

# 結核菌タンパク質 PE\_PGRS の機能解析

松村 和典<sup>1)</sup>, 祝 弘樹<sup>2)</sup>, 切替 照雄<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>国立国際医療研究センター研究所疾患制御研究部

<sup>2)</sup>同 感染症制御研究部

<sup>3)</sup>順天堂大学大学院医学研究科微生物学, 同 医学部微生物学講座

## Functional analysis of mycobacterial protein PE\_PGRS

Kazunori Matsumura<sup>1)</sup>, Hiroki Iwai<sup>2)</sup>, Teruo Kirikae<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Diseases Control, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine

<sup>2)</sup>Department of Infectious Diseases, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine

<sup>3)</sup>Department of Microbiology, Juntendo University School of Medicine

### Abstract

Tuberculosis (TB) remains an important infectious disease, causing ten million new cases and 1.4 million deaths a year in worldwide. Elucidating pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of TB, will contribute to development of new drugs, vaccines and treatments. Proline-glutamic acid (PE)/proline-proline-glutamic acid (PPE) family accounts for approximately 10% of the coding region of *M. tuberculosis* genome and its functions are largely unknown. PE proteins having polymorphic GC-rich repetitive sequences (PGRS) in carboxyl-terminal are members of PE\_PGRS family. PE\_PGRS62 and PE\_PGRS30 are members of PE\_PGRS family and homologues of MAG24, the virulence factor of *M. marinum*. We are in the process of analyzing the functions of PE\_PGRS62 and PE\_PGRS30, and have results suggesting that PE\_PGRS62 regulates autophagy, whereas PE\_PGRS30 induces cell death.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 59~63, 2020

**Key words** : 結核菌, PE\_PGRS, オートファジー, 細胞死

### はじめに

結核は、世界人口の 1/3 が感染していると推計され、年間約 1,000 万人が新規に罹患し、約 140 万人が亡くなる、今なお重要な感染症である<sup>1)</sup>。近年では、薬剤耐性結核菌の出現や、HIV 感染者の主要な死亡原因が結核であることが問題となっており、新規薬剤やワクチンの開発が急務である<sup>1)</sup>。結核菌の病原因子を同定・解析することは、それらの開発に重要である。結核菌標準株 H37Rv ゲノムでは、プロリン-グルタミン酸 proline-glutamic acid (PE) およびプロリン-プロリン-グルタミン酸 proline-proline-glutamic acid (PPE) ファミリーが、ゲノムコード領域の約 10% を占めている<sup>2)</sup>。PE/PPE タンパク質は、H37Rv で 99 の PE 遺伝子と 69 の PPE 遺伝子を有し、N 末端で保存された PE/PPE ドメインにより特徴づけられる。PE ファミリーは、C 末端に多型 GC

リッチ配列 polymorphic GC-rich repetitive sequences (PGRS) をもつ PE\_PGRS と、特徴のない PE 遺伝子を含む。PPE ファミリーは、主要な多形タンデムリピート major polymorphic tandem repeats (MPTR) をもつ PPE\_MPTR, Gxx-SVPxxW モチーフを持つ PPE\_SVP, PxxPxxW モチーフを持つ PPE\_PPV, および特徴のない PPE 遺伝子に分けることができる。PE/PPE ファミリータンパク質の C 末端は高度に可変的であることから、病原性、抗原多様性、または免疫回避における役割が示唆されている<sup>3)</sup>。

### 1. PE\_PGRS ファミリータンパク質の機能

PE\_PGRS タンパク質の機能として、マクロファージへの接着・侵入の増強、抗生物質などストレスへの耐性の調節、感染マクロファージのサイトカイン産生の制御、感染細胞のアポトーシス制御、樹状細胞活性化の調

