

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07134

研究課題名(和文) 結核菌タンパク質PE_PGRS30のPHB2を介したアポトーシス誘導機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of apoptosis induced by mycobacterial protein PE_PGRS30 via host protein PHB2

研究代表者

松村 和典 (MATSUMURA, Kazunori)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：70537670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：結核菌タンパク質PE_PGRS30が結核菌から分泌され、免疫細胞マクロファージのアポトーシスを誘導することを見出した。PE_PGRS30の細胞内標的因子PHB2を同定した。PHB2は、ミトコンドリア構造タンパク質OPA1を切断から守ることでミトコンドリアの構造を維持しアポトーシスを防ぐ。本研究の結果、PE_PGRS30は、PGRSドメインを介して細胞質内のPHB2ミトコンドリア標的配列に結合し、PHB2をリソソームに移動させて分解し、ミトコンドリア内PHB2量を減少させ、OPA1を切断し、アポトーシスを誘導する機序が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結核菌が誘導する細胞死で、これまで明らかにされてきたのは外因性、すなわちリガンド-受容体の結合により産生されるTNFによりアポトーシスが誘導される機構であり、内因性細胞死の誘導機構は、ほぼ未知のままであった。今回我々は宿主側の標的因子を同定したことから、結核菌から分泌されミトコンドリアを介して感染細胞を死に至らしめる機構を初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ectopic expression of Mycobacterial protein PE_PGRS30 resulted in apoptotic cell death. We identified Prohibitin 2 (PHB2) as a candidate for interaction with PE_PGRS30. PE_PGRS30 and PHB2 were found to bind through the PGRS domain and mitochondrial target sequence, respectively. Recombinant PE_PGRS30 protein induced apoptosis in mouse alveolar macrophages. PE_PGRS30 and PHB2 co-localized via the PGRS domain in cells. PE_PGRS30 did not localize to mitochondria but co-localized with lysosomes. PHB2 have pivotal roles in structural maintenance of mitochondria by protecting OPA1, a mitochondrial structural protein, from processing, but when the PGRS domain was added to cells, cleavage of OPA1 occurred. These findings suggest that PE_PGRS30 functions by binding to intracellular PHB2 via the PGRS domain, translocating PHB2 to lysosomes for degradation, reducing the amount of PHB2 in mitochondria, and inducing apoptosis.

研究分野：細菌学

キーワード：結核菌 PE_PGRS30 マクロファージ アポトーシス PHB2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

結核は、世界で年間 1000 万人が新規に罹患し、100 万人が亡くなる感染症である。エイズ患者の主要な死因の一つであり、薬剤耐性結核菌の感染拡大が世界的な問題となっている。結核菌の病原性について、感染細胞の殺菌機構に抵抗する機序や、免疫応答を阻害する機序などが明らかにされてきた。しかし、結核菌病原性の全貌は未だに明らかになっていない。例えば、結核菌ゲノムでタンパク質コード領域の 10% を占めるのが (Pro-Glu) PE / (Pro-Pro-Glu) PPE ファミリーであるが、特定の機能を有する特徴的なドメイン等は報告されておらず、機能が同定されているタンパク質も少ない。PE ファミリーの中で最も数の多いサブファミリーが PE_PGRS ファミリーである。結核菌の近縁菌である魚類結核菌において、MAG24 という PE_PGRS ファミリータンパク質が、ゼブラフィッシュにおける病原性に寄与すること、かつ、魚類結核菌の宿主細胞内増殖に必須であることが報告された。この MAG24 の結核菌におけるホモログタンパク質の一つが PE_PGRS30 である。PE_PGRS30 は、結核菌感染後、慢性状態に至ったマウスの肺における結核菌の生菌数維持に必須で、特に細胞死誘導機能を持つことを示唆する結果が報告された。しかし、詳細な分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、結核菌タンパク質 PE_PGRS30 が細胞死を誘導する分子機構を明らかにすることである。結核菌感染細胞の細胞死を誘導する病原因子は、いくつか報告されているが、宿主側の因子を同定し、細胞死の機序を明らかにした例は少ない。結核菌が誘導する細胞死で、これまで明らかにされてきたのは外因性、すなわちリガンド-受容体の結合により産生される TNF- によりアポトーシスが誘導される機構であり、内因性細胞死の誘導機構は、あまり知られていない。

