

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：82801

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15442

研究課題名（和文）分裂のON/OFFの可視化で明らかにする休眠結核菌の再活性化機構

研究課題名（英文）Reactivation mechanism of the viable but non-culturable (VBNC) Mycobacterium tuberculosis

研究代表者

森重 雄太 (Morishige, Yuta)

公益財団法人結核予防会 結核研究所・抗酸菌部 結核菌情報科・研究員

研究者番号：40765608

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：潜在性結核感染症(LTBI)から活動性結核への進展に寄与する結核菌側の分子機構解明を目指し、これと密接に関わる現象と考えられる細菌のVBNC状態に注目し、その再活性化機構の解明を試みた。本研究では結核菌群の「分裂のON/OFF」を、分裂に寄与するタンパク質の蛍光標識および蛍光アミノ酸取り込みによって可視化することに成功したが、再増殖可能菌と再増殖不能菌の分離・網羅的解析には至らなかった。しかし、VBNC結核菌の再活性化に対する結核菌Ser/ThrキナーゼPknの寄与を明らかにした。併せて、Pkn阻害活性を有する抗悪性腫瘍薬MitoxantroneのVBNC結核菌殺菌効果を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的に見れば、結核の脅威は今も尚続いている。潜在性結核感染症(LTBI)は、生体内で休眠(VBNC)化した結核菌の潜在感染状態と考えられる病態である。この時、菌はいわば「鳴りを潜めている」状態であり、適切な再活性化刺激によって増殖を再開するが、VBNC結核菌の詳細な再活性化機構は明らかではない。本研究において、VBNC結核菌の再活性化は結核菌Ser/Thrキナーゼの活性阻害によって抑制された。また、既存薬にVBNC結核菌を殺菌し得るものを見出した。これらの成果は、結核の発病予測や結核の再燃抑制を狙った創薬へ繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the molecular mechanisms of progression from latent tuberculosis infection (LTBI) to active tuberculosis, we focused on the VBNC (viable but non-culturable) state of Mycobacterium tuberculosis (Mtb), which is considered to be closely related to LTBI, and attempted to elucidate its reactivation mechanism.

In this study, we succeeded in visualizing the "on/off" of proliferation in Mtb complex by fluorescent labeling of the proteins that contribute to cell division and fluorescent amino acid incorporation, but were unable to separate and comprehensively analyze the "reactivating" and "non-reactivating" subpopulations.

However, the contribution of mycobacterial Ser/Thr kinase Pkn to the reactivation of VBNC Mtb was suggested. In addition, we demonstrated the bactericidal effect of mitoxantrone on VBNC Mtb, an anti-tumor drug which was also reported to have Pkn inhibitory activity.

研究分野：細菌学

キーワード：VBNC 結核菌 休眠 LTBI

1. 研究開始当初の背景

結核は有史以来、単一の細菌に起因する感染症では最も多くの人々を死に至らしめてきた。その脅威は今も尚続いており、年間約 1,000 万人が結核を発症し、約 150 万人が死亡している。潜在性結核感染症(LTBI)という、休眠状態にある結核菌の潜在感染状態と考えられる病態がある。その多くは一生再燃しないが、一部は活動性結核へ進展し、排菌して他者へ感染を伝播させる。LTBI では、結核菌は宿主内で休眠していると考えられる。これと密接に関わる現象として、細菌では一般的な休眠現象の一つである VBNC が挙げられる。VBNC とは外的ストレス等の要因により増殖を止めた細菌が、いわば「鳴りを潜めている」状態であり、適切な再活性化刺激によって増殖を再開する。結核菌でこの状態を実験的に誘導する手法はこれまでに複数の報告があり、その機構についても詳細な検討が行われて来た(Wayne & Hayes Infect. Immun. 1996 他)。しかし、いずれも菌集団を全体として解析しており、個々の菌の生理状態に注目した解析はほとんどない。

研究代表者はこれまでに、細胞内寄生菌であるサルモネラ属菌と結核菌において、再活性化刺激に応答して増殖を再開する VBNC 菌と、それに応答しない VBNC 菌の存在を示唆する知見を得ている(Morishige et al. Microb. Env. 2013 他)。同様の知見はコレラ菌でも報告がある(Imamura et al. Microbiol. Immunol. 2015)。この応答性の差異を解析するには、何らかの手法で両者を識別、分離する必要があるが、そのような試みはほとんど無い。また、再増殖をコントロールする因子も特定されていない。そこで本研究では、「VBNC 菌の再増殖可否の可視化」、「VBNC 菌の再増殖可否を決定づける因子の解明」を計画した。

