

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790426

研究課題名(和文) 宿主ヒアルロン酸を利用した結核菌の増殖機構および新規抗結核薬の開発
 研究課題名(英文) Mechanism of mycobacterial growth using host hyaluronan and novel
 antitubercular drug development targeting mycobacterial
 hyaluronidase.

研究代表者

仁木 満美子 (NIKI MAMIKO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20438229

研究成果の概要(和文)：細胞間マトリックスであるヒアルロン酸(HA)について、結核菌および BCG がこれを炭素源として増殖することを明らかにした。また、動物細胞には3種の HA 合成酵素が存在するが、肺の結核病巣では HAS3 の発現増強が認められた。また、BCG の表層蛋白質画分には HA 分解活性が存在したため、既知の HA 分解阻害剤であるアスコルビン酸パルミテートによる影響を調べたところ、菌の増殖が抑制されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We found that mycobacteria can grow utilizing hyaluronan (HA) as a carbon source. The expression of HA synthase in the was increased after infection of *M. tuberculosis*. We showed HAase inhibitor suppressed growth of mycobacteria *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：結核 ヒアルロン酸 抗結核薬

1. 研究開始当初の背景

結核菌は、人類の 32%に一部休眠状態で潜伏感染している。成人型肺結核の多くが潜伏感染菌による内因性の再燃であり、毎年 200 万人が結核で死亡している。通常結核菌は初感染時に結核を発症することが少なく、大部分は肺の細胞に接着・侵入したのちそこで長期間潜伏感染することが知られており、成人性肺結核のほとんどがこれらの潜伏感染菌の再燃により発症するといわれている。宿主細胞への結核菌の感染はグリコサミノ

グリカンがそのレセプターの役割を果たすことが明らかになっており、我々はこれまでの研究でヒアルロン酸が結核菌の細胞接着／侵入の足がかりとなることを証明してきた。ヒアルロン酸は N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の直鎖状高分子多糖であり、軟骨や細胞外マトリックスの主成分である。気道表面にも粘膜繊毛エレベーターに逆らって繫留されている。結核菌は宿主細胞表面のヒアルロン酸と抗酸菌特異的蛋白質 mycobacterial DNA-binding protein 1

(MDP1)を介して結合する。(Aoki K et al, J Biol Chem 2004)。さらにこれまでの研究より、細胞感染後の菌の増殖をヒアルロン酸が促進すること、また結核病巣においてヒアルロン酸合成酵素の発現が増強していることなどを明らかにしている。

2. 研究の目的

これまでの研究では、抗酸菌ゲノムにおいてヒアルロン酸を分解する酵素の存在は確認されていない。ではなぜヒアルロン酸存在下で結核菌の増殖が促進されるのか？先に記したようにヒアルロン酸は N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸からなる多糖である。*Staphyrococcus aureus* など、いくつかの微生物にはヒアルロン酸を分解する酵素（ヒアルロニダーゼ）の存在が知られており、組織の分解することにより感染および毒素の拡散を容易にしたり、分解したヒアルロン酸から得られた糖を栄養源としたりすることが知られている。そこで我々は結核菌がそれらを栄養源として利用しているのではないかと推察し、実験を行った。また、この酵素をターゲットとした新規抗結核薬開発の可能性についても検討を行った。

3. 研究の方法

Mycobacterium bovis BCG 菌体蛋白質抽出およびヒアルロン酸との反応

M. bovis BCG 菌体を PBS で数回洗浄したのち、0.05% Tween 80 を含む PBS (pH 8.0) で懸濁し、37 度で一晩加温する。その後遠心して上清を回収したものを BCG 菌体表層蛋白粗抽出液とする。これにヒアルロン酸を最終濃度が 1 mg/ml になるように添加し、37 度で加温した。

比色法を用いたヒアルロニダーゼ活性検出

比色法を用いたヒアルロニダーゼ活性の検出は Morgan-Elson assay により行った。この方法は酵素によって分解されることにより生じた N-アセチルグルコサミンの断端を定量する方法である。まず、BCG 菌体抽出蛋白質とヒアルロン酸の反応産物 130 μ l に 25 μ l の 0.8M potassium tetraborate を添加し、100 度で 3 分加熱した後氷上で冷却する。その後、1% Dimethylaminobenzaldehyde, 1.1% HCl in acetic acid を 0.75 ml 添加して 37 度で加温し、吸光度 (585 nm) を測定する。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いたヒアルロニダーゼ活性検出

