

課題番号 : 24指103
研究課題名 : 新しい病原因子を標的とした結核ワクチンの開発
主任研究者名 : 切替 照雄
分担研究者名 : 切替 照雄、濱端 崇、秋山 徹、岡村 匡史、船渡川 圭次

キーワード : 結核菌、ワクチン、ゲノム、病原因子
研究成果 :

1) 仮想結核菌コンセンサス・ゲノムの構築と次世代シーケンサーデータへの適用

背景 :

結核菌分離株はいくつかの異なる系統株から成り、疫学分析は通常特定の参照ゲノム(結核菌 H37Rv)と比較して評価されます。そして、それは若干の偏った結果をもたらすかもしれません。データベースで利用できて、次世代シーケンサー(NGSs)で得られる全ゲノム配列(WGS)データで、それらの分析は結核菌の基本的にゲノム配列情報に基づいて、イン・シリコ解析で実行されることができました。そのような分析のためのより高い決定方法を確立するアプローチとして、データベース上で利用できる結核菌群(MTBCs)株の全ゲノム配列は、コンセンサス配列(CS)と呼ばれている仮想参照ゲノム配列を造るために整理して、イン・シリコ疫学的分析においてその実現可能性を評価しました。

結果 :

コンセンサス配列(CS)の構築に成功し、系統発生の分析、リードマッピング有効性の評価を実証した。このリードマッピング有効性の評価は一塩基多型(SNP)を見つけるために重要であり、スポリゴタイピング、VNTR、Large sequence polymorphism(LSP)と北京タイピングを含む様々な仮想結核菌群タイピング法にも重要である。CSに基づいて見つけられるSNPは、H37Rvと比較すると、標準的な方法として全ゲノム配列に基づく系統樹と比較して信頼性を測定するために、コンカテマーに基づいた系統樹解析を利用した。H37RvのゲノムとCSに基づく系統樹の統計比較から、CSを用いた場合により良い結果が得られることが示された。CSからSNPを検出してコンカテマー化することが有用であることが、株系統の間で区別される重要なSNPの頻度がH37Rvゲノムを使用した場合よりも高かったことからわかった。CSより検出されたSNPの数は、H37Rvシーケンスより少なかったため、計算時間の短縮できる。それらが利用できる時、各々の仮想タイピングの実行は満足で、発表されるそれらと一致した。

結論 :

これらの結果は、結核菌群を参照するのに、ゲノム配列データから造られる仮想CSが理想的なアプローチであることを示した。

2) マイクロRNA-155 ノックアウト・マウスは結核菌の感染に感受性である

マイクロRNA(miRNA)は、短い、保存された、非翻訳RNA分子であり、mRNAが崩壊することにより翻訳が抑制される。したがってmiRNAが標的にしたmRNAにコードされる細胞分化、発達、免疫、アポトーシスに関係する分子が崩壊する。

C57BL/6匹マウスの骨髄由来マクロファージに結核菌Erdman株を感染させた時に、miR-155を含む少なくとも6つのmiRNAが発現増加した。静注でErdman株に感染させたC57BL/6マウスは、肝臓と肺でmiR-155の発現増加を示した。miR-155欠損C57BL/6マウスは、著しく早く死亡し、野生型マウスよりかなり高い肺におけるCFU(生菌数)を示した。さらに、Erdman株感染したmiR-155ノックアウト(miR-155^{-/-})の肺には、野生型マウスでより少ないCD4陽性T細胞、あるいはより多い単球と好中球が存在した。

これらの結果は、miR-155 が結核菌に体する免疫反応に重要な役割を果たすことを示した。

3) 東京の外国出生及び日本出生の居住者から分離された結核菌株の遺伝的多様性

日本国東京で外国出生及び日本出生の患者から得られた 259 の結核菌臨床分離株の完全なゲノム配列は決定した。

コンカテマー化した一塩基多型 SNP シーケンスを系統樹から構築した。259 の分離株は、4 つの分枝に集まっていた：系統 2（東アジア人または「北京」遺伝子型； $n=182$ 、70.3%）、系統 4（ユーロ・アメリカ人、 $n=46$ 、17.8%）、系統 1（インド・オセアニア、 $n=23$ 、8.8%）と系統 3（アフリカ東部・インド、 $n=8$ 、3.1%）。259 のうち、36（13.9%）が少なくとも 1 つの薬剤に対して耐性を示し、多剤耐性株は分離されなかった。薬剤耐性は、系統 2 ではない株よりも系統 2 の株の方が大きかった。系統 2 の分離株の割合は、日本出生者の（ $n=139/168$ 、82.7%）患者でより外国出生者（ $n=43/91$ 、47.3%）の患者でかなりより小さかったが、系統 1 の分離株の割合は日本出生者（ $n=4/168$ 、2.4%）患者でよりも外国出生者（ $n=19/91$ 、20.9%）ものでかなり大きかった。我々も系統 2 で典型的な北京株サブジェノタイプであるに特有の 8 つの SNP を見つけた。259 の分離株のうち、244 人が株に特有の SNP と小さな（1-30bp）挿入と欠失（挿入欠失）を有していた。株に特有の SNP の数と分離株あたりの挿入欠失は、日本出生患者（median 23, range 0-415）（ $p=3.66E-15$ ）より外国出生患者（median 89, range 0-520）が非常に大きかった。

