

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659553

研究課題名(和文)遅発育性抗酸菌用改変ベクターの開発とらい菌への g f p 遺伝子の導入及び K O 株の作製

研究課題名(英文) Development of gene replacement system in slow growth mycobacteria to express green fluorescent protein and knock out the mce1A gene in recombinant strains of *Mycobacterium leprae*

研究代表者

佐藤 直哉 (SATO, NAOYA)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：50276119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： GFP発現を指標とするヒト細胞侵入因子をノックアウトしたらい菌株を作製するため、遅発育性抗酸菌遺伝子改変ベクターの開発を試みた。結果、現時点ではらい菌へのベクター導入に至っていない。らい菌内制限酵素によりベクターが切断されている可能性があり、今後の検討課題である。

同時に、らい菌のヒト細胞侵入蛋白であるMce1A蛋白に対する抗体も作製した。前段階として、作製抗体によるMce1A蛋白外膜表示大腸菌のヒト細胞への侵入抑制効果を検討した結果、特定のMce1A蛋白領域に対する抗体により、同大腸菌の侵入抑制がみられた。

研究成果の概要(英文)： Two projects have been undertaken. First, a plasmid vector for slow growth mycobacteria was made. This vector was used to generate a mutant strain of *Mycobacterium leprae*, which expressed green fluorescence proteins and is useful for knocking out mammalian cell entry 1A (mce1A) gene. However, it was difficult to create an efficient mutagenesis system for *M. leprae*, perhaps due to endogenous restriction enzymes in *M. leprae*. This will be a subject of future studies.

Second, antibodies raised against *M. leprae* Mce1A protein were made to analyze the inhibition effect of these antibodies for Mce1A protein-dependent mammalian cell invasion of *M. leprae*. In preliminary data, the mammalian cell invasion of a recombinant *Escherichia coli*, which is expressed the Mce1A protein on its surface, was inhibited by an antibody raised against a unique epitope on the Mce1A protein.

研究分野：医歯薬学

キーワード：らい菌 ハンセン病 mce遺伝子 細胞内侵入因子

1. 研究開始当初の背景

ハンセン病は、遅発育性抗酸菌であるらい菌 *Mycobacterium leprae* が鼻粘膜から感染することで発症し、皮膚や末梢神経の障害される慢性感染症である。本症に対する治療としては、世界保健機関の推奨する多剤併用療法が有効であるものの、神経障害の残存や耐性菌株の出現など未だ解決されない問題が存在する。また、BCG を始めとするハンセン病予防法が検討されてきたが、現時点で決定的な予防法はない。以上の理由から、本症に対する有効な予防法の開発が喫緊の課題となっている。

2000 年にらい菌の全ゲノム解析が終了し、相同性解析を基礎にした各々の遺伝子機能が推定可能になった。しかし、らい菌病原因子の解析に基づいたハンセン病に対する分子標的ワクチンの開発は、遅々として進んでいないのが現状である。

一般に、新しい治療法やワクチンの開発を目的とする病原因子の解析は、遺伝子レベルでの相同性解析に加えて、蛋白レベルでの抗原性・類似性と菌体内の発現・局在解析、組換え蛋白を用いた *in vitro* での機能解析、及び、菌体レベルで、人工培地培養法を用いた目的遺伝子ノックアウト (KO) 株の作製、野生株を対照とした *in vitro* および *in vivo* での機能比較へと進められる。しかし、らい菌の場合、未だに人工培地で培養不能であることが、病原因子のポストゲノム解析を行う上での大きな障壁となっている。

