

課題番号 : 27指1102

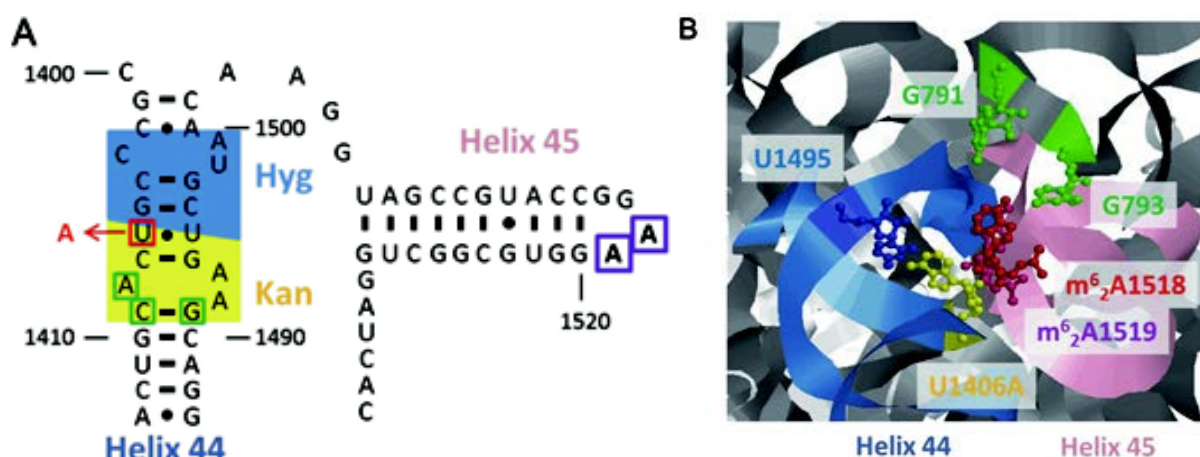
研究課題名 : 世界規模で新興している多剤耐性病原細菌の耐性化の分子基盤と新規抗菌薬の開発

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 : アミノグルコシド、結核菌、リボソーム、ペルオキシレドキシシン1、マイクロ RNA-155

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アミノグルコシド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。

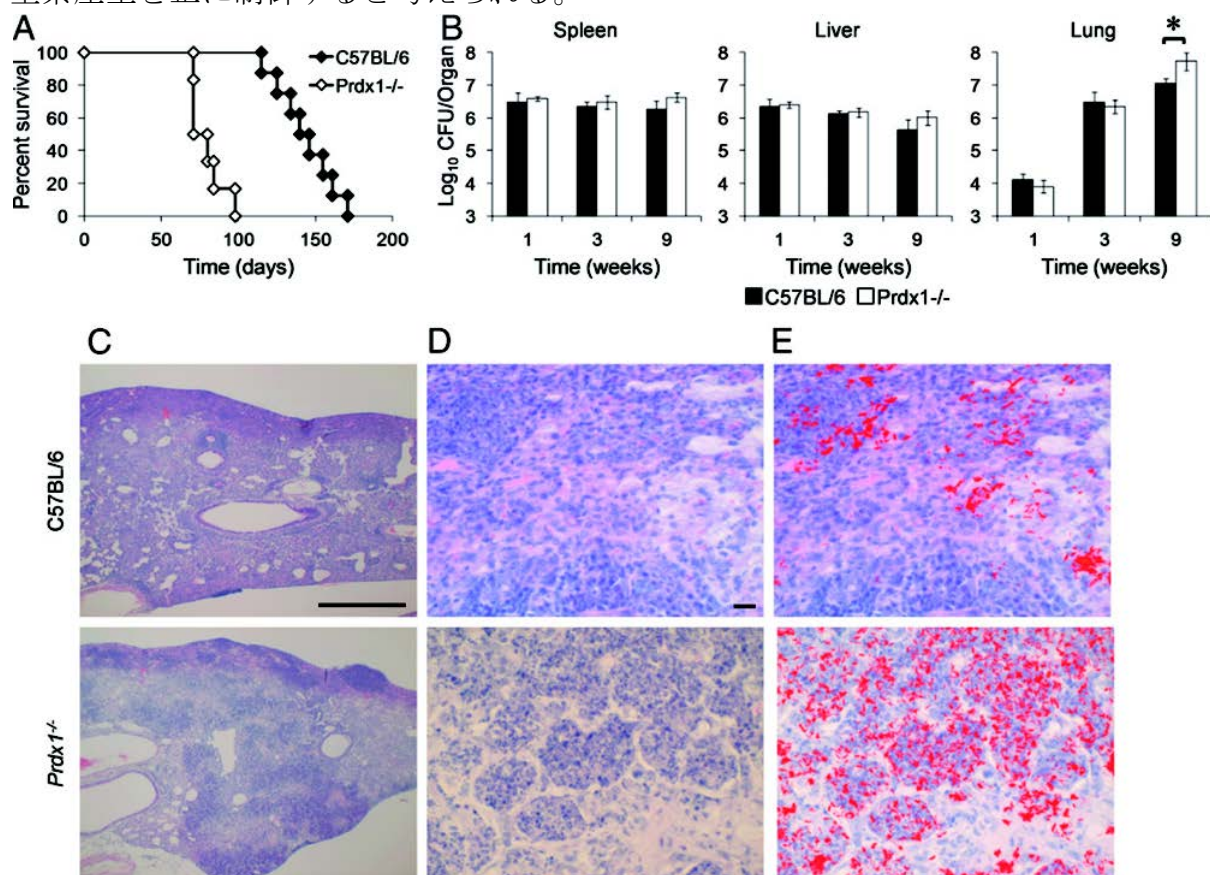


Infect Immun. 2016 Jul 21;84(8):2264-73.