3. 研究の方法

(1) PE_PGRS30 による細胞死誘導の検討

PE_PGRS30 の機能を探るため、マウス単球様細胞株 RAW264.7 に PE_PGRS30 を発現させる。PE_PGRS30 発現細胞を同定するため、目印として PE_PGRS30 の C 末端に Myc タグを融合する。抗 Myc 抗体で PE_PGRS30 発現細胞を同定し、核及びミトコンドリア染色により、細胞の状態を検討する。また、アポトーシスのマーカーである活性型カスパーゼ 3 の発現を調べる。さらに、目印として N 末端に GFP を融合した GFP-PE_PGRS30 を RAW264.7 に発現させ、アポトーシスのマーカーである Annexin V で染色する。フローサイトメトリー解析により GFP 陽性である PE_PGRS30 発現細胞を同定し、Annexin V 陽性の割合を調べる。また、PE_PGRS30 のアポトーシス誘導に TNF- が関与しているかどうか検討するため、培養上清の TNF- 量を測定する。

(2) PE_PGRS30 の細胞内標的因子の探索

PE_PGRS30 が標的とする細胞内因子を同定するため、N 末端に GST を融合させた GST-PE_PGRS30 を大腸菌に発現させ、Glutathione Sepharose により精製する。この GST-PE_PGRS30 ビーズと RAW264.7 細胞破碎液を混合し、PE_PGRS30 に結合する宿主因子をプルダウンする。SDS-PAGE で展開し、CBB 染色で得られたバンドのうち、GST ビーズに無いバンドを質量分析で解析し、候補因子を同定する。

(3) 細胞内相互作用の確認

PE_PGRS30 を RAW264.7 に発現させ、宿主因子に対する抗体を用いた免疫沈降で、PE_PGRS30 が検出されるか確認する。

(4) 相互作用領域の同定

PE_PGRS30 は、N 末端から PE・PGRS・CT ドメインの 3 ドメインに分かれる。これらドメイン別の組換えタンパク質を発現・精製し、宿主因子の組換えタンパク質と混合し、どのドメインが宿主因子と相互作用するか明らかにする。一方、宿主因子が複数の領域に分かれる場合、これら領域別の組換えタンパク質を発現・精製し、どの領域が PE_PGRS30 と相互作用するのかが明らかにする。

(5) 結核菌による PE_PGRS30 分泌の検討

PE_PGRS30 の C 末端から 100 アミノ酸分のペプチドを発現・精製し、ウサギに投与する。血清から IgG 抗体を精製し PE_PGRS30 を特異的に認識するか確認する。結核菌標準株 Erdman を、対数増殖期まで培養し、集菌して、最低限の生命活動維持に特化したソートン培地に置換する。1 日後、培養上清を濃縮し、ウェスタンブロットにより、培養上清中に PE_PGRS30 が存在するかどうか検討する。

(6) 組換え PE_PGRS30 タンパク質添加によるアポトーシス誘導

PE_PGRS30 全長及び PE・PGRS・CT ドメインを大腸菌で発現・精製し、マウス肺胞マクロファージに添加する。AnnexinV で染色し、組換え PE_PGRS30 タンパク質が、マウス初代培養細胞のアポトーシスを誘導することを確認する。

(7) 組換え PE_PGRS30 タンパク質と宿主因子の細胞内共局在の検討

PE_PGRS30 全長及び PE・PGRS・CT ドメインを大腸菌で発現・精製し、マクロファージに添加する。宿主因子及びミトコンドリアを抗体等で染色し、共焦点顕微鏡で PE_PGRS30 と共局在しているかどうかを確認する。

(8) 組換え PE_PGRS30 添加による細胞内 OPA1 の長さの変化

組換え PE_PGRS30 タンパク質をマクロファージの培養上清に添加し、細胞破碎液中の OPA1 をウェスタンブロットで検出し、PE_PGRS30 の添加により OPA1 が短くなるか明らかにする。

(9) PE_PGRS30 の結核菌病原性への寄与

結核菌 Erdman 株を親株とした PE_PGRS30 遺伝子欠損株のマウス感染実験(生死観察、肺の生菌数測定)により、PE_PGRS30 の結核菌病原性への寄与を確認する。また、肺の組織染色から PE_PGRS30 のアポトーシス誘導への寄与を見出す。

