

令和 2 年 9 月 17 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15695

研究課題名（和文）イソニアジド耐性に係る結核菌由来katG遺伝子上変異の解析及び結晶構造解析

研究課題名（英文）Functional analysis and characterization of KatG mutations associated with isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis and their crystal structures

研究代表者

金 玄 (KIM, HYUN)

国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官

研究者番号：90648817

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：1953年度より、すでにイソニアジドに耐性を示す結核菌が報告されるようになって、現在でもイソニアジドに対する耐性を示す結核菌が広がっている。そのため、イソニアジド耐性獲得機構の解明が急務となっている。本研究課題では迅速なイソニアジド感受性試験を可能とするために、イソニアジド耐性結核菌におけるkatG遺伝子上の変異とイソニアジド耐性獲得との関連を明らかにすること、並びにイソニアジドの構造を最適化することによって耐性菌が出現しにくい新規抗結核剤の開発を行うことを目的として研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は積極的に国内外の学術研究会において発表するとともに、論文著書として広く公開する。ホームページや報道機関の発表、市民公開講座等を通じて、研究成果を一般国民に向けて分かりやすく発信することも予定している。また、研究成果のうち必要なものについては特許の申請を行い、他の研究者や研究機関において利用可能な状態にする。

研究成果の概要（英文）：As isoniazid (INH) is an integral first-line anti-tuberculosis drug, INH-resistant Mycobacterium tuberculosis has become an urgent global health problem. Mutations of several genes, such as katG, inhA, and ahpC in M. tuberculosis have been reported to be associated with INH-resistance. However, all specific mutation points involved in the resistance have not yet been determined.

In this study, we sequenced the whole genomes of 11 INH-resistant M. tuberculosis clinical isolates collected from Taiwan and found five novel mutants in the katG. KatG exhibits catalase and peroxidase activities and also activates INH. Therefore, it seems that these novel mutations in the katG are involved in INH-resistance. This study aimed to elucidate the interaction between novel mutants in the katG and INH-resistance.

研究分野：細菌学

キーワード：M.tuberculosis KatG Isoniazid-resistance

1. 研究開始当初の背景

(1) 結核は全世界で毎年約 1000 万人の新規患者と、約 150 万人の死亡者を出している重要な慢性感染症である(Global TB report 2019, WHO)。近年、薬剤に耐性を示す結核菌(多剤耐性及び超多剤耐性結核菌を含む)が報告されるようになり、耐性獲得機構の解明が急務となっている。

(2) イソニアジドは 1951 年になって、結核に対して効果を持つことが明らかになったため、結核の治療薬として 1952 年より抗結核薬として使用されている(Science.1952.116:129-134)。しかしながら、使用 1 年後の 1953 年にはすでにイソニアジドに耐性を示す結核菌が報告されるようになり(Science.1953.118:297-299) 現在ではイソニアジドに対する耐性を示す結核菌が広まっている。そのため、イソニアジド耐性獲得機構の解明が急務となっている。イソニアジドはプロドラッグであり、細菌のカタラーゼ(結核菌では KatG 蛋白質)によって活性化されることが様々な論文で示されており(Molecular Microbiology.2006.62(5)1220-1227) イソニコチン酸アシル-NADH 複合体を形成することによって抗菌活性を示す(参照、図 1)。

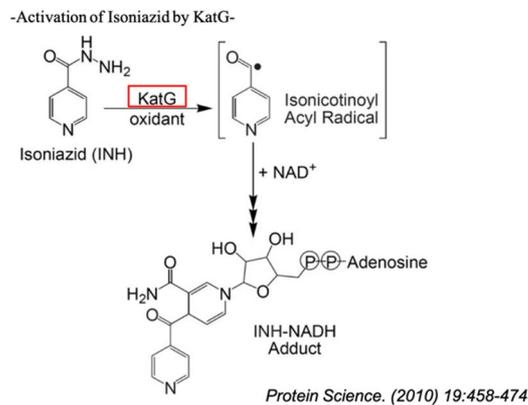


図1. katGにより、活性化されるイソニアジド

これまでも *katG* 遺伝子上の変異とイソニアジド耐性との関連については報告されているものの、その全容を解明するまでには至っていない。最近でも、本申請者らは台湾で分離されたイソニアジド耐性結核菌のゲノム解析から、新規の *katG* 遺伝子上の変異を見出したが、本遺伝子変異とイソニアジド耐性との関連については不明である。結核菌では培養による感受性検査は約 2 ヶ月の時間を要するために現実的ではないことから、*katG* 遺伝子上の変異とイソニアジド耐性

との関連についてその全容を明らかにすることによって、遺伝子変異検出に基づいた迅速なイソニアジド感受性試験の開発に結びつけることが臨床現場では求められている。また、多剤耐性結核菌の蔓延に伴い、新規抗結核薬の開発も強く望まれている。

2. 研究の目的

本研究課題では、迅速なイソニアジド感受性試験を可能とするために、イソニアジド耐性結核菌における *katG* 遺伝子上の変異とイソニアジド耐性獲得との関連を明らかにすること、並びにイソニアジドの構造を最適化することによって耐性菌が出現しにくい新規抗結核薬の開発を行うことを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