我々はこれまでに、らい菌 *mce1A* 遺伝子が本菌の鼻粘膜上皮細胞への感染に係わる重要な病原因子であることを、その組換え蛋白を用いた *in vitro* の系で明らかにしてきた。具体的には、らい菌 Mce1A 蛋白は、菌体表面に発現する native 蛋白で、らい菌が初期に感染する鼻粘膜上皮細胞への侵入活性を有し、さらに、末梢神経感染前にらい菌リザーバーとなる神経周囲血管内皮細胞へも侵入活性を示すこと、を明らかにしてきた (Sato N et al., *Kitasato med* 36, 65-73, 2006. Sato N et al., *J Dermatol Sci* 46, 101-110, 2007)。さらに、ハンセン病に対する新たな予防法として、本遺伝子を標的にしたワクチンが有効である可能性を提唱した (Sato N et al., *J Dermatol Sci* 46, 101-110, 2007)。加えて、目的蛋白を大腸菌外膜に表示させるシステムを用いて、らい菌と結核菌との Mce1A 蛋白機能を比較解析した結果、らい菌 Mce1A 蛋白は、結核菌のそれと比較して、鼻粘膜上皮細胞に対する特異的な侵入活性を有することも分かってきた (Sato N et al., *J Invest Dermatol* 128, S192, 2008)。これらの結果から、らい菌 *mce1A* 遺伝子や Mce1A 蛋白を標的としたハンセン病ワクチンには、強力な感染予防効果が期待されると共に、末梢神経障害をも減少させる効果が想定される。

しかし、らい菌が人工培地で培養不能であ

ることが足枷となり、ワクチン開発への次なるステップとして重要な Mce1A 蛋白の機能解析法、すなわち、*mce1A* 遺伝子 KO 株を用いた *in vitro* や *in vivo* の解析は不可能であった。

本研究では、人工培地培養を経ずにらい菌自体の遺伝子操作を可能とする基盤システムを開発することにより、上記の障壁を打ち破り、病原因子の解析を容易にし、迅速な臨床応用を可能にすることを目的とする。

2. 研究の目的

そこで我々は、(1) 遅発育性抗酸菌遺伝子改変用ベクターの開発、(2) 電気穿孔法による開発ベクターのらい菌への *gfp* 遺伝子カセット導入とらい菌感受性マウスへの接種・培養、(3) 抗 GFP 抗体を用いた FACS 解析による GFP 発現菌株の選別法、を組み合わせることで、人工培地での培養過程を経ずに、目的遺伝子改変または非改変 GFP 発現らい菌株の作製システムを構築することを目的とする。

これにより、培養不能ならい菌において不可能とされてきた病原因子の機能解析法が可能となる。すなわち、野生株と病原因子改変株との感染効率を、人工培地を用いたコロニーカウント法ではなく、GFP 発現強度に基づいた FACS 解析法によって比較可能になることから、有効な予防法のないハンセン病に対して、病原因子を標的にしたワクチン開発の基礎研究が可能となる。さらに、本研究は、他の培養困難な遅発育性抗酸菌感染症における病態解明や新たな治療・予防法を開発するための基盤技術に適用可能であり、極めて斬新で挑戦的な研究に位置付けることが出来る。

3. 研究の方法

(1) 遅発育性抗酸菌遺伝子改変用ベクターの開発：遅発育性抗酸菌に対する組換え効率の高い遺伝子改変株作製法を参考に、我々は、らい菌の遺伝子に対する組換えベクターとして、数種類の候補ベクターを想定した。

らい菌 *mce1A* 遺伝子は、相同組換えにより *gfp*-抗生剤耐性遺伝子カセットが挿入されることで失活するようベクターを設計した。ベクターの構成要素には、レポーターに *gfp* 遺伝子、選別マーカーとしてカナマイシンまたはハイグロマイシン耐性遺伝子 (*aph or neo*) を用いた。GFP 発現プロモーター (*Pmyc*) には、らい菌由来の *groEL1/2* (*hsp60/65*)、*sigA* などの候補遺伝子を組み込み、さらに、これらベクターは大腸菌内で作製するため *oriE* 及び *bla* 遺伝子を付加した。*mce1A* 遺伝子非 KO 株は、上記カセットを他領域に挿入することで作製することを試みた。

これら実験に必要ならい菌ゲノム DNA ライブラリーおよび各ベクター要素を作製・精製した後、らい菌用遅発育性抗酸菌遺伝子改変ベクターを作製した。

(2) 電気穿孔法による開発ベクターのらい

菌への遺伝子導入、マウスへの接種・培養、GFP 発現を指標にした FACS 解析法による遺伝子改変株の選別：電気穿孔法を用いて作製ベクターをコンピーテントらい菌に遺伝子導入した後、らい菌感受性マウス (SCID マウス) のフットパットに接種した。数週間フットパット内で増殖させた後、抗生剤 (カナマイシンまたはハイグロマイシン) 投与による遺伝子導入らい菌の選別を行った。十分に選別増殖させたらい菌を回収した後、最終的には GFP 発現を指標に FACS 解析法を用いてらい菌の選別を行った。なお、コンピーテントとして必要らい菌 Thai53 株は、SCID マウスを用いて増殖させ、保存・維持しているものを用いた。

