

平成21年 5月 15日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890278
 研究課題名(和文) Mce タンパク質を介した結核菌の宿主細胞侵入における分子メカニズムの解明
 研究課題名(英文) Interaction between *Mycobacterium* Mce proteins and mammalian cell surface in host cell invasion
 研究代表者
 岡部 真裕子(OKABE MAYUKO)
 国立感染症研究所・免疫部・研究員
 研究者番号：50455391

研究成果の概要：結核菌は宿主細胞に侵入することが感染のきっかけとなるため、細胞侵入に関与すると報告されている Mce タンパク質について宿主細胞に対する作用機構の解明を目指し研究に着手した。このうち Mce3B タンパク質について、直接的に細胞侵入には関与しないものの、宿主細胞に働きかけ自然免疫を惹起することを示唆する結果を得た。これにより結核菌が宿主の炎症反応を引き起こし感染に利用している可能性が考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	0	1,350,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	0	2,670,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

(1)結核は、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* により引き起こされる感染症である。現在も世界人口の3分の1が感染しており、毎年約160万もの人が結核により死亡している。結核を取り巻く現在の主要な問題として、現行のBCGワクチンの有効性に対する疑問や多剤耐性菌、特に超多剤耐性菌の出現が挙げられるが、結核の制圧にはその根底にある感染メカニズムの解明が急務である。

(2)結核菌を始めとするほとんどの抗酸菌は毒素を産出せず、炎症病変や組織障害は抗酸菌に対する感染免疫応答過程で宿主から産出されるサイトカインなどの生理活性物質によって引き起こされる。宿主に感染した結核菌はマクロファージに貪食されたのち、マクロファージの殺菌機構から逃れて細胞内で生存および増殖を行う。通常マクロファージに補食された微生物は酸性条件下で消化されるが、結核菌はファゴソームとリソソームの融合を阻害することで酸

性を防ぐとともに消化酵素による分解から逃れ生存し続けることができる。宿主内で長期に潜伏感染した結核菌は、その後宿主の免疫機構の破綻を待って発育・増殖を再開し、結核を発病すると考えられる。つまり結核菌が病原性を発揮する上で重要となるのが細胞内寄生のメカニズムであり、その第一段階としての宿主細胞への侵入機構を解明することが不可欠である。この重要な課題については従来多くの研究がなされ、結核菌、宿主細胞それぞれについて本菌の侵入に関わる分子が明らかにされてきた。しかし、関与が示唆されていても侵入における分子機構が明らかにされていないものも多い。細胞侵入におけるメカニズムを更に解明すべく、本研究に着手した。

2. 研究の目的

(1)結核菌は主にマクロファージに貪食され、ファゴソーム膜に囲まれた状態で細胞内へ移動することにより宿主細胞への侵入は成立する。これまでに結核菌の細胞侵入に関与する分子群のひとつとして *mce* オペロンが報告されている。非病原性大腸菌に結核菌の Mce1A タンパク質を発現させると、この大腸菌は細胞への侵入能を獲得する。またこの領域に変異を導入した結核菌では、感染性や病原性に変化が現れることが分かっている。結核菌は4つの *mce* オペロンを持っているが、興味深いことに Mce3B は細菌べん毛の構成タンパク質であるフラジェリンと相溶性が高い (図1)。細菌の運動器官であるべん毛

```
mce3B: 78  MVVQFIADSVLITRGTAVIRYDNLFGQRYALLEGAGGLAVLRPGHTIPLARTQALD 137
FliC : 308  VMSTYDNGKTE-DEGLAKVCE---DYLQATQNKQCSISINTTKYIADGGTSKIALN 362

mce3B: 138  LDALLGDFKPLFRALN-PEQVMAEQQLLAAGQRTIGSLTOSAVI---TIDADR 194
FliC : 363  K---LQADGKTEVVISGGRTYASAEQIAGAS-ED---LEAATITTEYQKILDA 414

mce3B: 195  LIGQVILNINLVLSGLGHTDLDQAVISLALIHRQAQRKTDLSNAVAYNAAAGVAD 254
FliC : 415  ALAAVDI---LRSDLGVQVDFNSAIIPLNGNTVNNITSAKSRDESDYAEVSNKRAQ 470

TLR5誘導部位
mce3B: 255  LKQ  259
FliC : 471  LKQ  475
```

図1 Mce3B と FliC のアライメント

は宿主の体内では免疫系にとって格好の標的であり、TLR5 で認識されることにより免疫反応を惹起する。結核菌の場合マクロファージに貪食されることが細胞内寄生のきっかけとなるため、べん毛様タンパク質を菌体表面に発現することで積極的に宿主側の免疫反応を活性化し、自身を細胞に取り込ませるトリックが存在するかもしれない。

