結核菌の潜伏感染と宿主細胞接着・侵入の分子機序 ; 分子標的療法の開発を目指して

松 本 壮 吉

大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学分野
〒 545-8585 大阪府大阪市阿倍野区旭町 1-4-3

[受理 : 2006 年 6 月]

結核菌は人類の 1/3 に潜伏感染しており、時に内因性再燃を引き起こす。成人の肺結核の多くがこの機序で発症し、現在、年間約 200 万人の命が失われている。潜伏感染菌は通常休眠することで、菌と宿主双方の生存を確保し、且つ薬剤抵抗性を獲得する。結核菌はヒトを住処としており、ヒト以外の生物や自然環境下での生存は難しい。したがって潜伏感染菌の根絶は根本的な結核対策となる。潜伏感染菌対策を講じるために休眠機構を解かなければならない。細胞を凍らすように菌の代謝を生理的温度下においていかに抑制するのか？休眠機構は“謎”に包まれていたが、我々は菌の増殖を停止させる分子 MDP1 を同定した。加えて MDP1 が接着分子として菌の潜伏感染細胞への接着／侵入を促すことを明らかにした。MDP1 の活性を中心として、接着分子を標的とした新しい治療／予防法開発の可能性を紹介する。

結核（症）の現状

世界保健機関の統計によると、2004 年には、891 万 8 千人が新たに結核に罹患し、169 万 3 千人（AIDS 結核を除く）が死亡した。国内でも 29,736 人が新たに患者として登録され、2,328 人が死亡している。結核は現在も、世界／国内ともに最大の細菌性感染症である。

現行ワクチン BCG は、小児の結核性髄膜炎や粟粒結核に対し 80% 程度の発症阻止を示すが、成人の肺結核に対する効果は充分でない。また、HIV 感染に伴う BCG の病原性回帰の問題もあり、BCG 接種は縮小傾向にある。日本においても 2005 年 4 月に結核予防法の改訂が行われ、小、中学生へのツベルクリン反応試験と BCG の再接種は中止された。

一方、化学療法薬に関しては、一次選択薬であるイソニアジドとリファンピシン抵抗性の多剤耐性結核菌が出現し

治療を困難にしている (1)。さらに休眠菌は既存の化学療法薬の標的代謝を停止しているため、潜伏感染する菌を駆逐することは現在、不可能である (2)。このように予防／治療いづれに関しても結核を取り巻く状況は厳しく、BCG を凌駕する新しいワクチンや薬剤の開発が必要とされている。

結核の発症 ; 潜伏感染と内因性再燃

結核菌は抗酸菌属に分類されるグラム陽性の桿菌である。生体内での増殖性に優り、実験的にはマウスやモルモットに経気道的に感染し簡単に動物を死に至らしめる。自然宿主のヒトにおいては、初感染で発病するケースは 5% 以下と稀であるが、感染した菌は免疫応答に屈することなく生体内で生存し続ける (図 1 参照) (1)。このように長期間潜伏感染する菌をパーシスターと呼ぶ。パーシスターの多くは休眠 (dormancy) 菌で、通常は病原性を発揮しないが、宿主の抵抗性の低下に伴って再び増殖を開始し結核を発症させる (図 1, 2 参照)。成人の肺結核の多くは内因性再燃の結果であり、感染者の 5-10% が終生の間に病気を発症する (1)。現在、20 億人に結核菌が感染しており、今後 20 年間で 2 億人が発病、6 千万人が死亡すると予測されている。

Sohkichi MATSUMOTO

Molecular mechanisms of persistent infection and adherence/entry to host cells with *Mycobacterium tuberculosis* for the development of a novel therapeutic and prophylactic intervention

Department of Host Defense, Osaka City University Graduate School of Medicine, 1-4-3 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan

図1. 結核菌の生活環と結核の発病
結核患者の痰の飛沫が結核菌を含む直径 5 μm ほどの飛沫核となり、それをヒトが吸い込むことで感染が成立する。ただちに発症する一次結核は5%未満であり、殆どが不顕性の経過をたどる。菌は生体内で増殖を停止（休眠）し潜伏感染が成立する。現在、世界人口の約 1/3 に結核菌が潜んでいる。既感染人のうち 5-10% が終生の間に結核を発病する。これを二次結核と呼び、成人の肺結核の多くは二次結核である。

潜伏感染菌の駆逐は根本的な結核対策である

潜伏感染菌の駆逐は根本的な結核対策に繋がる。なぜならば、ヒト型結核菌の自然宿主はヒトであり、菌の生存はヒト以外の生体や自然環境下で困難であるからだ。結核菌の休眠は、長期の潜伏感染を可能にし、代謝抑制により現行の抗結核薬に対する抵抗性を付与する (2)。したがって休眠機構の解明は、結核対策上、極めて重要である。

細胞内で菌は低酸素状態に曝され、その結果、休眠が促される (2)。Barry 等は低酸素状態での蛋白質発現プロファイル解析し、 α クリスタリン様の蛋白質 (Acr) が顕著に

誘導されることを見いだした (3)。この Acr が現在、結核菌の休眠マーカーとして利用されている。Acr は、眼球レンズの曇りをとる蛋白質と相同性を有する分子、すなわち分子シャペロンであり、休眠菌内部で蛋白質の変性を防いでいると推測される。

細菌の増殖を停止させる分子の同定

実際に休眠を誘導する、すなわち増殖を抑制する分子は明らかにされていなかった。私たちはそれを知るために、Acr を発現している牛型結核菌の弱毒株である BCG の菌体蛋白質を解析し、最も大量に発現している蛋白質を同定した (図 2, 3A 参照)。抗酸菌特異的に普遍的に存在する分子で、DNA 結合性蛋白質であることから (図 3B 参照) mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) と名付けた (物質特許, 特願平 11-22588) (4)。MDP1 の N 末端領域は大腸菌の核酸結合性蛋白質 HU と、C 末端領域はヒトを含む哺乳類のヒストン H1 蛋白質と部分的相同性を有し、菌体内で核酸と 50S リボソームに結合していた (図 4 参照)。

増殖には、酵素の発現と DNA 合成が必須である。そこで RNA 合成、蛋白質合成 (図 5A, B 参照)、さらに DNA 合成に対する MDP1 の作用を、試験管内の高分子合成系を用いて検討した。その結果、MDP1 は転写、翻訳、複製いずれも強く抑制することが分かった (5)。

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核酸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 $\text{TIxxAVxxGxxVTIxxFxxx}$ (x は置換可能なアミノ酸) と決定した (6)。この配列は、MDP1 に特異的であり、その他の生物の持つ核酸結合性蛋白質には存在しない。抗酸菌はグアニンとシトシンに富む GC-rich なゲノムを有するが、このモチーフ配列はグアニンとシトシンを介して核酸と結

図2. 作業モデル；潜伏感染と内因性再燃における MDP1 の役割

肺に侵入した結核菌に対し宿主（ヒト）が反応する。休眠誘導シグナルは低酸素や結核菌殺傷分子の NO ラジカル等と推測されており、MDP1 の発現／活性化が促される。MDP1 は菌の高分子合成を抑制して菌は休眠し、自身（菌）と宿主（ヒト）の生存が保証される。休眠菌はまた、擬似的な薬剤抵抗性を獲得している。菌体表面の MDP1 は細胞への侵入を促し、潜伏感染の場を確保する。内因性再燃の場合は逆に MDP1 の不活化が生じ、菌は増殖して二次結核を引き起こす。