リボソーム変異結核菌が弱毒化するメカニズムを解析した。

ペルオキシレドキシシン1は過酸化水素とペルオキシナイトナライトを解毒する抗酸化物質である。野生型マウスと比較して、ペルオキシレドキシシン1欠損マウスは結核菌に対する感受性が上昇しており、結核感染後の肺において IFN- $\gamma$  レベルと IFN- $\gamma$  産

生 CD4 陽性 T 細胞の割合が低下していた。IL-12 産生と c-Rel 誘導と p38 MAPK 活性化レベルは野生型よりもペルオキシレドキシシン 1 欠損マウスの骨髄由来マクロファージで低下していた。IFN- $\gamma$  活性化ペルオキシレドキシシン 1 欠損マウス骨髄由来マクロファージは結核菌を効率よく殺傷できなかった。結核菌感染後では、野生型よりもペルオキシレドキシシン 1 欠損マウスの骨髄由来マクロファージにおいて、1 酸化窒素産生は低く、アルギナーゼ 1 発現は高かった。アルギナーゼ阻害剤である N-ヒドロキシノルアルギニン、結核菌感染後のペルオキシレドキシシン 1 欠損マウスの IFN- $\gamma$  活性化骨髄由来マクロファージの 1 酸化窒素産生と抗菌活性を回復させた。以上の結果は、ペルオキシレドキシシン 1 が結核菌に対する宿主防御に寄与することを示唆する。ペルオキシレドキシシン 1 は c-Rel を誘導し、p38 MAPK を活性化することで IL-12 産生を正に制御し、結核感染マクロファージにおいて Arg1 発現を抑制することで 1 酸化窒素産生を正に制御すると考えられる。

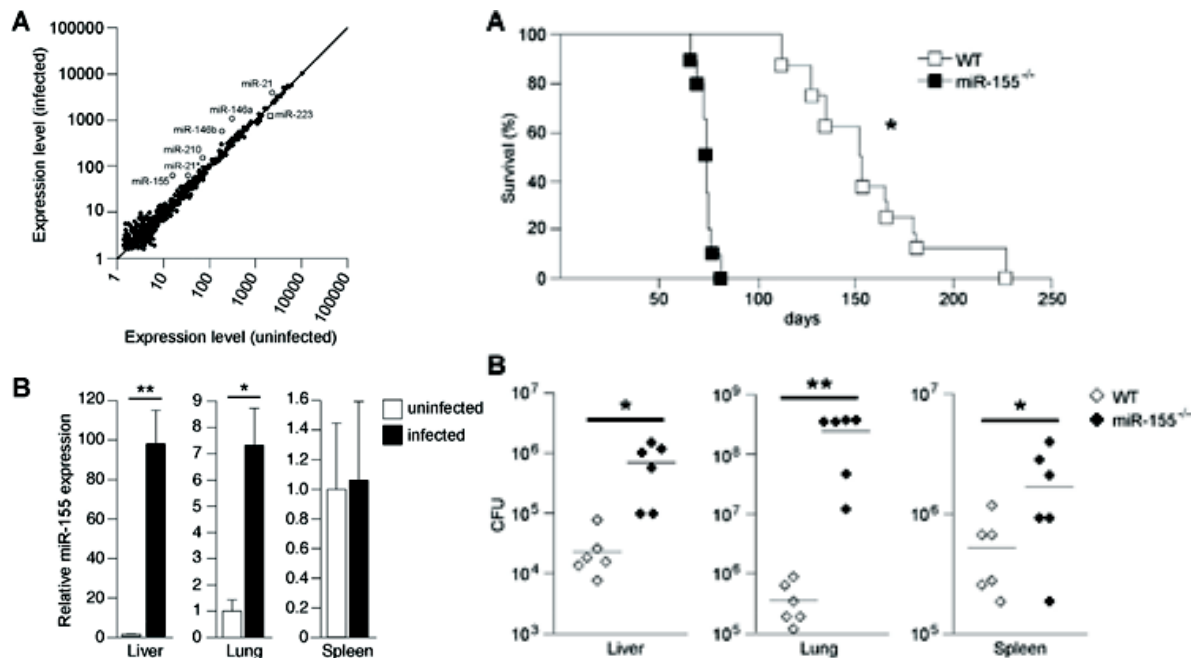


J Immunol. 2016 Oct 15;197(8):3233-3244.

宿主ペルオキシレドキシシン-1 が結核免疫に必須であること、またそのメカニズムを解析した。

**MicroRNA-155** ノックアウトマウスは、結核菌感染 マイクロ RNA (miRNA) は、翻訳を抑制する短く保存された非コード RNA 分子であり、続いて細胞分化、発達、免疫およびアポトーシスに参与する分子をコードする miRNA 標的 mRNA の崩壊である。C57BL/6 マウスの骨髄由来マクロファージが結核菌 Erdman 株に感染した場合、マイクロ RNA-155 (miR-155) を含む少なくとも 6 つの miRNA が増加した。Erdman 株を静脈注射した C57BL/6 マウスは、肝臓および肺における miR-155 の

増加を示した。感染後、miR-155 欠損 C57BL/6 マウスは著しく早く死亡し、肺では野生型マウスよりも有意に高い数の生菌数 (CFU) を有していた。さらに、Erdman 感染 miR-155 ノックアウト (miR-155<sup>-/-</sup>) の肺には、野生型マウスよりも少数の CD4<sup>+</sup> T 細胞、より多くの単球および好中球が存在した。これらの知見は、miR-155 が結核菌に対する免疫応答において重要な役割を果たすことを示した。



Tuberculosis (Edinb). 2015 May;95(3):246-50.

宿主マイクロ RNA-155 が結核免疫に必須であることを報告した。

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の一環として、細菌側の因子である結核菌のリボソーム RNA (*rrs* 別名 *rrs*, 16s rRNA gene) と宿主側の因子であるペルオキシレドキシシンおよびマイクロ RNA-155 の薬剤耐性や病原性における役割を解析した。

Subject No. : 27S1102

Title : Identification and functional analysis of novel drug resistance factors of multidrug resistant gram negative bacteria based on genome epidemiology

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*

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

*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.

