

200931025A

厚生労働科学研究費補助金  
新型インフルエンザ等新興・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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林和夫

平成22(2010)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
新型インフルエンザ等新興・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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成22 (2010) 年 3 月

## 目 次

### I. 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 1  
小林 和夫

### II. 分担研究報告書

- 休眠結核菌の蛋白質発現と長期生存の分子機序 11  
松本 壮吉

- 休眠結核菌の糖脂質代謝と免疫応答に関する研究 17  
杉田 昌彦

- 休眠性非結核性抗酸菌における菌体構成分子の解析 21  
宮本 友司

- 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 25  
小出 幸夫

- 持続性潜在抗酸菌感染を検出する臨床診断法の開発に  
関する研究 29  
前倉 亮治

- 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（新型インフルエンザ等新興・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・感染制御部・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	大原 直也	(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・口腔微生物学分野・教授)
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」の要因が関与している。活動性結核の発病は感染者の約 10%であり、潜在性持続結核菌感染や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」発現や機能が明らかとなった。休眠結核菌に高発現する抗酸菌 DNA 結合蛋白質 1 (MDP1) が鉄を酸化（フェロキシダーゼ活性）して貯蔵する活性のあることを明らかにした。結核菌類縁らい菌の「ミコール酸転移酵素」はミコール酸転移活性が低下しており、代表的抗酸菌糖脂質である trehalose dimycolate を効率的に産生できないことが明らかとなった。休眠環境条件（低栄養や低酸素状態）は *Mycobacterium avium complex* (MAC) 由来糖ペプチド脂質抗原 (GPL) 生合成に影響を及ぼすことが明らかとなった。休眠期結核菌由来遺伝子 (DosR regulon 遺伝子群 48 種および Rfp 遺伝子群 5 種) の DNA ワクチン・ライブラリーを完成した。そのうち、32 種類の候補抗原の免疫原性を 2 系統のマウスで検討し、T 細胞応答/抗体産生の両方で免疫反応を惹起できる抗原を、C57BL/6 で 1 種類、BALB/c で 7 種類同定した。中でも Rv3132c は両系統で両方の免疫応答を誘導でき、有望な候補抗原と考えられた。肺 MAC 感染症の血清抗 MAC-GPL 抗体の検出による血清診断は異なる人種・地域、さらに、潜在性 MAC 感染の診断に有用であることが判明した。血清診断は体外診断であるため安全、そして、簡便・迅速（所要：約 3 時間<—現行診断基準：1 か月以上）であり、有用性が高いと考えられる。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、930 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（2008 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	研究の総括
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 (MAC) 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。

### 抗酸菌 DNA 結合蛋白質 1 (MDP1) のフェロキシダーゼ活性

*M. bovis* BCG より精製した MDP1 (BCG-MDP1) および結核菌組み換え MDP1 (Mtb-MDP1) を用い、二価鉄または三価鉄との結合能を Surface plasmon resonance 法により検討した。また、放射ラベル化鉄 [ $^{55}\text{Fe}$ ] を用いて結合実験を行った。さらに、その他の二価金属 ( $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  および  $\text{Zn}^{2+}$ ) についても測定した。BCG-MDP1 および Mtb-MDP1 のフェロキシダーゼ活性を測定した。フェントン反応により生じるヒドロキシラジカルに対する消去作用をトラップ剤 8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazine-1,4-(2H,3H) dione を用いて評価した。さらに、ヒドロキシラジカル依存的 DNA 傷害に対する MDP1 の抑制作用をプラスミド DNA 存在下で検討した。

### ミコール酸転移酵素活性の測定

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ブン中で焼き付けることにより生成物を検出した。

### MAC の休眠環境（低栄養・低酸素）における培養

MAC 4 型血清型株の培養はグルコース含有培地 (Middlebrook 7H9 Broth + 10% ADC enrichment) 及び無グルコース培地 (Middlebrook 7H9 Broth + 0.2% Bovine Albumin Fraction V + 0.085% NaCl) を調製して使用し、それぞれに接種を行い、37°C、10 日間培養を行った。また、低酸素培養は Dubos broth medium で好氣的に培養したものを低酸素環境下へ移動し、さら

を行って菌体を調製した。

### 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 に挿入して、DNA ワクチン・ライブラリーを作成した。また、Histidine-tag を付加した抗原遺伝子を pET28b ベクターに挿入し、目的蛋白を大腸菌発現系によって産生させ、Ni-NTA column を用いて精製した。遺伝子銃 (Helios Gene-Gun) 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 $\mu$ g、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抗原蛋白で 37°C、48 時間刺激し、培養上清中に産生された IFN- $\gamma$  量を ELISA 法にて測定して、T 細胞応答を検討した。加えて、免疫マウス血清中の抗原特異的な抗体価を、組換え蛋白を抗原とした ELISA 法にて測定した。

### 持続性潜在抗酸菌感染を検出する臨床診断法の開発に関する研究

MAC 感染症の血清診断 (有用性: 感度や特異度) に関し、地域や人種差を確認するため、国立ユダヤ医療研究センター: デンバー市、コロラド州、アメリカ合衆国と国際共同研究を実施した。対象者 (総数: 124 名、年齢: 54.2  $\pm$  16.9、男: 女 = 96: 28、人種: 白人: 110、アジア系: 8、アフリカ系: 3、その他: 3 名) を登録した。アメリカ合衆国胸部疾患学会・感染症学会の診断基準 (2007) に合致したヒト肺 MAC 感染症 (47 例) 非活動性 MAC 感染 (10 例)、非 MAC 疾患 (8 例)、および健常者 (52 例) 由来治療前血清を用い、MAC 特異的 GPL 核抗原に対する血清抗体を酵素抗体法により測定した。なお、被験対象者は全例 HIV-1 および 2 抗体陰性である。患者血清採取に際し、医療機関 (国立病院機構刀根山病院: 大阪府豊中市、国立ユダヤ医療研究センター: デンバー市、コロラド州、アメリカ合衆国) で倫理審査の承認後、インフォームドコンセントを得た。なお、診断キットは株式会社タウンズ (静岡県沼津