図3. MDP1 の発現と DNA 結合性

- A. 結核菌の菌体蛋白質 (Lysate) を SDS-PAGE ゲル電気泳動により解析した。M はマーカー。矢印で示した最も濃い蛋白質バンドが MDP1。
- B. MDP1 の核酸結合性を DNA のゲル電気泳動にて検討した。M はマーカー DNA。環状 DNA を流すと、0 レーンのように二つのバンドに分かれて泳動される。MDP1 を様々な濃度 (20, 10, 5, 2.5 μM) で加えると DNA に結合し DNA の移動度が変化する (矢印)。MDP1 はスーパーコイル DNA (下の DNA バンド) に結合しやすい (矢頭)。

合する。そして MDP1 と同様に RNA 合成と DNA 合成を阻害する。これらの結果から、31-50 領域が MDP1 の主要な DNA 結合領域であり、転写／複製阻害を担う活性部位であると推測された (6)。

一方、MDP1 の蛋白質合成阻害は、核酸結合性は有するがリボゾーム結合性を消失した MDP1 では認められないことから、核酸結合性でなく、リボゾーム結合性に依存する。

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 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 (図 5C 参照)。MDP1 は結核菌では生存自体に必須と推測されており (7)、通常の方法では欠失株の作成は不可能である。しかし、速育型の *M. smegmatis* では、欠失可能でありその表現型を調べると、MDP1 欠失株は野生株に比べ定常期以降、速やかに死滅していく。このことは、MDP1 が休眠期を含め定常

期以降の生存に必須であることを示唆する。

MDP1 は結核菌細胞壁にも存在する

MDP1 の局在を生化学的解析と特異抗体を用いた免疫電顕法 (図 4B 参照) により検討した結果、一部は細胞壁にも存在していることを見いだした (4, 8)。MDP1 はシグナル配列を有さず、積極的に分泌されるとは当時考えにくかったため、この現象の解釈に戸惑っていた。

しかしながら、いくつかの核内蛋白質が細胞表面に分泌され、細胞内と異なった役割を担う例が報告されていた。たとえば MDP1 の C 末端領域と部分的相同性を有するヒストン H1 が、甲状腺ホルモンのレセプターとして作用したり (9)、HMGB1 と呼ばれる核酸結合性の核蛋白質が、細胞外では炎症のトリガーとして働き、恒常性の維持を行うという (10)。さらに同じ抗酸菌属である *Mycobacterium leprae* (末梢神経に感染しハンセン病をおこす病原体) の神経細胞への侵入を解析していた Rambukkana のグループが、*M. leprae* は神経細胞のラミニンを介して接着／侵入することを示し、さらに *M. leprae* 表面の 21 kDa ラミニン結合性蛋白質 *M. leprae* laminin-binding protein predicts a 21-kDa molecule (ML-LBP21) が、それを担う菌体分子であることを明らかにした (11) が、ML-LBP21 は、実は結核菌の MDP1 に相当する分子であった。

MDP1 は細胞外マトリックス成分に結合する

結核菌はマクロファージ以外に、肺胞上皮細胞や線維芽細胞に潜伏感染している。これらの非貪食性細胞は、マクロファージに比べ殺菌活性に乏しく、内因性再燃を引き起こす菌の主要な潜伏細胞である (12, 13)。非貪食性細胞への接着／侵入は細胞表面のグリコサミノグリカンを経由して行われ、(グリコサミノグリカンの一種である) ヘパリンにより競合的に阻害されることを、Mennozi 等が示した (14)。彼等はヘパリン結合性の接着分子を BCG から精製して同定し、これを heparin-binding hemagglutinin (HBHA) と名付けたが、(14) 後に HBHA は C 末端部に PAKK の繰り返し配列を 4 領域有し、この領域がヘパリン結合部位である

図4. MDP1 の構造と局在

- A. MDP1 の構造。結核菌の MDP1 は 215 アミノ酸からなる。31-50 の領域はグアニンとシトシンを介して核酸に結合する領域で MDP1 に特異的な配列であり、転写や複製の阻害活性を有する。
- B. MDP1 の免疫電顕法にて確認したもの。細胞内、外に MDP1 の存在を示すコロイドが観察される。