既知のヒアルロニダーゼは長鎖のヒアルロン酸をランダムに切断し、さまざまな分子量の断片が産生されるため、電気泳動によりラダーを観察することができる。BCG 抽出蛋白質と反応させたヒアルロン酸は、フェノール/クロロホルム処理により除蛋白をおこなったのち、12%ポリアクリルアミドゲルにて分離した。その後、1%アルシアンブルー水溶液で染色し、ラダーの有無を比較した。

培養細胞感染後の BCG 増殖におけるヒアルロニダーゼ阻害剤の効果

10%牛胎児血清含有 RPMI1640 培地にて 5%炭酸ガス存在下 37°C にて A549 細胞の継代培養を行なった。ルシフェラーゼ発現組み換え BCG (J. Bacteriol 2007, vol 189, p8241-8249 にて作成済み) は、カナマイシンを 10 μ g/ml 含有する 7H9-ADC 培地で培養し、対数増殖期の菌をグリセロール 15%溶液で -80°C にて保存して使用前に融解し感染に使用した。A549 細胞を 2×10^5 /ml/穴/24 穴プレート (ファルコン社) に播種し、ルシフェラーゼを発現する組み換え BCG を 2×10^6 集落形成数(CFU)/ml の濃度で加えた。16 時間 37°C で保温後、細胞外の菌を取り除きヒアルロン酸を加え、さらに L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル (AP) を 25 μ M 添加した。さらに培養を続けた後経時的にトライトン X (最終 0.5%) で処理して細胞を溶解させ、組み換え BCG 由来のルシフェラーゼ活性を測定、もしくは菌液を段階希釈して 7H11-OADC 培地上に釣菌し 37°C にて 20-25 日間培養後、生菌数を算定した。

マウス-BCG 感染モデルにおけるヒアルロニダーゼ阻害剤の効果

BALB/c マウスに BCG を経静脈的に感染させ、2 日後から毎日 Cremophor (negative control), AP (5-20 mM in Cremophor), Amikacin (1 mg/ml in saline) を 1 個体につき 200 μ l 腹腔内投与した。その後、経時的にマウスを屠殺して回収した肺をすりつぶし、寒天培地に接種して 20-25 日後に生菌数を測定した。

RT-PCR

結核菌感染マウスの肺組織におけるヒアルロン酸合成酵素の発現を RT-PCR にて確認した。C57BL/6 マウスに経気道的に結核菌 H37Rv 株を感染させ、経時的にマウスから肺組織を回収し RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。その後 Super Script II RNase H⁻ reverse transcriptase を用いて逆

転写を行い、得られた cDNA を鋳型とした RT-PCR を行った。

蛋白の同定

BCG 菌体表層蛋白はポリアクリルアミドゲル電気泳動後にゲルから切り出し、10 mM DTT および 100 mM 炭酸水素アンモニウム中で 57°C, 1 時間還元アルキル化を行った。その後溶液を 50 mM ヨードアセトアミド、100 mM 炭酸水素ナトリウムに交換し、さらに 1 時間振盪した。ゲル片はさらに脱水したのち、50 mM 炭酸水素アンモニウム、10 µg/ml トリプシン溶液中で一昼夜加温しゲル内消化を行った。その後 5% TFA, 50% アセトニトリルによりペプチド片を回収し、LC-MS により蛋白の同定を行った。

組換え蛋白質の作製

同定された蛋白質について、データベース (<http://genolist.pasteur.fr/BCGList/>) で報告されている塩基配列をもとにプライマーを設計し、BCG Pasteur 株染色体 DNA を鋳型として、それぞれの蛋白質についてその ORF を PCR で増幅した。得られた断片については蛋白質発現ベクターである pET22b (+) および pGEX-6P-1 に組み込んだ後、大腸菌 BL21 株に導入した。その後 IPTG 含有 LB 液体培地にて菌を培養し、回収した菌体を超音波破碎して菌体内蛋白を抽出したのち、ニッケルカラムもしくはグルタチオンカラムを用いて発現蛋白質の精製を行った。

