

平成 23 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2009～2010
課題番号：21790436
研究課題名 (和文) 結核菌感染における宿主の酸化還元調節因子 PrxI の役割に関する研究
研究課題名 (英文) Investigation of the role of antioxidant protein PrxI against tuberculosis.
研究代表者
奥村 香世 (OKUMURA KAYO)
帯広畜産大学・畜産学部・助教
研究者番号：70415561

研究成果の概要 (和文)：結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* がマクロファージに感染した際の宿主の PrxI の機能を明らかにするため、PrxI ノックアウトマウスを用いた感染実験を個体レベルおよび細胞レベルで実施した。とりわけ興味深い結果として、マウス高病原性のヒト型結核菌株を PrxI ノックアウトマウスに感染させ生死観察を行ったところ、遺伝子欠損マウスの生存日数は野生型マウスに比べて有意に短かった。さらに、感染マウスから臓器 (脾臓、肝臓および肺) を採取し、各臓器での生菌数を野生型マウスおよび PrxI ノックアウトマウス間で比較した結果、遺伝子欠損マウスにおいて顕著に高いことを明らかにした。これらの結果から、宿主 PrxI の結核菌に対する感染防御機構への関与が強く示唆された。

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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：細菌・感染症

1. 研究開始当初の背景

結核菌感染に対する宿主の防御機能として、一酸化窒素 (NO) による殺菌機構が重要であることがこれまでの研究から明らかとなっている。宿主のマクロファージは、結核菌をはじめとする病原菌や異物を認識し貪食すると、IFN- γ 等のサイトカインの刺激を

受けて活性化し、NO を合成する。NO と同時に産生されたスーパーオキシド (O_2^-) は NO と速やかに反応し、ペルオキシ亜硝酸 ($ONOO^-$) が産生される。ペルオキシ亜硝酸は、比較的安定な分子であると同時に、非常に強い殺菌作用を示す。また、ペルオキシ亜硝酸の示す細胞傷害性は、特定の細胞や異物に限定する

ような特異性は認められないため、過剰量のペルオキシ亜硝酸は、宿主にとっても細胞傷害を引き起こす危険性がある。したがって、マウス PrxI は自己が産生した NO の反応生成物であるペルオキシ亜硝酸の細胞内濃度を調節する役割も果たすことが予想される。

本研究で我々が着目したマウス酸化ストレス応答タンパク PrxI (Peroxiredoxin I) は、Prx タンパクファミリーに属し、哺乳動物、酵母、植物および細菌といった種々の生物由来のタンパクが含まれる。Prx ファミリーに属するタンパクの機能に関してはこれまでに多くの研究が行われているが、その局在や発現様式あるいは役割は、それぞれの生物間で異なっており、多岐にわたることが知られている。その一例として、細菌では、PrxI のホモログタンパクである AhpC (alkylhydroperoxide peroxidase C) が同定されており、*Salmonella typhimurium* の AhpC は、速やかにペルオキシ亜硝酸を亜硝酸塩へと変化させ、無害化することが報告されている。その一方で、マウス PrxI がマクロファージ内でどのような役割を担っているのか、その詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内寄生細菌である結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) がマクロファージに感染した際の宿主の保有する酸化ストレス応答タンパク PrxI の機能を明らかにするため、PrxI ノックアウトマウスを用いた *in vivo*、PrxI ノックアウトマウス由来マクロファージを用いた *in vitro* での感染実験を行う。これらの解析を通して、PrxI は結核菌感染時のマウスの生存率に大きな影響を与える重要な分子なのか否かを明確にし、結核菌感染初期における PrxI の動態を詳細に検討する。

3. 研究の方法

結核菌感染時の宿主 PrxI によるマウス生存率への影響を明らかにするため、PrxI ノックアウトマウスを用いて感染実験を実施した。実験には、マウスに高病原性のヒト型結核菌株である *M. tuberculosis* Erdman 株を供試し、調製した菌懸濁液をマウスの尾静脈より投与した。個体レベルでの感染実験の評価は、マウスの生存日数により行い、経時的に生死観察を実施後、各群（野生型マウス・遺伝子欠損型マウス）間で比較した。マウスの生存日数による評価と並行して、感染マウスからは経時的に脾臓、肺、肝臓を摘出し、そこから分離した結核菌を寒天培地上で培養し、各臓器での生菌数を野生型マウス・遺伝子欠損型マウス間で比較した。また、PrxI の発現は結核菌の感染によって誘導されるか否か、PrxI ノックアウトマウス由来マクロファージを用いて *in vitro* での結核菌感染実験も試みた。具体的な方法は、まず始めにマウスよりマクロファージを調製し、個体レベルでの感染実験と同様、マウス高病原性のヒト型結核菌株である *M. tuberculosis* Erdman 株を供試し、調製した菌懸濁液を接種後、免疫染色を実施し、共焦点顕微鏡を用いて観察を行った。

