

令和元年6月14日現在

機関番号：30108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08347

研究課題名(和文)非同義置換一塩基多型を利用した結核菌機能因子の探索

研究課題名(英文) Identification of functional factors of Mycobacterium tuberculosis M strain using non-synonymous SNP

研究代表者

前田 伸司 (Maeda, Shinji)

北海道科学大学・薬学部・教授

研究者番号：50250212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：国内で分離される結核菌で大きなクラスターを形成するM株は、病原性が高いと報告されている新興型北京型株である。このM株の全ゲノム解析によって、45種類の遺伝子がアミノ酸置換を伴う一塩基多型を持つことが明らかになった。これら遺伝子に注目して、野生型(H37Rv株)配列と変異型(M株)塩基配列を持つ遺伝子を導入した過剰発現用プラスミドを構築し、形質転換効率と増殖速度について比較を行った。脂肪酸の代謝酵素であるfadD25、fadB3は、M株型の変異が存在する酵素を発現した株の方が、形質転換効率が高くなった。このことから、これら遺伝子が、感染性や病原性などに関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

M株のゲノム解析により得られた非同義一塩基多型を持つ遺伝子解析によって、結核菌を含む抗酸菌では、脂肪酸代謝酵素のアミノ酸置換により、形質転換効率が高くなった。このように、脂肪酸代謝酵素の構造変化により表現型に変化が生じることは、脂肪酸合成酵素が病原性や感染性などに関与している可能性を示唆する。重要な病原性因子(遺伝子)が特定できれば、より危険度の高い結核菌を迅速に鑑別することが可能になる。また、新規抗微生物薬の標的となる反応を特定することができる。

研究成果の概要(英文)：M strains that form a large cluster of Mycobacterium tuberculosis isolated in Japan are one of the Beijing modern-type strains that are reported to be highly pathogenic. The whole genome analysis of the M strain revealed that 45 genes have a single nucleotide polymorphism (SNP) accompanied by amino acid substitution (non-synonymous).

Focusing on these genes, plasmids were constructed having the wild type nucleotide (H37Rv sequence) and the mutation type (M strain sequence). The transformation efficiency and the growth rate were compared between them. The fatty acid metabolic enzymes, fadD25 and fadB3 may be involved in infectivity and virulence because the transformation efficiency was higher when the M strain mutant type was expressed.

研究分野：微生物学

キーワード：結核菌 ゲノム 一塩基多型

1. 研究開始当初の背景

結核は、空気感染により他人に広がり、世界的にも未だに多くの患者が新規患者として登録されている。日本では特に高齢者を含む易感染性宿主に甚大な被害を与える呼吸器感染症のひとつである。国内では2017年において16,789人の新規患者が発生し、2,303名が亡くなっており、積極的に対応すべき感染症のひとつである。また、日本の新規登録結核患者の71.1%が60歳以上の患者となっている。また、結核を含めた抗酸菌は、細胞壁が強固な脂質成分に富む(菌体重量の約40%)ことが最大の特徴である。このような脂質分子は、感染宿主に多彩な影響を及ぼし細胞壁構成因子や脂質成分の合成酵素やメカニズムの解明は重要である。

結核菌の遺伝系統により病原性が異なることが報告され、特に北京型結核菌は、モデル動物を用いた感染実験によって他の遺伝系統と比べて病原性が高いこと、さらに、この系統の結核菌は、薬剤耐性に関連しており、多剤耐性化しやすい傾向があることが報告されている。

世界的に広まっている結核菌は、Large sequence polymorphisms (LSP) 分析によって大きく6つの遺伝系統(グループ)に分けられる。各遺伝系統の結核菌は特定の地域に局在化して広まっており、北京型結核菌は台湾を除く東アジア諸国(日本を含めて)で広まっている。診断一菌の遺伝系統に依存せず結核菌特異抗原でヒトリンパ球を刺激することによって放出されるγ-インターフェロンを検出する Interferon-gamma release assay (IGRA) や培養による菌の同定により感染診断が行われている。結核については、病原性や感染性に関する遺伝子など未解明な部分が多い。病原性に関しては、結核菌(MTB)の遺伝系統によって異なる。

今回実験に用いた臨床分離株のひとつである北京型結核菌 M 株は、東京都、大阪府、神戸市及び沖縄県等の主要都市で分離されることから既に広く蔓延していることが報告されている。そのため、この M 株は、ヒトからヒトへの感染性が高いと推定される。そこで、この M 株のゲノム上の多型についての特徴を結核菌標準株(H37Rv)と比較を行った。

感染性や病原性に関する遺伝子の同定ができれば、有力な抗菌薬の標的候補となり、結核菌の感染制御に利用できる。本研究により、将来的に結核患者数を低下させるための施策に貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