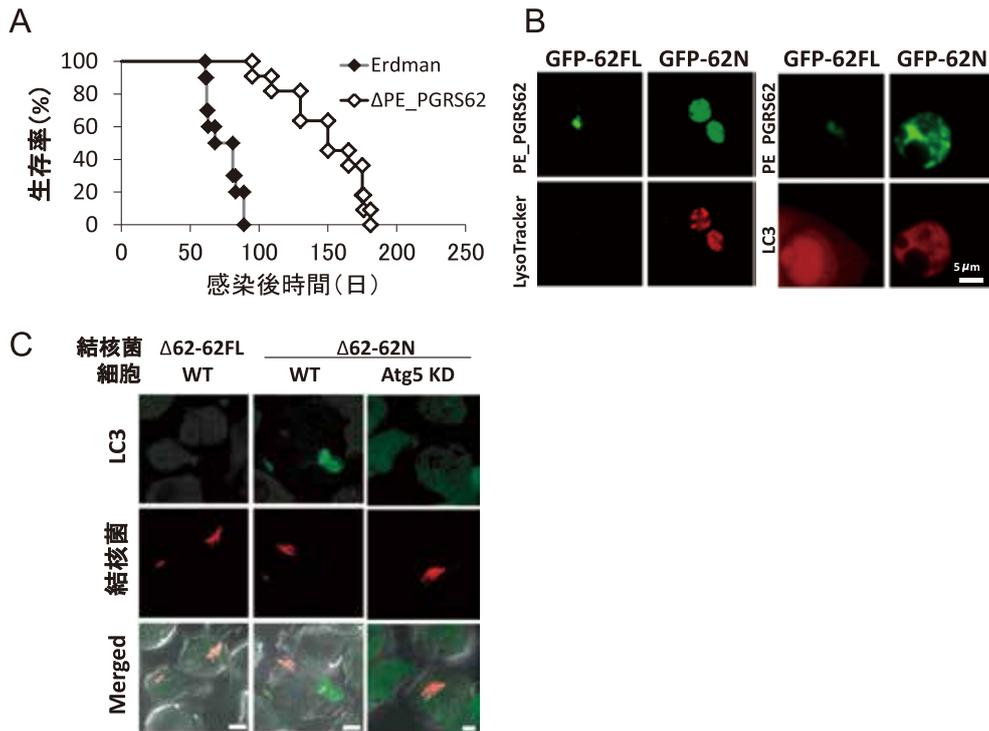


図 1 PE\_PGRS62 の機能解析

A: 結核菌 Erdman 株由来 *PE\_PGRS62* 遺伝子破壊株を BALB/c マウスに尾静脈より感染させた。平均生存日数は、野生株感染群 (◆: n=10) が  $73.9 \pm 11.1$  日, *PE\_PGRS62* 遺伝子破壊株感染群 (◇: n=11) が  $148.7 \pm 28.0$  日であった。B: *PE\_PGRS62* 全長 (1~504aa: 62FL) と, C 末端領域を欠損させた *PE\_PGRS62N* (1~350aa: 62N) の N 末端に GFP を融合し (GFP-62FL, GFP-62N), 哺乳類細胞に発現させ, リソソームおよび LC3 との共局在を観察した。リソソームは, LysoTracker で染色し, LC3 は抗体で検出した。C: 結核菌 *PE\_PGRS62* 遺伝子破壊株に対して, 62FL を発現させた補完株 ( $\Delta 62-62FL$ ) および, 62N を発現させた株 ( $\Delta 62-62N$ ) を, マウス単球様細胞株 J774 (WT) もしくは, J774 の *Atg5* 遺伝子ノックダウン細胞 (*Atg5* KD) に感染させ, LC3 との共局在を観察した。結核菌には蛍光タンパク質 mCherry を発現させた。

節, 感染マウスの臓器内もしくは感染マクロファージ内での生存・増殖の増強などが報告されている。また, 複数の機能を有する *PE\_PGRS* も報告されている。機能を推定するため, 同じマイコバクテリウム属であるが, *PE\_PGRS* 遺伝子がなく, 非病原性の近縁菌 *M. smegmatis* に発現させて種々の検討を行う方法が, よく用いられている。

### 1-1. マクロファージへの接着・侵入の増強

*PE\_PGRS3* を発現する *M. smegmatis* は, アルギニンリッチ C 末端ドメインを介して, マウスマクロファージやヒト上皮細胞への接着とマウス脾臓における菌の生存を増強した<sup>4)</sup>。

