

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月20日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2013

課題番号：22590411

研究課題名（和文） 結核菌 PE_PGRS タンパク質の病原性に関する機能解析

研究課題名（英文）

Mycobacterial *PE_PGRS62* gene is a virulence factor during tuberculosis.

研究代表者

切替照雄 (KIRIKAE, TERUO)

国立国際医療研究センター・研究所・部長

研究者番号：50192563

研究成果の概要（和文）：

PE_PGRS62 は、結核の病原因子の一つであると考えられている。*PE_PGRS62* が結核菌の病原因子であるかどうか決定するために、我々が全ゲノムシーケンスした結核菌 Erdman 株 DNA の情報を元にもまず *PE_PGRS62/Rv3812* を破壊するための結核菌ファージを作製した。遺伝子破壊株 ΔPE_PGRS62 へ *PE_PGRS62* 遺伝子とそのプロモーターを挿入した pMV306（インテグレーションプラスミド、ゲノムに1コピーの遺伝子を挿入する）で *PE_PGRS62* 遺伝子を相補した株 ($\Delta 62Comp$)、また、 $\Delta 62Comp$ 株のコントロールとして、目的遺伝子挿入のない pMV306 を導入した ΔPE_PGRS62 ($\Delta 62/mock$) 株も作製した。これらの遺伝子破壊と相補を確かめるために、我々は野生型 (WT)、 $\Delta 62/mock$ 、 $\Delta 62Comp$ のそれぞれの菌株からゲノム DNA を抽出した。これらの DNA を *Sma*I 処理し、得られた断片を特異的なプローブで検出した。次に、WT、 $\Delta 62/mock$ と $\Delta 62Comp$ のそれぞれの菌株の *PE_PGRS62* の発現量を調べた。これらの菌株を 7H9/ADC 培養液中で培養し、RNA を抽出した。*PE_PGRS62* の発現量は、特異的なプライマーを用いて qRT-PCR で測定した。その結果 $\Delta 62Comp$ 株の *PE_PGRS62* の発現が回復していた。WT 株、 $\Delta 62/mock$ 株と $\Delta 62Comp$ 株が 7H9/ADC 培養液中で培養した場合、それらの生育速度に違いはなかったが、J774 細胞に感染させた場合は細胞内での $\Delta 62/mock$ 株の生存率が減少していた。マウスにおける ΔPE_PGRS62 株の病原性低下を評価するために、WT 株または ΔPE_PGRS62 株をマウスの尾静脈に注射した。 ΔPE_PGRS62 株を感染した BALB/c マウスあるいは SCID マウスにおいて、WT 株感染マウスと比較すると顕著な生存日数の遅延が認められた。これらの結果により、*PE_PGRS62* が結核菌の病原性に必要であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

PE_PGRS62 is thought to be a virulence factor during tuberculosis. To determine whether *PE_PGRS62* is a virulence factor of *M. tuberculosis*, we deleted *PE_PGRS62* of *M. tuberculosis* Erdman (WT) using mycobacterial phage system. We designed the knockout phage of *PE_PGRS62/Rv3812* refer to Erdman genomic DNA. A knockout strain, ΔPE_PGRS62 was constructed and was complemented with the integrative plasmid pMV306 into which *PE_PGRS62* gene and its promoter are inserted ($\Delta 62Comp$). We also transformed an empty pMV306 as a control strain of $\Delta 62Comp$ to ΔPE_PGRS62 ($\Delta 62/mock$). To confirm these gene disruption and complementation, we extracted genomic DNA from WT, $\Delta 62/mock$ and $\Delta 62Comp$ strains. The fragments treated with *Sma*I are detected with specific probe. Next, we examined expression of *PE_PGRS62* of WT, $\Delta 62/mock$ and $\Delta 62Comp$ strains. These strains were cultured in