結核は空気感染で他人に広がり、日本では特に高齢者を含む易感染性宿主に甚大な被害を与える呼吸器感染症のひとつである。結核菌の遺伝系統で病原性が異なり、動物感染実験で東アジアを中心に広まっている北京型結核菌は、他の遺伝系統より病原性が高いこと、また多剤耐性結核菌と関連していることが報告されている。臨床分離株のひとつである北京型結核菌 M 株は東京都、大阪府、神戸市及び沖縄県等の主要都市で分離されることから既に広く蔓延しており、感染性が高いと推定される。そこで、次世代シーケンサー解析で得られた M 株が共通に持つ非同義一塩基置換(SNP)が存在する遺伝子に注目し、リコンビナント蛋白質を過剰発現させて、菌の形態、形質転換効率や増殖速度など表現型の変化を調べる。このような方法で研究を進め、菌の感染性に関連すると推定される遺伝子の同定を行った。感染性や病原性に関する遺伝子の同定ができれば、有力な抗菌薬の標的候補となり、結核菌の感染制御に利用できる。

3. 研究の方法

日本国内で広まっている北京型結核菌 M 株(代表的な結核菌の型別法である IS6110-制限酵素断片長多型、反復配列多型でそれぞれ同一パターン)に注目して、感染性や病原性に関する遺伝子を同定する。M 株の全ゲノム解析で得られた M 株内で共通する非同義 SNP を持つ 45 遺伝子を候補として、その中から選択した遺伝子をクローニングして発現ベクターを構築した。*Mycobacterium smegmatis* 及び *Mycobacterium bovis* BCG で非同義 SNP を持った遺伝子を過剰発現させた。野生株と比較してコロニーの形態・形状変化や菌の細胞壁構造が変化した変異株をスクリーニングして、変化に関連する遺伝子の同定を行った。このような感染性や病原性に関連すると推定される遺伝子に関して、遺伝子破壊株作製及び相補株の作製を行い、特定した遺伝子の機能を確認する。

4. 研究成果

(1) 非同義置換 SNP を持つ蛋白質(酵素)の選択とプラスミドの構築

45 種類の非同義置換 SNP を持つ蛋白質について、結核菌データベースを検索することでそれぞれの機能を推定した。これらの中で、主に菌の代謝、細胞壁の合成に関連すると推定される 10 種類の遺伝子を選び抗酸菌で過剰発現実験を行った。候補遺伝子としては、*fadD25* (1,752-bp)、*fadB3* (915-bp)、*fadE17* (1,230-bp)、*ftsQ* (945-bp)、*kdtB* (486-bp)、*hsaD* (876-bp)、*pheS* (1,026-bp)、*leuB* (1,011-bp)、*Rv1200* (1,278-bp)、*Rv0373c* (2,400-bp) とし、抗酸菌遺伝子発現プラスミド(pVV16)の *Nde* I/*Hind* III サイトに各遺伝子を導入した。

(2) エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入

野生型 (H37Rv とほぼ同じ塩基配列を持つ BCG 株由来の遺伝子) と変異型 (M 株の非同義置換 SNP を持つ遺伝子) を *M. smegmatis* 及び *M. bovis* BCG に導入して表現型の変化を調べた (図)。抗酸菌に約 0.5 µg のプラスミドを混合して、エレクトロポレーションを行った。*M. smegmatis* を宿主にした場合は、エレクトロポレーションの 5 日後に、コロニー数を観察した。また、*M. bovis* BCG を形質転換した時は、2 週間から 3 週間後にコロニーが形成した。

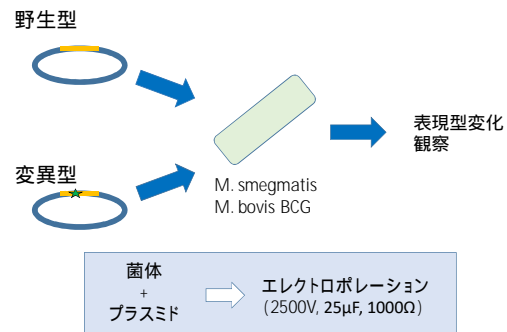


図 抗酸菌への野生型と変異型プラスミドの導入

(3) 各遺伝子発現株のコロニー形成率と増殖速度

非同義置換 SNP を持つ遺伝子について、野生型遺伝子と M 株型遺伝子をそれぞれ抗酸菌に導入して形質転換効率および増殖速度を比較した。その結果、導入した遺伝子によって、以下のように 3 つのグループ、(1) 非同義置換 SNP を持つ遺伝子を導入した変異株が、野生型遺伝子を導入した株より形質転換効率が高く、またその後の増殖が速い傾向を持った遺伝子 (*fadD25*, *fadB3*)、(2) 野生型遺伝子発現株が、変異型遺伝子発現株より、形質転換効率が高くなる遺伝子 (*kdtB*, *pheS*, *Rv0373c*, *Rv1200*)、(3) M 株型遺伝子と野生型遺伝子で、形質転換効率がほとんど変わらない遺伝子 (*fadE17*, *ftsQ*, *hsaD*, *leuB*)、に分類することができた。