市) が試作したものを使用した。なお、利益相反は存在しなかった。

### 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程に準拠し、機関で承認を得て実施した。なお、利益相反はなかった。

## C. 研究結果

### 休眠結核菌の鉄代謝

BCG-MDP1 ならびに Mtb-MDP1 は、二価鉄を三価鉄に酸化するフェロキシダーゼ活性を有していた。それぞれの Km 値は、0.101  $\pm$  0.015 mM ならびに 0.141  $\pm$  0.033 mM であった。BCG-MDP1 は 1 分子当り 76  $\pm$  23 分子の二価鉄を貯蔵することが明らかになった。他方、三価鉄やその他の二価金属との結合能は見られなかった。二価鉄と過酸化水素の存在下でフェントン反応により生じるヒドロキシラジカルは MDP1 の添加に伴い消去された。このときのヒドロキシラジカルに依存した DNA プラスミドの分解は BCG-MDP1 ならびに Mtb-MDP1 により抑制された。この抑制効果は DNA 結合作用をもつヒストンタンパク質にはみられなかった。一方、二価鉄と同じ遷移金属の一価銅によるフェントン反応依存的なヒドロキシラジカルの産生およびそれによる DNA プラスミドの切断に対する、MDP1 の抑制作用はなかった。

### 休眠抗酸菌の糖脂質代謝

*M. leprae* 由来 Ag85A はミコール酸転移酵素としての機能が減弱していたが、*M. leprae* 由来 Ag85A は直鎖脂肪酸の転移反応を効率的に触媒できた。*M. leprae* 由来 130 位ロイシン残基はミコール酸含有基質の結合を阻害した。アミノ酸変異の導入によって trehalose monomycolate 基質の変異酵素に対する親和性が増大したことが判明した。

### MAC の休眠環境 (低栄養・低酸素) における特異的細胞壁糖ペプチド脂質 (MAC-GPL) 動態の解析

休眠状態と関係する環境条件について 4 型 GPL の生合成に与える影響を評価した。

その結果、栄養欠乏状態を反映する無グルコース培地において、4型 GPL の生産量がグルコース含有培地に比較して著しく増加していた。また、好気状態から低酸素状態への移行により、それまで菌体に蓄積していた4型 GPL が量的に低下する現象が観察された。

#### DNA ワクチンの作製と免疫

潜伏期結核菌が発現する DosR regulon 蛋白 (48 種) および結核菌の再活性化に関与する Resuscitation promoting factor (Rpf) 蛋白 (5 種) を候補抗原として、DNA ワクチン・ライブラリーを作製した。32 種類について T 細胞応答のスクリーニングを終えた時点で、C57BL/6 で 9 種類、BALB/c で 12 種類の抗原が T 細胞応答を誘導し、そのうち 7 種類が両系統で T 細胞応答を誘導することができた。加えて一部の抗原について抗体産生を検討したところ、少なくとも C57BL/6 で 2 種類、BALB/c で 11 種類の抗原が抗体産生を誘導できた (2 種類が両系統で抗体産生を誘導)。また、同一系統で両方の免疫応答を誘導できた抗原は C57BL/6 で 1 種類、BALB/c で 7 種類であった。その中でも、Rv3132 (*dosS/desS*) は両系統のマウスで T 細胞応答と抗体産生を共に誘導でき、有望な候補抗原であると考えられた。

#### 持続性潜在抗酸菌感染を検出する臨床診断法の開発：人種・地域および潜在性 MAC 感染

血清抗 MAC-GPL 核-IgA 抗体価の陽性・陰性カットオフ値を 0.3 U/mL に設定した。活動性肺 MAC 感染症 (47 例) における血清抗体価は  $2.95 \pm 3.86$  IU/mL、非活動性肺 MAC 感染症 (10 例) における血清抗体価は  $1.63 \pm 2.83$  IU/mL、非 MAC 感染症 (8 例) :  $0.1 \pm 0.06$  IU/mL、なお、健常者 (52 例) は  $0.22 \pm 1.11$  IU/mL であった。これら成績から、国立ユダヤ医療研究センターにおける感度 : 77%、特異度 : 94% であることが判明した。非活動性肺 MAC 感染症 (10 例) における陽性率 (カットオフ値  $> 0.3$  U/mL を示す割合) は 59%、さらに、健常者 (52 例) における陽性率は 6% であり、潜

在性 MAC 感染症を示唆する成績を得ることができた。

#### 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。

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) 菌における特異な代謝状態 (鉄、糖脂質 : TDM、糖ペプチド脂質 : MAC-GPL) が明らかとなった。これら代謝は「低酸素や低栄養状態」で顕著に変化し、潜在性感染における休眠抗酸菌の生物学的特性であることが考えられる。特に、エネルギー代謝 (糖や脂質) のみならず、鉄代謝まで休眠状態が影響しており、結核菌の巧妙な宿主内長期生存戦略が示唆される。

現行 BCG ワクチンを凌駕するワクチン候補分子として、Rv3132 (*dosS/desS*) は T 細胞応答と抗体産生を共に誘導でき、有望な候補抗原であると考えられた。