これらの結果は外国出生患者から分離された結核菌が日本出生の患者よりも多くの遺伝的多様性を持っていることを示唆した。

4) 結核菌（Zopf）Lehmann と Neumann（ATCC35812）（クロノ）の注釈付き完全ゲノムシーケンス

我々は、結核菌（Zopf）Lehman と Neumann（ATCC35812）（クロノ）の注釈付き完全ゲノムシーケンスを報告する。

この菌株は病原因子や免疫研究に使用されてきた。結核菌クロノ株の完全なゲノムシーケンスは、長さ 4,415,078 塩基対で、65.60% の G+C 含有量であった。染色体は、合計 4,340 のタンパク質をコードしている遺伝子、53 の tRNA 遺伝子、1 分子のトランスファーメッセンジャー RNA（tmRNA）と 1 つの *rrn* オペロンを含むことが示された。LSP に基づく系統解析は、結核菌クロノ株がユーロ・アメリカの系統（系統 4）に属していることを示した。結核菌群の 22 菌株に加えて結核菌クロノの全部のゲノムシーケンスを用いた系統樹の解析は H37Rv がクロノ株に最も近い関係であることを示した。

動物モデルを用いた基礎研究において結核菌クロノ株が有用であることを示唆した。

5) *mabA* のサイレント突然変異は、結核菌にイソニアジド耐性を与える

結核菌の薬剤耐性は、ゲノムの制限された領域の突然変異に起因する。*katG* の突然変異、*mabA-inhA* オペロンのプロモーター領域と *inhA* は、最も頻繁にイソニアジド（INH）耐性の原因となる領域である。しかしながら、これらの領域の突然変異のないいくつかの INH 耐性（INH(r)) 結核菌臨床分離株が記述され、未だに不明な INH 耐性のメカニズムの存在が示唆された。

我々は、結核菌臨床分離株が既知の INH 抵抗突然変異なしで分離され、INH 耐性のかかなりの数で、*mabA*（g609a）サイレント突然変異を確認した。実験室株 H37Rv で *mabA*（g609a）変異体を構築すると、INH に対して耐性を示した。我々は *mabA*（g609a）突然変異が INH の標的をコードしている *inhA* の発現を

増加させたことを示した。そのサイレント突然変異の隣接領域 (mabA g609a) は inhA のもう 1 つのプロモーターとなっており、INH 耐性の新しいメカニズムであった。

したがって、本研究は不明だった INH 耐性メカニズムを説明の一助と成り得る。

Subject No. : 24S103
Title : Attenuated TB vaccine development by gene disruption of TB virulence factors
Researchers : Teruo Kirikae, Takashi Hamabata, Toru Miyoshi-Akiyama, Tadashi Okamura, Keiji Funatogawa
Key word : TB, Vaccine, Genome, virulence factor
Abstract :

1) Construction of a virtual *Mycobacterium tuberculosis* consensus genome and its application to data from a next generation sequencer.

BACKGROUND: Although *Mycobacterium tuberculosis* isolates are consisted of several different lineages and the epidemiology analyses are usually assessed relative to a particular reference genome, *M. tuberculosis* H37Rv, which might introduce some biased results. Those analyses are essentially based genome sequence information of *M. tuberculosis* and could be performed in silico in theory, with whole genome sequence (WGS) data available in the databases and obtained by next generation sequencers (NGSs). As an approach to establish higher resolution methods for such analyses, whole genome sequences of the *M. tuberculosis* complexes (MTBCs) strains available on databases were aligned to construct virtual reference genome sequences called the consensus sequence (CS), and evaluated its feasibility in in silico epidemiological analyses.

RESULTS: The consensus sequence (CS) was successfully constructed and utilized to perform phylogenetic analysis, evaluation of read mapping efficacy, which is crucial for detecting single nucleotide polymorphisms (SNPs), and various MTBC typing methods virtually including spoligotyping, VNTR, Long sequence polymorphism and Beijing typing. SNPs detected based on CS, in comparison with H37Rv, were utilized in concatemer-based phylogenetic analysis to determine their reliability relative to a phylogenetic tree based on whole genome alignment as the gold standard. Statistical comparison of phylogenic trees based on CS with that of H37Rv indicated the former showed always better results than that of later. SNP detection and concatenation with CS was advantageous because the frequency of crucial SNPs distinguishing among strain lineages was higher than those of H37Rv. The number of SNPs detected was lower with the consensus than with the H37Rv sequence, resulting in a significant reduction in computational time. Performance of each virtual typing was satisfactory and accorded with those published when those are available.

CONCLUSIONS: These results indicated that virtual CS constructed from genome sequence data is an ideal approach as a reference for MTBC studies.

2) MicroRNA-155 knockout mice are susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* infection

MicroRNAs (miRNAs) are short, conserved, non-coding RNA molecules that repress translation, followed by the decay of miRNA-targeted mRNAs that encode molecules involved in cell differentiation, development, immunity and apoptosis. At least six miRNAs, including microRNA-155 (miR-155), were upregulated when born marrow-derived macrophages from C57BL/6 mice were infected with *Mycobacterium tuberculosis* Erdman. C57BL/6 mice

intravenously infected with Erdman showed up-regulation of miR-155 in livers and lungs. Following infection, miR-155-deficient C57BL/6 mice died significantly earlier and had significantly higher numbers of CFU in lungs than wild-type mice. Moreover, fewer CD4⁺ T cells, but higher numbers of monocytes and neutrophils, were present in the lungs of Erdman-infected miR-155 knockout (miR-155^{-/-}) than of wild-type mice. These findings indicated that miR-155 plays a critical role in immune responses to *M. tuberculosis*.

3) Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from foreign-born and Japan-born residents in Tokyo.