4. 研究成果

BCG はヒアルロニダーゼ活性を有する。 BCG を Triton X-100 で処理して得られた抽出蛋白質とヒアルロン酸を混合し加温したところ、Morgan-Elson 法にて明るい赤紫色に呈色した。一方、抽出蛋白質と混合しないヒアルロン酸では無色のままであった (図 1)。これは菌体抽出蛋白質によってヒアルロン酸が分解され、反応液中に N-アセチルグルコサミンの断端が増加したことによる。また、この呈色反応はヒアルロン酸に加える菌体抽出蛋白質の濃度依存的に増強した。ポリアクリルアミド電気泳動による解析では、未反応のヒアルロン酸が高分子部分に塊状に観察されるのに対し、菌体抽出蛋白質と反応させたヒアルロン酸はラダー状の泳動像が観察された (図 1)。以上のことから BCG はヒアルロニダーゼ活性を有することが明らかになった。

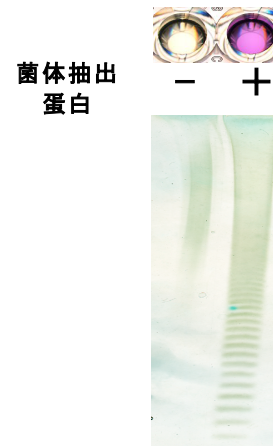


図 1. Morgan-Elson assay による呈色反応およびポリアクリルアミドゲル電気泳動によるヒアルロン酸分解断片の観察

培養細胞感染 BCG の増殖はヒアルロニダーゼ阻害剤により抑制される。 先述したように、結核菌は宿主細胞表面のヒアルロン酸を介して接着/侵入することが明らかになっている。また、長鎖のヒアルロン酸を分解することで栄養源として利用することも明らかになった。よって、菌のヒアルロニダーゼ活性を阻害することが宿主細胞への感染・増殖に何らかの抑制効果をもたらすのではないかと推察される。そこで、既知のヒアルロニダーゼに対して阻害作用を示す AP を BCG 菌体抽出蛋白質およびヒアルロン酸を混合した溶液に添加したところ、菌体抽出蛋白質濃度依存的に観察されていたヒアルロン酸の分解が AP により阻害されることがわかった (図 2)。そこでヒアルロン酸含有培地中での菌の増殖に与える AP の影響を調べた所、AP を添加した培養条件では BCG の増殖が抑制されることがわかった (図 3)。

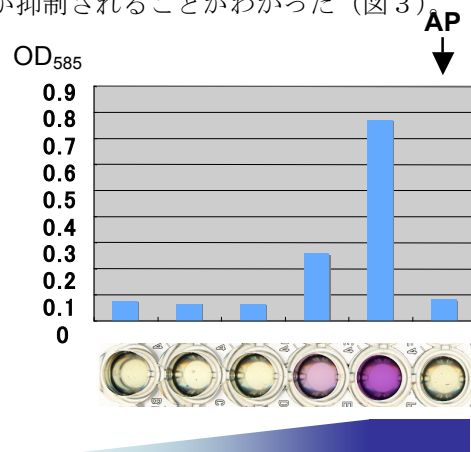


図 2. BCG 菌体抽出蛋白質濃度依存的なヒアルロン酸分解および AP による阻害

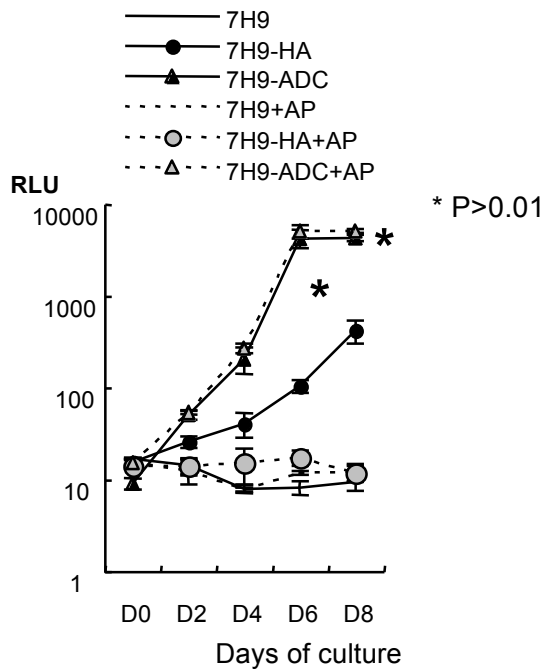


図3. APによるヒアルロン酸をC源としたBCG増殖の抑制

結核菌感染マウス肺組織ではHAS1の発現が増強する

動物細胞が有する3種のヒアルロン酸合成酵素についてゲノムデータベースをもとにプライマーを設計し、結核菌を経気道的に感染させたマウス肺組織におけるそれらの発現をRT-PCRにより解析した。その結果、HAS1のみ結核菌感染後経時的に発現が増強することが明らかになった(図4)