(1)イソニアジド耐性結核菌における新規 *katG* 遺伝子変異の同定：世界各国で分離されたイソニアジド耐性結核菌の全ゲノムを次世代シーケンサーを用いて解析を行い、レファレンス株である結核菌 H37Rv 株のゲノムと比較することにより、*katG* 遺伝子上の新規変異(5 種類)を同定した。全ゲノム解析が困難な場合は、PCR 法により *katG* 遺伝子のみを増幅させたのち、シーケンサーで配列の解析を行った。

(2) 組替え変異型 *katG* 遺伝子の構築及び発現と精製：PCR 法により結核菌 H37Rv 株由来の野生型 (WT) *katG* 遺伝子を増幅させ、発現用ベクターである pET30a に挿入することにより、結核菌由来 WT *katG* 発現プラスミド、pET30a-WT *katG* を作製した。変異型 *katG* 遺伝子の発現用プラスミドは、WT *katG* 遺伝子を鋳型として、市販のキット (QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit、アジレント社) を用いて変異を導入した後、pET30a-WT ベクターに挿入した。各プラスミドを大腸菌由来株である BL21(DE3)pLysS に導入し、Luria-Broth (LB) 中で IPTG を加えることによって発現を誘導した後、集菌した。集菌した菌体の破碎を行い、その遠心上清について His タグを利用したアフィニティークラムとゲルろ過を用いたカラムクロマトグラフィー操作を行うことにより、SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製を行った。

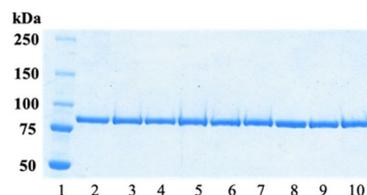
(3) 組替え KatG の酵素活性：精製した組替え WT 及び変異型 KatG について、基質である H₂O₂ 及び *o*-dianisidine を用いて Catalase assay 及び Peroxidase assay を行い、その活性を評価した。Catalase assay は KatG の活性によって減少する H₂O₂ の量を UV spectrometer (240nm) で測定することにより評価し、Peroxidase assay は oxidation された *o*-dianisidine の量を UV spectrometer (460nm) で測定することによって評価した。

(4) 変異型 KatG の結晶構造解析：本課題で作製した変異型 KatG について、市販のキットを用いて結晶化条件のスクリーニングを行った。さらに、WT 及び変異型 KatG とイソニアジドとの共結晶化も試した。得られた結晶については放射光科学研究施設 (つくば市) で X 線回折データの収集を行った。

4. 研究成果

(1) 組替え野生型及び変異型 KatG :

組換え野生型及び変異型 KatG はニッケルアガロースカラムアフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーを用いて2段階で精製を行った (参照、図2)。全てのタンパク質は95%以上の純度で取得し、KatG の酵素活性を行い問題ないことを確認した。



1. Protein marker (by Bio-Rad)
2. WT *katG*
3. A106V *katG*
4. G111D *katG*
5. S315T *katG*
6. A479E *katG*
7. G712D *katG*
8. A106V+G111D+R463L *katG*
9. R463L+A479E *katG*
10. R463L+G712D *katG*

図2. 野生型及び変異型組替え KatG

(2) 組替え KatG の評価：本課題で確認した野生型及び変異型の組替え KatG の評価は Catalase assay (基質:H₂O₂) 及び Peroxidase assay (基質:*o*-dianisidine) を用いて活性の評価を行った (参照、図3)。その結果、イソニアジドの活性化、すなわちイソニアジド耐性に直接関与している新規アミノ酸変異 (A106V、A479E、R463L+A479E 変異) を同定した。一方、KatG の酵素活性には影響を与えるが、イソニアジドの活性化 (HPLC、LC-Mass spectrometry 分析法を用いて行い、データなし) には関与しないアミノ酸変異があることを明らかにした。

Reaction	Catalase assay			Peroxidase assay		
	K _m (mM)	V _{max} (U/mg)	k _{cat} (s ⁻¹)	K _m (mM)	V _{max} (U/mg)	k _{cat} (s ⁻¹)
WT <i>KatG</i>	1.88 ± 0.26	248.4 ± 8.4	333.9 ± 8.4	0.61 ± 0.11	0.034 ± 0.001	0.046 ± 0.001
A106V <i>KatG</i>	0.80 ± 0.09	76.48 ± 1.4	102.2 ± 1.4	1.40 ± 0.41	0.013 ± 0.001	0.017 ± 0.001
G111D <i>KatG</i>	N.D. ^a	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
S315T <i>KatG</i>	0.40 ± 0.10	51.80 ± 1.5	69.6 ± 1.5	0.97 ± 0.15	0.031 ± 0.001	0.042 ± 0.001
A479E <i>KatG</i>	2.46 ± 0.20	341.8 ± 7.8	459.4 ± 7.8	1.78 ± 0.33	0.054 ± 0.004	0.073 ± 0.004
G712D <i>KatG</i>	1.46 ± 0.12	236.5 ± 4.2	317.9 ± 4.2	0.88 ± 0.23	0.023 ± 0.002	0.031 ± 0.002
A106V+G111D+R463L <i>KatG</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
R463L+A479E <i>KatG</i>	0.92 ± 0.08	171.0 ± 2.6	229.8 ± 2.6	0.55 ± 0.10	0.022 ± 0.001	0.030 ± 0.001
R463L+G712D <i>KatG</i>	1.93 ± 0.21	245.7 ± 6.9	330.2 ± 6.9	0.74 ± 0.13	0.027 ± 0.001	0.036 ± 0.001