4. 研究成果

(1) PE_PGRS30 による細胞死誘導の検討

PE_PGRS30 を RAW264.7 細胞に発現させたと、トランスフェクション後 12 時間をピークに発現細胞数が次第に減少した(図 1 A 上)。コントロールとして PE_PGRS33 と PE_PGRS62 を発現させたが、そのような現象は見られなかった。これらの結果から、PE_PGRS30 が細胞死を誘導したか、PE_PGRS30 が極端に不安定なタンパク質である可能性が考えられた。細胞の状態を確認するため、核の大きさを測定したところ、未処理細胞の核の大きさと比較して 70% 以下である細胞が 6 割近くを占めたことから、PE_PGRS30 がアポトーシスを誘導する可能性が示唆された(図 1 A 中)。またミトコンドリアの染色により膜電位の低下がみられた細胞(図 1 A 下)や、さらに活性型カスパーゼ 3 が検出された細胞も同程度の割合であった(図 1 B)。一方 GFP-PE_PGRS30 を発現させた細胞では、6 割以上が AnnexinV 陽性であった(図 1 C)。

さらに、培養上清中の TNF- α は、細胞死を誘導する濃度よりかなり低いレベルであった。以上の結果から、PE_PGRS30 は、RAW264.7 細胞のアポトーシスを誘導し、その機構はカスパーゼ依存的だが、TNF- α 非依存的な経路であることが明らかになった。

(2) PE_PGRS30 の宿主細胞内標的因子の同定

GST-PE_PGRS30 と RAW264.7 細胞破碎液のプルダウンアッセイにより、33kDa のタンパク質が相互作用候補として同定され、質量分析の結果、プロヒピチン 2 (PHB2) であることが明らかになった(図 2 A)。PHB2 は、核とミトコンドリアを行き来することで知られており、核内では転写因子として機能し、ミトコンドリアでは GTPase (OPA1) の長さを保つことでミトコンドリアの構造・品質維持に関与する。OPA1 が切断されるとアポトーシスが誘導される。抗 PHB2 抗体により、GST-PE_PGRS30 がプルダウンしたタンパク質が PHB2 であることを確認した(図 2 B)。

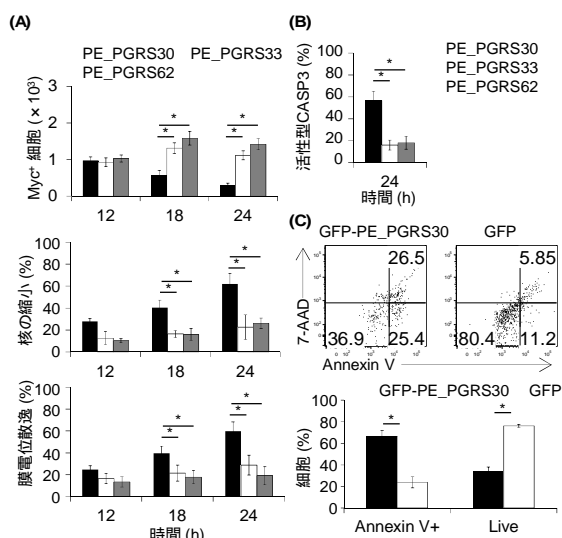


図 1 PE_PGRS30 はアポトーシスを誘導する

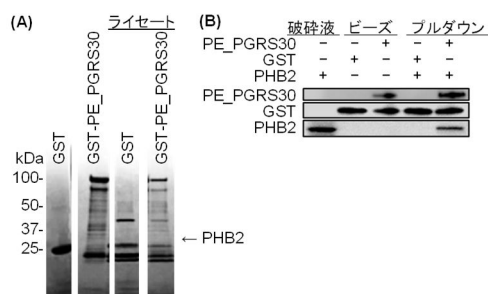


図 2 PE_PGRS30 の細胞内標的 PHB2

(3) 宿主細胞内標的因子の確認

RAW264.7 細胞に PE_PGRS30 を発現させ、抗 PHB2 抗体による免疫沈降を行ったところ、PE_PGRS30 が PHB2 と一緒に沈降していることを確認した。よって PE_PGRS30 の細胞内標的因子が PHB2 であることが明らかになった(図 3)