### 1-2. ストレスへの耐性の調節

*PE\_PGRS41* を発現する *M. smegmatis* は, 細胞壁の透過性を増し, 複数の抗生物質に対する感受性を亢進した<sup>5)</sup>。

### 1-3. 感染マクロファージのサイトカイン産生制御

*PE\_PGRS16* を発現する *M. smegmatis* をマクロファージに感染させるとインターロイキン Interleukin (IL)-12 の産生が増加した<sup>6)</sup>。*PE\_PGRS18* を発現する *M. smegmatis* をマクロファージに感染させると, IL-6・IL-1 $\beta$ ・IL-10 の産生が減少し, IL-12p40 の産生が増加した<sup>7)</sup>。*PE\_PGRS33* を発現する *M. smegmatis* をマクロファージに感染させると, *PE\_PGRS33* が Toll 様受容体 Toll-like receptor (TLR) 2 と相互作用することで, 腫瘍壊死因子 tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  の産生が増加した<sup>8)</sup>。*PE\_PGRS33* と *PE\_PGRS61* は, グリシンに富む配列モチーフ GGXGXGXDX/NXUX を有しており,  $Ca^{2+}$  に結合する特性がある。それらを発現する *M. smegmatis* をヒト単球様細胞株 THP-1 に感染させると,  $Ca^{2+}$  依存的に TLR2 と結合し, 抗炎症性サイトカイン IL-10 産生を増強した<sup>9)</sup>。

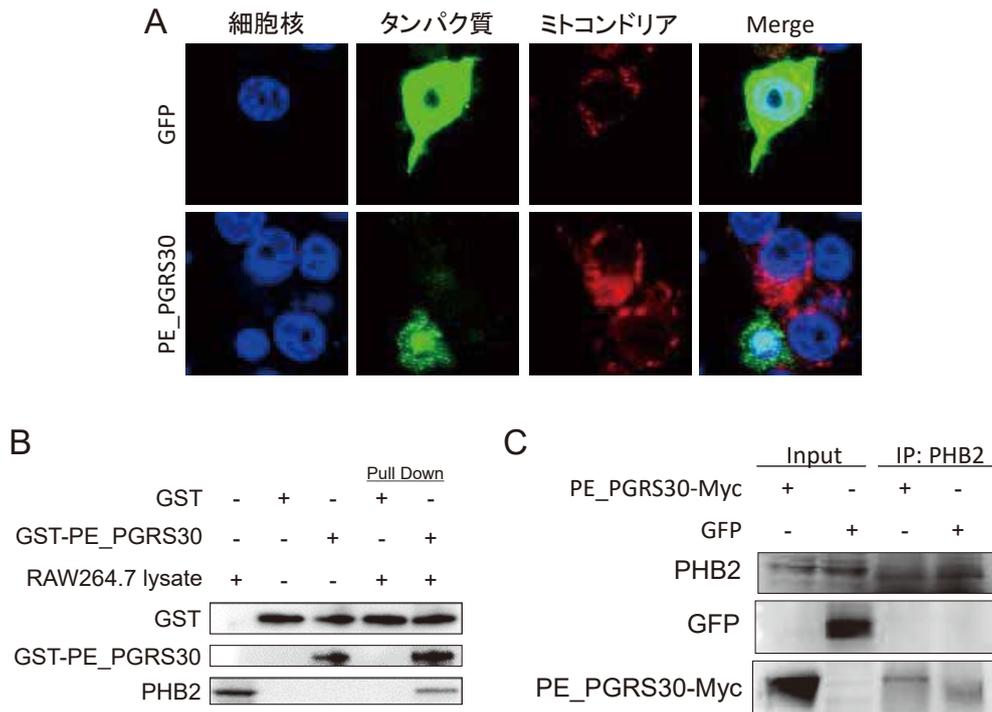


図 2 PE\_PGRS30 の機能解析

A : GFP および PE\_PGRS30-myc をマウス単球様細胞株 RAW264.7 に発現させ、細胞核 (Hoechst 33342) およびミトコンドリア (MitoTracker) を染色した。PE\_PGRS30 は抗 myc 抗体で検出した。B : 大腸菌で発現・精製した GST および PE\_PGRS30 の N 末端に GST を融合した GST-PE\_PGRS30 に対して RAW264.7 の細胞破砕液を混合してプルダウンアッセイを行った。抗 GST 抗体および抗 PHB2 抗体で検出した。C : RAW264.7 に GFP および PE\_PGRS30-myc を発現させ、抗 PHB2 抗体を用いて免疫沈降を行った。GFP は抗 GFP 抗体、PE\_PGRS30-myc は抗 myc 抗体を用いて検出した。