**Infection and Immunity. 2016 Jul 21;84(8):2264-73.**

Researchers には、分担研究者を記載する。

## **Peroxiredoxin 1 contributes to host defenses against *Mycobacterium tuberculosis***

Peroxiredoxin 1 (PRDX1) is an antioxidant that detoxifies hydrogen peroxide and peroxinitrite. Compared with wild-type (WT) mice, Prdx1-deficient (Prdx1<sup>-/-</sup>) mice showed increased susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and lower levels of interferon (IFN)- $\gamma$  and IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> 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<sup>-/-</sup> than WT bone marrow-derived macrophages (BMDMs). IFN- $\gamma$ -activated Prdx1<sup>-/-</sup> 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- $\gamma$ -activated Prdx1<sup>-/-</sup> than WT BMDMs after Mtb infection. An arginase inhibitor, N $\omega$ -hydroxy-nor-arginine, restored antimicrobial activity and NO production in IFN- $\gamma$ -activated Prdx1<sup>-/-</sup> 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.

**Journal of Immunology 2016 Oct 15; 197(8):3233-3244.**

## **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 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<sup>+</sup> T cells, but higher numbers of monocytes and neutrophils, were present in the lungs of Erdman-infected miR-155 knockout (miR-155<sup>-/-</sup>) than of wild-type mice. These findings indicated that miR-155 plays a critical role in immune responses to *M. tuberculosis*.

**Tuberculosis (Edinb) 95(3):246-50.2015**

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

# 期待される研究成果

アミノグリコシド高度耐性菌に起因する感染症治療が可能となる新規抗菌薬を開発

世界各国で新興しているアミノグリコシド高度耐性菌に加えカルバペネム耐性菌や一部の地域で新興しているコリスチン及びチゲサイクリン耐性菌のゲノム疫学研究により、新規耐性遺伝子の同定、その薬剤耐性メカニズムが解明

超多剤耐性結核菌(XDR-TB)に対する新規抗菌薬リード化合物を同定

結核菌病原因子としてPE\_PGRS62と16S rRNA(rrs)が、結核の宿主防御因子としてPrdx1、microRNA155、Hornerinを同定



# 発表論文

**Iwai H, Funatogawa K**, Matsumura K, Kato-Miyazawa M, Kirikae F, Kiga K, Sasakawa C, **Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T**.

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

Tuberculosis (Edinb). 2015 May;95(3):246-50.

宿主マイクロRNA-155が結核免疫に必須であることを報告した。

Watanabe S, Matsumura K, **Iwai H, Funatogawa K**, Haishima Y, Fukui C, Okumura K, Kato-Miyazawa M, Hashimoto M, Teramoto K, Kirikae F, **Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T**.

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

Infect Immun. 2016 Jul 21;84(8):2264-73.

リボソーム変異結核菌が弱毒化するメカニズムを解析した。

Matsumura K, **Iwai H**, Kato-Miyazawa M, Kirikae F, Zhao J, Yanagawa T, Ishii T, **Miyoshi-Akiyama T, Funatogawa K, Kirikae T**.

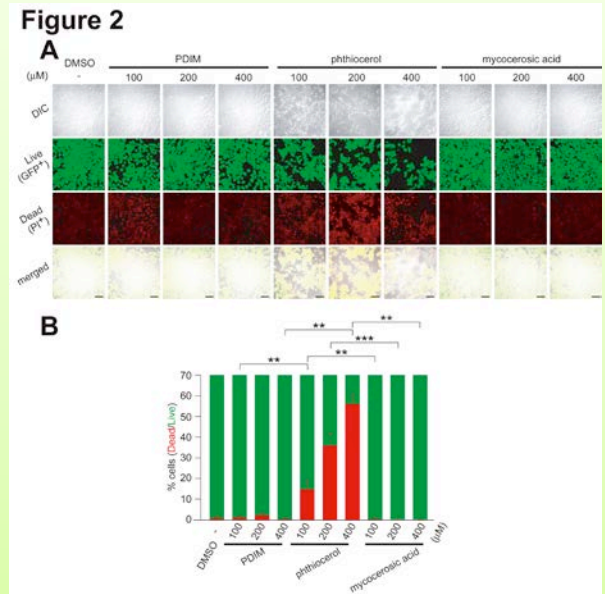
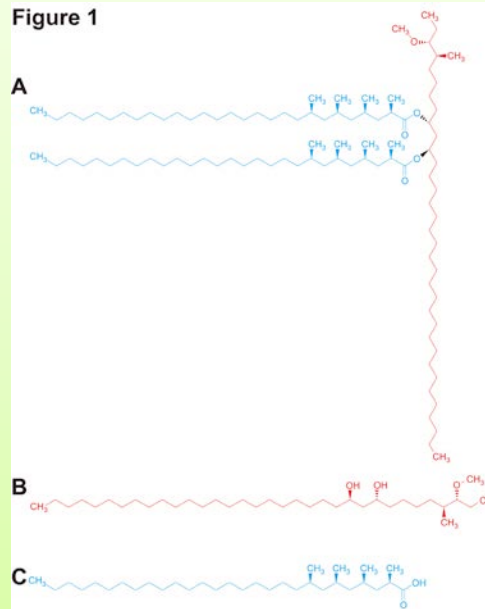
Peroxiredoxin 1 Contributes to Host Defenses against *Mycobacterium tuberculosis*.

J Immunol. 2016 Oct 15;197(8):3233-3244.

