

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）
総合研究報告書

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・細菌学）
研究協力者 仁木 満美子（大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学）
研究協力者 岡 真優子（大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学）

研究要旨

結核菌は、人類の 32%に一部休眠状態で潜伏感染しており、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る。現行の抗結核薬は休眠菌には無効であることから、休眠期独自の代謝経路の存在が伺われる。我々は、休眠状態の抗酸菌菌体内で発現するヒストン様蛋白質 Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)による、遺伝子発現制御と、薬剤抵抗性への関与について研究を行った。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、毎年約 180 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

状態で持続せず、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、休眠菌長期生存の分子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 mc²155 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、OD₆₀₀=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% OsO₄ 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。

d) 薬剤感受性試験

速育型抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* mc²155 株 (WT) およびそれを親株とした MDP1 欠失株 (KO) ならびに補填株 (Comp) については、LB 液体培地にて 37°C で好氣的に培養したのち、新鮮培地にて McFarland 0.5 相当に調製した。その後、各種薬剤を添加した LB 培地に菌液を接種し 37°C で 48 時間培養した。培養後、LB 寒天培地に接種し、CFU を算出して薬剤非添加で培養した際の CFU と比較した。

e) ヘパリンカラムを用いた MDP1 結合性 DNA 断片の調製

M. smegmatis WT 株および KO 株を LB 液体培地で培養し、最終濃度が 1% になるようにホルムアルデヒドを添加したのち 37°C, 30 分加温した。その後菌体を回収し、PBS で懸濁した後超音波破碎機を用いて破碎し、遠心分離により上清を回収した。ヘパリンカラムに添加し、ヘパリン結合性蛋白質画分を抽出した。その後、90°C, 30 分加熱し、蛋白質の脱架橋を行った。フェノール処理により除蛋白を行い、エタノール沈殿により DNA 断片を精製した。得られた DNA 断片を鋳型として、イソニアジド耐性関連遺伝子である *kasA* および *katG* に対する特異プライマーを用いた PCR 反応を行った。

C. 研究結果

MDP1 は休眠期抗酸菌の遺伝子発現維持に関わる

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 欠失株と比較した。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、休眠時においては野性株で 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 は休眠時においてタンパク合成や RNA 合成を阻害する薬剤に対する菌の感受性に関わる機構を調節していることが推察された。

MDP1 は KatG の発現を抑制することによりイソニアジド耐性に関わる

M. smegmatis WT, KO, Comp 株において、各種抗生剤に対する感受性を比較した。その結果、蛋白合成阻害作用を有する抗結核薬であるストレプトマイシンに対する感受性が、MDP1 欠失により増強することが明らかになった。同じく蛋白合成阻害剤であるエリスロマイシンに対しては MDP1 欠失により感受性の減弱が認められることから、この現象が MDP1 欠失により菌の蛋白合成能自体が減弱したことによるものではないことが示唆された。一方、抗結核薬であり、一般に休眠菌には無効とされている薬剤イソニアジドに対する感受性は、MDP1 欠失により増強することがわかった。イソニアジド耐性については、いくつかの遺伝子の関与がすでに報告されているため、マイクロアレイ解析によりこれらの遺伝子の発現の変化を MDP1 の有無で比較した。その結果、イソニコチン酸アシルと NADH をカップリングし、イソニアジドを活性型に変化させるカタラーゼをコードする遺伝子 *katG* の発現が MDP1 欠失により有意に増強することがわかった。以上のことから、MDP1 が *katG* の転写を抑制し、イソニアジドが活性型に転じるのを抑制することにより薬剤耐性を獲得している可能性が示唆された。

MDP1 は KatG 遺伝子領域に結合する

これまでの研究により、MDP1は *in vitro* において DNA に結合し、転写および翻訳の抑制を行うことが明らかになっている。そこで、MDP1 がゲノム上の *katG* 領域に結合するか検討を行った。これまでの研究により、MDP1 はヘパリンに親和性を持つことがわかっているため、*M. smegmatis* WT 株および KO 株についてホルムアルデヒドによる DNA-蛋白間の架橋を行い、ヘパリン結合性蛋白画分を抽出した。得られた画分についてウエスタンブロット解析を行い、WT 株から得られた画分のみが抗 MDP1 抗体に反応することを確認した。そこで、それぞれの画分を加熱により脱架橋し、DNA 断片のみを回収した。こうして得られた DNA 画分を鋳型とした PCR を行ったところ、WT 株から得られた DNA 断片を用いたときのみ *katG* 特異プライマーによる増幅が認められた。これに対し、*kasA* 特異プライマーによる PCR では、WT 株、KO 株ともに DNA の増幅が認められた。以上のことから、MDP1 はゲノム上の *katG* 領域に結合することが明らかになった。

D. 考察

一般に、生体内で休眠菌はすべてが完全に代謝を停止した状態ではなく、一部は再増殖しながら全体として viable な population が保たれていると考えられている。また、宿主の免疫低下などの環境変化に応じてすみやかに再燃できるような代謝経路を維持していると考えられる。

マイクロアレイを用いた増殖期-休眠期における遺伝子発現を比較すると、MDP1の有無に関わらず、増殖期ではタンパク合成などの遺伝子群の発現が休眠時より高く、活発に代謝・増殖を行っていることが推察された。一方、休眠期で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の発現が増殖期に比べて高いことが分かった。これは、休眠期におけるゲノムの不安定さを示すものなのか、さらなる検討が要求される。