a: Not detected

図3. The results of Catalase and peroxidase assays

(3)組替えKatGの結晶構造解析：イソニアジド耐性獲得機構について詳細に解析を行うため、変異型KatGのX線結晶構造解析を行った(データなし)。さらに、WT及び変異型KatGとイソニアジドとの共結晶化も試みる。その結果、タンパク質の結晶化は成功したが共結晶化ができず、今後共結晶化について条件検討を行う予定である。さらに、得られた結晶は放射光科学研究施設(つくば市)にてX線回折データの収集を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Rimbara Emiko, Mori Shigetaro, Kim Hyun, Suzuki Masato, Shibayama Keigo	4. 巻 62
2. 論文標題 Mutations in Genes Encoding Penicillin-Binding Proteins and Efflux Pumps Play a Role in Lactam Resistance in <i>Helicobacter cinaedi</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e02036-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.02036-17	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Kim Hyun, Fukutomi Yasuo, Nakajima Chie, Kim Youn Uck, Mori Shigetaro, Shibayama Keigo, Nakata Noboru, Suzuki Yasuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 DNA gyrase could be a crucial regulatory factor for growth and survival of <i>Mycobacterium leprae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10815
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-019-47364-5	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Ouchi Yuki, Mukai Tetsu, Koide Kentaro, Yamaguchi Tomoyuki, Park Jong-Hoon, Kim Hyun, Yokoyama Kazumasa, Tamaru Aki, Gordon Stephen V., Nakajima Chie, Suzuki Yasuhiko	4. 巻 120
2. 論文標題 WQ-3810: A new fluoroquinolone with a high potential against fluoroquinolone-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tuberculosis	6. 最初と最後の頁 101891 ~ 101891
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.tube.2019.101891	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Park Jong-Hoon, Yamaguchi Tomoyuki, Ouchi Yuki, Koide Kentaro, Mori Shigetaro, Kim Hyun, Mukai Tetsu, Nakajima Chie, Suzuki Yasuhiko	4. 巻 26
2. 論文標題 WQ-3810 inhibits DNA gyrase activity in ofloxacin-resistant <i>Mycobacterium leprae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 335 ~ 342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.10.013	査読の有無 有
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 該当する

〔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 Emiko Rimbara, Shigetarou Mori, Hyun Kim, Masato Suzuki, Keigo Shibayama
2. 発表標題 Antimicrobial resistance in <i>Helicobacter cinaedi</i>
3. 学会等名 第93回日本細菌学会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shigetarou Mori, Naoko Honda, Hyun Kim, Emiko Rimbara, Keigo Shibayama
2. 発表標題 Crystal structure of a diadenosine tetraphosphate phosphorylase from <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
3. 学会等名 第93回日本細菌学会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hyun Kim, Shigetarou Mori, Emiko Rimbara, Keigo Shibayama
2. 発表標題 BFF122 shows inhibitory activities against <i>M. tuberculosis</i> and <i>M. leprae</i> DNA gyrase
3. 学会等名 第93回日本細菌学会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hyun Kim, Yasuo Fukutomi, Chie Nakajima, Youn Uck Kim, Shigetarou Mori, Keigo Shibayama, Naboru Nakata, Yasuhiko Suzuki
2. 発表標題 Functional analysis of <i>M. leprae</i> DNA gyrase and its role in bacterial growth and survival
3. 学会等名 第92回日本細菌学会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Emiko Rimbara, Atsushi Toyoda, Shigetarou Mori, Hyun Kim, Keigo Shibayama
2. 発表標題 Transcriptomic change by knockout of genes involving DNA modifications in <i>Helicobacter cinaedi</i>
3. 学会等名 第92回日本細菌学会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hyun Kim, Ruwen Jou, Shigetarou Mori, Emiko Rimbara, Keigo Shibayama
2. 発表標題 Functional analysis of KatG mutations associated with isoniazid-resistance in <i>M. tuberculosis</i>
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Emiko Rimbara, Masato Suzuki, Koji Yahara, Shigetarou Mori, Hyun Kim, Keigo Shibayama
2. 発表標題 Whole-genome phylogenetic analysis of <i>Helicobacter cinaedi</i> including isolates from nosocomial infection
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hyun Kim, Emiko Rimbara, Keigo Shibayama, Shigetarou Mori
2. 発表標題 Quinolinic acid phosphoribosyltransferase activity from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv and inhibition of its activity by Pyrazinamide
3. 学会等名 IUBMB (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----