

Antisense oligo DNAによる酸素依存性マクロファージ 殺菌系および抗菌薬の *Mycobacterium avium* complex に対する活性発現増強の試み

¹清水 利朗 ¹佐藤 勝昌 ¹佐野 千晶 ^{1,2}佐野 啓介
¹富岡 治明

要旨：*Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症に対する化学療法剤開発の新しい試みとして MAC 菌を *oxyR* あるいは *ahpC* 遺伝子に対する antisense oligo DNA (AsDNA) で前処理したのち、H₂O₂-halogenation 殺菌系や抗菌薬 (clarithromycin + rifampicin) を単独あるいは併用して作用させた場合の抗菌作用の発現プロフィールについて検討した。その結果、AsDNA 処理により、MAC 菌のこれらの殺菌系に対する感受性が特に高まるといった傾向は認められなかった。こうした成績は AsDNA を利用して MAC 菌のビルレンス因子の発現を抑制し、ひいては抗菌薬への菌の感受性を高めようとする方策の困難さを物語るものである。

キーワード：*Mycobacterium avium* complex, Antisense oligo DNA, H₂O₂-halogenation 殺菌系, Clarithromycin, Rifampicin

現在、難治性抗酸菌症に対してより強力な新規化学療法剤の開発研究が進められているが、思うような成果が得られていない現状にある¹⁾。従って、今後の突破口としては、最近解読された結核菌の全ゲノム²⁾、さらには結核菌や MAC の virulence gene^{3) 4)} についての情報を利用して新しいタイプの化学療法剤の開発研究を展開していく必要があるものと考えられる。ところで、結核菌のゲノム情報の化学療法への応用の試みとしては、最近 Harth らが glutamine synthetase 遺伝子より antisense oligo DNA (AsDNA) を調製し、この標品を用いて結核菌を処理することにより、結核菌の *in vitro* での発育を抑制することが可能であることを見出しているが⁵⁾、この研究は結核菌のゲノム情報を利用した化学療法剤開発研究の新しい試みとして注目に値する。

抗酸菌はマクロファージ (Mφ) の殺菌メカニズムに対して強い抵抗性を有しており、このことが結核菌や *Mycobacterium avium* complex (MAC) の感染部位における滞留性の主な原因であるものと考えられている。病原

性抗酸菌は、活性酸素 (ROI) や活性酸化窒素などの Mφ 殺菌エフェクターの作用を回避するための様々な病原因子を有している^{6) 7)}。そこで今回は、MAC 菌が ROI 依存性の Mφ 殺菌メカニズムの攻撃からエスケープする過程で重要な役割を演ずると考えられる *oxyR*, *ahpC* 遺伝子^{3) 8) ~ 10)} に注目し、MAC 菌を予めこれらの遺伝子に対する AsDNA で処理し、次いで菌体に H₂O₂-halogenation 殺菌系や抗菌薬の各単独、あるいはそれらを併用して作用させた場合に、これら殺菌系の抗菌作用の発現プロフィールにどのような影響がみられるのかについての検討を試みた。

供試菌株としては、MAC N-444 株 (DNA プローブ試験で *M. avium* と同定) の 7H9 培地中培養菌を用いた。上記 2 つの遺伝子 (*oxyR*, ROI の消去に関わる酵素の発現誘導; *ahpC*, peroxide の消去)^{8) ~ 10)} に対する AsDNA は、各遺伝子の塩基配列より教室で独自に設計し (Fig. 1)、企業に外注 (フナコシ) して合成したものであるが、今回は deoxyribonuclease に対する抵抗性を付与するために

¹ 島根医科大学微生物・免疫学, ² 耳鼻咽喉科学

連絡先: 富岡治明, 島根医科大学微生物・免疫学, 〒693-8501 島根県出雲市塩冶町 89-1 (E-mail: tomioka@shimane-med.ac.jp) (Received 10 Jun. 2002/Accepted 4 Oct. 2002)

MAC *oxyR* As-1: 5'ATAAGTCTTATCGGG3'
 MAC *oxyR* As-2: GCGCAGGCCGCGAT
 MAC *ahpC* As-1: GATGGTCAGCAGAGG
 MAC *ahpC* As-2: TAGGCGGGAACTGA