Sequences of the full genomes of 259 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, obtained from foreign-born and Japan-born patients in Tokyo, Japan, were determined, and a phylogenetic tree constructed by concatenated single-nucleotide polymorphism (SNP) sequences. The 259 isolates were clustered into four clades: Lineage 2 (East Asian or "Beijing" genotype; n = 182, 70.3%), Lineage 4 (Euro-American, n = 46, 17.8%), Lineage 1 (Indo-Oceanic, n = 23, 8.9%), and Lineage 3 (East African-Indian, n = 8, 3.1%). Of the 259, 36 (13.9%) were resistant to at least one drug. There was no multi-drug-resistant isolate. Drug resistance was greater for the strains in Lineage 2 than the non-Lineage 2. The proportion of Lineage 2 isolates was significantly smaller in foreign-born (n = 43/91, 47.3%) than in Japan-born (n = 139/168, 82.7%) patients, whereas the proportion of Lineage 1 isolates was significantly larger in foreign-born (n = 19/91, 20.9%) than in Japan-born (n = 4/168, 2.4%) patients. We also found eight SNPs specific to the typical Beijing sub-genotype in Lineage 2, including 4 non-synonymous SNPs. Of the 259 isolates, 244 had strain-specific SNP(s) and small (1-30-bp) insertions and deletions (indels). The numbers of strain-specific SNPs and indels per isolate were significantly larger from foreign-born (median 89, range 0-520) than from Japan-born (median 23, range 0-415) (p 3.66E-15) patients. These results suggested that *M. tuberculosis* isolates from foreign-born patients had more genetic diversity than those from Japan-born patients.

4) Complete annotated genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* (Zopf) Lehmann and Neumann (ATCC35812) (Kurono)

We report the completely annotated genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* (Zopf) Lehmann and Neumann (ATCC35812) (Kurono), which is a used for virulence and/or immunization studies. The complete genome sequence of *M. tuberculosis* Kurono was determined with a length of 4,415,078 bp and a G+C content of 65.60%. The chromosome was shown to contain a total of 4,340 protein-coding genes, 53 tRNA genes, one transfer messenger RNA for all amino acids, and 1 rrn operon. Lineage analysis based on large sequence polymorphisms indicated that *M. tuberculosis* Kurono belongs to the Euro-American lineage (lineage 4). Phylogenetic analysis using whole genome sequences of *M. tuberculosis* Kurono in addition to 22 *M. tuberculosis* complex strains indicated that H37Rv is the closest relative of Kurono based on the results of phylogenetic analysis. These findings provide a basis for research using *M. tuberculosis* Kurono, especially in animal models.

Researchers には、分担研究者を記載する。

5) A silent mutation in mabA confers isoniazid resistance on *Mycobacterium tuberculosis*.

Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) is caused by mutations in restricted regions of the genome. Mutations in *katG*, the promoter region of the *mabA-inhA* operon, and *inhA* are those most frequently responsible for isoniazid (INH) resistance. Several INH-resistant (INH(r)) *Mtb* clinical isolates without mutations in these regions have been described, however, indicating that there are as yet undetermined mechanisms of INH resistance. We identified the *mabA*(g609a) silent mutation in a significant number of INH(r) *Mtb* clinical isolates without known INH resistance mutations. A laboratory strain, H37Rv, constructed with *mabA*(g609a), was resistant to INH. We show here that the *mabA*(g609a) mutation resulted in the upregulation of *inhA*, a gene encoding a target for INH, converting the region adjacent to the mutation into an alternative promoter for *inhA*. The *mabA*(g609a) silent mutation results in a novel mechanism of INH resistance, filling in a missing piece of INH resistance in *Mtb*.