(3) 選別らい菌の遺伝子・蛋白レベルでの解析と保存：GFP 発現を指標に選別したらい菌よりゲノム DNA を抽出した後、遺伝子レベルでは至適プライマーを用いた DNA シークエンスにより解析し、目的菌株を選別した。さらに蛋白レベルでは、Mce1A 蛋白の活性領域に対する MoAb または PoAb を用いて (以下 d で作製)、ブロッティング法 (菌体ライセート)、ゴールドビーズを用いた免疫電顕法 (生菌体) により Mce1A 蛋白発現の有無を確認した。以上により選別・確認されたらい菌は、再度マウス内で増殖させた後、グリセロール内に保存した。

(4) Mce1A 蛋白の活性領域に対する抗体の作製：すでに我々は、Mce1A 蛋白の侵入活性領域について、本蛋白を大腸菌外膜に表示させるシステムや組換え蛋白 (N 末/C 末トランケート) を用いた実験から、72 アミノ酸からなる領域に存在することを突き止めている (Sato N et al., *J Invest Dermatol* 128, S192, 2008)。本領域を数分割した領域をペプチド合成し、担体蛋白を結合させた合成ペプチドをマウスまたはラビットに免疫することで Mce1A 蛋白に対する MoAb または PoAb を作製した。

なお、作製抗体の抗原特異性に関しては、既に我々が作製した組換えらい菌 Mce1A 蛋白及びらい菌 Mce1A 蛋白外膜表示大腸菌を用いた、ブロッティング法や FITC 染色により確認した。

(5) らい菌 *mce1A* 遺伝子機能解析：上記システムより得られたらい菌株 (*mce1A* 遺伝子改変株と非改変株) の鼻粘膜上皮細胞を始めとするヒト細胞に対する感染・侵入効率を、GFP 発現に基づく蛍光強度にて定量化し、比較検討する予定とした。同時に、作製した Mce1A 蛋白に対する抗体を用いた抑制試験を *in vitro* および *in vivo* にて行う予定とした。

この前段階として、既にヒト細胞侵入能を有することが確認されているらい菌 Mce1A 蛋白外膜表示大腸菌を用いて、作製抗体による本大腸菌の鼻粘膜細胞を始めとするヒト細胞への侵入能抑制効果を検討した。

4. 研究成果

(1) GFP 発現を指標とするらい菌のヒト細胞侵入因子 *mce1A* 遺伝子を KO したらい菌株を作製するため、遅発育性抗酸菌遺伝子改変ベクターの開発を試みた。はじめに、GFP 発現ベクターを作製し、これを電気穿孔法にて牛型結核菌 *Mycobacterium bovis* BCG 株に導入した結果、BCG 株における GFP 発現を確認することが出来た。次に、本ベクターを基に GFP 発現らい菌遺伝子改変ベクターを数種類作製し、これらのらい菌への導入を試みた。結果、現時点では、GFP 発現らい菌株及び GFP 発現 *mce1A* 遺伝子 KO らい菌株を確認出来ない。らい菌内制限酵素によりベクターが切断されている可能性があり、今後の検討課題である。

(2) 同時に、らい菌のヒト細胞侵入蛋白である Mce1A 蛋白に対する抗体も作製した。作製抗体による Mce1A 蛋白外膜表示大腸菌のヒト細胞への侵入抑制効果を検討した結果、特定の Mce1A 蛋白領域に対する抗体により、同大腸菌の侵入抑制がみられた (図 1)。本特定領域が、ハンセン病に対する新規ワクチン開発のターゲットとなり得ることが示唆された。