次に、増殖期および休眠期のそれぞれにおいて、野性株と MDP1 欠失株における遺

伝子発現を比較したところ、増殖期においては野性株-欠失株間において顕著に発現の差がある遺伝子群はなかった。これに対して、休眠期においては MDP1 欠失によりタンパク合成や細胞壁合成など多岐にわたる代謝に関係する遺伝子群で発現の抑制が観察された。走査性電子顕微鏡による観察でも、休眠期における MDP1 欠失株の細胞壁に壁の脆弱化を思わせる変異が観察されており、MDP1 欠失により実際に壁合成系の抑制がもたらされていることが伺える。以上のことから、MDP1 が休眠時における代謝の極端な低下を抑制し、生存に必要な最小限な代謝を維持するよう調節を行っている可能性が示唆された。このことは、MDP1 欠失株が定常期以降になると死滅しやすいというデータとも合致する。

薬剤感受性については、増殖期での MDP1 欠失による顕著な変化は観察されなかったにも関わらず、休眠期においては MDP1 欠失により薬剤耐性の獲得が観察された。今回検討した薬剤(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)は、RNA 合成もしくはタンパク合成の阻害剤であり、MDP1 欠失株において耐性が観察されたという結果は、休眠時において欠失株がこれらの代謝活動を活発に行っていない可能性を示唆し、先のマイクロアレイ解析の結果とも合致する。

一方、MDP1 が *katG* の転写を抑制することにより抗結核薬イソニアジドに対する菌の感受性が変化することを明らかにした。イソニアジドが休眠状態の菌に無効であることについてはその現象のみが報告されており、耐性獲得メカニズムについては不明であったため、その一部が本研究により解明されたと考えられる。

これまでの研究においても、MDP1 欠失により休眠時における遺伝子発現の顕著な抑制が起こることが明らかになっていることから、この分子が休眠期特異的な代謝の調節を司り、休眠菌の薬剤抵抗性に関与していると考えられる。休眠状態の菌に有効な薬剤の開発には休眠期特異的な代謝に関与する分子の同定が必須であると考えられ

ることから、MDP1 がゲノム上のどの領域に結合し、どの分子の転写を調節しているかを明らかにすることにより、新たな薬剤ターゲットの同定が期待される。

E. 結論

MDP1 は結核菌の休眠の導入と維持に重要な分子であることが判明した。MDP1 による転写・翻訳の制御により、定常期以降の菌の代謝が選択的に抑制され、休眠期特異的な代謝活動の維持が行われることが示された。また休眠に伴う抗酸菌の薬剤感受性の変動に MDP1 が関わるということが判明した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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. 2008. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J Bacteriol* 190:3613-3621.
- 3) Saiga H., J. Nishimura, H. Kuwata, M. Okuyama, **S. Matsumoto**, S. Sato, M. Matsumoto, S. Akira, Y. Yoshikai, K. Honda, M. Yamamoto and K. Takeda. 2008. Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J Immunol* 181: 8521-8527
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Tateishi, Y., Y. Hirayama, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura, J. Kang, A. Shibata, K. Hirata, K. Kitada, S. Kitada, R. Maekura, H. Ogura, K. Kobayashi, and **S. Matsumoto**. 2009. Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from immune-competent patients. *Microb Pathog* 46:6-12.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Kitamura, A., **S. Matsumoto** and I. Asahina. 2009. Growth inhibition of HeLa cell by internalization of *Mycobacterium bovis* Bacillus

- Calmette-Guerin (BCG) Tokyo. Cancer Cell Int 9:30.
- 11) Ozeki, Y., I. Sugawara, T. Udagawa, T. Aoki, M. Osada-Oka, Y. Tateishi, H. Hisaeda, Y. Nishiuchi, N. Harada, K. Kobayashi and **S. Matsumoto**. 2010. Transient role of CD4+CD25+ regulatory T cells in mycobacterial infection in mice. Int Immunol 22:179-189.
 - 12) Sena, C. B., T. Fukuda, K. Miyanagi, **S. Matsumoto**, K. Kobayashi, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Kinoshita, and Y. S. Morita. 2010. Controlled expression of branch-forming mannosyltransferase is critical for mycobacterial lipoarabinomannan biosynthesis. J Biol Chem 285:13326-13336.
 - 13) 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 28:2020-2025.
 - 14) Seto, S., **S. Matsumoto**, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Differential recruitment of CD63 and Rab7-interacting-lysosomal-protein to phagosomes containing *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. Microbiol Immunol 54:170-174.
 - 15) Jalilian, B., A. R. Omar, M. H. Bejo, N. B. Alitheen, M. Rasoli and **S. Matsumoto**. 2010. Development of avian influenza virus H5 DNA vaccine and MDP-1 gene of *Mycobacterium bovis* as genetic adjuvant. Genet Vaccines Ther 8:4.

総説

- 1) **松本 壮吉**、小林 和夫. 2008. 結核ワクチン研究の現状と展望. 臨床検査 Vol 52 p1149-1153.
- 2) 西内 由紀子、立石 義隆、**松本 壮吉**. 生活環境における非結核性抗酸菌の分布. 化学療法の領域 2011 出版予

定

- 3) 仁木 満美子、**松本 壮吉**. 結核研究の新たな展開：潜在性結核と結核菌—休眠現象の分子メカニズム. 最新医学 Vol 66 巻 3 号、2011 出版予定

