

て、人工合成した Mycolactone A/B の細胞傷害性を検討したところ、短時間に細胞死を引き起こすことが明らかになった。この結果をもとに、Mycolactone の神経系細胞への影響を検討する予定である。

Central Special Skin Clinic (CSSC),  
Yangon General Hospital における EMG  
トレーニング報告 (第 1 報) . 第 83  
回日本ハンセン病学会 2010 年 5 月  
鹿児島市

#### G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表  
圓 純一郎、Kyaw Kyaw、北島信一、後藤正道、石田 裕. ミャンマー国

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

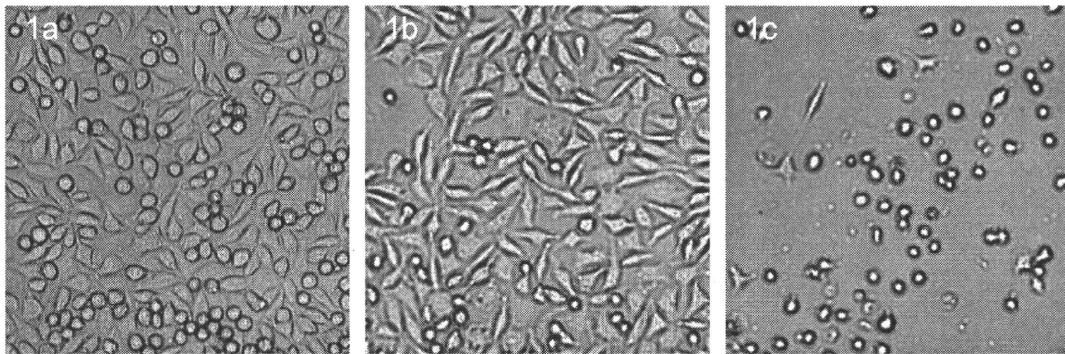


図 1. 培養線維芽細胞への合成 Mycolactone A/B 投与 60 時間後の形態変化

対照 (1a) では紡錘形細胞がほとんどで、Mycolactone 3ng/ml でもほとんど変化はないが (1b)、Mycolactone 30ng/ml では紡錘形細胞はほとんどなくなり (1c)、変性・壊死を示す小型円形細胞が主体となっている。

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

結核菌の分子遺伝学

分担研究報告書

研究分担者

谷口 初美

(産業医科大学・教授)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
分担研究報告書

結核菌の分子遺伝学

研究分担者 谷口初美 （産業医科大学医学部・微生物学・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）  
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・教授）  
福田和正 （産業医科大学医学部・微生物学・講師）  
小川みどり （産業医科大学医学部・微生物学・講師）

研究要旨.

*Mycobacterium smegmatis* J15cs 株は TLR2 を介しての生体防御反応を回避していることが明らかになった。J15cs 株の *rpoZ* 変異株は、色素産生性が低下し、SDS 感受性に変わる以外は *in vitro* の性状に変化はなかった。細胞壁の構成成分は類似しており、ミコール酸、リン脂質、糖脂質の分布は等しく、GPL は両株とも欠落していた。しかし、脂質固定による電子顕微鏡解析で、J15cs 株の細胞壁は非常に厚い高電子密度層を有し、*rpoZ* 変異株では薄くなっていることが分かった。また、培養 2 ヶ月後の菌を普通寒天培地および L-broth に植え継いだ場合、*rpoZ* 変異株は増殖することができず、*in vitro* での生残性は弱くなっていた。一方、J774 細胞内増殖能は J15cs 株より増大した。以上の結果より、J15cs 株の RNA ポリメラーゼの  $\omega$  サブユニットをコードする *rpoZ* 遺伝子は、細胞内増殖性を含む多様な性状に影響を与えることが示明らかになった。

A. 研究目的

結核菌は細胞内で増殖し、休眠状態から再活性化するという特異な性状を有する。この性状は日本での結核対策を困難にしている再燃現象の原因の一つになっていると考えられる。我々は、結核菌の細胞内増殖性のメカニズムを明らかにするために分子遺伝学的解析を行ってきた。しかし、汎用されている宿主・ベクター系の宿主である *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 株は、マウスマクロファージ系 J774 細胞内で生残することができない。我々は、独自の宿主・ベクター系 *M. smegmatis* J15cs-pYT923hyg を構築し、J15cs 株が J774 細胞内で、mc<sup>2</sup>155 株に比べ有意に生残することを見出した。迅速発育抗酸菌である J15c 株が J774 細胞内で生残するメカニズムを明らかにすることは、結核菌の細胞内増殖性のメカニズムを知る上で有用な情報を得ることができると考えた。

また、J15cs 株は弱毒・迅速発育菌であるために、実験遂行が容易であるという大きな利点がある。そこで、J15cs 株の細胞壁構造の形態学的解析、および脂質成分の解析を行い、J15cs 株は mc<sup>2</sup>155 株に比べ、特異な細胞壁構造を有し、且つ apolar GPL (glycopeptidolipid) を欠損していることが明らかになった。すでに、結核菌も apolar GPL を欠損していることが報告されている。そこで、apolar GPL の欠損が、J15cs 株が迅速発育抗酸菌であるにもかかわらず、J774 細胞内で生残する理由の一つではないかと考え、本年度は、TLR2 及び TLR4 に対する反応性を調べた。

一方、我々は、すでに宿主・ベクター系 *M. smegmatis* J15cs-pYT923hyg を用いて、結核菌遺伝子 Rv1388-Rv1389-Rv1390 (*rpoZ*) が J774 細胞内で *M. smegmatis* J15cs に休眠類似の状態を誘導することを見出している。

*rpoZ* 遺伝子は RNA ポリメラーゼの  $\omega$  サブユニットであり、ストレス状態での遺伝子発現の制御に関与しているため、細胞内生残の際の遺伝子発現にも影響すると考えられる。しかし、結核菌の *rpoZ* 遺伝子は必須で、欠損株を取ることができないとの報告がある。すでに mc<sup>2</sup>155 株の *rpoZ* 欠損株の報告があるが、mc<sup>2</sup>155 株は細胞内で生残することができない。そこで、本研究では、*M. smegmatis* J15cs の *rpoZ* に相当する遺伝子を破壊し、*rpoZ* 変異株の性状と細胞内増殖性への影響を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 細胞壁成分の解析

*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155、*M. smegmatis* J15cs とその *rpoZ* 変異株を普通寒天培地で 7 日間培養し、遠心集菌した。

#### ・ミコール酸分析

1M 水酸化テトラブチルアンモニウム溶液で 90°C、16 時間アルカリ加水分解した。6M 塩酸で中和後、ヘキササン抽出によりミコール酸画分を分取し、さらにジアゾメタンでメチルエステル化した。薄層クロマトグラフィー (TLC) で展開 (Hexane/diethyl ether, 90:15 by vol. x3 runs or benzene x3 runs) し、その移動度からミコール酸サブクラスを検出した。展開した TLC 上の単一スポットを精製し、各サブクラスミコール酸メチルエステルを MALDI/TOF MS 分析し、質量数を検定した。TLC での移動度と質量数から各ミコール酸のサブクラスと分子種を同定した。