概要

新規の結核ワクチンを開発するためには
新たな病原因子を同定することが必須である

目的

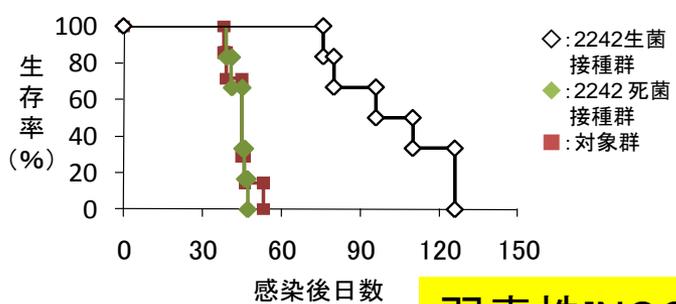
新たな結核菌病原因子及びこれらと相互作用する
宿主防御因子の同定

対象

- 遺伝子破壊により同定した新規病原性タンパク質
- 当研究部で分離した薬剤耐性結核菌NCGM2242株

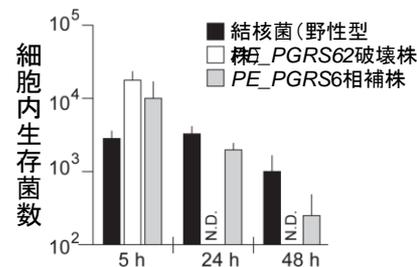
方法

- 遺伝子改変技術、マウス結核菌感染実験や結核菌ゲノム
解読を実施することで対象の生物学的性状を解明する
- これらの知見をもとに結核ワクチンの候補を作製する



ワクチン効果

弱毒株INCGM2242



PE_PGRS62は病原因子

研究成果

弱毒結核菌NCGM2242株の変異の同定

結核菌弱毒株NCGM2242の全ゲノムを解読し、リボソーム点突然変異による基礎代謝酵素や病原因子のタンパク質発現が減少していることを明らかにした。

ワクチン標的分子の同定

結核菌細胞壁タンパク質のひとつであると考えられているPE_PGRS62の遺伝子を破壊し、マウス生存日数の遅延の確認により病原因子として新規に同定した。

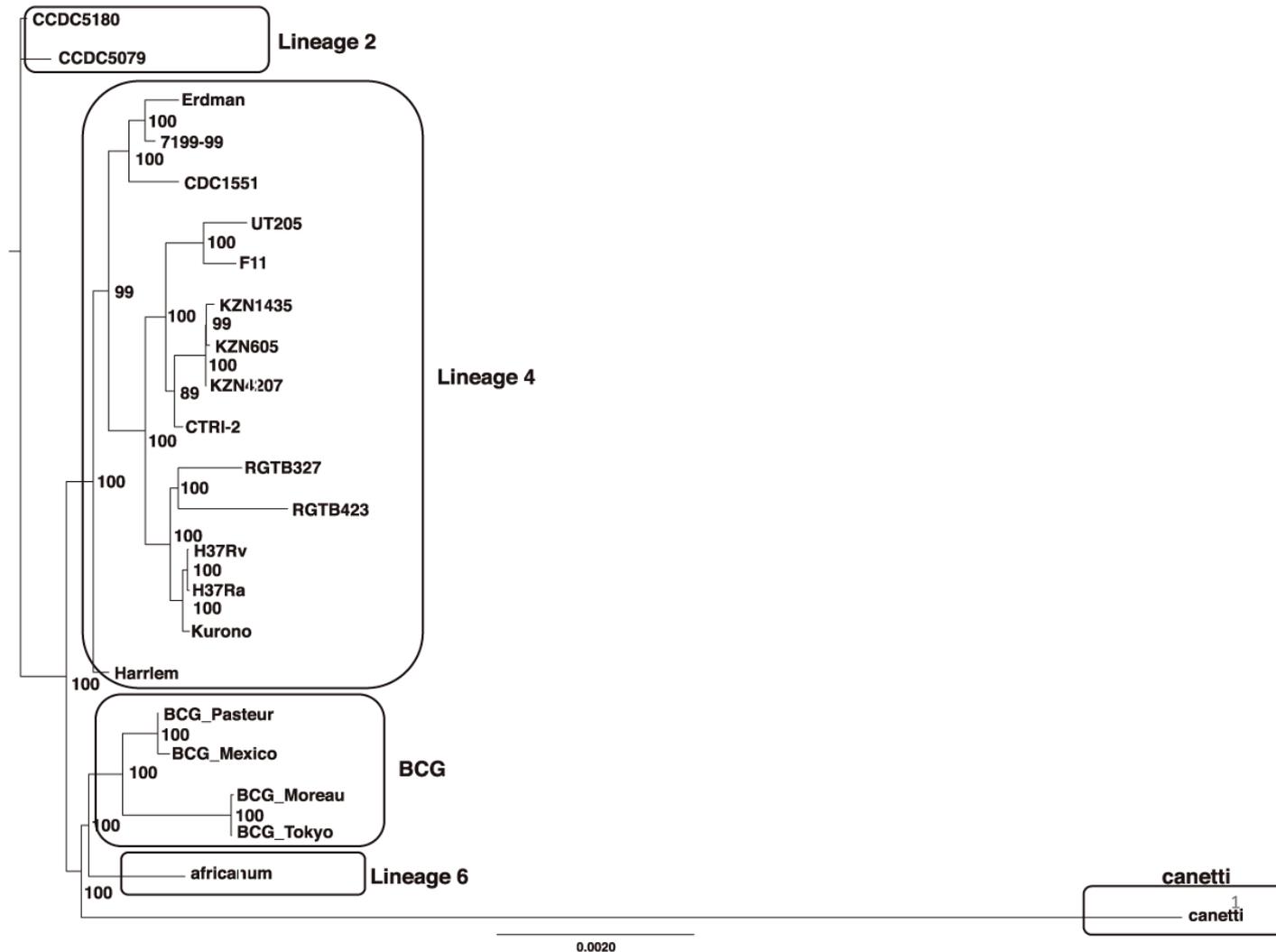
マウス結核モデルの構築

ペルオキシレドキシシン1欠損マウスは結核感受性が高かった。戻し交配によりさらに感受性を高めたBALB/cペルオキシレドキシシン1欠損マウスを作製した。

結核ワクチン標的分子を選抜

NCGM2242株のリボソームrrsの点突然変異を決定し、PE_PGRS62を病原因子として同定した。復帰変異を防ぐためにNCGM2242株のPE_PGRS62を破壊する。

