

第89回総会教育講演

抗酸菌とレドックス

瀧井 猛将

要旨：抗酸菌は宿主内を含む環境からの酸化ストレスや窒素酸化物によるストレスに曝されている。菌感染後、マクロファージはNADPHオキシダーゼによりスーパーオキシドを産生する。また、誘導型のNO合成酵素により活性窒素種の前駆体物質であるNOを産生して殺菌する。結核菌はスーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼ、アルキルペルオキシダーゼ等の酵素によるストレス分子の解毒系とマイコチオール、チオレドキシシン等のストレス分子の緩衝系等のレドックスストレスに対する耐性機構をもっている。これらの分子は結核菌のマクロファージ内での生存・増殖能の獲得に関係しているが、結核の潜在性や発症、再燃についてはこれらの分子だけでは説明ができないことから新たな分子の存在が予想されていた。構造中にヘムや鉄-硫黄錯体をもつタンパク質が結核菌から見つかり、これらのタンパク質がレドックス環境を感知するセンサーとして働いて菌の宿主内での潜在化や再燃を制御しているとの知見が注目されている。本総説では、レドックス環境と結核の潜在化と再燃、発症との関係から存在が予想されたセンサー分子であるヘム含有タンパク質DosS/DosTと鉄-硫黄クラスタータンパク質ファミリー WhiBsについてレドックス感知の機構と遺伝子制御の機構を概説する。

キーワード：レドックス, DosS, DosT, Dosレギュロン, WhiBs

1. はじめに

抗酸菌の中で結核菌は宿主に寄生することに成功した菌である。多くの研究から、結核菌が宿主のマクロファージ細胞から産生される活性酸素種 (ROS) や活性窒素種 (RNS) から回避するためにスーパーオキシドジスムターゼ (SOD), カタラーゼ/ペルオキシダーゼ (KatG), アルキルヒドロペルオキシド還元酵素 (AhpC) 等の解毒系の酵素やマイコチオールなどの分子が働いていることが明らかになっている (Fig. 1, Table)。しかしながら、これらの分子だけでは結核菌の病原性として結核の潜在化や再燃、発症の病態を説明することはできない。結核と酸素分圧の変化により病態が変わることが古くから臨床的に知られている。一酸化窒素 (NO) については結核患者の呼気中のNOが高いとの報告が近年されている。このようにレドックスは結核の病態と関係している。レドックスの結核における役割を理解するために、本稿で

はじめにROS, 低酸素, NO, 酸性pHなどのレドックス環境と結核の潜在性や発症との関連について再考したい。続いて、結核菌のレドックスセンサータンパク質DosS/DosT¹⁾とWhiBs²⁾についてレドックス感知機構とセンサーの制御下にある遺伝子調節機能に関する知見から結核の潜在化と再燃、発症の機構について分子レベルで考察したい。

2. レドックスストレスと結核菌の病原性

結核菌は体内でROSやRNS, 酸性pHや低酸素などのレドックス関連ストレスに曝されている。これらのストレスは結核菌の宿主細胞内生存に適応した代謝機構を誘導するだけでなく、病原性因子の発現も誘導する。さらに、菌体周囲のレドックスストレスの強弱は結核菌の休眠期への移行や分裂開始期への移行の決定に大きく関与している。

2.1 ROSと結核発症との関係

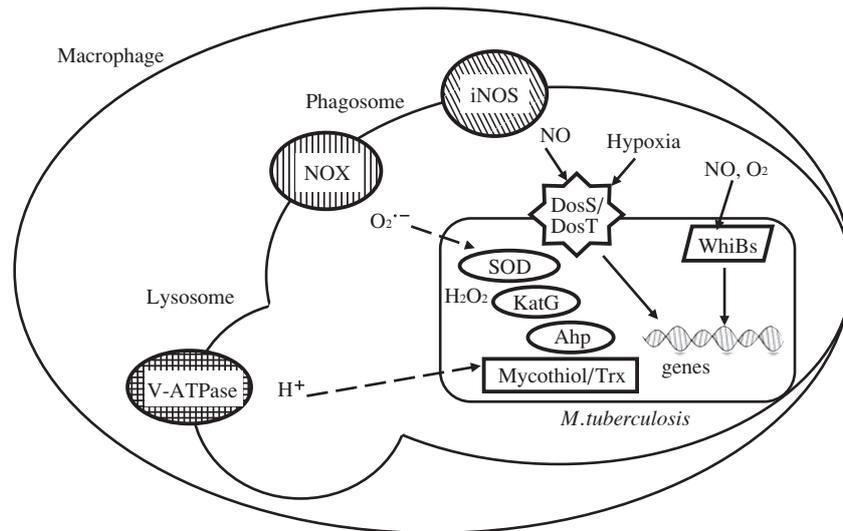


Fig. 1 The scheme of survival of *M. tuberculosis* in macrophage

NOX: NADPH oxidase, iNOS: inducible NO synthase, SOD: superoxide dismutase, KatG: catalase-peroxidase, Trx: thioredoxin, Ahp: alkyl hydroperoxide reductase, V-ATPase: vacuolar-type H⁺-ATPase, DosS/DosT: hem-based redox-sensor, WhiBs: Fe-S cluster type redox-sensor

Table Molecules of maintaining intercellular redox homeostasis in *Mycobacteria*

Enzyme/Molecules	Molecular Species	Primary role/Character
Detoxification Enzyme		
Superoxide Dismutase	SodA (FeSOD) ^{93) 94)} SodC (CuZnSOD) ^{95) 96)}	Dismutation of O ₂ ^{•-} into H ₂ O ₂ and molecular oxygen
Catalase Peroxydase	KatG	Protect bacteria from ROS damage ^{97) 98)}
Alkyl Hydroperoxide Reductase	AhpC	Protection against both oxidative and nitrosative stress ^{99) 100)}
Thioredoxin Reductase	TrxR	NADPH + H ⁺ + Trx-S ₂ → NADP ⁺ + Trx-(SH) ₂ Protect bacteria against ROS and RNS ^{101) 102)} Trx system (TrxR, TrxB and TrxC) may be involved in virulence. ¹⁰³⁾
Methionine Sulfoxide Reductases	MsrA, MsrB	Protect bacteria from ROS and RNS damage ¹⁰⁴⁾
Disulfide Oxidoreductases	DsbD, DsbE, DsbF	Thioredoxin-like proteins ^{105) 106)}
Buffer Substances		
Mycothiol	MSSM/2MSH ^{107) 108)}	NADPH + H ⁺ + MSSM → 2MSH + NADP ⁺ Millimolar quantities in cytosol as the major redox buffer ⁷⁾ MSH consists of myo-inositol linked to N-acetylated glucosamine ^{109) 110)} The <i>mshD</i> mutants are hypersensitive to H ₂ O ₂ ^{111) 112)}
Ergothioneine		Protect bacteria from ROS damage ^{113) 114)}
Thioredoxin	TrxA, TrxB, TrxC	Trx-(SH) ₂ + protein → Trx-S ₂ + protein-(SH) ₂ Oxidoreduction and the detoxification of ROS ^{102) 115) 116)}
Truncated Hemoglobin	trHbO trHbN	High affinity for O ₂ , Detoxification of H ₂ O ₂ and NO ¹¹⁷⁾ Oxidation of NO ¹¹⁸⁾

ROS: reactive oxygen species, RNS: reactive nitrogen species, NO: nitric oxide

結核菌は肺感染時に最初に肺胞マクロファージに遭遇する。肺胞マクロファージは病原体を排除するためにNADPH酸化酵素 (NOX) やミエロペルオキシダーゼなどのROS産生に関する一連の酵素群をもっている。NOXはp40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p22^{phox}, gp91^{phox}から構成されるコアタンパク質と制御タンパク質からなる複合タンパク質である。結核菌は一般細菌に比べてキサンチンオキシダーゼから産生されるROSに対して抵抗性である³⁾。また、他の細胞内寄生菌のリステリアやサルモネラに比

べても結核菌は抵抗性を示す⁴⁾。ROSはDNAやタンパク質、脂質などの細胞成分に損傷を与え、結核菌のDNA修復能に影響を及ぼす⁵⁾。結核菌はマクロファージからのレドックスストレスに適応する機構としてスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やカタラーゼ (KatG)、アルキルヒドロペルオキシド還元酵素 (AhpC)、ペルオキシレドキシニンなどの酵素をもっている⁶⁾。加えて、ミコール酸に富んだ結核菌の細胞壁はROSに対して抵抗性である。また、結核菌は細胞内のレドックス緩衝系とし

