

結核菌の休眠誘導と潜伏感染成立／回避の分子機構

●松本 壮吉¹⁾ ◆吉村 満美子¹⁾ ◆小林 和夫²⁾

1) 大阪市立大学大学院医学研究科 2) 国立感染症研究所免疫部

<研究の目的と進め方>

現在、人類の1/3に結核菌が休眠状態で潜伏感染している。既感染者の5-10%が終生の間に内因性再燃を引き起こすことから、今後20年間で約2億人の発病と7千万人の死亡が予測される。潜伏感染菌の駆逐は根本的な結核対策となるが、現行の化学療法薬は休眠菌を殺傷できない。潜伏感染菌対策を構築するため結核菌の増殖停止（休眠；長期生存の機構）と再増殖（再燃）のメカニズムを明らかにする必要がある。

細菌の増殖は、細胞内の複数分子による時間的、空間的な分子間相互作用の総和と考えられる。結核菌を含め微生物のゲノム情報を活用できるようになった現在、各増殖期における遺伝子発現と発現した分子の相互作用を網羅的・総合的に解析し理解することが可能となった。

研究代表者等は結核菌などの抗酸菌に特異的なヒストン様蛋白質 Mycobacterial DNA-binding protein 1(MDP1)が、広くゲノムに結合して転写抑制を行うことで菌の増殖を停止させる休眠の鍵分子であると想定している。また、休眠菌内に大量に存在するMDP1は、DNA以外の菌体分子とも会合し菌の増殖制御を総合的に調節していると思われる。本研究は、抗酸菌の増殖制御をゲノム情報と抗酸菌増殖制御の鍵分子（MDP1）を足掛かりとして解明することを目的としている。

具体的には、1, DNAマイクロアレイを用いた転写制御解析 2, タイリングアレイ解析によるMDP1のゲノム上結合部位の同定 3, 蛋白質発現の網羅的解析 4, MDP1結合性蛋白質群の同定を行う。1-4の研究成果を総合的に検討し、転写から翻訳に至るまで各増殖期における時間的—空間的な分子群の動態を明らかにすることで、増殖制御全体の理解を試みる。

<2007年度の研究の当初計画>

準備状況；人型結核菌で当初は解析を計画し実行したが、増殖が緩慢（倍加時間；24時間）な上、重厚な細胞壁を有するため高品質のRNA採取が困難で研究進行が遅滞した。そのため比較的増殖が速く（倍加時間；3時間）細胞壁も薄い *Mycobacterium smegmatis*（結核菌と同様に休眠する）に対象を変更した。そしてMDP1欠失株やMDP1入れ戻し株を作成した。MDP1結合性蛋白質の同定するため、MDP1アフィニティークラムを作成した。

研究計画；

1, 遺伝子転写制御の網羅的解析

抗酸菌 (*M. smegmatis*) の各増殖期（対数増殖期、定常期、休眠期、休眠解除期）における遺伝子発現を網羅的に解析する。*M. smegmatis* 全遺伝子を標的としたDNAマイクロアレイにより、まず高品質のRNAを容易に採取できる対数増殖期を解析し、続いて定常期における遺伝子発現解析を計画した。また、MDP1欠失

株 (*M. smegmatis*) のRNAを同時に採取し並行してDNAマイクロアレイを行い野生株と比較することで、MDP1によって転写制御される遺伝子の同定を計画した。

2, 休眠菌の作成と休眠期RNAの採取方法の検討

休眠期の遺伝子発現を解析するために安定した試験管内休眠モデルの構築と休眠菌からの高品質のRNAの採取方法の確立を計画した。

3, MDP1のゲノムへの結合と転写の相関解析

実際に抗酸菌内で、MDP1のゲノムへの結合が転写抑制（計画1で明らかにする）と相関するかをchip-on chip-タイリングアレイ解析により検討する。タグ付きのMDP1を発現する解析用菌株の作成し、それを利用してMDP1のゲノム上での結合領域をタイリングアレイ解析による決定することを計画した。

4, 蛋白質発現調節の網羅的解析

野生株、MDP1の欠失菌、MDP1入れ戻し株の蛋白質発現パターンの差異を蛋白質二次元電気泳動により比較する。顕著に変化する蛋白質群を質量分析とデータベースを利用して同定することを計画した。