#### ・脂質画分の抽出と比較

菌体を超音波破碎後、Folch 法に準じて chloroform/methanol (3:1, 2:1, by vol) と H<sub>2</sub>O で二層分配し、有機層を回収、濃縮して総脂質画分を得た。総脂質画分を TLC で二次元展開 (1<sup>st</sup> chloroform/methanol/H<sub>2</sub>O, 65:25:4 by vol; 2<sup>nd</sup> chloroform/methanol/acetic acid/H<sub>2</sub>O, 40:6:7.5:2 by vol.) し、主要脂質成分を網羅的に比較検討した。リン脂質は Dittmer 試薬、アミノ基は Ninhydrin 試薬、糖脂質

は 20% 硫酸で検出した。

#### ・アルカリ安定脂質の検出

総脂質画分を 0.2N NaOH/methanol で 37°C、2 時間アルカリ加水分解してアルカリ安定脂質を得た。アセトン沈澱、Sep-pack カラム処理を行い、糖ペプチド脂質 (glycopeptidolipid, GPL) 画分を抽出した。TLC (chloroform/methanol, 90:10 by vol. or chloroform/methanol/H<sub>2</sub>O, 60:16:2 by vol.) で展開し、20% 硫酸で GPL のスポットを検出した。

### 2) GPL 刺激とレセプター

Toll-like receptor (TLR) を介した宿主認識を、マウス (C57BL/6, TLR2-KO, TLR4-KO) 骨髄由来マクロファージ (BMMs) により測定した。BMMs は、96 穴平底プレートに 2 × 10<sup>5</sup>/ml に調整し、脂質分画で刺激した。24 時間反応後、上清の TNF  $\alpha$  の産生を測定した。さらに、TLR を介したシグナル伝達については、ヒト TLR2 および TLR4 認識に関係する multigene を導入した HEK-Blue2 (TLR2) 細胞および HEK-Blue4 (TLR4) 細胞の分泌アルカリホスファターゼ活性を測定した。

### 3) 色素産生性

*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155、*M. smegmatis* J15cs とその *rpoZ* 変異株を 1% 小川培地に接種し、37°C、1 ヶ月間培養し、コロニーの色素産生性を観察した。

### 4) 脂質固定による電子顕微鏡解析

普通寒天培地で 5 日間培養し、オスミック酸で蒸気固定した。培地から菌を回収し、アガロースに包埋して小さく切り出し、リン酸緩衝液で洗浄した。2% オスミック酸・イミダゾールで脂質固定を行い (室温、1 時間)、脱水・包埋・超薄切片を作成し、ウランとナマリで電子染色後、透過電子顕微鏡で観察した。

### 3) 培地への継代による増殖能

普通寒天培地で画線培養後約 2 ヶ月経過した菌を普通寒天培地および L-broth に植え継ぎ、コロニーの形成および増殖の様子を観察した。

### 4) 細胞内増殖性

マウスマクロファージ系 J774 細胞を 24

穴 plate と Lab-Tek chamber slide に、ほぼ monolayer になるように調整した (10%FCS 加 RPMI1640, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 2 日間)。普通寒天培地で 37°C、7 日間培養した菌を PBS にケン濁し、5 μm フィルターを使用し単個菌を調整、菌を感染させた (約 1×10<sup>6</sup>CFU/well)。感染 3 時間後に PBS で 2 回洗浄し、さらに 200 μg/ml アミカシン加 5%FCS RPMI で 2 時間処理し、細胞外の菌を除き、5 μg/ml アミカシン加 5%FCS RPMI に交換した。この時点をも 0 日目とした。Lab-Tek chamber slide は Ziehl-Neelsen 染色を行い、抗酸性と形態観察を行った。また、24 穴 plate に関しては、0.2% Triton-X-100 とラバーポリスマンで処理し、普通寒天培地にプレーティングして 37°C で 3~6 日培養後、菌数 (CFU) を測定した。

### C. 研究結果

#### 1) 細胞壁成分の解析

J15cs 株とその *rpoZ* 変異株のミコール酸組成は同様であった。 $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、エポキシミコール酸の 3 種類のサブクラスを発現しており、 $\alpha$  ミコール酸は C78-83、 $\alpha'$  ミコール酸は C62-65、エポキシミコール酸は C78-82 を中心としたクラスターを形成した。総脂質画分の二次元 TLC の結果、主要リン脂質として phosphatidylethanolamine (PE), cardiolipin (CL), phosphatidyl-inositol-mannoside (PIM)、糖脂質として trehalose-monomycolate (TMM) をそれぞれ検出し、これらリン脂質、糖脂質の分布にも差はなかった。また、アルカリ安定脂質の TLC において、mc<sup>2</sup>155 株に検出される apolar GPL のスポットは、J15cs 株およびその *rpoZ* 変異株とともに GPL を欠落していた。J15cs 株とその *rpoZ* 変異株の細胞壁成分に差は認められなかった。

#### 2) GPL 刺激とレセプター

マウス (C57BL/6, TLR2-KO, TLR4-KO) 骨髄由来マクロファージ (BMMs) を脂質画分 (GPL) で刺激し、TNF  $\alpha$  の産生を測定した。TLR4-KO マウスにおいては、mc<sup>2</sup>155 株の GPL (1~100 μg/ml) で刺激すると、濃度依存的

に TNF- $\alpha$  の産生が上昇した。しかし、TLR2-KO マウスにおいては、TNF- $\alpha$  の産生が抑制された。また、分泌アルカリホスファターゼ活性は、HEK-Blue2 (TLR2) 細胞を mc<sup>2</sup>155 株の GPL で刺激した時に高い活性が認められた。

#### 3) 色素産生性

J15cs 株と mc<sup>2</sup>155 株を 1%小川培地で培養すると、1 ヶ月後には J15cs 株は mc<sup>2</sup>155 株より色素産生性が強く、コロニーは黄変した。また、*rpoZ* 変異株は色素産生が低下した。

#### 4) 脂質固定による電子顕微鏡解析

mc<sup>2</sup>155 株の細胞壁は、オスミック酸・イミダゾールによる固定を行っても、通常法 (グルタル・オスミウム固定) と特に異なった像は観察されなかったが、J15cs 株の細胞壁は、非常に厚い高電子密度層として観察された。*rpoZ* 変異株は、J15cs 株に比べ、高電子密度層が薄くなっていた。

#### 3) 培地への継代による増殖能

普通寒天培地で画線培養後約 2 ヶ月経過した菌を普通寒天培地および L-broth に植え継いだ。mc<sup>2</sup>155 株および J15cs 株はコロニーを形成したが、*rpoZ* 変異株はコロニーを形成することができなかった。また、L-broth を用いても、J15cs 株は液面部分に凝集塊を形成し明らかな増殖を認めたが、*rpoZ* 変異株は増殖することができなかった。

#### 5) 細胞内増殖性

マウスマクロファージ系 J774 細胞に J15cs 株とその *rpoZ* 変異株を感染させた。0 日目で、J15cs 株、*rpoZ* 変異株に差は認められなかった。しかし、感染 3 日目、6 日目で、J15cs 株は菌体が拡散した状態で生残し、*rpoZ* 変異株は菌塊を形成した部分が多く観察され、J774 細胞が菌塊の周りに集積していた。細胞内菌数に関しては、0 日目に差は認められなかったが、3 日目、6 日目で *rpoZ* 変異株を感染させた場合 J15cs 株を感染させた場合より細胞内菌数が多い傾向はみられたが、光顕像を反映するほどではなかった。