そこで *mce* オペロンに着目し、この分子を中心として本菌の宿主細胞への侵入機構を新たな視点から解明することを考えた。

3. 研究の方法

(1)RT-PCR法による発現の確認

各 *mce* オペロンからの発現状況を確認するため、BCG から RNA を調整し、RT-PCR 法を用いてそれぞれのオペロンにおける mRNA の転写の有無を確認した。

(2)各Mceタンパク質における細胞侵入能の検討

細胞侵入能を付加する分子として、既に Mce1A, 3A および 3E が同定されている。これ以外の Mce タンパク質についても同様の機構を持つか確認するため、各 *mce* 遺伝子をクローニングし大腸菌で発現させた。各 Mce タンパク質を発現させた DH5 α を HeLa 細胞の培養上清に添加し作用させたのち、細胞外に存在する菌体を洗って除去した。細胞を破碎したものを LB プレートに撒いて一晚培養し、コロニーをカウントすることで細胞侵入能を検討した。

(3)Mceタンパク質の大量発現と精製

大腸菌にてヒスチジンタグを付加した Mce3B タンパク質を大量発現させ、Ni-NTA を用いて精製を行なった。この精製物を用いて pNF κ B-SEAP をトランスフェクションした HEK293T 細胞を刺激し、TLR5 応答の有無をレポーターアッセイにより確認した。

4. 研究成果

(1)BCG から RNA を調整し、*mce1* および *mce2* オペロンの各遺伝子について mRNA の転写が起こっているかを RT-PCR により確認した (図2)。各 *mce* オペロン内の A~F 遺伝子について全て転写が確認できたため、これらのタンパク質は発現し何らかの機能を担っていることが推測された。

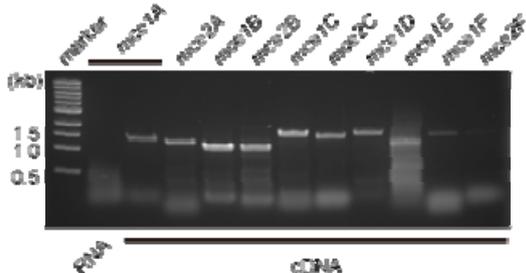


図2 RT-PCR による各 *mce* 遺伝子からの mRNA の転写の確認

(2) BCG の DNA から *mce1* および *mce2* オペロン内の各遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させ HeLa 細胞への侵入能を調べた。既に細胞侵入能の確認されている Mce1A を発現させた大腸菌では HeLa 細胞への侵入が確認されたが、それ以外の Mce タンパク質ではこのような効果は見られなかった。このことから BCG が発現する Mce1 および 2 タンパク質のうち、細胞侵入に関与しているのは Mce1A のみであることが確認された。他の各 Mce1 タンパク質は直接細胞侵入能を付加しないものの、同じオペロン内で共に発現していることから、細胞や Mce1A に作用し侵入を助けている可能性が考えられる。本研究では *mce3* および 4 オペロンの各遺伝子については解析を行なわなかったが (*mce3* については BCG には存在しないため)、最近では結核菌の Mce4A タンパク質も細胞侵入能を付加することや、BCG の Mce4A タンパク質がマクロファージのサイトカイン産生を誘導することが明らかとなっている。今後 *mce4* オペロンについても解析を行なうとともに、複数ある各オペロン間に何らかの連絡があるかを明らかにしていく必要があると考える。結核菌が *mce* オペロンを 4 個有するのに対し、ウシ型結核菌では 3 個となっており、BCG は各オペロン間の相互作用をよりシンプルに検証できる系として期待される。本研究で BCG における各 Mce タンパク質の細胞侵入能を明らかにした結果は、今後の解析を進める上で重要な基礎データとなるものである。

(3) Mce タンパク質について、宿主細胞に対する作用機構の解明を目指し、生化学的手法による解析に着手した。

①実際に細胞侵入能に関与すると報告されている Mce1A, 3A および 3E については既に多くのグループにより研究が行われているため、それ以外の Mce タンパク質からターゲットを絞ることにした。その中で私は結核菌には存在するがウシ型結核菌には存在しない *mce3* オペロンに着目し、サルモネラのフラジェリンタンパク質 FliC および FljB と同一性が高い Mce3B について、大腸菌にて大量発現させ精製を試みた。