宿主ペルオキシレドキシン-1が結核免疫に必須であること、またそのメカニズムを解析した。

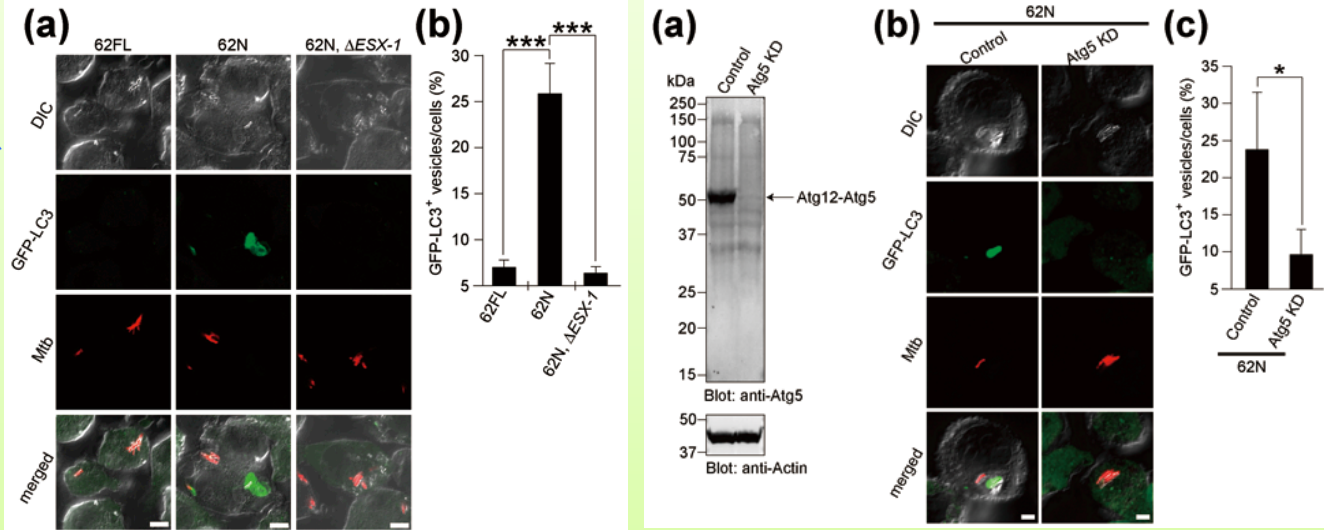
# 投稿予定の論文

結核菌のワックス／脂質であり、病原因子と考えられていた PDIM (phthiocerol mycocerosate)ではなくその前駆体phthiocerolが細胞死を誘導することを発見した。(論文投稿準備中)



# 再投稿予定の論文

結核菌の新たな病原因子 PE\_PGRS62を同定した。PE\_PGRS62がオートファジーを抑制することも明らかにしつつある。専門誌 (Cellular Microbiology; Impact Factor : 4.554) に再投稿するため、実験中。



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 ヶ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 種類の植物エキスをライブラリから、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。これらの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っている。

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 :

結核菌は1個のrRNAオペロンを含み、当該部分は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、結核菌のカナマイシン耐性臨床分離株において、16S rRNAのカナマイシン結合部位に4個のみの変異が報告されている。筆者等は、同領域における他の変異が結核菌の生存力と病原性を大きく低下させると仮定した。今回、rRNAのU1406Aに変異を持った結核菌を *in vitro* で分離した。同菌はカナマイシンに耐性化していたが、病原性が大きく低下していた。同変異体は代謝酵素、ミコール酸合成酵素、抗原85複合体とESAT-6のような病原因子を含む結核菌蛋白質の約20%(361個)の発現が低下していた。U1406A変異により、リボソームのU1406A変異部位の近傍に結合するKsgA(Rv1010;16S rRNA アデニンジメチルトランスフェラーゼ)などの三つの蛋白質の発現誘導されていた。これらの蛋白質はリボソームの成熟と翻訳開始プロセスに関与していた。変異体は17S rRNA(16S rRNAの前駆体)の増加と、70Sリボソームに対する30Sサブユニットの比率の減少を示した。これらのことはU1406A変異が、上述のプロセスに影響することで結核の病原性を低下させることを示唆する。以上の知見を、以下の査読付き論文に発表した。

A Mutation in the 16S rRNA Decoding Region Attenuates the Virulence of Mycobacterium tuberculosis. Watanabe S, Matsumura K, Iwai H, Funatogawa K, Haishima Y, Fukui C, Okumura K, Kato-Miyazawa M, Hashimoto M, Teramoto K, Kirikae F, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. Infect Immun. 2016 Jul 21;84(8):2264-73. doi: 10.1128/IAI.00417-16. Print 2016 Aug. PMID: 27245411

ペルオキシレドキシシン1は過酸化水素とペルオキシナイトナライトを解毒する抗酸化物質である。野生型マウスと比較して、ペルオキシレドキシシン1欠損マウスは結核菌に対する感受性が上昇し

ており、結核感染後の肺において IFN- $\gamma$  レベルと IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性 T 細胞の割合が低下していた。IL-12 産生と c-Rel 誘導と p38 MAPK 活性化レベルは野生型よりもペルオキシレドキシシン 1 欠損マウスの骨髄由来マクロファージで低下していた。IFN- $\gamma$  活性化ペルオキシレドキシシン 1 欠損マウス骨髄由来マクロファージは結核菌を効率よく殺傷できなかった。結核菌感染後では、野生型よりもペルオキシレドキシシン 1 欠損マウスの骨髄由来マクロファージにおいて、1 酸化窒素産生は低く、アルギナーゼ 1 発現は高かった。アルギナーゼ阻害剤である N-ヒドロキシ-ノル-アルギニン、結核菌感染後のペルオキシレドキシシン 1 欠損マウスの IFN- $\gamma$  活性化骨髄由来マクロファージの 1 酸化窒素産生と抗菌活性を回復させた。以上の結果は、ペルオキシレドキシシン 1 が結核菌に対する宿主防御に寄与することを示唆する。ペルオキシレドキシシン 1 は c-Rel を誘導し、p38 MAPK を活性化することで IL-12 産生を正に制御し、結核感染マクロファージにおいて Arg1 発現を抑制することで 1 酸化窒素産生を正に制御すると考えられる。以上の結果、査読付きの以下の論文にて発表した。

Peroxiredoxin 1 Contributes to Host Defenses against Mycobacterium tuberculosis.

Matsumura K, Iwai H, Kato-Miyazawa M, Kirikae F, Zhao J, Yanagawa T, Ishii T, Miyoshi-Akiyama T, Funatogawa K, Kirikae T.

J Immunol. 2016 Oct 15;197(8):3233-3244. Epub 2016 Sep 7.