- 図 5. MDP1 は転写／翻訳を阻害し、菌の増殖を抑制する
- A. MDP1 による RNA 合成阻害。縦軸は、RNA の合成量を ³H-dUTP の取り込み量で表している。MDP1 を 20, 10, 5, 2.5, 1.25 および 0 μM それぞれ加えた。RNA 合成酵素は T7 フェージ由来のものを用いた。
- B. MDP1 による蛋白質合成阻害。縦軸は、蛋白質合成量を ³⁵S-メチオニンの取り込み量で表している。大腸菌リボソームとフェージ RNA を鋳型に蛋白質合成を行った。
- C. BCG 由来の MDP1 を発現した *M. smegmatis* (MDP1+) を寒天培地にて増殖させたもの。コントロール (左) に比べ、増殖が顕著に抑制されている。

と推測した (15)。興味深いことに、MDP1 の C 末端部にも 6 箇所の PAKK の繰り返し配列が認められた。さらに DNA 結合性蛋白質は、構造類似性からヘパリン結合性を有することが多い。これらの事実から我々は、結核菌細胞壁の MDP1 がグリコサミノグリカンと結合し、非貪食性細胞への接着／侵入に関わるのではないかと考えた。

仮説を検証するためヘパリンカラムを用いて試験的な検討を行うと、MDP1 がヘパリン結合性を有することが確認された。次に、BIAcore バイオセンサーを用いて、結合性を詳細に解析した。Mennozi 等は、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、デキストラン硫酸が、結核菌の上皮細胞への接着／侵入を抑制するが、デキストラン、マンノース、ガラクトースにその活性がないことを報告した (14)。そこで MDP1 とこれらの糖類との結合性を検討した結果、MDP1 は、コンドロイチン硫酸 A および B、ヘパリン (図 6 参照)、デキストラン硫酸には結合するが、デキストラン、マンノース、ガラクトースには結合しないことが分かった。つまり細胞に対する MDP1 と結核菌の結合性は全く一致することが分かった。我々は更に、結核菌道上に実際に多く存在するグリコサミノグリカンである、ヘパラン硫酸やヒ

図 6. MDP1 はヘパリンに結合する
MDP1 をチップに固相化し、100 秒後から 2 分間ヘパリンを様々な濃度で加え、結合を BIAcore バイオセンサーにてモニターした。

アルロン酸との結合性を検討し、MDP1 がそのいずれにも結合することを見いだした。

MDP1 は DNA 結合領域により グリコサミノグリカンと結合する

一定分子量の標品が得られ結合定数測定可能なヘパリン (図 6 参照) とヘパラン硫酸を用いて、MDP1 の結合力を測定した結果、それぞれ、 3.53×10^{-10} , 1.54×10^{-8} M の結合定数であることが分かった。これは抗原抗体反応に匹敵する結合力であり、また、MDP1 は HBHA の結合力を 100 倍以上上回ることが判明した。この結合力の違いから、MDP1 が HBHA と同様に PAKK 配列のみでグリコサミノグリカンと結合しているとは考えにくく、我々は MDP1 の全アミノ酸配列をカバーする合成ペプチドを用いて結合部位を解析した。その結果、PAKK 配列よりも、MDP1 に特異的な核酸結合部位 (31-50 領域) に強い活性があることを突き止めた (8)。

MDP1 はヒアルロン酸を介して A549 ヒト II 型肺胞上皮細胞に結合する

MDP1 を蛍光色素で標識し、ヒト II 型肺胞上皮細胞株 A549 細胞への結合性を検討した。0.5 μM の濃度で MDP1 を加えると素早く結合し、60 分後には殆どの細胞が MDP1 陽性を示したことから、実際に MDP1 が肺胞上皮細胞に結合することが明らかとなった。次に MDP1 の細胞接着がグリコサミノグリカンへの結合依存的であるかを分解酵素で処理することで試験すると、ヒアルロン酸分解酵素処理で特異的に解除されることから (図 7 参照)、細胞表面の標的はヒアルロン酸であることが判明した。