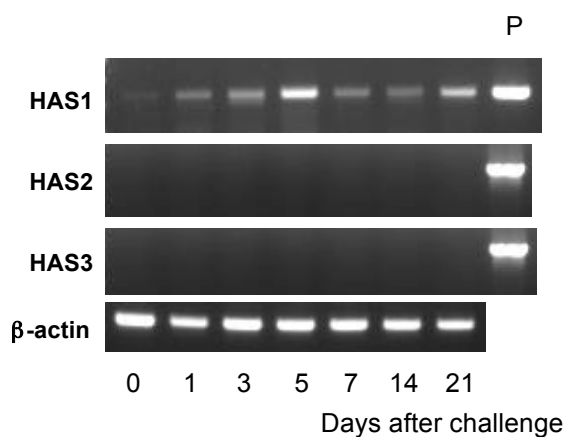


図4. RT-PCRによるマウス結核病巣におけるヒアルロン酸合成酵素の発現解析

CFU/Lung ± S.E.

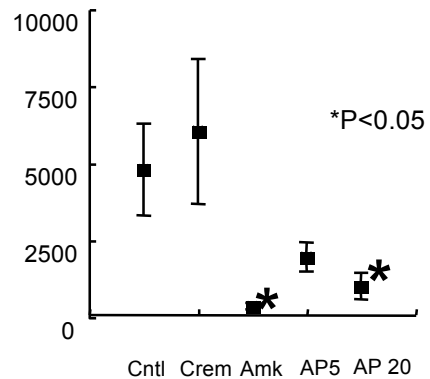


図5. マウス感染モデルにおけるAPのBCG増殖抑制効果

マウス感染モデルにおけるBCGの増殖はヒアルロニダーゼ阻害剤で抑制される。
In vitroでのAPによるBCG増殖抑制効果が確認されたので、マウス感染モデルにおいても同様の作用がみられるかを実験した。経静脈的にBCGを感染させたマウスにAPを投与すると、組織中でのBCGの増殖が顕著に抑制された(図5)。以上のことから、BCGは生体内での増殖にヒアルロン酸を利用しての可能性が示唆された。

ヒアルロニダーゼ活性画分中の蛋白質同定および組換え蛋白質の作製

LC-MS解析により30の蛋白質群が同定された。これらのうち、機能が未知であり、かつ膜貫通領域予測(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)により表層蛋白質の可能性のあるものにつき(BCG0157, BCG0093, BCG3215, BCG3329)組換え蛋白質を作製し、Morgan-Elson assayにより活性を確認したところ、ヒアルロン酸分解活性は見いだせなかった。

まとめ

ヒアルロン酸は細胞間マトリックスとして肺をはじめとして広く組織中に存在することが知られており、気道における細菌感染防御に重要な役割を担うことが示されていたが、結核感染におけるヒアルロン酸の役割は明らかにされていなかった。これまでの研究から、肺の結核病巣中にはヒアルロン酸の集積が認められることや、in vitroにおいて結核菌がヒアルロン酸濃度依存的に増殖することが明らかになってきた。しかしながらこ

れまでに抗酸菌がヒアルロニダーゼを有するという報告はなく、他の細菌からクローニングされたヒアルロニダーゼの塩基配列を基にデータベース検索をかけても相同性の高い ORF は検出できなかった。我々は BCG より抽出した蛋白画分がヒアルロニダーゼ活性を有することを世界で初めて発見し、以前より推察していたように一部の抗酸菌がヒアルロン酸を切断し、得られた糖を栄養源として利用することを明らかにした。結核菌はマクロファージ以外にも II 型肺胞上皮細胞に接着／侵入し、ヒアルロン酸が菌の接着／侵入の足がかりになっていることをこれまでに明らかにしてきた。また、結核病巣ではヒアルロン酸合成酵素の一つである HAS1 が発現し、ヒアルロン酸の集積が認められることも発見した。以上から、結核菌はまず MDP1 を介して宿主細胞表面に存在するヒアルロン酸に接着し、その一方で細胞間および細胞表面に豊富に存在するヒアルロン酸を栄養源として増殖しながら感染を拡大させているのではないかと推察される。