著書

- 1) **松本 壮吉**. 2010. 分子生物学から見た結核研究の現在. 四元秀毅、倉島篤行、結核 Up to Date 改訂 3 版 四元秀毅、倉島篤行 編集. 南江堂、p183-189.
- 2) 西内 由紀子、立石 善隆、山田 毅、**松本 壮吉**. 人獣共通感染症、木村 哲、喜田 宏 編集. 非結核性抗酸菌症 改訂版. 医薬ジャーナル社、2011 出版予定
- 3) Niki M and **Matsumoto S**. Host and bacterial factors that regulate *Mycobacterium tuberculosis* infection and persistence. Yamamoto S, Maeyama J, and Takii T editors. BCG vaccine and adjuvant, Japan anti-tuberculosis association, Tokyo, 2011 in press

2. 学会発表

- 1) **松本壮吉**、尾関 百合子、西内由紀子、藤原永年、吉村満美子、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. 結核、83 : 3. 第 83 回日本結核病学会 2008 年 4 月 東京
- 2) 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. 結核、83 : 3. 第 8 3 回日本結核病学会 2008 年 4 月 東京
- 3) 仁木誠、吉村満美子、**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. 結核、83 : 3. 第 83 回日本結核病学会 2008 年 4 月 東京
- 4) **MATSUMOTO Sohkiichi**. Protection of DNA by mycobacterial DNA- binding protein 1(MDP1) by preventing the ironinduced Fenton reaction. 2008 年

- July USA.
- 5) 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-super family 蛋白質様活性. 第 61 回日本細菌学会関西支部総会 2008 年 11 月 京都
 - 6) Suzuki Daisuke, NAGATA Toshi, MATSUMOTO Sohki, KOIDE Yukiko. 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. 日本免疫学会雑誌 38 巻、第 38 回日本免疫学会総会 2008 年 12 月 京都
 - 7) 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
 - 8) 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
 - 9) 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
 - 10) 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
 - 11) 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. 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. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
 - 12) 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. 結核菌の増殖に対するヒアルロン酸の作用. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
 - 13) 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
 - 14) 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
 - 15) 岡真優子、小林和夫、松本壮吉. 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. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
 - 16) 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
 - 17) 仁木誠、吉村満美子、小林和夫、松本壮吉. 抗酸菌の薬剤感受性における MDP1 の調節機構の解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
 - 18) 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. 抗結核菌薬スクリーニング系の確立と実践. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
 - 19) 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
 - 20) 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
 - 21) 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
- 22) Osada-Oka, M., M. Takatsuka, F. E. Sato, Y. Ozeki, M. Yoshimura, M. Inoue, K. Kobayashi, **S. Matsumoto**. A ferritin superfamily-like protein in mycobacteria. THE 9TH AWAJI INTERNATIONAL FORUM 2009 年 9 月 淡路島
- 23) **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
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 岡真優子、今岡 進、小林和夫、**松本壮吉**. 低酸素状態での HIF-1 α 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
- 28) 立石善隆、岡真優子、西内由紀子、小林和夫、前倉亮治、**松本壮吉**. 感染マクロファージにおけるサイトカイン発現パターンの差異からみた肺 MAC 症の重症化機序の解明. 第 8 回感染症沖縄フォーラム 2010 年 2 月 沖縄
- 29) 岡真優子、平山幸雄、立石善隆、小林 和夫、前倉亮治、**松本壮吉**. 潜在性結核菌に対する液性免疫応答の解析. 第 8 回感染症沖縄フォーラム 2010 年 2 月 沖縄
- 30) 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 細胞の関与. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
- 31) 岡真優子、平山幸雄、立石善隆、小林和夫、**松本壮吉**. 潜在性結核の診断法の確立に向けた臨床への橋渡し研究; 第 1 報. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
- 32) 西内由紀子、**松本壮吉**、立石善隆. 生活環境由来 *Mycobacterium avium* complex の遺伝子多型解析. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
- 33) **松本壮吉**. Molecular mechanisms of latent tuberculosis infection (LTBI) and development of diagnosis of LTBI. 第 3 回日中科学フォーラム、2010 年 3 月 中国湖北省武漢市
- 34) **松本壮吉**. 抗酸菌感染症における感染制御の進歩. 第 84 回日本感染症学会総会 2010 年 4 月 東京
- 35) **松本壮吉**. 結核菌の長生きのメカニズム; 休眠現象と潜在性結核. 第 27 回東海薬物治療研究会 2010 年 5 月 名古屋
- 36) **Sohkichi Matsumoto**. Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication. International Society for Hyaluronan Sciences 8th International Congerence Hyaluronan 2010, 2010 年 6 月 京都
- 37) Ozeki, Y., I. Sugawara, T. Udagawa, H. Hisaeda, K. Kobayashi, and **S. Matsumoto**. Transient role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August 22-27, 2010.
- 38) **松本壮吉**. 結核菌の気道ヒアルロン酸を利用した感染と生体内増殖. 第 22 回微生物シンポジウム 2010 年 9 月 大阪
- 39) Osada-Oka, M., M. Takatsuka, K. Kobayashi, **S. Matsumoto**. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activities: ferric iron storage

and ferrous iron oxidation. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2010年9月 淡路島

- 40) Osada-Oka, M., Y. Hirayama, S. Kitada, Y. Tateishi, R. Maekura, H. Sugimura, Y. Koide, K. Kobayashi, **S. Matsumoto**. Clinical Practice for the Diagnosis of Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. 14th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim: 2010年10月 Malaysia

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 出願番号：特願 2008-277012、発明者：松本 壮吉、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：平成 20 年 10 月 28 日

- 2) 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

- 3) 出願番号：特許第 4415200 号：発明者、山田 毅、松本 壮吉、発明等の名称：遅発育性抗酸菌ポリペプチド、出願人：大塚製薬株式会社、山田 毅、松本 壮吉：平成 21 年 12 月 4 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）
総合研究報告書

