

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23790490

研究課題名(和文)結核菌の再活性化に関する分子機構の解明

研究課題名(英文)Streptomycin dependent Mycobacterium tuberculosis and M. bovis BCG

## 研究代表者

本田 尚子 (Honda, Naoko)

国立感染症研究所・品質保証・管理部・研究員

研究者番号：40600911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：結核菌はヒトに感染後、一部が抗結核薬の効きにくい休眠状態となる。これは抗結核薬治療の長期化の原因となるため、休眠期に効果のある薬剤の開発が重要である。ストレプトマイシン(SM)要求性結核菌18b株は16S rRNAに変異をもつ。SM非存在下で増殖を休止し抗結核薬抵抗性を示すため、休眠期結核菌モデルとして利用されつつあるが、BSL3施設を必要とする。そこで結核のワクチンであるBCG株に同一の変異を導入した結果、18b株と同様SM依存的に増殖し、SM非存在下では増殖を停止し、抗結核薬イソニアジドへの感受性が低下した。休眠期結核菌に効果のある抗結核薬の開発に広くBSL2施設で利用可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：A SM dependent mutant M. tuberculosis 18b strain has an additional cytosine residue in 16S rRNA and this mutation has been considered to be responsible for SM dependence. As 18b strain replicates in SM containing medium and enters non-replicating state after SM removal even in aerobic cultures, this has been developed as dormancy model to screen new drugs active against non-replicating state in recent years. As BSL3 facility is required to culture 18b and it is not known whether other mutations associated with drug susceptibility exist on 18b, we introduced the same nucleotide insertion on the currently used vaccine strain, M. bovis BCG Tokyo and confirmed that this mutation conferred SM dependence. We further examined the effect of first line drugs on non-replicating SM starved BCG and showed that this strain had phenotypic resistance to isoniazid and will be useful for screening of new drugs in BSL2 facilities.

研究分野：細菌 結核

キーワード：結核 ストレプトマイシン 休眠

### 1. 研究開始当初の背景

結核菌は世界の人口の 1/3 に感染し、感染者の 10% は生涯のいずれかの時期に結核を発症する。日本の新規結核登録患者数は年間約 2 万人であり半数は 70 歳以上の高齢者の再燃による。数十年にわたり休眠状態で潜在感染した結核菌は、免疫力低下や高齢化等に伴い再増殖し結核を発症させる。休眠誘導、休眠の維持、再増殖に到る機構の詳細は不明であるが、休眠菌を殺菌することは、結核再燃対策に重要である。既存の抗結核薬は増殖停止期の結核菌への効果が弱いため、肺内で一定の割合で生じると考えらえる休眠菌を殺菌できれば、6 か月必要な抗結核薬服用期間を大幅に短縮するばかりでなく、服薬中断による耐性菌の出現防止に有効である。

ヒト個体内で起こる結核菌の休眠現象と再活性化は不明な点が多く、*in vitro* で再現することは非常に困難であるが、密閉したガラス瓶内で結核菌を培養し、徐々に酸素を消費させ嫌気状態に移行させる Wayne の嫌気モデルが、休眠菌に近い状態を実験室で作成する手法としてよく用いられている。しかし嫌気下で抗結核薬を添加する必要があり、薬剤のスクリーニングには手間を要した。

一方 1955 年に分離されたストレプトマイシン (SM) 依存的に増殖する、SM 要求性の結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* 18b 株は、16S rRNA をコードする *rrs* の 513 塩基目に 1 塩基挿入変異があることが分かっており ( ), 好気培養下で利用可能な簡便な休眠モデルとして利用されつつある。18b 株は SM 非存在下では数回の分裂後に増殖を停止し、イソニアジドへの感受性が低下しリファンピシンへの感受性は維持することから、休眠菌の薬剤感受性に類似するとされる。しかし 18b 株の培養には BSL3 施設が必要であるため、その利用は限られていた。

一般的に増殖に SM を必要とする SM 要求性となる原因は、*rpsL* にコードされたりボソーム構成タンパク質の S12 のアミノ酸置換や、16S rRNA の 530 ループ、ヘリックス 44 の 1490 塩基付近の塩基置換により、リボソームの A 部位に安定してアミノアシル tRNA が結合できなくなることにより、ペプチジル結合が形成されずに解離する状態を、SM が結合することで適度に安定化し、翻訳が進むためと考えられている。しかし 18b 株の SM 要求性となる機構や 16S rRNA 以外の薬剤感受性に関する遺伝子の変異の有無は分かっていない。

### 2. 研究の目的

増殖停止期の結核菌に作用する抗結核薬の解析が容易になるように、BSL2 実験室で取り扱い可能な結核症のワクチン株である *M. bovis* BCG 株に 513 塩基挿入変異を導入し、SM 要求性 BCG になること、および結核菌 18b 株の 16S rRNA の一塩基置換が SM 要求性の原

因遺伝子であるか確認を行う。次に増殖停止期の SM 要求性 BCG 株の薬剤感受性を解析し、BSL2 施設で利用可能な休眠菌のモデルの一つとすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 結核菌 18b 株をビーズ破碎後、遠心上澄をショ糖に重層し超遠心によりリボソームのペレットを回収した。リボソームを含まない大腸菌の *in vitro* 翻訳系 PURExpress *In Vitro* Protein Synthesis Kit (NEB) に抽出したリボソームと 35S-methionine を添加し *in vitro* 翻訳を行い、翻訳産物 DHFR を SDS-PAGE により分離しイメージングプレートで検出した。