てマイコチオールを利用して細胞内の酸化還元電位を維持している⁵⁾。マイコチオールはN-アセチルシステインとグルコサミンとミオイノシトールから構成されている⁷⁾。これらの分子による制御下において結核菌は生理的に発生する量のROS下で生存することができる⁶⁾。Tableに結核菌のレドックス応答に関与する分子と役割・特徴をまとめた。

結核発症とROSの役割について、結核患者由来の肺胞マクロファージや末梢血単核球から産生されるROSの量が健常者と比べて非常に低いとの報告がある⁸⁾⁹⁾。このROSの減少はNADPHオキシダーゼやヘキソースリン酸経路の活性の減少と関連がある⁸⁾。ROSは単に殺菌的な分子として働くだけでなく、マクロファージにASK1 (apoptosis-regulating signal kinase 1) を活性化してアポトーシスを誘導して菌を排除する作用もしている¹⁰⁾。さらに、ヒトの結核におけるROSの重要性について慢性肉芽腫症の患者（遺伝的にROSを産生できない）は多くの抗酸菌種に対して感受性であることが知られている¹¹⁾。ROS産生を欠如したマクロファージを用いた研究で結核菌の殺菌にはROSは関係していないとの報告¹²⁾があるが、以上のような報告にあるようにROSは殺菌だけでなく免疫系の細胞にも作用して結核の発症に関係する重要な因子であることに違いはない。

2.2 休眠と再燃における低酸素の役割

酸素は結核菌の活動的な増殖に必要である。一方、酸素分圧の減少は結核菌に分裂休止期からパーシスターの状態（非増殖期にあるが酸素濃度が高くなれば増殖期に移行できる状態、薬剤非感受性でもある）への移行を促すことが知られている¹³⁾¹⁴⁾。この状態になると菌は宿主内に数十年にわたって生存できると考えられている。低酸素曝露は菌の生理的な変化をもたらす。つまり、核酸とタンパク質合成の阻害、細胞壁の肥厚による抗酸菌染色性の変化とイソニアジドに対する耐性化が起こる¹⁵⁾。これらの変化は感染した組織から得られた菌も同じであることから、低酸素は感染の成立を左右するストレスであることが示唆される。

抗生剤治療が実施される以前は、結核に対して高地でのサナトリウム療法、人工気胸術や胸郭形成術と感染組織の除去などの外科的治療がされていた。これらの治療により結核の状態は安定するが、時に肺での酸素分圧の低下を伴うため結核菌の休眠期への移行を助長しているとも考えられている^{16)~18)}。人工気胸術は肺を萎縮させるため感染部位の酸素分圧が下がる。さらに、病巣周辺においてしばしば線維化が起こり、菌の封じ込めが起こる。その結果、結核性の空洞が取り残されて休眠期結核菌の温床となると考えられている。

これらの処置が結核菌の休眠期への移行を促進するか

否かの議論は別にして、近年、人工気胸術と胸郭形成術が多剤耐性結核や超多剤耐性結核の治療に有用との報告もあり¹⁹⁾²⁰⁾、酸素分圧が結核菌の増殖や潜在性に関係していることがうかがえる。さらに結核の初感染は肺尖部に認められ、酸素分圧と結核菌の潜在化との関係性が指摘されている²¹⁾²²⁾。実際に酸素との非接触部位では結核菌が少なく、一方、空気に曝露している部位からは菌が多く分離されるとの報告がある²³⁾。加えて、ヒトの結核結節は無血管であることが多く組織中では結核菌は低酸素状態におかれている²⁴⁾。

これらのことから結核結節中の酸素分圧は結核菌が増殖期もしくは休眠期に移行する要因になっていることが推測される。増殖期から休眠期への移行は菌の代謝と関連して制御されているため、結核菌は微小環境下での酸素分圧を持続的にモニターするセンサーを備えていることが強く示唆される。

2.3 一酸化窒素 (NO) の結核での役割

酸化ストレスと同様にNOストレスは増殖期の結核菌を休眠期へ移行させると考えられている。低レベルのNO曝露は、結核菌の呼吸を阻害することにより核酸やタンパク質合成を阻害して菌の増殖を停止させ、薬剤非感受性の休眠期への移行を促す²⁵⁾。中程度のNO曝露は結核菌に静菌的に、高濃度のNO曝露は殺菌的に作用している²⁶⁾。さらに、NO曝露は低酸素で誘導される遺伝子産物の機能が似た遺伝子誘導をすることが報告されている²⁰⁾²⁵⁾²⁷⁾。

結核感染におけるNOの役割についてマウスのマクロファージは殺菌的な量のNOを産生する¹²⁾。NO誘導酵素(iNOS)欠損マウスでは結核感染に感受性が高くなることからNOが殺菌的に働いていることが示されている²⁸⁾²⁹⁾が、結核感染の慢性期にiNOSを阻害すると症状が悪化して感染動物が死亡することもあり²⁸⁾、NOは結核菌の潜在化に不可欠であるとも考えられる³⁰⁾。さらにNOによる結核菌の潜在化の機構として、結核感染後期にマクロファージから放出されたNOが結核菌に作用して菌のシトクロム*c*酸化酵素を抑制して代替酵素であるII型NADH脱水素酵素とシトクロム*bd*の誘導を促し、結核菌を硝酸呼吸へ移行させることが知られている³¹⁾。

ヒトの肺結核については研究に使用できる生体試料が不足しているためにNOの結核での役割についてはっきりとした結論は出ていないが、NOの重要性についていくつかの報告がある。健常者の肺のマクロファージは結核菌の増殖を阻害するのに十分な量のNOを産生している^{32)~34)}。手術で摘出した活動性結核患者の肺組織にはiNOS, eNOS (endothelial NOS) とニトロ化チロシンの存在が認められることからヒトの肺結核においてもiNOSが機能していることが考えられる³⁵⁾。さらに、健常群と

比べて結核患者は呼気中にNOを多く排出していることや、患者の肺胞マクロファージは高いiNOS活性をもつことが報告されている³⁶⁾。NOは結核菌に殺菌的であることに加えて、獲得免疫や感染の成立に影響を与える食細胞の機能を調節するセカンドメッセンジャーとしても働いている。結核菌の増殖を抑制するためにマクロファージのアポトーシスをNOが誘導している³⁷⁾。他の研究では、間充織幹細胞から産生されたNOは感染部位に集まり、T細胞応答を抑制することが報告されている³⁸⁾。免疫系に果たすNOの役割について今後の研究が興味深い。

2.4 酸性pHストレスが結核菌の病原性に果たす役割

結核菌は感染初期には肺胞マクロファージの食胞に寄生する。Naïveなマクロファージの食胞のpHは6.3～6.5³⁹⁾であり活性化されたマクロファージの食胞は4.5～4.8である⁴⁰⁾。増殖性もしくは潜在性の感染が成立するためには結核菌はマクロファージからの酸性ストレスに耐えなければならない。ファゴソームやファゴリソーム内で生き残るために、結核菌はアンモニアの産生と分泌⁴¹⁾、または、分泌性の因子を介して液胞型ATPaseを阻害することによりファゴソームの酸性化を抑制する⁴²⁾。結核菌は宿主内の微小環境中で菌体外のpHの変動に対して細胞内のpHを保つために代謝を変える必要がある⁴³⁾。菌がNaïveもしくは活性化されたマクロファージ内に相当するpHに曝露されるとpH応答に関連した一連の遺伝子の転写応答が見られる⁴⁴⁾。数多くの*in vivo*や*in vitro*での研究から結核菌は過酷な酸性pHストレスにも耐性であることが示されている⁴⁵⁾。酸性環境に対する適応機構は結核菌の病原性と密接に関連していることが示されているが、pH感知による耐性遺伝的誘導機構の詳細については今後の研究展開が待たれる。筆者の研究室では*Mycobacterium avium*の亜種*hominissuis*においてアンモニア産生に係わる酵素の遺伝子発現が酸性環境下で誘導されることを見出している。さらにこの現象と*M. avium*の病原性やpH依存性のMAC症の化学療法薬クラリスロマイシン耐性との関連について現在研究を進めている。