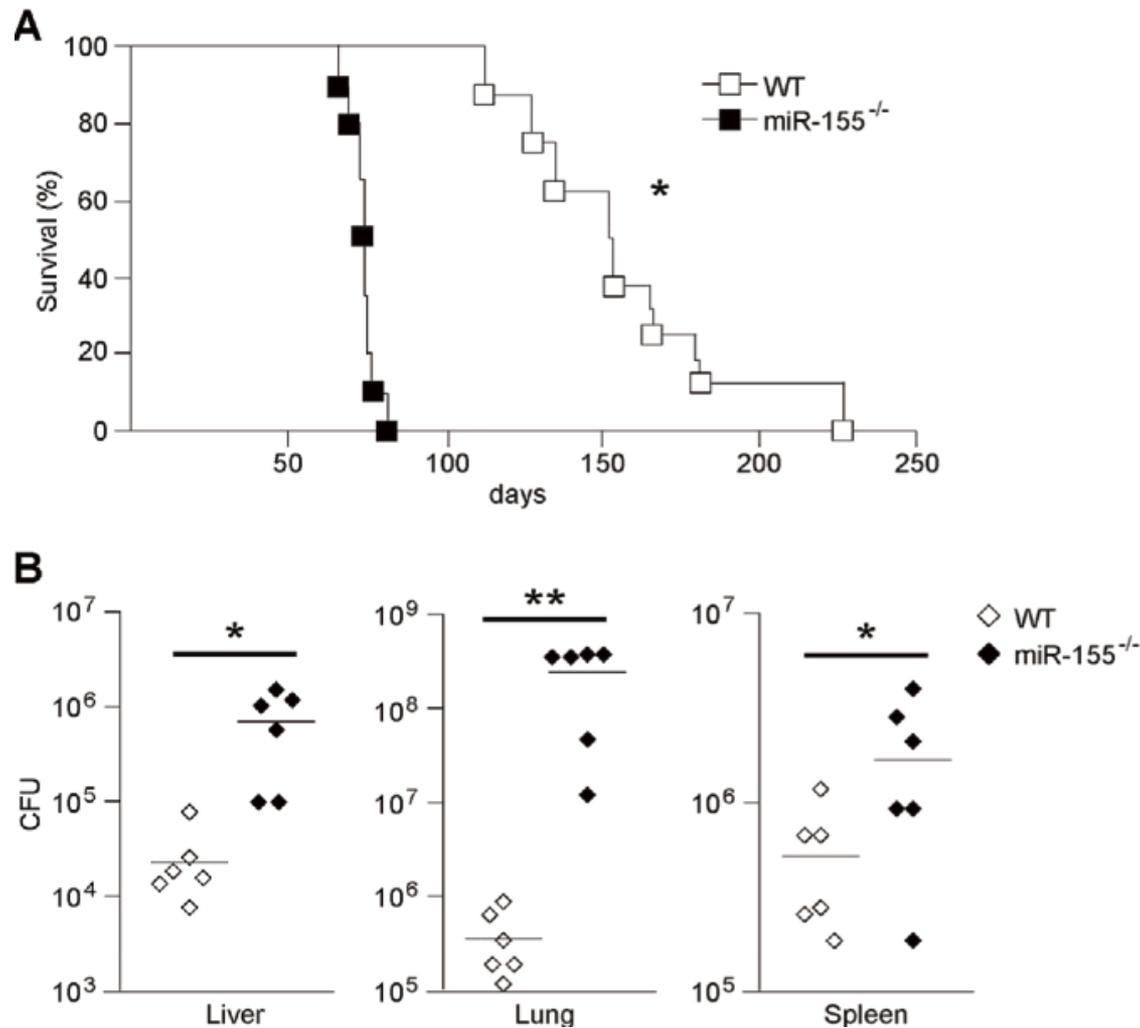
結核菌Kurono株の全ゲノム完全配列を決定した



系統解析結果ではKurono株はEuro-American系統に属していた。

系統発生解析では、Kurono株はH37Rv株に最も近縁であることが明らかとなった。

マイクロRNA-155ノックアウトマウスは結核感受性であった



(A) 結核菌感染した野性型マウス153日で半数が死亡、miR-155^{-/-}マウスは74. 5日で半数死亡

(B) 肝臓、肺、脾臓での生菌数は野性型マウスに較べ、miR-155^{-/-}マウスで高かった(肺では691倍)

課題番号 : 24指103
研究課題名 : 結核菌の全ゲノム解析およびワクチン候補株の機能解析
主任研究者名 : 切替 照雄
分担研究者名 : 濱端 崇

キーワード : 結核菌、PE_PGRS62、Hornerin

研究成果 :

【目的】

結核は国際的な再興感染症であり、予防には BCG が用いられている。BCG は乳幼児期の重傷化する結核を予防できるが、成人の結核を予防する次世代ワクチンが開発されていない。そこでワクチンの開発を目指し、これまでに作製した弱毒株である遺伝子ノックアウト結核菌の病原性低下のメカニズムを明らかにするために、PE_PGRS62 タンパク質の宿主細胞内における機能を明らかにする。

【方法】

結核菌 PE_PGRS62 タンパク質に結合する宿主タンパク質の同定: 同定した結核菌病原因子タンパク質 PE_PGRS62 の機能を明らかにするために、宿主細胞内で PE_PGRS62 を発現させ観察を行った。結合タンパク質を同定するために2段階の免疫沈降、具体的には GFP-PE_PGRS62 と HA-ユビキチンを共発現させた 293T 細胞の抽出液を用いて HA 抗体による1回目の免疫沈降後に GFP 抗体による2回目の免疫沈降を行い、得られた特異的な銀染色バンドを LC-MS/MS 解析し、PE_PGRS62 に結合する宿主タンパク質を同定する。

結核菌 PE_PGRS62 タンパク質を発現する肺胞 II 型上皮細胞 A549 の作製: A549 細胞に安定的に GFP-PE_PGRS62 を発現させるために、レトロウイルスベクター (pMX-puro、pVSV-G プラスミドと Plat-GP 細胞によるシステム、Cell Biolabs 社) を使用し GFP-PE_PGRS62 遺伝子を含む DNA 断片を A549 細胞に導入する。ピューロマイシン耐性細胞株を限界希釈により分離し、生育後に細胞抽出液を作製し Anti-GFP 抗体でウェスタンブロッティング解析を行うことで GFP-PE_PGRS62 が安定発現した A549 細胞をクローニングする。

結核菌 PE_PGRS62-5xMyc タンパク質を誘導発現する結核菌 ΔPE_PGRS62 株の作製: ΔPE_PGRS62 株のハイハイグロマイシンカセットを除去し得た菌株に、pUV15/Tet02-PE_PGRS62-5xMyc および pMV261Zeo/3xmCherry を導入した。PE_PGRS62 の発現は結核菌の生育に影響を与えるため、発現誘導可能で検出可能な発現系を構築する。

【結果・考察】

PE_PGRS62 タンパク質を 293T 細胞に過剰発現させるとベシクルに局在することがわかった。このベシクルに関与している細胞質タンパク質を同定するために、細胞質に豊富に存在しているユビキチンタンパク質を過剰発現・免疫沈降してから GFP-PE_PGRS62 の免疫沈降を行ったところ、結合タンパク質として Hornerin を同定した。Hornerin と PE_PGRS62 の結合が C 末端領域の推定膜貫通領域であることも確認できた。