Fig. 1 Antisense oligo DNAs (AsDNAs) used in this study

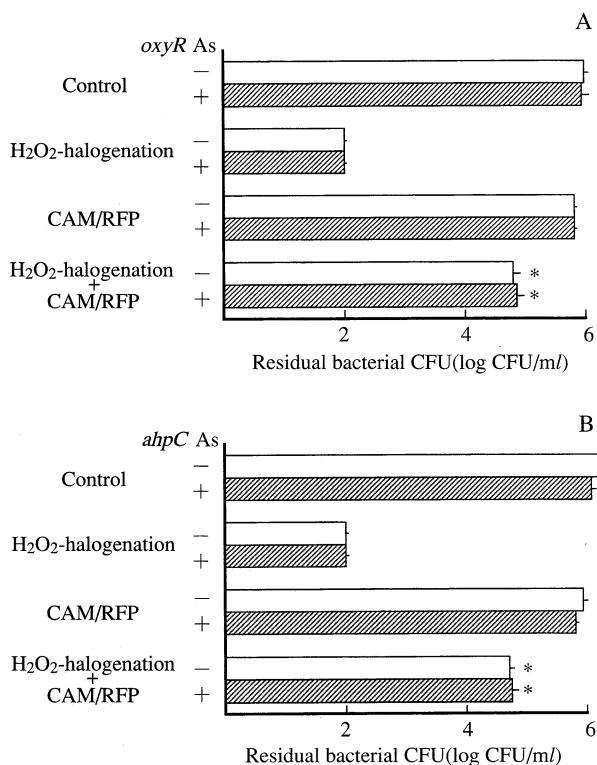


Fig. 2 Effects of AsDNAs against *oxyR* (A) and *ahpC* (B) on the anti-MAC antimicrobial activity of H₂O₂-halogenation system, CAM plus RFP, or combination of them. In the first incubation, MAC organisms were treated with AsDNA (As-1 plus As-2), and subsequently treated with the H₂O₂-halogenation system and CAM plus RFP, alone and in combination. Residual bacterial CFU were counted on 7H11 agar. Each bar indicates the mean \pm s.e.m (n=3). *Significantly larger than the value of the H₂O₂-halogenation system alone ($p < 0.01$).

phosphorothioate 化した標品を用いている。供試菌を 7H9 培地中で各々の AsDNA (100 μ M) の存在下あるいは非存在下で 37 $^{\circ}$ C, 24 時間培養した後, 蒸留水で遠心洗浄した (11,000 \times g, 10 分)。次いで回収された菌を 100mM 酢酸緩衝液 (pH5.5) 中に浮遊させ, H₂O₂-halogenation 殺菌系 (10 μ M H₂O₂, 10 μ M NaI, 10 μ M FeSO₄) または血中 C_{max} 濃度の clarithromycin (CAM: 大正製薬) (2.3 μ g/ml) + rifampicin (RFP: Sigma) (8.0 μ g/ml) の各単独, あるいはそれらの併用により 37 $^{\circ}$ C, 2 時間処理した後, 遠心洗浄し, 生残 CFU を 7H11 寒天平板上で計測した。

Fig. 2 は, 供試 AsDNA で前処理した MAC 菌とそうした前処理を行っていない菌との H₂O₂-halogenation 殺菌

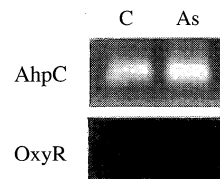


Fig. 3 Expression of AhpC and OxyR mRNA in MAC N-444 exposed to AsDNA against *ahpC* or *oxyR*. MAC N-444 were left untreated (lane C) or exposed to 100 μ M AsDNA (lane As) in 7H9 medium at 37 $^{\circ}$ C for 24 hr. Cells were harvested, and total RNA was isolated and subjected to reverse transcription (RT)-PCR analysis.