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

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りと考えられる。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。結核菌細胞壁には、自然免疫刺激活性の強いトレハロースジミコール酸(TDM)が多量に存在すると考えられてきた。しかし、3年間の本研究において、生体内に侵入した結核菌は宿主由来グルコース基質へのミコール酸転移反応を行うことにより、TDMの産生を抑制するとともに、自然免疫刺激活性が微弱なグルコースモノミコール酸(GMM)に置換すること、一方、新たに生成されたGMMはCD1分子を介してT細胞に提示され、TH1タイプのサイトカイン産生を主体とした遅延型アレルギー応答が誘起されることが明らかとなった。さらに結核菌休眠菌に特有のミコール酸含有糖脂質の存在とそれに対する免疫応答の実態が解明されつつある。糖脂質代謝と免疫応答に着目した本研究は、新たな抗結核ワクチンの開発や結核診断法の確立への基盤を構築するものである。

A. 研究目的

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、強力な生物活性を有することから、その合成の制御は、菌にとってもまた宿主防御においても重要な意味を持つ。抗酸菌細胞壁脂質の構造や組成、生物学的活性を検証したこれまでの研究の多くは、最適化された標準人工培地で培養した菌を用いてきた。しかし、結核菌などの抗酸菌は細胞内寄生細菌であり、宿主との密接な相互作用を通して感染が成立する。したがって、抗酸菌による感染とりわけ長期に宿主環境に暴露される潜伏感染の理解においては、宿主環境により制御される糖脂質代謝の存在とその分子機構の解明が不可欠である。とくにTDMが持つ極めて強い宿主自然免疫刺激活性（アジュバント活性）は感染の成立に不都合であることから、生体内生育菌あるいは

休眠菌ではその産生が負に制御されている可能性が考えられる。そこで、宿主生体内での結核菌糖脂質代謝と宿主免疫応答の解明をもとに、休眠菌バイオロジーを明らかにすることを目的とした研究を展開した。

B. 研究方法

抗酸菌株およびその培養 American Type Culture Collection より得た *M. tuberculosis* (Erdman) (以下 M.tb と記載) および *M. avium* (serovar 4) (以下 MAC と記載) を用いた。MAC は 0.05% Tween 80 および 10% ADC エンリッチメントを含有した 7H9 メディウムを用い、37 度で培養した。BCG (Tokyo 172 株) はこれらにさらに 5% グルコースを含有した 7H9 メディウムを用い、37 度で培養した。

脂質精製 脂質の精製は文献 2 の記載に従い行った。菌体より抽出した総脂質をク

ロホルム/メタノール(2:1, v/v)に溶解したのち冷アセトンを加え、不溶画分を回収した。さらにこの画分を薄層クロマトグラフィー(TLC)により展開し、TDM、GMM およびトレハロースモノミコール酸(TMM)を含んだ分画を単離精製した。精製したGMMをマススペクトロメトリに供し、分子確認を行った。また得られたGMMを、ステアリン酸付加オクタアルギニンを含むリポソームに封入した。

Ag85A リコンビナントタンパク質の作製 MAC ゲノム遺伝子を鋳型とし、シグナル配列を欠くAg85Aタンパク質をコードする遺伝子をPCR法により増幅した。単離した遺伝子をpET-21cプラスミドベクターに挿入し、BL21(DE3)大腸菌株をトランスフォームすることにより、C末端にHisタグを組み込んだリコンビナントAg85Aタンパク質を発現させた。大腸菌を破砕した後可溶画分を回収し、Ni-レジンカラムを用いてタンパク質精製を行った。

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ブン中で焼き付けることにより生成物を検出した。

GMM 特異的T細胞アッセイ GMM特異的CD1b拘束性T細胞より単離したT細胞抗原受容体遺伝子をJurkat変異株に導入し、特異的T細胞抗原受容体を再構築した。この細胞のIL-2産生を指標として、GMM特異的応答を検証した。抗原提示細胞として、ヒト単球由来樹状細胞ならびにヒトCD1b cDNAを導入したB細胞株トランスフェクタントを用いた。

モルモット 3週齢のメスHartleyモルモットは、日本SLCより購入し、SPF環境下で飼育した。BCG(5 x 10⁷ CFU)を皮内投与し、6週後にpurified protein derivative(PPD)、GMM(5 µg)含有リポソームおよ

びコントロールリポソームを皮内接種した。皮膚反応を経時的に観察するとともに、一部のモルモットにおいては皮膚組織を採取し、常法に従ってヘマトキシリンエオジン染色を行うとともに、抗モルモットヘルパー/インデューサーT細胞抗体(CT7)および抗モルモットCD8抗体(CT6)を用いた蛍光染色を施行した。

サイトカイン mRNA 発現解析 BCG免疫モルモットの所属リンパ節より細胞を単離し、PPD(0.5 mg/ml)あるいはGMMリポソーム(1 mg/ml)存在下で培養した。一部の実験においては、抗モルモットCD1抗体(CD1F2/6B5、10 mg/ml)を添加した。18時間後に細胞を回収し、キアゲンキットを用いてトータルRNAを単離した。さらにoligo(dT)を用いた常法に従い、逆転写反応を行い、鋳型となる一本鎖DNAを作成した。RT-PCRに用いたプライマーは下記の通りである。IFN-γ: 5'-CTA GCT ACT ACT GCC AGT CAA GAT-3' (sense)、5'-GCT CTG AAA CAG CAT CTG AGT CCT-3' (anti-sense); TNF-α: 5'-CCA TGA GCA CAG AAA GCA TGA TCC G-3' (sense)、5'-CTC ACA GGG CAA TGA CCC CAA AGT A-3' (anti-sense); IL-5: 5'-CCA TGA GGG TGC TTC TGC AGT TGG G-3' (sense)、5'-CTC AGC CTT CAA TTG TCC ATT CCG T-3' (anti-sense); IL-10: 5'-GGC ACG AAC ACC CAG TCT GA-3' (sense) and 5' -TCA CCT GCT CCA CTG CCT TG-3' (anti-sense)。