感染におけるヒアルロン酸の重要性

ヒアルロン酸が実際に、結核菌の接着／侵入に関わるかを、試験管内の培養細胞系とマウスを用いて検討した。A549 ヒト肺胞上皮細胞への結核菌の接着／侵入は、ヒアルロン酸で競合的に抑制され、抗 MDP1 抗体もヒアルロン酸には及ばないが、一定の抑制効果を示した。このことは、ヒアルロン酸-MDP1 結合が肺胞上皮細胞への菌の接着／

図 7. MDP1 はヒアルロン酸依存的に A549 肺上皮細胞に結合する
 蛍光色素で標識した BSA (a, コントロール) と MDP1 (b および c) を A549 細胞に加え、蛍光陽性細胞を FACSscan で検出した。MDP1 は細胞に結合するが (b), 細胞をヒアルロン酸分解酵素で処理することにより結合は解除される。

侵入に関わることを示唆する。次に、マウスの肺に経気道的に BCG を感染させ、ヒアルロン酸の有無で定着率に差があるか検討した所、ヒアルロン酸が菌の肺内定着を競合的に抑制することが分かった (図 8 参照)。また同様の系で、抗 MDP1 抗体も一定の抑制効果を示した。以上の結果から動物感染レベルにおいても MDP1- ヒアルロン酸結合が、菌の感染に重要な役割を果たすことが判明した。

肺におけるヒアルロン酸の役割と結核

結核におけるヒアルロン酸の重要性はこれまで指摘されたことはなかった。ヒアルロン酸は、D-N- アセチルグルコサミンと D- グルクロン酸が交互に結合した直鎖状の高分子多糖である。肺実質の細胞外マトリックスの主要成分で肺組織の形成に関わりと同時に、粘膜下腺の漿液細胞から気道内に分泌される。肺から気道にかけては、粘膜繊毛装置により粘液は終止口蓋にむけて移動し感染や汚染を防いでいる。分泌されたヒアルロン酸は、気道表面に存在する

図 8. ヒアルロン酸の気道内注入は、BCG の感染を抑制する
 1×10^6 集落形成単位の BCG のみ (C) もしくはヒアルロン酸と共に (+HA), C57BL/6 マウスの気道内に注入した。二週間後の肺における集落形成単位 (CFU) を、7H11 寒天培地で菌を培養後、算出した。○および●, 各マウスの集落形成単位を示す。横線は各群の平均値を示す。

ヒアルロン酸レセプター (RHAMM) に結合して留まり、リゾチームなどの抗菌物質を粘膜繊毛装置に逆らって特異的に繫留させることで気道の無菌化に重要な役割を果たす (16)。一方、肺胞内粘液中にもヒアルロン酸は存在し、CD44 レセプターを介して肺胞マクロファージに捕食される (17)。つまり、結核菌が感染する気道系内腔表面はヒアルロン酸が豊富に存在し、菌がヒアルロン酸を利用するということは、極めて理にかなっている。我々は、ヒアルロン酸の結核における役割を継続的に解析しており、細胞感染後は結核菌の増殖がヒアルロン酸の存在で加速されることを見だしている。ヒアルロン酸は菌の侵入サイトとしてのみならず、結核の病態形成において重要な役割を担っているようだ。

DNA が MDP1 の抗原性を増強する

MDP1 が菌体表面に接着分子として作用し、病態の形成に関わるのであれば、MDP1 の機能を抑制することが予防や治療に繋がる可能性がある。我々はワクチン開発を想定して MDP1 の抗原性についての検討を始めた。まず MDP1 と BCG を C3H/HeJ マウスに投与し、抗 MDP1 抗体の産生を検討した。そうすると BCG 投与はマウスに MDP1 抗体を産生させるが、精製した MDP1 投与では殆ど産生誘導能がないという奇妙な現象に遭遇した (図 9 参照) (18)。

細菌の DNA にアジュバント活性があることを徳永、山本等が発見し (19, 20), 2000 年にその活性は審良等により TLR9 レセプターを介した細胞の活性化であることが示された (21)。MDP1 の多くは菌体内で DNA と結合している。そこで我々は、DNA の抗 MDP1 抗体産生に対する影響を検討した。MDP1 に結核菌のゲノム DNA を混合してマウスに免疫すると、顕著に抗 MDP1 抗体の産生を誘導することが分かった。混合する DNA の量を検討した結果、5 μ g の MDP1 をマウスに投与する際に、5–50 ng の量で十分な賦活活性が見られた。このような、少量の DNA による抗

図 9. DNA による抗 MDP1 抗体の産生増強
 精製 MDP1 を PVDF 膜に転写後、各種マウス抗血清と反応させた。免疫抗原; BCG (BCG), MDP1 単独 (MDP1), 結核菌 DNA (DNA), MDP1-DNA 複合体 (MDP1+DNA)。

図 10. MDP1 は CpG- オリゴ DNA の免疫賦活作用を増強する
C57BL/6 マウス (WT) および TLR9 欠失 (TLR9KO) マウス由来脾臓細胞を試験管内で培養しグラフ下に示した抗原で刺激し、培養液中に産生される TNF-alpha および IL-6 の量を ELISA 法で測定した。

体産生増強の活性は、試験した他の蛋白質に対しては認められず、MDP1 にユニークな現象と考えられた (18)。逆に MDP1 の DNA の免疫賦活作用に対する MDP1 の効果を検討した結果、MDP1 は TLR9 依存的なサイトカイン産生を惹起することが判明した (図 10 参照) (18)。このことから MDP1-DNA 複合体の強い抗原性は、MDP1 と DNA の相乗的な活性増強による結果と推測される。

MDP1 は結核防御免疫を誘導する

次に我々は、MDP1 の免疫により実際に防御免疫が誘導されるかを検討した。MDP1, MDP1-DNA 複合体、陽性コントロールとして BCG でマウスを免疫し、結核菌クロノ株を感染させた。その結果、BCG の効果には及ばないが、MDP1-DNA 複合体で免疫したときのみ有意に結核菌の肺内増殖を抑制することが分かった (図 11 参照) (18)。

菌の細胞侵入阻害による新しい予防／治療法開発の可能性

前述のように、結核菌はグリコサミノグリカン足を十分に有する細胞である肺胞上皮細胞のような非貪食性の細胞に侵入する。この際の菌側の接着分子は、HBHA であり (14)我々が明らかにした MDP1 である (8)。MDP1 は結核菌細胞壁に強く結合しており、結合力も HBHA に勝ることから菌と宿主細胞の強い会合を可能にすると考えられる。一方 HBHA は、菌体から離れ分泌されるが、菌の自己凝集活性を有することから、組織内で分泌され菌が接着する足場をつくることで病巣の広がりには貢献すると考えられる。

貪食細胞であるマクロファージも主要な潜伏細胞であり、菌は血清の存在下では主に補体レセプターを介してマクロファージに侵入する (22)。興味深いことに、Norris 等が、補体成分である C3 結合性分子を検索したところ HBHA と MDP1 (HupB) であることが明らかになった (23)。したがって HBHA や MDP1 は、補体レセプターを介したマク

ロファージへの侵入にも関わる可能性が高い。

結核菌は、T 細胞の活性化／分化に生体内で重要な役割を果たす樹状細胞にも感染し増殖するが、この際の主要レセプターは DC-SIGN であり、菌体側の接着分子はリポアラビノマンナン (LAM) と呼ばれる糖脂質であることが分かっている (24, 25)。

結核菌は細胞内寄生菌であり、細胞内で殺傷されず持続感染し、時に増殖して病気を発症させる。結核菌表面の接着分子の作用を阻害することで、これまでにない新しい予防／治療法の開発が可能ではないだろうか。結核菌は通常、貪食細胞とライソゾームとの融合 (P-Lfusion) を阻害することで生き残るが、仮に、抗体が完全に菌の細胞侵入を抑制せずとも Fc レセプター (抗体のレセプター) を介して貪食された結核菌は P-Lfusion をおこしやすく殺菌されやすいことから (26)、一定の効果が見込まれる。