5, MDP1結合性蛋白質の網羅的同定

これまでの解析によりMDP1結合性蛋白質が菌体内に複数存在することを明らかにしている。MDP1の調節因子や被調節因子の同定を目指し、全てのMDP1結合性蛋白質の同定を質量分析とデータベースを利用して行うことを計画した。

<2007年度の成果>

1, 遺伝子転写制御の網羅的解析

対数増殖期と定常期の野生株およびMDP1欠失株からRNAを抽出し、*M. smegmatis* MC²155株全遺伝子を標的としたDNAマイクロアレイ解析を行った。対数増殖期から定常期にかけて、既知遺伝子中、181遺伝子が増減し、そのうちの99遺伝子の発現が減衰、82遺伝子が上昇していた。野生株とMDP1欠失株の発現を比較することで、MDP1は既知遺伝子中、171遺伝子の発現制御に関わり、134遺伝子の発現抑制と34遺伝子の発現増強に関わることが明らかになった。特筆すべき点としては、1; 定常期において高分子合成に関わる酵素（DNA合成酵素やRNA合成酵素、リボゾーム蛋白質など）の発現が終息するが、その終息にMDP1が強く関わる事が判明した。また、2; 定常期においてバクテリオファージ由来遺伝子がMDP1欠失株で頻発することから α 、 β 、 γ 、プロテオバクテリアで見られるヒストン様蛋白質HN-Sのように、菌に致死となるような外来遺伝子の発現を抑制していることを明らかにした。

2, 休眠菌の作成と休眠期RNAの採取方法の検討

結核菌の潜伏する細胞内環境を想定した、段階的低酸素暴露による休眠誘導モデル（Wayneモデル）の諸条件の再検討（容積や

酸素濃度) やシステムを改善することで、安定して休眠菌を作成することを実現した。休眠菌は抗結核薬イソニアジドに全く抵抗性となった。さらに RNA 抽出の諸条件を検討し、休眠菌から高品質の RNA を精製する系を確立した。

3, MDP1 のゲノムへの結合と転写の相関解析

MDP1 の転写制御 (計画 1 で明らかにする) とゲノムへの結合の相関を明らかにするためタイリングアレイ解析を計画した。解析用組み換え体として MDP1 欠失株にヒスチジntag 付きの MDP1 を入れ戻した菌株を作成した。

4, 蛋白質発現調節の網羅的解析

野生株、MDP1 の欠失菌、MDP1 入れ戻し株の蛋白質発現パターンの違いを二次元電気泳動により比較した。MDP1 欠失株は定常期以降死滅しやすく、*M. smegmatis* の死滅にともない顕著に増加する蛋白質二種が認められた。質量分析により細胞壁合成に関わる脱水素酵素と分子シャペロンであった。また死滅以前に MDP1 の欠失により顕著に発現変化のみられる蛋白質が少なくとも複数あることが蛋白質二次元電気泳動によっても判明した。アルコール脱水素酵素など、転写レベル (マイクロアレイ) の解析と一致するものとそうでないものが存在した。

5, MDP1 結合性蛋白質の網羅的同定

MDP1 が制御する、また MDP1 の制御を行う分子の同定を目指し、MDP1 結合性蛋白質を質量分析により同定した。その中には、DNA 合成酵素、RNA 合成酵素、リボゾーム蛋白質など、複製 - 転写 - 翻訳に中核的に関与する分子が 19 含まれていた。

<国内外での成果の位置づけ>

結核菌の休眠現象は、結核臨床上也生物学的にも重要な生命現象であるが、その本質的メカニズムは未解明である。臨床的には、休眠菌に十分な効果をあらわす薬剤がないことから、現在の結核治療は少なくとも半年の投薬を余儀なくされており、休眠菌を殺傷する薬剤が開発されれば理論的には 2 週間で治療を完了すると推定される。さらに休眠菌を殺傷できれば人類の 1/3 に休眠して潜伏する菌を殺傷することで結核の根本的対策も可能となる。生物学的には、芽胞や種子のように大きな変態を伴わず、長期間の生存を獲得する特異な高次生命現象である。このように結核菌の増殖制御機構の解明は重要課題であり、2007 年の *Nature Medicine* 誌等でも記載されているように、結核対策の構築につながる最重要課題であることが世界的に認識されている。