PMID: 27605010

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。

結核感染防御において重要であるとされる遺伝子は、サイトカイン、サイトカイン受容体、Toll-like受容体および貪食細胞のNO産生を制御するiNOSなど、限られた遺伝子しか同定されていない。従って、結核感染防御に関与する宿主防御遺伝子を同定し、その機能を解明することは、結核対策において極めて重要である。我々は、結核菌の病原因子としてPE\_PGRS62を同定し、PE\_PGRS62と宿主タンパク質の相互作用スクリーニングの結果、宿主因子としてPrdx1を同定した。Prdx1はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とONOO-を基質とする抗酸化酵素であるが、結核菌防御との関連性は明らかとなっていない。さらに、新規宿主防御候補因子を同定している。本研究では、ゲノム編集技術を用いて、結核菌防御におけるこれらの遺伝子の機能を解明し、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/Cas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。新規宿主防御候補遺伝子上に2つの標的配列を設定し、これを認識するsgRNAを設計した。この2つのsgRNAをCas9をコードするmRNAとともに、149個のマウス前核期受精卵に導入した。この受精卵を二細胞期胚まで培養し、偽妊娠マウスへ移植することにより13匹の産仔を得た(産仔率:19.7%)。生まれた13匹の産仔からDNAを抽出し、ダイレクトシーケンスを用いてゲノム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。この遺伝子変異導入個体を用いて兄妹交配を繰り返すことにより系統化を行った。また、マウスの食道抽出液を用いて、ホモ接合体では新規宿主防御候補因子タンパク質の発現が消失していることを確認した。

## 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

C57BL/6 と BALB/c の系統間では、結核菌に対して著しい感受性の違いがあることがわかっている。このことに着目し、C57BL/6 と BALB/c マウスの交雑群を用いた連鎖解析により、結核菌抵抗性遺伝子座をマウス第 1 染色体上に同定した。さらに、この C57BL/6 の結核菌抵抗性遺伝子座を BALB/c マウスに導入したコンジェニックマウスを作製した。コンジェニックマウスの骨髄由来マクロファージに結核菌 Erdman 株を MOI 10:1 で感染させ 1 ヶ月間培養後、マクロファージ内の結核菌生菌数を調べた。その結果、コンジェニックマウスとコントロールの BALB/c では、結核菌の生菌数に差がないことがわかった。次に、C57BL/6 および BALB/c の骨髄由来マクロファージを用いた実験により LPS 刺激に対するマクロファージの NO 産生能を調べた。その結果、NO 産生能においては両系統間で差がないことが明らかとなった。その一方で、BALB/c 骨髄由来マクロファージでは LPS 刺激に対して、結核菌感染防御に重要とされる細胞性免疫の誘導に重要な特定のサイトカインの発現量が低いことが明らかとなった。従って、このサイトカイン発現量の差が結核菌感受性に影響を与えることが示唆された。これは C57BL/6 が Th1 型の免疫応答を生じやすく、BALB/c マウスが Th2 型の免疫応答を生じやすいと言う既存の報告と一致する。次に、このサイトカインの発現量の低下が何に起因するかを調べるために、このサイトカイン遺伝子の cDNA ならびにプロモーター配列の解析を行った。その結果、C57BL/6 と BALB/c の両系統間では cDNA ならびにプロモーター配列には差がないことが明らかとなった。さらに、C57BL/6 の結核菌抵抗性遺伝子座を BALB/c マウスへ導入したコンジェニックマウスの骨髄由来マクロファージにおいては、このサイトカインの発現量がほぼ正常であったことから、マウス第 1 染色体上に存在する結核菌抵抗性遺伝子座にはこのサイトカインの発現を調節する遺伝子が存在することが示唆された。この結核菌抵抗性遺伝子座には、結核菌感染に関与することが報告されている *Ipr1* 遺伝子および、クラス A スカベンジャー受容体遺伝子が存在する。*Ipr1* は、C3H マウスの亜系間での結核菌ならびにリステリア菌などの細胞内寄生菌に対する感受性に寄与することが報告されている。C57BL/6 ならびに BALB/c マウスにおいては、BALB/c マウスで *Ipr1* プロモーターに 60bp の欠損が見られ、C57BL/6 と比較して *Ipr1* の発現が低い傾向はあるものの有意な差は見られず、これが C57BL/6 と BALB/c マウスの結核菌感受性を規定しているとは考えにくい。一方、クラス A スカベンジャー受容体遺伝子では、ヒトにおいてこの遺伝子の多型が結核菌の食作用や重症度、感受性に関与することが報告されている。そこで、C57BL/6 と BALB/c の系統間で、このクラス A スカベンジャー受容体の発現量を解析したところ、サイトカインと同様に BALB/c マウスではこの受容体の発現量が著しく低下していた。クラス A スカベンジャー受容体は、TLRs と相互作用することで細胞内のシグナル伝達を調節することが報告されている。このことから、クラス A スカベンジャー受容体が結核感染に関与する TLR2 や TLR4 などと相互作用することにより、サイトカインの産生を調節し、細胞性免疫と液性免疫のバランスを保っていることが示唆された。



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 :

最新の WHO の結核レポートによると結核菌は年間1040万人の活動性結核患者を、年間180万人の死者を引き起こしているため、結核の病原性因子の役割を明らかにすることは、より良い治療方法の開発に必須である。結核菌の全ゲノム解読により、ゲノムの約10%を構成するファミリー遺伝子が明らかになった。これらの PE タンパク質は、グリシンに富む C 末端ドメインを持つ PE\_PGRS 持つものがある。

PE\_PGRS62 は結核菌が有しているが、これまでに抗酸菌をモデル生物に病原因子としての機能が、国外の他の研究で分かってきた。例えば、魚類結核の起原菌である *Mycobacterium marinum* は PE\_PGRS62 のオーソログとして *MMAR\_2458* を有しており、これを破壊した *M. marinum* *MMAR\_2458::Tn* はマクロファージ内で増殖できなかった。また、*MMAR\_2458::Tn* はヒョウガエルの肉芽腫における潜伏・持続感染性が低下していた。したがって、結核菌感染における PE\_PGRS62 が病原因子であるかどうかが明らかになっておらず、その機能も不明である。