(4) 遺伝子を導入した抗酸菌の違いによる影響の有無

最初は、迅速発育菌の *M. smegmatis* で遺伝子過剰発現による表現型の違いを調べたが、遅発育菌である *M. bovis* BCG を形質転換した場合についても、同様に調べた。形質転換から 3 週間後、さらに 3 週間培養 (形質転換から 6 週間後) した結果を観察した。BCG では、コロニー形成までに時間がかかったが、各プラスミドの野生型と変異型おける形質転換効率やコロニー数などの違いは、*M. smegmatis* の場合に得られた結果と同様な傾向であった。

(5) 導入した各遺伝子の機能と結果

今回の実験は、遺伝子の過剰発現実験であり、もともと菌体内に生理的に存在する酵素 (タンパク質) も共存していることから、各遺伝子の機能が見え難くなっている可能性がある。今回用いた指標である形質転換や増殖能に遺伝子産物が関連しなければ、上記の (3) グループのような結果となる。

1) *fadD25* と *fadB3* について

M 株型プラスミドを導入することで、形成したコロニー数が増加した。これらの酵素は、脂肪酸の代謝に関連することから、変異が入った酵素を過剰発現することで代謝活性が促進し、コロニー形成と菌の増殖に関与しているものと考えられる。脂肪酸の代謝酵素が変化することに伴い菌の性質が変化した。このことから、感染性や病原性などに関与している可能性がある。

2) *kdtB*, *pheS*, *Rv0373c*, *Rv1200* について

Rv0373c, *Rv1200* は、相同性検索で機能が判明していないタンパク質 (酵素) なので、今後、他の表現型で検討を進める必要がある。他方、*kdtB*, *pheS* は、それぞれ phosphopantetheine adenylyltransferase と Phenylalanyl-tRNA synthetase をコードする遺伝子である。それぞれの酵素に M 株型の変異が入ることで、形質転換や増殖速度が低下した。酵素の基質特異性が変化することで、ネガティブに作用してこのような現象が起こったと考えられる。

3) *ftsQ* について

菌の分裂に関連する *ftsQ* では、野生型あるいは M 株 (変異) 型プラスミドを導入すると、*M. smegmatis* で 5 日経過してもコロニー形成は観察できなかった。しかし、更に 4 日後 (エレクトロポレーションから 9 日目) になってコロニーが観察できたことから、*ftsQ* の過剰発現は、菌の増殖能を形質転換初期に低下させることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

前田伸司、藤原永年、山本三郎、瀧井猛将、反復配列多型 (VNTR) 分析を利用した結核菌と BCG 推定の可能性、日本感染症学雑誌、査読有、第 92 巻、第 5 号、2018、705-709
<http://journal.kansensho.or.jp/Disp?pdf=0920050705.pdf>

〔学会発表〕(計 7 件)

Nagatoshi Fujiwara, Yuji Miyamoto, Minoru Ayata, Takashi Naka, Hirotaka Kuwata, Hiroyuki

Yamada, and Shinji Maeda : The structure and biosynthesis gene cluster of a novel glycopeptidolipid isolated from clinical nontuberculous mycobacteria. FEMS 2019-The 8th Congress of European Microbiologists. Glasgow, July 7-11, 2019 Scotland.

前田伸司、和田崇之、藤原永年 : 非同義置換一塩基多型を利用した結核菌 M 株の機能因子の探索、第 92 回日本細菌学会総会、2019 年 4 月、札幌

瀧井猛将、小川翔大、大原直也、小川賢二、八木哲也、藤原永年、前田伸司、伊藤佐生智、肥田重明、小野寄菊夫 : トリ型結核菌 *Mycobacterium avium* の酸性環境下における適応機構の解析、第 92 回日本細菌学会総会、2019 年 4 月、札幌

藤原永年、宮本友司、綾田稔、中崇、桑田啓貴、前田伸司 : 非結核性抗酸菌臨床分離株の新規糖ペプチド脂質抗原と生合成遺伝子群の解析、第 92 回日本細菌学会総会、2019 年 4 月、札幌

Nagatoshi Fujiwara, Takashi Naka, Minoru Ayata, Shinji Maeda, Takemasa Takii, Hideaki Ohno, and Saburo Yamamoto : The lipid phenotypes of *Mycobacterium bovis* BCG substrains and their host responses, BCG 110 years after its conception. December 3-5, 2018, Institut Pasteur de Lille, Lille Cedex, France

Shinji Maeda, Nagatoshi Fujiwara, Saburo Yamamoto, and Takemasa Takii : Retrospective study for estimation of *Mycobacterium bovis* BCG based on variable number tandem repeated location, BCG 110 years after its conception. December 3-5, 2018, Institut Pasteur de Lille, Lille Cedex, France

Nagatoshi Fujiwara, Minoru Ayata, Hiroyuki Yamada, Takashi Naka, Hirotaka Kuwata, and Shinji Maeda : The Morphology Affects Bacterial Virulence in Mycobacteria : SCANDEM 2018. June 26-28, 2018, Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者 : 前田 伸司
(MAEDA, shinji)

研究者番号 : 50250212

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 : 藤原 永年
(FUJIWARA, nagatoshi)

研究者番号 : 80326256

連携研究者 : 和田 崇之
(WADA, takayuki)

研究者番号 : 70332450