(2) 18b 株と同一の挿入変異をもった *rrs* オペロン全長を含む、抗酸菌で複製しないプラスミドを BCG に導入し、カナマイシン耐性株を選択後、SM200  $\mu\text{g/ml}$  の 7H10 プレートで増殖した SM 耐性株を選別した。カナマイシン感受性かつ SM 不含培地で増殖しない SM 要求性 BCG を選別した。各濃度の SM を含む 7H9 液体培地および 7H10 寒天培地で培養し、増殖に必要な SM 濃度を調べた。

(3) 抗結核薬感受性を調べるため、対数増殖期の SM 要求性 BCG 株を SM200  $\mu\text{g/ml}$  を含む 7H9 培地に 550nm における吸光度を 0.0001 に調整した。SM 不含培地で 2 週間培養し増殖を停止した BCG 株は吸光度を 0.2 に調整した。各濃度の抗結核薬存在下で 96 ウェルプレート中で 7-10 日培養後、レサズリンを終濃度 0.001-0.005% 添加し、レゾルフィンへの還元による蛍光を 48 時間後にプレートリーダーで測定した。BCG の一部は 7H10 寒天培地を用いて 5 週間後に cfu を計数した。

### 4. 研究成果

(1) 結核菌 18b 株の対数増殖期、増殖停止期および野生型 BCG 株のリボソームを用いて各濃度の SM 存在下で *in vitro* 翻訳を行った結果、BCG のリボソームでは 2  $\mu\text{g/ml}$  の SM で翻訳産物が検出されなくなったが、18b 株のリボソームでは、200  $\mu\text{g/ml}$  の SM を添加しても翻訳産物の量は SM 非添加時と変わらなかった。よって少なくとも 18b のリボソームは SM により翻訳が阻害されないことが示された。SM 非添加においても翻訳産物が検出され、SM 濃度依存的な翻訳産物の増加が認められなかったことから、リボソームの精製の過程では結合した SM が外れないこと、増殖停止期の 18b 株から抽出したリボソームにも翻訳活性があることが示唆された。

(2) 18b 株の *rrs* と同一の挿入変異を持たせた BCG 株は、SM 不含培地では増殖せず、50-800

µg/ml の濃度で親株とほぼ同じ増殖速度で増殖する SM 要求株となった。ここから 18b 株の SM 要求性となる原因遺伝子が *rrs* の変異であることが確認された。対数増殖期の SM 要求性 BCG を洗浄し培地から SM を除去すると、約 7 日で増殖が停止した。2 週間後のコロニー形成率は 10%、3 週間で 1% に低下したが、SM 添加により再増殖し、18b 株と同様の SM 依存的増殖を示すことが示された。

(3) レサズリンの還元による蛍光量の変化を指標とした薬剤感受性試験から、対数増殖期の BCG 株は、イソニアジド・エタンブトール・パラアミノサリチル酸・リファンピシン・カナマイシンの MIC が SM 感受性である親株と SM 要求株の 2 つでほぼ同じであった。SM 除去後 2 週間の SM 要求性 BCG 株は、レサズリンの還元能が著しく低下した。レサズリンの濃度を一般的に用いられる 0.005% から 1/10 に減少させても、抗結核薬非添加とほとんど差が認められなかった。7H10 プレートでのコロニー計数法では、イソニアジド感受性が対数増殖期に比べ低下したことから、増殖停止期の薬剤感受性は 18b 株と同様の傾向を示した。

SM 要求性 BCG の薬剤感受性試験に用いる時期を早めるといった条件を検討することで、今後この株を BSL2 施設においてもレサズリンの還元を指標に増殖停止期に作用する薬剤のスクリーニングに利用できると考えられる。

#### 引用文献

Honore N., Marchal G., Cole ST. Antimicrob Agents Chemother. 39: 769-70, 1995

#### 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)

1. Honda N., Kimb H., Rimbara E., Kato A., Shibayama K., Mori S.

"Purification and functional characterization of diadenosine 5', 5''-P1, P4 -tetrphosphate phosphorylases from *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium avium*." *Protein Expression and Purification*. 112:37-42, 2015  
doi:10.1016/j.pep.2015.04.010

[学会発表](計 4 件)

1. 本田尚子、佐藤法仁、阿戸学、松村隆之、山崎利雄、関塚剛史、黒田誠、中山真彰、小林和夫、大原直也 : A single base insertion in 16S rRNA gene confers Streptomycin dependence in *Mycobacterium bovis* BCG. 第 88 回日本細菌学会総会、岐阜、2015 年 3 月

2. 趙娜、中山真彰、関塚剛史、黒田誠、本田尚子、阿戸学、中島千絵、鈴木定彦、大原直也 : 抗酸菌におけるパラアミノサリチル酸に対する新たな耐性機序の可能性、第 88 回日本細菌学会総会、岐阜、2015 年 3 月

3. 佐藤法仁、阿戸学、黒田誠、山崎利雄、松村隆之、関塚剛史、中山真彰、井上哲圭、本田尚子、土田耕三、小林和夫、大原直也 : 結核菌/BCG のストレプトマイシン耐性・依存性に関する新たな知見、第 82 回 実験結核研究会、広島、2012 年 5 月

4. Satoh N, Ato M, Matsumura T, Yamazaki T, Sekizuka T, Kuroda M, Honda N, Nakayama M, Tsuchida K, Kobayashi K, Ohara N, Identification of the novel mutations in 16S rRNA gene of the substrains of a streptomycin dependent *mycobacterium tuberculosis* strain 18b which confer streptomycin resistance in *mycobacterium*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Sep., 2011

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

特になし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

本田 尚子 (HONDA Naoko)

国立感染症研究所・品質保証・管理部・  
研究員

研究者番号 : 40600911

(2)研究分担者  
( 0 )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( 0 )

研究者番号：