Hornerin はケラチノサイトで発現量が多いことがわかってきた。結核菌感染に関係しそうな A549 細胞 (肺胞 II 型上皮細胞株) と Jurkat 細胞 (T 細胞株) で Hornerin が比較的多く発現していることがわかってきた。マクロファージの他に肺胞 II 型上皮細胞は結核菌が直接感染することが知られてお

り、この細胞内で PE_PGRS62 タンパク質が機能する可能性が考えられたため、GFP-PE_PGRS62 を安定発現する A549 細胞を作製した（クローン No. 11 細胞）。

A549 細胞内で GFP_PGRS62 はベシクルに局在することが確認され、このベシクルがラメラ封入体であるかどうかを確認するために、クローン No. 11 細胞に安定的に ABCA3-Myc を発現する細胞株を作製中である。

A549 細胞はサーファクタントタンパク質の分泌等が不完全であることが知られている。これまでに我々の研究グループが同定した PE_PGRS62 結合タンパク質である宿主 Prdx1 は細胞質型のペルオキシレドキシシンとして知られているが、A549 細胞において TGF- β 1 刺激依存的に細胞外に分泌することが報告されている。Prdx は細胞内では抗酸化作用を示すと考えられているが、Prdx がマクロファージや樹状細胞を TLR2/TLR4 依存的に IL-23、IL-1 β 、TFN- α などの炎症性サイトカインを強く産生させることが知られている。現在、A549 細胞を用いた Prdx1 の分泌を調べる実験系を構築中である。Prdx1 の分泌を PE_PGRS62 と Hornerin がどのように制御するか明らかにすることで結核菌の新たな感染戦略を発見できる可能性が十分ある。

結核菌に PE_PGRS62, 1-504 (FL) 、PE_PGRS62, 1-350 (Δ TM) および PE_PGRS62, 350-504 (TM) を無水テトラサイクリンで発現誘導し、ウェスタンブロット解析により 5xMyc タグしたそれぞれのタンパク質の発現を確認した。PE_PGRS62, 1-350 (Δ TM) を発現した結核菌が弱毒化するかどうか、培養細胞やマウスへの感染で調べる必要がある。

課題番号 : 24指103
研究課題名 : 結核菌の全ゲノム解析およびワクチン候補株の機能解析
主任研究者名 : 切替 照雄
分担研究者名 : 秋山 徹

キーワード : 結核菌、全ゲノムシーケンス、次世代シーケンサ、病原体ゲノム
研究成果 :

結核菌の薬剤耐性は治療上の重要課題のままである。従来、結核菌の薬剤耐性検査は PCR 法による遺伝子増幅で実施されてきた。本研究では結核菌による薬剤耐性などの変異獲得現象を、PCR による標的遺伝子増幅を用いない、検体の直接解析による、次世代シーケンサを用いた臨床分離株の全ゲノム解析により、遺伝子レベルで完全解明する基盤を構築する。

研究目的：結核菌の薬剤耐性は治療上の重要課題のままである。本研究では結核菌による薬剤変異獲得現象の駆動力となっている機構を明らかにするため、長期罹患患者由来結核菌の経時的全ゲノム解析を行う。同時に培養や PCR による特定遺伝子の増幅に依存しない、次世代シーケンサを活用した、短期間で結核菌の薬剤耐性や分子タイピング情報を網羅的に取得可能な手法の基盤を構築する。

研究成果：新規の結核ワクチンを開発するためには、新たな病原因子を同定することが必須である。また結核菌の薬剤耐性診断のためには種々の同菌株の全ゲノム情報解明が必要である。本計画では、新たな結核菌病原因子およびこれらと相互作用する宿主防御因子を同定するための基盤として、結核菌の全ゲノム情報を詳細に解析するために、結核菌実験株として動物実験などに汎用される Erdman 株の全ゲノム配列解析を実施した。その結果、予定通り、Erdman 株の全ゲノム情報を完全解明できた。これまでに完了された結核菌ゲノム配列解析の結果と、現在までに得られた本計画の Erdman 株の配列の比較では数ベース単位以上での多型性を示す部位は 34 か所であり、そのうち 17 か所は相同性解析より、PE/PPE ファミリーおよび膜合成に関与する因子をコードする領域と考えられた。これらの部位を Erdman 株と比較した時の多型性の有無のパターンは菌株ごとに異なっており Erdman と完全に一致するパターンを示す菌株は全配列が決定された結核菌株には見いだされなかった。またイソニアジド耐性に関わる新規薬剤耐性変異を同定し、論文発表した。

国内での結核実験に汎用されている *M. tuberculosis* Kuroono 株の全ゲノム完全配列を決定した。同菌ゲノムは 4415078 塩基からなり、G+C 含量は 65.60%、蛋白質コード領域は 4340 個、tRNA 遺伝子は 53 個、transfer messenger RNA は 1 個、リボソーマル RNA オペロンは 1 個存在した。系統解析結果では Kuroono 株は Euro-American 系統に属していた。系統発生解析では、Kuroono 株は H37Rv 株に最も近縁であることが明らかとなった。

結核患者由来喀痰などの臨床材料から効率的な次世代シーケンサ用サンプルを調製するための基礎検討を実施した。菌の濃縮法、共雑物除去法について既に実施している予備実験の結果を元に、手法の最適化を行った。また従来培養法により分離した結核菌から調製したゲノムによる予備的解析を実施し、得られた大量のゲノム情報を効率良く処理して必要情報を得るためのデータベース構築を行った。当センター・検体委員会の承認を受けた後に、臨床材料を検体とした解析のフィージビリティを検討した。これらの検討を元に、当センター病院などで分離された、在日外国人と日本人由来の結核株の比較を行うための、全ゲノム配列解析を 259 株で実施、菌株の系統や、系統発生解析に資するデータを得ることができた。

