

課題番号 : 27指1102

研究課題名 : 世界規模で新興している多剤耐性病原細菌の耐性化の分子基盤と新規抗菌薬の開発

主任研究者名 : 切替照雄

分担研究者名 : 秋山徹、岡村匡史、船渡川圭次、祝弘樹、多田達哉

キーワード : カナマイシン耐性、リボソーム変異、病原性、リボソーム成熟

研究成果 : 結核菌は1つのrRNA オペロンを有しており、カナマイシンなどの抗結核薬の標的となっている。現在まで、16S rRNA のカナマイシン結合部位の4つの突然変異が、カナマイシン耐性臨床分離株で報告されていた。我々は、rRNA オペロン領域のこれまでに報告かない突然変異が結核菌の生存能力と病原性を劇的に減少させるかもしれないと仮説を立てた。そこで、我々はrRNA 突然変異(U1406A)について記載する。このU1406A 変異した結核菌は試験管内で作られ、カナマイシンに抵抗性だけでなく、結核菌の病原性が非常に減少していた。この変異体は、代謝酵素、ミコール酸性生合成酵素と病原性要因(例えばAg85複合体とESAT-6)を含む結核菌タンパク質の20%(n = 361)の発現が減少していた。リボソーム突然変異はKsgA (Rv1010; 16S rRNA アデニン・ジメチル転移酵素)を含む3つのタンパク質の発現を誘導した。この3つのタンパク質はリボソームの上でU1406A 突然変異と近接しており、リボソーム成熟と翻訳開始プロセスと関係していた。変異体は17S rRNA (前駆16S rRNA) の増加と30Sサブユニットと70Sのリボソームの比の減少を示した。そして、16S rRNA のU1406A 突然変異がこれらのプロセスに影響を及ぼすことによって結核菌の病原性を減らしたことを示唆した。

Subject No. : 27S1102

Title : A Mutation in the 16S rRNA Decoding Region Attenuates the Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*

Researchers : Teruo Kirikae, Tohru Miyoshi-Akiyama, Tadashi Okamura, Keiji Funatogawa, Hiroki Iwai, Tatsuya Tada

Key word : Kanamycin resistance; Ribosome mutation; Virulence; Ribosome maturation; *Mycobacterium tuberculosis*

Abstract : *Mycobacterium tuberculosis* contains a single rRNA operon that encodes targets for antituberculosis agents, including kanamycin. To date, only four mutations in the kanamycin binding sites of 16S rRNA have been reported in kanamycin-resistant clinical isolates. We hypothesized that another mutation(s) in the region may dramatically decrease *M. tuberculosis* viability and virulence. Here, we describe an rRNA mutation, U1406A, which was generated *in vitro* and confers resistance to kanamycin while highly attenuating *M. tuberculosis* virulence. The mutant showed decreased expression of 20% (n = 361) of mycobacterial proteins, including central metabolic enzymes, mycolic acid biosynthesis enzymes, and virulence factors such as antigen 85 complexes and ESAT-6. The mutation also induced three proteins, including KsgA (Rv1010; 16S rRNA adenine dimethyltransferase), which closely bind to the U1406A mutation site on the ribosome; these proteins were associated with ribosome maturation and translation initiation processes. The mutant showed an increase in 17S rRNA (precursor 16S rRNA) and a decrease in the ratio of 30S subunits to the 70S ribosomes, suggesting that the U1406A mutation in 16S rRNA attenuated *M. tuberculosis* virulence by affecting these processes. (Infect. Immun. Accepted manuscript posted online 31 May 2016 , doi:10.1128/IAI.00417-16)

27指1102

研究課題名： 世界規模で新興している多剤耐性病原細菌の耐性化の分子基盤解析と新規抗菌薬の開発

主任研究者名： 切替 照雄

分担研究者名： 秋山 徹、岡村 匡史、船渡川 圭次、祝 弘樹、多田達哉

概要

- ・多剤耐性菌に対する抗菌薬の開発・基盤研究を実施
- ・分子疫学研究を駆使し多剤耐性菌の新たな薬剤耐性因子を同定

目的

アミノグリコシド高度耐性菌は日本を含むアジア諸国の医療安全を脅かしつつあるため、アミノグリコシド高度耐性菌に有効な新規抗菌薬を開発する

結核治療薬の探索・開発を行うための新規ターゲット分子を見つけるため、結核菌の病原因子や宿主防御因子を同定し、その機能を解析する

課題番号 : 27指1102
研究課題名 : 超多剤耐性結核菌に対する新規抗菌薬リード化合物の探索
主任研究者名 : 切替照雄
分担研究者名 : 切替照雄

キーワード : 結核菌、多剤耐性結核菌 (MDR-TB)、超多剤耐性結核菌 (XDR-TB)、植物エキス

研究成果 :