7H9/ADC medium and their RNAs were extracted. The transcription levels of *PE_PGRS62* were determined by qRT-PCR with specific primers. We observed the recovery of *PE_PGRS62* expression in $\Delta 62$ Comp strain. We checked any difference among WT, $\Delta 62$ /mock and $\Delta 62$ Comp. Although we confirmed no differences among these strains grown in 7H9/ADC culture medium, $\Delta 62$ /mock mutant strain showed reduced the survival rate of intracellular mycobacteria in J774 cells. To evaluate the virulence attenuation of ΔPE_PGRS62 in mice, we injected the strains of WT or ΔPE_PGRS62 into tail vein of mice. There was a significant delay in survival infected with the ΔPE_PGRS62 mutant strain relative to WT strain in BALB/c and SCID mice. These results demonstrate that *PE_PGRS62* is required for *M. tuberculosis* virulence.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 総計 | 3,400,000 | 1,220,000 | 4,420,000 |

研究分野：

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：PE_PGRS62、Prdx1、ペルオキシレドキシシン、マクロファージ、結核

1. 研究開始当初の背景

魚類の結核起因菌である *M. marinum* の細胞内増殖に必要な病原因子として *MAG24-1* および *MAG24-3* が同定されていた。これらの遺伝子の結核菌オーソログである二つの結核菌遺伝子 *PE_PGRS30* と *PE_PGRS62* が病原因子であるかどうかはわかっていなかった。

2. 研究の目的

結核菌ゲノム解析からグリシンに富む機能未知な PE_PGRS ファミリータンパク質の存在が明らかになり、PE_PGRS タンパク質がタイプ VII 分泌機構のひとつである ESX-5 から分泌されると考えられているため、PE_PGRS タンパク質は宿主細胞に何らかの影響を与えることが予想された。本研究の目的は PE_PGRS ファミリータンパク質遺伝子のひとつである *PE_PGRS62* (*Rv3812*) の遺伝子を破壊した結核菌株を作製し、この菌株が弱毒化するかどうか調べることにより、*PE_PGRS62* が結核菌の病原因子かどうかを明らかにす

ることである。

3. 研究の方法

結核菌 Erdman の *PE_PGRS62* 遺伝子破壊株を作製し、マウスに感染させ、その生存日数を観察した。*PE_PGRS62* 遺伝子破壊株に *PE_PGRS62* をコンプリメント（相補）し、マクロファージ内での細胞内増殖性（細胞内の結核菌 CFU）が回復するかどうか調べた。

4. 研究成果

PE_PGRS62 遺伝子破壊株を感染させた BALB/c マウスの生存日数は野性型株に比べ 70 日程度遅くなった。*hsp60* プロモーターで *PE_PGRS62* を *PE_PGRS62* 遺伝子破壊株に発現させると生育速度が遅くなったため、ネイティブなプロモーターを含む *PE_PGRS62* 遺伝子を挿入したインテグレーションプラスミド pMV306 を *PE_PGRS62* 遺伝子破壊株に導入し新たにコンプリメント株を得た。そのコンプリメント株の *PE_PGRS62* 発現量は 75% 回復し、その生育速度は野性型株および

PE_PGRS62 遺伝子破壊株と同じであった。一方で結核菌を感染させたマクロファージ内では、PE_PGRS62 遺伝子破壊株の細胞内生存率は野性型株に比べ低くなり、コンプリメント株は細胞内生存率に回復が認められた。したがって PE_PGRS62 が結核菌の病原因子であることが明らかとなった。

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 8 件)

1. A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria.

Niki M, Niki M, Tateishi Y, Ozeki Y, Kirikae T, Lewin A, Inoue Y, Matsumoto M, Dahl JL, Ogura H, Kobayashi K, Matsumoto S. *J Biol Chem.* 2012;287(33):27743-52. doi: 10.1074/jbc.M111.333385.

2. Complete annotated genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* Erdman.

Miyoshi-Akiyama T, Matsumura K, Iwai H, Funatogawa K, Kirikae T. *J Bacteriol.* 2012;194(10):2770. doi: 10.1128/JB.00353-12.

3. Comprehensive multicenter evaluation of a new line probe assay kit for identification of *Mycobacterium* species and detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*.

Mitarai S, Kato S, Ogata H, Aono A, Chikamatsu K, Mizuno K, Toyota E, Sejimo A, Suzuki K, Yoshida S, Saito T, Moriya A, Fujita A, Sato S, Matsumoto T, Ano H, Suetake T, Kondo Y, Kirikae T, Mori T. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):884-90. doi: 10.1128/JCM.05638-11.