課題番号 : 24指103
研究課題名 : 結核ワクチン評価モデルの開発およびマウス結核感受性遺伝子の同定
主任研究者名 : 切替 照雄
分担研究者名 : 岡村 匡史

キーワード : マウス、結核菌、感受性遺伝子、連鎖解析
研究成果 :

目的 :

BCG ワクチンは小児の結核性髄膜炎や粟粒結核を有効に予防するものの、成人の肺結核には無効であることが大規模な疫学検査から明らかとなっている。従って、成人の肺結核に対して本当に有効なワクチンは未だ存在しない。その原因の一つとして、有用な結核感染モデル動物の開発が遅れていることが上げられる。我々は、結核の病原因子として、PE_PGRS62 を同定し、PE_PGRS62 は宿主細胞のペルオキシレドキシシン(Prdx1)と特異的に結合し、Prdx1 遺伝子欠損マウスでは、結核菌に対する感受性が著しく高い事を見出した。さらに、BALB/c マウスは、C57BL/6 比べ、遺伝的に結核菌に高感受性を示す形質を有している。本研究では、以上の知見およびツールを用いて、新たな結核菌評価モデルを開発するとともに、結核菌病原因子と相互作用する宿主防御因子を同定することを目的とする。

研究成果 :

1. 結核菌高感受性マウスを用いたワクチン候補株の検証

Prdx1 遺伝子を欠損することで、マウスは結核菌に対する感受性が著しく高まる。さらに、結核菌に感受性が高い系統である BALB/c に Prdx1 欠損を導入した結核菌高感受性マウス (Prdx1^{-/-}-BALB/c) は、ワクチン候補株やリコンビナント病原因子のワクチン効果をより効率的に評価できるモデルとして期待される。ワクチン候補株である弱毒株 NCGM2242 を結核高感受性 Prdx1^{-/-}-BALB/c に接種し、そのワクチン効果を検証した。その結果、NCGM2242 を接種したことで、逆に発症が早まってしまった。NCGM2242 にワクチン効果はなかったが、Prdx1^{-/-}-BALB/c は、BALB/c よりも結核菌に高感受性であるため、ワクチンの安全性およびその効果の検証に有用であると考えられた。

2. Prdx1 欠損マウス結核感染モデルによる新規宿主防御遺伝子の同定

C57BL/6 と BALB/c の系統間では、結核菌に対する著しい感受性の違いがある。結核菌に

抵抗性である Prdx1^{-/-}-B6 と感受性である Prdx1^{-/-}-BALB/c を交配した F1 は、結核菌に抵抗性であることがわかった。F1 と Prdx1^{-/-}-BALB/c の交雑群を作成し、結核菌の感染実験を行った。体重減少および致死を指標に、交雑群の連鎖解析を行った結果、マウス第 1 染色体に結核菌抵抗性遺伝子座を同定した。第 1 染色体に存在する結核菌抵抗性遺伝子座を、Prdx1^{-/-}-BALB/c に導入したコンジェニック系統を作製した。今後、樹立したコンジェニック系統の結核菌感染後の体重変化、生存日数等を指標に第 1 染色体に存在する結核菌抵抗性遺伝子を同定する。

課題番号 : 24指103

研究課題名 : 結核菌の全ゲノム解析およびワクチン候補株の機能解析

主任研究者名 : 切替 照雄

分担研究者名 : 船渡川 圭次

キーワード : 結核感染実験、ワクチン、マウス

研究成果 :

【目的】新規の結核ワクチンを開発するためには、新たな病原因子を同定することが必須である。本研究では、結核菌強毒株 Erdman 由来 NCGM2242 株のマウス感染実験を実施し、その病原性を評価する。また、NCGM2242 株のワクチン効果を検証する。宿主防御因子候補分子 Peroxiredoxin1 (Prdx1) のノックアウトマウスに結核菌を感染させ、結核菌に対する感受性を評価する。結核菌感染で発現が増加する宿主 microRNA155 のノックアウトマウスが結核感受性かどうか調べる。

【方法】感染実験に供する結核菌は、標準株 Erdman 株、NCGM2242 株を用いた。マウスは、C57BL/6 野生マウス、BALB/c 野生マウスおよび BALB/c をバックグラウンドに持つ Prdx1 ノックアウトマウス (Prdx1^{-/-}, BALB/c マウス) の雄、8 週齢を準備した。対数増殖期まで培養した結核菌を遠心して回収し、PBS で洗い、 1×10^7 CFU/ml になるよう調製した。マウスの尾静脈より結核菌 (2×10^6 CFU) を感染させた。感染させたマウスは、P3A 施設内のケージで飼育した。ワクチン効果を検証する場合は、接種菌量を $2 \times 10^{5.4}$ CFU にし、接種 1 ヶ月後、Erdman 株 ($2 \times 10^{5.4}$ CFU) を感染させた。

【結果】NCGM 2242 株の LD50 試験 : NCGM 2242 株の LD50 を決定するため、 2×10^7 生菌数を BALB/c マウスの腹腔に接種したが、300 日経過しても全て生存した。これに対して、Erdman 株を感染させた群では、平均 114 日 (2×10^5 生菌数接種群)、136 日 (2×10^4 生菌数接種群)、236 日 (2×10^3 生菌数接種群) 生存した。NCGM2242 株のワクチン効果試験 (1) : NCGM2242 株のワクチン効果を検証するため、NCGM2242 株の生菌及び死菌を BALB/c マウスに接種し、4 週間後 Erdman 株を感染させた。何も接種しなかったコントロール群、および NCGM 2242 死菌を接種した群は、平均 44 日生存したのに対し、NCGM2242 生菌を接種した群は、平均 102 日生存した。NCGM2242 株のワクチン効果試験 (2) : NCGM2242 株のワクチン効果を BCG と比較するため、NCGM 2242 株及び BCG を BALB/c マウスに接種し、4 週間後 Erdman 株を感染させた。何も接種しないコントロール群は、平均 129 日で死亡した。BCG を接種した群は、平均 161 日 (2×10^3 生菌数接種群) もしくは 190 日 (2×10^4 生菌数接種群) 生存した。それに対して、NCGM 2242 株を接種した群は、平均 245 日 (2×10^3 生菌数接種群) もしくは 258 日 (2×10^4 生菌数接種群) 生存した。