肺 MAC 感染症の血清抗 MAC-GPL 抗体の検出による血清診断は異なる人種・地域、さらに、潜在性 MAC 感染の診断に有用であることが判明した。血清診断は体外診断であるため安全、そして、簡便・迅速 (所要 : 約 3 時間 < 現行診断基準 : 1 か月以上) であり、有用性が高いと考えられる。

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。

#### E. 結論

・代謝の低下した持続感染 (休眠) 菌における特異な代謝状態 (鉄、糖脂質 : TDM、糖ペプチド脂質 : MAC-GPL) が明らかとなった。これら代謝は「低酸素や低栄養状態」で顕著に変化し、潜在性感染における休眠



抗酸菌の生物学的特性であることが考えられる。

・ワクチン候補分子として、Rv3132 (*dosS/desS*) は T 細胞応答と抗体産生を共に誘導でき、有望な候補抗原であると考えられた。

・肺 MAC 感染症の血清抗 MAC-GPL 抗体の検出による血清診断は異なる人種・地域、さらに、潜在性 MAC 感染の診断に有用であることが判明した。血清診断は体外診断であるため安全、そして、簡便・迅速（所要：約 3 時間<—現行診断基準：1 か月以上）であり、有用性が高いと考えられる。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hirayama, Y., M. Yoshimura, Y. Ozeki, I. Sugawara, T. Udagawa, S. Mizuno, N. Itano, K. Kimata, A. Tamaru, H. Ogura, **K. Kobayashi**, and **S. Matsumoto**. 2009. Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication. *PLoS Pathog* 5: e1000643.
- 2) Wada, T., S. Fujihara, A. Shimouchi, M. Harada, H. Ogura, **S. Matsumoto**, and A. Hase. 2009. High transmissibility of the modern Beijing *Mycobacterium tuberculosis* in homeless patients of Japan. *Tuberculosis (Edinb)* 19: 19.
- 3) 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.
- 4) Seto, S., **S. Matsumoto**, I. Ohta, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2009. Dissection of Rab7 localization on *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Biochem Biophys Res Commun* 387: 272-277.
- 5) Okazaki, M., K. Ohkusu, H. Hata, H. Ohnishi, K. Sugahara, C. Kawamura, N. Fujiwara, **S. Matsumoto**, Y. Nishiuchi, K. Toyoda, H. Saito, S. Yonetani, Y. Fukugawa, M. Yamamoto, H. Wada, A. Sejimo, A. Ebina, H. Goto, T. Ezaki, and T. Watanabe. 2009. *Mycobacterium kyorinense* sp. nov., a novel, slow-growing species, related to *Mycobacterium celatum*, isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 1336-1341.
- 6) Nishiuchi, Y., A. Tamura, **S. Kitada**, T. Taguri, **S. Matsumoto**, Y. Tateishi, M. Yoshimura, Y. Ozeki, N. Matsumura, H. Ogura, and **R. Maekura**. 2009. *Mycobacterium avium* complex organisms predominantly colonize in the bathtub inlets of patients' bathrooms. *Jpn J Infect Dis* 62: 182-186.
- 7) Kitamura, A., **S. Matsumoto**, and I. Asahina. 2009. Growth inhibition of HeLa cell by internalization of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo. Kitamura, A., S. Matsumoto, and I. Asahina. *Cancer Cell Int* 9: 30.
- 8) Seto, S., **S. Matsumoto**, I. Ohta, K. Tsujimura, and **Y. Koide**. 2009. Differential recruitment of CD63 and Rab7-interacting-lysosomal-protein to phagosomes containing *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. *Microbiol Immunol* In press.
- 9) Ozeki, Y., I. Sugawara, T. Udagawa, T. Aoki, M. Osada-Oka, Y. Tateishi, H. Hisaeda, Y. Nishiuchi, N. Harada, **K. Kobayashi**, and **S. Matsumoto**. Transient role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in mycobacterial infection in mice. *Int Immunol* In press.
- 10) 小林和夫. 2009. マイコバクテリウム属 (抗酸菌). 標準微生物学 第 10 版 (平松啓一、中込 治 編) 東京: 医学書院. 286-298.

- 11) 大原直也、小林和夫. 2009. 抗酸菌 (マイコバクテリウム) 感染症. コンパクト内科学 (井上修二、上原誉志夫、金澤真雄、川口 実、代田常道 編) 京都: 金芳堂. 418-420.
- 12) Nakao, H., I. Matsunaga, D. Morita, T. Aboshi, T. Harada, Y. Nakagawa, N. Mori, and M. Sugita. 2009. Mycolyltransferase from *Mycobacterium leprae* excludes mycolate-containing glycolipid substrates. J. Biochem. 146: 659-665.
- 13) Hatta M., M. Makino, M. Ratnawati, Mashudi, Yadi, M. Sabir, N. Tandirogang, L.M.M. Rusyati, M. Kai, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, T. Mukai, and Y. Maeda. 2010. Detection of serum antibodies to *Mycobacterium leprae* major membrane protein-II in leprosy patients from Indonesia. Lepr. Rev. In press.
- 14) Ichikawa, T., Y. Kageyama H. Kobayashi, N. Kato, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Etanercept treatment reduces the serum levels of interleukin-15 and interferon-gamma inducible protein-10 in patients with rheumatoid arthritis. Rheumatol. Int. (in press)
- 15) Seto, S., S. Matsumoto, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Interaction of lysosomal markers with phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis* in macrophage. Microbiol. Immunol. (in press)
- 16) Suzuki, D., T. Nagata, G. Eweda, S. Matsumoto, M. Matsumoto, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) using DNA vaccination. Vaccine (in press)
- 17) Wang, L.-X., T. Nagata, K. Tsujimura, M. Uchijima, S. Seto, and Y. Koide. 2010. Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination. Vaccine (in press)
- 18) Tsujimura, K., Y. Ikehara, T. Nagata, Y. Koide, and N. Kojima. 2009. Induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposomes targeting to peritoneal macrophages. Procedia Vaccinology 1: 127-134.
- 19) Seto, S., S. Matsumoto, I. Ohta, K. Tsujimura, Y. Koide. 2009. Dissection of Rab7 localization on *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. Biochem Biophys Res Commun 387: 272-277.
- 20) Aoshi, T., J. A. Carrero, V. Konjufca, Y. Koide, E. R. Unanue, and M. J. Miller. 2009. The cellular niche of *Lesteria monocytogenes* infection changes rapidly in the spleen. Eur. J. Immunol. 39: 417-425.
- 21) Kitada, S., K. Kobayashi, Y. Nishiuchi, K. Fushitani, K. Yoshimura, Y. Tateishi, K. Miki, M. Miki, H. Hashimoto, M. Motone, T. Fujikawa, T. Hiraga, and R. Maekura. Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex proven by bronchial wash culture. Chest In press.