目的 : 結核は現在も年間 960 万人が新規に罹患し、150 万人が死亡している (WHO Tuberculosis Report) 疾患である。新規患者のうち 48 万人が多剤耐性結核菌 (MDR-TB) であり、このうち 9% が超多剤耐性結核菌 (XDR-TB) である。XDR-TB は稀ではあるが治療薬がなく、既に 77 カ国で出現が報告されており治療がほぼ不可能なため、XDR-TB を含む MDR-TB の治療薬の開発が必要とされている。本研究では高度耐性菌及び超多剤耐性結核菌に関する抗菌薬の開発研究を行う。

方法 :

1 次スクリーニング : 医薬基板研究所薬用植物資源研究センター所有の植物エキスライブラリを用い、我が国で分離された超多剤耐性結核菌臨床分離株 *M. tuberculosis* NCGM946K2 で抗結核効果を検定する。この NCGM946K2 株は表に示す通り、ほぼすべての抗結核薬に耐性 (R: Resistance) を示した。この菌株を 96 ウェルプレートで培養し、コントロールの菌が十分増殖した時点でアラマ・ブルーを添加する。増殖及び阻害は、2 日後のアラマブルーの色の変化で判定する。

Strain	抗結核薬 (µg/ml)								
	INH	RFP	EB	SM	KM	TH	PAS	CS	EVM
	1	40	2.5	10	20	20	0.5	30	20
NCGM946K2	R	R	R	R	R	R	R	R	S

INH, isoniazid; RFP, rifampin; EB, ethambutol; SM, streptomycin; KM, kanamycin; TH, Ethionamide; PAS, para-amino-salicylic acid; CS, cycloserine; EVM, ethionamide

2 次スクリーニング : 1 次スクリーニングで得られたサンプルの *M. tuberculosis* NCGM946K2 に対する最小増殖阻止濃度 (MIC) と細胞毒性試験をヒト乳腺ガン細胞 (MCF-7) とヒト肺ガン細胞 (A549) を用いて実施する。

結果 :

医薬基板研究所薬用植物資源研究センター所有の約 5000 種類の植物エキスライブラリから、1 次スクリーニングで、約 131 種類に結核菌の増殖抑制効果が認められた。2 次スクリーニングとしてこれらの植物エキスの結核菌最小増殖阻止濃度 (MIC) を調べた結果、比較的強い抗結核菌作用を示した 38 サンプルを得た。この 38 サンプルについて細胞毒性有無を調べ、低毒性かつ抗結核菌作用を持つ抽出物を得た。今後はこれら抽出物の一つであるミツバ栽培品抽出物から化合物の精製を進め、超多剤耐性結核菌臨床分離株 *M. tuberculosis* NCGM946K2 で抗結核効果の検定を行う予定である。

課題番号 : 27指1102

研究課題名 : ゲノム疫学に基づく多剤耐性グラム陰性細菌の新規薬剤耐性因子の同定および機能解析

主任研究者名 : 切替照雄

分担研究者名 : 秋山徹

キーワード : ペルオキシレドキシシン1、結核菌

研究成果 :