倫理面への配慮

本研究は、生命倫理や動物愛護、安全対策の観点から、機関で定められた規定に則り、当該委員会での承認を得て遂行した。

C. 研究結果

グルコース濃度に依存してTDM産生抑制ならびにGMM産生亢進が誘起される さまざまな濃度(0.01% - 10%)のグルコースを含有した7H9メディウム中でMACを数日間培養し、菌体より抽出した脂質をTLCプレート上に展開したところ、グルコース

濃度に依存したTDM産生抑制が認められた。一方、グルコース濃度が高くなるにしたがって、TDMよりやや高いRf値を持つ分子種の顕著な産生増加を認めた。この脂質を抽出しマススペクトロメトリを行ったところ、ミコール酸に六単糖が1個付加された構造に合致する解析結果が得られた。さらにこの付加糖をgas chromatographyを用いて解析した結果グルコースであることが明らかとなった。さらにこの脂質は、ヒトGMM特異的CD1b拘束性T細胞を活性化したことから、マススペクトロメトリおよびガスクロマトグラフィーの結果が裏付けられた。以上より、グルコース濃度に依存して産生が増加した脂質はGMMであると結論づけた。したがって、MACは細胞外グルコース濃度に依存して脂質代謝を変化させ、TDMの産生を抑制するとともにGMM産生を亢進することが判った。

グルコース濃度に依存したTDM産生抑制とGMM産生亢進は、Ag85Aによって触媒される リコンビナントAg85Aタンパク質の存在下にTMMを37°Cで1時間インキュベートすると、1分子のTMMから別の1分子のTMMへのミコール酸の転移が起こり、TDMが産生される。この反応系にグルコースを添加すると、TDMの産生が抑制され、新たにGMMが産生されることが観察された。さらにこの反応は不活化した酵素では起きないことから、酵素の触媒作用の結果と考えられた。以上の結果から、TMMとグルコースを基質としたAg85Aの触媒作用によりGMMが産生されることが明らかとなった。グルコースが高濃度に存在する場合には、ミコール酸のアクセプター分子としてTMMとグルコースが競合し、TDMの産生抑制とGMMの産生亢進が起きると考えられた。

生理的なグルコース濃度においてGMMの産生が起きる 生理的濃度である0.1%のグルコースを含有した7H9メディウム中でMACを培養すると、数時間後にはGMMの産生が検出されることを観察した。また血清中で菌を培養しても同様の結果を得た。

以上の結果は、MACが宿主体内への感染後宿主由来グルコースを利用して迅速にTDMとGMMの置換を行う可能性を示唆した。

生理的なグルコース濃度で産生されたGMMは、CD1b拘束性T細胞によって認識される MACを0.01%あるいは0.1%グルコース含有7H9メディウムで数日間培養したのち菌より脂質を回収し、GMM特異的CD1b拘束性T細胞の刺激活性を検討したところ、0.1%グルコース存在下に培養した菌より得た脂質では高いT細胞刺激活性を認めただけに対し、0.01%グルコース存在下に培養した菌より得た脂質では、まったくT細胞刺激活性を認めなかった。以上の結果は、GMM特異的T細胞が、生体内増殖菌と生体外（環境）増殖菌を識別し、生体内増殖菌に対してのみ有効な応答を起こす可能性を示唆した。

BCG免疫モルモットにGMMリポソームを皮内接種することにより、遅延型アレルギー応答が誘起できる BCG接種モルモットにPPDならびにGMMリポソームを皮内接種したところ、おおよそ2日目をピークとした皮膚の硬結を観察した。この皮膚反応はBCG非接種モルモットでは誘起されないことから、前感作を必要とするメモリー応答であることが明らかとなった。また接種部位の組織染色を行ったところ、PPD接種、GMMリポソーム接種ともに単核球の顕著な浸潤が見られ、ヘルパー/インデューサーT細胞とCD8陽性T細胞の有意な浸潤が認められた。以上より、GMMリポソーム接種により遅延型アレルギー応答が誘起されることが実証され、糖脂質が遅延型アレルギー応答の新しい化学クラスの標的抗原となることがはじめて示された。

GMMに対する遅延型アレルギー応答はCD1依存性である BCG接種モルモットの所属リンパ節細胞をex vivoにおいてGMMリポソームで刺激すると、IFN-gの転写が亢進した。そこでこの培養を抗モルモットpan-CD1抗体およびコントロール抗体の存在下で行ったところ、抗モルモットpan-CD1抗体存在下においてIFN-g転写は

完全に抑制された。したがって、この GMM 特異的応答は CD1 に拘束した応答であることが示された。

GMM に対する遅延型アレルギー応答は、高度に TH1 サイトカイン産生にシフトした応答である BCG 接種モルモットの所属リンパ節を PPD あるいは GMM リポソームで刺激し、TH1 サイトカインである IFN-g と TNF-a、TH2 サイトカインである IL-5 と IL-10 の転写を RT-PCR により検証したところ、PPD 刺激では TH1 サイトカイン、TH2 サイトカインの両方が誘導されたのに対し、GMM リポソーム刺激では TH1 サイトカインのみが誘導され、それに対して抑制的に働くと思われる TH2 サイトカインはまったく誘導されなかった。以上の結果から、GMM に対する遅延型アレルギー応答は、極度に TH1 サイトカイン応答にシフトした反応であることが明らかとなった。