2. 研究の目的

まず、「VBNC 菌の再増殖可否の可視化」のために、抗酸菌の伸長の際に細胞末端部に局在して伸長複合体を形成するタンパク質の1つである Wag31 に、光変換タンパク質 Dendra2 を連結した Wag31-Dendra2 発現 *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 株および結核菌 *M. tuberculosis* H37Rv 株を作製し、次に Wag31-Dendra2 発現結核菌を用いて、VBNC 菌集団の再活性化時に現れる「再増殖可能菌」と「再増殖不能菌」をセルソーターで光学的に分離し、それらの代謝産物の網羅的比較解析を行い、VBNC 菌の再増殖を決定づける因子の同定を行うこととした。

3. 研究の方法

・Wag31-Dendra2 発現 *M. bovis* BCG Tokyo 株の作製

BCG Tokyo 株 Wag31 の C 末端側に Dendra2 を連結し、大腸菌-抗酸菌シャトルベクター-pMV306hsp の Hsp60 プロモーター下流にクローニングし、BCG Tokyo 株へ導入した。

・VBNC 結核菌の再活性化に寄与する因子の探索

研究代表者は電子伝達系阻害薬 Diphenyleneiodonium(DPI)による迅速かつ簡便な VBNC 誘導(Yeware et al., PLoS One, 2019)を応用し、本法によって VBNC 化した結核菌 H37Rv 株がウシ血清アルブミン刺激によって再活性化することを報告している(Morishige et al., bioRxiv, 2021)。本法を応用し、ウシ血清アルブミン以外の再活性化促進因子および再活性化阻害因子を探索した。

4. 研究成果

Wag31-Dendra2 発現 BCG Tokyo 株の作製に成功した(図 1)。しかし、本研究で得られた Wag31-Dendra2 発現菌で効率よく VBNC 誘導および再活性化を観察することが困難であったので、研究期間内に Wag31-Dendra2 発現結核菌の作製には至らなかった。並行して、蛍光アミノ酸アナログ HADA および NADA のパルスラベリングによって、分裂の ON/OFF の可視化を短時間であるが追跡することに成功している。今後、本法を用いた再増殖可能菌および再増殖不能菌の分離および網羅的比較解析、Wag31-Dendra2 導入法の最適化を進める。

一方で、DPI 誘導 VBNC 結核菌の再活性化促進因子について、ウシ血清アルブミンのみならず、ヒト血清アルブミンも再活性化を促進することが明らかになった。この現象は、卵白アルブミンや抗酸化物質の一つである N-Acetyl-L-cysteine、ラジカル捕捉剤 D-Mannitol では認められなかった。血清アルブミンには抗酸化作用を有することが知られているが、この作用に寄与する SH 基を血清アルブミンより多く有する卵白アルブミンや抗酸化物質では VBNC 菌の再活性化が認められなかったことから、血清アルブミンの再活性化促進効果は抗酸化作用によるものではないと考えられた。また、ウシ血清アルブミンと類似の構造を持つマウス血清アルブミンにも、再活性化促進効果は見られなかったことから、動物種間のわずかな構造的差異が重要であることが考えられた。

また、血清アルブミンによる VBNC 菌の再活性化は、Ser/Thr kinase 阻害剤 H89 および Staurosporine によって抑制された(図 2)。結核菌の Ser/Thr kinase のうち、特に分裂・増殖に寄与するものとして PknA / PknB が考えられるが、この結果から、血清アルブミンは何らかの経路で VBNC 結核菌の PknA / PknB を活性化して、再活性化を刺激している可能性が示唆された。

さらに、VBNC 結核菌を標的とした創薬を目指して、VBNC 菌再活性化阻害効果を有する既存薬を探索した。その結果、結核菌 PknB の阻害効果が認められている抗悪性腫瘍薬 Mitoxantrone が、VBNC 結核菌に対して殺菌的に作用することが明らかになった。

今後、CRISPRi による遺伝子ノックダウン等を行い、VBNC 再活性化における血清アルブミンの詳細な作用機序の解析を進める。併せて、Mitoxantrone をベースにより効率良く VBNC 菌を殺菌し得る化合物の探索を進める。

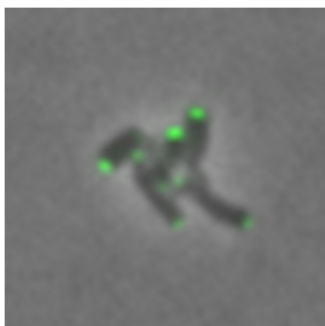


図 1. Wag31-Dendra2 発現 BCG Tokyo 株 (光変換前)