#### 1-4. 感染細胞のアポトーシス制御

PE\_PGRS5 は、結核菌感染患者の感染後期の肉芽腫に存在し、宿主細胞の ER ストレス媒介アポトーシスを誘発していた<sup>10)</sup>。PE\_PGRS33 は、宿主細胞のミトコンドリアを標的とし、マクロファージまたはマウス脾細胞においてアポトーシスを引き起こした<sup>11)</sup>。また、PE\_PGRS33 を発現する *M. smegmatis* をマクロファージに感染させると壊死マーカー乳酸デヒドロゲナーゼの放出が増加した<sup>12)</sup>。

#### 1-5. 樹状細胞活性化の調節

PE\_PGRS17 および PE\_PGRS11 は TLR2 と相互作用し、ヒト樹状細胞の成熟および活性化を誘発した。活性化樹状細胞は IL-6・IL-8・IL-12 を産生し、CD4+ T 細胞の増殖を誘導した<sup>13)</sup>。

#### 1-6. 感染マウスの臓器内もしくは感染マクロファージ内での生存・増殖の増強

PE\_PGRS47 遺伝子破壊結核菌は、マウスおよびマクロファージ内で、増殖が減弱し、感染マウスにおいて MHC クラス II 制限抗原提示が増加していた。また、PE\_

PGRS47 は感染マクロファージにおけるファゴソーム成熟およびオートファジーを阻害した<sup>14)</sup>。

## 2. PE\_PGRS62 の機能

マウス単球様細胞株 J774 内で増殖できない魚類結核菌 *M. marinum* のトランスポゾン変異株 L1D は、PE\_PGRS タンパク質をコードする遺伝子 *mag* 24-1 に変異が入っており、その結核菌ホモログ PE\_PGRS62 および PE\_PGRS30 について、マクロファージ内増殖に関する機能を有する可能性が示唆された<sup>15)</sup>。

PE\_PGRS62 の発現について、結核菌感染マクロファージを低酸素条件で培養すると、PE\_PGRS62 の転写量が増加していた<sup>16)</sup>。また、結核菌感染モルモット肺の菌体内において、PE\_PGRS62 の発現が確認された<sup>17)</sup>。さらに、PE\_PGRS62 は菌体表面に局在していた<sup>18)</sup>。PE\_PGRS62 の機能については、牛型結核菌弱毒化株 *M. bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) の PE\_PGRS62 遺伝子変異株が、マクロファージ内での生存について、野生株と比較して困難になった<sup>19)</sup>。PE\_PGRS62 を発現する *M. smegmatis* をマクロファージに感染させると、IL-1・IL-6 の発現が低下し<sup>20)</sup>、ファゴソームの成熟が阻

害され<sup>21,22)</sup>、iNOS産生が減少した<sup>22)</sup>。PE\_PGRS62のPGRSドメインはユビキチン-プロテアソーム依存的分解からPEドメインを保護していた。これはCD8<sup>+</sup>T細胞によるPE\_PGRS62の認識に影響し、結核菌感染細胞の免疫認識と殺菌を回避する可能性を示唆する<sup>23)</sup>。PE\_PGRS62を発現する*M. marinum*は、界面活性剤に対して感受性を亢進した<sup>22)</sup>。

