

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

| |
|---|
| 機関番号：10105 |
| 研究種目：若手研究（B） |
| 研究期間：2011～2012 |
| 課題番号：23790466 |
| 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）：本研究では、結核菌が感染した際に重要な働きを示すことが予想される宿主側分子 PrxI を見出し、PrxI ノックアウトマウスを用いた感染実験を実施した。その結果、ノックアウトマウスの平均生存日数は野生型マウスに比べ短く、有意な差が認められた。また、宿主 PrxI タンパクが結核菌をはじめとする抗酸菌特異的なタンパクと結合することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To determine whether PrxI is essential for the host defense against tuberculosis, susceptibility of PrxI-deficient (PrxI KO) mice to *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) was compared to wild-type mice *in vivo*. We observed that PrxI KO mouse infected that with virulent Mtb survived significantly shorter as compared to the wild-type controls. Also we found that PrxI bound to Mtb specific protein.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-------------|-----------|-------------|
| 交付決定額 | 3,330,000 円 | 990,000 円 | 4,290,000 円 |

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

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 ファミリータンパクに属し、哺乳動物、酵母、植物および細菌といった種々の生物がそのホモログタンパクを有することが知られている。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なされているが、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に変化させ、無害化することが報告されている。

これまでの研究により、一酸化窒素 (NO) による殺菌機構が結核菌感染に対する宿主の防御機構として重要であることが明らかにされている。宿主のマクロファージは結核

菌等の病原細菌や異物を認識し貪食すると、 $\text{INF-}\gamma$ などによるサイトカイン刺激を受けて活性化され、 NO を産生する。さらに、 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^-) が生成される。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障害性は、特定の細胞や異物に限定され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、宿主の細胞も細胞傷害を引き起こす恐れがある。したがって、細菌の AhpC と同様、マウスの 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。しかしながら、マウス PrxI のマクロファージ内でどのような機能を示すのか実際のところ詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は、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、宿主の酸化ストレス応答タンパク PrxI がどのような機能を示すのか明らかにすることを目的とする。そのため、 PrxI ノックアウトマウスを用いた結核菌感染実験を行う。また、宿主の PrxI と作用する結核菌側因子を明らかにするため、細胞ライセートを用いたプルダウンアッセイを実施する。これらの解析を通して、 PrxI が結核菌感染時のマウス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 の動態を検討する。また、宿主 PrxI と作用する結核菌側因子を同定し、宿主の感染防御機構を回避するのに必要な細菌側因子を探索する。

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尾静脈より投与した。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。

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。

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、ノックアウトマウスの平均生存日数は、野生型マウスに比べて短く、有意な差が認められた。さらに、感染マウスから臓器（脾臓、肺および肝臓）を採取し、各臓器での結核菌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

て顕著に高いことが明らかになった。

マウスは、PrxI から PrxVI の 6 つの Prx ファミリータンパクを有することが知られており、そのうち PrxI から PrxVI は類似した構造をとる。そこで、PrxI 以外の Prx についてもマクロファージ内で発現が認められるか否かをウェスタンブロット法により検討した。解析には、マクロファージ様培養細胞株 RAW およびマウス骨髄細胞から分化誘導したマクロファージ (BMM) を用いた。その結果、BMM、RAW 共に PrxI および PrxII の発現が認められた一方、PrxIII、PrxIV の発現は認められなかった (図 1)。

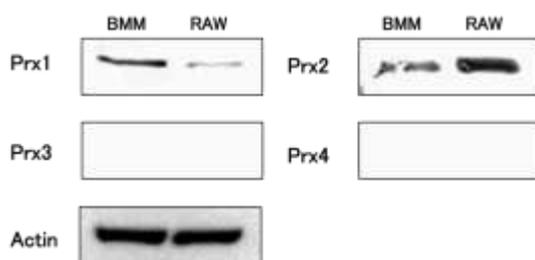


図 1 Prx のウェスタンブロット解析

各レーンには、20 μ g のセルライゼートを展開し、市販の抗体を用いて検出した。

次に、PrxI と相互作用する結核菌側の因子を特定するため、プルダウンアッセイを行った。結核菌のこれまでの研究から、PE_PGRS62 および PE_PGRS30 タンパクは結核菌がマクロファージ感染時にのみ発現し、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ており、この 2 つの結核菌タンパクを PrxI と作用する候補分子として選抜した。これらのタンパクは 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。その結果、PE_PGRS62 タンパクは、PrxI、PrxII のうち、PrxI とのみ結合することが明らかになった (図 2)。一方 PE_PGRS30 は PrxI、PrxII 共に結合は認められなかった。