Peroxiredoxin 1 (PRDX1) is an antioxidant that detoxifies hydrogen peroxide and peroxynitrite. Compared with wild-type (WT) mice, Prdx1-deficient (Prdx1^{-/-}) mice showed increased susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and lower levels of interferon (IFN)- γ and IFN- γ -producing CD4⁺ T cells in the lungs after Mtb infection. Interleukin (IL)-12 production, c-Rel induction and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation levels were lower in Prdx1^{-/-} than WT bone marrow-derived macrophages (BMDMs). IFN- γ -activated Prdx1^{-/-} BMDMs did not kill Mtb effectively. Nitric oxide (NO) production levels were lower, and arginase activity and arginase 1 (Arg1) expression levels were higher in IFN- γ -activated Prdx1^{-/-} than WT BMDMs after Mtb infection. An arginase inhibitor, N ω -hydroxy-nor-arginine, restored antimicrobial activity and NO production in IFN- γ -activated Prdx1^{-/-} BMDMs after Mtb infection. These results suggest that PRDX1 contributes to host defenses against Mtb. PRDX1 positively regulates IL-12 production by inducing c-Rel and activating p38 MAPK, and positively regulates NO production by suppressing Arg1 expression in macrophages infected with Mtb.

Peroxiredoxin 1 contributes to host defenses against *Mycobacterium tuberculosis* (投稿中)

課題番号 : 27指1102
研究課題名 : マウスモデルを用いた結核菌の宿主防御因子の同定
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、ゲノム編集
研究成果 :

[目的]

結核は最も重要な国際的感染症のひとつである。結核は現在も年間で900万人が新規に罹患し、150万人が死亡している（WHO Tuberculosis Report）。新規患者のうち48万人が多剤耐性結核菌（MDR-TB）であり、このうち9%が超多剤耐性結核菌（XDR-TB）である。XDR-TBは稀ではあるが治療薬がなく、既に77カ国で出現が報告されており治療がほぼ不可能なため、XDR-TBを含むMDR-TBの治療薬の開発が必要とされている。本研究の目的は、結核治療薬の探索・開発を行うための新規ターゲット分子を見つけるために、新規宿主防御候補因子を同定し、ゲノム編集技術等を用いて、結核菌防御におけるこれらの遺伝子の機能を解明する。さらに、マウス近交系の結核菌に対する系統差に着目し、新たな宿主防御因子を同定する事で、創薬標的分子を明らかにする。

[研究成果]

1. ゲノム編集技術を用いた新規宿主防御候補遺伝子の検証

ゲノム編集技術の1つであるCRISPR/Cas9システムを用い、新規宿主防御候補遺伝子ノックアウトマウスを作製した。標的配列を認識するsgRNAとCas9をコードするmRNAマウス前核期受精卵に導入し、偽妊娠マウスへの移植により産仔を得た。生まれた産仔からDNAを抽出し、ゲノムDNA配列を解読することにより、新規宿主防御候補因子遺伝子への変異導入を確認した。

2. マウス系統差を利用した結核菌の新規宿主防御遺伝子の同定

第1染色体上に存在するC57BL/6の結核菌抵抗性遺伝子座をBALB/cに導入したコンジュニック系統および、Prdx1^{-/-}-BALB/cマウスのマクロファージに結核菌を感染させたところ、コンジュニック系統で結核菌生菌数が抑制されることを明らかにした。また、C57BL/6およびBALB/cのマクロファージをLPSで刺激し、培養上清中に含まれるNOを測定した結果、両系統間で差がなかった。

課題番号 : 27指1102
研究課題名 : マウス結核モデルの作成
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 : 結核菌、マイクロ RNA

研究成果 :

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 bone 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*.

MicroRNA-155 knockout mice are susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* infection
Tuberculosis (Edinb) 95(3):246-50.2015

課題番号 : 27指1102
研究課題名 : 結核菌の新規病原因子および宿主防御因子の機能解析
主任研究者名 : 切替照雄
分担研究者名 : 祝 弘樹

キーワード : 結核菌、オートファジー

研究成果 :