結核菌標準株 Erdman を用いて PE\_PGRS62 遺伝子欠損株を作製し、マウスに感染させたところ、親株に比べ弱毒化していたことから、PE\_PGRS62 は結核菌の病原因子であることが示唆された (図 1)。PE\_PGRS62 の機能を探るため、哺乳類細胞に PE\_PGRS62 を発現させると、リソソームや LC3 と共局在しておらず、C 末端領域を削った PE\_PGRS62N は、それらと共局在していた。さらに Atg5 ノックダウン J774 細胞を用いた解析から、PE\_PGRS62 が ATG5 依存的なオートファジーを抑制することが示唆された。

### 3. PE\_PGRS30 の機能

PE\_PGRS30 は、1,011 アミノ酸長のタンパク質であり、その中に PGRS ドメイン (506 アミノ酸長) と、ユニークな 306 アミノ酸長の C 末端ドメインが続いている。PE\_PGRS30 は、菌体の極に局在することが見出され、PGRS ドメインがその局在に寄与していた<sup>24)</sup>。PE\_PGRS30 を発現する *M. smegmatis* をマクロファージに感染させると、IL-12・TNF- $\alpha$ ・IL-6 の産生が減少した<sup>25)</sup>。結核菌 PE\_PGRS30 遺伝子変異株をマウスに感染させると、慢性期の肺が、野生株感染群と比較して、組織障害が少なかった。PE\_PGRS30 を発現する *M. smegmatis* をマクロファージに感染させると野生株と比較して細胞死が増加した。これらの結果から、PE\_PGRS30 は、結核菌の病原因子であることが示唆された<sup>26)</sup>。PE\_PGRS30 をマウス単球様細胞 RAW264 に発現させると、アポトーシスが誘導された (図 2)。PE\_PGRS30 との相互作用因子を探索した結果、ミトコンドリアの構造維持や分解に関与するプロヒビチン prohibitin (PHB) 2 が同定された。PE\_PGRS30 は PHB2 と相互作用することで、アポトーシスを誘導することが考えられる。

### おわりに

結核菌ゲノムコード領域の約 10% を占める PE/PPE ファミリー、その PE ファミリーの中で最も大きなサブファミリーである PE\_PGRS タンパク質の機能は、少しずつ明らかになっているが、同じ機能を示すファミリータンパク質間でも、その機能を担う領域について共通点は見出されていない。また、PGRS 領域のアミノ酸配列の多型性を反映しているのか、機能の範囲が幅広い。そのため現在まで、PE\_PGRS タンパク質の機能予測は進んでおらず、個々の PE\_PGRS について、その機能を解

明していく必要がある。これは、PE\_PGRS だけでなく、残りの PE/PPE ファミリーについても同様である。結核菌の病原性を明らかにするため、これらタンパク質の機能の一つ一つを解明していき、共通点を見出し、予測に寄与することが今後の課題である。

### 文 献

- 1) World Health Organization : Global tuberculosis report 2019. 2019
- 2) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. : Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393 : 537-544, 1998
- 3) Yu X, Feng J, Huang L, et al. : Molecular Basis Underlying Host Immunity Subversion by *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE Family Molecules. *DNA Cell Biol* 38 : 1178-1187, 2019
- 4) De Maio F, Battah B, Palmieri V, et al. : PE\_PGRS3 of *Mycobacterium tuberculosis* is specifically expressed at low phosphate concentration, and its arginine-rich C-terminal domain mediates adhesion and persistence in host tissues when expressed in *Mycobacterium smegmatis*. *Cell Microbiol* 20 : e12952, 2018
- 5) Deng W, Long Q, Zeng J, et al. : *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS41 Enhances the Intracellular Survival of *M. smegmatis* within Macrophages Via Blocking Innate Immunity and Inhibition of Host Defense. *Sci Rep* 7 : 46716, 2017
- 6) Singh PP, Parra M, Cadieux N, et al. : A comparative study of host response to three *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS proteins. *Microbiology* 154 : 3469-3479, 2008
- 7) Yang W, Deng W, Zeng J, et al. : *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS18 enhances the intracellular survival of *M. smegmatis* via altering host macrophage cytokine profiling and attenuating the cell apoptosis. *Apoptosis* 22 : 502-509, 2017
- 8) Zumbo A, Palucci I, Cascioferro A, et al. : Functional dissection of protein domains involved in the immunomodulatory properties of PE\_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Pathog Dis* 69 : 232-239, 2013
- 9) Yeruva VC, Kulkarni A, Khandelwal R, et al. : The PE\_PGRS Proteins of *Mycobacterium tuberculosis* Are Ca<sup>2+</sup> Binding Mediators of Host-Pathogen Interaction. *Biochemistry* 55 : 4675-4687, 2016
- 10) Grover S, Sharma T, Singh Y, et al. : The PGRS Domain of *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS Protein Rv0297 Is Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis through Toll-Like Receptor 4. *mBio* 9 : e01017-18, 2018
- 11) Basu S, Pathak SK, Banerjee A, et al. : Execution of macrophage apoptosis by PE\_PGRS33 of *Mycobacte-*