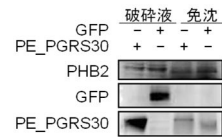


図 3 細胞内での PE_PGRS30 と PHB2 の結合

(4) PE_PGRS30 と PHB2 の相互作用領域の同定

PE_PGRS30 の 3 ドメインについて、N 末端に GST を融合した組換えタンパク質 GST-PE, GST-PGRS 及び GST-CT を作成し、PHB2 の N 末端に His を融合した組換えタンパク質 His-PHB2 とのプルダウンアッセイを行ったところ、GST-PGRS が His-PHB2 と結合することが明らかになった。(図 4 A) 一方、PHB2 は、N 末端側にミトコンドリア移行シグナルを含む領域 (1-50 アミノ酸) と C 末端側に核移行シグナルを含む領域 (51-299 アミノ酸) の 2 領域に分かれる。これら 2 領域の His 融合組換えタンパク質を作成し、GST-PE_PGRS30 とのプルダウンアッセイを行ったところ、1-50 アミノ酸領域が GST-PE_PGRS30 と結合することが明らかになった (図 4 B)

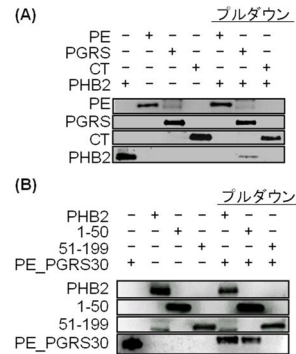


図 4 PE_PGRS30 と PHB2 の相互作用領域

(5) PE_PGRS30 の菌体外分泌の検討

結核菌標準株 Erdman の培養上清中に PE_PGRS30 が含まれているかどうか、ウサギ由来抗 PE_PGRS30 抗体で検討したところ、培養上清中に PE_PGRS30 を同定した(図 5・C F)。培養上清中に KatG、Ag85c といった既報の分泌タンパク質を認めた。さらに、菌体内にのみ存在する InhA は、培養上清中には認められず、菌体破砕液中に認められた(図 5・W C L)。このことから、PE_PGRS30 は結核菌から分泌されるタンパク質であり、死菌から漏れ出したものではないことが示唆された。

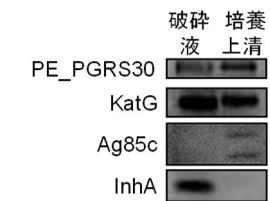


図 5 結核菌培養上清中の PE_PGRS30

(6) 組換え PE_PGRS30 タンパク質によるマウス肺胞マクロファージのアポトーシス誘導

PE_PGRS30 の全長 (FL) 及び PE・PGRS・CT の各ドメインの組換えタンパク質をマウス肺胞マクロファージの培養上清に添加した。PE_PGRS30 添加群と PGRS ドメイン添加群の 5 割が Annexin V 陽性であった(図 6)。一方、PE、CT ドメイン添加群は、2 割が Annexin V 陽性で、コントロールの GFP 添加群と比べて有意差は認められなかった。よって、大腸菌に発現させ精製した PE_PGRS30 タンパク質は、結核菌特異的な修飾が無くとも、マウス初代培養細胞のアポトーシスを誘導することが明らかになった。また、PGRS ドメインが主にアポトーシスを誘導するドメインであることが明らかになった。

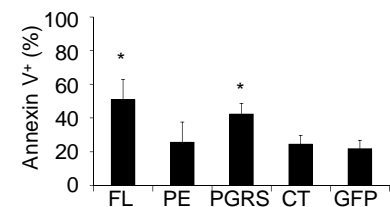


図 6 組換え PE_PGRS30 によるアポトーシス誘導

(7) 組換え PE_PGRS30 タンパク質と PHB2 の細胞内共局在の検討

PE_PGRS30 及び PE・PGRS・CT の各ドメインの組換えタンパク質を RAW264.7 細胞の培養上清に添加したところ、PE_PGRS30 は、細胞質内で PHB2 と共局在していた(図 7)。PGRS ドメインも PHB2 と共局在していたが、PE と CT ドメインは共局在していなかった。また、PE_PGRS30 はミトコンドリアとは共局在していなかった。PGRS、PE、CT ドメインのいずれもしていなかった。さらに、PE_PGRS30 は、タンパク質分解の場であるリソソームのマーカー、LAMP1 と共局在していた。PGRS ドメインも LAMP1 と共局在していた。以上の結果から、PE_PGRS30 は、細胞質内で PHB2 と結合し、ミトコンドリアではなく、リソソームに移動することが示唆された。