次に、PrxI と結合する結核菌由来タンパクを探索するため、結核菌がマクロファージ感染時にのみ発現が予想され、かつ結核菌の菌体表面に局在することが遺伝子配列情報から予想される結核菌タンパクを候補分子として複数選抜した。それらの候補タンパクは、GST タグを融合した状態で大腸菌内で発現させ、得られたリコンビナントタンパクを精製後、マクロファージ抽出液を用いて GST プルダウンアッセイを実施した。

さらに、得られた候補タンパクを欠損させ

た変異型結核菌を作製し、マウスに尾静脈投与後、マウスの生死観察を行い、変異型結核菌投与群と野生型結核菌投与群での生存日数の違いを検討した。

4. 研究成果

宿主の感染防御機構における PrxI の重要性を検証するため、マウス高病原性のヒト型結核菌株を PrxI ノックアウトマウスに感染させ生死観察を行った。その結果、各群の平均生存日数は 143 日(野生型)および 80 日(ノックアウトマウス)と有意な差が認められた(図 1) ($P < 0.001$)。さらに、感染マウスから臓器(脾臓、肝臓および肺)を採取し、各臓器での生菌数を野生型マウスおよび PrxI ノックアウトマウス間で比較した結果、遺伝子欠損マウスにおいて顕著に高いことを明らかにした。

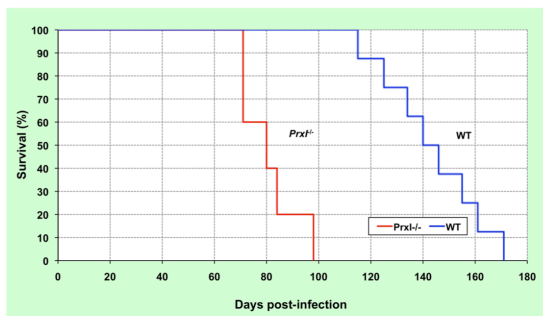


図 1 結核菌感染におけるマウスの生存曲線
横軸は感染からの経過日数、縦軸は生存率 (%) を示す。

PrxI^{-/-}:PrxI ノックアウトマウス(C57BL6/J *prxI/prxI*)、WT:野生型マウス(C57BL6/J)共に 8 週齢マウスを使用した。

次に、PrxI の発現様式を解析するため、PrxI ノックアウトマウス由来マクロファージを用いて感染実験を実施した。共焦点顕微鏡による観察を行った結果、マウスマクロファージに結核菌を感染させると、PrxI の発現が著しく増強することが明らかとなった。このことから、宿主 PrxI の発現は結核菌が感

染することによって誘導され、結核菌感染の初期段階で何らかの機能を発揮していることが示唆された。以上の結果を総合すると、PrxI は、宿主の感染防御機構に大きな役割を果たしており、結核菌感染時のマウスの生存率に大きな影響を与える重要な分子であることが強く示唆された。今後は、結核菌が宿主の感染防御機構を回避するのにどのような戦略をとるのかといった病原菌側の回避機構についても検討し、PrxI を中心とした宿主の感染防御、それに対する病原菌側の対抗措置の機構といった宿主-病原菌の相互作用の解明を試みる。

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 1 件)

Shimomura Y, Okumura K, Yamagata Murayama S, Yagi J, Ubukata K, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T . Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS). (2011) BMC Genomics 12, 17-33 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. 奥村 香世、八木 淳二、秋山 徹
「Evolutionary path of streptococcal and staphylococcal superantigens based on mass genome comparison of *Streptococcus pyogenes* and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, and re-analysis of the entire genome of *Staphylococcus aureus*.」 第 39 回日本免疫学会、大阪国際会議場、2009 年 12 月 4 日

2. T. Miyoshi-Akiyama, K. Okumura, Y. Shimomura, S. Murayama, J. Yagi, K. Ubukata, T. Kirikae “Origin of Streptococcal Superantigens Based on Mass Genome Comparison among *Streptococcus pyogenes* and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*”
The 109th general meeting American Society for Microbiology, Pennsylvania Convention, USA, May 17, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 香世 (OKUMURA KAYO)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：70415561

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者