3. 結核菌は古典的なレドックスセンサーを欠く

種々の細菌には多くの古典的なセンサーが備わっており、レドックスストレスや低酸素を感知している。古典的なセンサーとして*Salmonella*属のOxyR、*Rhizobium*属のFixL、*Escherichia coli*のSoxR、フマル酸/硝酸還元剤の制御因子であるFNRやArcB、そして、*Streptomyces*属のRexA等がある⁴⁶⁾。結核菌のOxyRには多くの箇所に変異があり不活化されており機能していない⁴⁷⁾。結核菌のcAMP受容体タンパク質(Crp)/FNRホモログは*E. coli*のCrpと32%の相同性を有しているが、カチオン性の鉄イオンを欠いていることから古典的なレドックスセンサー

として機能していない⁴⁸⁾。結核菌のフェレドキシン-NADP⁺レダクターゼは他の菌種と相動性をもつが、鉄-硫黄クラスターをもたないことから古典的なレドックスセンサーではないと考えられている⁴⁹⁾。そして、結核菌のゲノム解析とプロテオーム解析から他の古典的なレドックスセンサーと相同性のある分子も見つかっていない。

以上のように結核菌は古典的なレドックスセンサーをもたないが、結核菌にはレドックスストレス防御機構が備わっていることから別のセンサーを利用していることが強く示唆される。

4. DosSとDosT: ヘムを含むレドックスセンサー (NOとCO)

結核菌は古典的なセンサーとは別のヘム骨格をもつセンサー(DoS, DosT)をもっている^{50)~53)}。DosSとDosTはDosRと共に2成分系を構成している。DosSとDosTは酸化剤などのリガンドにより活性化されるヒスチジンリン酸化酵素であり、シグナルを下流のDosR分子に伝えるDosレギュロンを形成している(Fig. 2)。Dosレギュロンは結核菌をパーシスターの状態から活動性に転換するのに重要な働きをしていることが報告されている。

4.1 Dosレギュロンと結核菌の低酸素, NO, COに対する応答

結核菌は嫌氣的状況、もしくは突然酸素がなくなると生存できない⁵⁴⁾が、徐々に酸素を減らすと数十年にわたって生存できることが知られている^{13) 14)}。結核菌は*in vitro*で低酸素に曝露すると形態が長くなり、細胞壁の肥厚と抗酸性の消失が起こり、抗結核薬に対する感受性もなくなる^{14) 55)}。これらの表現型の変化は潜在性結核菌に典型的な特徴に似ていることから、低酸素は結核菌の潜在化の誘導に関係していると考えられる。

結核菌は他の細菌と同様に低酸素下では全体的にRNAやタンパク質の生合成を抑制しているが、*narX* (硝酸還元酵素)、*narK2* (亜硝酸排出タンパク質)、*fdxA* (フェレドキシン)、*ahpC* (アルキルヒドロペルオキシド還元酵素)などを含むおよそ50の遺伝子が低酸素で誘導される⁵⁶⁾。これらの遺伝子は結核菌の潜在性に関連する遺伝子とされ、レドックスセンサータンパク質DosT、DosSと遺伝子転写制御因子であるDosRで構成されるDosレギュロンが転写を制御している^{56)~58)}(Fig. 2B)。DosSのホモログであるDosT (Rv2072c)はオーファンヒスチジンキナーゼであり、DosRを特異的にリン酸化する^{59) 60)}。DosSはDosRにより発現が制御されるが、DosTはDosRによって制御されずに恒常的に発現している。結核菌において低酸素時と同様にNOがDosレギュロンを誘導すること²⁵⁾、COもDosレギュロンを誘導することが報告されている^{61) 62)}。Dosレギュロンはこれらのレドックス関

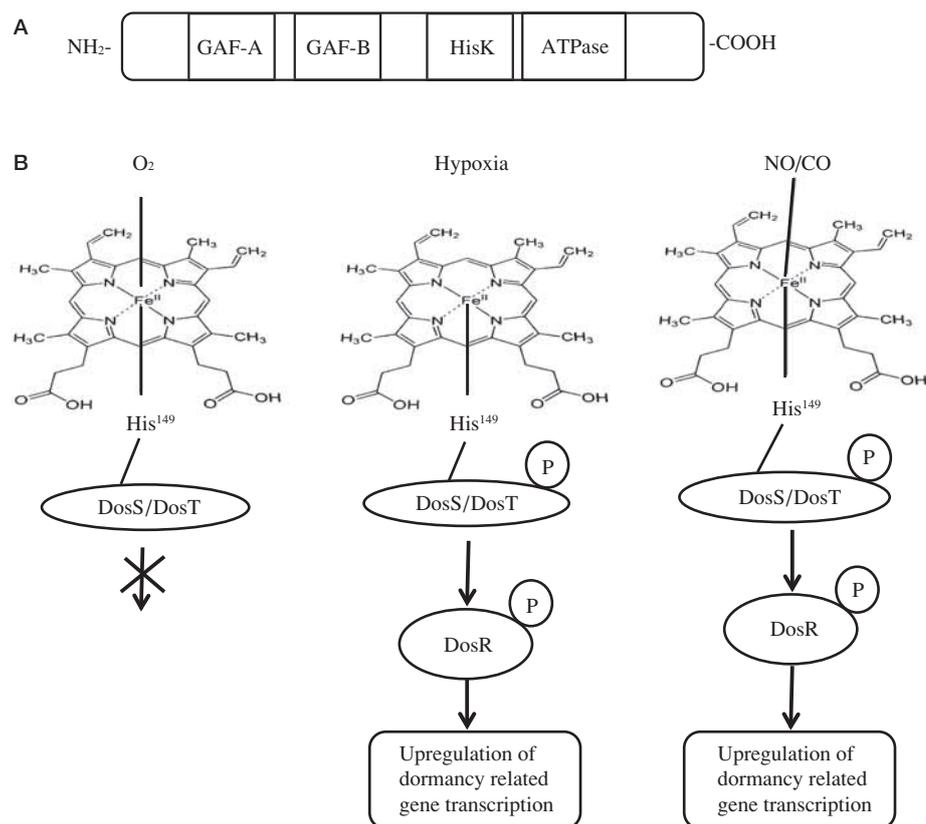


Fig. 2 Hem-based redox sensor; DosS⁷¹) and DosT⁶⁰)

(A) Domain structure of *M.tuberculosis* DosS and DosT. DosS and DosT contain two N-terminal GAF domains, GAF-A and GAF-B, followed by a histidine kinase domain and an ATPase domain. The conserved histidine residue at 392 is autophosphorylated. (B) The deoxy ferrous form of DosS/DosT is autophosphorylated under hypoxia or upon binding of CO or NO. The phosphorylation of the protein isn't observed upon binding oxygen. The phosphorylated protein transfers the phosphate group to DosR. Phosphorylated DosR transduces the signal to upregulate genes necessary for dormancy.

連の分子を感知して潜在化関連遺伝子の転写を活性化して結核菌の潜在化に関係していると考えられる。

4.2 DosRが制御している電子伝達系関連酵素

細菌は低酸素もしくは無酸素下でATP産生を続けるために硝酸もしくはフマル酸のような代替の電子受容体を使う必要がある。*E.coli*では硝酸を電子受容体として使って、硝酸還元酵素が硝酸を亜硝酸に還元する。このシステムは硝酸の取り込みと硝酸呼吸で生じる亜硝酸の排出の硝酸-亜硝酸アンチポーターと連動している⁶²。低酸素ではこのアンチポーターの発現が転写制御されることが知られている⁶³。結核菌も*E.coli*と同様に代替の電子受容体を利用している。酸素がない条件下でDosレギュロンは電子伝達系の酵素の多くを支配しており、硝酸還元酵素、フマル酸還元酵素、ギ酸デヒドロゲナーゼやフェレドキシンを誘導する。DosRは硝酸還元酵素をコードしている*narX*と硝酸-亜硝酸アンチポーターをコードしている*narK2*の発現も制御して低酸素⁶⁴や酸性pH⁶⁵での結核菌の生存や*in vivo*でのパーシステンスの誘導に関与していると考えられている⁶⁶。