ワクチン戦略を考慮すれば、細胞性免疫を惹起する IFN-gamma 産生 T 細胞を誘導する抗原であれば更に効果を期待できる (27)。MDP1 がそうであるように (図 11 参照) 単独の防御抗原では BCG の効果を凌駕できないのが現状であり、複数の抗原を用いる必要がある。我々が示したように、MDP1 には一定の防御誘導能があり (18)、また HBHA についても顕著な効果が報告されている (28)。MDP1, HBHA, LAM 等の抗原性を有する接着分子は結核ワクチンのコンポーネントとしての有用性が見込まれる。

結 わ り に

MDP1 は増殖する結核菌の菌体蛋白質中 7% 以上を占め、定常期以降には更にその含有量の増加する主要な菌体成分である。菌体内で多くの MDP1 は DNA と結合しており、これは己 (結核菌) を排除する免疫を惹起する。では、なぜ菌はあれほど大量の MDP1 を生体内で発現しているのだろうか。その答えは MDP1 が菌の生体内生存に必須であ

図 11. MDP1-DNA 複合体免疫は抗結核防御免疫を誘導する

C3H/HeJ マウスをグラフ下に示した抗原で免疫し、結核菌クロノ株を尾部静脈より感染させた。感染 14 (A) 日および 28 (B) 日後の肺の菌数を測定。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$ (ANOVA)。

るからだろう (7)。そのように考えれば、化学療法薬の標的は無論のこと、ワクチン標的にしても、これまでに考えられてきたように抗原性の強弱のみならず、病原性や菌の生存に必須の分子であるか否かを考慮して設計すべきではないだろうか。

結核の病態形成に必須の役割を担う分子が、治療や予防の標的である可能性を我々は示した。現在これを基盤としてワクチン開発を図っているが、生物学的興味に基づいた発見に端を発し、それが臨床応用に実を結ぶことができれば basic science の研究者として大変な幸せを感じる。

謝 辞

本研究は、旧長崎大学歯学部細菌学講座で山田毅教授のもと、現在は大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学分野小林和夫教授のもとで行われている。また、本研究は文部科学省科学研究費、厚生労働省科学研究費、ヒューマンサイエンス振興財団総合研究事業により支援された。

文 献

- 1) Bloom, B.R. (2002): Tuberculosis—the global view. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1434–1435.
- 2) Wayne, L.G., Sohaskey, C.D. (2001): Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 139–163.
- 3) Yuan, Y., Crane, D.D., Barry, 3rd, C.E. (1996): Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J. Bacteriol.* **178**, 4484–4492.
- 4) 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-Guerin. *Microbiol. Immunol.* **43**, 1027–1036.
- 5) 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. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**, 297–301.
- 6) Furugen, M., Matsumoto, S., Matsuo, T., Matsumoto, M., Yamada, T. (2001): Identification of the mycobacterial DNA-binding protein 1 region which suppresses transcription in vitro. *Microb. Pathog.* **30**, 129–138.
- 7) Sassetti, C.M., Boyd, D.H., Rubin, E.J. (2003): Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **48**, 77–84.
- 8) Aoki, K., Matsumoto, S., Hirayama, Y., Wada, T., Ozeki, Y., Niki, M., Domenech, P., Umemori, K., Yamamoto, S., Mineda, A., Matsumoto, M., Kobayashi, K. (2004): Extracellular mycobacterial DNA-binding Protein 1 participates in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* **279**, 39798–39806.
- 9) Brix, K., Summa, W., Lottspeich, F., Herzog, V. (1998): Extracellularly occurring histone H1 mediates the binding of thyroglobulin to the cell surface of mouse macrophages. *J. Clin. Invest.* **102**, 283–293.
- 10) Scaffidi, P., Misteli, T., Bianchi, M.E. (2002): Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**, 191–195.
- 11) Shimoji, Y., Ng, V., Matsumura, K., Fischetti, V.A., Rambukkana, A. (1999): A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 9857–9862.
- 12) Bishai, W.R. (2000): Rekindling old controversy on elusive lair of latent tuberculosis. *Lancet* **356**, 2113–2114.
- 13) Hernandez-Pando, R., Jeyanathan, M., Mengistu, G., Aguilar, D., Orozco, H., Harboe, M., Rook, G.A., Bjune, G. (2000): Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet* **356**, 2133–2138.
- 14) Menozzi, F.D., Rouse, J.H., Alavi, M., Laude-Sharp, M., Muller, J., Bischoff, R., Brennan, M.J., Loch, C. (1996): Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. *J. Exp. Med.* **184**, 993–1001.
- 15) Pethe, K., Aumercier, M., Fort, E., Gatot, C., Loch, C., Menozzi, F.D. (2000): Characterization of the heparin-binding site of the

- mycobacterial heparin-binding hemagglutinin adhesin. *J. Biol. Chem.* **275**, 14273–14280.
- 16) Forteza, R., Lieb, T., Aoki, T., Savani, R.C., Conner, G.E., Salathe, M. (2001): Hyaluronan serves a novel role in airway mucosal host defense. *FASEB J.* **15**, 2179–2186.
 - 17) Culty, M., Nguyen, H.A., Underhill, C.B. (1992): The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J. Cell Biol.* **116**, 1055–1062.
 - 18) Matsumoto, S., Matsumoto, M., Umemori, K., Ozeki, Y., Furugen, M., Tatsuo, T., Hirayama, Y., Yamamoto, S., Yamada, T., Kobayashi, K. (2005): DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J. Immunol.* **175**, 441–449.
 - 19) Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T., *et al.* (1984): Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J. Natl. Cancer Inst.* **72**, 955–962.
 - 20) Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Yano, O., Tokunaga, T. (1992): Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J. Immunol.* **148**, 4072–4076.
 - 21) Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740–745.
 - 22) Schlesinger, L.S., Bellinger-Kawahara, C.G., Payne, N.R., Horwitz, M.A. (1990): Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J. Immunol.* **144**, 2771–2780.
 - 23) Mueller-Ortiz, S.L., Sepulveda, E., Olsen, M.R., Jagannath, C., Wanger, A.R., Norris, S.J. (2002): Decreased infectivity despite unaltered C3 binding by a DeltahbA mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **70**, 6751–6760.
 - 24) Maeda, N., Nigou, J., Herrmann, J.L., Jackson, M., Amara, A., Lagrange, P.H., Puzo, G., Gicquel, B., Neyrolles, O. (2003): The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* **278**, 5513–5516.
 - 25) Tailleux, L., Schwartz, O., Herrmann, J.L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., Legres, L., Dreher, D., Nicod, L.P., Gluckman, J.C., Lagrange, P.H., Gicquel, B., Neyrolles, O. (2003): DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **197**, 121–127.
 - 26) Malik, Z.A., Denning, G.M., Kusner, D.J. (2000): Inhibition of Ca(2+) signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J. Exp. Med.* **191**, 287–302.
 - 27) Kawamura, I., Tsukada, H., Yoshikawa, H., Fujita, M., Nomoto, K., Mitsuyama, M. (1992): IFN-gamma-producing ability as a possible marker for the protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. *J. Immunol.* **148**, 2887–2893.
 - 28) Temmerman, S., Pethe, K., Parra, M., Alonso, S., Rouanet, C., Pickett, T., Drowart, A., Debie, A.S., Delogu, G., Menozzi, F.D., Sergheraert, C., Brennan, M.J., Mascart, F., Loch, C. (2004): Methylation-dependent T cell immunity to *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin. *Nat. Med.* **10**, 935–941.

(担当編集委員 小林和夫)