- rium tuberculosis* is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor- $\alpha$ . J Biol Chem 282 : 1039-1050, 2007
- 12) Dheenadhayalan V, Delogu G, Brennan MJ : Expression of the PE\_PGRS 33 protein in *Mycobacterium smegmatis* triggers necrosis in macrophages and enhanced mycobacterial survival. Microbes Infect 8 : 262-272, 2006
  - 13) Bansal K, Elluru SR, Narayana Y, et al. : PE\_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis* induce maturation and activation of human dendritic cells. J Immunol 184 : 3495-3504, 2010
  - 14) Saini NK, Baena A, Ng TW, et al. : Suppression of autophagy and antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS47. Nat Microbiol 1 : 16133, 2016
  - 15) Ramakrishnan L, Federspiel NA, Falkow S : Granuloma-specific expression of Mycobacterium virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family. Science 288 : 1436-1439, 2000
  - 16) Vipond J, Vipond R, Allen-Vercoe E, et al. : Selection of novel TB vaccine candidates and their evaluation as DNA vaccines against aerosol challenge. Vaccine 24 : 6340-6350, 2006
  - 17) Kruh NA, Trout J, Izzo A, et al. : Portrait of a pathogen : the *Mycobacterium tuberculosis* proteome *in vivo*. PLoS One 5 : e13938, 2010
  - 18) Vani J, Shaila MS, Trinath J, et al. : *Mycobacterium tuberculosis* cell wall-associated Rv3812 protein induces strong dendritic cell-mediated interferon  $\gamma$  responses and exhibits vaccine potential. J Infect Dis 208 : 1034-1036, 2013
  - 19) Stewart GR, Patel J, Robertson BD, et al. : Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. PLoS Pathog 1 : 269-278, 2005
  - 20) Huang Y, Wang Y, Bai Y, et al. : Expression of PE\_PGRS 62 protein in *Mycobacterium smegmatis* decrease mRNA expression of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 in macrophages. Mol Cell Biochem 340 : 223-229, 2010
  - 21) Huang Y, Zhou X, Bai Y, et al. : Phagolysosome maturation of macrophages was reduced by PE\_PGRS 62 protein expressing in *Mycobacterium smegmatis* and induced in IFN- $\gamma$  priming. Vet Microbiol 160 : 117-125, 2012
  - 22) Thi EP, Hong CJ, Sanghera G, et al. : Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* protein PE-PGRS62 as a novel effector that functions to block phagosome maturation and inhibit iNOS expression. Cell Microbiol 15 : 795-808, 2013
  - 23) Koh KW, Lehming N, Seah GT : Degradation-resistant protein domains limit host cell processing and immune detection of mycobacteria. Mol Immunol 46 : 1312-1318, 2009
  - 24) De Maio F, Maulucci G, Minerva M, et al. : Impact of protein domains on PE\_PGRS30 polar localization in Mycobacteria. PLoS One 9 : e112482, 2014
  - 25) Chatrath S, Gupta VK, Dixit A, et al. : PE\_PGRS30 of *Mycobacterium tuberculosis* mediates suppression of proinflammatory immune response in macrophages through its PGRS and PE domains. Microbes Infect 18 : 536-542, 2016
  - 26) Iantomasi R, Sali M, Cascioferro A, et al. : PE\_PGRS30 is required for the full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Cell Microbiol 14 : 356-367, 2012