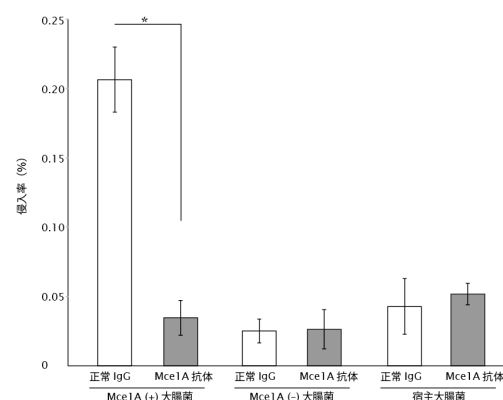


図 1. らい菌 Mce1A 蛋白特異抗体による Mce1A 蛋白外膜表示大腸菌のヒト細胞侵入抑制効果の検討

AIDA (adhesin involved in diffuse adherence) 法による目的蛋白の大腸菌外膜表示システムを用いて、AIDA ベクターにらい菌 *mce1A* 遺伝子を挿入し、これを非病原性宿主大腸菌に組換えることでらい菌 Mce1A 蛋白外膜表示大腸菌 (Mce1A (+) 大腸菌) を作製した。AIDA ベクターのみを組換えた大腸菌 (Mce1A (-) 大腸菌)、及び宿主大腸菌は陰性対照として用いた。

はじめに、各々の大腸菌を、正常 IgG ないし作製した Mce1A 蛋白の特定領域に対する特異抗体 (Mce1A 抗体) で前処理した後、ヒト細胞に感染効率 (multiplicity of infection) 10 : 1 で感染させ、30 分間反応させた。次に、ゲンタマイシン処理を 2 時間行うことで非侵入大腸菌を殺菌した後、ヒト細胞を破碎して侵入大腸菌を回収し、コロニーカウント法にて定量化した。各棒グラフは、侵入大腸菌数を初期に感染させた大腸菌数

で割り、侵入率 (%) として表記した。エラーバーは標準偏差を示す。統計解析は Student's t-テストを用いた。*: $P < 0.05$ 。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 5 件)

① Haslindah Dahlan, Naoya Sato, Fauzan Azhari Marzuki, Ahmad Haykal Abdurahman, Takao Fujimura: Endothelial cell invasion of *Mycobacterium leprae* Mce1A protein expressed by the *Escherichia coli* AIDA autotransporter. The 16th annual meeting of Kitasato Microbial Academy. 2013. 8. 8 (Sagamihara, Japan).

② 佐藤直哉、藤村響男、Abdurahman Ahmad Haykal、Marzuki Fauzan Azhari、Bakri Haslindah Dahlan、勝岡憲生: らい菌 Mce1A 蛋白外膜表示大腸菌の培養ヒト微小血管内皮細胞に対する侵入能の検討. 日本皮膚科学会第 844 回東京地方会. 2012 年 09 月 08 日 (横浜市).

③ Ahmad Haykal Abdurahman, Naoya Sato, Sanako Tajima, Takao Fujimura, Kensei Katsuoka: Vascular endothelial cell entry activity of *Mycobacterium leprae* depends on Mce1A protein. The 36th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2011. 12. 9 (Kyoto, Japan).

④ Tajima Sanako, Naoya Sato, Ahmad Haykal Abdurahman, Takao Fujimura, Kensei Katsuoka: *Mycobacterium leprae* can invade in the human microvascular endothelial cells through the Mce1A protein. The 40th annual meeting of the Japanese Society for Immunology. 2011. 11. 29 (Makuhari, Japan).

⑤ Naoya Sato, Ahmad Haykal Abdurahman, Toshiko, Miyata, Takao Fujimura, Kensei Katsuoka: Invasion of human microvascular endothelial cells by *Mycobacterium leprae* through Mce1A protein. Internal Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress, XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 2011. 9. 10 (Sapporo, Japan).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: らい菌による感染症を予防又は治療するためのワクチン、抗体及び医薬

発明者: 藤村響男

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願 2012-180114 号

出願年月日: 24 年 8 月 15 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 直哉 (SATO, Naoya)

北里大学・医学部・助教

研究者番号: 50276119

(2) 研究分担者

藤村 響男 (FUJIMURA, Takao)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 50209087

(3) 連携研究者

なし