### D. 考察

mc<sup>2</sup>155 株、J15cs 株とその *rpoZ* 変異株の細胞壁成分の解析において、ミコール酸、リン脂質、糖脂質の分布に差はなく、J15cs 株と *rpoZ* 変異株の GPL は欠落していた。細胞内で生残できない mc<sup>2</sup>155 株と生残できる J15cs 株において、mc<sup>2</sup>155 株は細胞壁に GPL が存在するが、J15cs 株には欠落しており、GPL は細胞内での生残に関係していると考えられる。*rpoZ* 変異株も J15cs 株 GPL を株と同様に GPL を欠落していた。

TLR2-KO マウスにおいて、mc<sup>2</sup>155 株の GPL で刺激しても TNF- $\alpha$  の産生は抑制され、HEK-Blue2 (TLR2) 細胞では高いアルカリホスファターゼ活性が認められたので、GPL の刺激は TLR2 を介してシグナル伝達が行われていることが示唆された。

脂質固定による電子顕微鏡で、J15cs 株は細胞壁に厚い高電子密度層を有しており、*rpoZ* 変異株では薄くなっていた。細胞壁の脂質成分に差は認められなかったが、形態的には明らかな差があった。また、*rpoZ* 変異株は、SDS に感受性になり、小川培地上での色素産生性が低下することを見出している。

また、普通寒天培地で培養後 2 ヶ月経過した *rpoZ* 変異株は、液体培地を使用しても増殖することができず、死滅しており、寒天培地上での長期生残への *rpoZ* 遺伝子の関与が示唆された。

マクロファージ内では、*rpoZ* 変異株は菌塊を多数形成し、J15cs より増殖能が増大していた。しかし、細胞内菌数測定の結果は、J15cs と *rpoZ* 変異株でそれほどの差は認められなかった。これは、菌塊を形成するため、コロニー数に反映されなかったと考えられる。現在 0.2% TritonX-100 を使用しているが、菌塊を単個菌にする工夫をする必要があると考えられた。これらの結果より、*rpoZ* 遺伝子変異による細胞壁の脂質成分の変化は認められないが、菌体の細胞壁構造に何らかの変化があり、その結果細胞内での増殖性に影響する原因があるので

はないかと考えている。

## E. 結論

J15cs 株は、宿主の TLR2 を介した免疫応答を回避することにより、マクロファージ内で生残すると考えられた。J15cs 株の *rpoZ* 遺伝子は、培地上の生残性、色素産生性、および細胞内増殖性など多様な影響を与えることが示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Morii, H., M. Ogawa, K. Fukuda, H. Taniguchi, and Y. Koga. 2010. A revised biosynthetic pathway for phosphatidylinositol in mycobacteria. *J. Biochem.*, 148: 593-602.

### 2. 学会発表

- 1) 野本摩利, 小川みどり, 福田和正, 宮本比呂志, 谷口初美. *Mycobacterium smegmatis* J15cs の結核菌細胞内増殖の分子遺伝学的研究への応用 (1) : 宿主・ベクター系の構築. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
- 2) 小川みどり, 大原直也, 野本摩利, 福田和正, 谷口初美. *Mycobacterium smegmatis* J15cs の結核菌細胞内増殖の分子遺伝学的研究への応用 (2) : *rpoZ* mutant の解析. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
- 3) 福田和正, 森井宏幸, 小川みどり, 谷口初美. 抗酸菌における phosphatidylinositol (PI) 合成経路の解明. 第 63 回日本細菌学会総会 2005 年 10 月 宮崎

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

非結核性抗酸菌の感染・発病に関する基礎的研究

分担研究報告書

研究分担者

後藤 義孝

(宮崎大学・教授)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
分担研究報告書

非結核性抗酸菌の感染・発病に関する基礎的研究

研究分担者 後藤 義孝（宮崎大学農学部・獣医微生物学・教授）

研究要旨.

NTM は水中や土壌などの環境中に広く存在し、鳥類や爬虫類、魚類に病気を起こすほか、人を含めた哺乳動物に日和見感染を起こす。NTM は結核菌群のようにヒト-ヒト間あるいは、哺乳動物-ヒト間の感染は確認されていないが、人獣共通感染症の原因菌として問題となる。哺乳動物のうち猫はNTM による皮膚抗酸菌症の報告が多くあり、易感染状態では全身性の感染症となる。またNTM に対する治療薬は少なく、長期的な多剤併用療法が行われるが、難治性であることも多い。自然環境下で生息する動物からは多種類のNTM が分離されるが、それらのもつ病原性や哺乳動物への感染機序に関してはよく分かっていない。そこで、今回環境から分離したさまざまなNTM のネコマクロファージ系株化細胞への感染系を考案し、それらの菌がもつ同細胞内での増殖性を調べ、起病性のスクリーニングが可能か否かを検討した。

A. 研究目的

抗酸菌は *Mycobacterium tuberculosis* や *M. bovis* に代表される結核菌群と非結核性抗酸菌 (non-tuberculosis Mycobacteria : NTM)、それにらい菌 (*M. leprae*)、鼠らい菌、ヨ-ネ病菌 (*M. avium* subsp. *paratuberculosis*) などの培養困難な抗酸菌に分類される。このうちNTM は水や土壌などの環境中に広く存在しており、水道水からも分離される。人や動物がNTM に接触する機会は多く、免疫能が正常な人や動物に対しては通常無害であるが、免疫低下患者には日和見感染を引き起こす。NTM の多くは日和見感染を引き起こす病原体と見なされるが、病気を引き起こすメカニズムはほとんど分かっていない。人から人、動物から人、あるいは人から動物への直接的伝播は今のところよく分かっていないが、猫は多種類のNTM に感受性があり、個体間で感染が成立した例が知られている。多くのNTM 感染症は一般に難治性であり、猫では潰瘍や膿肉芽腫性皮膚炎、脂肪織炎を起こすほか播種性抗酸菌症の報告もある。ヒトのNTM 感染症では外科的手術による治療と

長期的な多剤併用療法が用いられるが、予後が悪いことも多い。また長期的な抗生物質投与により、薬剤耐性菌の出現の可能性も危惧される。

我々はこれまでに、ヒトやマウスのマクロファージを用いた *in vitro* NTM 感染系とくにヒトの非定型抗酸菌症の主たる原因菌である *M. avium* や *M. intracellulare* の感染系について研究を行い、ヒト由来単球系株化 (THP-1) 細胞やマウス株化マクロファージ細胞を用いた *M. avium* 感染系を考案している。しかし、近年 *M. avium* 以外のNTM 感染症例がヒトをはじめペットで多く見つけてきており、人獣共通感染症としての危険性はじめ治療法や病原性のスクリーニング法の研究が必要になってきている。マウスはほとんどのNTM に対し抵抗性を示すため、マウスを用いた病原性のスクリーニングは実用的ではないように思われる。猫には多くのNTM 自然感染例が知られているが、動物個体を用いた病原性スクリーニング法はコスト面や倫理面から望ましくないとされる。そこで猫由来のマクロファージ株化細胞を用いた *in vitro* 実験系を確立し、