フマル酸は電子伝達系からの電子を利用してフマル酸還元酵素によりコハク酸に還元される。実際に低酸素下において結核菌から分泌されるコハク酸の量が増加することが観察されている⁶⁷。DosRはフマル酸還元酵素 (*frd ABCD*) の発現を制御しており、一連の酵素のうち*fdxA*は低酸素での電子伝達系において重要な働きをしている代替電子伝達タンパク質である。また、DosRはギ酸デヒドロゲナーゼ (FLH) をコードしている酵素の発現も制御する⁶⁸。この系は酸素や他の代替の電子受容体がなくても機能している。

このようにDosレギュロンは硝酸呼吸関連酵素の発現も制御して潜在性結核への移行に関与している。

4.3 DosRが制御している核酸、脂肪酸合成関連酵素

DosRは低酸素時の電子受容体の制御に加えて、核酸、脂肪酸合成経路を制御している。DosRはリボ核酸からデオキシリボ核酸を生成する生合成を行う酵素であるリボヌクレオシド二リン酸還元酵素 (*nrdZ*) の嫌気的な環境下での発現を制御している⁶⁹。また、DosRはトリアシルグリセロール合成酵素 (*Tgs1*) の発現も制御してい

る。トリアシルグリセロール生合成経路はTCAサイクルを回避することによって結核菌の増殖率を制御している⁷⁰⁾。

Dosレギュロンのレドックス適応に関する生理機構について、低酸素や嫌気的な環境下での硝酸呼吸や電子伝達系によるエネルギー産生と核酸、脂肪酸合成等の生存や複製に必要な機能をもつ遺伝子の発現がDosレギュロンによって制御されていることが以上のような研究で近年明らかになってきた。次項ではセンサータンパク質であるDosSとDosTの構造からレドックスセンシングとシグナル伝達について概説する。

4.4 DosSとDosTによるガスセンサーとレドックス分子の機構

DosSとDosTはヒスチジンリン酸化酵素活性をもつ細胞表面上のセンサー分子でありDosR応答制御因子にシグナルを中継する。両者はセンサー領域と活性化/伝達領域をもち、センサー領域には2つ並んだGAF領域を含む(GAF:cGMP特異的ホスホジエステラーゼ、アデニルサイクラーゼとFhlAの3つのセンサータンパク質の頭文字)。伝達領域はヒスチジンリン酸化酵素とATP分解酵素を含んでいる。DosSとDosTの生化学的な特徴の解析によりヘム結合タンパク質であることが明らかにされた^{50)~52)}。DosSの最初のGAF領域(GAF-A)はヘムのHis¹⁴⁹に共有結合する⁷¹⁾。DosSとDosTセンサーは自身タンパク質中のヘムとO₂やNO、COとの配位/レドックス化学反応によってセンサータンパク質のリン酸化活性を制御できる。DosSとDosTのセンサー領域にO₂が結合するとシグナルが活性化/伝達領域に中継され、DosSとDosTのリン酸化活性が抑制される(Fig. 2B)。NOとCOの場合にはリン酸化活性を阻害しない。このリガンドの区別にはTyr¹⁷¹とGAF-B領域が関与していることが報告されている⁷²⁾⁷³⁾。

DosSとDosTは非常に似ている分子であるが、生化学的に決定的な違いが多くある。例えば、DosSとDosTはガス状のリガンドに対する結合親和性が異なる⁵²⁾。さらに、DosTはほとんど酸化されないが⁵¹⁾⁵²⁾、DosSはO₂により酸化されやすく⁵¹⁾、不安定な酸素クラスターを形成する⁵⁰⁾⁵²⁾⁷²⁾。*in vivo*でのDosSとDosTによる低酸素やレドックス感知の機構の解明はさらに今後研究が必要な領域である。

5. 鉄-硫黄クラスターをもつセンサータンパク質 WhiB

結核菌はDosレギュロンとは別に脂質合成関連遺伝子*pks2*や薬剤感受性に関係する*erm*遺伝子の制御を行っている別のレドックスセンサータンパク質WhiBをもっている。WhiBタンパク質は1992年にDavisとChaterによ

り*Streptomyces*属の胞子形成に関与する遺伝子として最初に報告された⁷⁴⁾。WhiBタンパク質はチオレドキシシンやマイコレドキシシンに似たチオール特異的な抗酸化機構もっている。また、鉄-硫黄クラスターをもちDNAに結合性をもつ。結核菌では放線菌のような胞子形成の現象は報告されていないが、結核菌には7つのWhiB様タンパク質(WhiB1~WhiB7)が存在する⁷⁵⁾⁷⁶⁾。結核菌のWhiB2は抗酸菌の隔膜形成と細胞分裂の制御に関係がある⁷⁷⁾。さらに他の*whiB*遺伝子(*whiB3*や*whiB7*)の産物はチオレドキシシン様活性⁷⁸⁾から抗酸化活性⁷⁹⁾、転写制御⁸⁰⁾まで様々な生理的な応答に関与していることが報告されている。

5.1 WhiBsによる結核菌の脂質合成酵素の制御

*WhiB3*変異体の脂質含量の解析からWhiB3は脂質産生を制御していることが明らかになった⁸⁰⁾。WhiB3はポリアセチルトレハロース(PAT)、ジアセチルトレハロース(DAT)、スルホリピド(SL-1)、トレハロースモノミコール酸(TMM)やトレハロースジミコール酸(TDM)等の結核菌の毒力に関係する脂質の産生を制御しており⁸⁰⁾、WhiB3は*pks2*(SL-1の生合成に必要)と*pks3*(PAT/DAT合成に必要)遺伝子のプロモーターに結合して転写制御している。DNA結合能はWhiBファミリー間で保存されているシステインのレドックス状態によって規定されている(Fig. 3, Fig. 4)。WhiBのO₂/NO感知能は抗酸菌のマクロファージ感染時や潜伏期におけるPks1/Pks3の増強に関係しているとの報告があり⁴⁴⁾、さらに、近年結核菌のWhiB4が酸素とNO感受性に鉄-硫黄クラスターが重要であるとの報告がされた⁸¹⁾。興味深いことにWhiB4変異体では細胞質内のNADHの蓄積によるレドックスバランスの調節が変わることや*in vivo*や*in vitro*での酸化ストレスに耐性になることが示されている。この変異体はモルモットの肺で病原性が増加することが示されている。

5.2 WhiBsはレドックス感受性の転写因子である

WhiBsはDNA結合性があり、 σ 因子であるSigA(RpoV)とも結合する⁸²⁾。また、WhiB3は脂質合成遺伝子*pks2*と*pks3*のプロモーターに特異的に結合できる⁸⁰⁾。WhiB3はO₂感受性をもち酸化により鉄-硫黄クラスター形成が変化することが知られている(Fig. 3)。EPR分光法を用いた解析から酸素がレドックス応答性の[4Fe-4S]²⁺クラスターを[3Fe-4S]¹⁺に変換すること、および、WhiB3がDNA結合タンパク質として機能するためには鉄-硫黄クラスターが最終的に壊滅されることが示されている⁸³⁾。酸化されたapo型WhiB3はholo型WhiB3や還元型apo型WhiB3よりもDNA結合能が高いことから、WhiB3がレドックス感受性のスイッチ機構として転写制御をしているモデルが提案されている⁸⁰⁾(Fig. 4)。

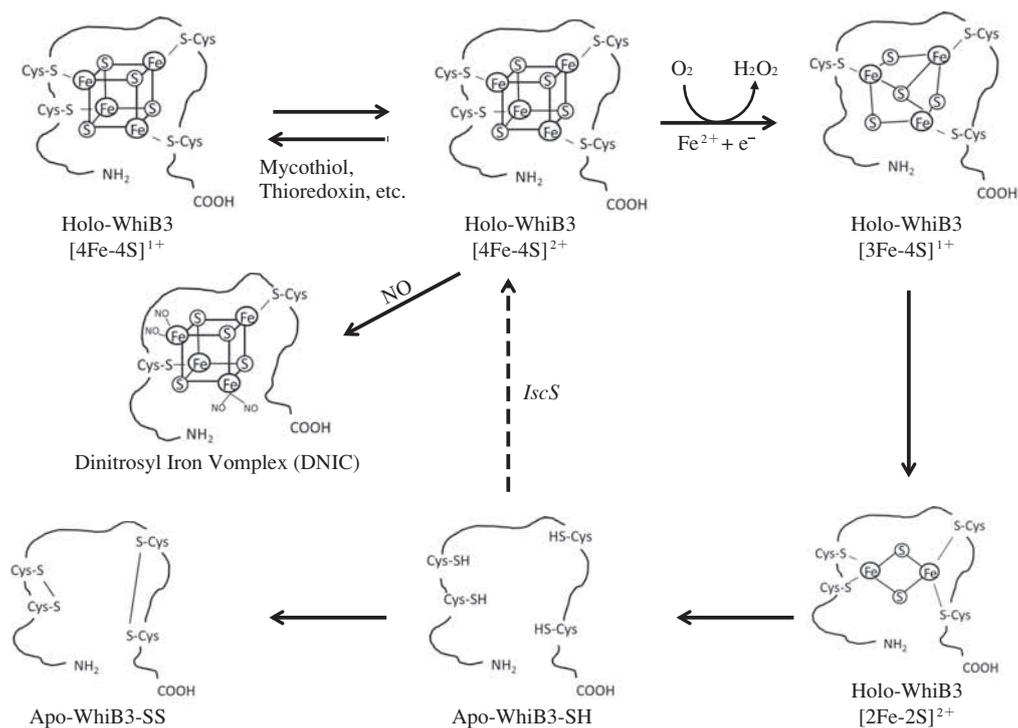


Fig. 3 Model of Fe-S cluster formation of WhiB3 regulated by redox

Under high concentrations of oxygen, WhiB3 [4Fe-4S]¹⁺ cluster is oxidized to WhiB3 [4Fe-4S]²⁺ and is consecutively converted into a WhiB3 [3Fe-4S]¹⁺ cluster accompanied with generation of H₂O₂. Thioredoxin and mycothiol may be involved in stabilizing the WhiB3 [4Fe-4S] cluster⁸⁴). The WhiB3 [3Fe-4S]¹⁺ yields WhiB3 [2Fe-2S]²⁺ intermediates, and then the cluster within WhiB3 was completely lost. Non cluster employed whiB3 protein is reduced WhiB3-SH state, or oxidized WhiB3-SS state. *IscS* converts apo-WhiB3 to WhiB3 [4Fe-4S]²⁺.

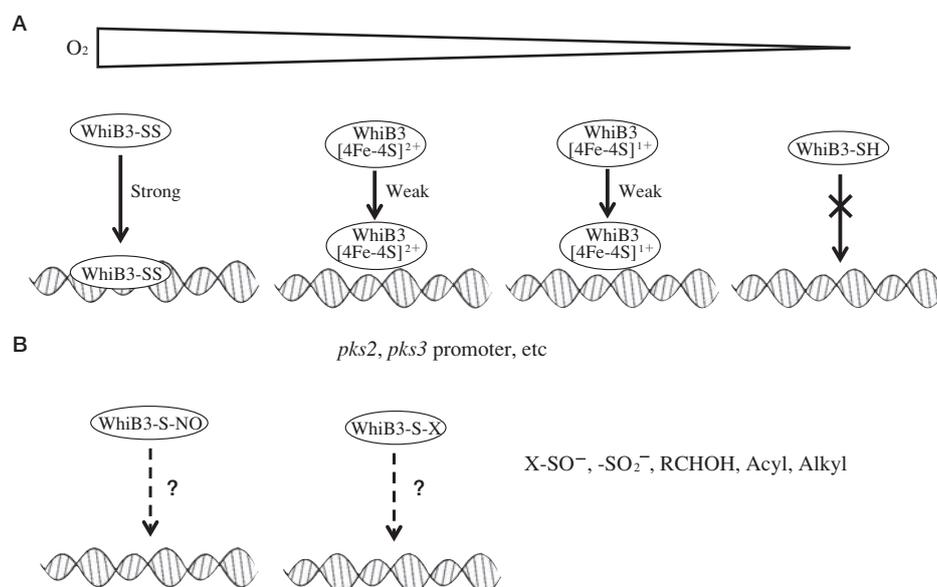


Fig. 4 DNA binding model of Fe-S cluster WhiB3 regulated by redox

(A) DNA binding activity of holo-WhiB3 and apo-WhiB3 is influenced by the redox state of the Fe-S cluster and by the oxidation states of the Cys residues, respectively. Oxidized apo-WhiB3 binds DNA strongly and holo-WhiB3 [4Fe-4S]¹⁺ or holo-WhiB3 [4Fe-4S]²⁺ binds DNA weakly, whereas reduced apo-WhiB3 does not bind DNA⁸⁰). (B) The modification of Cys residues to -SH, disulfide (-SS-), sulfenated (-S-NO), sulfoxidated (-S-X), or s-nitrosylated states, could also modulate DNA-binding activity.

他のWhiBファミリータンパク質の研究では、WhiB1の鉄-硫黄クラスターは酸素耐性でありNOとジニトロシルジチオラト鉄錯体(DNIC)を速やかに形成すること、holo型WhiB1([4Fe-4S]²⁺クラスター)はapo型WhiB1もしくはNOで処理したholo型WhiB1と比べてDNA結合親和性が低いことが示されている⁸⁴⁾。WhiB2についてはmycobacteriophage TM4のWhiBTM4(WhiBホモログ)のDNA結合能が示されている⁸⁵⁾。WhiB4についてはDNAのGC-rich領域に非特異的に結合する性質があり、その結果、転写が活性化されるとの報告がある⁸¹⁾。この研究では、酸化環境下ではholo型のWhiB4がapo型に変換されてWhiB4のDNA結合が増強された結果、転写抑制活性が誘導されるとしている。

これらの報告をまとめるとDNA結合活性はWhiBファミリーの共通の特徴であるが、鉄-硫黄クラスター形成と転写活性化については分子間で異なる。今後このWhiBファミリー間の違いとO₂、NOのナノセンサー機能との関連の解明が待たれる。

5.3 WhiBタンパク質は病原性とストレス応答因子である

WhiBタンパク質の転写活性化能と結核菌の毒力との関係について様々な報告がある。ヒト型結核菌弱毒株ではArg⁵¹⁵がHisに変わっているためRpoVと結合能が失われ、ヒト型結核菌強毒株のwhiB3変異体はモルモットやマウスモデルでは増殖できないことが報告されている⁸²⁾。M. aviumのWhiB2とWhiB3の発現は酸化状態やpHストレス下で上昇している⁸⁶⁾。さらに、マウスの肺やマクロファージではWhiB3の発現が感染初期に増加しており、WhiB3の発現様式は菌数密度に依存していることから“クオラムセンシング”による制御があることが示唆されている⁸⁷⁾。

WhiB7についてはMSH/MSSMのレベルに反応して誘導されることから菌のレドックス恒常性に直接関与していることが示されている⁸⁸⁾。また、WhiB7はerm遺伝子(エリスロマイシン・リボソーム・メチル基転移酵素をコードしている遺伝子)の転写因子としてマクロライド耐性に関係しており⁸⁹⁾、また他の研究からもwhiB7の変異体はマクロライド系薬に感受性が高くなることからマクロライド系薬の標的であることが示唆されている^{90)~92)}。今後WhiBタンパク質の転写やレドックス制御の役割の研究が進むことによりWhiBタンパク質の生理的機能の詳細が明らかになることが期待される。

6. おわりに

本総説は第89回日本結核病学会の教育講演で紹介したAshwani Kumarらの総説⁶⁾⁴⁶⁾をもとにレドックス関連分子の結核の休眠や再燃に関する知見の紹介と結核菌で

発見されたレドックスセンサーに焦点をあてた。今回紹介したDosレギュロンやWhiBsによるレドックスセンサー機構と生理的な役割の研究は結核のレドックス適応と病原の機構の解明に大きく貢献している。本稿では紙面の都合上紹介できなかったが、σファクターがpH変化にセンサータンパク質であるとの報告も多くされている。今後この分野の研究が発展することが楽しみである。センサーをターゲットとした創薬は未知の分野であり、さらなる発展が期待される。研究により見出された分子を利用した予防・診断・治療法や医薬品の開発が大いに期待できる。

謝 辞

教育講演の機会を与えて下さった第89回日本結核病学会会長 愛知医科大学教授の森下宗彦先生に深く感謝致します。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関して特になし。

文 献

- 1) Boon C, Dick T: How *Mycobacterium tuberculosis* goes to sleep: the dormancy survival regulator DosR a decade later. *Future Microbiol.* 2012; 7 (4) : 513-518.
- 2) Chim N, Johnson PM, Goulding CW: Insights into redox sensing metalloproteins in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Inorg Biochem.* 2014; 133 : 118-126.
- 3) Yamada Y, Saito H, Tomioka H, et al.: Susceptibility of micro-organisms to active oxygen species: sensitivity to the xanthine-oxidase-mediated antimicrobial system. *J Gen Microbiol.* 1987; 133 (8) : 2007-2014.
- 4) Yamada Y, Saito H, Tomioka H, et al.: Relationship between the susceptibility of various bacteria to active oxygen species and to intracellular killing by macrophages. *J Gen Microbiol.* 1987; 133 (8) : 2015-2021.
- 5) Kurthkoti K, Varshney U: Distinct mechanisms of DNA repair in mycobacteria and their implications in attenuation of the pathogen growth. *Mech Ageing Dev.* 2012; 133 (4) : 138-146.
- 6) Kumar A, Farhana A, Guidry L, et al.: Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control? *Expert Rev Mol Med.* 2011; 13 : e39.
- 7) Newton GL, Arnold K, Price MS, et al.: Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *J Bacteriol.* 1996; 178 (7) : 1990-1995.
- 8) Jaswal S, Dhand R, Sethi AK, et al.: Oxidative metabolic status of blood monocytes and alveolar macrophages in the spectrum of human pulmonary tuberculosis. *Scand J Clin Lab Invest.* 1992; 52 (2) : 119-128.
- 9) Kumar V, Jindal SK, Ganguly NK: Release of reactive oxygen and nitrogen intermediates from monocytes of

- patients with pulmonary tuberculosis. *Scand J Clin Lab Invest.* 1995 ; 55 (2) : 163–169.
- 10) Behar SM, Martin CJ, Booty MG, et al.: Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol.* 2011 ; 4 (3) : 279–287.
 - 11) Ohga S, Ikeuchi K, Kadoya R, et al.: Intrapulmonary *Mycobacterium avium* infection as the first manifestation of chronic granulomatous disease. *J Infect.* 1997 ; 34 (2) : 147–150.
 - 12) Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, et al.: Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med.* 1992 ; 175 (4) : 1111–1122.
 - 13) Corper HJ, Cohn ML: The viability and virulence of old cultures of tubercle bacilli; studies on 30-year-old broth cultures maintained at 37 degrees C. *Tubercle.* 1951 ; 32 (11) : 232–237.
 - 14) Wayne LG, Hayes LG: An *in vitro* model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun.* 1996 ; 64 (6) : 2062–2069.
 - 15) Bloch H, Segal W: Biochemical differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* grown *in vivo* and *in vitro*. *J Bacteriol.* 1956 ; 72 (2) : 132–141.
 - 16) Mansoor JR, Kibuga DK, Borgdorff MW: Altitude: a determinant for tuberculosis in Kenya? *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999 ; 3 (2) : 156–161.
 - 17) Olender S, Saito M, Apgar J, et al.: Low prevalence and increased household clustering of *Mycobacterium tuberculosis* infection in high altitude villages in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 ; 68 (6) : 721–727.
 - 18) Vree M, Hoa NB, Sy DN, et al.: Low tuberculosis notification in mountainous Vietnam is not due to low case detection: a cross-sectional survey. *BMC Infect Dis.* 2007 ; 7 : 109.
 - 19) Motus IY, Skorniakov SN, Sokolov VA, et al.: Reviving an old idea: can artificial pneumothorax play a role in the modern management of tuberculosis? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006 ; 10 (5) : 571–577.
 - 20) Park SK, Kim JH, Kang H, et al.: Pulmonary resection combined with isoniazid- and rifampin-based drug therapy for patients with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Int J Infect Dis.* 2009 ; 13 (2) : 170–175.
 - 21) Miller WT, MacGregor RR: Tuberculosis: frequency of unusual radiographic findings. *AJR Am J Roentgenol.* 1978 ; 130 (5) : 867–875.
 - 22) Woodring JH, Vandiviere HM, Fried AM, et al.: Update: the radiographic features of pulmonary tuberculosis. *AJR Am J Roentgenol.* 1986 ; 146 (3) : 497–506.
 - 23) Kaplan G, Post FA, Moreira AL, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect Immun.* 2003 ; 71 (12) : 7099–7108.
 - 24) Farrer PA: Caseating tuberculous granuloma of the neck presenting as an avascular “cold” thyroid nodule. *Clin Nucl Med.* 1980 ; 5 (11) : 519.
 - 25) Voskuil MI, Schnappinger D, Visconti KC, et al.: Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J Exp Med.* 2003 ; 198 (5) : 705–713.
 - 26) Firmani MA, Riley LW: Reactive nitrogen intermediates have a bacteriostatic effect on *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. *J Clin Microbiol.* 2002 ; 40 (9) : 3162–3166.
 - 27) Ohno H, Zhu G, Mohan VP, et al.: The effects of reactive nitrogen intermediates on gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol.* 2003 ; 5 (9) : 637–648.
 - 28) MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, et al.: Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 ; 94 (10) : 5243–5248.
 - 29) Jung YJ, LaCourse R, Ryan L, et al.: Virulent but not avirulent *Mycobacterium tuberculosis* can evade the growth inhibitory action of a T helper 1-dependent, nitric oxide synthase 2-independent defense in mice. *J Exp Med.* 2002 ; 196 (7) : 991–998.
 - 30) Flynn JL, Scanga CA, Tanaka KE, et al.: Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis. *J Immunol.* 1998 ; 160 (4) : 1796–1803.
 - 31) Shi L, Sohaskey CD, Kana BD, et al.: Changes in energy metabolism of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lung and under *in vitro* conditions affecting aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 ; 102 (43) : 15629–15634.
 - 32) Nicholson S, Bonecini-Almeida Mda G, Lapa e Silva JR, et al.: Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med.* 1996 ; 183 (5) : 2293–2302.
 - 33) Nozaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, et al.: Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect Immun.* 1997 ; 65 (9) : 3644–3647.
 - 34) Rich EA, Torres M, Sada E, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)-stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. *Tuberc Lung Dis.* 1997 ; 78 (5-6) : 247–255.
 - 35) Choi HS, Rai PR, Chu HW, et al.: Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 ; 166 (2) : 178–186.
 - 36) Wang CH, Liu CY, Lin HC, et al.: Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. *Eur Respir J.* 1998 ; 11 (4) : 809–815.
 - 37) Herbst S, Schaible UE, Schneider BE: Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS One.* 2011 ; 6 (5) : e19105.
 - 38) Raghuvanshi S, Sharma P, Singh S, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* evades host immunity by recruiting mesen-

- chymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 ; 107 (50) : 21653–21658.
- 39) Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, et al.: Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*. 1994 ; 263 (5147) : 678–681.
 - 40) Ohkuma S, Poole B: Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 ; 75 (7) : 3327–3331.
 - 41) Song H, Huff J, Janik K, et al.: Expression of the ompATb operon accelerates ammonia secretion and adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to acidic environments. *Mol Microbiol*. 2011 ; 80 (4) : 900–918.
 - 42) Wong D, Bach H, Sun J, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 ; 108 (48) : 19371–19376.
 - 43) Vandal OH, Pierini LM, Schnappinger D, et al.: A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med*. 2008 ; 14 (8) : 849–854.
 - 44) Rohde KH, Abramovitch RB, Russell DG: *Mycobacterium tuberculosis* invasion of macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues. *Cell Host Microbe*. 2007 ; 2 (5) : 352–364.
 - 45) Zhang Y, Scorpio A, Nikaïdo H, et al.: Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol*. 1999 ; 181 (7) : 2044–2049.
 - 46) Bhat SA, Singh N, Trivedi A, et al.: The mechanism of redox sensing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Free Radic Biol Med*. 2012 ; 53 (8) : 1625–1641.
 - 47) Deretic V, Philipp W, Dhandayuthapani S, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative-stress regulatory gene: implications for sensitivity to isoniazid. *Mol Microbiol*. 1995 ; 17 (5) : 889–900.
 - 48) Akhter Y, Tundup S, Hasnain SE: Novel biochemical properties of a CRP/FNR family transcription factor from *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Med Microbiol*. 2007 ; 297 (6) : 451–457.
 - 49) Rickman L, Scott C, Hunt DM, et al.: A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and controls transcription of the rpfA gene coding for a resuscitation promoting factor. *Mol Microbiol*. 2005 ; 56 (5) : 1274–1286.
 - 50) Ioanoviciu A, Yukl ET, Moenne-Loccoz P, et al.: DevS, a heme-containing two-component oxygen sensor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*. 2007 ; 46 (14) : 4250–4260.
 - 51) Kumar A, Toledo JC, Patel RP, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 ; 104 (28) : 11568–11573.
 - 52) Sousa EH, Tuckerman JR, Gonzalez G, et al.: DosT and DevS are oxygen-switched kinases in *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Sci*. 2007 ; 16 (8) : 1708–1719.
 - 53) Sivaramakrishnan S, de Montellano PR: The DosS-DosT/DosR Mycobacterial Sensor System. *Biosensors (Basel)*. 2013 ; 3 (3) : 259–282.
 - 54) Wayne LG: Dynamics of submerged growth of *Mycobacterium tuberculosis* under aerobic and microaerophilic conditions. *Am Rev Respir Dis*. 1976 ; 114 (4) : 807–811.
 - 55) Wayne LG, Sohaskey CD: Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Microbiol*. 2001 ; 55 : 139–163.
 - 56) Sherman DR, Voskuil M, Schnappinger D, et al.: Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha-crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 ; 98 (13) : 7534–7539.
 - 57) Boon C, Dick T: *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy. *J Bacteriol*. 2002 ; 184 (24) : 6760–6767.
 - 58) Park HD, Guinn KM, Harrell MI, et al.: Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 2003 ; 48 (3) : 833–843.
 - 59) Roberts DM, Liao RP, Wisedchaisri G, et al.: Two sensor kinases contribute to the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*. 2004 ; 279 (22) : 23082–23087.
 - 60) Saini DK, Malhotra V, Tyagi JS: Cross talk between DevS sensor kinase homologue, Rv2027c, and DevR response regulator of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Lett*. 2004 ; 565 (1-3) : 75–80.
 - 61) Kumar A, Deshane JS, Crossman DK, et al.: Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide induces the *Mycobacterium tuberculosis* dormancy regulon. *J Biol Chem*. 2008 ; 283 (26) : 18032–18039.
 - 62) Shiloh MU, Manzanillo P, Cox JS: *Mycobacterium tuberculosis* senses host-derived carbon monoxide during macrophage infection. *Cell Host Microbe*. 2008 ; 3 (5) : 323–330.
 - 63) Stewart V: Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1993 ; 9 (3) : 425–434.
 - 64) Sohaskey CD: Nitrate enhances the survival of *Mycobacterium tuberculosis* during inhibition of respiration. *J Bacteriol*. 2008 ; 190 (8) : 2981–2986.
 - 65) Tan MP, Sequeira P, Lin WW, et al.: Nitrate respiration protects hypoxic *Mycobacterium tuberculosis* against acid and reactive nitrogen species stresses. *PLoS One*. 2010 ; 5 (10) : e13356.
 - 66) Fritz C, Maass S, Kreft A, et al.: Dependence of *Mycobacterium bovis* BCG on anaerobic nitrate reductase for persistence is tissue specific. *Infect Immun*. 2002 ; 70 (1) :

- 286–291.
- 67) Watanabe S, Zimmermann M, Goodwin MB, et al.: Fumarate reductase activity maintains an energized membrane in anaerobic *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. 2011 ; 7 (10) : e1002287.
- 68) He H, Bretl DJ, Penoske RM, et al.: Components of the Rv0081-Rv0088 locus, which encodes a predicted formate hydrogenlyase complex, are coregulated by Rv0081, MprA, and DosR in *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 2011 ; 193 (19) : 5105–5118.
- 69) Leistikow RL, Morton RA, Bartek IL, et al.: The *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy. J Bacteriol. 2010 ; 192 (6) : 1662–1670.
- 70) Baek SH, Li AH, Sasseti CM: Metabolic regulation of mycobacterial growth and antibiotic sensitivity. PLoS Biol. 2011 ; 9 (5) : e1001065.
- 71) Sardiwal S, Kendall SL, Movahedzadeh F, et al.: A GAF domain in the hypoxia/NO-inducible *Mycobacterium tuberculosis* DosS protein binds haem. J Mol Biol. 2005 ; 353 (5) : 929–936.
- 72) Yukl ET, Ioanoviciu A, de Montellano PR, et al.: Interdomain interactions within the two-component heme-based sensor DevS from *Mycobacterium tuberculosis*. Biochemistry. 2007 ; 46 (34) : 9728–9736.
- 73) Yukl ET, Ioanoviciu A, Nakano MM, et al.: A distal tyrosine residue is required for ligand discrimination in DevS from *Mycobacterium tuberculosis*. Biochemistry. 2008 ; 47 (47) : 12532–12539.
- 74) Davis NK, Chater KF: The *Streptomyces coelicolor* whiB gene encodes a small transcription factor-like protein dispensable for growth but essential for sporulation. Mol Gen Genet. 1992 ; 232 (3) : 351–358.
- 75) Soliveri JA, Gomez J, Bishai WR, et al.: Multiple paralogous genes related to the *Streptomyces coelicolor* developmental regulatory gene whiB are present in Streptomyces and other actinomycetes. Microbiology. 2000 ; 146 (Pt 2) : 333–343.
- 76) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998 ; 393 (6685) : 537–544.
- 77) Gomez JE, Bishai WR: whmD is an essential mycobacterial gene required for proper septation and cell division. Proc Natl Acad Sci USA. 2000 ; 97 (15) : 8554–8559.
- 78) Alam MS, Garg SK, Agrawal P: Molecular function of WhiB4/Rv3681c of *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv: a [4Fe-4S] cluster co-ordinating protein disulphide reductase. Mol Microbiol. 2007 ; 63 (5) : 1414–1431.
- 79) Kim TH, Park JS, Kim HJ, et al.: The whcE gene of *Corynebacterium glutamicum* is important for survival following heat and oxidative stress. Biochem Biophys Res Commun. 2005 ; 337 (3) : 757–764.
- 80) Singh A, Crossman DK, Mai D, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid anabolism to modulate macrophage response. PLoS Pathog. 2009 ; 5 (8) : e1000545.
- 81) Chawla M, Parikh P, Saxena A, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* WhiB4 regulates oxidative stress response to modulate survival and dissemination *in vivo*. Mol Microbiol. 2012 ; 85 (6) : 1148–1165.
- 82) Steyn AJ, Collins DM, Hondalus MK, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for *in vivo* growth. Proc Natl Acad Sci USA. 2002 ; 99 (5) : 3147–3152.
- 83) Singh A, Guidry L, Narasimhulu KV, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 responds to O₂ and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival. Proc Natl Acad Sci USA. 2007 ; 104 (28) : 11562–11567.
- 84) Smith LJ, Stapleton MR, Fullstone GJ, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* WhiB1 is an essential DNA-binding protein with a nitric oxide-sensitive iron-sulfur cluster. Biochem J. 2010 ; 432 (3) : 417–427.
- 85) Rybniker J, Nowag A, van Gumpel E, et al.: Insights into the function of the WhiB-like protein of mycobacteriophage TM4—a transcriptional inhibitor of WhiB2. Mol Microbiol. 2010 ; 77 (3) : 642–657.
- 86) Wu CW, Schmoller SK, Shin SJ, et al.: Defining the stressome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* *in vitro* and in naturally infected cows. J Bacteriol. 2007 ; 189 (21) : 7877–7886.
- 87) Banaiee N, Jacobs WR Jr., Ernst JD: Regulation of *Mycobacterium tuberculosis* whiB3 in the mouse lung and macrophages. Infect Immun. 2006 ; 74 (11) : 6449–6457.
- 88) Burian J, Ramon-Garcia S, Sweet G, et al.: The mycobacterial transcriptional regulator whiB7 gene links redox homeostasis and intrinsic antibiotic resistance. J Biol Chem. 2012 ; 287 (1) : 299–310.
- 89) Nash KA: Intrinsic macrolide resistance in *Mycobacterium smegmatis* is conferred by a novel erm gene, erm (38). Antimicrob Agents Chemother. 2003 ; 47 (10) : 3053–3060.
- 90) Morris RP, Nguyen L, Gatfield J, et al.: Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA. 2005 ; 102 (34) : 12200–12205.
- 91) Geiman DE, Raghunand TR, Agarwal N, et al.: Differential gene expression in response to exposure to antimycobacterial agents and other stress conditions among seven *Mycobacterium tuberculosis* whiB-like genes. Antimicrob Agents Chemother. 2006 ; 50 (8) : 2836–2841.
- 92) Fu LM, Shinnick TM: Genome-wide exploration of the drug action of capreomycin on *Mycobacterium tuberculosis* using Affymetrix oligonucleotide GeneChips. J Infect. 2007 ; 54 (3) : 277–284.
- 93) Zhang Y, Lathigra R, Garbe T, et al.: Genetic analysis of superoxide dismutase, the 23 kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol. 1991 ; 5 (2) : 381–391.
- 94) Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, et al.: Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth.

- Infect Immun. 1991 ; 59 (6) : 1905-1910.
- 95) Edwards KM, Cynamon MH, Voladri RK, et al.: Iron-cofactored superoxide dismutase inhibits host responses to *Mycobacterium tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med. 2001 ; 164 (12) : 2213-2219.
- 96) Piddington DL, Fang FC, Laessig T, et al.: Cu, Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. Infect Immun. 2001 ; 69 (8) : 4980-4987.
- 97) Jackett PS, Aber VR, Lowrie DB: The susceptibility of strains of *Mycobacterium tuberculosis* to catalase-mediated peroxidative killing. J Gen Microbiol. 1980 ; 121 (2) : 381-386.
- 98) Knox R, Meadow PM, Worssam AR: The relationship between the catalase activity, hydrogen peroxide sensitivity, and isoniazid resistance of mycobacteria. Am Rev Tuberc. 1956 ; 73 (5) : 726-734.
- 99) Wilson TM, Collins DM: ahpC, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Mol Microbiol. 1996 ; 19 (5) : 1025-1034.
- 100) Master SS, Springer B, Sander P, et al.: Oxidative stress response genes in *Mycobacterium tuberculosis*: role of ahpC in resistance to peroxynitrite and stage-specific survival in macrophages. Microbiology. 2002 ; 148 (Pt 10) : 3139-3144.
- 101) Zhang Z, Hillas PJ, Ortiz de Montellano PR: Reduction of peroxides and dinitrobenzenes by *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin and thioredoxin reductase. Arch Biochem Biophys. 1999 ; 363 (1) : 19-26.
- 102) Jaeger T: Peroxiredoxin systems in mycobacteria. Subcell Biochem. 2007 ; 44 : 207-217.
- 103) Hu Y, Coates AR: Acute and persistent *Mycobacterium tuberculosis* infections depend on the thiol peroxidase Tpx. PLoS One. 2009 ; 4 (4) : e5150.
- 104) St John G, Brot N, Ruan J, et al.: Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. Proc Natl Acad Sci USA. 2001 ; 98 (17) : 9901-9906.
- 105) Goulding CW, Apostol MI, Gleiter S, et al.: Gram-positive DsbE proteins function differently from Gram-negative DsbE homologs. A structure to function analysis of DsbE from *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem. 2004 ; 279 (5) : 3516-3524.
- 106) Chim N, Riley R, The J, et al.: An extracellular disulfide bond forming protein (DsbF) from *Mycobacterium tuberculosis*: structural, biochemical, and gene expression analysis. J Mol Biol. 2010 ; 396 (5) : 1211-1226.
- 107) Patel MP, Blanchard JS: Expression, purification, and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* mycothione reductase. Biochemistry. 1999 ; 38 (36) : 11827-11833.
- 108) Patel MP, Blanchard JS: *Mycobacterium tuberculosis* mycothione reductase: pH dependence of the kinetic parameters and kinetic isotope effects. Biochemistry. 2001 ; 40 (17) : 5119-5126.
- 109) Sakuda S, Zhou ZY, Yamada Y: Structure of a novel disulfide of 2-(N-acetylcysteiny)amido-2-deoxy-alpha-D-glucopyranosyl-myoinositol produced by *Streptomyces* sp. Biosci Biotechnol Biochem. 1994 ; 58 (7) : 1347-1348.
- 110) Spies HS, Steenkamp DJ: Thiols of intracellular pathogens. Identification of ovoidiol A in *Leishmania donovani* and structural analysis of a novel thiol from *Mycobacterium bovis*. Eur J Biochem. 1994 ; 224 (1) : 203-213.
- 111) Buchmeier NA, Newton GL, Koledin T, et al.: Association of mycothiol with protection of *Mycobacterium tuberculosis* from toxic oxidants and antibiotics. Mol Microbiol. 2003 ; 47 (6) : 1723-1732.
- 112) Buchmeier NA, Newton GL, Fahey RC: A mycothiol synthase mutant of *Mycobacterium tuberculosis* has an altered thiol-disulfide content and limited tolerance to stress. J Bacteriol. 2006 ; 188 (17) : 6245-6252.
- 113) Rahman I, Gilmour PS, Jimenez LA, et al.: Ergothioneine inhibits oxidative stress- and TNF-alpha-induced NF-kappa B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2003 ; 302 (4) : 860-864.
- 114) Paul BD, Snyder SH: The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. Cell Death Differ. 2010 ; 17 (7) : 1134-1140.
- 115) Akif M, Khare G, Tyagi AK, et al.: Functional studies of multiple thioredoxins from *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 2008 ; 190 (21) : 7087-7095.
- 116) Shi L, Sohaskey CD, North RJ, et al.: Transcriptional characterization of the antioxidant response of *Mycobacterium tuberculosis in vivo* and during adaptation to hypoxia *in vitro*. Tuberculosis (Edinb). 2008 ; 88 (1) : 1-6.
- 117) Ouellet H, Ranguelova K, Labarre M, et al.: Reaction of *Mycobacterium tuberculosis* truncated hemoglobin O with hydrogen peroxide: evidence for peroxidatic activity and formation of protein-based radicals. J Biol Chem. 2007 ; 282 (10) : 7491-7503.
- 118) Pathania R, Navani NK, Gardner AM, et al.: Nitric oxide scavenging and detoxification by the *Mycobacterium tuberculosis* haemoglobin, HbN in *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2002 ; 45 (5) : 1303-1314.

Review Article (The 89th Annual Meeting Educational Lecture)

SENSORS IN MYCOBACTERIA FOR THE DETECTION OF REDOX STRESS

Takemasa TAKII

Abstract *Mycobacterium* species are exposed to oxidative and nitrosylative stress from environments within and outside the host cells. After the host is infected with the bacilli, macrophages produce superoxide molecules via NADPH oxidase activity and nitric oxide (NO) via inducible NO synthase activity to kill the bacilli. The pathogenic bacilli can successfully survive in host cells via anti-oxidative and anti-nitrosylative mechanisms. In particular, *Mycobacterium tuberculosis* persists pose a great problem for chemotherapy because most anti-mycobacterial drugs are ineffective against mycobacteria that are in the persistent state. In accordance with the changes in redox balance, the bacilli change their metabolic pathways from aerobic to anaerobic ones, thereby leading to a change from an actively growing state to a dormant state. Therefore, *M. tuberculosis* is expected to be equipped with sensors that detect redox stress in the environment such that it can switch to the dormant state and change

its metabolic pathways accordingly. In this review, roles of the mycobacterial O₂, NO, and CO gas sensors, DosS and DosT, consisting of the DosR regulon, and mycobacterial DNA binding proteins WhiBs, which contain iron-sulfur clusters, in latent infection are discussed.

Key words: Redox, DosS, DosT, DosR regulon, WhiBs

Department of Hygienic Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

Correspondence to: Takemasa Takii, Department of Hygienic Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1, Tanabe, Mizuho-ku, Nagoya-shi, Aichi 467-8603 Japan.

(E-mail: ttakii@phar.nagoya-cu.ac.jp)