系および抗菌薬 (CAM + RFP) に対する感受性を比較したものである。図から明らかのように, 供試いずれの AsDNA での前処理によっても MAC 菌のこれらの殺菌系に対する感受性が高まるといった傾向は全く認められなかった。従って今回の検討では, *oxyR*, *ahpC* の mRNA に対する AsDNA によっては, H₂O₂-halogenation 殺菌系や CAM + RFP の抗菌作用に対する MAC 菌の感受性が高まるような傾向は認められなかった。Harth らの報告によれば, 結核菌を glutamine synthetase に対する AsDNA で処理した場合でも, 標的遺伝子の蛋白発現は十分なレベルでは抑制されず, ひいては満足いく菌の増殖抑制効果は得られてはいないとのことである⁵⁾。また, Fig. 3 に示した RT-PCR による検討では, AhpC mRNA については AsDNA 処理の前後での発現に特に大きな差は認められていない。他方, MAC では *oxyR* 遺伝子は結核菌の場合のように多数のフレームシフトや欠損はなく intact であるものの, 今回の検討では, AsDNA 処理の有無にかかわらず, その mRNA の発現は認められなかった。これらの成績からすると, MAC 菌に対する phosphorothioate 化 AsDNA の導入の効率は予想以下に低いため, 標的遺伝子の mRNA 発現の有効な抑制には至っていないものと考えられる。この原因としては, 結核菌や MAC 菌の脂質に富む堅牢な細胞壁が AsDNA の透過性に対するバリアーとして働いた可能性が考えられるが, Harth らは, ethambutol (EB) や polymyxinB による処理で細胞壁を "softening" することにより AsDNA の細胞壁透過性を改善させようとする試みは功を奏さなかったとしている⁵⁾。現在 AsDNA に RFP や EB などの薬剤を conjugate させて transporter の働きを担わせる方策や, 抗酸菌ファージを用いて AsDNA を効率よく菌体内に取り込ませるといった方策について検討中である。いずれにしても今回の成績は, AsDNA を用いての MAC 菌のビルレンス因子発現を抑制し, ひいては MAC 菌の抗菌薬に対する感受性を高めようとする strategy には AsDNA の菌体内への uptake の効率化などの今後解決せねばな

らない種々の課題が山積みしていることを示しており、今後の研究の進展に期待したい。

CAMを分与頂いた大正製薬に深謝します。

文 献

- 1) Tomioka H: Prospects for development of new antimycobacterial drugs. *J Infect Chemother.* 2000 ; 6 : 8-20.
- 2) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998 ; 393 : 537-544.
- 3) 富岡治明: 肺結核, 細菌学の進歩. *カレントテラピー.* 2000 ; 18 : 22-27.
- 4) Glickman MS, Jacobs WR: Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell.* 2001; 104 : 477-485.
- 5) Harth G, Zamecnik PC, Tang JY, et al.: Treatment of *Mycobacterium tuberculosis* with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly-L-glutamate/glutamine cell wall structure, and bacterial replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 ; 97 : 418-423.
- 6) Hingley-Wilson SM, Sly LM, Reiner NE, et al.: The immunology of the mycobacterial infected macrophage. *Mod Asp Immunobiol.* 2000 ; 1 : 96-101.
- 7) 富岡治明: 非結核性抗酸菌の細菌学と感染宿主応答. 「結核」, 光山正雄編, 医薬ジャーナル社, 東京, 2001, 322-333.
- 8) Sherman DR, Sabo PJ, Hickey MJ, et al.: Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 ; 92 : 6625-6629.
- 9) Wilson T, de Lisle GW, Marcinkeviciene JA, et al.: Antisense RNA to *ahpC*, an oxidative stress defence gene involved in isoniazid resistance, indicates that *AhpC* of *Mycobacterium bovis* has virulence properties. *Microbiology.* 1998 ; 144 : 2687-2695.
- 10) Bryk R, Lima CD, Erdjument-Bromage H, et al.: Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science.* 2002 ; 295 : 1073-1077.

Short Report

EFFECTS OF ANTISENSE OLIGO DNA ON THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF REACTIVE OXYGEN INTERMEDIATES AND ANTIMYCOBACTERIAL AGENTS AGAINST *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX

¹Toshiaki SHIMIZU, ¹Katsumasa SATO, ¹Chiaki SANO, ^{1,2}Keisuke SANO, and ¹Haruaki TOMIOKA

Abstract There has not yet been systematic studies which attempt to elucidate detailed profiles of the interaction between antimicrobial drugs and macrophage microbicidal mechanisms. We examined the effects of antisense oligo DNAs (AsDNAs) against *oxyR* and *ahpC* on the susceptibility of *Mycobacterium avium* complex (MAC) to the H₂O₂-halogenation system and combined antimycobacterial drugs [clarithromycin (CAM) + rifampicin (RFP)], both separately and in combination. It was found that AsDNA treatment of MAC did not affect the susceptibility of the organisms to any of the antimicrobial systems tested. Since the present AsDNAs did not efficiently reduce the expression of *AhpC* mRNA, attempts to increase bacterial uptake of AsDNAs are

necessary to achieve significant increase in the drug susceptibility of MAC organisms due to AsDNA treatment.

Key words: *Mycobacterium avium* complex, Antisense oligo DNA, H₂O₂-halogenation system, Clarithromycin, Rifampicin

¹Department of Microbiology and Immunology and ²Department of Otorhinolaryngology, Shimane Medical University

Correspondence to: Haruaki Tomioka, Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, 89-1, Enya-cho, Izumo-shi, Shimane 693-8501 Japan. (E-mail: tomioka@shimane-med.ac.jp)