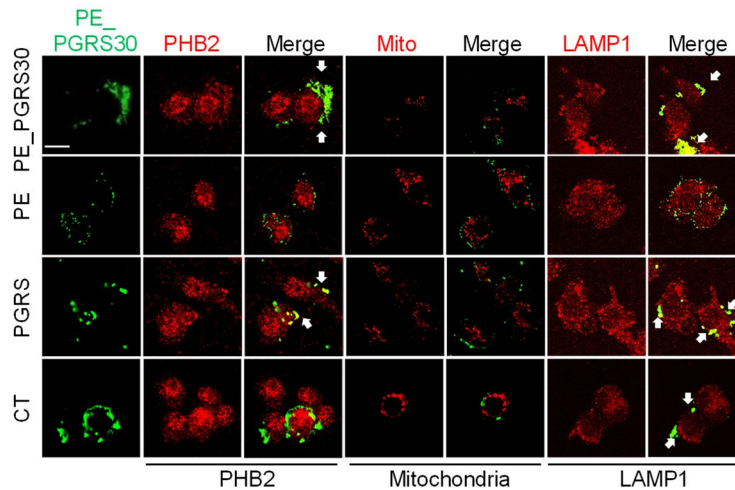


図7 PE_PGRS30 と PHB2、・ミトコンドリア・LAMP1 との共局在

(8) 組換え PE_PGRS30 添加による OPA1 の長さの変化

PGRS ドメインを RWA264.7 の培養上清に添加し、細胞内の OPA1 を検出したところ、添加前は長短のアイソフォームが半々程度であったが、時間経過に伴い、短いアイソフォームが占めるようになった(図8)。よって、PHB2 がミトコンドリアから減少した結果、OPA1 の長さの維持が困難になったことが示唆された。

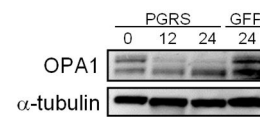


図8 PGRS ドメイン投与による OPA1 の長さの変化

(9) PE_PGRS30 の結核菌病原性への寄与

BALB/c マウスに結核菌 Erdman 株と PE_PGRS30 遺伝子欠損株を 2×10^6 個、尾静脈より感染させたところ、平均生存日数がそれぞれ 79.9 ± 15.2 日及び 69.0 ± 15.1 日であった。よって PE_PGRS30 が急性感染における結核菌病原性に寄与する可能性は低いことを確認した。

以上の結果から、結核菌タンパク質 PE_PGRS30 は、結核菌から分泌され、宿主タンパク質 PHB2 と相互作用し、リソソームヘリクルートすることで、PHB2 をミトコンドリアに戻れなくし、PHB2 がミトコンドリアで担う機能を阻害し、アポトーシスを誘導する機能が示唆された。これまで結核菌のミトコンドリアを介した細胞死誘導機構はあまり知られていなかった。今後、結核菌の細胞死誘導について、さらに知見を増していけば、新規薬剤の標的となる機構が見出せる可能性がある。また、PE/PPE ファミリーにおいて、機能が明らかになったタンパク質は全体の2割に満たない。この中に今まで明らかになっていなかった結核菌の病原性を担う機能を有するタンパク質が存在する可能性は高い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 松村 和典, 祝 弘樹, 切替 照雄	4. 巻 23
2. 論文標題 結核菌タンパク質PE_PGRSの機能解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 エンドトキシン・自然免疫研究	6. 最初と最後の頁 59-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24573/jeiis.23.0_59	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松村 和典, 高木 智, 切替 照雄
2. 発表標題 結核菌タンパク質PE_PGRS30 の機能解析
3. 学会等名 第94 回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松村和典、祝弘樹、切替照雄
2. 発表標題 結核菌タンパク質PE_PGRS62とPE_PGRS30の機能解析
3. 学会等名 第25回日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松村和典、祝弘樹、切替照雄
2. 発表標題 Analysis of mycobacterial protein PE_PGRS62 and PE_PGRS30
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 松村和典、佐伯久美子、切替照雄
2. 発表標題 Mycobacterial protein PE_PGRS30 induces apoptosis through interacting host protein prohibitin 2
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 Kazunori Matsumura, Satoshi Takaki
2. 発表標題 Mycobacterial protein PE_PGRS30 induces apoptosis via interacting prohibitin 2
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
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