Mycobacterium tuberculosis interacts with the host defense system(s) for their survival in macrophages. After phagocytosed by macrophages, *M. tuberculosis* escapes from autophagosomes and translocates to cytosol using an ESX-1 secretion system within 24-48 hours post infection. However, it has been not fully understood the inhibiting mechanisms of autophagy by *M. tuberculosis*. Here we show that *M. tuberculosis* inhibits autophagy via mycobacterial PE_PGRS62 protein after translocated to cytosol. To investigate function of PE_PGRS62, we constructed a series of mutant strains with virulent *M. tuberculosis* Erdman; ErdmanDPE_PGRS62, ErdmanDPE_PGRS62/PE_PGRS62-1-504 (Full length), ErdmanDPE_PGRS62/PE_PGRS62-1-350 and ErdmanDESX-1, DPE_PGRS62/PE_PGRS62-1-350. To monitor autophagosome formation, we generated the J774 stably expressing GFP-LC3 (J774/GFP-LC3) and infected with *M. tuberculosis* Erdman strains. After 72 h post infection, ErdmanDPE_PGRS62/PE_PGRS62-1-350 induced significant LC3-puncta formation in J774/GFP-LC3 compared to other strains. ATG5 plays essential role for localization of LC3 to autophagosomes. We observed induction of LC3-puncta formation by ErdmanDPE_PGRS62/PE_PGRS62-1-350 was significantly reduced in ATG5 knocked-down J774/GFP-LC3. These results suggest that *M. tuberculosis* inhibits autophagy by interfering function of ATG5 with PE_PGRS62 C-terminal domain in cytosol of macrophages.

A mycobacterial virulence protein, PE_PGRS62, inhibits autophagy in macrophages (投稿準備中)

課題番号 : 27指1102

研究課題名 : 高度アミノグリコシド耐性緑膿菌・アシネトバクターに対する新規抗菌薬の開発研究

主任研究者名 : 切替照雄

分担研究者名 : 多田達哉

キーワード : カルバペネム耐性、緑膿菌、カルバペネマーゼ遺伝子 bla IMP

研究成果 : カルバペネム耐性の緑膿菌 NCGM1984 株が、2012 年に日本で入院していた患者から分離された。免疫クロマトグラフィー分析法は、この分離株は IMP 型メタロ-β-ラクタマーゼ陽性であることを示した。全ゲノム配列の解読により、NCGM1984 は染色体の異なる領域に別個に blaIMP-34 が存在しており、ゲノムに合計 2 コピーの耐性遺伝子を有していることが明らかになった。各々の blaIMP-34 は、クラス 1 インテグロン (tnpA (ISPa7) -intI1-qacG-blaIMP-34-aac (6') -Ib-qacEdelta1-sul1-orf5-tniBdelta-tniA) で同じ構造であった。分離株は、MLST 疫学解析により ST235 に属し、国際的にハイリスクなクローン株であった。IMP-34 は、IMP-1 の Glu126Gly 変異体で、β-ラクタマーゼに安定なモノバクタム系抗生剤アズトレオナム以外、テストされるすべての β-ラクタマーゼを加水分解した。その触媒活性は IMP-1 と類似していた。緑膿菌の染色体の上に、2 コピーの blaIMP-34 が存在している臨床分離株を初めて報告する。

(PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0149385 April 7, 2016)

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 27指1102

研究課題名： 世界規模で新興している多剤耐性病原細菌の耐性化の分子基盤解析と新規抗菌薬の開発

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
Development and evaluation of immunochromatography to detect gram-negative bacteria producing ArmA 16S rRNA methylase responsible for aminoglycoside resistance.	9) Tada T, Nhung PH, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Phuong DM, Anh NQ, Ohmagari N, Kirikae T	J Microbiol Methods	118: 159-163	2015
Molecular epidemiology of multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> isolates in a university hospital in Nepal reveals the emergence of a novel epidemic clonal lineage.	10) Shrestha S, Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Ohara H, Shimada K, Satou K, Teruya K, Nakano K, Shiroma A, Sherchand JB, Rijal BP, Hirano T, Kirikae T*, Pokhrel BM*corresponding author.,	Int J Antimicrob Agents	46(5): 526-531	2015
A novel 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase, AAC(6')-Ial, from a clinical isolate of <i>Serratia marcescens</i> .	11) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Dahal RK, Mishra SK, Ohara H, Kirikae T*, Pokhrel BM	Microb Drug Resist	59(9): 5847-5850	2015

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Dissemination of CC2 multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> strains in Vietnam.	225) 多田達也, 秋山徹, 切替照雄	第89回日本細菌学会総会	大阪不	2016年3月
日本の医療施設で分離される IMP-type メタロ-β-ラクタマーゼ産生多剤耐性緑膿菌株	221) 多田達哉, 秋山 徹, 島田佳世, 霜島正浩, 切替照雄	第88回日本細菌学会総会	岐阜県	2015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
該当なし				

※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。