

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25871158

研究課題名(和文)細胞内寄生に影響を与える抗酸菌代謝機構の解析

研究課題名(英文)Characterization of metabolism in mycobacteria, which affects the intracellular survival

研究代表者

宮本 友司 (Miyamoto, Yuji)

国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・主任研究官

研究者番号：40392328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸菌の代謝機構は、細胞内寄生性に影響を及ぼすことが知られているが、その詳細なメカニズム等は不明である。本研究では代謝機構の解明を目指し、多面的なアプローチにより解析を試みた。栄養成分の代謝能解析では、一部の抗酸菌が他とは異なる窒素源の代謝機構を持つことが明らかとなった。一方、抗酸菌の菌体内代謝成分の動態解析を実施した結果、特徴的な代謝産物の動態を示すことが判明した。さらに、代謝の動きを適切に評価し得る遺伝子マーカーについても、その一部を同定することが出来た。依然として、抗酸菌の代謝機構は多くの点で未解明であるが、本研究の結果はその一端を明らかにしたものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is known that the metabolism in mycobacteria critically plays a role in maintaining the intracellular survival in host, while its details remain unclear. In this study, for understanding the mechanism of mycobacterial metabolism, multifaceted experimental approaches have been carried out. Evaluation of metabolic activity demonstrated that *M. leprae* has unique nitrogen metabolism which is different from other mycobacteria. Additionally, comprehensive investigation focusing on metabolites and genetic marker showed that the fate of mycobacterial metabolites has distinctive feature and a part of the RNA molecules could be a promising indicator of metabolic activity. These results would shed light on undefined mechanism of metabolism in mycobacteria.

研究分野：細菌学

キーワード：抗酸菌 代謝

1. 研究開始当初の背景

抗酸菌は、結核やハンセン病といった人類にとって未だ大きな脅威となっている感染症を引き起こす原因細菌である。結核による死亡者は全世界で年間数百万人を数え、ハンセン病は発展途上国を中心に今なお年間数十万の新規患者が発生している。一方、土壌や水中などの自然環境に広く存在し、結核様症状を誘導する非結核性抗酸菌症も近年増加傾向にあり同様に重要な慢性感染症である。また、これらの疾病を引き起こす抗酸菌には、多剤耐性結核菌の出現や有効な治療薬の存在しない非結核性抗酸菌の伝播といった薬剤を用いた治療戦略に対する懸念もはらんでいる。従って、新たに有効な予防・治療法の開発へとつながる病原性・発症機構の解明が望まれている。

2. 研究の目的

Mycobacterium tuberculosis (結核菌) や *Mycobacterium leprae* (らい菌) などの病原性抗酸菌は、宿主に感染後、主にマクロファージなどの免疫担当細胞内に寄生し分裂増殖する。これを可能としている一次的な要因としては、殺菌的処理を担う細胞内のライソゾーム等の中で抗酸菌が抵抗性を示し、なお且つライソゾーム等への移行自体から逃れることが挙げられる。これらの仕組みには、抗酸菌の細胞壁に豊富に含まれる糖脂質分子の関与が知られている。一方で、殺菌的処理から逃れた抗酸菌が細胞内で分裂増殖を継続するためには、宿主細胞内の極めて偏った環境から栄養を取得・利用し自身の代謝を維持しなければならない。従って、抗酸菌は細胞内寄生に適した代謝機構を保持していることが考えられるが、そのメカニズム等は未だ不明な点が多い。本研究では抗酸菌の病原性や発症機構の解明に繋がる可能性のある代謝機構を明らかにすることを目的とし、多面的なアプローチによる解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) 抗酸菌の中でも人工培地での分裂増殖が不能である *M. leprae* の代謝活性に影響を及ぼす栄養成分の検討を行った。様々な栄養成分を含む培地を作製し、*M. leprae* を一定時間接触させた後、パルミチン酸のベータ酸化の結果生じた ^{14}C の定量で代謝活性の評価を行った。比較対照として *Mycobacterium bovis* BCG も同様に解析した。

(2) 抗酸菌研究においてモデルとして頻繁に使用される *Mycobacterium smegmatis* の菌体内代謝産物の動態解析を試みた。培養菌体を Milli-Q 水で洗浄後、メタノールによって代謝産物が含まれる菌体内成分を抽出し、クロロホルムによる脂質成分、さらに限外濾過フィルターによる不純物の除去をそれぞれ行い、分析用サンプルとした。イオン性化合物の検出に適した CE-MS (capillary

electrophoresis-mass spectrometry) 法により、菌体内成分に含まれる低分子イオン性化合物の同定及びそれらの含有比を算出した。

(3) 抗酸菌の代謝活性を鋭敏に評価し得る RNA マーカーの探索を目的として、栄養成分の量比や代謝阻害剤の有無等諸条件を変化させた培地に *M. leprae* を一定時間に接触させた。その後、*M. leprae* 菌体より抽出した Total RNA を使用し、候補 RNA 分子の定量比較を RT-qPCR により行った。

