that function in the dissociation of Rab GTPases from mycobacterial phagosomes

研究代表者

瀬戸真太郎 (Shintaro Seto)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：50383203

研究成果の概要（和文）：Rab GTPase かい離候補遺伝子として Rv3377c 遺伝子を見出した。Rv3377c 遺伝子産物はゲラニルゲラニル基を環状構造に触媒する活性を持つことが知られている。Rv3377c は結核菌弱毒株である H37Ra 株や BCG 株では感染マクロファージ内で発現しないことを明らかにした。次に、結核菌のファゴソーム内での増殖を支持する宿主因子を探索するため、結核菌ファゴソームのプロテオミクス解析を行った。生化学的に単離した結核菌ファゴソームのプロテオミクス解析によって、結核菌ファゴソームに含まれるタンパク質を網羅的に同定した。結核菌ファゴソーム画分には後期エンドソームマーカータンパク質である Rab7 や v-ATPase のサブユニットタンパク質、リソソームマーカータンパク質である LAMP-1 や LAMP-2 などが含まれていた。また、ミトコンドリア特異的シャペロンの CH60 も含まれていた。さらに、小胞体タンパク質である Grp78、PDI、リボソームサブユニットタンパク質も同定した。このことは、結核菌ファゴソームは後期エンドソームやリソソームと融合することができること、しかし、小胞体由来小胞との融合が優先されるために結核菌ファゴソームのファゴソーム熟成が阻害されることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：As the candidate of mycobacterial factor that function in the dissociation of Rab GTPases from mycobacterial phagosomes, we focused on the gene Rv3377c. It is reported that Rv3377c product has the cyclase activity for geranylgeranyl moieties. We found that the attenuated strains Mycobacterium tuberculosis H37Ra and Mycobacterium bovis BCG do not express Rv3377c in infected macrophages. Next, we explored the host factors that support the proliferation of *M. tuberculosis* in the phagosomes in infected macrophages. we carried out the proteomic analysis of mycobacterial phagosomes isolated from infected macrophages. Raw264.7 macrophages were infected with *M. tuberculosis*, and phagosomal fraction was isolated by sucrose gradient centrifugation. Proteins extracted from mycobacterial phagosomes were subjected to two-dimensional gel electrophoresis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The prominent proteins in the fraction of mycobacterial phagosome were those associated with the endoplasmic reticulum (ER), suggesting that the vesicles derived from ER interact with mycobacterial phagosomes during the inhibition of phagosome maturation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：基礎医学・細菌学

科研費の分科・細目：マクロファージ・Rab GTPase・ファゴソーム・プロテオミクス
キーワード：

1. 研究開始当初の背景

Mycobacterium tuberculosis (結核菌)は細胞内寄生性細菌であり、貪食されたマクロファージ内で細胞増殖を行う。結核菌の細胞内増殖能はファゴソームとリソソームの融合(ファゴリソーム形成)を阻害することによって獲得しているといわれている。これまで、結核菌によるファゴリソーム形成阻害は、ファゴソーム内で大量のアンモニアを産生することや結核菌菌体に含まれる糖脂質によって行われていると考えられていた。トランスポゾン変異株ライブラリーの結果から結核菌の細胞内増殖に関与する遺伝子は同定されている(PNAS. 2003; 100: 12989-94)。また、全ゲノムスケール siRNA による解析によって、結核菌の細胞内増殖に関与する宿主遺伝子の同定も行われた(Cell 2010, 140; 731-43)。しかし、明確なファゴリソーム形成阻害因子の同定や、結核菌因子と宿主因子の相互作用の解析は行われていない。それは、結核菌ファゴソームにおけるファゴリソーム形成阻害過程の詳細がいまだ明らかになっていないからである。