全ゲノムシーケンスにより、NCGM2242 株は *rrs* (別名 MTB000019 遺伝子) が変異していることがわかった (*rrs* の相補実験を計画中)。また、この変異により NCGM2242 株はカナマイシン耐性およびハイグロマイシン耐性になった。

Prdx1 ノックアウトマウスおよび miR-155 ノックアウトマウスは結核菌に感受性が高まっていた。また、BALB/c バックグラウンドの Prdx1 ノックアウトマウスも結核感受性であった。

【考察・結論】NCGM2242 株のワクチン効果 : NCGM2242 株の生菌でワクチン効果が見られた。それに対し、熱で処理した死菌ではワクチン効果は、ほとんど見られなかった。死菌は、マウスの体内ですぐ処理されてしまい免疫が成立しない。

NCGM2242 株のリボソーム変異を相補 (コンプリメント) する追加実験が必要になった。NCGM2242 株はリボソーム変異により複数の抗生物質耐性になったため、ゼオシンの耐性マーカーを有するプラスミドを構築した。このプラスミドへ *rrs* 発現に必要なオペロン領域 8 kbp を挿入しコンプリメント用プラスミドを得た。このプラスミドを NCGM2242 株に導入し、NCGM2242 の *rrs* 変異が回

復することを実験的に確認した（再投稿1）。再投稿1の後、*rrs* 変異により発現が変動する結核菌タンパク質の1つである **KsgA** のタンパク質量を調べる必要が出て来た。**KsgA** の抗体を作成し、投稿準備中である（再投稿2を準備中）。

miR-155 は結核菌感染で発現が増加していた。**miR-155** ノックアウトマウスは **Th2** 優位であり **Th1** 応答が正常ではなかったため結核菌への抵抗性が著しく低下していた。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：24指103

研究課題名：新しい病原因子を標的とした結核ワクチンの開発

主任研究者名：切替 照雄

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
A silent mutation in mabA confers isoniazid resistance on Mycobacterium tuberculosis.	Ando H, Miyoshi-Akiyama T, Watanabe S, Kirikae T.	Mol Microbiol.	91(3):538-47.	2014
Differential function of Themis CABIT domains during T cell development.	Okada T, Nitta T, Kaji K, Takashima A, Oda H, Tamehiro N, Goto M, Okamura T, Patrick MS and Suzuki H.	PLoS One	e89115	2014
MicroRNA-155 knockout mice are susceptible to Mycobacterium tuberculosis infection.	Iwai H, Funatogawa K, Matsumura K, Kato-Miyazawa M, Kirikae F, Kiga K, Sasakawa C, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T	Tuberculosis		2015 Mar 21. [Epub ahead of print]
Complete annotated genome sequence of Mycobacterium tuberculosis (Zopf) Lehmann and Neumann (ATCC35812) (Kurono)	Miyoshi-Akiyama T, Satou K, Kato M, Shiroma A, Matsumura K, Tamotsu H, Iwai H, Teruya K, Funatogawa K, Hirano T, Kirikae T	Tuberculosis	95(1): 37-39	2015
Construction of a virtual Mycobacterium tuberculosis consensus genome and its application to data from a next generation sequencer.	Okumura K, Kato M, Kirikae, T, Kayano M, Miyoshi-Akiyama T	BMC Genomics	16(1): 218	2015
Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from foreign-born and Japan-born residents in Tokyo.	Kato-Miyazawa M, Miyoshi-Akiyama T, Kanno Y, Takasaki J, Kirikae T*, Kobayashi N	Clin Microbiol infect	21(3): 248	2015

研究発表及び特許取得報告について

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
海外から輸入される多剤耐性結核の調査（本邦における外国人結核に対する調査研究）	喜多洋子、岡田全司、橋元里美、林清二、鈴木克洋、露口一成、小林信之、切替照雄、豊田恵美子、藤田明、下内昭、加藤誠也、小向潤、松本健二	第89回日本結核病学会総会	岐阜	2014年5月
Construction of a virtual Mycobacterium tuberculosis consensus genome and its application to data from next generation sequencers.	Okumura K, Kato M, Kirikae T, Kayano M, Miyoshi-Akiyama T.	American Society of Microbiology, 114th General Meeting.	米国	2014年7月
Tuberculosis among foreign-born persons in Japan: whole genome sequencing analysis of Mycobacterium tuberculosis isolates from residents in Tokyo	Kobayashi N, Kato M, Miyoshi-akiyama T, Takasaki J, Okada M, Kirikae T	5th Union world conference on lung health,	スペイン	2014年11月
Micro-RNA 155 mediates CD4+ T cell responses to Mycobacterium tuberculosis.	祝 弘樹, 船渡川圭次, 松村和典, 加藤雅子, 切替富美子, 氣賀恒太郎, 笹川千尋, 秋山 徹, 切替 照雄	第88回日本細菌学会総会	岐阜	2014年3月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
(結核菌の菌株の同定方法及び遺伝子変異の検出法)	PCT/JP2014/051208	ニプロ株式会社・帯広畜産大学・国立国際医療研究センター	2014年1月22日	日本

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。