4. Genome sequence of clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* NCGM2209.

Miyoshi-Akiyama T, Matsumura K, Kobayashi N, Maeda S, Kirikae T. *J Bacteriol.* 2011;193(23):6792. doi: 10.1128/JB.06233-11.

5. Downregulation of *katG* expression is associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.

Ando H, Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Kato S, Mori T, Kirikae T. *Mol Microbiol.* 2011;79(6):1615-28. doi:

10.1111/j.1365-2958.2011.07547.x.

6. Evaluation of a line probe assay for the rapid detection of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*.

Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Kato S, Mori T, Kirikae T. *J Med Microbiol.* 2011;60(Pt 2):184-8. doi: 10.1099/jmm.0.024729-0.

7. Identification of *katG* mutations associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.

Ando H, Kondo Y, Suetake T, Toyota E, Kato S, Mori T, Kirikae T. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(5):1793-9. doi: 10.1128/AAC.01691-09.

8. Pyrazinamide resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Japan.

Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Sekiguchi JI, Kato S, Mori T, Kirikae T. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(8):1164-8. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03078.x.

[学会発表] (計 9 件)

1. Kirikae T. Genetic diagnosis of multidrug resistant tuberculosis, Japan-Russia Workshop 2010 Tokyo, 54th International Science and Technology Center (ISTC) Japan Workshop, May 30, 2010, Tokyo.

2. Ando H, Kato S, Mori T, Kirikae T. Down-regulation of *katG* expression is associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. 110th General Meeting of the American Society for Microbiology, May 27, 2010, San Diego, USA.

3. 松村和典、切替照雄. 結核感染に関わる宿主側タンパク質 PrxI の機能解析. 第 81 回 実験結核研究会, 東京, 6 月 1 日, 2011.

4. Kirikae T. A New line probe assay kit for detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. The 30th World Congress of Biomedical Laboratory Science, August 21, 2012. Berlin, Germany.

5. 祝弘樹, 船渡川圭次, 渡邊真弥, 奥村香世, 齋島由二, 加藤雅子, 切替富美子, 秋山徹, 切替照雄. Mycobacterial PE_PGRS62 is a virulence factor during tuberculosis. 第 86 回日本細菌学会総会, 千葉, 3 月 18~20 日, 2013.
6. 加藤雅子, 渡邊真弥, 松村和典, 祝弘樹, 船渡川圭次, 切替富美子, 秋山徹, 切替照雄. マウス感染モデルにおける弱毒型結核菌 NCGM2242 の免疫防御反応. 第 86 回日本細菌学会総会, 千葉, 3 月 18~20 日, 2013.
7. 渡邊真弥, 祝弘樹, 船渡川圭次, 齋島由二, 奥村香世, 加藤雅子, 橋本雅仁, 切替富美子, 秋山徹, 切替照雄. A mutation in the decoding region of 16S rRNA attenuates the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. 第 86 回日本細菌学会総会, 千葉, 3 月 18~20 日, 2013.
8. 切替照雄. 薬剤耐性結核菌迅速検出ラインプローブ法の開発. 第 88 回日本結核病学会総会, 千葉, 3 月 18 日, 2013.
9. 切替照雄, 安藤弘樹, 加藤正子, 秋山徹. イソニアジド耐性に関する遺伝子変異に関する実験解析. 第 83 回実験結核研究会総会, 千葉, 3 月 27 日, 2013.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 結核菌の菌株の同定方法及び遺伝子変異の検出方法

発明者: 秋山徹, 切替照雄, 奥村香世

権利者: 秋山徹, 切替照雄, 奥村香世

種類: 特許出願

番号: 特願 2013-012546

出願年月日: 平成 25 年 1 月 25 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

切替照雄 (TERUO KIRIKAE)

国立国際医療研究センター・研究所 部長

研究者番号: 50192563

(2) 研究分担者

船渡川 圭次 (FUNATOGAWA KEIJI)

栃木県保健環境センター・微生物部 部長

研究者番号: 70536896

(3) 連携研究者

()

研究者番号: