

ORIGINAL ARTICLE

Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of immunoglobulin G in individuals with past tuberculosis

Mayuko Osada-Oka¹, Yoshitaka Tateishi², Yukio Hirayama¹, Yuriko Ozeki³, Mamiko Niki¹, Seigo Kitada², Ryoji Maekura², Kunio Tsujimura⁴, Yukio Koide⁴, Naoya Ohara⁵, Taro Yamamoto⁶, Kazuo Kobayashi⁷ and Sohkiichi Matsumoto¹

¹Department of Bacteriology, Osaka City University Graduate School of Medicine, 1-4-3 Abeno-ku, Osaka 545-8585, ²Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Toneyama National Hospital, 5-1-1 Toneyama, Toyonaka, Osaka 560-8552,

³Department of Food and Nutrition, Sonoda Women's University, 7-29-1 Minamitsukaguchi-cho, Amagasaki, Hyogo 661-0012,

⁴Department of Infectious Diseases, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, ⁵Department of Oral Microbiology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 2-5-1 Shikada-cho, Kita-ku, Okayama 700-8558, ⁶Department of International Health, Institute of Tropical Medicine, The Global Center of Excellence, Nagasaki University, Nagasaki 852-8523 and ⁷Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

ABSTRACT

Development of accurate methods for predicting progression of tuberculosis (TB) from the latent state is recognized as vitally important in controlling TB, because a majority of cases develop from latent infections. Past TB that has never been treated has a higher risk of progressing than does latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in patients who have previously received treatment. Antibody responses against 23 kinds of *M. tuberculosis* proteins in individuals with past TB who had not been medicated were evaluated. These individuals had significantly higher concentrations of antibodies against Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) than did those with active TB and uninfected controls. In addition, immunohistochemistry revealed colocalization of tubercle bacilli, antigen 85 and MDP1 inside tuberculous granuloma lesions in an asymptomatic subject, showing that *M. tuberculosis* in lesions expresses both antigen 85 and MDP1. Our study suggests the potential usefulness of measuring antibody responses to antigen 85A and MDP1 for assessing the risk of TB progression.

Key words humoral response, latent *Mycobacterium tuberculosis* infection, Rv2986c, tuberculosis.

The WHO reports that *M. tuberculosis* latently infects 30% of the world's population and that nearly 8.8 million new cases of TB and 1.1 million deaths occur worldwide (1).

The American Thoracic Society classifies *M. tuberculosis*-infected individuals as symptomatic and asymptomatic (2). They divide the asymptomatic group into those with past

Correspondence

Sohkiichi Matsumoto, Department of Bacteriology, Osaka City University Graduate School of Medicine, 1-4-3 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan.

Tel: +81 6 6645 3745; fax: +81 6 6645 3746; email: sohkiichi@med.osaka-cu.ac.jp

Received 4 July 2012; revised 19 October 2012; accepted 2 November 2012.

List of Abbreviations: Acr, alpha-crystallin like protein (also called HspX); Ag85, antigen 85 complex proteins (mycolyltransferases); Ag85A, antigen 85A; Ag85B, antigen 85B (also called alpha antigen); AUC, area under the curve; BCG, *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin; CFP10, 10 kDa culture filtrate protein; CI, confidence interval; DosR, dormancy survival regulator; DosS, sensor histidine kinase of DosR; ESAT6, 6 kDa early secretory antigenic target of *Mycobacterium tuberculosis*; HCs, *M. tuberculosis* uninfected healthy controls; HBHA, heparin-binding hemagglutinin; HE, hematoxylin–eosin; HrpA, heat-stress-induced ribosome binding protein A (also called Acr2); IGRA, interferon gamma release assay; LTBI, latent *Mycobacterium tuberculosis* infection; MDP1, mycobacterial DNA-binding protein 1 (also called Mt-HLP, HupB, LBP); *M. tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*; PPD, purified protein derivative; ROC, receiver operating characteristic; QFT, QuantiFERON-TB; TB, tuberculosis; TST, tuberculin skin test; WHO, World Health Organization.

TB and those with LTBI. Past TB includes a history of active TB or abnormal stable radiographic findings of TB. LTBI denotes a positive TST or IGRA and no clinical and no radiographic evidence of active disease. Patients with both past TB and LTBI have no bacteriological evidence of the disease. Individuals with past TB are more than likely to harbor persisting *M. tuberculosis* because, once infection is established, human host immunity alone rarely eradicates this organism. Individuals with past TB not currently receiving medication have a higher risk of TB progression than do those with LTBI (3–5). Identification of people at risk of TB progression is important in that it leads to provision of appropriate preventative medication. However, recent diagnostic methods, such as TST and IGRAs do not permit assessment of the risk of TB progression (4, 5).

As the WHO warns, currently available commercial kits for TB serodiagnosis and identification of symptomatic *M. tuberculosis* infection are of questionable value because of their broad and erratic results for samples from subjects with paucibacillary forms of TB. In contrast antibody responses, which correlate with bacterial burden, have the potential to track TB progression from asymptomatic infections (5). During stable asymptomatic infection or after vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG, tests for antibody production are largely negative (6–8). By contrast, antibody titers to *M. tuberculosis* antigens increase prior to TB progression (9–12).

Identification of specific antibodies in subjects with asymptomatic *M. tuberculosis* infection is an important step in identifying those at risk of TB progression. It is conceivable that there are heterogeneous populations of tubercle bacilli during dormancy and actively multiplying phases within granulomatous lesions at the pre-recurrence stage. In this study, we assessed antibody responses to 23 kinds of major *M. tuberculosis* proteins, including those expressed by growing and dormant bacilli (13–19) obtained from individuals with past TB who were not currently receiving TB chemotherapy. The aim of this study was to explore biomarker-targeted antibody responses in those who are at risk of TB progression.

MATERIALS AND METHODS

Study populations

The following groups of individuals were enrolled (Table 1).

1. A HC group of 17 students (ages 20–24 years, male/female ratio 9/8) from Osaka City University Medical School (Osaka, Japan). These participants were negative for TB according to chest X-ray films and immune-based assessment (TST and IGRAs), and had no known risk factors for *M. tuberculosis* infection such as HIV infection, close contact with infected individuals or suggestive chest X-ray findings.
2. An active TB group of 15 individuals (aged 35–71 years, male/female ratio 13/2) whose diagnoses of active TB were based on microbiologic examination of sputum specimens yielding either positive cultures for *M. tuberculosis* or positive DNA amplification tests specific for *M. tuberculosis* (TRC Test; TRCRapid-160, Tosoh, Tokyo, Japan). All members of this group had positive IGRAs.
3. A past TB group of 15 patients with definitive histories of pulmonary TB more than 5 years previously. Their sputum samples were negative on culture and nucleic acid amplification *M. tuberculosis* tests. Their chest X-ray films showed sclerotic lesions and stable cavities. The cavitory lesions indicated radiographic diagnoses of TB because they had no surrounding infiltrating shadows. In this group, 33% of individuals were IGRA positive.

Subjects were excluded from this study when disease due to nontuberculous mycobacteria was confirmed by repeated cultures and the findings satisfied the American Thoracic Society guidelines (20). The serum specimens were assayed without knowledge of the patients' clinical characteristics. This study was approved by the Research and Ethical Committees of the National Toneyama Hospital and Osaka City University Graduate School of Medicine and informed consent was obtained from all subjects.

Table 1. Characteristics of the study subjects

	HC	Active TB	Past TB
Number of participants	17	15	15
Age, mean (years) \pm SD	21.82 \pm 1.13	255.93 \pm 11.25	69.40 \pm 12.73
Age range (years)	20–24	35–71	42–91
Male/female ratio	9/8	13/2	9/6
IGRA positive (%)	0	100	33.33

HC, healthy controls; IGRA, interferon gamma release assay.

Materials and reagents

pET-21b and Bugbuster HT were obtained from Novagen (Darmstadt, Germany), *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells from Toyobo (Osaka, Japan), Lowenstein–Jensen Luria–Bertani medium and carbenicillin from Sigma (St. Louis, MO, USA), isopropyl-1-thio-beta-d-galactopyranoside and Ni-NTA agarose from Qiagen (Gaithersburg, MD, USA), skimmed milk from Morinaga (Tokyo, Japan), horseradish peroxidase-conjugated anti-human IgG, IgA, or IgM antibodies and Envision kits from Dako (Carpinteria, CA, USA), SureBlue reserve TMB microwell peroxidase substrate from KPL (Gaithersburg, MD, USA) and monoclonal Acr antibody from HyTest (Turku, Finland).

Recombinant protein preparation

A pET-21b-based expression vector containing the full coding sequence for HBHA (Rv0475) was generated by a PCR-based approach and maintained in *E. coli* BL21 (DE3) cells. The DNA sequence encoding HBHA was amplified from *M. tuberculosis* H37Rv DNA using appropriate primers and cloned into the *Nde*I and *Hind*III sites of pET-21b. The vectors expressing Acr, HrpA (Rv0251c), ESAT-6 (Rv3875), CFP10 (Rv3874), Ag85A (Rv3804c) and Ag85B (Rv1886c) were produced similarly by a PCR-based approach using a bacterial chromosome. Each PCR product containing coding regions was designed to allow expression of C-terminal, 6 × histidine-tagged variants of the recombinant proteins following ligation into pET-21b. After construction, expression vectors were confirmed by DNA sequencing. Recombinant *M. tuberculosis* proteins were purified by utilizing a Ni-NTA column (1 mL bed volume, GE Healthcare Bio-Science, Piscataway, NJ, USA) according to the manufacturer's instruction.

Enzyme-linked immunosorbent assay

Concentrations of IgG, IgA and IgM antibodies were determined by ELISA using recombinant proteins. Ninety-well microplates (Sumilon Type H, LMS, Tokyo, Japan) were coated with each recombinant antigen in bicarbonate buffer, pH 9.6 (0.5 µg/well) overnight at 4°C. The plates were blocked with PBS containing 0.05% Tween 20 and 5% skimmed milk for 12 hr at 4°C and washed four times with PBS containing 0.05% Tween 20. The plates were then washed and human serum samples diluted 1:100 in PBS containing 0.05% Tween 20 and 0.5% skimmed milk were incubated for 12 hr at 4°C. After washing the wells, HRP-conjugated anti-human IgG, IgA, or IgM antibodies were added at a 1:5000 dilution. After 1 hr incubation at 37°C, the plates were

washed four times before 100 µL of SureBlue reserve-TMB was added to each well. The reactions were stopped after 3 min by adding 50 µL of 0.1 M HCl and the plates read at 450 nm using a Multiskan (Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama, Japan).

Histopathology of granulomatous lesions

Paraffin-embedded lung sections were stained with monoclonal anti-Acr (1:500), polyclonal anti-MDP1 (1:500) and polyclonal anti-Ag85 (1:1000) according to the manufacturer's instructions and examined with the Dako EnVision system.

Statistical analyses

Optical density differences between study groups were determined using the Mann–Whitney's U-test. ROC curve analysis and the AUC with 95% s CI for each antigen were calculated with the GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). In all analyses, $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Concentrations of serum antibodies against 6 kDa early secretory antigenic target of *Mycobacterium tuberculosis* and 10 kDa culture filtrate protein

We examined the serum concentrations of antibodies against ESAT-6 and CFP10, which are produced from *M. tuberculosis* during the growth phase, by ELISA. We found that the concentrations of IgG-class antibodies to ESAT-6 and CFP10 were significantly higher in the active TB group than in the HC group ($P < 0.05$, Fig. 1). In addition, the concentration of IgG against CFP10 was significantly higher in the active TB group than in the past TB group ($P < 0.05$).

Concentrations of antibodies against 16 proteins encoded by the dormancy survival regulator (Rv3133c) region of *Mycobacterium tuberculosis*

In order to clarify antibody responses to latency-associated antigens of *M. tuberculosis*, we next examined the levels of serum antibodies against 16 proteins encoded by the DosR regulon, namely Rv0574, Rv0079, Rv1998, Rv2005, Rv2029, Rv2030, Rv2031c (Acr), Rv2032, Rv2623, Rv2624, Rv2628, Rv2629, Rv3127, Rv3129, Rv3132 (DosS), and Rv3134. With the exception of Acr and DosS, levels of IgG antibodies to DosR regulon-encoded proteins were low or absent in the

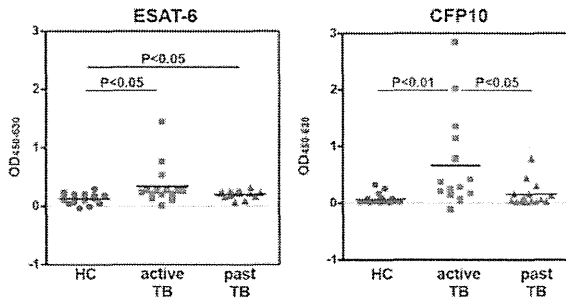


Fig. 1. The amounts of immunoglobulin G (IgG) to 6 kDa early secretory antigenic target of *M. tuberculosis* (ESAT-6) and 10 kDa culture filtrate protein (CFP10) of *M. tuberculosis*. ELISA optical densities of recombinant antigens, ESAT6 and CFP10, indicating the serum antibody concentrations in the HC (n = 17), active TB (n = 15), and past TB (n = 15) groups. All results are expressed as individual data and geometric mean \pm SD. OD, optical density.

three groups (Fig. S1, Fig. 2a, b). The concentrations of IgG antibody to Acr were significantly higher in the active TB and past TB groups than in the HC group. However, there were no differences between the past and active TB groups in concentrations of IgG to either Acr or DosS. In contrast to IgG antibodies, IgM and IgA antibody responses to the proteins were below measurable limits in all the tested individuals (data not shown).

Concentrations of antibodies to non-dormancy survival regulator regulon proteins

We next examined concentrations of IgG to immunogenic *M. tuberculosis* proteins other than ESAT-6, CFP10, and DosR-regulon proteins. Although the concentrations of IgG to HBHA and HrpA were higher in the past TB group than in the active TB group, we found no difference between the past TB and HC groups (data not shown). In contrast, the concentrations of IgG antibody against Ag85 and MDP1 were higher in the past TB group than in the HC and active TB groups (P < 0.01, Fig. 2c–e).

Sensitivity of immunoglobulin G response to tuberculosis status

Based on these data, we performed ROC analyses on data from the past TB and HC groups (Fig. 3 and Table 2). Acr, Ag85A, and MDP1 produced ROC curves acceptable for diagnostics with AUCs of 0.992 (95% CI 0.972–1.013, P < 0.0001), 0.965 (95% CI 0.910–1.019, P < 0.0001), and 0.973 (95% CI 0.925–1.024, P < 0.0001), respectively. Moreover, the AUCs for Ag85A and MDP1 were 0.809 (95% CI 0.642–0.976, P = 0.0040) and 0.858 (95% CI 0.720–0.995, P = 0.0008), respectively, in a ROC analysis between the past TB and active TB groups.

Table 3 summarizes the sensitivities to antigens in each group. These data show that IgG responses to CFP10 and

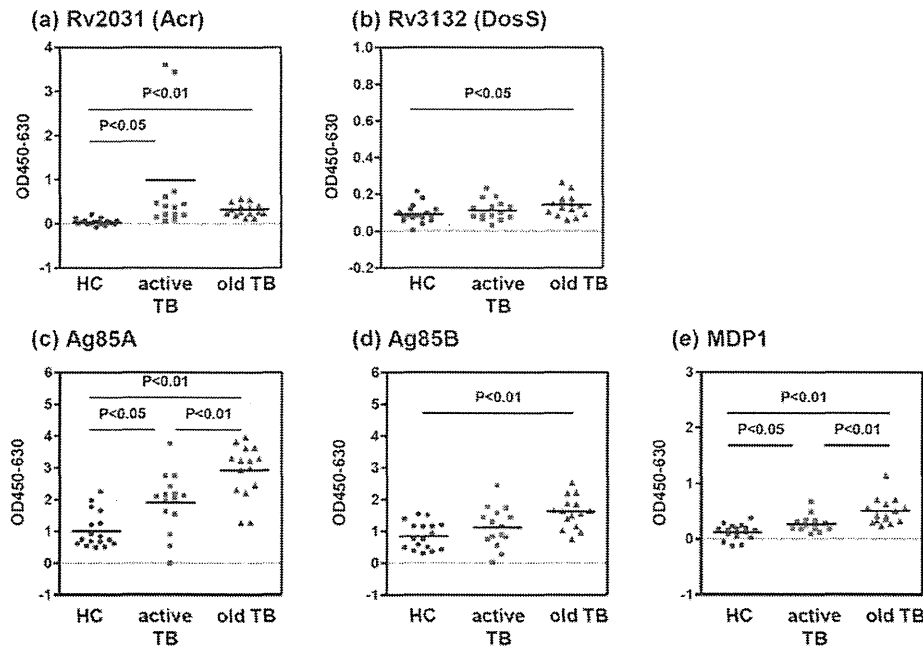


Fig. 2. The amount of immunoglobulin G (IgG) to proteins encoded by the dormancy survival regulator (DosR) regulon and other mycobacterial proteins. ELISA optical densities of DosR regulon-encoded recombinant antigens (a) Rv2031 (Acr) and (b) Rv2132 (DosS) (c) Ag85A, (d) Ag85B and (e) MDP1, indicating serum antibody concentrations in the HC (n = 17), active TB (n = 15), and past TB (n = 15) groups.

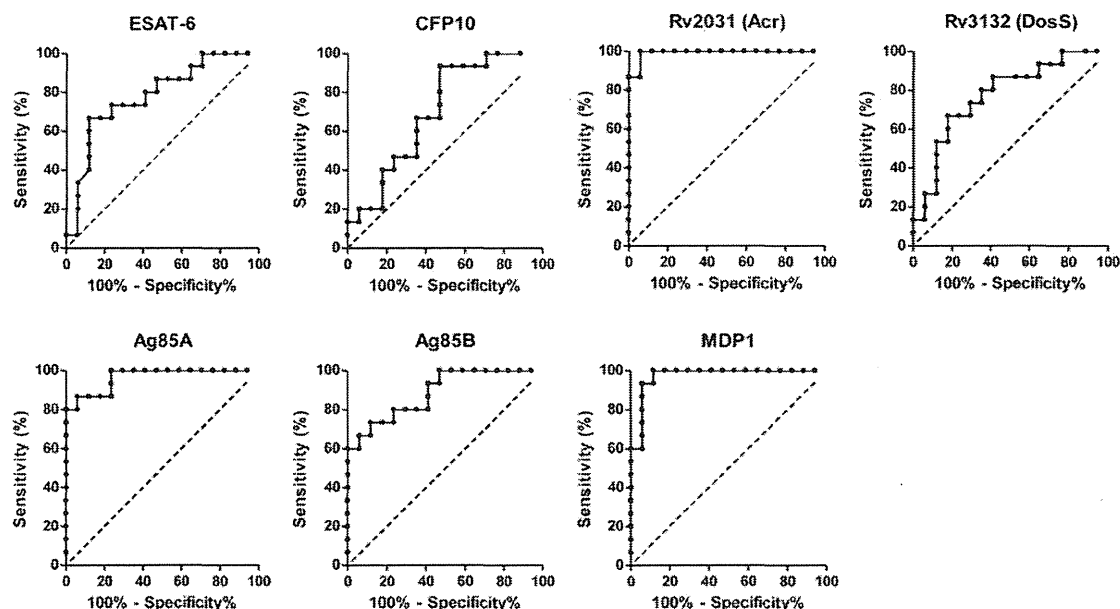


Fig. 3. Receiver-operator characteristics (ROC) curves of immunoglobulin G (IgG) concentrations of *M. tuberculosis* antigens. ROC curves for accuracies of single analyses for differentiating between past TB and HC group IgG concentrations.

Acr occurred more often in the active TB than the past TB or HC groups. The sensitivities for CFP10 and Acr in the active TB group were 53.3% and 60.0%, respectively. By contrast, the sensitivities of IgG responses to Ag85A (86.7%) and MDP1 (60.0%) were greater in the past TB than in the HC groups.

Colocalization of antigen 85 complex proteins and mycobacterial DNA-binding protein 1 with *Mycobacterium tuberculosis* in human pulmonary granulomatous lesions

In order to confirm expression of Ag85 and MDP1 in persistent *M. tuberculosis*, we histopathologically

examined a biopsy of a solitary pulmonary coin lesion that was visible in chest X-ray films of a patient who was negative for sputum bacteriology (both smear and culture). Microbiologic examination of this biopsied specimen showed *M. tuberculosis* infection in a tuberculoma. We stained the biopsy section with HE (Fig. 4a), Ziehl–Neelsen (Fig. 4b, c), and antibodies to control (Fig. 4d), Ag85 (Fig. 4e) and MDP1 (Fig. 4f). The HE stain showed typical granuloma formation with central caseation (Fig. 4a). Ziehl–Neelsen staining revealed acid fast bacilli located in the center of the granuloma (Fig. 4b, c). The lesion was positive for antibodies against Ag85 and MDP1 in the same areas as were positive for Ziehl–Neelsen. Thus, for the first time we

Table 2. ROC individual analyses against *M. tuberculosis* antigen results in subjects with past TB or healthy controls

Antigens	Concentration			ROC analysis		
	HC (n = 17)	Active TB (n = 15)	Past TB (n = 15)	AUC	95% CI	P-value
ESAT-6	0.137 ± 0.094	0.297 ± 0.325	0.210 ± 0.065	0.782	0.62–0.95	0.0066
CFP10	0.077 ± 0.096	0.662 ± 0.836	0.151 ± 0.305	0.702	0.52–0.88	0.0519
Acr	0.147 ± 0.058	0.989 ± 1.419	0.333 ± 0.145	0.992	0.97–1.01	< 0.0001
DosS	0.090 ± 0.052	0.136 ± 0.072	0.144 ± 0.058	0.773	0.61–0.94	0.0087
Ag85A	0.984 ± 0.570	1.899 ± 0.928	2.918 ± 0.839	0.965	0.91–1.02	< 0.0001
Ag85B	0.836 ± 0.437	1.110 ± 0.630	1.611 ± 0.497	0.886	0.77–1.00	0.0002
HBHA	0.890 ± 0.207	0.485 ± 0.388	0.923 ± 0.347	0.526	0.31–0.74	0.8061
HrpA	0.260 ± 0.304	0.172 ± 0.122	0.341 ± 0.205	0.651	0.46–0.85	0.1460
MDP1	0.112 ± 0.145	0.269 ± 0.141	0.509 ± 0.238	0.973	0.92–1.02	< 0.0001

Average ± SD levels in HC, active TB, and past TB measured according to ability to discriminate between IgG antibody concentrations of each subject. ROC analyses were performed using the established past TB and HC groups as comparator groups.

Table 3. Sensitivity of antibodies against *M. tuberculosis* antigen in each group

Antigens	HC (n = 17)	Active TB (n = 15)	Past TB (n = 15)
ESAT-6	0.0% (1)	20.0% (3)	6.7% (1)
CFP10	6.7% (1)	53.3% (8)	33.3% (5)
Acr	0.0% (1)	60.0% (9)	60.0% (9)
DosS	0.0% (1)	6.7% (1)	13.3% (2)
Ag85A	6.7% (1)	33.3% (5)	86.7% (13)
Ag85B	0.0% (1)	13.3% (2)	33.3% (5)
HBHA	6.7% (1)	6.7% (1)	20.0% (3)
HrpA	0.0% (1)	0.0% (1)	0.0% (1)
MDP1	0.0% (1)	13.3% (2)	60.0% (9)

Cut-off value was set as average \pm 2 SD of IgG concentrations in HC group.

Sensitivity (%) and number of subjects.

demonstrated colocalization of Ag85, MDP1 and persistent *M. tuberculosis* bacilli.

DISCUSSION

Asymptomatic *M. tuberculosis* infection represents a large pathogen pool that can cause reactivation. Therefore, identifying those at risk of TB progression is an important challenge for successful control of TB. Although the accuracy of serodiagnosis of active TB

is controversial, several lines of evidence suggest it has the potential to track disease progression. For example, several studies have reported higher antibody concentrations in sputum smear-positive than in smear-negative subjects (6, 21) and increased antibody production when disease progresses in both macaques (5) and HIV-infected human cohorts (9–12). Since antibody titers and targets differ from each other (22, 23), identification of several antigens that are targeted by antibodies in people who are at risk of TB progression is the first critical step. Because people with radiographic evidence of past or spontaneously cured TB have a higher risk of disease progression than LTBI alone, we selected subjects with past TB for this study and examined their concentrations of antibodies against *M. tuberculosis* proteins.

We found humoral antibody (IgG) responses to the major pathogenic proteins of *M. tuberculosis*, ESAT-6 and CFP10 (which are produced in the growth phase) in 20.0% and 53.3%, respectively, of individuals in the active TB group, but in only 6.7% and 33.3%, respectively, of those in the past TB group (Fig. 1 and Table 3). Indeed, only 33.3% of the past TB group was positive for IGRAs using these antigens. This suggests that both humoral and cell-mediated immune responses to ESAT-6 and CFP10 are low in the past TB group, demonstrating the difficulty

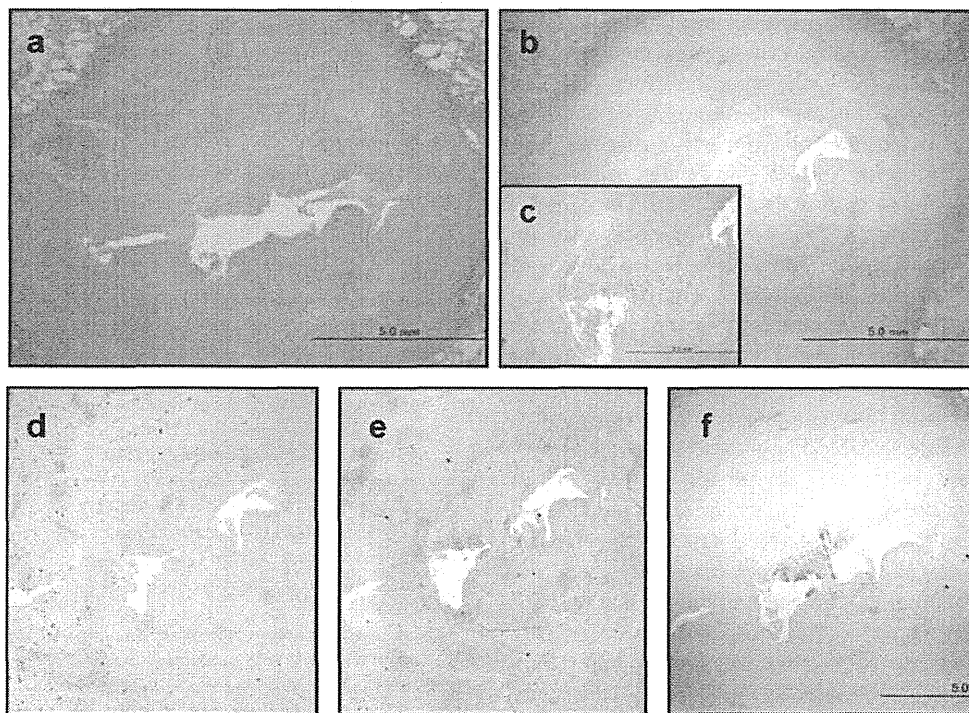


Fig. 4. Histological analysis of human pulmonary past tuberculoma. (a) HE stain. (b–c) Ziehl-Neelsen, acid-fast, stain. Immunohistochemistry staining with (d) control antibody, (e) Ag85 antibody, and (f) MDP1 antibody.

of diagnosing asymptomatic infection, which has potential to reactivate.

The DosR is considered a key regulator of adaptation of *M. tuberculosis* to hypoxic conditions (24–26). T cells of asymptomatic subjects with LTBI DosR reportedly preferentially recognize regulon-encoded proteins (14, 27). With the exception of Acr and DosS, this study has shown that antibody concentrations are low in patients with past TB group. Possible explanations for the present data are low antigenicity or degrees of expression of DosR regulon-encoded proteins other than Acr and DosS. Another possible explanation is the location of DosR regulon encoded proteins; because antigens encoded by the DosR regulon are not secreted, humoral immune responses to such intracellular antigens cannot be evoked.

In this study, we have identified two candidate antigens, Ag85A and MDP1, for identifying those at risk of TB progression. Ag85A belongs to the Ag85 complex, which consists of three member proteins designated Ag85A, Ag85B, and Ag85C. Ag85 genes are encoded by three genes located at different sites in the *M. tuberculosis* genome and show cross-reactivity as well as homology at amino acid levels (18). Amino acid homology between Ag85A and Ag85B is 82%. The Ag85 complex has mycolyl transferase enzymatic activity, which translocates mycolic acids of trehalose 6-monomycolate to free sugars, such as trehalose (28). Recent studies show that dynamic remodeling of mycolic acid-containing glycolipids in the cell wall occurs in vivo, this process being mediated by the broad substrate specificity of Ag85 (29, 30). Importantly, immune responses to glycerol monomycolate reportedly occur specifically in people with LTBI or in BCG-vaccinated individuals but not in patients with active TB (31). Thus, Ag85-dependent exchange of trehalose 6-monomycolate to glycerol monomycolate is likely to occur in LTBI and BCG-vaccinated sites. Collectively, these reports suggest that the detection of immune responses to Ag85 in this study is not surprising and that this protein may be useful for detecting asymptomatic *M. tuberculosis* infection at risk of TB progression.

Mycobacterial DNA-binding protein 1 has pleiotropic functions and is an essential protein for survival of *M. tuberculosis*. It influences various biological functions of mycobacteria, from the growth phase to the hypoxic dormant state (32, 33). The present data suggest the possibility of enhanced expression of this protein in latent rather than in the active disease states (Figs. 2, 3). MDP1 suppresses mycobacterial multiplication by controlling gene expression (33, 34) and also has ferritin-like activity controlling iron homeostasis (35). Iron is essential for the survival and multiplication of *M. tuberculosis* inside macrophages, whereas the host utilizes iron to generate

bactericidal reactive oxygen intermediates. MDP1 stores iron inside bacteria and prevents iron-dependent generation of oxygen radicals (35). Such multifunctional activities of this protein are likely involved in downshifting the growth rate and long-term persistence of *M. tuberculosis* in the latent state, thus accounting for the definite IgG production in the past TB group in the present study.

DISCLOSURE

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ms. Sara Matsumoto and Inori Omura, for assistance with the experiments and their heartfelt encouragement. We would like to thank Mr. Hiroo Yamamoto and Ms. Junko Koizumi (Osaka City University Medical School) for their technical assistance. This work was supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Ministry of Health, Labor and Welfare (Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Health Sciences Research Grants), and Japan Health Sciences Foundation.

REFERENCES

1. WHO. (2011) Global tuberculosis control: WHO report 2011. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
2. American Thoracic Society. (2000) Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* **161**: 1376–95.
3. Grzybowski S., Fishaut H., Rowe J., Brown A. (1971) Tuberculosis among patients with various radiologic abnormalities, followed by the chest clinic service. *Am Rev Respir Dis* **104**: 605–8.
4. Horsburgh, C.R., Jr., Rubin E.J. (2011) Clinical practice. Latent tuberculosis infection in the United States. *N Engl J Med* **364**: 1441–8.
5. Kunmath-Velayudhan S., Gennaro M.L. (2011) Immunodiagnosis of tuberculosis: a dynamic view of biomarker discovery. *Clin Microbiol Rev* **24**: 792–805.
6. Bothamley G.H., Rudd R., Festenstein F., Ivanyi J. (1992) Clinical value of the measurement of Mycobacterium tuberculosis specific antibody in pulmonary tuberculosis. *Thorax* **47**: 270–75.
7. Maekura R., Okuda Y., Nakagawa M., Hiraga T., Yokota S., Ito M., Yano I., Kohno H., Wada M., Abe C., Toyoda T., Kishimoto T., Ogura T. (2001) Clinical evaluation of anti-tuberculous glycolipid immunoglobulin G antibody assay for rapid serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* **39**: 3603–8.
8. Silva V.M., Kanaujia G., Gennaro M.L., Menzies D. (2003) Factors associated with humoral response to ESAT-6, 38 kDa and 14 kDa in patients with a spectrum of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **7**: 478–84.
9. Cavalcante S., Kritski A.L., Ferreira M.A., Souza M.A., Laszlo A., Werneck-Barroso E.B., Fonseca L.S. (1997) Association between an early humoral response to Mycobacterium tuberculosis

- antigens and later development of tuberculosis in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Int J Tuberc Lung Dis* 1: 170–4.
10. Gennaro M.L., Affouf M., Kanaugia G.V., Brusasca P.N., Mangura B., Reichman L. (2007) Antibody markers of incident tuberculosis among HIV-infected adults in the USA: a historical prospective study. *Int J Tuberc Lung Dis* 11: 624–31.
 11. Laal S., Samanich K.M., Sonnenberg M.G., Belisle J.T., O'leary J., Simberkoff M.S., Zolla-Pazner S. (1997) Surrogate marker of preclinical tuberculosis in human immunodeficiency virus infection: antibodies to an 88-kDa secreted antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 176: 133–43.
 12. Simonney N., Chavanet P., Perronne C., Leportier M., Revol F., Herrmann J.L., Lagrange P.H. (2007) B-cell immune responses in HIV positive and HIV negative patients with tuberculosis evaluated with an ELISA using a glycolipid antigen. *Tuberculosis (Edinb)* 87: 109–22.
 13. Andersen P., Munk M.E., Pollock J.M., Doherty T.M. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 356: 1099–104.
 14. Leyten E.M., Lin M.Y., Franken K.L., Friggen A.H., Prins C., Van Meijgaarden K.E., Voskuil M.I., Weldingh K., Andersen P., Schoolnik G.K., Arend S.M., Ottenhoff T.H., Klein M.R. (2006) Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect* 8: 2052–60.
 15. Matsumoto S., Yukitake H., Furugen M., Matsuo T., Mineta T., Yamada T. (1999) Identification of a novel DNA-binding protein from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Microbiol Immunol* 43: 1027–36.
 16. Ohara N., Ohara N., Naito M., Miyazaki C., Matsumoto S., Tabira Y., Yamada T. (1997) HrpA, a new ribosome-associated protein which appears in heat-stressed *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *J Bacteriol* 179: 6495–8.
 17. Roberts D.M., Liao R.P., Wisedchaisri G., Hol W.G., Sherman D. R. (2004) Two sensor kinases contribute to the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 279: 23 082–7.
 18. Wiker H.G., Harboe M. (1992) The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev* 56: 648–61.
 19. Wilkinson K.A., Stewart G.R., Newton S.M., Vordermeier H.M., Wain J.R., Murphy H.N., Horner K., Young D.B., Wilkinson R.J. (2005) Infection biology of a novel alpha-crystallin of *Mycobacterium tuberculosis*: Acr2. *J Immunol* 174: 4237–43.
 20. Griffith D.E., Aksamit T., Brown-Elliott B.A., Catanzaro A., Daley C., Gordin F., Holland S.M., Horsburgh R., Huijt G., Iademarco M.F., Iseman M., Olivier K., Ruoss S., Von Reyn C.F., Wallace, R.J., Jr., Winthrop K. (2007) An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 367–416.
 21. Steingart K.R., Dendukuri N., Henry M., Schiller I., Nahid P., Hopewell P.C., Ramsay A., Pai M., Laal S. (2009) Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Clin Vaccine Immunol* 16: 260–76.
 22. Abebe F., Holm-Hansen C., Wiker H.G., Bjune G. (2007) Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand J Immunol* 66: 176–91.
 23. Steingart K.R., Henry M., Laal S., Hopewell P.C., Ramsay A., Menzies D., Cunningham J., Weldingh K., Pai M. (2007) Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *PLoS Med* 4: e202.
 24. Boon C., Dick T. (2002) *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy. *J Bacteriol* 184: 6760–7.
 25. Locht C., Hougardy J.M., Rouanet C., Place S., Mascart F. (2006) Heparin-binding hemagglutinin, from an extrapulmonary dissemination factor to a powerful diagnostic and protective antigen against tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 86: 303–9.
 26. Park H.D., Guinn K.M., Harrell M.I., Liao R., Voskuil M.I., Tompa M., Schoolnik G.K., Sherman D.R. (2003) Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 48: 833–43.
 27. Roupie V., Romano M., Zhang L., Korf H., Lin M.Y., Franken K.L., Ottenhoff T.H., Klein M.R., Huygen K. (2007) Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice. *Infect Immun* 75: 941–9.
 28. Belisle J.T., Vissa V.D., Sievert T., Takayama K., Brennan P.J., Besra G.S. (1997) Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 276: 1420–2.
 29. Backus K.M., Boshoff H.I., Barry C.S., Boutureira O., Patel M.K., D'Hooge E., Lee S.S., Via L.E., Tahlan K., Barry III, C.E., Davis B. G. (2011) Uptake of unnatural trehalose analogs as a reporter for *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Chem Biol* 7: 228–35.
 30. Matsunaga I., Naka T., Talekar R.S., McConnell M.J., Katoh K., Nakao H., Otsuka A., Behar S.M., Yano I., Moody D.B., Sugita M. (2008) Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in *Mycobacteria*. *J Biol Chem* 283: 28 835–41.
 31. Layre E., Collmann A., Bastian M., Mariotti S., Czaplicki J., Prandi J., Mori L., Stenger S., De Libero G., Puzo G., Gilleron M. (2009) Mycolic acids constitute a scaffold for mycobacterial lipid antigens stimulating CD1-restricted T cells. *Chem Biol* 16: 82–92.
 32. Lewin A., Baus D., Kamal E., Bon F., Kunisch R., Maurischat S., Adonopoulou M., Eich K. (2008) The mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) from *Mycobacterium bovis* BCG influences various growth characteristics. *BMC Microbiol* 8: 91.
 33. Matsumoto S., Furugen M., Yukitake H., Yamada T. (2000) The gene encoding mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) transformed rapidly growing bacteria to slowly growing bacteria. *FEBS Microbiol Lett* 182: 297–301.
 34. Niki M., Niki M., Tateishi Y., Ozeki Y., Kirikae T., Lewin A., Inoue Y., Matsumoto M., Dahl J.L., Ogura H., Kobayashi K., Matsumoto S. (2012) A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. *J Biol Chem* 287: 27 743–52.
 35. Takatsuka M., Osada-Oka M., Satoh E.F., Kitadokoro K., Nishiuchi Y., Niki M., Inoue M., Iwai K., Arakawa T., Shimoji Y., Ogura H., Kobayashi K., Rambukkana A., Matsumoto S. (2011) A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. *PLoS ONE* 6: e20985.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

Figure S1 The amount of IgG to proteins encoded by 16 DosR regulon proteins. ELISA optical densities of DosR regulon-encoded recombinant antigens, Rv0574, Rv0079, Rv1998, Rv2005, Rv2029, Rv2030, Rv2031, Rv2032, Rv2623, Rv2624, Rv2628, Rv2629, Rv3127, Rv3129, Rv3132, Rv3134 indicating serum antibody concentrations in the HC (n = 17), active TB (n = 15), and past TB (n = 15) groups.

【タイトル】

鉄代謝およびイソニアジド耐性に関わる結核菌分子の機能と治療法開発の可能性

【英文タイトル】

The function of *Mycobacterium tuberculosis* molecule contributing to iron metabolism and isoniazid resistance and its clinical application.

【筆者】

仁木 満美子 (Mamiko Niki)、松本 壮吉 (Sohkichi Matsumoto)

【要旨】

結核菌は宿主に感染後休眠状態で長期間潜伏感染することが知られている。また、これらの潜伏感染菌は抗菌薬に対する抵抗性を有しており、結核治療を困難にしている。筆者らは、定常期以降の結核菌菌体内に大量に発現する分子である抗酸菌特異的ヒストン様蛋白質Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)は、生体にとって必須な元素である鉄の貯蔵および解毒に関与することで宿主内での長期生存に寄与するのみならず、抗結核薬であるイソニアジドの活性化酵素の発現を抑制することにより、定常期以降にみられる結核菌のイソニアジド抵抗性の獲得に関与することを明らかにしている。本稿ではこの分子をターゲットとした結核治療法開発の可能性について述べる。

【キーワード】

鉄代謝、イソニアジド抵抗性、潜在性結核、抗酸菌特異的ヒストン様蛋白質

【はじめに】

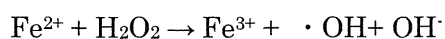
結核は日本国内最大の感染症であり、世界的にみても人口の1/3 が結核菌に感染しているといわれている。今日でもなお毎年100万人以上が結核を原因として死亡しているが、さらに近年では現行の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌の出現により、結核はもはや過去の病気とはいえない状況である。一方、ヒト型結核菌はヒト以外の生体や自然環境中で生育するのは困難であり、ヒトは結核菌の唯一の宿主と考えられていることから、ヒト体内からの菌の完全排除が実現すれば制圧が可能な感染症であると考えられている。

多くの細菌感染症において、抗菌薬を用いて宿主体内の菌の根絶を目指す化学療法が治療において不可欠である。しかしながら、結核治療における化学療法を困難にする問題点として、投薬期間が非常に長期にわたること、さらに現行の抗結核薬が潜在性結核には無効であることがあげられる。これらの問題を克服するべく、国内外を問わず多くの研究者が様々なアプローチで新規結核予防・治療法を模索しているところである。本稿では抗酸菌特異的ヒストン様蛋白質である *Mycobacterium* DNA-binding protein 1 (MDP1) という分子に焦点を絞り、本分子によって制御される酸化ストレス防御および薬剤耐性メカニズムを紹介するとともに、実際の結核治療への応用の可能性について述べる。

【生体鉄と結核】

鉄はほとんどの真核/原核生物にとって生命維持に必須な元素である。結核菌においても、鉄を補因子とする酵素群が呼吸やDNA合成などさまざまな代謝に関与することが知られており、宿主内での増殖および病原性の発揮には鉄が必要不可欠である。通常生体内においてほとんどの鉄は遊離状態では存在せず、ヘムやferritin、transferrinといった鉄結合性蛋白質により貯蔵、運搬されている。細菌はこういった鉄制限環境下において効率よく鉄を獲得するために、シデロフォアと呼ばれる低分子の鉄キレート分子を産生することが知られている。結核菌の産生するシデロフォアは mycobactin および carboxymycobactin と呼ばれる局在の異なる分子であることが報告されている¹⁾。シデロフォアは鉄親和性の極めて高い分子であり、細菌はこれらの分子を介して宿主の鉄結合性蛋白質から鉄を奪いとり利用している。これに対抗するように、宿主細胞は lipocalin 2 (Lcn2) と呼ばれるシデロフォア結合蛋白質を産生し、細菌の鉄獲得を阻害することが知られている。ノックアウトマウスを用いた実験では、Lcn2欠失により肺胞上皮細胞内での結核菌の増殖が促進されるという報告もある²⁾。一方、mycobactin欠失結核菌は鉄制限培地中で増殖が抑制され、マクロファージ内での生存が阻害されることが明らかになっている³⁾。以上のことから、鉄獲得を阻害することにより宿主内の結核菌の増殖を抑制することが可能であると考えられる。この仮説のもと、シデロフォア合成に関与する酵素の阻害剤を用いた結核治療法の開発が試みられている。また、結核に限らずいくつかの感染症の分野において、鉄キレート剤の投与による生体鉄の調節を行うことで病原体の増殖を制御するという研究もなされている⁴⁾。

鉄は2価および3価のイオンとして存在することが可能であり、種々の酸化還元反応を触媒する酵素の活性中心として働くことが知られている。なかでも2価鉄(Fe²⁺)は活性酸素種(ROS)および活性窒素種(RNS)の産生に関与し、それによりDNAや蛋白質などの生体構成分子を傷害することが知られている。活性酸素のなかでも最も生体に有害とされるのがヒドロキシルラジカルであり、鉄存在下で酵素非依存的なフェントン反応により産生される。



マクロファージはこうした鉄を介したフリーラジカル産生を病原体からの生体防御機構のひとつとして利用しているが、一方では過剰な鉄の存在は細胞自身にとって有害であるため、生体内での鉄イオンレベルを厳密に制御するシステムも持ち合わせている。なかでもferritin superfamily proteinに属する蛋白質はそのフェロキシダーゼ活性により Fe^{2+} を Fe^{3+} に変換して貯蔵する中心的な役割を果たしている。DNAは最も重要な生体構成分子の一つであるため、細菌にも同様の活性酸素防御機構が存在する。細菌のもつferritin superfamily proteinのうち、ヘムを含むものはferritin-like proteinあるいはbacterioferritinと呼ばれ、含まないものはminiferritin もしくはDNA-binding protein in starved cells (Dps)と呼ばれている。

結核菌のような細胞内寄生菌はROSから受けるDNAの傷害を回避しつつ細胞内で増殖する必要がある。結核菌はDpsを有しておらず、その代わりにferritin (BfrB)、bacterioferritin (BfrA)⁵⁾ および抗酸菌特異的ヒストン様蛋白質MDP1⁶⁾が鉄貯蔵および解毒に関与することが明らかになっている。MDP1は系統発生的にはferritin superfamily proteinとは異なる分子であり、それぞれの分子による鉄貯蔵メカニズムは異なっている。ferritinは分子中のフェロキシダーゼ活性中心において Fe^{2+} を酸化したのち貯蔵するが、MDP1は Fe^{3+} と直接結合することにより鉄を貯蔵することができる。また、MDP1はDNA結合能を有しており、物理的に酵素による分解を阻害すると同時に、自身の持つフェロキシダーゼ活性によりフェントン反応を阻害することでヒドロキシラジカルによるDNA分解を阻害する作用を有することが明らかになっている (図1)。以上のことから、これらの分子は生体内で菌が宿主細胞により産生されるROSからの攻撃を逃れつつ生育するために重要な防御機構であり、新規結核治療法のターゲットとして有効であると考えられる。また、現行の抗結核薬であるイソニアジドは薬剤の代謝の際にROSが産生されることから、これらの分子の機能を抑制する薬剤との併用により治療成績をあげる効果も期待される。

【長期生存と遺伝子変異を伴わない薬剤抵抗性】

結核菌の大きな特徴の一つとして、菌が定常期以降に増殖を停止した、いわゆる休眠状態で長期間生存可能である点があげられる。一般に、休眠状態の結核菌は活発な代謝活動を行わず、増殖することなく生命を維持していると考えられている。そのため、結核菌は宿主体内においても感染後すぐに結核を発症させることなく、休眠状態で持続感染することが可能である。こういった感染状態のことを潜在性結核と呼んでいる。

結核の化学療法は少なくとも6ヶ月にわたり複数の薬剤を併用することで行われるのが標準だが、それでも治療後の再発率は2~3%に達するとの報告がある。長期にわたる治療は患者への負担と薬剤耐性菌の出現の危険を伴う。このような治療長期化の背景には、結核菌の遅発育性と薬剤耐性の獲得がある。なかでも潜伏感染菌は長期間宿主内で生存することにより、遺伝子的には変異が見られないものの、表現型のみ薬剤抵抗性を獲得することが知られている。特に定常期以降の抗酸菌はイソニアジド (INH) に対し抵抗性を示すことが報告されており、治療のうえで問題視されている。以上のことから、結核菌の休眠機構の解析を行うことにより、新たな結核診断・治療法の開発の糸口が得られると考えられる。

休眠のメカニズムを解明するうえで、多くの科学者たちが実験的休眠モデルを提案している。なかでも低酸素による休眠誘導モデルは広く研究に用いられているが、これは結核菌の感染病巣である肉芽腫内が低酸素状態であることから⁷⁾、本来好気性菌である抗酸菌が環境に適応しつつ生命を維持するために、代謝を劇的に変化させ休眠状態に陥るのではという仮説に基づくものである。実

際、Wayne らによって開発された低酸素モデル⁸⁾を用いて作製された休眠菌はイソニアジドに抵抗性を示すことが明らかになっている。Dick らは、Wayne モデルを用いて培養した速育型抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* 菌体内においてMDP1の発現が上昇しているのを見いだしている。興味深いことに、*Streptomyces coelicolor* のヒストン様蛋白質HupS は芽胞形成時に発現が上昇する分子として報告されている⁹⁾。HupS は核様体蛋白質であり、芽胞内の染色体の安定化とストレス防御に関与していると考えられている。抗酸菌は芽胞形成能を有しないものの、休眠菌の生物学的意義は芽胞のそれと類似していることから、この分子がストレス環境下における染色体構造の安定化など、菌の長期生存に何らかの働きを担っていることが推察される。

MDP1 の発現は定常期以降に増強すること、また、MDP1 を欠失させた抗酸菌はイソニアジド感受性となることから、定常期以降にみられるイソニアジド抵抗性の獲得にこの分子が何らかの役割を果たしていると考えられていた。プロドラッグであるイソニアジドは抗酸菌の有するカタラーゼである KatG に代謝されることにより活性型になり、最終的には細胞壁成分であるミコール酸の合成を阻害することで菌を死に至らしめる。我々の研究により、MDP1 は KatG の発現を抑制し (図2)、その結果イソニアジドの代謝が抑制されることで菌のイソニアジド抵抗性に関与することが明らかとなった (図3)¹⁰⁾。MDP1 は定常期以降に発現が増強することから、増殖期菌体においては KatG の発現により菌はイソニアジド感受性である。しかし、定常期以降の経時的な MDP1 発現増強に伴い、KatG の発現が抑制されることにより菌は薬剤抵抗性を獲得することが可能となる (図4)。以上のことから、宿主内菌体の MDP1 発現を薬剤により調節することにより潜伏感染菌に対するイソニアジドの効果をあげるような治療が可能であると考えられる。

【まとめ】

MDP1 は抗酸菌特異的ヒストン様蛋白質であり、結核菌を含む抗酸菌群において広く保存されている。MDP1 により発現調節される KatG はカタラーゼ活性を有し、活性酸素である過酸化水素を分解し水と酸素を生じることから、結核菌が宿主内において酸化ストレスを受ける際に抗酸化物質として働き、菌の生存を助けると考えられている。MDP1 もフェロキシンダーゼ活性により鉄存在下で過酸化水素を水に変換することから、両蛋白質は過酸化水素の消去において同様の機能を有している。そのために、KatG と MDP1 の発現は相反して調節されているのではないかと推察される。実際に *M. smegmatis* 野生株において、KatG と MDP1 発現量は相反して調節されており、それが定常期以降の INH 抵抗性をもたらしているのではと考えられる。

MDP1 は、細菌の増殖を抑制する活性があり、静止期や休眠期において発現が増強するとの報告がある。これまでの研究により、MDP1 欠失により休眠期の遺伝子発現に顕著な抑制が観察されることから、この分子による代謝調節が潜伏感染菌の薬剤抵抗性に関与していると考えられている。現行の抗結核薬は増殖期の代謝に関わる分子をターゲットとしたものであり、休眠菌には無効であることが問題となっていた。休眠菌に有効な新規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 の発現により転写の調節が行われる分子を明らかにすることで、休眠期特異的な新規薬剤標的分子の同定が期待される。

1. De Voss JJ, et al: Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. J Bacteriol, 181 (15), p4443-51, 1999.
2. Saiga H, et al: Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar

- epithelium. *J Immunol*, 181 (12), p8521-7, 2008.
3. De Voss JJ, et al: The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (3), p1252-7, 2000.
 4. Cronje L, Bornman L: Iron overload and tuberculosis: a case for iron chelation therapy. *Int J Tuberc Lung Dis*, 9 (1) p2-9, 2005.
 5. Andrews SC: Iron storage in bacteria. *Adv Microb Physiol*, 40, p281-351, 1998.
 6. Takatsuka M, et al: A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. *PLoS One*, 6 (6), e20985, 2011.
 7. Via LE, et al: Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates. *Infect Immun*, 76 (6), p2333-40, 2008.
 8. Wayne LG: Dynamics of submerged growth of *Mycobacterium tuberculosis* under aerobic and microaerophilic conditions. *Am Rev Respir Dis*. 114 (4), p807-11, 1976.
 9. Salerno P, et al: One of the two genes encoding nucleoid-associated HU proteins in *Streptomyces coelicolor* is developmentally regulated and specifically involved in spore maturation. *J Bacteriol*, 191 (21), p6489-500, 2009.
 10. Niki M, et al: A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. *J Biol Chem*, 287 (33), p27743-52, 2012.

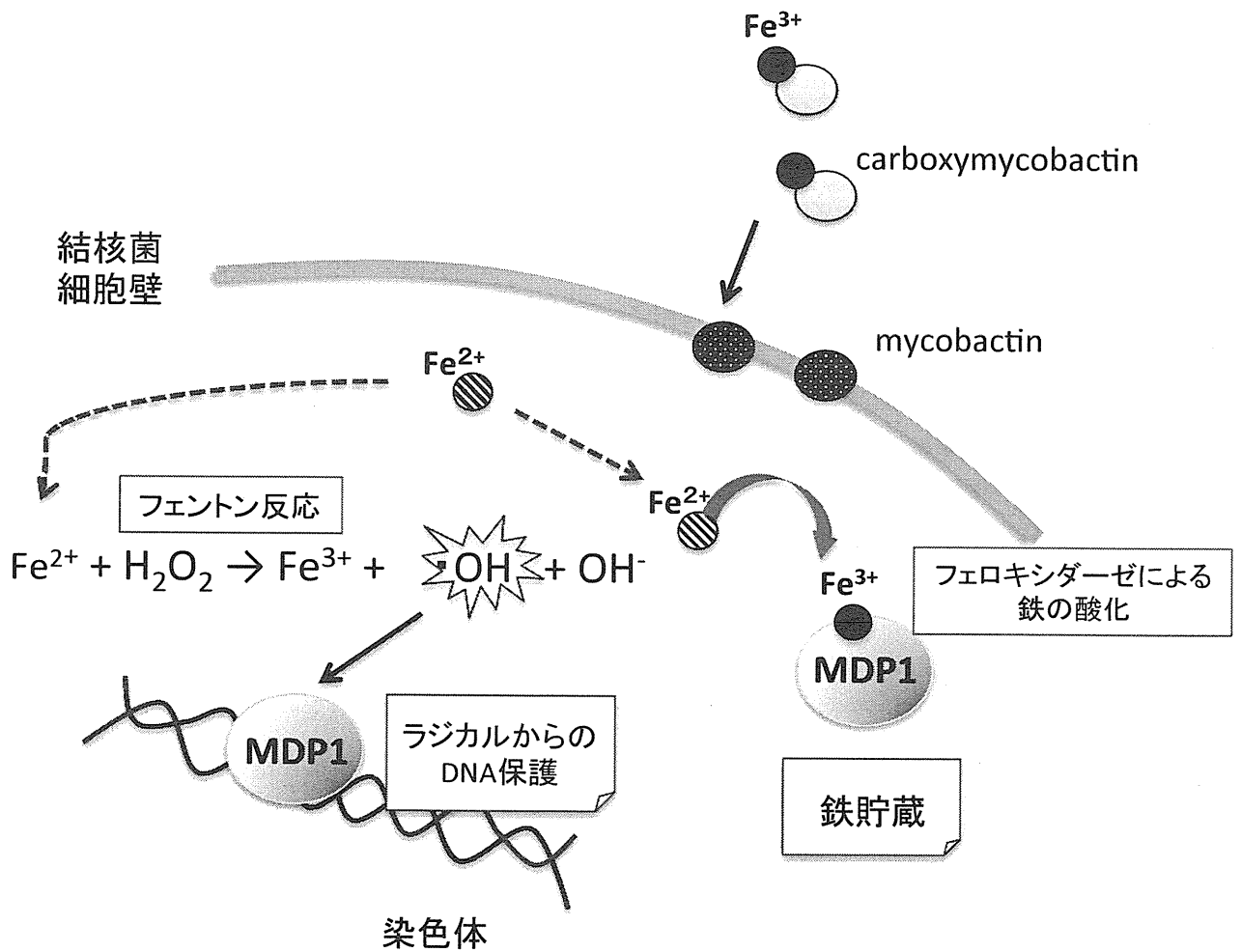


図1. 結核菌の鉄獲得および貯蔵機構。MDP1は鉄の貯蔵蛋白として機能するのみならず、フェントン反応により生じたラジカルからDNAを保護する機能を有する。

潜在性結核と結核菌の潜伏感染メカニズム

——結核菌の潜伏感染機構

Latent tuberculosis infection and the molecular mechanisms of persistence



松本 壮吉

Sohkiichi MATSUMOTO

大阪市立大学大学院医学研究科細菌学分野

◎結核菌は飛沫核感染によって肺を侵入門戸としてヒトに感染する。感染者の約5%が速やかに結核を発症するが、感染者の約95%が無症候感染が成立する。ヒト型結核菌はヒトによく適応した寄生病原体であり、感染成立後、免疫系は菌を生体から駆逐できない。無症候感染は潜在性結核と定義されるが、その理由は5~10%で内因性再燃による病気が生じるからである。結核菌はヒトを住み処とし、ときに発症によって住み処を拡大しながら有史前より今日まで種を継いできた。現在、無症候感染者は人類の1/3にのぼる。このような事実は病原体の源泉である潜在性結核の対処なしには結核を制圧できないことを意味しており、潜伏感染メカニズムの解明はそのよりどころとなる。潜伏菌は休眠と増殖のサイクルを繰り返し、単細胞生物でありながら長期間の生命維持を実現している。本稿では結核菌の潜伏感染のメカニズムについて、これまでの知見を概説する。



Key word : 結核, 潜伏感染, 休眠, 薬剤耐性, 潜在性結核, 内因性再燃

結核(症)の歴史と現状

結核は三大感染症(AIDS, 結核, マラリア)のひとつで、抗酸菌属に分類されるグラム陽性の桿菌 *Mycobacterium tuberculosis* を起因とする細菌性疾患である。2011年には年間880万人の新規発症者と140万人以上の死亡者が報告されているように、現在も人類に甚大な健康被害を招来する最大級の感染症である。

結核の痕跡としてもっとも古いものは、ドイツで発見された紀元前7000年ごろのミイラに残る脊椎カリエスであるが、結核菌の誕生はさらにさかのぼり最近のゲノム解析によると約5~10万年前のアフリカにおける人類の誕生と同時期に近縁菌より進化し、ヒトの移動に伴って、すくなくとも6派に分かれて世界に伝播したと推定されている^{1,2)}。この6派の結核菌のうち、日本を含むアジアを中心に定着しているのが北京型とよばれる菌

型で、高病原性で薬剤耐性化傾向が強いことが指摘されている。このように結核菌は有史前より人類の移動や繁栄に伴って世界に拡散したが、ヒト-ヒト間の水平感染により伝播するため、爆発的な蔓延が生じたのは人口の流入で都市が形成された産業革命以降である。ちなみに、1990~1999年の10年間には約8,800万人が結核を発症し、3,000万人が死亡したと推計されている。

結核菌の生活環, 潜在性結核と活動性結核

結核菌はヒトの寄生菌であるが、宿主の死に伴い感染菌も死滅してしまうことから、菌が子孫を継ぐには、発症し咳やくしゃみに伴う飛沫となって外界に排出され、あらたな感染宿主にふたたび感染しなければならない(図1)。実際の飛沫そのものでは気道で捕捉され、痰として排出されるため非感染性であるが、飛沫が乾燥して直径5μm

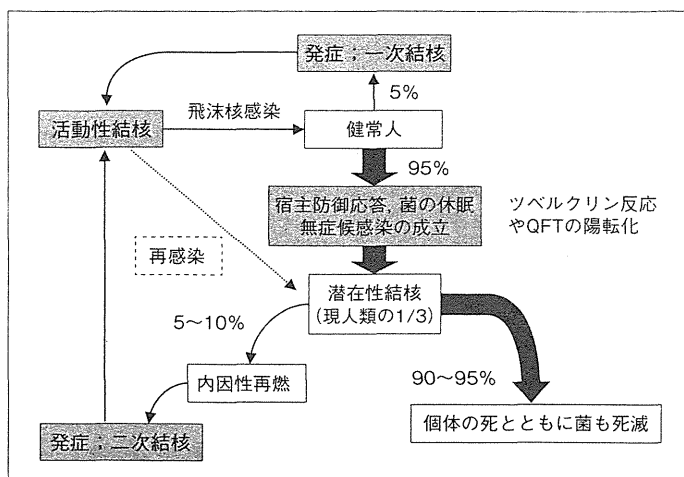


図1 結核菌の生活環と結核(症)

患者由来の飛沫が乾燥して感染粒子の飛沫核となり、健康人あるいは既感染者(再感染)の肺胞に到達する飛沫核感染で感染が成立する。このとき、感染者のおよそ5%が結核を発症するが、残る95%は宿主の防御応答によって発症を免れる。しかし、感染菌は生体から完全に排除されることはなく、増殖を停止して薬剤抵抗性となった休眠状態で持続感染し、無症候潜伏感染が継続する。休眠菌は一定の割合で再増殖し、5~10%の感染者が終生の間に内因性再燃による結核を発症することから、無症候性の結核菌感染は“潜在性結核”とよばれる。潜在性結核は現在、ツベルクリン試験あるいはクオンティフェロン(QFT)試験で診断されているが、現人類の1/3にのぼる。

ほどの飛沫核という粒子となり、これがヒトの肺胞内部まで到達して感染が成立する。肺の解剖学的形態により結核菌は右下葉に初感染しやすい。

感染に引き続いて起こる結核を一次結核とよび、感染者の約5%が発症する。一方、ほとんど(95%)の感染者は症状を現さないが、菌は生体から排除されず無症候キャリアとなる。この無症候感染者の5~10%が、生涯にかけて潜伏感染菌の再増殖、すなわち内因性再燃により結核を発症するため、無症候感染は“潜在性結核”と定義される。宿主の結核に対する抵抗力の低下は結核の再燃をさらに助長し、老化や糖尿病などの成人性疾患は先進国で、HIVの蔓延はとくに途上国で、それぞれ結核の再興を促している。

二次結核の病巣は初感染部位の下葉ではなく、右肺の上葉部に起こりやすい。この原因は、好気性である結核菌が酸素濃度の高い肺上部で増殖しやすいこと、さらに潜在菌が肺上葉の健常組織(マクロファージ、肺胞上皮細胞、線維芽細胞)に潜伏しているからと考えられる³⁾。現在、人類の1/3に及ぶ膨大な潜在性結核菌感染者の存在が推定されており、計算上、今後20年間で2億人が二次結核を発症し、6千万人が死亡すると予測されることから、結核を根本的に制御するには、活動性結核に加え、潜在性結核に対する対処法確立の重要性が指摘されている。

結核菌の休眠(dormant)現象

潜伏する結核菌はほとんど増殖せず、一部は代謝を停止した休眠(dormant)状態で潜伏感染している。マクロファージによる貪食や肉芽腫形成による局所的な酸素分圧の低下が菌の休眠を促すと考えられてきたが、実際に肉芽腫内は無酸素状態であることが酸素プローブによって昨今証明されている。低酸素下において結核菌は alpha-crystallin (Acr) とよばれる蛋白質を特異的に産生しており、現在 Acr は休眠のマーカーとして利用されている(図2)。

Wayneらは、結核菌が *in vitro* で緩やかに酸素欠乏状態に曝されることで低酸素環境に適応することを見出し^{4,5)}、Wayneモデルを考案した。Wayneモデルの休眠菌はAcrを産生し、一次選択薬であるイソニアジドに対し抵抗性を示す。著者らは、休眠期を含む静止期以降のイソニアジド耐性化の一因は結核菌のDNA結合性蛋白質“MDP1”によるイソニアジドの活性化酵素“KatG”の発現抑制であることを見出している⁶⁾。

Cornell大学のグループが1950年代に膨大な動物実験を行い、Cornellモデルとよばれる休眠-内因性再燃の系を考案した^{7,8)}。彼らは、結核菌感染マウスを30日間イソニアジドとピラジナミド(PZA)を投与することで組織内の菌が陰性化するが、90日後以降には薬剤感受性の結核菌による内因性再燃が認められることを見出した。この研究成果は、*in vitro* では殺菌性に乏しいPZAの効

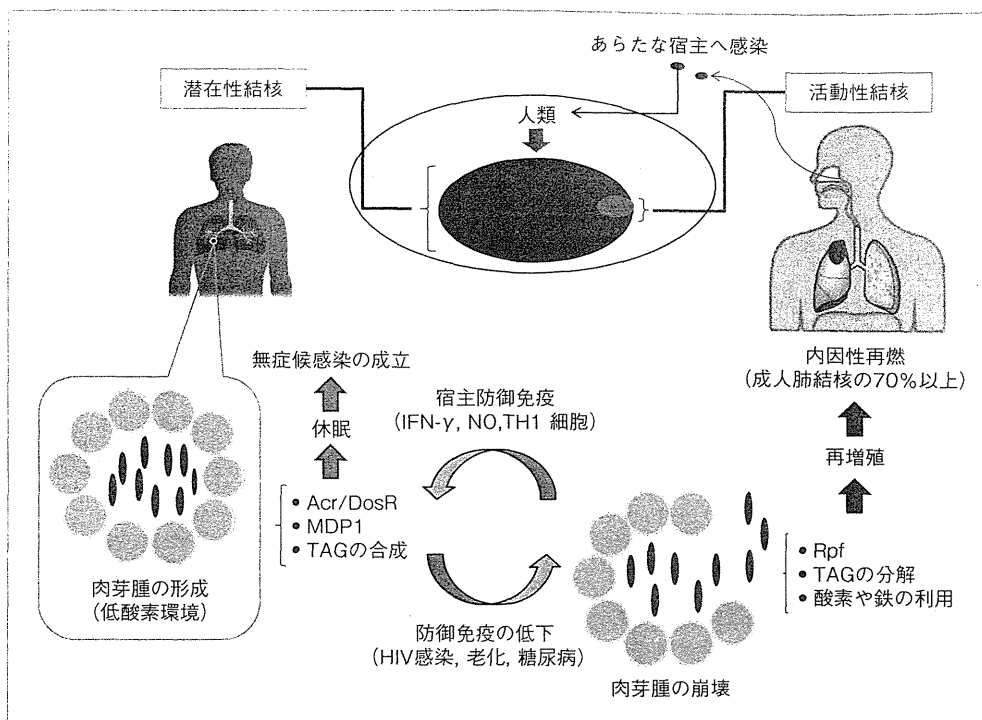


図 2 無症候感染の成立とその破綻

結核菌のすみかはヒトである。人類の1/3は無症候の結核菌感染者で(青, およそ1,600万人)している。宿主防御免疫の誘導により肉芽腫が形成され、低酸素環境が出現、菌はAcrやMDP1を発現し休眠期に移行、無症候感染が成立する。一方、防御免疫の低下は肉芽腫の崩壊を招き、Rpfによる細胞壁の部分分解をトリガーとして炭素源としてTAGを利用し菌は増殖を開始、これと進行すると内因性再燃が生じ結核が発症する(図作成者:大村いのり, 濱 智子)。

果を動物実験で証明し、PZAの臨床導入を促し今日の結核治療の短縮にも貢献した。

Cornellモデルを用いて、コルチゾンやNO阻害剤の投与⁹⁾が結核菌の内因性再燃を誘発することが示された。また、CD4陽性Tリンパ球やIFN- γ の除去も内因性再燃を引き起こした¹⁰⁾。

これらの報告から考察するに、結核菌の無症候感染は静的な現象ではなく、むしろ動的な平衡状態、すなわち一定の割合で菌は再増殖を行うが、防御免疫(CD4陽性Tリンパ球、IFN- γ 、NOなど)により休眠状態に戻されたり、一部は殺傷されることで潜伏感染が維持されていると推測できる(図2)。このことは休眠菌には効果を有さないイソニアジドが、潜在性結核の治療に一定の効果を表す理論的根拠ともいえよう。

潜在性結核と内因性再燃の分子機構

休眠のマーカーであるAcrは分子シャペロン

で、潜伏感染する菌体内部で蛋白質の変性を防いでいると思われる。Acrの遺伝子発現を調節する転写因子がDosRで、DosRの変異株はAcrを発現せず、Wayneの休眠モデルで死滅する¹¹⁾。したがって、AcrやDosRは休眠の維持に必須の分子と考えられる。

一方、休眠は長期の細胞生存に加え増殖の停止を伴うが、休眠時に増殖を抑制している分子は未同定であった。著者は遅発育状態の結核菌がもつとも大量に発現している蛋白質を同定し、それが抗酸菌特異的で核酸結合性を有することから、mycobacterial DNA-binding protein 1(MDP1)と名づけた(特許第4415200号)。MDP1は結核菌に必須の分子で休眠期に発現が上昇しているが、菌体内では核酸と50Sリボソームに結合し、複製、転写、翻訳をそれぞれ強く抑制して増殖を停止させる分子であることを明らかにした¹²⁾。MDP1は休眠菌の臨床的特徴であるイソニアジド

抵抗性を誘導する⁶⁾。また、真核細胞のフェリチン様活性、すなわち鉄の酸化と貯蔵活性を併せもち、菌の増殖に必要な鉄を貯蔵するとともに、酸素ラジカルの産生を回避してDNAの障害を防ぐ¹³⁾。MDP1の一部は結核菌の細胞壁にも存在し、細胞壁合成を抑制したり¹⁴⁾、潜伏細胞への侵入¹⁵⁾を促す。これらの機能から、MDP1が休眠期の増殖停止や生命維持に重要な分子であることが推定される(図2)。

DosRやMDP1による遺伝子の発現調節が休眠の鍵であるとするれば、内因性再燃を促す分子は何であろうか。*Micrococcus luteus*で見出された休眠菌の再増殖を惹起する蛋白質 resuscitation-promoting factor (Rpf)が結核菌の再増殖を促すことが証明され、驚いたことに結核菌ゲノムにはRpf様蛋白質が5種類コードされていた¹⁶⁾。Rpfはリゾチーム様の構造をとることから、Rpfによる細胞壁のペプチドグリカンあるいはその類似構造の切断が再増殖を促すと推測されている¹⁷⁾。実際にRpfを欠失させると、Cornallモデルにおいて結核菌の内因性再燃の遅延が認められている¹⁶⁾。細胞壁の部分的な分解がどのように菌の増殖につながるのかは今後の検討課題であるが、Rpfの発現が結核再燃のマーカーとなるかもしれない(図2)。

一方、結核菌は増殖時にグリセロールやヒアルロン酸などを炭素源として利用する¹⁸⁾、潜伏感染時には脂肪酸をおもに利用することが知られている¹⁹⁾。実際のヒトにおける潜伏感染において、結核菌は脂肪滴豊富な環境に潜み、菌体内にも脂肪酸をトリアシルグリセロール(TAG)として蓄えていて²⁰⁾、再燃時にそれを分解して増殖に利用する²¹⁾(図2)。このような事実は、脂肪酸代謝酵素²²⁾やTAGの合成酵素および分解酵素²¹⁾が潜在性結核に対する有望な薬剤標的であることを示唆している。

類の1/3に寄生している菌が結核の病原体の源泉である。したがって、活動性結核に加え、潜在性結核に対処することが結核の制圧につながることから、結核菌が巧みにヒトに寄生するメカニズムの解明は潜在性結核対策のよりどころとなるであろう。また、休眠現象という、増殖を伴わない長期の細胞生存の仕組みに生物共通のものがあるのであれば、それはヒトの長寿のヒントとなるかもしれない。寄生菌としてヒトと共進化を遂げてきた結核菌の生存戦略の基礎的解明が病原体のアクセシブルな感染制御法の構築につながることを期待したい。

文献

- 1) Hershberg, R. et al.: *PLoS Biol.*, **6**: e311, 2008.
- 2) Gutierrez, M. C. et al.: *PLoS Pathog.*, **1**: e5, 2005.
- 3) Hernandez-Pando, R. et al.: *Lancet*, **356**: 2133, 2000.
- 4) Wayne, L. G. and Hayes, L. G.: *Infect. Immun.*, **64**: 2062, 1996.
- 5) Wayne, L. G. and Sohaskey, C. D.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **55**: 139, 2001.
- 6) Niki, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **287**: 27743, 2012.
- 7) McCune, R. M. Jr. et al.: *J. Exp. Med.*, **104**: 763, 1956.
- 8) McCune, R. M. Jr. and Tompsett, R.: *J. Exp. Med.*, **104**: 737, 1956.
- 9) Voskuil, M. I. et al.: *J. Exp. Med.*, **198**: 705, 2003.
- 10) Shi, L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 241, 2003.
- 11) Boon, C. and Dick, T.: *J. Bacteriol.*, **184**: 6760, 2002.
- 12) Matsumoto, S. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **182**: 297, 2000.
- 13) Takatsuka, M. et al.: *PLoS One*, **6**: e20985, 2011.
- 14) Katsube, T. et al.: *J. Bacteriol.*, **189**: 8241, 2007.
- 15) Aoki, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **279**: 39798, 2004.
- 16) Tufariello, J. M. et al.: *Infect. Immun.*, **74**: 2985, 2006.
- 17) Cohen-Gonsaud, M. et al.: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**: 270, 2005.
- 18) Hirayama, Y. et al.: *PLoS Pathog.*, **5**: e1000643, 2009.
- 19) Bloch, H. and Segal, W.: *J. Bacteriol.*, **72**: 132, 1956.
- 20) Daniel, J. et al.: *PLoS Pathog.*, **7**: e1002093, 2011.
- 21) Low, K. L. et al.: *J. Bacteriol.*, **191**: 5037, 2009.
- 22) Munoz-Elias, E. J. and McKinney, J. D.: *Nat. Med.*, **11**: 638, 2005.

おわりに—結核と結核菌の生物学、および潜在性結核対策の重要性

結核菌はヒトに特化した寄生病原体であり、人

* * *

抗酸菌の休眠現象や薬剤抵抗性に関わる分子メカニズム — 抗酸菌の休眠と薬剤耐性機構 —

松本 壮吉*

新潟大学大学院医歯学総合研究科細菌学分野 教授

[受付・掲載決定：2013年10月1日]

キーワード：鉄、休眠、薬剤耐性、潜在性結核、内因性再燃

はじめに

一般に細菌は、適切な環境下で可及的迅速に分裂して繁殖する進化をとげたが、抗酸菌など一部の細菌は、例外的に緩慢に増殖する。自然環境下での生存に不利であるが、寄生には宿主との共存に有利である。抗酸菌は、静止期以降に休眠 (dormant) 期へと移行し、増殖を停止した後も生存し、自身と宿主双方の生存を保証しているようにみえる。

潜伏感染対策の重要性

無症候の潜伏感染対策は、結核対策上重要である。結核の治療は、複数薬の投与で現在すくなくとも6ヶ月を要するが、これは発症時にも一定の割合で菌が静止期や休眠期に移行し薬剤抵抗性となることが原因である。一方、人類の1/3が、無症候感染者であるが、その5-10%が終生の間に内因性再燃により発症することから、無症候性感染は現在、潜在性結核とよばれる。結核菌の住み処はヒトであるから、活動性結核と潜在性結核の双方に対処するこ

とが根本的な対策となる。そのためには、休眠と増殖の制御を知り、発症を抑止するワクチンや潜在期にも効果のある薬剤の開発につなげる必要がある。

潜伏する休眠菌の性質と MDP1 の同定

潜伏菌は、肉芽腫内部で低酸素状態に曝される結果、休眠期に移行する¹⁾。Barry等は低酸素状態での蛋白質発現を解析し、 α クリスタリン様の蛋白質 (Acr) が顕著に発現誘導されることを見いだした²⁾。このAcrが現在、休眠マーカーとして利用されている。Acrは、分子シャペロンでHspXともよばれ、休眠菌内部で蛋白質の変性を防いでいると推測される。

私は、Acrを発現しているBCGの菌体蛋白質を解析し、大量に発現している蛋白質が、DNA結合性で抗酸菌に普遍的に存在する分子であることを見いだした。この蛋白質をmycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) と名付けたが (物質特許、特願平11-22588³⁾)、MDP1は、大腸菌の核酸結合性蛋白質HU様のN末端領域と、ヒトを含む哺乳類のヒストンH1蛋白質様のC末端領域とからなるヒストン様蛋白質で、菌体内では核酸と50Sリボゾームに結合しており、一部は細胞壁にも存在する⁴⁾。MDP1を精製し、生体高分子合成に対する作用を検討した結果、転写、翻訳、複製、糖脂質合成のいずれも抑制することが分かった^{5,6)}。

*Corresponding author:

新潟大学医学部医学科 細菌学講座
〒951-8510 新潟県新潟市中央区旭町通一番町 757
TEL: 025-227-2050 FAX: 025-227-0762
E-mail: sohkich@med.niigata-u.ac.jp

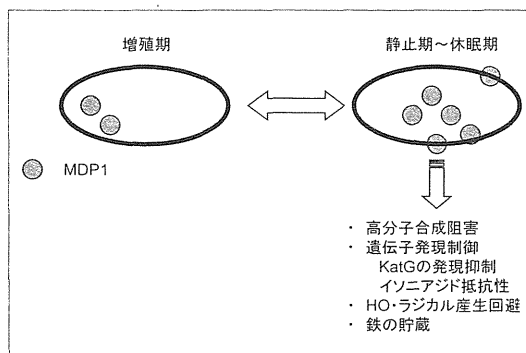
高分子合成と増殖の抑制

MDP1 の転写および複製阻害は、核酸の競合阻害により減弱することから、核酸結合性に依存している。合成ペプチドを用いた解析から 31-50 のアミノ酸領域に強い DNA 結合性があることが分かり、アミノ酸置換により結合モチーフを TlxxAVxxGxx-VTlxxFxxx (x は置換可能なアミノ酸) と決定した⁷⁾。この配列は、MDP1 に特異的であり、近縁の *Actinomyces* や *Nocardia* を除く他の生物の核酸結合性蛋白質には存在しない。MDP1 はヒストン様蛋白質の一種であるが、一般のヒストン様蛋白質と異なり GC 豊富領域に結合する。MDP1 は結核菌のような遅発育性抗酸菌で必須で、遺伝子の喪失が著しいらい菌でも保存されている

次に MDP1 を大腸菌や速育型の抗酸菌である *Mycobacterium smegmatis*、さらに遅発育型の抗酸菌 BCG に発現させると、それぞれ菌の増殖を抑制することが分かった。MDP1 は結核菌の生存自体に必須で、欠失株の作成は不可能である。しかしドイツのグループは、アンチセンスを用いて MDP1 の発現を限定的に抑制すると、BCG の増殖が促進されることや、休眠期において蛋白質の発現と糖脂質の合成に大きな変化が認められることを報告している⁸⁾。一方、速育型の *M. smegmatis* において MDP1 の発現量は結核菌など遅発育型抗酸菌比べて低く、静止期移行に発現が上昇する。*M. smegmatis* では MDP1 を欠失可能であり、欠失株は培地の条件に制限されるが、野生株に比べ定常期以降、速やかに死滅していく。これらの成績から、MDP1 は抗酸菌の遅発育性自体や菌の休眠導入/維持に関わる分子であることがわかる (図参照)。

ラジカル産生の回避と鉄の貯蔵

休眠菌は増殖を停止した後も、菌の生命維持を担うしくみがある。私たちは最近、MDP1 自体にも、そのような活性があることを見いだした。高塚や岡等は、MDP1 に 2 価の鉄を 3 価に酸化する酵素活性、すなわちフェロキシダーゼ活性を有することを発見した⁹⁾。結核菌やライ菌をはじめ、好気性菌は鉄を電子のアクセプターに使用するが、酸素呼



抗酸菌の増殖制御や薬剤抵抗性に関わる MDP1 の活性

MDP1 は、抗酸菌のヒストン様蛋白質³⁾ で、静止期から休眠期で発現量が上昇し高分子合成を抑制して増殖の停止に関わり^{5,6)}、KatG の発現抑制を介したイソニアジド抵抗性の付与¹⁰⁾、鉄を酸化してヒドロキシラジカル・OH 産生を回避し、生命維持や増殖に必須の鉄を貯蔵するなど、潜在期における抗酸菌の生命維持に関わる活性を有する⁹⁾。

吸の結果、必然的に生じるスーパーオキシドを解毒する過程で、過酸化水素が発生する。この過酸化水素と 2 価の鉄が共存すると、フェントン反応が生じ、最も生物に偽害性の高いヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) が発生する。フェロキシダーゼは、2 価の鉄を酸化することで、このフェントン反応を回避する。MDP1 にはそのフェロキシダーゼ活性がある。また、MDP1 は 1 分子あたり 139 ± 36 もの酸化した鉄を貯蔵することができた。鉄は菌の生存に必須の金属であり、抗酸菌の病原性にも欠かせないが、MDP1 は遺伝子発現の制御に依存せず、直接に鉄代謝をコントロールして、DNA など生体物質の保護や、休眠期の生命維持および発症時の増殖を支えていると考えられる。

イソニアジド抵抗性の付与

イソニアジド抵抗性は、休眠菌の主要な表現型であり、临床上、最も問題となる形質であるが、仁木等は最近、MDP1 が遺伝子発現の制御を介して、静止期以降の抗酸菌のイソニアジド抵抗性に関与をすることを見いだした¹⁰⁾。イソニアジドはプロドラッグで、結核菌内でカタラーゼ “KatG” によって活性化される。MDP1 はこの KatG の発現を抑制して、