オートファジーは主要な細胞内分解システムであり、細胞質内の構成成分を輸送し、リソソームで分解する。30以上のオートファジー関連遺伝子 (*Atg*) が同定され、うち18の *Atg* が栄養飢餓後のオートファジー形成に必須であった。これらの必須遺伝子には、*Atg5*、*Atg8/microtubule-associated protein 1 light chain (LC3)* 及び *Atg12* をエンコードする遺伝子が含まれている。LC3は、細胞質型の LC3-I と膜型の LC3-II がある。LC3-I に脂質 (ホスファチジルイノシトール) が共有結合すると、LC3-II になる。また、*Atg12* は *Atg5* と共有結合する。これらの共有結合による反応を介して、オートファジーの膜が形成される。LC3-II はオートファゴソーム膜の特異的なマーカーである。

この研究では、結核菌の PE\_PGRS62 が *Atg5* に結合し、オートファジーを抑制することを明らかにする点が特に斬新、革新的である。

PE\_PGRS62 が病原因子であることを明らかにするために、PE\_PGRS62 遺伝子ノックアウト結核菌を作製し、弱毒化するかどうか調べる。方法はマウスへの感染実験の他、培養細胞への感染を行った。

PE\_PGRS62 を宿主細胞内に発現させたところ、ベシクル形成を誘導した。また、変異体 PE\_PGRS62 が巨大なベシクル形成を誘導したことから、このベシクルの性質を明らかにするために、オートファジーマーカータンパク質 LC3 及びリソソームマーカータンパク質 CD63 (別名 Lamp3) との共局在性を調べた。PE\_PGRS62 が LC3-I から LC3-II への変換を抑制するかどうか調べた。

PE\_PGRS62 がオートファジーを抑制することが分かったので、そのメカニズムを明らかにするためにオートファジー進行に必須な分子 Atg5 との結合性を調べた。

PE\_PGRS62 が実際に結核菌の表層に存在し、宿主因子と相互作用できるかどうかを調べた。

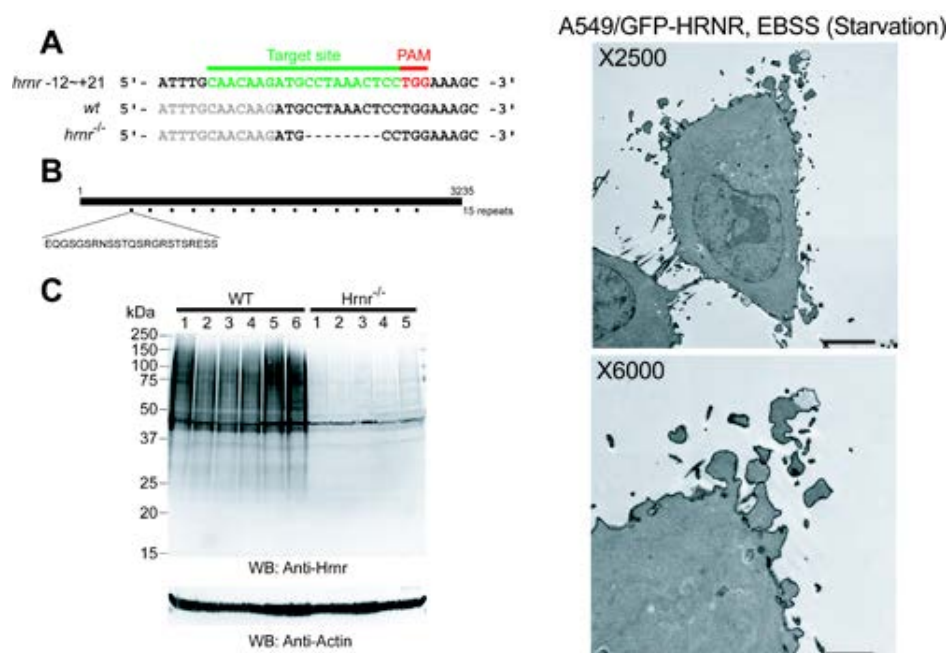
GFP-LC3 が発現した J774 細胞内で PE\_PGRS62 を発現した結核菌がオートファジーを抑制するかどうか調べた。

GFP-LC3 が発現した J774 細胞内で、PE\_PGRS62 変異体を発現した結核菌が誘導するオートファジーが Atg5 依存的かどうか調べた。

PE\_PGRS62 変異体を発現した結核菌の宿主細胞内生存率を調べた。PE\_PGRS62 がどのようなメカニズムでオートファジーを抑制するか説明した。

審査後の論文改訂するために、半年～1年以内で実験・論文修正を実施し、論文掲載により結核菌感染におけるオートファジー抑制機構の分子機構を解明する。結核菌タンパク質 PE\_PGRS62 が病原因子であることを明らかにするために、結核菌 PE\_PGRS62 遺伝子ノックアウト株を作製し、マウス結核モデル実験により弱毒化しているかどうか調べた。この結核菌病原性タンパク質が宿主のオートファジー関連分子 Atg5 と相互作用することにより、オートファジーを抑制し、結核菌はマクロファージ内で生存していた。より信憑性が高い実験データを要求されており、マクロファージに結核菌を感染させた場合のオートファジーフラックス（進行）についての追加実験を行う。

続編研究として、結核菌 PE\_PGRS62 に結合する宿主タンパク質 Hornerin を同定した。Hornerin はアトピー性皮膚炎の病態形成に関与しているが、細菌感染およびオートファジーにおける機能的がわかっていない。結核菌感染や宿主オートファジーにおける Hornerin の機能を明らかにするために、CRISPR-Cas9 システムを用いて迅速に Hornerin ノックアウトマウスを作製した。Hornerin は分解性のタンパク質であり、15 回リピート配列を抗原に抗体でマウスの食道に発現している Hornerin を検出し、Hornerin ノックアウトマウスの完成を確認した。



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)

A Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Harboring Two Copies of  
blaIMP-34 Encoding a Metallo-β-Lactamase.

A carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa*, NCGM1984, was isolated  
in 2012 from a hospitalized patient in Japan. Immunochromatographic assay showed  
that the isolate was positive for IMP-type metallo-β-lactamase. Complete genome

sequencing revealed that NCGM1984 harbored two copies of blaIMP-34, located at different sites on the chromosome. Each blaIMP-34 was present in the same structures of the class 1 integrons, tnpA(ISPa7)-intI1-qacG-blaIMP-34-aac(6')-Ib-qacEdelta1-sul1-orf5-tniBdelta-tniA. The isolate belonged to multilocus sequence typing ST235, one of the international high-risk clones. IMP-34, with an amino acid substitution (Glu126Gly) compared with IMP-1, hydrolyzed all  $\beta$ -lactamases tested except aztreonam, and its catalytic activities were similar to IMP-1. This is the first report of a clinical isolate of an IMP-34-producing *P. aeruginosa* harboring two copies of blaIMP-34 on its chromosome.

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 :

マウスへの結核菌感染の主要な経路は、1) エアロゾルによる肺感染、2) 尾静脈注射による感染、である。我々の研究グループでは(2)について、実験系を構築し、宿主マイクロ RNA155 ノックアウトマウスを研究対象に解析を実施した。

MicroRNA-155 ノックアウトマウスは、結核菌感染 マイクロ RNA(miRNA)は、翻訳を抑制する短く保存された非コード RNA 分子であり、続いて細胞分化、発達、免疫およびアポトーシスに關与する分子をコードする miRNA 標的 mRNA の崩壊である。C57BL/6 マウスの骨髄由来マクロファージが結核菌 Erdman 株に感染した場合、マイクロ RNA-155 (miR-155) を含む少なくとも 6 つの miRNA が増加した。Erdman 株を静脈注射した C57BL/6 マウスは、肝臓および肺における miR-155 の増加を示した。感染後、miR-155 欠損 C57BL/6 マウスは著しく早く死亡し、肺では野生型マウスよりも有意に高い数の生菌数 (CFU) を有していた。さらに、Erdman 感染 miR-155 ノックアウト (miR-155<sup>-/-</sup>) の肺には、野生型マウスよりも少数の CD4<sup>+</sup> T 細胞、より多くの単球および好中球が存在した。これらの知見は、miR-155 が結核菌に対する免疫応答において重要な役割を果たすことを示した。

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<sup>+</sup> T cells, but higher numbers of monocytes and neutrophils, were present in the lungs of Erdman-infected miR-155 knockout (miR-155<sup>-/-</sup>) than of wild-type mice. These findings indicated that miR-155 plays a critical role in immune responses to *M. tuberculosis*.

Tuberculosis (Edinb) 95(3):246-50.2015

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
Dissemination of Carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> clinical isolates with various combinations of Carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA Methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam.	Tada T, Tsuchiya M, Shimada K, Nga TTT, Thu LTA, Phu TT, Ohmagari N, Kirikae T.	BMC Infect Dis.	17(1):467.	2017
Genetic diversity of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolates from Tochigi prefecture, a local region of Japan.	Mizukoshi F, Miyoshi-Akiyama T, Iwai H, Suzuki T, Kiritani R, Kirikae T, Funatogawa K.	BMC Infect Dis.	7(1):365.	2017
PER-8, a Novel Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase PER Variant, from an <i>Acinetobacter baumannii</i> Clinical Isolate in Nepal.	Tada T, Shrestha S, Shimada K, Ohara H, Sherchand JB, Pokhrel BM, Kirikae T.	Antimicrob Agents Chemother.	61(3). pii: e02300-16.	2017
High rate of multidrug-resistant organism colonization among patients hospitalized overseas highlights the need for preemptive infection control.	Hayakawa K, Mezaki K, Sugiki Y, Nagamatsu M, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, Kutsuna S, Takeshita N, Yamamoto K, Katanami Y, Ohmagari N.	Am J Infect Control.	44(11):e257-e259.	2016
Comparative Genome Analysis of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing <i>Escherichia coli</i> Sequence Type 131 Strains from Nepal and Japan.	Miyoshi-Akiyama T, Sherchan JB, Doi Y, Nagamatsu M, Sherchand JB, Tandukar S, Ohmagari N, Kirikae T, Ohara H, Hayakawa K.	mSphere.	1(5). pii: e00289-16.	2016

研究発表及び特許取得報告について

<p>Multidrug-Resistant Sequence Type 235 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Clinical Isolates Producing IMP-26 with Increased Carbapenem-Hydrolyzing Activities in Vietnam.</p>	<p>Tada T, Nhung PH, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Tsuchiya M, Phuong DM, Anh NQ, Ohmagari N, Kirikae T.</p>	<p>Antimicrob Agents Chemother.</p>	<p>60(11):6853-6858.</p>	<p>2016</p>
<p>Peroxiredoxin 1 Contributes to Host Defenses against <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.</p>	<p>Matsumura K, Iwai H, Kato-Miyazawa M, Kirikae F, Zhao J, Yanagawa T, Ishii T, Miyoshi-Akiyama T, Funatogawa K, Kirikae T.</p>	<p>J Immunol.</p>	<p>197(8):3233-3244.</p>	<p>2016</p>
<p>A mutation in the decoding region of 16S rRNA attenuates the virulence of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.</p>	<p>Watanabe S, Matsumura K, Iwai H, Funatogawa K, Haishima Y, Fukui C, Okumura K, Kato-Miyazawa M, Hashimoto M, Teramoto K, Kirikae F, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T.</p>	<p>Infect Immun.</p>	<p>Volume 84 Number 8</p>	<p>2016</p>
<p>A Carbapenem-Resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Isolate Harboring Two Copies of blaIMP-34 Encoding a Metallo-<math>\beta</math>-Lactamase.</p>	<p>Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shiroma A, Nakano K, Teruya K, Satou K, Hirano T, Shimojima M, Kirikae T.</p>	<p>PLoS One</p>	<p>11(4):e0149385</p>	<p>2016</p>
<p>Phenotypic Characterization of Multidrug-resistant <i>Escherichia Coli</i> with Special Reference to Extended-spectrum-beta-lactamases and Metallo-beta-lactamases in a Tertiary Care Center.</p>	<p>Shrestha B, Shrestha S, Mishra SK, Kattel HP, Tada T, Ohara H, Kirikae T, Rijal BP, Sherchand JB, Pokhrel BM.</p>	<p>JNMA J Nepal Med Assoc.</p>	<p>53(198):89-95.</p>	<p>2015</p>