環境由来 NTM のなかから動物に起病性を有する株をスクリーニングする方法について検討することにした。

## B. 研究方法

株化細胞：猫マクロファージ系株化細胞 Fcwf-4(以下 Fcwf-4)は 10% FBS 加 Dulbecco's Modified Eagle Medium で培養し、組織培養用フラスコ (TPP、Switzerland)において 5%CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で培養した。

蛍光ラテックスビーズの貪食：10%FBS 加 DMEM 培地に浮遊させた 10<sup>5</sup> の Fcwf-4 細胞を 4 ウェルのチャンバースライド (Lab-Tek II Chamber Slide、ナルジュヌンクインターナショナル、東京)に接種し、1 日培養して細胞を接着後、上清を除去し、蛍光ラテックスビーズ (Fluoresbrite Carboxylate Microspheres、2.5% solids-latex、YG、粒径約 0.75 μm ~ 1 μm、Polyscience、U.S.) を細胞 1 に対し 100 ~ 1,000 の割合となるよう加えて 37°C、5%CO<sub>2</sub> で 30 分、1 時間、2 時間培養した。PBS で 5 回洗浄し、貪食されなかったビーズを除去後、蛍光顕微鏡で観察した。

免疫組織学的染色(免疫染色)：細胞をスライドチャンバーに接着させた後、4%パラホルムアルデヒドにて固定、3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> メタノール処理による内因性ペルオキシダーゼ不活化をおこなった後、一次抗体として、HLA-DR 抗ヒト、マウスモノクローナル抗体 (Dako Japan、東京)および抗 Iba1 ウサギポリクローナル抗体 (Wako、大阪)を反応させた。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ・抗マウスイムノグロブリンを用いた。光学顕微鏡観察下でジアミノベンジン (DAB) を滴下して発色させた。

環境由来抗酸菌：*M. terrae* No. 41、*M. abscessus* No. 42、*M. arupense* No. 39、No. 122、*M. fortuitum* OP39-12 の 5 株と、全身性抗酸菌症の猫の肉芽腫から分離された *M. intracellulare* MJFel-01、日本 BCG 研究所から分与を受けた *M. bovis* BCG 合計 7 株を使用した。

In vitro 感染系：10%FBS 加 DMEM 培地に

浮遊させた Fcwf-4 細胞 (1.0 × 10<sup>5</sup>/ml) に、m. o. i. 10 に調整した菌浮遊液を加え、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにおいて 37°C、2.5 時間貪食させた。細胞に貪食されなかった菌を除去するために 500g で 5 分間の遠心を 4 回繰り返した。洗浄液除去後、10%FBS 加 DMEM 培地に細胞を再浮遊させ、10<sup>5</sup>/ml/ウェルの割合で 24 ウェルプレートならびに 4 ウェルチャンバースライドに接種、細胞を付着させるとともに 5%CO<sub>2</sub> にて 37°C で一定期間培養した。前者は細胞内生菌数の測定に、また後者は培養終了後に抗酸染色を行って、光学顕微鏡下で細胞内菌の観察を行った。

細胞内生菌数の測定：24 ウェルプレートは 0、2、4、6 日目に培養上清を除去し、0.05%Triton-X で細胞を融解させた。溶解液は 10 倍段階希釈を行い、Middlebrook 7H10 寒天培地に接種、形成されたコロニー数を数えて細胞内生菌数を算出した。

各種抗生物質による細胞外抗酸菌の増殖阻止濃度の検討：NTM は抗生物質不含培地では Fcwf-4 細胞外での増殖が著しく、Fcwf-4 細胞内での菌増殖測定が困難であると予想された。そこで Fcwf-4 細胞による貪食後、細胞外に残存する菌の増殖を抑制するアミノグリコシド系薬剤の濃度を検討した。同薬剤は抗酸菌に対する効力が比較的高く、細胞内への移行性が低い。*M. terrae* No. 41 と *M. arupense* No. 39 は SM 100 μg/ml、*M. arupense* No. 122 は GM 2.5 μg/ml、*M. abscessus* は GM 20 μg/ml、*M. fortuitum* は GM 100 μg/ml を細胞外菌増殖阻止濃度とした。

## C. 研究結果

### 1. Fcwf-4 細胞の特徴

蛍光ラテックスビーズの希釈濃度により貪食に違いがみられた。100 倍希釈では背景に洗浄で取り除ききれなかった残存ビーズが認められたものの、細胞への貪食が明瞭に観察でき、貪食細胞の割合は 1000 倍希釈に比べて高かった。貪食させる時間を 30 分から 1 時間に延長すると、貪食細胞の割合が増加した。ビーズ作用時間を 1 時間に設定し、LPS 刺激を行ったが、LPS 刺激によ

る食食率の増加は認められなかった。

陽性コントロールとした猫ノカルジア症皮下腫瘍標本を様々な一次抗体を用いて染色したところ、抗 HLA-DR 抗体と抗 Iba1 抗体が猫マクロファージで交差性を示し、両抗体は猫のマクロファージ表在抗原への有効性が認められた。そこで Fcwf-4 細胞について同抗体で免疫染色を行ったがいずれも陰性であった。

## 2. Fcwf-4 細胞内における NTM の増殖

結果を図 1 に示す。Fcwf-4 細胞が取り込んだ菌数(0 日目の値)は菌株によって大きく異なり、*M. fortuitum* と *M. intracellulare* では細胞内に取り込まれた生菌数が、*M. terrae*、*M. abscessus*、*M. arupense* No. 39、*M. arupense* No. 122、*M. bovis* BCG に比べて少なかった。次に経日的に細胞内生菌数を調べてみると *M. arupense* No. 122 を除く 4 菌株で菌数増加が認められたが、抗生物質非添加条件での感染実験に比べて増殖率(感染 6 日目の生菌数を感染直後における細胞内菌数で除した値)は小さくなった。これは感染 6 日目の生菌数には細胞外で増殖した菌数が相当数含まれているためと思われる。*M. terrae*、*M. arupense* No. 39 は感染後 6 日間を通して菌数の増加がみられた。*M. abscessus* は 4 日目までは菌数の増加を示したが 6 日目にはやや減少した。*M. fortuitum* は 4 日目まで菌数の増加がみられたがそれ以降は横ばいであった。*M. arupense* No. 122 は 6 日間を通して菌数は増えずにほぼ一定の菌数を維持していた。陽性コントロールとした *M. intracellulare* は感染初期には菌数増加が認められたが 4 日以降の菌数はほぼ横ばいで推移した。陰性コントロールとした *M. bovis* BCG は感染期間を通じて菌数増加はみられなかった。

培養細胞を顕微鏡で観察してみると、*M. terrae*、*M. abscessus* 感染細胞はともに 4 日目まではシート状に貼り付いていたが、5 日目には円形浮遊細胞が散見され、6 日目には付着細胞は更に減少した。*M. arupense* No. 39 は 5 日目まで細胞がシート状に貼り付いており、6 日目には多くが円形化し浮