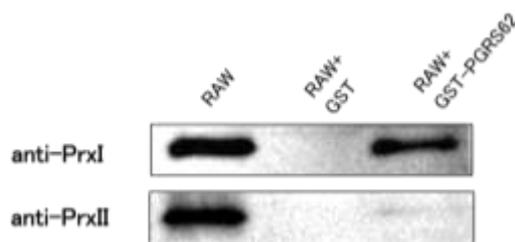


図 2 GST プルダウンアッセイ

GST-PGRS62 は、GST 融合 PE_PGRS62 タンパクを示す。市販の抗体を用いて検出した。

今回解析したリコンビナント PE_PGRS62 および PE_PGRS30 タンパクは、結核菌 H37Rv 株の遺伝子を元に調製したが、*pe_pgrs62* および *pe_pgrs30* の他の菌株での保有性を確認するため、結核菌および非結核性抗酸菌の全ゲノム解読株 19 株 (*M. tuberculosis* 13 株、*M. bovis* BCG 4 株、*M. africanum* 1 株、*M. canettii* 1 株) について遺伝子の検索を行った。その結果、*pe_pgrs62* は非結核性抗酸菌も含む全ての菌株で保存されており、相同性もほぼ 100%一致していた。さらに、*pe_pgrs62* の周辺配列の遺伝子構造も全ての株で高度に保存されていた。それに対して、*pe_pgrs30* では、4 株でフレームシフト変異が存在し、周辺配列の遺伝子構造も高度な保存性は認められず多様性に富んでいた。PE_PGRS は、抗酸菌に特異的に存在する PE/PPE ファミリータンパクの構成タンパクの一つであり、ゲノム中に約 160 のタンパクが存在し、ゲノム全体の約 10%を占める。これまでの比較ゲノム解析により、同一の *pe_pgrs* 遺伝子でもその配列は菌株間で多型性が認められることが知られている。したがって、*pe_pgrs62* 自体やその周辺構造で示された保存性の高さは、*pe_pgrs62* の機能が抗酸菌の生存にとって重要であることを示唆している。したがって、PE_PGRS62 が宿主の PrxI と結合することが結核菌にとってどのような意味をもつか、本タンパクの機能を詳細に解明すること

は、今後結核菌の病原性をさらに理解する上で重要な課題である。

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 PE_PGRS62 を利用して宿主の感染防御機構をどのように回避するのかといった病原菌側の回避戦略についても検討し、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目指す。

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 3 件)

Okumura K, Arai R, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D, Osaki M, Miyoshi-Akiyama T (2012). Complete genome sequence of *Melissococcus plutonius* DAT561, a strain that shows an unusual growth profile and is representative of an endemic cluster in Japan. *Journal of Bacteriology*. 194: 3014 DOI: 10.1128/JB.00437-12.

Okumura K, Shimomura Y, Yamagata Murayama S, Yagi J, Ubukata K, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T (2012). Evolutionary paths of streptococcal and staphylococcal superantigens. *BMC Genomics*. 13:404 DOI: 10.1186/1471-2164-13-404.

Okumura K, Arai R, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D, Osaki M, Miyoshi-Akiyama T (2011). Complete genome sequence of *Melissococcus plutonius* ATCC 35311. *Journal*

of Bacteriology. 193: 4029-4030 DOI: 10.1128/JB.05151-11.

[学会発表] (計 4 件)

渡邊真弥、祝弘樹、船渡川圭次、はい島由二、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*、日本細菌学会総会、平成 25 年 3 月 18 日、幕張メッセ

祝弘樹、船渡川圭次、渡邊真弥、奥村香世、はい島由二、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、日本細菌学会総会、平成 25 年 3 月 18 日、幕張メッセ

高松大輔、大倉正稔、奥村香世、秋山徹、*Melissococcus plutonius* 典型株・非典型株 識別用 Duplex PCR 法の開発、日本細菌学会総会、平成 25 年 3 月 18 日、幕張メッセ

奥村香世、下村有美、村山琮明、八木淳二、切替照雄、秋山徹、レンサ球菌および黄色ブドウ球菌のスーパー抗原の起源に関する解析、日本細菌学会北海道支部学術総会、平成 24 年 8 月 29 日、とがちプラザ

[その他]

ホームページ等

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