D. 考察

休眠菌は年余にわたり生体内環境に暴露されることから、低いながらも維持され続けている菌の生存に必須の糖脂質代謝は、宿主環境の影響を強く受けることが予想される。その意味で、生体内環境での菌の代謝変化に着目した本研究のアプローチは、休眠菌の本態の一端を明らかにする研究と言える。

外界環境下での抗酸菌は、TDM を多量に産生して堅牢な細胞壁を構築し、菌集塊やバイオフィルムを形成することにより、種々の物理的あるいは化学的ストレスに対応することができる。しかし一旦宿主体内に入ると、TDM は mincle あるいは TLR2 依存的にマクロファージを活性化し NO の産生を誘導するため、菌にとって極めて不都合である。菌はこの生体応答を回避するため、既存の酵素と宿主由来グルコースを最大限に活用して迅速に TDM を GMM に置換し、基本骨格を保持しながらも宿主自然免疫刺激活性の弱い細胞壁を構築するものと考えられる。

休眠菌のように長期に生体内グルコース

に暴露された場合、細胞壁 TDM はほとんど消失し、GMM が主体となることが予想される。この変化は、菌が宿主自然免疫を回避するうえで極めて有効である。一方、本研究から明らかのように、宿主免疫系は GMM を標的とした強い遅延型アレルギー応答を惹起し、強い TH1 サイトカイン産生へのシフトにより菌を制御しようとする機構が働く可能性が考えられる。この応答がメモリー T 細胞応答であることを考慮すると、GMM が新たな抗結核ワクチンとして有効である可能性も考えられ、今後の研究展開が期待される。

ツベルクリン反応が、必ずしも結核免疫の成立と相関しないことは周知の事実である。その理由は、TH1 サイトカインとともにその働きを抑制する TH2 サイトカインが同時に誘導されることが考えられる。これに対して GMM に対する応答は、高度に TH1 サイトカイン応答にシフトしたものであることから、「脂質バージョンのツベルクリン反応」である GMM 皮内テストは、有効な結核免疫成立の指標となる可能性がある。

E. 結論

生体内環境に暴露された菌に特異的な糖脂質代謝経路を明らかにし、それを標的とした免疫応答の存在を実証した。この知見は、潜伏感染の免疫病態の理解だけでなく、新たな抗結核ワクチンの開発において、極めて重要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.

- 3) 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.
 - 4) 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.
- 2. 学会発表**
- 1) 大塚篤司、松永勇、小森崇矢、富田和沙、戸田好信、真鍋俊明、宮地良樹、**杉田昌彦**. 2008. Eosinophilic DTH: 脂質を標的とした新しい皮膚アレルギー応答. 第 11 回京都免疫ワークショップ 学術集会 (京都、3 月).
 - 2) Otsuka, A., I. Matsunaga, T. Komori, K. Tomita, Y. Toda, T. Manabe, Y. Miyachi, and **M. Sugita**. 2008. Eosinophilic skin reactions to glycolipids in mycobacterial infection represent a novel form of delayed-type hypersensitivity. *The International Investigative Dermatology* 2008. (Kyoto, Japan, 5 月).
 - 3) **Sugita, M.** 2008. Eosinophilic skin hypersensitivity to glycolipids in mycobacteria-infected guinea pigs.

43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (Baltimore, MD, USA, 7 月).

- 4) Otsuka, A. I. Matsunaga, Y. Miyachi, and **M. Sugita**. 2008. Eosinophilic skin reactions to glycolipids define a novel form of hypersensitivity in mycobacterial infection. 第 38 回日本免疫学会総会 (京都、12 月).
- 5) 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).
- 6) **Sugita M.** 2010. Mycolyltransferase from *Mycobacterium leprae* excludes mycolate-containing glycolipid substrates. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (Boston, MA, U.S.A., 7 月).
- 7) **杉田昌彦**. 2010. ミコール酸含有糖脂質の生合成と免疫認識～抗酸菌バイオロジーの新たな世界～ 第 85 回日本結核病学術集会 (京都、5 月)
- 8) **杉田昌彦**. 2010. 結核菌脂質を標的とした新しい免疫応答 第 53 回日本感染症学会中日本地方会学術集会 (京都、10 月)

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 |

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）
総合研究報告書

休眠性非結核性抗酸菌における菌体構成分子の解析

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・主任研究官）

研究要旨

非結核性抗酸菌症の代表的な起因細菌である *Mycobacterium avium* complex (MAC) には、主要な菌体構成分子の一つとして glycopeptidolipid (GPL) が存在する。MAC には約 30 種類に及ぶ血清型株が存在するが、これらは GPL に含まれる糖鎖構造の違いにより規定されている。本研究では、高い頻度で分離され且つ高病原性血清型に分類される 4 型及び 8 型血清型 GPL 糖鎖に注目し、未だ明らかにされていないそれらの生合成機構と休眠性等を含む病原性との関わりを解明することを目的とした。両血清型株のゲノム上より候補遺伝子を選定し、組換え株の作製及び発現解析を行った結果、各血清型の特性を決定する糖鎖生合成遺伝子が同定され、これまで未解明であった両血清型 GPL の形成過程が明らかとなった。さらに、これらの遺伝子により生み出される糖鎖構造が菌体の形態・性状と深く関与していること、また、生合成自体が低栄養や低酸素といった休眠状態を反映する環境によって影響を受け得ることが判明し、MAC における GPL の機能の一端が明らかとなった。