4. 研究成果

(1) *M. leprae* の代謝活性を *M. bovis* BCG と比較検討した結果、*M. leprae* では *M. bovis* BCG に比べアルブミンを代謝する能力が高いことが判明した。一方、各種アミノ酸の代謝能についても、*M. leprae* と *M. bovis* BCG の間で異なる傾向を示した。この結果は、*M. leprae* と *M. bovis* BCG では窒素源の代謝機構に異なる仕組みが存在することを示唆するものである。寄生細胞内には宿主由来のタンパク質やアミノ酸等の窒素源が存在するが、それらを効率的に自身の代謝に利用することは細胞内寄生性を発揮する上で重要な戦略であると考えられる。ハンセン病の病原体である *M. leprae* が特徴的な窒素源の利用能を示したことは、抗酸菌の中でも唯一末梢神経に寄生する *M. leprae* の特異的な病原性と代謝機構の関わりを探る上で一つの鍵と成り得るものであった。

(2) *M. smegmatis* の菌体内には、エネルギー、核酸及びアミノ酸代謝に関与する多くの化合物が含まれており、それらの中でもアミノ類の一つである citrulline の含有量が著しく高いことが判明した。この結果は、抗酸菌が自身の菌体内に栄養成分としてのアミノ酸を貯蔵し、長期にわたる細胞内寄生性を維持するためにこれらのアミノ酸を自身の代謝に利用していることが考えられる。一方、これまでに明らかになっている *M. leprae* の菌体内代謝成分の動態では、顕著な citrulline の蓄積は観察されていない。このことは、抗酸菌間で代謝成分の動態が異なることを示唆するものであり、これらの動態の違いが、抗酸菌症の病態の違いに (例えば結核では呼吸器、ハンセン病では末梢神経に寄生し病変を生じさせる等) 何らかの影響を及ぼしていることが考えられる。

(3) 候補 RNA の検討を行った結果、栄養環境及び代謝阻害によって 16S rRNA の前駆体分子が、速やかに変化することが判明した。現在、一般的には、細胞内寄生している抗酸菌の代謝活性或いは生存度を評価するには、細胞外に出した寄生菌を培地上で生育させ、生菌数の算出を行う CFU (colony formation unit) 法が採用されている。しかし、この方

法では直接的な寄生菌の評価は困難である。一方、本研究で明らかとなった 16S rRNA の前駆体分子は、極めて鋭敏に代謝の状況を反映するため、より実態に近い評価が出来る可能性がある。特に、人工培地上で生育することが出来ない *M. leprae* の評価には非常に有効な手法となり得る。従って、16S rRNA の前駆体分子は *M. leprae* を含む抗酸菌の細胞内寄生性と関連する代謝動態を適切に評価する上で、重要な指標となり得ることを示している。

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 4 件)

Oaku S., Nagata M., Miyamoto Y., Ishii N., Aozasa N. Two cases of *Mycobacterium marinum* infection on the upper limbs. The Journal of Dermatology, DOI: 10.1111/1346-8138. 13920. 2017

Miyamoto Y., Mukai T., Matsuoka M., Kai M., Maeda Y., Makino M. Profiling of Intracellular Metabolites: An Approach to Understanding the Characteristic Physiology of *Mycobacterium leprae*. PLOS Neglected Tropical Diseases, Vol.10:e0004881. 2016.

Kai M., Fafutis-Morris, M., Miyamoto, Y., Mukai, T., Mayorga-Rodriguez, J., Rodriguez-Castellanos, M., Matsuoka, M. Mutations in the DRDR region of *Mycobacterium lepromatosis* isolated from leprosy patients in Mexico. The Journal of Dermatology, Vol. 43:1345-1349. 2016.

Nomura H., Funakoshi T., Chaya A., Tanikawa A., Miyamoto Y., Ishii N. Cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection after body piercing. European Journal of Dermatology, Vol. 26:635-637. 2016.

[学会発表](計 5 件)

Miyamoto Y., Nguyen Phuc N. Ha, Kai M., Maeda Y., Mukai T., Nguyen Thanh Tan. Characterization of pre-rRNA as a viability indicator for *Mycobacterium leprae*. 19th International Leprosy Congress, Beijing, China, 2016 年 9 月 19-20 日

Miyamoto Y., Mukai T., Matsuoka M., Kai M., Maeda Y., Makino M. Comprehensive profiling of cellular components: an approach to understanding the

characteristic physiology of *Mycobacterium leprae*. 50th Anniversary of the U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, Bethesda, USA, 2016 年 1 月 13 日

宮本友司、向井徹、牧野正彦：
Mycobacterium leprae のアミノ酸代謝解析 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会、所沢(埼玉)、2014 年 9 月 30 日

宮本友司、向井徹、牧野正彦：抗酸菌におけるアミノ酸生合成・代謝解析 第 87 回日本細菌学会総会、江戸川区(東京)、2014 年 3 月 27-28 日

Miyamoto Y., Matsuoka M., Fukutomi Y., Mukai T., Kai M., Maeda Y., Makino M. Metabolome analysis of *Mycobacterium leprae*. 18th International Leprosy Congress, Brussels, Belgium, 2013 年 9 月 17 日

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 友司 (MIYAMOTO, Yuji)
国立感染症研究所・ハンセン病研究センター
感染制御部・主任研究官
研究者番号：40392328

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()