細胞内小胞輸送機構の研究において、さまざまな分子が同定され、その機能が解明されつつある。結核菌感染マクロファージにおける小胞輸送の研究は、主に Deretic 等の研究グループによって行われていた。Deretic 等は小胞輸送を制御する Rab GTPase に注目して、後期エンドソームマーカーである Rab7 が結核菌ファゴソームに局在しないことを示した。このことは、Rab7 が結核菌ファゴソームに局在しないために、ファゴリソーム形成が阻害されることを示唆する (Annu Rev Cell Dev Biol. 2004; 20: 367-94)。また、Rab14 や Rab22a が結核菌ファゴソームに局在することによってファゴソーム熟成を阻害することを示している(EMBO J. 2006, 25: 5250-9, J Cell Biol. 2006, 174: 923-9)。

しかし、応募者はこれまでの結核菌ファゴソーム像とは異なる結果をイメージ解析とプロテオミクス解析によって明らかにしている。

(1) Rab7は結核菌ファゴソームに感染直後から局在するが、その後、結核菌ファゴソームからかい離するために持

続的なファゴリソーム形成が阻害された。

- (2) 結核菌感染マクロファージにおける Rab GTPase の網羅的局在解析を行った。黄色ブドウ球菌ファゴソームに局在する20の Rab GTPase のうち、結核菌感染マクロファージにおいて Rab7 を含む15の Rab GTPase に局在変化があった。
- (3) ファゴソーム熟成に関与する Rab 遺伝子を明らかにするため、これらの Rab 遺伝子の不活性化型変異遺伝子を発現するマクロファージを作成して、ファゴソームの酸性化とカテプシンDの局在を調べた。Rab7、Rab20、Rab39 はファゴソームの酸性化に、Rab7、Rab20、Rab32、Rab34、Rab38 がカテプシンDのファゴソームへの局在に関与した。
- (4) 種々のリソソームマーカーの結核菌ファゴソームにおける局在を調べた。カテプシンDやRILPの局在は制限されるが、LAMP-2やCD63は局在した。

しかし、結核菌ファゴソームから Rab GTPase をかい離させる結核菌因子はいまだ見つかっていない。また、結核菌がファゴソーム内で増殖するためにどのように宿主の小胞輸送を改変しているかはいまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は結核菌ファゴソームから Rab GTPase をかい離させる因子を同定すること、および、結核菌がファゴソーム内で増殖するためにどのように宿主の小胞輸送を改変しているかを明らかにすることである。具体的には、Rab GTPase のかい離因子として Rv3377c に注目して、マクロファージでの発現様式を明らかにした。また、結核菌ファゴソームを生化学的に単離して、ファゴソームに含まれるタンパク質を網羅的に同定した。

3. 研究の方法

(1) 結核菌感染マクロファージからの結核菌 RNA の調整、Rv3377c の RT-PCR

Mycobacterium tuberculosis H37Rv (H37Rv 株)、M. tuberculosis H37Ra (H37Rv 株)、Mycobacterium bovis BCG (BCG 株) を Raw264.7 マクロファージに感染させた。感染 24 時間後に感染細胞から RNA を回収した。cDNA を合成して、Rv3377c の RT-PCR を行った。

(2) 結核菌ファゴソームの生化学的単離
結核菌を Raw264.7 マクロファージに感染させて、感染細胞を 24 時間後に回収した。感染細胞破砕液をショ糖密度勾配遠心分離法によって分画した。結核菌ファゴソーム画分を回収して、タンパク質抽出を行った。

(3) プロテオミクス

ファゴソーム画分抽出タンパク質を SDS-PAGE で展開して、銀染色を行った。バンドを切り出し、ゲル内分解法を行った。ゲル中に含まれるタンパク質をトリプシン処理を行い、分解ペプチドを抽出した。断片ペプチドを nano-LC-MS/MS (ABI Q-STAR XL) によって検出した。得られた MS/MS スペクトルをデータベース検索 (Mascot 検索) することによってタンパク質同定を行った。