本報告では、菌のもつこのヒアルロニダーゼ活性が感染の増悪因子の一つとして働いているのではないかと仮説のもとに、この酵素活性をターゲットとした新規抗結核薬の開発の可能性を検討した。ヒアルロニダーゼは原核・真核生物で広くその存在が知られており、その阻害剤についてもいくつかの報告がなされている。なかでも AP はその阻害作用が強力であること、またアスコルビン酸の誘導体であり、抗酸化剤として食品添加物に利用されていることなどから今回の実験に利用した。その結果、*in vitro*, *in vivo* において BCG の (ヒアルロニダーゼ依存的) 増殖を抑制することが明らかになった。

本研究で我々は、これまでに報告のない抗酸菌ヒアルロニダーゼの存在を明らかにした。このことから結核菌は気道系のヒアルロン酸を利用し、宿主への接着／侵入に利用するのみならず、それを栄養源として組織内で増殖している可能性が示唆された。また、既知のヒアルロニダーゼ阻害剤を利用することで、菌が生体内で実際にヒアルロン酸を分解して生存・増殖している可能性を明らかにした。以上のことから、菌のヒアルロン酸代謝酵素は、結核菌の生体内増殖に強く関わると考えられ、それらの阻害剤は新たな薬剤標的となりうるであろう。本研究では BCG 菌体より活性画分を粗精製し、含まれる蛋白質の同定を行った。そのうち菌体表層蛋白であり機能が未知のものについて組換え蛋白質の作製を行ったが、ヒアルロン酸分解活性

を有するものを見いだすことはできなかった。今後は抗酸菌菌体を利用した組換え蛋白質の発現系を用いて、再度活性を有する蛋白質の同定を行いたい。

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 7 件)

- ① Yukitake H, Naito M, Sato K, Shoji M, Ohara N, Yoshimura M, Sakai E, Nakayama K. (2011) Effects of non-iron metalloporphyrins on growth and gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Immun*, 55(3): 141-153. (査読有)
- ② Usui T, Yoshikawa T, Orita K, Ueda SY, Katsura Y, Fujimoto S, Yoshimura M. (2011) Changes in salivary antimicrobial peptides, immunoglobulin A and cortisol after prolonged strenuous exercise. *Eur J Appl Physiol* (-): -. (査読有)
- ③ Kondo Y, Ohara N, Sato K, Yoshimura M, Yukitake H, Naito M, Fujiwara T and Nakayama K. (2010) Tetratricopeptide repeat protein-associated proteins contribute to the virulence of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 78 (6): 2846-2856. (査読有)
- ④ Hirayama Y, Yoshimura M, Ozeki Y, Sugawara I, Udagawa T, Mizuno S, Itano N, Kimata K, Tamaru A, Ogura H, Kobayashi K and Matsumoto S. (2009) Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication. *PLoS Pathog*. 5 (10): e1000643. (査読有)
- ⑤ Yoshida A, Yoshimura M, Ohara N, Yoshimura S, Nagashima S, Takehara T and Nakayama K. (2009) Hydrogen sulfide production from cysteine and homocysteine by periodontal and oral bacteria. *J. Periodontol*. 80 (11): 1845-1851. (査読有)
- ⑥ Nishiuchi Y, Tamura A, Kitada S, Taguri T, Matsumoto S, Tateishi Y, Yoshimura M, Ozeki Y, Matsumura N, Ogura H and Maekura R. (2009) *Mycobacterium avium* complex organisms predominantly colonize in the bathtub inlets of patients' bathrooms. *Jpn J Infect Dis*. 62 (3): 182-186. (査読有)

⑦ Tateishi Y, Hirayama Y, Ozeki Y, Nishiuchi Y, Yoshimura M, Kang J, Shibata A, Hirata K, Kitada S, Maekura R, Ogura H, Kobayashi K and Matsumoto S. (2009) Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from immunocompetent patients. *Microb Pathog.* 46 (1): 6-12. (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仁木 満美子 (NIKI MAMIKO)
大阪市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：20438229

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし