

200829039A

厚生労働科学研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業

持続性結核菌感染の病原性や発症に関わる  
分子機構の解明及び治療・予防の基礎研究

(H20-新興-一般-005)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成21 (2009) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業

持続性結核菌感染の病原性や発症に関わる  
分子機構の解明及び治療・予防の基礎研究

(H20-新興-一般-005)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成21 (2009) 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
持続性結核菌感染の病原性や発症に関わる分子機構の 解明及び治療・予防の基礎研究 小林 和夫	1
II. 分担研究報告	
休眠抗酸菌と宿主応答 小林 和夫	11
休眠結核菌の蛋白質発現と長期生存の分子機序に関する 研究 松本 壮吉	15
休眠結核菌の糖脂質代謝と免疫応答に関する研究 杉田 昌彦	19
休眠性非結核性抗酸菌における菌体構成分子の解析 宮本 友司	23
休眠期結核菌由来遺伝子を用いたDNAワクチンの 開発研究 小出 幸夫	27
持続性潜在結核菌感染を検出する臨床診断法の開発に 関する研究 前倉 亮治	31
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	37

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
総括研究報告書

持続性結核菌感染の病原性や発症に関わる分子機構の解明及び治療・予防の基礎研究  
(H20-新興-一般-010)

研究代表者	小林 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・部長)
研究分担者	松本 壮吉	(大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・准教授)
研究分担者	杉田 昌彦	(京都大学ウイルス研究所細胞制御研究分野・教授)
研究分担者	宮本 友司	(国立感染症研究所ハンセン病研究センター病原微生物部・主任研究官)
研究分担者	小出 幸夫	(浜松医科大学・理事、感染症学・教授)
研究分担者	前倉 亮治	(国立病院機構刀根山病院・副院長)
研究協力者	阿戸 学	(国立感染症研究所・免疫部・第二室長)
研究協力者	大原 直也	(国立感染症研究所・免疫部・第四室長)
研究協力者	大西 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・主任研究官)
研究協力者	高橋 宜聖	(国立感染症研究所・免疫部・主任研究官)
研究協力者	岡部 真裕子	(国立感染症研究所・免疫部・第四研究員)
研究協力者	菅原 勇	(結核研究所・抗酸菌レファレンス部・病理検査科長)
研究協力者	松本 真	(大塚製薬微生物研究所・所長)
研究協力者	藤原 永年	(大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・講師)
研究協力者	北田 清悟	(国立病院機構刀根山病院・呼吸器内科医長)

### 研究要旨

潜在性持続結核菌感染には「結核菌」と「宿主」の要因が関与し、成立していることが考えられる。しかし、活動性結核の発病は感染者の約 10% であり、発病に対する宿主防御機構の解明は結核対策に寄与することが考えられる。代謝の低下した持続感染（休眠）菌における「蛋白質、脂質や糖脂質」発現が明らかとなった。結核菌類縁 *Mycobacterium avium* complex 由来糖ペプチド脂質抗原は宿主に液性（抗体）免疫応答を誘導し、活動性 MAC 感染症の血清診断に有用な抗原であるが、潜在性 MAC 感染を検出することはできなかった。抗酸菌感染における内因性再燃を抑制するワクチン開発に関し、休眠菌に発現が増強する DNA ワクチンライブラリーの約 90% が整備した。これらの新知見を基盤として、今後、潜在性持続結核菌感染の診断・治療・予防の開発を推進する。

### A. 研究目的

世界で約 20 億人（日本：2,500 万人）が結核菌に既感染、920 万人（日本：2,5 万人）が結核を発病、200 万人（日本：2,2 千人）が死亡し、現在でも、結核は甚大な健康被害を提供している（2007 年）。

結核の発症機序には「感染後早期に発症する一次性結核」、「潜在性感染から発症する二次性結核（内因性再燃）」や「既感

染宿主に再感染し発病（外来性再感染）」があるが、成人結核のほとんどは「内因性再燃」に起因している。潜在性感染機序の解明は新規抗結核薬や感染曝露後（治療的）ワクチン開発を促進し、結核制圧に寄与することが期待される。

本研究では、潜在性感染における発症に関わる宿主および菌の分子機構を解明し、病態の理解、診断・治療やワクチン標的候

補の探索を目的とした。

担当者	研究課題
小林 和夫	休眠抗酸菌に対する宿主免疫応答
松本 壮吉	休眠結核菌の蛋白質発現と長期生存の分子機序
杉田 昌彦	休眠結核菌の糖脂質代謝と免疫応答
小出 幸夫	休眠結核菌由来遺伝子を用いた DNA ワクチンの開発研究
宮本 友司	休眠性非結核性抗酸菌における菌体構成分子の解析
前倉 亮治	持続性抗酸菌感染における臨床診断法の開発

## B. 研究方法

### 脂質や糖脂質解析

結核菌や類縁抗酸菌 *Mycobacterium avium* complex の細胞壁から、2 次元薄層クロマトグラフィー (TLC)、イオンクロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーや質量分析計を用いて、リン脂質や糖脂質を分離・精製し、構造解析した。

### 遺伝子発現解析

DNA マイクロアレイによる増殖期—休眠期の抗酸菌における遺伝子発現の比較はアレイチップ (Roche Diagnostics 社) を用いて行った。ハイブリダイゼーション装置は MAUI (BioMicro 社) を、解析装置は GenePix 4000B (Axon 社)、シグナル解析は NimbleScan ver2.3 (Nimblegen 社) を用いて行った。得られたデータの解析は GeneSpring (アジレント・テクノロジー株式会社) を用いた。

### 薬剤感受性試験

抗微生物薬 (リファンピシン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール) 添加培地に接種後、2 日間培養した。その後、菌を寒天培地に接種し、生菌数を比較した。同様に、Wayne dormant model (低酸素環境) で培養した菌株を薬剤添加培地を用いて、嫌氣的に 2 日間培養した。その後、菌を寒天培地に接種し、生菌数を比較した。

### ミコール酸転移酵素活性の測定

すでに報告された方法 (Lett. Appl. Microbiol. 34: 233, 2002) に準拠し、酵素としてリコンビナント Ag85A タンパク質、基

質として精製 TMM および D-グルコースを用いて 37°C、1 時間の反応を行った。反応後、抽出した脂質を TLC プレート上に展開し、50% 硫酸を噴霧してオープン中で焼き付けることにより生成物を検出した。

### DNA ワクチンの作製と免疫

結核菌ゲノム情報に基づき、DosR regulon 蛋白および Rfp 蛋白をコードする遺伝子を PCR によって単離し、哺乳類細胞用の発現ベクターである pCI に挿入し、DNA ワクチン・ライブラリーを作成した。また、それと平行して目的遺伝子を pET28b ベクターに挿入し、大腸菌発現系によって目的蛋白を調製した。遺伝子銃を用いて、作成した DNA ワクチンでマウス (BALB/c および C57BL/6) を免疫 (2 µg、2 週間隔で 3 回) した。最終免疫 2 週間後、免疫マウスの脾細胞を対応する組換え蛋白で 37°C、48 時間刺激し、培養上清中の IFN-γ 産生を指標として、免疫の効果を検討した。

### Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) の T 細胞エピトープの同定

MDP1 遺伝子を pCI に挿入し、マウス (BALB/c、C57BL/6 および C3H/He) を免疫した。免疫マウスの脾細胞をオーバーラッピング・ペプチド (20 mer) で刺激し、IFN-γ 産生を指標として、免疫の効果と T 細胞エピトープを検討した。さらに、同定した候補ペプチドについては、BIMAS / SYFPEITHI / RANKPEP の 3 つのアルゴリズムの予想に基づいて、より短い抗原ペプチドを合成し、T 細胞応答を検討して最小エピトープを決定した。

### オリゴマンノース被覆リポソーム (OML) による免疫効果の増強

Ovalbumin (OVA) を封入した OML で C57BL/6 マウスを免疫 (2 週間隔で腹腔内注射、3 回) し、その抗原特異的免疫誘導能を検討した。免疫マウスの脾細胞を H-2K<sup>b</sup> 拘束性の OVA ペプチド (257-264 番目のアミノ酸) で刺激して細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導し、非免疫マウスまたは OML 非被覆リポソーム封入 OVA で免疫したマウスの脾細胞と誘導効率を比較した。CTL 活性の測定には OVA 遺伝子導入 EL4 細胞 (EG.7-OVA) と EL4 細胞を用いた。さらに、免疫マウスに EG.7-OVA と EL4 を接種し、マウスの生存を観察した。

持続性潜在結核菌感染を検出する臨床診断法の開発

抗酸菌糖脂質抗原 (TBGL)、リポアラビノマンナン (LAM) に対する抗酸菌抗体・末梢血インターフェロン遊離試験 (QFT-2G)・*Mycobacterium avium* complex 糖ペプチド脂質抗原 (GPL-core) 抗体を測定した。

#### 倫理面への配慮

生命倫理、動物愛護や遺伝子組換え実験、また、安全対策の観点から、機関で定められた規定に準拠し、機関で承認を得て遂行した。なお、利益相反はなかった。

### C. 研究結果

#### 結核菌の糖脂質解析

増殖分裂や代謝活性の低下した休眠期結核菌の糖脂質発現に関し、細胞壁糖脂質構成を解析した。菌種 (結核菌 H37Rv、H37Ra や Aoyama B 株) により、糖脂質発現が異なることが判明した。しかし、リン脂質は 3 菌種に質的な相異を認めなかった。

結核菌細胞壁表層を構築する糖脂質群は宿主環境との接点に存在することから、宿主との相互作用の結果としてダイナミックに変容し、感染病態の形成に深く関わると考えられる。とりわけ、休眠菌のように年余にわたって宿主環境に暴露される場合、人工培養菌とは異なる糖脂質代謝とそれに対する宿主応答の存在が想定される。通常の人工培地に比して生体内環境では高濃度のグルコースが存在することに着目し、グルコース依存的に誘起されるミコール酸含有糖脂質の変化を追究した。その結果、生体内や生体内環境を模倣した人工培地で増殖した菌は、自然免疫刺激活性の強いトレハロースジミコール酸 (TDM) が活性の弱いグルコースモノミコール酸 (GMM) に置換され、宿主自然免疫系の活性化を抑制していることを見いだした。一方、新たに生成された GMM は CD1b 分子を介して T 細胞に提示され、宿主獲得免疫系の標的となることが示された。これらの事実は、GMM 特異的免疫応答の検証が、潜伏感染の免疫病態の理解に不可欠であることを示唆している。

#### *Mycobacterium avium* complex 特異的細胞壁糖ペプチド脂質 (MAC-GPL) の解析

MAC-GPL に対し、ヒト感染宿主は特異的抗体免疫応答を表現した。この免疫応答を利用し、活動性 MAC 感染症の試作血清診断キット (抗 MAC-GPL 抗体の検出) を既に開発した。診断キットの感度は 84%、特異度は 100% であり、臨床応用に向け、申請を進めている。しかし、潜在性 MAC 感染症に関し、検出は困難であった。本研究において、MAC-GPL 抗原 (血清型 8、12 と 16) の生合成系の解明に着手した。その結果、グルコース残基形成酵素群 (3 種)、新規メチル基転移酵素 (2 種)、糖転移酵素 (3 種)、アシル基転移酵素 (1 種) およびアミノ基転移酵素 (1 種) の存在が判明した。

#### 抗酸菌蛋白質発現

休眠期結核菌は抗酸菌 DNA 結合蛋白質 1 (MDP1)、alpha crystalline-like protein (Acr)、heat-stress-induced ribosome binding protein A (HrpA、Acr2) や heparin binding hemagglutinin (HBHA) を発現した。他方、分裂増殖期結核菌は early secreted antigen target 6 kDa (ESAT-6) や culture-filtrate protein 10 kDa (CFP-10) を発現した。これらの遺伝子をクローニングし、DNA 配列を確認後、大腸菌 BL21 株に各プラスミドを導入し、各蛋白質が発現することを確認した。

休眠期抗酸菌に大量に発現しているヒストン様蛋白質 MDP1 について、その有無による増殖期と休眠期の蛋白質発現の変化をマイクロアレイにて観察した。その結果、細菌の基礎代謝を担う酵素群の発現が、MDP1 の欠失により休眠時に顕著に抑制されることが判明した。また、休眠時において MDP1 の欠失による薬剤感受性の低下が認められた。これらの結果から、MDP1 が休眠時において薬剤標的となるような菌の生存維持に必要な代謝活動を維持し、菌の長期生存を保証している分子であることが判明した。

#### DNA ワクチンの作製と免疫

成人結核のほとんどが内因性再燃に起因するため、結核菌の再燃を抑制する新規ワクチンの開発を計画した。潜伏期の結核菌

が発現する DosR regulon 蛋白 (48 種) および結核菌の再活性化に關与する Resuscitation promoting factor 蛋白 (5 種) を候補抗原として、DNA ワクチン・ライブラリーの作製を進め約 9 割を完成した。さらに、一部についてはマウスに免疫を施してスクリーニングを開始した。上記の候補抗原に先行し、結核菌の休眠期に高発現する MDP1 に対する細胞性免疫応答をマウスで検討し、C57BL/6 の最小 CD8<sup>+</sup> T 細胞エピトープおよび BALB/c の最小 CD4<sup>+</sup> T 細胞エピトープをそれぞれ 1 つ決定した。また、将来同定できた候補抗原蛋白を用いて、より効率良い免疫応答を誘導すべく、新たな抗原デリバリーシステムとして、オリゴマンノース被覆リポソームを開発した。

#### 持続性潜在結核菌感染を検出する臨床診断法の開発

肺結核の既往歴を持ち抗酸菌潜在感染が疑われる 270 例から血清検体が得られ、抗酸菌糖脂質抗原 (TBGL)、リポアラビノマンナン (LAM) に対する血清抗酸菌抗体・末梢血インターフェロン遊離試験 (QFT-2G) ・ *Mycobacterium avium* complex 糖ペプチド脂質抗原 (GPL-core) 抗体を測定した。このうち 31 検体を抽出し、新規抗原; 1) ESAT-6 (結核菌の増殖期に発現)、2) CFP10 (増殖期に発現)、3) MDP1 (常に発現、休眠期に増強)、4) Acr (低酸素で誘導)、5) GlnA1 (低酸素で誘導)、6) HSP(Rv0251c (後期休眠期に発現) や 7) Rv2658c (後期休眠期に発現) を用いて、臨床診断法として最も適切な抗原の組み合わせを検討中である。

#### D. 考察

潜在性結核菌感染には「結核菌」と「宿主」の要因が關与し、成立していることが考えられる。しかし、活動性結核の発病は感染者の約 10% であり、発病に対する宿主防御機構の解明は結核対策に寄与することが考えられる。さらに、潜在性結核菌感染者を早期に発見し、治療・予防介入することにより、結核の発病を未然に防止することが可能となる。

今年度、結核菌など抗酸菌要因の解明に成果が挙げられる。特に、代謝の低下した持続感染 (休眠) 菌における「蛋白質、脂質や糖脂質」発現が明らかとなった。休眠菌の蛋白質 (遺伝子) 発現として、抗酸菌 DNA 結合蛋白質 1、Acr、HrpA (Acr2) や HBHA を発現した。他方、分裂・増殖期菌は ESAT-6 や CFP-10 を発現し、対比的である。すなわち、ESAT-6 や CFP-10 蛋白質は潜在性感染を検出する際、感度に疑問が生ずる。

休眠菌における「脂質や糖脂質 (9 kcal/g)」は分裂・増殖期菌における活発な「糖代謝 (4 kcal/g)」から代謝交換を図り、エネルギー効率に寄与する可能性がある。結核菌など抗酸菌の生物学的特徴は一般細菌に比し、構成成分として脂質や糖脂質が豊富であり、休眠に適した菌であると考えられる。

休眠菌の「脂質、糖脂質や蛋白質」に対する宿主応答の解明は今後の課題となる。MAC-GPL 抗原は宿主液性 (抗体) 免疫応答を誘導し、活動性 MAC 感染症の血清診断に有用な抗原であるが、潜在性 MAC 感染を検出することはできなかった。MAC-GPL の生合成系や生物学的意義を解明し、持続潜在感染 MAC における GPL の性状から持続潜在感染 MAC 感染の診断に発展させたい。

現行 BCG ワクチンは内因性再燃を発症機序とした成人結核に対する有効性は疑問視されている。この課題を克服するため、抗酸菌感染における内因性再燃を抑制するワクチン開発を本研究に加えている。休眠菌に発現する蛋白質、脂質や糖脂質はワクチン抗原候補と考えられる。蛋白質に関し、DNA ワクチンライブラリーの約 90% が整備され、今後、検証実験を推進する。

#### E. 結論

・ 持続潜伏感染の分子機構、特に、菌情報に関し、低酸素環境で誘導した休眠菌から、糖脂質・遺伝子・蛋白質発現や精製に成功した。

・ MAC-GPL 抗原を用いた血清診断は潜在

性 MAC 感染を検出しなかった。

・新規診断や予防方法の開発に向け、今年度の成果は基盤を提供した。

## F. 健康危険情報

世界で約 20 億人（日本：2,500 万人）が結核菌に無症候性持続感染、920 万人（日本：2,5 万人）が結核を発病、200 万人（日本：2,2 千人）が死亡し、現在でも、結核は甚大な健康被害を提供している（2007 年）。潜在性持続結核菌感染は今後の結核対策に重要である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kitada, S., **K. Kobayashi**, S. Ichiyama, S. Takakura, M. Sakatani, K. Suzuki, T. Takashima, T. Nagai, I. Sakurabayashi, M. Ito, and **R. Maekura**. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium*-complex pulmonary disease using an enzyme immunoassay kit. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177: 793-797, 2008.
- 2) Nakata, N., N. Fujiwara, T. Naka, I. Yano, **K. Kobayashi**, and S. Maeda. 2008. Identification and characterization of two novel methyltransferase genes that determine the serotype 12-specific structure on glycopeptidolipids of *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 190: 1064-1071, 2008.
- 3) Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, **K. Kobayashi**, M. Makino, **S. Matsumoto**, H. Ogura, and S. Maeda. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 190: 3613-3621, 2008.
- 4) Nishimura, J., H. Saiga, S. Sato, M. Okuyama, H. Kayama, H. Kuwata, **S. Matsumoto**, T. Nishida, Y. Sawa, S. Akira, Y. Yoshikai, M. Yamamoto, and K. Takeda. 2008. Potent anti-mycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J. Immunol.* 180:4032-4039.
- 5) Saiga H., Nishimura J, Kuwata H, Okuyama M, **Matsumoto S**, Sato S, Matsumoto M, Akira S, Yoshikai Y, Honda K, Yamamoto M and K Takeda. 2008. Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J. Immunol.* 181: 8521-8527.
- 6) Hava, D.L., N. van der Wel, N. Cohen, C.C. Dascher, D. Houben, L. Leon, S. Agarwal, **M. Sugita**, M. van Zon, S.C. Kent, H. Shams, P.J. Peters, and M.B. Brenner. 2008. Evasion of peptide, but not lipid antigen presentation, through pathogen-induced dendritic cell maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 11281-11286.
- 7) Matsunaga, I., T. Naka, R.S. Talekar, M.J. McConnell, K. Katoh, H. Nakao, A. Otsuka, S.M. Behar, I. Yano, D.B. Moody, and **M. Sugita**. 2008. Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 283: 28835-28841.
- 8) Matsunaga, I., T. Komori, A. Ochi, N. Mori, and **M. Sugita**. 2008. Identification of antibody responses to the serotype-nonspecific molecular species of glycopeptidolipids in *Mycobacterium avium* infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 165-169.
- 9) Morita, D., K. Katoh, T. Harada, Y. Nakagawa, I. Matsunaga, T. Miura, A. Adachi, T. Igarashi, and **M. Sugita**. 2008. Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 889-893.
- 10) Otsuka, A., I. Matsunaga, T. Komori, K. Tomita, Y. Toda, T. Manabe, Y. Miyachi, and **M. Sugita**. 2008. Trehalose dimycolate elicits eosinophilic skin hypersensitivity in mycobacteria-infected guinea pigs. *J. Immunol.* 181: 8528-8533.
- 11) **Miyamoto, Y.**, T. Mukai, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. 2008. The *Mycobacterium avium*

- complex *gtfTB* gene encodes a glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific glycopeptidolipid. *J. Bacteriol.* 190: 7918-7924.
- 12) Kai, M., Phuc N. H. Nguyen, Thi T. H. Hoang, A. H. Nguyen, Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, T. Fujiwara, T. T. Nguyen, and M. Makino. 2008. Serological diagnosis of leprosy in patients in vietnam by enzyme-linked immunosorbent assay with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein II. *Clin. Vaccine Immunol.* 15: 1755-1759.
  - 13) Mukai T., Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, and M. Makino. 2008. CD4+ T-cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53: 96-106.
  - 14) Aoshi, T., B. H. Zinselmeyer, V. Konjufca, J. N. Lynch, X. Zhang, Y. Koide, and M. J. Miller. 2008. Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8+ T cells. *Immunity* 29: 476-486.
  - 15) Uchijima, M., T. Nagata, and Y. Koide. 2008. Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 protein efficiently induces antigen-specific T-cell responses. *Vaccine* 26: 5165-5169.
  - 16) Nagata, T., T. Aoshi, M. Uchijima, and Y. Koide. 2008. In vivo hierarchy of individual T-cell epitope-specific helper T-cell subset against an intracellular bacterium. *Vaccine* 26: 5123-5127.
  - 17) Hashimoto, D., T. Nagata, M. Uchijima, S. Seto, T. Suda, K. Chida, H. Miyoshi, H. Nakamura, and Y. Koide. 2008. Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific CD8+ T-cell responses in the lung. *Vaccine* 26: 5095-5100.
  - 18) Aoshi, T., T. Nagata, M. Suzuki, M. Uchijima, D. Hashimoto, A. Rafiei, T. Suda, K. Chida, and Y. Koide. 2008. Identification of an HLA-A\*0201-restricted T-cell epitope on the MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis*, by MPT51 overlapping peptide screening. *Infect. Immun.* 76: 1565-1571.
  - 19) Ikehara, Y., N. Shiuchi, S. Kabata-Ikehara, H. Nakanishi, N. Yokoyama, H. Takagi, T. Nagata, Y. Koide, K. Kuzushima, T. Takahashi, K. Tsujimura, and N. Kojima. 2008. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal phagocytic cells. *Cancer Lett.* 260: 137-145.
  - 20) Tateishi, Y., Y. Hirayama, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura, J. Kang, A. Shibata, K. Hirata, S. Kitada, R. Maekura, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2009. Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from immunocompetent patients. *Microb. Pathog.* 46: 6-12.
  - 21) 小林和夫. 2008. 再興した感染症「結核」の診断・治療・予防法. *Biophilia* 4 : 30-34.
  - 22) 松本杜吉、小林和夫. 2008. 結核ワクチン研究の現状と展望. *臨床検査* 52 : 1149-1153.
  - 23) 大原直也、小林和夫. 2008. 結核菌. *バイオセーフティーの辞典. 病原微生物とハザード対策の実際 (バイオメディカルサイエンス研究会 編)* 東京 : みみずく舎. 194-197.
  - 24) 前倉亮治、田栗貴博. 2008. 結核診断法の進歩. *検査と技術*. 36 : 137-145.
2. 学会発表
    - 1) 小林和夫、菅原 勇. ワクチン研究の現状と将来 (ミニシンポジウム). 第 83 回日本結核病学会総会. 2008 年 4 月. 東京.
    - 2) 松本杜吉、藤原永年、吉村満美子、尾

- 関百合子、西内由紀子、小林和夫. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)による増殖と細胞壁合成の同調メカニズム. 第83回日本結核病学会総会. 2008年4月. 東京.
- 3) 平山幸雄、吉村満美子、尾関百合子、菅原 勇、青木俊明、西内由紀子、小林和夫. ヒアルロン酸の結核病巣における産生と局在. 第83回日本結核病学会総会. 2008年4月. 東京.
- 4) 仁木 誠、松本壮吉、和田崇之、小林和夫. 抗酸菌の薬剤感受性におけるMDP1の調節機構の解析. 第83回日本結核病学会総会. 2008年4月. 東京.
- 5) Matsumoto S. Protection of DNA by mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) by preventing the iron-induced Fenton reaction. (Baltimore, MD, USA, 7月, 2008)
- 6) 松本 壮吉、尾関 百合子、吉村 満美子、藤原 永年、西内 由紀子、立石 善隆、小林 和夫. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) に見いだされた Ferritin-superfamily 蛋白質様活性. 第61回日本細菌学会関西支部総会 (京都、11月)
- 7) Suzuki D., Nagata T., Matsumoto S, Koide Y. MDP1 タンパクのマウスT細胞エピトープの解析/ Characterization of murine T-cell epitopes in mycobacterial DNA-binding protein 1. 第38回日本免疫学会総会 (京都、12月)
- 8) Otsuka, A., I. Matsunaga, T. Komori, K. Tomita, Y. Toda, T. Manabe, Y. Miyachi, and M. Sugita. Eosinophilic skin reactions to glycolipids in mycobacterial infection represent a novel form of delayed-type hypersensitivity. 2008. The International Investigative Dermatology 2008. (Kyoto, Japan, 5月).
- 9) Sugita, M. Eosinophilic skin hypersensitivity to glycolipids in mycobacteria-infected guinea pigs. 2008. 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (Baltimore, MD, USA, 7月).
- 10) Otsuka, A. I. Matsunaga, Y. Miyachi, and M. Sugita. Eosinophilic skin reactions to glycolipids define a novel form of hypersensitivity in mycobacterial infection. 2008. 第38回日本免疫学会総会 (京都、12月).
- 11) 松永勇、中崇、加藤久美子、中尾瞳、大塚篤司、矢野郁也、杉田昌彦. 2008. ミコール酸転移酵素による脂質T細胞抗原の生合成. 第81回日本生化学会総会 (神戸、12月).
- 12) 甲斐雅規、前田百美、福富康夫、宮本友司、向井徹、牧野正彦. 2008. らい菌由来免疫原性タンパク、MMP-IIを用いた血清診断. 第81回日本ハンセン病学会総会・学術大会 (熊本、5月).
- 13) 向井徹、和泉真藏、Teky Budiawan、宮本友司、Cita Rosita、Indropo Agusni、松岡正典、牧野正彦. 2008. 常温輸送臨床検体のLAMP法によるらい菌遺伝子検出. 第81回日本ハンセン病学会総会・学術大会 (熊本、5月).
- 14) Miyamoto, Y., Mukai, T., Maeda, Y., Makino, M. 2008. Characterization of the glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium avium* complex serovar 8. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 43<sup>rd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (Baltimore, USA, 7月)
- 15) 右藤智啓、内嶋雅人、永田 年、辻村邦夫、小出幸夫. 2009. 結核菌のHeat-shock protein 70 (HSP70) を結核菌抗原 MPT51 に結合させた分子融合型 DNA ワクチンは抗原特異的 T細胞を効率よく誘導する. 第82回日本細菌学会総会 (名古屋、3月発表予定).
- 16) 内嶋雅人、永田 年、辻村邦夫、小出幸夫. 2009. ケモカイン融合型 DNA ワクチンにより誘導される抗原特異的 CD8+および CD4+T細胞の解析. 第82回日本細菌学会総会 (名古屋、3月発表予定).
- 17) 瀬戸真太郎、小出幸夫. 2009. 結核菌によるファゴソーム局在性 Rab

- GTPase の局在変化とファゴリソーム形成阻害機構の解析. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月発表予定) .
- 18) 永田 年、鈴木大介、辻村邦夫、小出幸夫. 2008. DNA ワクチンを用いた結核菌低分子量分泌蛋白のマウス T 細胞エピトープの同定. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月発表予定) .
  - 19) 鈴木大介、永田 年、辻村邦夫、松本杜吉、小出幸夫. 2008. DNA ワクチンを用いた Mycobacterium DNA-binding protein 1 (MDP1) のマウス T 細胞エピトープの同定. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月発表予定) .
  - 20) Seto, S., and Y. Koide. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* modulates the network of Rab GTPases in attenuation of phagosome maturation. Keystone symposium. (Keystone, USA, 1 月)
  - 21) Nagata, T., L.-X. Wang, and Y. Koide. 2008. Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening. DNA Vaccines 2008. (Las Vegas, USA, 12 月)
  - 22) Suzuki, D., T. Nagata, S. Matsumoto, and Y. Koide. 2008. Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1). DNA Vaccines 2008. (Las Vegas, USA, 12 月)
  - 23) Tsujimura, K., Y. Ikehara, T. Nagata, Y. Koide, and N. Kojima. 2008. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposomes targeting to intraperitoneal macrophages. Vaccine 2nd Global Congress. (Boston, USA, 12 月)
  - 24) Suzuki, D., T. Nagata, S. Matsumoto, and Koide Y. 2008. Characterization of murine T-cell epitopes in Mycobacterial DNA-binding protein 1. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 (京都、12 月) .
  - 25) Uto, T., M. Uchijima, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. Genetic fusion of Heat-shock protein 70 to a mycobacterial antigen enhances the antigen-specific T cell responses. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 (京都、12 月) .
  - 26) Uchijima, M., T. Nagata, K. Tsujimura, K. Shibata, and Y. Koide. Analysis of antigen-specific CD8+ and CD4+ T-cell responses induced by MIP-1 $\alpha$ -MPT51 fusion DNA vaccination. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 (京都、12 月) .
  - 27) 瀬戸真太郎、小出幸夫. 2008. 結核菌感染マクロファージにおける Rab GTPase の網羅的局在解析. 第 91 回細菌学会関東支部総会 (千葉、10 月) .
  - 28) Seto, S., and Y. Koide. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* modulates the network of Rab GTPases to inhibit phagolysosome biogenesis in macrophage. 第 8 回あわじ感染症・免疫フォーラム (淡路、9 月) .
  - 29) Seto, S., and Y. Koide. 2008. Live *Mycobacterium tuberculosis* inhibits phagolysosome biogenesis in macrophages by modulating localization of Rab GTPase proteins on its phagosomes. 43<sup>rd</sup> US-Japan conference on Tuberculosis and Leprosy. (Baltimore, USA, 7 月)
  - 30) Maekura, R., S. Kitada, T. Hiraga, K. Yoshimura, Y. Tateisi, H. Hashimoto, and K. Fushitani. 2008 Long-term survival of patients with *Mycobacterium avium-intracellulare* complex pulmonary disease (MAC-PD). 2008 Annual Congress of European Respiratory Society (Berlin, Germany, 10 月)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
    - 1) 出願番号：特願 2008-172640、発明者：山本 法明、松本 杜吉、発明の名称：MDP1 による微生物を凝集お

よび／または沈殿させる方法、出願人：コニカミノルタホールディングス株式会社、公立大学法人大阪市立大学、出願日：2008年7月1日

- 2) 出願番号：特願 2008-277012、発明者：松本 杜吉、山本 法明、発明の名称：MDP1 を用いた炭水化物を有

する物質の分離方法 出願人：コニカミノルタホールディングス株式会社、出願日：2008年10月28日

2. 実用新案登録 特になし  
3. その他 特になし

## II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

休眠抗酸菌と宿主応答

研究分担者	小林 和夫	（国立感染症研究所・免疫部・部長）
研究協力者	藤原 永年	（大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・講師）
研究協力者	大原 直也	（国立感染症研究所・免疫部・室長）
研究協力者	阿戸 学	（国立感染症研究所・免疫部・室長）
研究協力者	大西 和夫	（国立感染症研究所・免疫部・主任研究官）
研究協力者	高橋 宜聖	（国立感染症研究所・免疫部・主任研究官）
研究協力者	岡部 真裕子	（国立感染症研究所・免疫部・研究員）

研究要旨

持続潜伏結核菌由来分子に対する宿主応答を明らかにするため、増殖分裂や代謝活性の低下した休眠期結核菌の糖脂質発現に関し、細胞壁糖脂質構成を解析した。菌種（結核菌 H37Rv、H37Ra や Aoyama B 株）により、糖脂質発現が異なることが判明した。脂質成分は代謝の低下した状態における主要なエネルギー源であり、結核菌由来糖脂質発現の相異は病原性や潜伏感染に関与していることが考えられる。

A. 研究目的

世界で約 20 億人（日本：2,500 万人）が結核菌に既感染、920 万人（日本：2,5 万人）が結核を発病、200 万人（日本：2,2 千人）が死亡し、現在でも、結核は甚大な健康被害を提供している（2007 年）。

結核の発症機序には「感染後早期に発症する一次性結核」、「潜在性感染から発症する二次性結核（内因性再燃）」や「既感染宿主に再感染し発病（外来性再感染）」があるが、成人結核のほとんどは「内因性再燃」に起因している。潜在性感染機序の解明は新規抗結核薬や感染曝露後（治療的）ワクチン開発を促進し、結核制圧に寄与することが期待される。

本研究では、潜在性感染における分裂や代謝活性の低下した休眠期結核菌や非結核性抗酸菌の糖脂質・蛋白質発現を解析し、診断・治療やワクチン標的候補の探索を目的とした。

B. 研究方法

結核菌や類縁抗酸菌 *Mycobacterium avium* complex の細胞壁から、2次元薄層クロマトグラフィー、イオンクロマトグラ

フィー、ガスクロマトグラフィー、質量分析計を用いて、リン脂質や糖脂質を分離・精製し、構造解析した。

潜在性感染における分裂や代謝活性の低下した休眠期結核菌の蛋白質発現に関し、低酸素環境（1% O<sub>2</sub>）培養により休眠菌を人工的に誘導し、遺伝子や蛋白質発現を分裂増殖期結核菌（20% O<sub>2</sub>）と比較解析した。また、発現遺伝子を大腸菌 BL21 株に導入し、遺伝子組み換え蛋白質を発現、精製した。なお、遺伝子操作に関し、DNA 組み換え実験指針に準拠し、機関承認を得て、実施した。

C. 研究結果

結核菌の糖脂質解析

増殖分裂や代謝活性の低下した休眠期結核菌の糖脂質発現に関し、細胞壁糖脂質構成を解析した。菌種（結核菌 H37Rv、H37Ra や Aoyama B 株）により、糖脂質発現が異なることが判明した（図 1）。しかし、リン脂質は 3 菌種に質的な相異を認めなかった（表 1）。

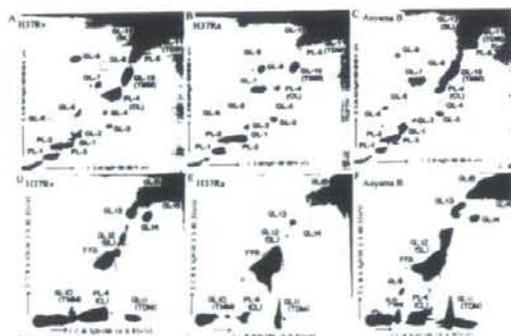


図 1. 結核菌の糖脂質解析

### Mycobacterium avium complex 特異的細胞壁糖ペプチド脂質 (MAC-GPL) の解析

MAC-GPL に対し、ヒト感染宿主は特異的抗体免疫応答を表現した。この免疫応答を利用し、活動性 MAC 感染症の試作血清診断キット (抗 MAC-GPL 抗体の検出) を既に開発した。診断キットの感度は 84%、特異度は 100% であり、臨床応用に向け、申請を進めている。しかし、潜在性 MAC 感染症に関し、検出は困難であった。本研究において、MAC-GPL 抗原 (血清型 12 と 16) の生合成系の解明に着手した。その結果、新規メチル基転移酵素 (2 種)、糖転移酵素 (3 種)、アシル基転移酵素 (1 種) およびアミノ基転移酵素 (1 種) の存在が判明した。

### 抗酸菌蛋白質発現

休眠期結核菌は抗酸菌 DNA 結合蛋白質 1 (MDP1)、alpha crystalline-like protein (Acr)、heat-stress-induced ribosome binding protein A (HrpA、Acr2) や heparin binding hemagglutinin (HBHA) を発現した。他方、分裂増殖期結核菌は early secreted antigen target 6 kDa (ESAT-6) や culture-filtrate protein 10 kDa (CFP-10) を発現した。これらの遺伝子をクローニングし、DNA 配列を確認後、大腸菌 BL21 株に各プラスミドを導入し、各蛋白質が発現することを確認した (図 2) (研究分担者: 大阪市立大学大学院医学研究科細菌学 松本 壮吉 准教授)。

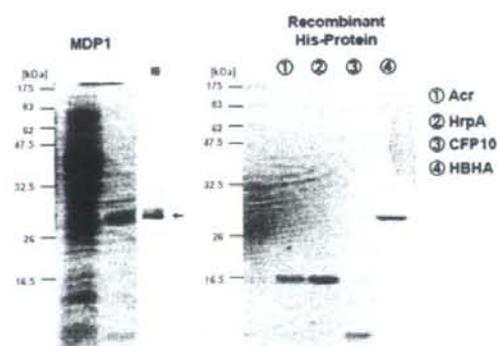


図 2. 低酸素環境における休眠結核菌蛋白質発現

### D. 考察

潜在性結核菌感染には「結核菌」と「宿主」の要因が関与し、成立していることが考えられる。しかし、活動性結核の発病は感染者の約 10% であり、発病に対する宿主防御機構の解明は結核対策に寄与することが考えられる。さらに、潜在性結核菌感染者を早期に発見し、治療・予防介入することにより、結核の発病を未然に防止することが可能となる。

抗 MAC-GPL 抗体の検出 (血清診断) は活動性 MAC 感染症に有用性が評価されている。しかし、潜在性 MAC 感染症に関し、検出は困難である。本研究において、MAC-GPL 抗原の生合成系関連酵素群が判明したことにより、今後、休眠菌における MAC-GPL 発現動態を解明し、その結果、潜在性 MAC 感染症対策に寄与することが期待される。

結核菌糖脂質は代謝の低下状態 (休眠菌) における主要なエネルギー源であり、糖脂質動態は休眠機構に密接に関連し、持続潜伏感染に寄与している。さらに、菌種による発現パターンの相異は病原性にも関与している可能性を示唆している。

現在、潜在性結核菌感染を検出する方法として 1) ツベルクリン皮内反応および 2) 末梢血細胞を用いた interferon-gamma 産生遊離試験 (IGRA、Quantiferon-2G) が頻用されている。1) ツベルクリン皮内反応は抗酸菌由来精製蛋白質群を診断抗原と

しているため、結核菌感染のみならず、非結核性抗酸菌感染や BCG 接種でも陽性となる。他方、2) 末梢血細胞を用いた interferon-gamma 産生遊離試験 (IGRA、Quantiferon-2G) は結核菌特異的蛋白質抗原を用いているが、この特異抗原は分泌性蛋白質のため、分裂・増殖期結核菌に発現し、休眠期結核菌感染の検出には不十分である。

本研究において、低酸素環境における休眠結核菌に発現する糖脂質・蛋白質を誘導し、さらに、分離精製することが可能となった。今後、これら糖脂質・蛋白質に対する宿主応答を解析し、診断抗原、薬剤標的やワクチン候補の可能性を探索する。

## E. 結論

・結核菌潜伏感染の分子機構、特に、菌情報に関し、低酸素環境で誘導した休眠菌から、糖脂質・遺伝子・蛋白質発現や精製に成功した。

・MAC-GPL 抗原の生合成系酵素群を解明し、その結果、新規メチル基転移酵素 (2 種)、糖転移酵素 (3 種)、アシル基転移酵素 (1 種) およびアミノ基転移酵素 (1 種) の存在が判明した。

## G. 研究発表

### 2. 論文発表

- 1) Kitada, S., K. Kobayashi, S. Ichiyama, S. Takakura, M. Sakatani, K. Suzuki, T. Takashima, T. Nagai, I. Sakurabayashi, M. Ito, and R. Maekura. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium*-complex pulmonary disease using an enzyme immunoassay kit. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177: 793-797, 2008.
- 2) Nakata, N., N. Fujiwara, T. Naka, I. Yano, K. Kobayashi, and S. Maeda. 2008. Identification and characterization of two novel methyltransferase genes that determine the serotype 12-specific structure on glycopeptidolipids of *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 190: 1064-1071, 2008.

- 3) Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, K. Kobayashi, M. Makino, S. Matsumoto, H. Ogura, and S. Maeda. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 190: 3613-3621, 2008.
- 4) 小林和夫. 再興した感染症「結核」の診断・治療・予防法. *Biophilia* 4: 30-34, 2008.
- 5) 松本壮吉、小林和夫. 結核ワクチン研究の現状と展望. *臨床検査* 52: 1149-1153, 2008.
- 6) 大原直也、小林和夫. 結核菌. *バイオセーフティーの辞典. 病原微生物とハザード対策の実際 (バイオメディカルサイエンス研究会 編) 東京: みみずく舎. 194-197, 2008.*

### 2. 学会発表

- 31) 小林和夫、菅原 勇. ワクチン研究の現状と将来 (ミニシンポジウム). 第 83 回日本結核病学会総会. 2008 年 4 月. 東京.
- 32) 松本壮吉、藤原永年、吉村満美子、尾関百合子、西内由紀子、小林和夫. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) による増殖と細胞壁合成の同調メカニズム. 第 83 回日本結核病学会総会. 2008 年 4 月. 東京.
- 33) 平山幸雄、吉村満美子、尾関百合子、菅原 勇、青木俊明、西内由紀子、小林和夫. ヒアルロン酸の結核病巣における産生と局在. 第 83 回日本結核病学会総会. 2008 年 4 月. 東京.
- 34) 仁木 誠、松本壮吉、和田崇之、小林和夫. 抗酸菌の薬剤感受性における MDP1 の調節機構の解析. 第 83 回日本結核病学会総会. 2008 年 4 月. 東京.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

表 1. 結核菌株のリン脂質および糖脂質分布

菌株	リン脂質 (Phospholipids : PL)						糖脂質 (Glycolipids : GL)																
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
H37Rv	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
青山B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
H37Ra	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-

PL-1, 2, phosphatidylinositol mannosides; PL-3, phosphatidyl ethanolamine; PL-4, diphosphatidylglycerol (cardiolipin)

GL-1, di-acyl-trehalose-2'-sulfate (SL-3); GL-8, tri-acyl-trehalose-2'-sulfate (SL-2); GL-10, trehalose-6-monomycolate (TMM); GL-11, trehalose-6,6'-dimycolate (cord factor/TDM); GL-12, penta-acyl-trehalose-2'-sulfate (SL-1); GL-16, penta-acyl-trehalose (PAT). +, present; -, absent

## 休眠結核菌の蛋白質発現と長期生存の分子機序に関する研究

研究分担者 松本 壮吉（大阪市立大学大学院医学研究科細菌学・准教授）

### 研究要旨

休眠期抗酸菌に大量に発現しているヒストン様蛋白質 mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)について、その有無による増殖期と休眠期の蛋白質発現の変化をマイクロアレイにて観察した。その結果、細菌の基礎代謝を担う酵素群の発現が、MDP1の欠失により休眠時に顕著に抑制されることが判明した。また、休眠時においてMDP1の欠失による薬剤感受性の低下が認められた。これらの結果から、MDP1が休眠時において薬剤標的となるような菌の生存維持に必要な代謝活動を維持し、菌の長期生存を保証している分子であることが判明した。

### A. 研究目的

結核菌は、人類の32%に一部休眠状態で潜伏感染している。成人型肺結核の多くが潜伏感染菌による内因性の再燃であり、毎年200万人が結核で死亡している。ヒト型結核菌はヒト以外の生体や自然環境中で生育するのは困難であり、ヒトは結核菌の唯一の宿主と考えられていることから、根本的な結核対策として潜伏感染菌の根絶が望まれる。しかしながら、現行の化学療法薬は潜伏感染中の菌には無効であり、対処できないのが現状である。よって、潜伏感染時における菌の代謝機構の解明が有効な結核治療法の開発につながると考えられる。