A. 研究目的

結核菌、らい菌、非結核性抗酸菌などに代表される抗酸菌は、その大きな生化学的特徴として菌体構成成分に様々な糖脂質成分を保有する。また、これらの成分は、抗酸菌の休眠性等を含む病原性が発揮される際に関与することが指摘されている。本研究で取り上げる *Mycobacterium avium* complex (MAC) は、土壌や水圏などの自然界に存在し、日和見感染を引き起こす非結核性抗酸菌の一種であるが、その病原性機構は依然として未解明な点が多い。MAC には主要糖脂質として glycopeptidolipid (GPL) が存在する。この GPL は宿主に対して影響を及ぼす分子があることが知られており、MAC の病原性に関与することが示唆されている。一方、GPL に含まれる糖鎖部分は構造の違いにより約 30 種類に及ぶ MAC の血清型を規定している。この血清型の違いにより病原性に差があることが報告されていることから、この糖鎖部分が MAC の病原性へ深くかかわっていることが推測

されている。しかしながら、GPL の糖鎖についてはその生合成を含め多くの点で不明な点も多い。本研究では、病原性が比較的強いとされ且つ分離頻度が高い 4 型及び 8 型血清型について焦点を絞り、それらの糖鎖生合成の解明、さらには休眠性等に代表される MAC の病原性に生合成や糖鎖機能がどのような影響を与えているかについて明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

MAC 4 型血清型株として ATCC35767 株を、MAC 8 型血清型株として ATCC35771 株をそれぞれ採用した。両株のゲノム配列情報は未解明であるため、他の血清型株で判明している情報を利用し、GPL 生合成遺伝子内で特異性を示す領域を増幅するように複数のプライマーセットを設計した。それぞれの血清型株について、ゲノム DNA を鋳型として上記のプライマーセットを使用して PCR を行った。増幅された DNA 断片の塩基配列を決定し、frame plot 解析によ

り ORF 予測を行った。各 ORF をプラスミドベクター pMV261a 又は染色体組み込みベクター pYM301a を用いて *M. smegmatis* mc²155 株に導入することにより生合成解析用の組換え株とした。一方、予め mc²155 株の *gtf3* 遺伝子を MAC 由来 *rffA* 遺伝子で入れ換えた株を mc²155 株に代わるホストとして使用し、機能解析用の組換え株を作製した。各生合成解析用組換え株から単離・精製した GPL 成分は、TLC、GC/MS 及び MALDI-TOF/MS に供しそれぞれの糖鎖構造を解析した。MAC 株の休眠状態を反映した培養は、グルコースを制限した Middlebrook 7H9 Broth + Bovine Albumin Fraction V + NaCl 培地を使用することにより栄養状態を、さらに、Dubos broth medium で好氣的培養を行い、低酸素環境下へ移動することにより嫌気状態を再現した。

倫理面への配慮

特になし

C. 研究結果

約 30 種類に及ぶ MAC の血清型は、GPL に含まれる糖鎖構造の違いによってタイプが区別されている。これまでに一部の血清型 GPL 糖鎖についてのみ生合成が解明されているが、本研究で取り上げる 4 型及び 8 型 GPL 糖鎖については不明であった。解明された GPL 生合成遺伝子領域を比較すると、それらの大部分は共通しているがそれぞれの血清型に特異性を示す領域がある。そこで、4 型及び 8 型血清型株におけるこれらの領域を単離するために、PCR による増幅を試みた。その結果、4 型株より約 6.8kb、8 型株より 4.6kb の DNA 断片がそれぞれ増幅された。まず、4 型株の 6.8kb 断片について、塩基配列の解析を実施したところ、5つの ORF が含まれることが判明した。これらの ORF について、*M. smegmatis* 株における発現解析を行った結果、細菌由来の hemolysin に相同性を示す ORF1(*hlpA4* と命名)と ORF2 の二つの遺伝子が 4 型 GPL 糖鎖の構造的な特異性を決定す

る 4-O-methyl-rhamnose 残基の形成に関与することが明らかとなった。さらに、個別の機能解析により *hlpA4* は rhamnosyltransferase を、ORF2 は 4-O-methyltransferase をそれぞれコードすることが判明した。つづいて、8 型株より得られた 4.6kb 断片を解析した結果、4つの ORF が含まれていた。発現解析の結果、その中の 3 遺伝子が 8 型 GPL の特異的糖鎖 4,6-O-(1-carboxyethylidene)-3-O-methyl-glucose 残基の生合成に関与しており、中でも、ORF2 (*gtfTB* と命名) は glucosyltransferase をコードしていた。このように、これまで未解明であった 4 型及び 8 型 GPL の糖鎖生合成について、関与遺伝子群を含め明らかとなった。

一方、これらの上記関与遺伝子群の情報を利用し、4 型及び 8 型 GPL 糖鎖を安定的且つ特異的に発現する組換え *M. smegmatis* 株を作製し、菌体性状の解析を行った。その結果、他の血清型糖鎖を発現する株に比べ両血清型糖鎖の場合に菌体が著しく凝集する様子が観察された。さらに、休眠状態を反映する培養条件が MAC 株そのものの GPL 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培地において、4 型 GPL の生産量が増加し、また、好気状態から低酸素状態への移行により、4 型 GPL の生産量が低下する現象が観察された。