遊していた。

## D. 考察

猫の NTM 感染症に関する報告の多くは症例報告である。猫の皮膚抗酸菌症の組織サンプルを用いた免疫病理学的研究や、サイトカインと iNOS 動態に関する研究があるが、感染のメカニズムについての研究や、猫由来細胞を用いた *in vitro* での抗酸菌研究はほとんどない。Fcwf-4 株化細胞は、食食能や非特異的エステラーゼおよび Fc レセプターなど猫マクロファージの特徴の一部は保持しているものの MHC クラス II 抗原および Iba1 の発現がみられず、抗原提示能の欠落や LPS 刺激に対する無反応性など本来成熟猫マクロファージが保有する特徴はないと思われる。同細胞は分裂・増殖能が激しく未成熟段階の細胞で、殺菌物質をほとんどもたないように思われる。このことが他のマクロファージ系細胞に比べて NTM の細胞内増殖を容易にしている理由なのかもしれない。細胞外増殖を抑制できる濃度に抗生物質を加えることで、Fcwf-4 細胞がシート状を保つ 4 日目までは細胞外の菌増殖を効果的に抑制できた。こうした条件下で、5 株中 4 株の NTM が細胞内で増殖した。培養を長期化させると細胞剥離、変性、および一部の菌株で細胞外増殖が見られるようになったが、非感染細胞の培養でも 4 - 5 日目以降に細胞剥離がみられることから、剥離は菌増殖の影響ではなく、細胞の過増殖のためと推測される。今後の課題として、Fcwf-4 細胞の増殖と分化をコントロールして長期間付着生育できる条件の検討が必要であると考えている。

今回の感染実験で使用した NTM 菌株は、水生カメの体表部および消化管内から分離されたもので、カメに対する病原性は明らかでなくいわゆる自然環境に生息する菌といってよい。こうした菌の中に動物マクロファージ内で増殖できるものが存在することが今回の実験で明らかになった意義は大きい。感染 3-4 日まで細胞内増殖がみられた 3 菌株は、猫に病原性を有する MJFe1-01 株 (*M. intracellulare*) と増殖パターンが似通っ

ており、動物に病原性を有する可能性がある。実際に*M. abscessus*と*M. fortuitum*をそれぞれマウス (C57BL/6) に実験感染させたところ、両株ともにマウスに病原性を示し、マウスの脾臓や肝臓内に多くの肉芽腫を形成した。またそれら肉芽腫を構成するマクロファージ内において菌増殖が確認された。

以上、我々は環境から分離されるNTMの病原性を推定するひとつの方法として猫マクロファージ系株化細胞を用いた*in vitro*感染系を考案した。菌株により貪食されやすい菌とされにくい菌が存在したが、最初に取り込まれた菌数に関係なく、細胞内でよく増殖する株とそうでない株とに分けることができた。

環境由来 NTM は抗生物質が効きにくく、感染・発病に至れば治療が困難となる。猫の NTM に対する感受性には遺伝的背景や免疫抵抗性が関与するともいわれるが、菌種や菌株による起病性の違いもまた重要である。Fcwf-4 細胞を用いた本スクリーニング法の開発は、動物実験の軽減に資することができるとともに、NTM 感染症における有効な治療薬のスクリーニングや感染症の機序解明などの研究にも有効であると思われる。ができるとともに、NTM 感染症における有効な治療薬のスクリーニングや感染症の機序解明などの研究にも有効であると思われる。

#### E. 結論

水中や土壌などの環境中に広く存在する非結核性抗酸菌 (NTM) のネコマクロファージ系株化細胞への *in vitro* 感染系を考案し、同細胞内で増殖できる株は動物に対する起病性を有することを明らかにした。本法は NTM のヒトをはじめとする動物に対する病原性をスクリーニングするのに有用な系である。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
- 1) 後藤義孝. 輸入エキゾチックアニマルにおける非定型抗酸菌の検出状況と対策. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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

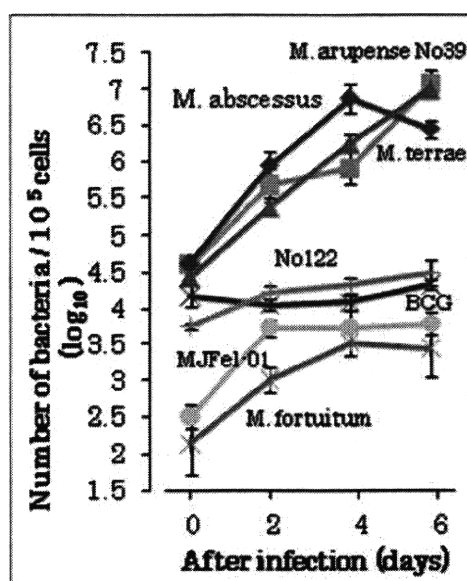


図 1. Fcwf-4細胞内におけるNTMおよび*M. bovis* BCGの増殖。4菌株5株 (*M. arupense* No39とNo122, *M. abscessus* No42, *M. terrae* No41, *M. fortuitum* OP89-12), *M. intracellulare* M.JFel-01株それにBCG Tokyo株をmoi 10の割合でFcwf-4細胞に感染させ、還元培養法により細胞内生菌数を調べた。各ポイントは3ウェルの平均値と標準偏差を示す。

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

抗酸菌症に対する予防、診断、治療に関する

細菌学的・免疫学的な基礎研究

分担研究報告書

研究分担者

瀧井 猛将

(名古屋市立大学・准教授)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
分担研究報告書

抗酸菌症に対する予防、診断、治療に関する細菌学的・免疫学的な基礎研究

研究分担者 瀧井 猛将（名古屋市立大学大学院薬学研究科・  
生体防御機能学・准教授）

研究要旨.

高齢者の結核罹患率は依然高く有効な予防法が求められている。本研究では、高齢マウスに対する BCG 接種は若齢マウスに対する接種と同等の感染防御効果が認められた。

A. 研究目的

平成 21 年の結核の統計によると 70 歳以上の罹患率は 58.8 であり、80 歳以上では 88.3 となっている。平成 21 年の新規登録者の 50.1% が 70 歳以上の高齢者であり本邦での高齢者結核は大きな問題となっている。高齢者は BCG 非接種者も多い。

結核ワクチンである BCG の成人結核に対する予防効果は不定とされており、高齢者を含む成人の初回感染、発症にたいしての有効性について評価を得られていない。

本研究では実験的に高齢者を想定した高齢マウス感染実験モデルにおいて、若齢期 BCG 接種群とのワクチン効果の比較を行った。

B. 研究方法

老齢マウスとして 24 ヶ月齢の雌性 C57BL/6 を用いた。若齢マウスとしては 4～6 ヶ月齢の同系の雌性マウスを用いた。BCG ワクチン株としては Tokyo172 株を用いた。感染実験にはヒト型結核菌株 *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv を用いた。サイトカイン測定は ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) 法にて行った。リンパ球の細胞表面マーカー検出は特異的な抗体で処理後、flow cytometry を用いて行った。感染臓器での結核菌数は組織懸濁液を寒天平板に塗布し、孵卵器で 2 週間培養後、コロニー数をカウントして算出した。

倫理面への配慮

本動物実験計画は名古屋市立大学実験動物委員会の倫理審査をうけて行った。

C. 研究結果

加齢に伴い、リンパ球のサブセットである CD4 と CD8 の比率が変化することが報告されている。本研究で用いた老齢マウスの CD4/CD8 の比率は若齢マウスと比べておよそ 2 倍高かった。この結果は上述の知見と一致した。