## 2. 学会発表

- 1) 岡 真優子、高塚正樹、尾関百合子、吉村満美子、小林和夫、松本壮吉. Mycobacterial DNA-binding protein-1 の新機能-鉄の酸化活性と貯蔵性-. 第7回感染症沖縄フォーラム 2009年2月 沖縄
- 2) 吉村満美子、仁木 誠、岡 真優子、尾関百合子、原田 誠、田丸亜貴、立石善隆、西内由紀子、小林和夫、松本壮吉抗酸菌の休眠誘導と遺伝子発現

- 解析. 第 7 回感染症沖縄フォーラム  
2009 年 2 月 沖縄
- 3) 立石善隆、岡 真優子、西内由紀子、吉村満美子、小林和夫、前倉亮治、松本壮吉. 急速な臨床経過に合致した高病原性 MAC 菌株の同定-臨床病態と細菌学的病原性との関連. 第 7 回感染症沖縄フォーラム 2009 年 2 月 沖縄
  - 4) 松本壮吉. Tuberculosis, from biology to development of control strategies. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
  - 5) 立石善隆、平山幸雄、尾関百合子、西内由紀子、吉村満美子、小林和夫、松本壮吉. 2009. 抗酸菌感染症研究における新たな視点 (ワークショップ 15). 急速な臨床経過に合致した高病原性 *Mycobacterium avium-intracellulare* complex 菌株の同定. 日本細菌学会雑誌、64 : 93、2009. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月).
  - 6) 平山幸雄、吉村満美子、尾関百合子、菅原 勇、小林和夫、松本壮吉. 2009. 抗酸菌感染症研究における新たな視点 (ワークショップ 15). 結核菌の増殖に対するヒアルロン酸の作用. 日本細菌学会雑誌、64 : 93、2009. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月).
  - 7) 西内由紀子、松本壮吉、立石善隆、鈴木定彦. 生活環境に分布する *Mycobacterium avium* complex と臨床分離株の多型解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
  - 8) 藤原永年、中田 登、中 崇、水野浄子、合田麗奈、牧野正彦、吉村満美子、松本壮吉、前田伸司. *Mycobacterium intracellulare* 由来血清型 7,12,13 型糖ペプチド脂質の構造類似性とオリゴ糖解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
  - 9) 岡 真優子、小林和夫、松本壮吉. 2009. 結核菌感染マクロファージにおける hypoxia-inducible factor-1alpha の作用機構. 日本細菌学会雑誌、64 : 190、2009. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月).
  - 10) 鈴木大介、永田 年、辻村 邦夫、松本壮吉. 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 2009 年 3 月 名古屋
  - 11) 仁木 誠、吉村満美子、小林和夫、松本壮吉. 2009. 抗酸菌の薬剤感受性における MDP1 の調節機構の解析. 日本細菌学会雑誌、64 : 192、2009. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月).
  - 12) 尾関百合子、原田 誠、西内由紀子、山本三郎、小林和夫、松本壮吉. 2009. 抗結核薬スクリーニング系の確立と実践. 日本細菌学会雑誌、64 : 193、2009. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月).
  - 13) 田丸亜貴、松本壮吉. 集団感染事例における VNTR 型と IS6110-RFLP パターンの比較. 第 84 回日本結核病学会総会 2009 年 5 月 札幌
  - 14) 田丸亜貴、河原隆二、松本壮吉、鈴木定彦. MLPA 法による多剤耐性結核菌の検出. 第 84 回日本結核病学会総会 2009 年 5 月 札幌
  - 15) 西内由紀子、田栗貴博、松本壮吉、立石善隆、北田清悟、田丸亜貴、鈴木定彦、前倉亮治. 肺 *Mycobacterium avium* complex 症患者由来 *M. avium* と豚由来 *M. avium* の血清型比較. 第 84 回日本結核病学会総会 2009 年 5 月 札幌
  - 16) Osada-Oka, M., M. Takatsuka, E. Sato, Y. Ozeki, M. Yoshimura, M. Inoue, K. Kobayashi, S. Matsumoto. A ferritin superfamily-like protein in mycobacteria. THE 9<sup>TH</sup> AWAJI INTERNATIONAL FORUM. 2009 年 9 月 淡路島
  - 17) 松本壮吉. 気道ヒアルロン酸を利用し

- た、結核菌の感染と増殖のストラテジー. 第 50 回日本熱帯医学学会大会 2009 年 10 月 沖縄
- 18) 尾関百合子、菅原 勇、岡 真優子、小林和夫、松本壮吉. 結核菌感染における制御性 T 細胞の役割検討. 第 62 回日本細菌学会関西支部総会 2009 年 11 月 大阪
- 19) 平山幸雄、吉村満美子、尾関百合子、田丸亜貴、小倉 壽、小林和夫、松本壮吉. 抗酸菌は宿主ヒアルロン酸を利用して細胞外増殖を行う. 第 62 回日本細菌学会関西支部総会 2009 年 11 月 大阪
- 20) 吉村満美子、仁木 誠、立石善隆、小林和夫、松本壮吉. 休眠時における抗酸菌の遺伝子発現解析. 第 62 回日本細菌学会関西支部総会 2009 年 11 月 大阪
- 21) 岡 真優子、今岡 進、小林和夫、松本壮吉. 低酸素状態での HIF-1 $\alpha$  安定化におけるグルコースの作用機構. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 横浜
- 22) Sugita, M. Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in mycobacteria. 2009. Forty-four Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (福岡, 7 月).
- 23) 松永 勇、中尾 瞳、森田大輔、杉田昌彦. 2008. らい菌のミコール酸転移酵素によるミコール酸糖脂質の産生. 第 82 回日本生化学会総会(神戸、12 月).
- 24) 宮本友司、向井 徹、中 崇、甲斐雅規、前田百美、矢野郁也、牧野正彦. 2009. *Mycobacterium avium* complex における glycopeptidolipid 生合成遺伝子群の転写制御解析. 第 82 回日本細菌学会総会(名古屋、3 月).
- 25) 甲斐雅規、藤原永年、宮本友司、向井徹、矢野郁也、牧野正彦. 2009. BCG 菌のミコール酸サブクラス合成遺伝子の解析. 第 82 回日本細菌学会総会(名古屋、3 月).
- 26) 向井 徹、宮本友司、前田百美、牧野正彦. 2009. らい菌蛋白調整に用いる発現用プロモーターの同定. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会(出雲、5 月)
- 27) 前田百美、M. Hatta、R. M. Yadi、M. Sabir、N. Tandirogang、L. M. M. Rusyati、甲斐雅規、向井 徹、宮本友司、福富康夫、牧野正彦. 2009. Major Membrane Protein-II を用いた血清診断法. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会(出雲、5 月)
- 28) Miyamoto, Y., and M. Makino. 2009. Biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* Complex. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and leprosy Research Conference (福岡, 7 月)
- 29) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Proteomic analysis revealed the interaction of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome with ER. 第 83 回日本細菌学会(横浜、3 月).
- 30) Nagata, T., G. Eweda, D. Suzuki, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. 第 83 回日本細菌学会(横浜、3 月).
- 31) Nagata, T., G. Eweda, D. Suzuki, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. 第 83 回日本細菌学会(横浜、3 月).
- 32) Yamamura, Y., S. Seto, M Uchijima, H. Hodumi, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Immune responses against latency-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. 第 83 回日本細菌学会(横浜、3 月).

- 33) Uto, T., M. Uchijima, S. Seto, T. Nagata, T. Suda, K. Chida, H. Nakamura, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Genetic fusion of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 to a mycobacterial antigen MPT51 augments the antigen-specific T cell responses. 第 83 回日本細菌学会 (横浜、3 月) .
- 34) Yamamura, Y., S. Seto, M. Uchijima, H. Hodumi, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Immunogenicity of dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. DNA vaccine 2010. (New Orleans, U.S.A., 3 月)
- 35) Eweda, G. D. Suzuki, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secreted proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis* with DNA immunization. DNA vaccine 2010. (New Orleans, U.S.A., 3 月)
- 36) Yamamura, Y., S. Seto, M. Uchijima, H. Hodumi, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2009. Immunogenicity of latency-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会. (大阪、12 月)
- 37) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2009. 結核菌ファゴソームのプロテオミクスによる分子解剖. 第 92 回日本細菌学会関東支部総会. (東京、11 月) .
- 38) Uto, T., M. Uchijima, S. Seto, T. Nagata, T. Suda, K. Chida, H. Nakamura, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2009. Genetic fusion of heat-shock protein 70 to a mycobacterial antigen enhances the antigen-specific T cell responses. Vaccine 3rd Global Congress. (Singapore, Singapore, 10 月).
- 39) Seto, S. and Y. Koide. 2009. Alternative localization of Rab GTPases to phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis* in inhibition of phagolysosome biogenesis. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (東京、11 月) .

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

- 1) 出願番号：PCT/JP2009/061819、発明者：山本法明、松本壮吉. 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、発明の名称：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：2009 年 6 月 29 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（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

休眠結核菌の蛋白質発現と長期生存の分子機序

研究分担者 松本 壮吉（大阪市立大学大学院医学研究科）  
研究協力者 吉村 満美子（大阪市立大学大学院医学研究科）  
研究協力者 岡 真優子（大阪市立大学大学院医学研究科）

研究要旨

持続感染する結核菌（休眠期）は増殖菌とは異なるタンパク質発現のパターンを示すことは知られているが、休眠期結核菌の病原性や内因性再燃の機構は不明な点が多く、潜在性結核対策の障害となっている。

結核菌は、宿主のマクロファージ内で増殖および休眠するが、このとき鉄キレート分子のマイコバクチン無しには生存できないことから鉄は菌の生存に必須考えられる。一方、宿主にとっても鉄は必須微量元素であり、特に二価鉄は、強い抗菌作用を示すヒドロキシラジカルの産生に利用される。