D. 考察

MAC の病原性に関与する GPL は、骨格部分の構造は変わらず糖鎖部分のみに多様性を持つことが大きな特徴である。同時にこれらの糖鎖部分は MAC の血清型を規定する機能を持つことから、血清型間での病原性に違いは GPL の糖鎖部分に起因することが推測されている。そこで、本研究では、病原性が比較的強いとされる 4 型及び 8 型血清型 GPL の糖鎖を生合成及び機能の側面から理解することにより、病原性解明への足がかりとすることを目指した。4 型及び 8 型の生合成にはその前駆体となり得る血清型糖鎖構造が存在する。それらの

前駆体糖鎖に対して、4型では *hlpA4* 遺伝子が、8型では *gtfTB* 遺伝子が作用することによりそれぞれの特異的糖鎖形成が開始されることが生合成解析より明らかとなった。両遺伝子は機能的には糖転移酵素をそれぞれコードしていることから、異なる糖鎖の伸長が血清型の多様性を生じる上で重要なステップであると考えられる。また、4型糖鎖生合成における *hlpA4* 遺伝子に関しては、ホモログの多くが抗酸菌とは異なるシアノバクテリアに認められることが明らかとなった。このことは、MACが環境細菌として様々なバクテリア群から遺伝子の水平伝播を受けることにより、進化学的に GPL 糖鎖すなわち血清型の多様性を生み出してきた可能性を示している。一方、4型及び8型 GPL 糖鎖を再現した株で、他血清型 GPL 糖鎖との間に凝集性の差が認められたことは、糖鎖構造が菌体の生化学的性状を制御する一因になっていることを示している。菌体の凝集性に関しては、細胞性免疫による認識度合いに違いが生じることが報告されており、GPL 糖鎖により凝集性が変化することは、免疫を通じた宿主による排除機構に対して菌側が発揮する抵抗手段の一つであることを示唆するものである。さらに、MACにおける4型 GPL の生合成が、休眠状態を反映した培養条件により影響を受け得ることが示されたことは、上述した糖鎖の機能に留まらず、環境に応じた量的又は質的な制御を MAC 自身が GPL 糖鎖の生合成において行う能力を持つ可能性も考えられる。本研究において、代表的な GPL 糖鎖の生合成を解明することにより、それらの機能または制御機構の一端を明らかにすることができた。しかしながら、GPL には多面的な側面を持つ可能性が指摘されており、MAC の病原性機構全体を見据えたさらなる解析が望まれる。

E. 結論

MACにおける高病原性血清型4型及び8型 GPL の糖鎖生合成機構を解明した。さらに GPL の糖鎖は菌体の生化学的性状を制御し、またその糖鎖生合成は休眠状態の環

境により影響を受けることが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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. 2009. Detection of serum antibodies to *M. leprae* Major Membrane Protein-II in leprosy patients from Indonesia. *Leprosy Review.* 80:402-409.
- 5) Miyamoto, Y., T. Mukai, T. Naka, N. Fujiwara, Y. Maeda, M. Kai, S. Mizuno, I. Yano, and M. Makino. 2010. Novel rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.*, 192: 5700-5708.
- 6) Komine-Aizawa, S., T. Yamazaki, T.

Yamazaki, S. Hattori, Y. Miyamoto, N. Yamamoto, S. Haga, M. Sugitani, M. Honda, S. Hayakawa, and S. Yamamoto. 2010. Influence of advanced age on *Mycobacterium bovis* BCG vaccination in guinea pigs aerogenically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Vaccine Immunol., 17:1500-1506.

- 7) Kai, M, N. H. Nguyen Phuc, A. H. Nguyen, B. D. H. Pham Thi, K. H. Nguyen, Y. Miyamoto, Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Makino, and T. T. Nguyen. 2010. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. Clin. Infect. Dis. 52: e127-e132.

2. 学会発表

- 1) 宮本友司、向井 徹、甲斐雅規、前田百美、中 崇、矢野郁也、牧野正彦。2008. *Mycobacterium avium* complex 血清型 8 型における糖脂質抗原の生合成経路の解析. 第 81 回日本細菌学会総会 (京都、3 月) .
- 2) 甲斐雅規、宮本友司、向井 徹、矢野郁也、牧野正彦。2008. 遺伝子破壊による BCG 菌ミコール酸のサブクラス変換. 第 81 回日本細菌学会総会 (京都、3 月) .
- 3) 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) .
- 4) 向井徹、和泉眞藏、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) .
- 5) 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. 43rd Tuberculosis and leprosy Research Conference. (Baltimore, United States of America, 7 月)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 前田百美, Mochammad Hatta, Ratnawati, Mashudi, Yadi, Muhammad Sabir, Nataniel Tandirogang, Luh Made Mas 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)
- 10) Miyamoto, Y. and M. Makino. 2009. Biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* Complex. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and leprosy Research Conference (福岡、7 月)
- 11) 甲斐雅規, 松岡正典, 宮本友司, 牧野正彦。2010. 次世代シーケンス解析によるらい菌株のゲノム配列比較. 第 83 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 (鹿児島、5 月).
- 12) 向井 徹, 松岡正典, 前田百美, 宮本友司, 福富康夫, 牧野正彦。2010. 抗酸菌ファージプロモーターによるらい菌の蛍光蛋白発現. 第 83 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 (鹿児島、5 月).
- 13) Miyamoto, Y. and M. Makino. 2010. Characterization of the

glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium avium* complex serovar 20. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (Boston, United States of America, 7月)

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