老齢、若齢マウスそれぞれに  $1 \times 10^6$  CFU (Colony Forming Unit) の BCG を腹腔内に注射し、8 週間後に屠殺し、脾臓を摘出し、脾臓細胞を単離後、結核抗原である PPD (Purified Protein Derivative) と共培養したときに産生されるインターロイキン-2 (IL-2) とインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を測定したところ、老齢マウスの非細胞からのこれらのサイトカン産生量は若齢マウスと同様であった。また、BCG 免疫、非免疫マウスそれぞれにヒト型結核菌 *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv を  $1 \times 10^5$  CFU 尾静脈より注入し感染させた。結核菌感染 4 週間後に屠殺し摘出した脾臓から単離した非細胞を抗原刺激した時の IL-2、IFN- $\gamma$  の産生量も老齢マウスは若齢マウスと同様であった。

感染マウスの肺、脾臓での結核菌数を測定したところ、老齢マウスは BCG 接種により結核菌数を 1/100 にまで減少させた。この結果は若齢マウスと同等であった。

#### D. 考察

本研究では加齢研究によく用いられているマウス実験系をもちいて BCG ワクチン初回接種における結核感染防御効果を検討した。24ヶ月齢マウスはヒトの年齢に換算するとおよそ65～70歳とされている。加齢に伴うT細胞のサブセット比率の変化ヒトリンパ球でも同様に報告されており、本研究で用いた加齢マウスは高齢者での免疫状態を反映している結果であることが推測される。

加齢マウスでの BCG 免疫後の PPD に対する応答について、T細胞の増殖因子である IL-2、及び結核の感染防御に重要な働きをしていることが知られている IFN- $\gamma$  の産生について BCG 接種若齢マウス（ヒト換算で乳幼児期）と同等のサイトカイン産生が見られた。上記サイトカインは結核免疫に重要な細胞性免疫に働く因子であり、老齢マウスに対して BCG ワクチン接種が結核感染防御に有効であることを示している。実際、感染防御実験においても BCG 接種により老齢マウスにおいて結核菌数の減少が見られた。

#### E. 結論

BCG 非接種高齢者を想定した老齢マウス感染実験モデルにおいて、BCG 接種は結核菌感染防御に有効であった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hayashi, D., T. Takii, T. Mukai, M. Makino, E. Yasuda, Y. Horita, R. Yamamoto, A. Fujiwara, K. Kanai, M. Kondo, A. Kawarazaki, I. Yano, S. Yamamoto, and K. Onozaki. 2010. Biochemical characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG substrains. FEMS Microbiol. Lett., 306: 103-109.
- 2) Ito, T., T. Takii, M. Maruyama, D. Hayashi, T. Wako, A. Asai, Y. Horita, K. Taniguchi, I. Yano, S. Yamamoto, and K. Onozaki. 2010. Effectiveness

of BCG vaccination to aged mice. Immun. Ageing, 7: 12.

##### 2. 学会発表

- 1) 山本龍二, 瀧井猛将, 堀田康弘, 小川賢二, 小野寄菊夫. トリ型結核菌亜種のアノモニア産生における Arginine deiminase の関与. 第9回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2010 2010年10月 京都
- 2) 谷口恵一, 瀧井猛将, 林大介, 矢野郁也, 山本三郎, 丸山光生, 小野寄菊夫. BCG 亜株の抗原提示能の差異および BCG ワクチンの有効性に関する研究. 第22回微生物シンポジウム 2010年9月 大阪
- 3) Hayashi, D., T. Takii, N. Fujiwara, Y. Fujita, I. Yano, S. Yamamoto, M. Kondo, E. Yasuda, E. Inagaki, K. Kanai, A. Fujiwara, Y. Horita, K. Taniguchi, T. Chiba, and K. Onozaki. Comparable studies of immunostimulating activities in vitro among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) substrains. 14th International Congress of Immunology 2010, 22-27 August, 2010, Kobe, Japan.
- 4) 瀧井猛将. 抗酒薬ジスルフィラムの抗結核薬への応用. 第9回バイオテクノロジー国際会議 2010年6月 東京
- 5) 堀田康弘, 小川賢二, 瀧井猛将. 抗酒癖薬ジスルフィラムの結核菌特異的な作用に関する研究. 第85回日本結核病学会総会 2010年5月 京都
- 6) 山本龍二, 小川賢二, 堀田康弘, 瀧井猛将. トリ型結核菌亜種のアノモニア産生における arginine deiminase の関与. 第85回日本結核病学会総会 2010年5月 京都
- 7) 谷口恵一, 市川和哉, 小川賢二, 堀田康弘, 瀧井猛将. 推定病原性因子のサイトカイン誘導能についての研究. 第85回日本結核病学会総会 2010年5月 京都

- 8) 堀田康弘, 瀧井猛将 小川賢二, 稲垣衣美, 小野寄菊夫. 抗酒薬ジスルフィラムの抗結核作用についての検討. 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 岡山
- 9) 黒石隆司, 瀧井猛将, 堀田康弘, 千葉拓, 森雅美, 前田康博, 黒野幸久, 小川賢二, 小野寄菊夫. OCT313 の誘導体の作製と抗結核作用の解析. 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 岡山
- 10) 山本龍二, 瀧井猛将, 堀田康弘, 小川賢二, 小野寄菊夫. トリ型結核菌亜種のアンモニア産生における Arginine deiminase の関与. 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 岡山
- 11) 谷口恵一, 瀧井猛将, 安田恵実, 林大介, 向井徹, 山本三郎, 小野寄菊夫. *Mycobacterium bovis* BCG の宿主細胞内生存能と抗原性の発現に関する研究. 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月. 岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

宿主への侵入および宿主内生存に関わる抗酸菌の

分子と宿主要因に関する研究

分担研究報告書

研究分担者

大原 直也

(岡山大学・教授)



厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
分担研究報告書

宿主への侵入および宿主内生存に関わる抗酸菌の分子と宿主要因に関する研究

研究分担者 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・教授）  
研究協力者 小林 和夫（国立感染症研究所・免疫部・部長）  
研究協力者 岡部真裕子（国立感染症研究所・免疫部・研究員）  
研究協力者 中山 真彰（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・口腔微生物学・助教）

研究要旨.

BCGのチミジル酸合成酵素 ThyX を欠損させると特定の培地上で増殖出来ない。これはチミンの飢餓によるものではなく、ThyX が併せ持つ NADPH 酸化活性の喪失によることが示唆された。さらに詳細な原因を明らかにすることを目的として DNA マイクロアレイを用いて解析したところ、cyclic-di-GMP の合成・分解が菌の増殖に関与していることが示唆された。ThyX、cyclic-di-GMP はヒトを始めとする哺乳類には存在しないため、抗生物質開発の新たな標的となる可能性がある。

A. 研究目的

細菌は環境の変化に対して、発現する遺伝子のセットを変化させることで適応する。細胞内寄生菌である結核菌が宿主に感染した場合には、培地で培養を行なった場合とは異なる遺伝子の発現プロファイルを示す。さらに宿主細胞内に潜伏感染している結核菌は感染初期とは異なる遺伝子を発現していることが推測される。そして潜伏（持続）感染している際に発現している遺伝子群は宿主内における本菌の生存に重要な遺伝子であると考えられる。一方、宿主内で長期生存しているときの環境は低酸素状態であることが推測されており、好気条件下で発育する本菌が低酸素状態で長期生存するためには、酸化還元に関わる分子が長期生存に重要であることが考えられる。