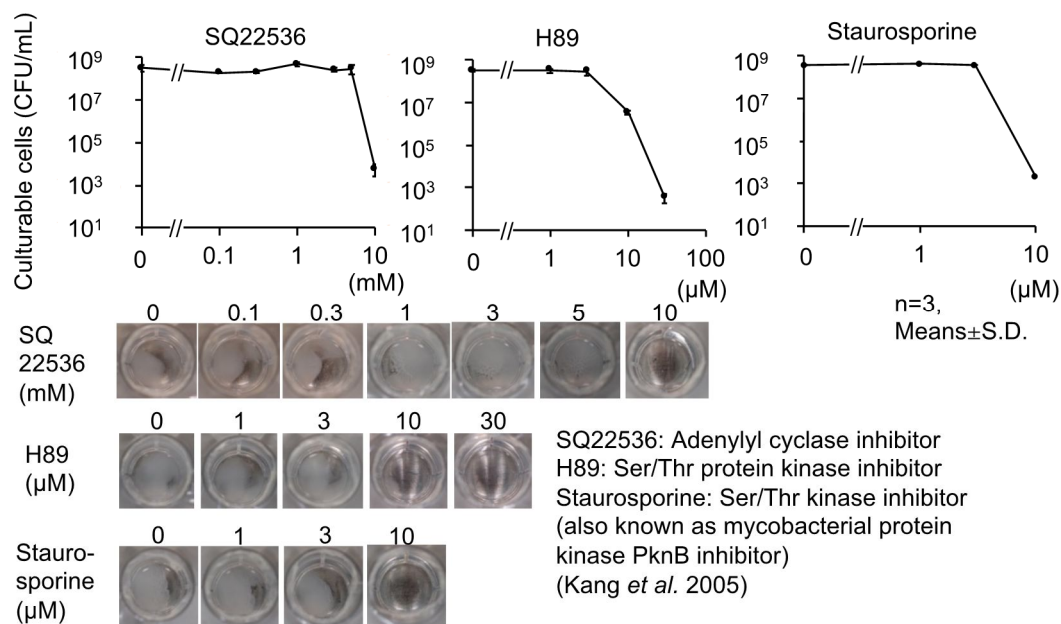


図 2. Ser/Thr キナーゼ H89 および Staurosporine の VBNC 結核菌再活性化阻害効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morishige Yuta, Murase Yoshiro, Chikamatsu Kinuyo, Aono Akio, Igarashi Yuriko, Shimomura Yoshiko, Hosoya Makiko, Kamada Keisuke, Yamada Hiroyuki, Takaki Akiko, Mitarai Satoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Bovine serum albumin as a resuscitation promoting factor for viable but non-culturable <i>Mycobacterium tuberculosis</i> via the activation of protein kinase A-dependent cellular processes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.11.22.468319	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森重雄太, 村瀬良朗, 近松絹代, 山田博之, 御手洗聡
2. 発表標題 迅速発育性抗酸菌 <i>Mycobacterium abscessus</i> species の休眠誘導実験系の構築
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第79回学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森重雄太, 村瀬良朗, 近松絹代, 山田博之, 青野昭男, 五十嵐ゆり子, 高木明子, 御手洗聡
2. 発表標題 血清アルブミンによるVBNC(viable but non-culturable)結核菌の再活性化機構
3. 学会等名 第7回抗酸菌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森重雄太, 村瀬良朗, 近松絹代, 山田博之, 青野昭男, 五十嵐ゆり子, 高木明子, 御手洗聡
2. 発表標題 血清アルブミンによるVBNC結核菌の再活性化機構
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuta Morishige, Yoshiro Murase, Kinuyo Chikamatsu, Hiroyuki Yamada, Akio Aono, Yuriko Igarashi, Yoshiko Shimomura, Makiko Hosoya, Akiko Takaki, Satoshi Mitarai
2. 発表標題 Reactivation effects of albumin and antioxidative agents to viable but non-culturable Mycobacterium tuberculosis - a wake-up call for tubercle bacilli-
3. 学会等名 ASM Conference on Biofilms 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森重雄太, 村瀬良朗, 下村佳子, 細谷真紀子, 青野昭男, 近松絹代, 五十嵐ゆり子, 山田博之, 高木明子, 御手洗聡
2. 発表標題 VBNC(viable but non-culturable)結核菌のアルブミンによる再活性化機構の解析
3. 学会等名 第97回日本結核・非結核性抗酸菌症学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森重雄太, 村瀬良朗, 近松絹代, 青野昭男, 五十嵐ゆり子, 大薄麻未, 鎌田啓佑, 山田博之, 高木明子, 御手洗聡
2. 発表標題 アルブミンによるVBNC結核菌の再活性化機構
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森重雄太, 村瀬良朗, 大薄麻未, 下村佳子, 細谷真紀子, 近松絹代, 青野昭男, 五十嵐ゆり子, 鎌田啓佑, 山田博之, 高木明子, 御手洗聡
2. 発表標題 VBNC結核菌の再活性化に対するアルブミンおよび抗酸化物質の影響
3. 学会等名 日本バイオフィルム学会第35回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森重雄太, 村瀬 良朗, 大薄 麻未, 下村 佳子, 細谷 真紀子, 五十嵐 ゆり子, 近松 絹代, 青野 昭男, 山田 博之, 高木 明子, 御手洗 聡]
2. 発表標題 VBNC状態の結核菌の代謝活性イメージング
3. 学会等名 第77回日本顕微鏡学会学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関