研究発表及び特許取得報告について

<p>CASTB (the comprehensive analysis server for the Mycobacterium tuberculosis complex): A publicly accessible web server for epidemiological analyses, drug-resistance prediction and phylogenetic comparison of clinical isolates.</p>	<p>Iwai H, Kato-Miyazawa M, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T.</p>	<p>Tuberculosis (Edinb)</p>	<p>95(6):843-4.</p>	<p>2015</p>
<p>Dissemination of clonal complex 2 Acinetobacter baumannii strains co-producing carbapenemases and 16S rRNA methylase ArmA in Vietnam.</p>	<p>Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Nga TT, Thu le TA, Son NT, Ohmagari N, Kirikae T.</p>	<p>BMC Infect Dis.</p>	<p>15;15:433.</p>	<p>2015</p>
<p>Development and evaluation of immunochromatography to detect Gram-negative bacteria producing ArmA 16S rRNA methylase responsible for aminoglycoside resistance.</p>	<p>Oshiro S, Tada T, Kameoka Y, Suzuki K, Ohmagari N, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T.</p>	<p>J Microbiol Methods.</p>	<p>118:159-63.</p>	<p>2015</p>
<p>Molecular epidemiology of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolates in a university hospital in Nepal reveals the emergence of a novel epidemic clonal lineage.</p>	<p>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.</p>	<p>Int J Antimicrob Agents.</p>	<p>46(5):526-31.</p>	<p>2015</p>
<p>IMP-51, a novel IMP-type metallo-<math>\beta</math>-lactamase with increased doripenem- and meropenem-hydrolyzing activities, in a carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa clinical isolate.</p>	<p>Tada T, Nhung PH, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Phuong DM, Anh NQ, Ohmagari N, Kirikae T.</p>	<p>Antimicrob Agents Chemother.</p>	<p>59(11):7090-3.</p>	<p>2015</p>
<p>A Novel 6'-N-Aminoglycoside Acetyltransferase, AAC(6')-Ial, from a Clinical Isolate of Serratia marcescens.</p>	<p>Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Dahal RK, Mishra SK, Ohara H, Kirikae T, Pokhrel BM.</p>	<p>Microb Drug Resist.</p>	<p>22(2):103-8.</p>	<p>2016</p>

研究発表及び特許取得報告について

Identification of a novel NDM variant, NDM-13, from a multidrug-resistant Escherichia coli clinical isolate in Nepal.	Shrestha B, Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Ohara H, Kirikae T, Pokhrel BM.	Antimicrob Agents Chemother.	59(9):5847-50.	2015
Evaluation of the Etest method for detecting colistin susceptibility of multidrug-resistant Gram-negative isolates in Vietnam.	Nhung PH, Miyoshi-Akiyama T, Phuong DM, Shimada K, Anh NQ, Binh NG, Thanh do V, Ohmagari N, Kirikae T.	J Infect Chemother.	21(8):617-9.	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.	20;16:218.	2015
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 (Edinb)	95(3):246-50.	2015
Clinical epidemiology and molecular analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli in Nepal: characteristics of sequence types 131 and 648.	Sherchan JB, Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama T, Ohmagari N, Kirikae T, Nagamatsu M, Tojo M, Ohara H, Sherchand JB, Tandukar S.	Antimicrob Agents Chemother.	59(6):3424-32.	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. e1-8.	2015

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
------	-----	-----	----	----

研究発表及び特許取得報告について

<p>A Mutation in the 16S rRNA Decoding Region Attenuates the Virulence of Mycobacterium tuberculosis</p>	<p>Shinya Watanabe, Kazunori Matsumura, Hiroki Iwai (ポスター発表者), Keiji Funatogawa, Yuji Haishima, Chie Fukui, Kayo Okumura, Masako Kato-Miyazawa, Masahito Hashimoto, Kanae Teramoto, Fumiko Kirikae, Tohru Miyoshi-Akiyama, Teruo Kirikae</p>	<p>Keystone Symposia, New Developments in Our Basic Understanding of Tuberculosis (A5)</p>	<p>Fairmont Hotel Vancouver, Vancouver, Brithish Columbia, Canada</p>	<p>2017年1月</p>
<p>Analysis of PRDX1 which contributes to host defenses against Mycobacterium tuberculosis</p>	<p>松村 和典 (口頭発表者), 祝弘樹, 加藤-宮澤 雅子, 切替富美子, 趙 吉子, 柳川 徹, 石井 哲郎, 船渡川 圭次, 秋山 徹, 切替 照雄</p>	<p>第90回日本細菌学会総会</p>	<p>仙台国際センター展示棟</p>	<p>2017年3月</p>
<p>カナマイシン耐性に寄与する16SリボゾームRNA の解読領域の 変異と結核菌の弱毒化</p>	<p>渡邊 真弥 (口頭発表者), 松村 和典, 祝弘樹, 船渡川 圭次, 加藤 雅子, 切替 富美子, 秋山 徹, 崔 龍洙, 切替 照雄</p>	<p>第90回日本細菌学会総会</p>	<p>仙台国際センター展示棟</p>	<p>2017年3月</p>

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
結核について	祝 弘樹	第8回北里感染症教育フォーラム	北里大学薬学部コンベンションホール	2017年5月20日(土)

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

研究発表及び特許取得報告について

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。