核酸はすべての生物にとって必須である。従って DNA の構成成分のひとつチミンの合成経路も生物にとって必須である。チミジル酸（dTMP）はチミン合成経路の中間産物であり、dUMP を基質として、チミジル酸合成酵素 thymidylate synthase (TS) によって合成される。TS には古くから知られてお

り哺乳類も持つ ThyA と、最近になり発見された ThyX の 2 種類が存在する。細菌を含む多くの生物は ThyA を持つが、一部の生物種は ThyA の代わりに ThyX を持つ。*Mycobacterium* とその近縁種である *Corynebacterium*、*Nocardia*、*Rhodococcus* は例外的に ThyA と ThyX の両者を持つ。ThyA と ThyX は同じチミジル酸合成活性を持ちながら両者に相同性は無く、また ThyA と異なり ThyX は補酵素として FAD を必要とし、その反応に NADPH オキシダーゼ反応を伴う。NADPH/NADP<sup>+</sup>は NADH/NAD<sup>+</sup>とともに、その酸化還元反応が細胞のさまざまな代謝経路に使用されていることから ThyX はチミジル酸の合成以外に菌体内の恒常性の維持に関わっていることが推測される。BCG *thyX* 欠損株と *thyA* 欠損株を用いた我々の実験から、*thyX* 欠損株は特定の条件下で発育できないことが示された。本研究ではその原因および責任分子を明らかにし、その分子を標的とした新しい作用機序の抗結核剤開発に供すること目的とする。これまでにないタイプの抗結核剤が開発されれば現在アジアに蔓延している多剤耐性結核菌、超多剤

耐性結核菌制圧の有効な手段となる可能性がある。

## B. 研究方法

### 1. 使用菌株および培養条件

BCG Tokyo 株を親株とした *thyX* の遺伝子欠損株  $\Delta$ ThyX はシヨ糖感受性遺伝子 (*sacB*) を利用した 2 段階の相同組み換えによって行なった。遺伝子相補株  $\Delta$ ThyX:*thyX*/pNN は  $\Delta$ ThyX をプラスミド pNN-*thyX* で形質転換することにより作製した。BCG Tokyo 株および変異株は完全合成培地である Sauton 培地で 2 週間表面培養を行なった。また 7H9-ADC-Tween80 倍地、7H10-ADC 寒天培地 (カタラーゼ含有)、7H10-ADS 寒天培地 (カタラーゼ非含有) でも培養を行なった。

### 2. DNA マイクロアレイ

マイクロアレイは NCBI に公開されている BCG パスツール 1173P2 株のゲノム情報をもとに 3,951 遺伝子、プローブ長 60 塩基の発現アレイをロッシュ社に作製依頼した。

菌体内全 RNA は TRIzol 試薬を用いて行ない、DNaseI により混在する DNA を消化後、RNeasy を使用して不純物の除去を行なった。

### 3. 遺伝子過剰発現株の作製

親株に対して *thyX* の遺伝子欠損株  $\Delta$ ThyX で発現が上昇した遺伝子とそのプロモーターを含む領域を PCR で増幅し親株した遺伝子を大腸菌-抗酸菌シャトルベクター pNN2 に挿入した。作製されたプラスミドをエレクトロポレーション法により BCG に導入し、カナマイシン含有 7H10-ADC 寒天培地に播種した。得られた組換え体は 7H10-ADC 寒天培地および 7H9-ADC-Tween80 倍地を用いて発育速度の検討を行なった。

倫理面への配慮 該当しない。遺伝子組み換え実験については機関内承認を得た。

## C. 研究結果

### 1. *thyX* が菌の増殖に与える影響

$\Delta$ ThyX は完全合成培地である Sauton 培地では、その増殖は野生株との間に差は認められなかった。またカタラーゼ非含有培

地である 7H10-ADS 寒天培地においてもその増殖は野生株との間に差は認められなかった。しかし、7H9-ADC-Tween80 倍地、7H10-ADC 寒天培地 (カタラーゼ含有) を用いた場合には増殖は顕著に抑制され、特に、7H10-ADC 寒天培地上においては、野生株において通常集落が数ミリメートル以上となる 3 週間では集落の形成は確認できなかった。しかし、さらに培養を続けることにより、野生株に比し少数であるが、集落の形成が確認された。このようにして得られた株を  $\Delta$ ThyX-R とした。 $\Delta$ ThyX-R はカタラーゼ含有培地である 7H10-ADC 寒天培地に継代しても野生株と同様の増殖を示した。

遺伝子相補株  $\Delta$ ThyX:*thyX*/pNN ではいずれの培地を用いた場合においてもその増殖において野生株との間に差は認められなかった。

### 2. $\Delta$ ThyX の遺伝子発現プロファイル

BCG Tokyo 株、 $\Delta$ ThyX、遺伝子相補株  $\Delta$ ThyX:*thyX*/pNN、 $\Delta$ ThyX-R の遺伝子発現プロファイルを比較検討した。BCG Tokyo 株と遺伝子相補株  $\Delta$ ThyX:*thyX*/pNN の比較では相補株において *thyX* が 46.18 と高い値を示し、*thyX* が過剰発現していることを示している以外は大きな変動は見られなかった。またこのことから今回のマイクロアレイのデータは信頼性が高いことが示された。BCG Tokyo 株と  $\Delta$ ThyX-R の比較では 14 遺伝子が  $\Delta$ ThyX-R で 2 倍以上の発現が高かったが、5 倍を超えて高い値を示す遺伝子は認められなかった。

BCG Tokyo 株と  $\Delta$ ThyX の比較では両者に顕著な差がみられた。 $\Delta$ ThyX で発現量の減少していた遺伝子 (カットオフ値 0.50) は 3951 遺伝子中 49 遺伝子であった。また  $\Delta$ ThyX と遺伝子相補株の間で、 $\Delta$ ThyX で発現量の減少した遺伝子は 120 遺伝子であった。そして両者に共通する遺伝子は 26 遺伝子であり、これらが *thyX* の欠損により発現量に影響を受けた遺伝子と考えられる。9 遺伝子は機能の全く未知な遺伝子であった。しかし、両者に共通して 3 分の 1 以下に発現の下降した遺伝子は *thyX* 以外に認められず、またこれらの遺伝子はゲノムに散在

して存在していた。以上のことから  $\Delta$ ThyX で発現量の減少していた遺伝子の中に、 $\Delta$ ThyX が特定の培地において増殖が抑制されることの原因遺伝子を推測することは困難であった。

一方、BCG Tokyo 株に比し  $\Delta$ ThyX で発現量の増加していた遺伝子（カットオフ値 2.00）は 3951 遺伝子中 58 遺伝子であった。また  $\Delta$ ThyX と遺伝子相補株の間で、 $\Delta$ ThyX において発現量の増加していた遺伝子は 81 遺伝子であった。そして両者に共通する遺伝子は 30 遺伝子であり、これらが *thyX* の欠損により発現量に影響を受けた遺伝子と考えられる。15 遺伝子は機能の全く未知な遺伝子であった。他の遺伝子の産物には、転写調節因子をコードしていると推測される遺伝子が 5 遺伝子含まれていた。特に他の菌でバイオフィルムの形成に関与することが示されている LuxR タイプ転写因子の遺伝子が 2 遺伝子含まれていた。ゲノム上では 15 遺伝子は 3 か所の領域、BCG0943c - BCG0947、BCG1416c - BCG1421、BCG3786 - 3788 に局在していたが、他の 15 遺伝子はゲノム上の様々な位置に散在していた。なお、 $\Delta$ ThyX-R におけるこれらの遺伝子の発現レベルは親株と同等であった。以上のことから、 $\Delta$ ThyX が特定の培地において増殖が抑制されることの原因遺伝子は以上の遺伝子の中に存在することが推測された。

### 3. 特定の遺伝子過剰発現株の増殖能

$\Delta$ ThyX で発現が上昇している遺伝子が増殖抑制の原因遺伝子であるかを明らかにするため、前項で示された半数の遺伝子が局在している BCG0943c - BCG0947、BCG1416c - BCG1421、BCG3786 - 3788 の 3 領域内に存在する遺伝子をそれぞれ大腸菌-抗酸菌シャトルベクター pNN2 に挿入し、BCG Tokyo 株に導入することで各遺伝子の過剰発現株を作製した。その結果、BCG1419c、BCG1421、BCG3787 の過剰発現株において集落形成にかかる時間が親株に比し 2 倍以上遅延した。

## D. 考察

我々はこれまでに、最小培地および富栄

養培地のいずれの場合においても BCG は *thyA* および *thyX* を恒常的に発現していること、また両遺伝子は大腸菌 *thyA* 欠損株を相補することができ、チミジル酸合成酵素活性を有していることを明らかにしている。

また、*thyA*、*thyX* それぞれの遺伝子欠損株  $\Delta$ ThyA および  $\Delta$ ThyX を作製したところ、両者ともにチミンあるいはチミジル酸を含有しない最少培地およびカタラーゼを含有する 7H10-ADC 寒天培地上においては親株同様に増殖すること、一方、カタラーゼを含有しない 7H10-ADS 寒天培地上では  $\Delta$ ThyA は増殖するが  $\Delta$ ThyX は増殖しないことも明らかにしている。このことから ThyX はチミジル酸の合成活性とともに菌体内の酸化還元電位の恒常性に寄与していることを推測した。 $\Delta$ ThyX に *thyX* を保持したプラスミドを導入することでカタラーゼを含有しない 7H10-ADS 寒天培地上でも親株と同等の増殖を示した。

ところで、ThyX の酵素反応には FAD を補酵素として必要とし、NADPH の酸化反応を伴う。野生型の遺伝子の代わりに、チミジル酸合成活性は消失しているが NADPH 酸化能を持つ変異型 *thyX* 遺伝子を相補した場合、野生型の *thyX* 遺伝子を相補した場合同様、7H10-ADS 寒天培地上で親株と同等の増殖を示した。このことは ThyX が持つ NADPH の酸化反応が菌の生理に重要な働きを担っていることが推測される。ThyX は哺乳類を始めとする脊椎動物には存在しない。そのため、ThyX を標的とすることで、これまでにない新たな抗結核剤を開発することが可能と考えられる。

NADPH は NADH とともに代謝系の様々な代謝経路に使用されているため、どの代謝経路に携わっているかは不明である。この点を明らかにすることを目的として、マイクロアレイでの解析を試みた。解析の結果、*thyX* の欠損により発現レベルの減少した遺伝子よりも *thyX* の欠損により発現レベルの上昇した遺伝子の中に増殖に関わる遺伝子が存在することが推測された。候補遺伝子をすべてクローニングし、各遺伝子の過剰発現 BCG を作製した。その結果、BCG1419c、

BCG1421、BCG3787 の 2 遺伝子を過剰発現させると菌の増殖が顕著に抑制された。また BCG3787 の過剰発現株は中等度の増殖速度を示した。なお、BCG1416c の過剰発現株は現在までに得ることができていない。

BCG3787 は oxidoreductase をコードしており、この遺伝子を発現させることにより菌体内の酸化還元電位のバランスが変化したことによって菌の増殖速度に影響を与えたことが推測される。

BCG1416c は GGDEF ドメインと EAL ドメインを、BCG1419c は GGDEF ドメインを、BCG1421 は EAL ドメインを持つ。GGDEF ドメインは 2 分子の GTP から環状の cyclic-di-GMP を合成する活性を、EAL ドメインは cyclic-di-GMP を 2 分子の GMP に分解する活性を持つ。cyclic-di-GMP は細菌のセカンドメッセンジャーとして働く分子として報告されている。これまでに他の菌において、菌体外マトリックスの産生を始めとする細胞壁の構築、バイオフィーム形成、鞭毛や線毛の動き、菌体表層の接着・粘性、細胞間相互作用、細胞周期、発生と分化、タンパク質分解、コレラ毒素などの病原因子の産生、芽胞の形成など広範囲の生理機能の発現に関与していることが報告されている。

抗酸菌に関する既報は 2 報であり、速育菌の *Mycobacterium smegmatis* では定常期以降の生存に関わること、また結核菌では BCG1416c の相同タンパク質が病原性に関わる種々のタンパク質と相互作用を持つことが報告されている。しかしながら我々は解明されていない部分が多いと推測している。

今回の研究で cyclic-di-GMP を合成、分解する酵素の発現レベルを変化させると菌の増殖に大きく影響することが示された。このことは ThyX の場合と同様に cyclic-di-GMP を標的とすることでこれまでの薬剤と作用機序の異なる新規抗結核剤の開発を行ない得る可能性を示している。ThyX および cyclic-di-GMP を標的とする抗結核剤が開発できればアジアに蔓延している多剤耐性菌、超多剤耐性菌の制圧を行なう有力な手段となることが期待できる。

## E. 結論

結核菌/BCG のチミジル酸合成酵素 ThyX が保有する NADPH 酸化活性は BCG の生理機能に必要であることが示唆された。また cyclic-di-GMP は結核菌/BCG の生理機能に重要な役割を演じていることが示唆された。ThyX と cyclic-di-GMP は抗結核剤の新たな標的になる可能性がある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, A. Kariyone, M. D. Begum, K. Kawakami, Y. Okamoto, S. Hamada, K. Oshiro, H. Kohama, T. Arakawa, N. Ohara, K. Takatsu, and G. Matsuzaki. 2010. Suppressed induction of mycobacterial antigen-specific Th1-type CD4+ T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection. *Int. Immunol.*, 22: 307-318.

### 2. 学会発表

- 1) 大原直也, 岡部真裕子, 山本三郎, 瀧井猛将, 藤原永年, 前山順一, 佐藤法仁, 井上哲圭, 小林和夫. BCG Tokyo 172 株に存在するサブポピュレーション間の遺伝子発現の比較発現の比較検討. 第 80 回実験結核研究会 2010 年 5 月 京都
- 2) 大原直也, 山本三郎, 瀧井猛将, 藤原永年, 前山順一, 小林和夫. DNA マイクロアレイを用いた BCG Tokyo 172-1 に存在するサブポピュレーションの遺伝子発現の比較検討. 第 80 回実験結核研究会 2010 年 5 月 京都
- 3) 藤原永年, 前田伸司, 吉村満美子, 大原直也, 前山順一, 瀧井猛将, 矢野郁也, 山本三郎. 形態の異なる BCG Tokyo 172 亜種間の脂質生化学的比較. 第 85 回日本結核病学会総会 2010 年 5 月 京都
- 4) Taniguchi, H., M. Nomoto, M. Ogawa,