②いくつかの Mce タンパク質では、結核菌体表面に発現することが知られており、N 末側には細胞膜貫通または輸送シグナル配列が

存在することが推定される。そこで C 末側にヒスチジンタグを付加するベクター pET21b に *mce3B* 遺伝子を挿入し、大腸菌 BL21(DE3) 株に導入し IPTG にて発現を誘導した。ヒスチジンタグに対する抗体を用いて発現を確認したところ、少量培養では推定分子量のタンパク質が確認できたが、大量培養に切り替えたところ全く発現しなくなった。結核菌をはじめとする抗酸菌はグラム陽性菌であり、グラム陰性の大腸菌とはコドン使用頻度が異なるためと推測される。そこで、大腸菌内で使用頻度の低いコドンを含むタンパク質を効率的に発現するように工夫された Rosetta 株に切り替えたところ、大量培養下でも発現が損なわれることはなかった。

③しかし、菌を分画して目的タンパク質がどの画分に含まれるかを調べたところ、半分以上が封入体に存在し、残りは膜画分に含まれていた。このような場合、封入体の場合は変性させ、膜画分では界面活性剤を用いて可溶化したのち精製することが可能である。実際これまでに報告のあった Mce タンパク質の多くは封入体から変性させて精製し、再フォールディングさせて解析に用いている。この方法ではタンパク質が失活するおそれがある上、機能未知のタンパク質では活性が分からず再フォールディングの指標がない。このため私は水溶性画分からの精製にこだわり、Mce3B の N 末側に存在する疎水性の推定膜貫通領域を欠失させた。このトランケートはやはり封入体や膜画分に多く含まれたが、一部を水溶性画分に得ることができた。この水溶性画分を Ni-NTA カラムに通し、イミダゾールで溶出し目的タンパク質を得た。溶出画分には非特異的タンパク質も多く得られたが、これはそもそも水溶性画分に含まれる目的タンパク質の量が少なかったことやタグの問題が考えられる。具体的には C 末側でタグが効率的に機能できなかったか、6 個のヒスチジンでは不十分だった可能性があり、タグの種類や位置は今後の検討課題である。

④得られた Mce3B 画分を用い、TLR5 の応答を検証した。対照実験としてはベクターを導入した Rosetta 株の水溶性画分精製物を用いた。HEK293 細胞はフラジェリンによる TLR5 応答を見るのに適している。HEK293T 細胞に pNFκB-SEAP をトランスフェクションし、レポーターアッセイにて Mce3B に対する TLR5 応答の有無を確認した。Mce3B 画分を添加し

たものは、対照と比べわずかに NF- κ B からの発現が上昇していた。現在のところまだ有為差は得られていないが、目的タンパク質の精度や量が十分でなかったためと考えられる。今後タグを検討し精度、量共に十分な精製タンパク質を得ることで、この問題は解決できると思われる。

⑤本研究では細胞侵入に関与する *mce* オペロンのうち、Mce3B について宿主細胞 TLR5 との関与の可能性を示した。TLR の刺激により自然免疫が惹起されることは、一見体内に侵入してきた細菌にとっては好ましくない現象に思われる。しかし結核菌の場合、形成された肉芽腫の中心で生き延びる等、宿主の炎症反応を利用している節がある。またマクロファージの分化が進めばその分結核菌にとっては感染のチャンスが増えることになる。これまでも Mce4A や 4E がマクロファージに働きかけ、サイトカインの産出を促すという報告もされている。今回、細胞侵入能を付加する新たな Mce タンパク質は同定できなかったが、これらが炎症反応およびサイトカイン産生を引き起こすことで宿主細胞に働きかけている可能性を示すことができた。今後更に他の Mce タンパク質についても解析を進め、*mce* オペロンと宿主細胞の関わりを調べることで、結核菌の細胞侵入に際するサイトカインの関与および分子メカニズムについて明らかにすることができると期待する。

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 2 件)

岡部真裕子、大原直也、小林和夫. 「結核. 特集. 新興・再興感染症の現状と予防」保健の科学 49 : 691-697. (2007) 査読無

Mayuko Okabe, Tohru Minamino, Katsumi Imada, Keiichi Nmaba and May Kihara "Role of the N-terminal domain of FlhI ATPase in bacterial flagellar protein export" *FEBS Letters* **583**, 743-748. (2009) 査読有

[学会発表] (計 2 件)

岡部真裕子、大原直也、小林和夫. 「実用化

を目指した組み換えBCGワクチンの開発」第6回感染症沖縄フォーラム(沖縄、2008年2月15日)

岡部真裕子、大原直也、山本三郎、小林和夫 「BCG Tokyo 172-I型および-II型株におけるsliding能の差異」第82回日本細菌学会総会(名古屋、2009年3月13日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡部 真裕子 (OKABE MAYUKO)

国立感染症研究所・免疫部・研究員

研究者番号 : 50455391

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者