我々は、休眠期の結核菌に高発現する mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)が、鉄を酸化して（フェロキシダーゼ活性）貯蔵する活性のあることを明らかにした。MDP1は、フェロキシダーゼ活性によりフェントン反応を回避して DNA などを障害するラジカルの産生を抑制した。休眠期結核菌内で MDP1 は、菌の増殖を停止させると同時に、酸素ラジカルからの防御にも関わり、潜伏結核菌の長期生存に関わると考えられる。

A. 研究目的

鉄は、呼吸や核酸合成酵素の活性中心として生物に利用されており、多くの生物に必須の金属である。特に二価鉄は、フェントン反応の基質として働き、過酸化水素の存在下でヒドロキシラジカル（HO $\cdot$ ）を産生させる（ $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO} + \text{HO}\cdot$ ）。ヒドロキシラジカルは、長寿命であり、殺菌作用あるいは DNA 切断を示す最も活性の高い酸素ラジカルである。一方、三価鉄は、安定であるが溶解性が低く（ $10^{-18}$  M）、生物が必要とする鉄濃度（ $10^{-7}$  M）にほど遠い。従って、生物は鉄代謝を厳密に調節する必要があり、これにフェリチンスーパーファミリータンパク質が中心的な役割を担っている。しかし、結核菌において、鉄を酸化したり貯蔵するタンパク質の存在は知られていない。

休眠期結核菌が宿主内で持続潜伏するた

めには、宿主のマクロファージから鉄を奪い増殖しなければならない。また、マクロファージから生じるヒドロキシラジカルは強い殺菌作用を有していることから、結核菌には、これから回避する機構があるはずである。そこで、休眠期結核菌に高発現する mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)に着目し、フェリチンスーパーファミリータンパク質の持つ鉄結合能およびフェロキシダーゼ活性の評価を行った。

B. 研究方法

ウシ型結核菌 BCG より精製した MDP1 (BCG-MDP1)および結核菌組み換え MDP1 (Mtb-MDP1)を用い、二価鉄または三価鉄との結合能を Surface Plasmon resonance 法により検討した。また、放射ラベル化鉄 [ $^{55}\text{Fe}$ ] を用いて結合実験を行った。さらに、その他の二価金属（ $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ およ

び  $Zn^{2+}$ ) についても測定した。

次に、BCG-MDP1 および Mtb-MDP1 のフェロキシダーゼ活性を検索するため、二価鉄から三価鉄への酸化に伴い現れる 305 nm の吸収極大を分光光度計を用いて測定した。また、フェントン反応により生じるヒドロキシラジカルに対する消去作用をヒドロキシラジカルのトラップ剤 8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazine-1,4-(2H,3H) dione を用いて評価した。さらに、ヒドロキシラジカル依存的 DNA 障害に対する MDP1 の抑制作用をプラスミド DNA 存在下で検討した。

#### 倫理面への配慮

本研究には、関係しない。

#### C. 研究結果

BCG-MDP1 ならびに Mtb-MDP1 は、二価鉄を三価鉄に酸化するフェロキシダーゼ活性を有しており (Figure)、それぞれの  $K_m$  値は、 $0.101 \pm 0.015$  mM ならびに  $0.141 \pm 0.033$  mM であった。また Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer で測定した結果、BCG-MDP1 は、1 分子あたり  $76 \pm 23$  分子の二価鉄を貯蔵することが明らかになった。一方、三価鉄やその他の二価金属との結合能は見られなかった。

次に、二価鉄と過酸化水素の存在下でフェントン反応により生じるヒドロキシラジカルは、MDP1 の添加に伴い消去された。このときのヒドロキシラジカルに依存した DNA プラスミドの分解は、BCG-MDP1 ならびに Mtb-MDP1 により抑制された。この抑制効果は、DNA 結合作用をもつヒストンタンパク質にはみられなかった。一方、二価鉄と同じ遷移金属の一価銅によるフェントン反応依存的なヒドロキシラジカルの産生およびそれによる DNA プラスミドの切断に対する、MDP1 の抑制作用はなかった。

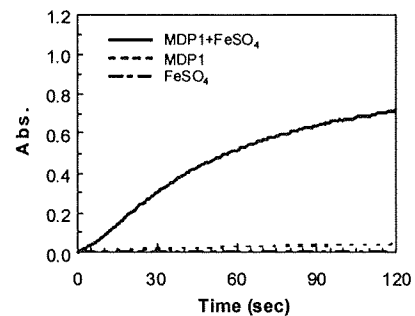


Figure BCG-MDP1 のフェロキシダーゼ活性 GCB-MDP1 による  $Fe^{2+}$  から  $Fe^{3+}$  への酸化作用を波長 305 nm で測定した。

#### D. 考察

MDP1 は、三価鉄と特異的に結合し、フェロキシダーゼ活性を有することから、鉄の代謝と貯蔵を調節する結核菌においてフェリチン様タンパク質を代償し、鉄の代謝や貯蔵に関わることが示された。この鉄への作用は、フェントン反応依存的なヒドロキシラジカルの産生を回避することと、DNA 障害を防ぐことで明らかになった。

#### E. 結論

休眠期結核菌で高発現し、休眠期の菌の生存に必須であることが知られている MDP1 は、DNA 結合性タンパク質として遺伝子の転写を調節することが知られている。加えて本研究成果により MDP1 は、フェリチン様タンパク質様の活性も有し、結核菌の生存に必須な鉄を貯蔵し、鉄に依存した宿主由来のラジカル産生を抑制して潜伏感染結核菌の生存を維持していると推定される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hirayama, Y., M. Yoshimura, Y. Ozeki, I. Sugawara, T. Udagawa, S. Mizuno, N. Itano, K. Kimata, A. Tamaru, H. Ogura, **K. Kobayashi**, and **S. Matsumoto**. 2009. Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication. PLoS Pathog 5: e1000643.
- 2) Wada, T., S. Fujihara, A. Shimouchi, M. Harada, H. Ogura, **S. Matsumoto**, and A. Hase. 2009. High transmissibility of



the modern Beijing *Mycobacterium tuberculosis* in homeless patients of Japan. Tuberculosis (Edinb) 19:19.

- 3) 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.
- 4) Seto, S., S. Matsumoto, I. Ohta, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2009. Dissection of Rab7 localization on *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. Biochem Biophys Res Commun 387:272-277.
- 5) Okazaki, M., K. Ohkusu, H. Hata, H. Ohnishi, K. Sugahara, C. Kawamura, N. Fujiwara, S. Matsumoto, Y. Nishiuchi, K. Toyoda, H. Saito, S. Yonetani, Y. Fukugawa, M. Yamamoto, H. Wada, A. Sejimo, A. Ebina, H. Goto, T. Ezaki, and T. Watanabe. 2009. *Mycobacterium kyorinense* sp. nov., a novel, slow-growing species, related to *Mycobacterium celatum*, isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol 59:1336-1341.
- 6) Nishiuchi, Y., A. Tamura, S. Kitada, T. Taguri, S. Matsumoto, Y. Tateishi, M. Yoshimura, Y. Ozeki, N. Matsumura, H. Ogura, and R. Maekura. 2009. *Mycobacterium avium* complex organisms predominantly colonize in the bathtub inlets of patients' bathrooms. Jpn J Infect Dis 62:182-186.
- 7) Kitamura, A., S. Matsumoto, and I. Asahina. 2009. Growth inhibition of HeLa cell by internalization of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo. Kitamura, A., S. Matsumoto, and I. Asahina. Cancer Cell Int 9:30.
- 8) Seto, S., S. Matsumoto, I. Ohta, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2009. Differential recruitment of CD63 and Rab7-interacting-lysosomal-protein to phagosomes containing *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. Microbiol Immunol in press.
- 9) Ozeki, Y., I. Sugawara, T. Udagawa, T. Aoki, M. Osada-Oka, Y. Tateishi, H. Hisaeda, Y. Nishiuchi, N. Harada, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. Transient role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in mycobacterial infection in mice. Int Immunol in press.

## 2. 学会発表

- 1) 岡 真優子、高塚正樹、尾関百合子、吉村満美子、小林和夫、松本壮吉. Mycobacterial DNA-binding protein-1の新機能-鉄の酸化活性と貯蔵性-. 第7回感染症沖縄フォーラム 2009年2月 沖縄
- 2) 吉村満美子、仁木 誠、岡 真優子、尾関百合子、原田 誠、田丸亜貴、立石善隆、西内由紀子、小林和夫、松本壮吉抗酸菌の休眠誘導と遺伝子発現解析. 第7回感染症沖縄フォーラム 2009年2月 沖縄
- 3) 立石善隆、岡 真優子、西内由紀子、吉村満美子、小林和夫、前倉亮治、松本壮吉. 急速な臨床経過に合致した高病原性MAC菌株の同定-臨床病態と細菌学的病原性との関連. 第7回感染症沖縄フォーラム 2009年2月 沖縄
- 4) 松本壮吉. Tuberculosis, from biology to development of control strategies. 第82回日本細菌学会総会 2009年3月 名古屋
- 5) 立石善隆、平山幸雄、尾関百合子、西内由紀子、吉村満美子、小林和夫、松本壮吉. 2009. 抗酸菌感染症研究における新たな視点(ワークショップ15). 急速な臨床経過に合致した高病原性 *Mycobacterium avium-intracellulare* complex 菌株の同定. 日本細菌学会雑誌, 64 : 93, 2009. 第82回日本細菌学会総会 (名古屋, 3月).
- 6) 平山幸雄、吉村満美子、尾関百合子、