われわれは結核菌の定常期および休眠導入期に発現が増強する抗酸菌特異的蛋白質 mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)に着目した。この蛋白質はDNA結合能を有し、転写と翻訳を抑制する性質を有する。そこで、速育抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* を用いてMDP1欠失株を作製したところ、定常期以降の菌の生存が静菌的状态で持続せず、すみやかに菌が死滅することを明らかにした。これらの事実から、MDP1は結核菌の休眠の導入と維持に重要な分子と考えられ、またこの蛋白による転写・翻訳の制御により、定常期以降の菌の代謝を選択的に抑制し、活発な代謝は行わないものの、生命維持に必要な最小限な代謝は持続させるよう調節している可能性が示唆される。

これらのことから、MDP1が休眠時の菌の遺伝子発現にどのような影響を与えているかを網羅的に解析することは、休眠時の薬剤感受性の変化のみならず、休眠のメカニズムの解明の糸口になると考えられる。今回はMDP1欠失による遺伝子発現の変化を増殖期および休眠期について解析、比較した。さらに、休眠期における薬剤感受性の変化におけるMDP1の役割を解析した。

### B. 研究方法

a)DNAマイクロアレイによる増殖期—休眠期の抗酸菌における遺伝子発現の比較

*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155株（野性株）およびそのMDP1欠失株をDubos培地にて好氣的に3日間培養し、遠心分離により菌体を回収した。同様に、上記3株をDubos培地に接種し、密閉ガラス容器にて攪拌しながら7日間培養したのち（Wayne dormant model）、遠心分離にて菌体を回収した。回収した菌体はTrizolで懸濁したのち、ガラスビーズ含有マイクロチューブに移し、BeadBeaterにて5,000 rpm, 20秒を3回繰り返して機械的に破碎した。その後遠心分離ののち上清を回収し、フェノール/クロロホルム処理にて除蛋白を行った。Total RNAの精製はエタノール沈殿およびカラム精製（RNeasy Mini Kit; 株式会社キアゲン）にて行った。マイクロアレイ解析はロシュ・ダイアグノスティック株式会社のアレイチップを用いて行った。ハイブリダイゼーション装置はMAUI (BioMicro社)を、

解析装置は GenePix 4000B (Axon 社)、シグナル解析は NimbleScan ver2.3 (Nimblegen 社)を用いて行った。得られたデータの解析は GeneSpring (アジレント・テクノロジー株式会社)を用いた。

#### b) 薬剤感受性試験

*M. smegmatis* 野性株および MDP1 欠失株と MDP1 補填株を MIC 程度の各種薬剤 (リファンピシン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール) を添加した培地に接種したのち、好氣的に 2 日間培養した。その後、菌を寒天培地に接種し、生菌数を比較した。同様に、Wayne dormant model にて培養した上記 3 株を薬剤添加培地に接種し、嫌氣的に 2 日間培養した。その後、菌を寒天培地に接種し、生菌数を比較した。

#### c) 走査電子顕微鏡による細胞壁の観察

好氣的に培養した *M. smegmatis* 菌体を回収し、OD<sub>600</sub>=0.1 になるように調製したのち、24 well tissue culture plate 内に静置した poly-L lysine coated thermanox coverslips 上に加え、2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 7.4), 0.2M sucrose 溶液を加え、4°C で 16 時間反応させた。後に 2% OsO<sub>4</sub> を加えさらに 2 時間室温で反応させた。その後エタノールで脱水し、二酸化炭素存在下で critical point apparatus (HCP-2, Hitachi)を用いて乾燥させた。その後、Pt-Pd でコートしたのち、Hitachi S-4700 scanning electron microscope で観察を行った。

### C. 研究結果

#### MDP1 は休眠期抗酸菌の代謝を保存する

まず、MDP1 欠損による遺伝子発現の変化を増殖期—休眠期で比較した。すると、野性株において休眠時と比較して増殖期に発現が高い遺伝子数は 1239 遺伝子、これに対して休眠時に発現が高い遺伝子は 929 遺伝子であった。一方、MDP1 欠失株では、休眠時と比較して増殖期に発現が高い遺伝子数は 1655 遺伝子、これに対して休眠時に発現が高い遺伝子は 1161 遺伝子であった。これらを遺伝子の機能ごとに比較すると、野性株および MDP1 欠失株の両方において増殖時に遺伝子発現が活発であったカテゴリーは主にタンパクやアミノ酸などの

菌体成分の生合成に関わる遺伝子群であった。これに対し、休眠時に発現が活発なカテゴリーはトランスポゾンなどの遺伝子組換えに関わる遺伝子群であった。

次に、増殖期または休眠期のそれぞれの条件において、遺伝子発現の変化を野性株—MDP1 欠失株で比較した。すると、増殖期において MDP1 欠失株と比較して野性株で発現が高い遺伝子は 314 遺伝子であった。一方野性株と比較して MDP1 欠失株で発現が高い遺伝子は 358 遺伝子であった。これに対して休眠期において MDP1 欠失株と比較して野性株で発現が高い遺伝子は 696 遺伝子であった。一方野性株と比較して MDP1 欠失株で発現が高い遺伝子は 535 遺伝子であった。これらを遺伝子の機能ごとに比較すると、増殖期において野性株と MDP1 欠失株の遺伝子発現に差があるカテゴリーはなかったが、休眠時には野性株で cellular process, DNA metabolism, energy metabolism, protein synthesis, regulatory function など多岐にわたるカテゴリーにおいて活発な発現が観察された。これに対して MDP1 欠失株ではトランスポゾンなどの遺伝子組換えに関するカテゴリーのみで野性株より遺伝子の発現が高かった。

以上のことから、増殖期においては MDP1 の有無により発現に変化がみられる遺伝子は機能的な偏りはみられないのに対し、休眠期では MDP1 欠失株において幅広く代謝が抑制されていることが明らかになった。

#### MDP1 は休眠期抗酸菌の薬剤感受性を調節する

野性株と MDP1 欠失株、およびその MDP1 補填株について薬剤感受性を比較した。リファンピシン、エリスロマイシン、クロラムフェニコールについて比較したところ、好氣的条件下では、エリスロマイシンにおいて MDP1 欠失株が若干の耐性を示したものの、野性株、欠失株、補填株で大きな違いは観察されなかった。これに対し、休眠時では 3 種すべての薬剤について MDP1 欠失株において顕著な薬剤耐性の獲得が観察された。

以上のことから、MDP1 は休眠時におい