4. 研究成果

(1) Rv3377c の発現様式

恒常的活性化型 (CA) Rab GTPase の結核菌ファゴソームにおける局在を調べた。GFP 融合 CA-Rab GTPase を発現するマクロファージに *M. tuberculosis* H37Rv を感染させた。CA-Rab GTPase は通常型と同様に結核菌ファゴソームからかい離することが明らかになった。このことは結核菌ファゴソームから Rab GTPase のかい離様式は GTPase 活性に依存しないことを示す。Rab GTPase かい離候補遺伝子として Rv3377c 遺伝子を見出した。Rv3377c 遺伝子産物はゲラニルゲラニル基を環状構造に触媒する活性を持つことが知られている。Rv3377c は結核菌弱毒株である H37Ra 株や BCG 株では感染マクロファージ内では発現しないことを RT-PCR によって明らかにした。

(2) 結核菌ファゴソームのプロテオミクス
結核菌のファゴソーム内での増殖を支持する宿主因子を探索するため、結核菌ファゴソームのプロテオミクス解析を行った。生化学的に単離した結核菌ファゴソームのプロテオミクス解析によって、結核菌ファゴソームに含まれるタンパク質を網羅的に同定した。結核菌を Raw264.7 マクロファージに感染させて、ファゴソーム画分をショ糖密度勾配遠心分離法によって単離した。二次元電気泳動法によって展開した結核菌ファゴソーム画分において、銀染色によって 200 以上のスポ

ットが観察された。リソソーム特異的なタンパク質スポットは見つからず、calreticulin、Grp78、PDI など小胞体特異的なタンパク質が顕著なスポットであった。このことは結核菌ファゴソームと小胞体由来膜小胞の融合、もしくは小胞体と直接融合することを示唆する。次に、結核菌ファゴソーム画分抽出タンパク質の網羅的同定を LC-MS/MS 法によって行った。SDS-PAGE で結核菌ファゴソーム画分を展開して、銀染色を行った。切り出したバンドからトリプシン処理後、断片ペプチドを抽出した。抽出したペプチドを nano-LC-MS/MS によって質量解析を行った。結核菌ファゴソーム画分には後期エンドソームマーカータンパク質である Rab7 や v-ATPase のサブユニットタンパク質、リソソームマーカータンパク質である LAMP-1 や LAMP-2 などが含まれていた。また、ミトコンドリア特異的なシャペロンの CH60 も含まれていた。さらに、小胞体タンパク質である Grp78、PDI、リボソームサブユニットタンパク質も同定した。このことは、結核菌ファゴソームは後期エンドソームやリソソームと融合することができること、しかし、小胞体由来小胞との融合が優先されるために結核菌ファゴソームのファゴソーム熟成が阻害されることを示唆する。

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 5 件)

- (1) Seto S, Matsumoto S, Ohta I, Tsujimura K, Koide Y., Dissection of Rab7 localization on Mycobacterium tuberculosis phagosome, *Biochem Biophys Res Commun*, 387, 272-277, 2009.
- (2) Wang LX, Nagata T, Tsujimura K, Uchijima M, Seto S, Koide Y, Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from Mycobacterium tuberculosis using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination., *Vaccine*, 23, 2026-2031, 2010
- (3) Seto S, Matsumoto S, Tsujimura K, Koide Y., Differential recruitment of CD63 and Rab7-interacting-lysosomal-protein to phagosomes containing Mycobacterium

- tuberculosis in macrophages., *Microbiol Immunol.*, 54, 170-174, 2010.
- (4) Uto T, Tsujimura K, Uchijima M, Seto S, Nagata T, Suda T, Chida K, Nakamura H, Koide Y., A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of heat shock protein 70., *FEMS Immunol Med Microbiol*, 61, 189-196, 2011.
- (5) Seto S, Tsujimura K, Koide Y., Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes., *Traffic*, in press.

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫, Proteomic analysis revealed the interaction of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome with endoplasmic reticulum., 第 83 回日本細菌学会総会, 2010 年 3 月 27 日
- (2) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫, イメージ解析とプロテオミクスによる結核菌ファゴソームの分子解剖, 第 85 回日本結核病学会, 2010 年 5 月 20 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬戸真太郎 (Shintaro Seto)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50383203

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者