- 菅原 勇、小林和夫、松本壮吉. 2009. 抗酸菌感染症研究における新たな視点 (ワークショップ 15). 結核菌の増殖に対するヒアルロン酸の作用. 日本細菌学会雑誌, 64 : 93, 2009. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋, 3 月).
- 7) 西内由紀子、松本壮吉、立石善隆、鈴木定彦. 生活環境に分布する *Mycobacterium avium* complex と臨床分離株の多型解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 8) 藤原永年、中田 登、中 崇、水野 淨子、合田麗奈、牧野正彦、吉村満美子、松本壮吉、前田伸司. *Mycobacterium intracellulare* 由来血清型 7,12,13 型糖ペプチド脂質の構造類似性とオリゴ糖解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 9) 岡 真優子、小林和夫、松本壮吉. 2009. 結核菌感染マクロファージにおける hypoxia-inducible factor-1alpha の作用機構. 日本細菌学会雑誌, 64 : 190, 2009. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋, 3 月).
- 10) 鈴木大介、永田 年、辻村 邦夫、松本壮吉. 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 2009 年 3 月 名古屋
- 11) 仁木 誠、吉村満美子、小林和夫、松本壮吉. 2009. 抗酸菌の薬剤感受性における MDP1 の調節機構の解析. 日本細菌学会雑誌, 64 : 192, 2009. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋, 3 月).
- 12) 尾関百合子、原田 誠、西内由紀子、山本三郎、小林和夫、松本壮吉. 2009. 抗結核薬スクリーニング系の確立と実践. 日本細菌学会雑誌, 64 : 193, 2009. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋, 3 月).
- 13) 田丸亜貴、松本壮吉. 集団感染事例における VNTR 型と IS6110-RFLP パターンの比較. 第 84 回日本結核病学会総会 2009 年 5 月 札幌
- 14) 田丸亜貴、河原隆二、松本壮吉、鈴木定彦. MLPA 法による多剤耐性結核菌の検出. 第 84 回日本結核病学会総会 2009 年 5 月 札幌
- 15) 西内由紀子、田栗貴博、松本壮吉、立石善隆、北田清悟、田丸亜貴、鈴木定彦、前倉亮治. 肺 *Mycobacterium avium* complex 症患者由来 *M. avium* と豚由来 *M. avium* の血清型比較. 第 84 回日本結核病学会総会 2009 年 5 月 札幌
- 16) Osada-Oka, M., M. Takatsuka, E. Sato, Y. Ozeki, M. Yoshimura, M. Inoue, K. Kobayashi, S. Matsumoto. A ferritin superfamily-like protein in mycobacteria. THE 9<sup>TH</sup> AWAJI INTERNATIONAL FORUM. 2009 年 9 月 淡路島
- 17) 松本壮吉. 気道ヒアルロン酸を利用した、結核菌の感染と増殖のストラテジー. 第 50 回日本熱帯医学学会大会 2009 年 10 月 沖縄
- 18) 尾関百合子、菅原 勇、岡 真優子、小林和夫、松本壮吉. 結核菌感染における制御性 T 細胞の役割検討. 第 62 回日本細菌学会関西支部総会 2009 年 11 月 大阪
- 19) 平山幸雄、吉村満美子、尾関百合子、田丸亜貴、小倉 壽、小林和夫、松本壮吉. 抗酸菌は宿主ヒアルロン酸を利用して細胞外増殖を行う. 第 62 回日本細菌学会関西支部総会 2009 年 11 月 大阪
- 20) 吉村満美子、仁木 誠、立石善隆、小林和夫、松本壮吉. 休眠時における抗酸菌の遺伝子発現解析. 第 62 回日本細菌学会関西支部総会 2009 年 11 月 大阪
- 21) 岡 真優子、今岡 進、小林和夫、松本壮吉. 低酸素状態での HIF-1alpha 安定化におけるグルコースの作用機構. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 横浜

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

出願番号：PCT/JP2009/061819、

発明者：山本法明、松本壮吉

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、発明の  
名称：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：平成21年6  
月29日

- 2. 実用新案登録 なし
- 3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

休眠結核菌の糖脂質代謝と免疫応答に関する研究

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）  
研究協力者 松永 勇（京都大学ウイルス研究所細胞制御研究分野）

研究要旨.

トレハロースジミコール酸（TDM）は、標準人工培地で培養した抗酸菌において多量に産生される細胞壁糖脂質である。TDM はきわめて強い宿主自然免疫細胞の活性化能を有することから、休眠結核菌においてはこの分子発現を制御する機構が存在するものと考えられる。実際、休眠モデル菌においては TDM の産生が低下しており、その機序の解明は潜伏感染病態の理解に必須である。本研究では、生体内環境でのみ生育が可能で、生育に最低限必須の遺伝子を選択的に発現するなど、休眠結核菌と重要な特質を共有するらい菌に着目し、本菌の TDM 発現抑制機構の解析を行った。その結果、らい菌の「ミコール酸転移酵素」は、基質結合部位の変異によりミコール酸転移活性が低下しており、TDM を効率的に産生できないことが明らかとなった。一方この酵素は、直鎖脂肪酸の転移活性を保持していることから、この反応生成物はらい菌の生育に必須の分子であると考えられる。この分子の同定ならびに休眠菌における産生機序と免疫認識機構の解明は、潜伏感染に理解に大きく貢献することが期待される。

A. 研究目的

トレハロースジミコール酸（TDM）は、抗酸菌細胞壁表層に多量に存在するミコール酸含有糖脂質のひとつであり、Toll 様受容体や mincle を介して強力に宿主自然免疫系を活性化する。研究分担者の杉田は、休眠結核菌のように年余にわたって宿主体内で生存する菌は、TDM の産生を抑制することにより宿主免疫系からエスケープする機構を有しているであろうとの仮説を立て、その産生機序と免疫認識機構の解明を目指した研究を展開してきた。

TDM は 1 分子のトレハロースモノミコール酸（TDM）からもう 1 分子の TMM にミコール酸を転移することにより生成される。Ag85 分子群はこのミコール酸転移を触媒する酵素で、抗酸菌細胞壁の構築を規定する重要な機能分子であるとともに、宿主獲得免疫応答の標的となることから、抗酸

菌感染病態の理解に重要である。我々の昨年度の研究から、ヒト結核菌やトリ結核菌の宿主感染においては、宿主内に高濃度に存在するグルコースが TMM と競合的にアクセプター分子として働き、グルコースモノミコール酸（GMM）が生成されるとともに、TDM の産生抑制が起きることを明らかにした。この応答は、菌が細胞壁の基本構築を保ちながらも、宿主自然免疫系からエスケープする有効な手段になると考えられる。

一方、人工培地では増殖しないという本質的特徴を休眠菌と共有しているらい菌においては、TDM のみならず GMM の産生が抑制されている。したがって、そこにはヒト結核菌やトリ結核菌にはみられない新たな糖脂質代謝機構が存在する。そこで本研究では、らい菌 Ag85 に着目し、ミコール酸転移酵素としての機能の評価を行った。