我々は抗酸菌に特異的なヒストン様蛋白質 MDP1 が菌の増殖の遅滞と共に大量に発現し、かつ MDP1 に転写抑制能があることなどから結核菌休眠の鍵分子と想定し解析を遂行してきた。本年度の研究結果から、MDP1 が定常期において実際に高分子合成に関わる遺伝子群の発現をグローバルに抑制 (成果参照) することを明らかにしたが、本成果は、結核菌の増殖制御を明らかにする上で進歩的かつ貴重な成果と考えられる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

DNA マイクロアレイによる転写制御の解析結果と MDP1 のゲノム結合部位の整合性を検討するため chip-on chip- タイリングアレイを計画していたが、解析用の組み換え菌は作成したものの、解析を遂行するまでに至らなかった。これは、当初の計画の過密によるもので来年度以降に必ず実施したい。

休眠菌の DNA マイクロアレイ解析も計画したが、従来の Wayne 休眠モデルでは、休眠の再現性に乏しく、安定した休眠の

誘導系から再構築せざるを得なかった。それで本年は、Wayne 休眠モデルの諸条件を検討し、また嫌気チャンパーと組み合わせることで安定した休眠菌作成系を構築した。さらに高品質の RNA を休眠菌から採取する技術を確立した。これで次年度以降、休眠菌の網羅的転写解析が可能となった。

<今後の課題>

結核菌を含む抗酸菌の増殖制御機構を解明するために、これまでの解析を継続/発展させる。確立した安定-休眠系を用いて、休眠期および休眠解除期 (酸素の再注入による) の遺伝子発現をマイクロアレイと二次元電気泳動-質量分析にて網羅的に解析する。また、休眠させた MDP1 欠失株の遺伝子発現を同様に解析し、(休眠菌の長期生存に必須な)MDP1 が発現調節する遺伝子群を明らかにする。ヒスチジntag 付き MDP1 を発現する組み換え菌を利用して、タイリングアレイ解析を行い、MDP1 の、増殖期、定常期、休眠期、休眠解除期における結合部位を順次同定し、転写制御 (マイクロアレイ解析結果) との整合性を比較検討する。以上の方法によって網羅的な遺伝子発現解析と分子の動態解析から、最終的に抗酸菌の増殖制御機構の解明に迫る。

<成果公表リスト>

1. 0801171301

Tomoya Katsube, Sohkiichi Matsumoto, Masaki Takatsuka, Megumi Okuyama, Yuriko Ozeki, Mariko Naito, Yukiko Nishiuchi, Nagatoshi Fujiwara, Mamiko Yoshimura, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii, Nobuhide Oshitani, Tetsuo Arakawa, and Kazuo Kobayashi. Control of cell wall assembly by a histone-like protein in mycobacteria. *J Bacteriol.* 189(22):8241-8249, 2007.

2. 0801171336

Bhatt A, Fujiwara N, Bhatt K, Gurcha SS, Kremer L, Chen B, Chan J, Porcelli SA, Kobayashi K, Besra GS, Jacobs WR Jr. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(12):5157-62, 2007.

3. 0801171320

Jun-ichi Nishimura, Hiroyuki Saiga, Shintaro Sato, Megumi Okuyama, Hisako Kayama, Hirotaka Kuwata, Sohkiichi Matsumoto, Toshirou Nishida, Yoshiki Sawa, Shizuo Akira, Yasunobu Yoshikai, Masahiro Yamamoto, Kiyoshi Takeda. *J Immunol.* 2008 in press.

共同研究の状況; 下記の方々とは班員内共同研究を進めている。

1. 国立感染症研究所 佐々木 裕子 先生
(質量分析による分子同定)
2. 国立感染症研究所 見理 剛 先生
(蛍光蛋白質を用いたゲノムと蛋白質の共存解析)
3. 大阪大学微生物病研究所 戸邊 亨 先生
(タイリングアレイ解析)