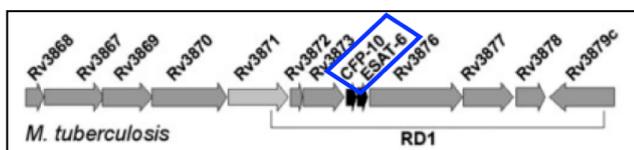


[研究の背景]

再興感染症として位置づけられている結核が克服されない最大の問題点として、未だ結核の原因細菌である結核菌の病原性因子の特定、またその分子のメカニズムが詳細に解明されていないことがあげられる。1996年、Mahairasらによって病原性をもたない *Mycobacterium bovis* BCG株(現在では結核の予防接種等で広く用いられている株)では、病原性を有する結核菌の遺伝子上にある Regions of Difference 1 (RD1) といわれる領域が抜け落ちていることが明らかになった⁽¹⁾。RD1領域には9つの遺伝子(Rv3871-3879)が存在し、現在までの解析によって Rv3874 は CFP-10 (Culture Filtrate Protein 10-kDa) を、Rv3875 は ESAT-6 (Early Secretary Antigenic Target 6-kDa) というタンパク質をコードしていること、残りの7つの遺伝子がこの2つのタンパク質を分泌するための装置(ESX-1)として働いていることが報告されている(図)。つまり、CFP-10、ESAT-6 という2つの分泌タンパク質が結核菌の病原性を示す因子として最も有力であり、結核菌が宿主に及ぼす病原性を理解する上で最も重要な分子であることが示唆される。



(1) Mahairas GG et.al., Molecular Analysis of Genetic Differences between *Mycobacterium bovis* BCG and Virulent *M. bovis*. *J Bacteriol.*, 1996, 178, 1274-1282.

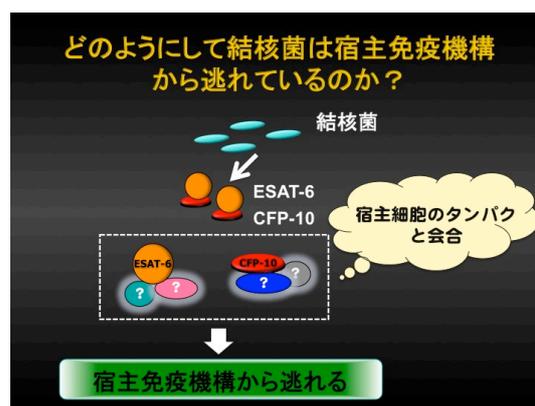
[研究目的]

近年、多くの研究者によって CFP-10/ESAT-6 の機能解析がなされている。例えば 2006 年、CFP-10/ESAT-6 がファゴリソームの形成を阻害していること⁽²⁾、2007 年には CFP-10 が、結核菌のファゴソームから細胞質に逃れるために必要な分子であることが報告されている⁽³⁾。しかしながら、未だこれらのタンパク質の機能の詳細な分子メカニズムは解明されていない。そこで我々は結核菌が分泌する 2 つのタンパク質 CFP-10 と ESAT-6 に注目し、CFP-10/ESAT-6 両タンパク質の細胞内、特に自然免疫細胞であるマクロファージ内での動態および役割を分子レベルおよび個体レベルで解析することにより、結核菌がどのようにして細胞内にとどまり病原性を発揮しているのかを解き明かすことを目的とした。(2) Tan T et.al., The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation. *Cell Microbiol.* 2006. 8. 1417-1429. (3) van der Wel N et.al., *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell.* 2007. 129. 1287-1298.

[研究方法と結果]

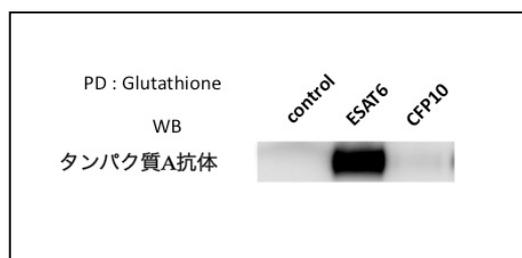
(1) CFP-10、ESAT-6 と会合する宿主タンパク質の探索

これまでに報告されている論文から、CFP-10 および ESAT-6 が宿主細胞のファゴソームとリソソームの融合に関わる何らかの分子と相互作用することでマクロファージによる防御機構から逃れていることが予想された(図)。そこで CFP-10、ESAT-6 と会合する宿主細胞の分子を探索し同定を試みた。まず GST タグを付加した CFP-10、ESAT-6 の発現ベクターを作製し、大腸菌によりリコンビナント GST-CFP-10 および GST-ESAT-6 を精製した。これらを bait にして、マクロファージの cell line である RAW 細胞の溶解液と混合することによって CFP-10、ESAT-6 と特異的に結合しうる宿主細胞由来のタンパク質を精製した。これらのタンパク質を質量分析器 (ThermoFisher) で解析したところ、とても興味深いタンパク質群が同定された。このことから CFP-10/ESAT-6 がそれらのタンパク質群と会合しうることが示唆された。



(2) 会合分子の特定

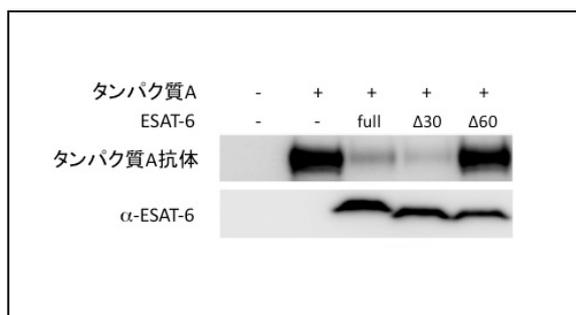
ウエスタンブロット法により(1)で同定された分子と ESAT-6 の会合を検討した。その結果、タンパク質 A が ESAT-6 と会合することが示唆された(図)。



(3) ESAT-6 の機能解析

(2)でタンパク質 A と ESAT-6 の会合が示唆されたことから、我々はタンパク質群の中から特に会合の可能性の高いと判断されるタンパク質 A に注目し研究を進めた。in vitro の系で細胞に ESAT-6 およびタンパク質 A を共発現させ、ウエスタンブロット法により解析したところ、ESAT-6 (full)とタンパク質 A を共発現させて 24 時間後の細胞ではタンパク質 A の発現が顕著に減少していることが明らかとなった(図)。これまでに ESAT-6 には cytolysis activity が存在することが報告されていることから⁽⁴⁾、ESAT-6 はタンパク質 A の発現抑制もしくは分解を促すことによって宿主免疫機構から逃れていることが示唆された。また ESAT-6 の N 末端を 30bp (Δ 30) および 60bp (Δ 60) 削った ESAT-6 を作製し、同様にタンパク質 A の発現を解析し

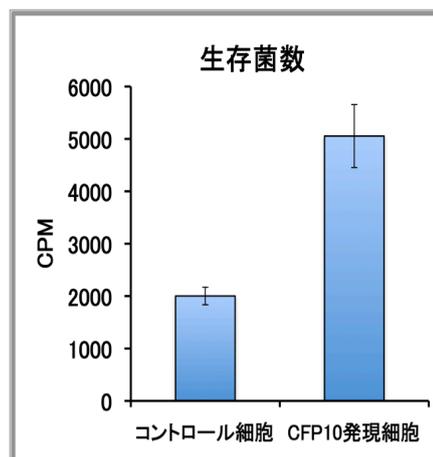
たところ、 $\Delta 30$ との共発現ではタンパク質 A の発現が減少していたのに対して、 $\Delta 60$ との共発現ではタンパク質 A の発現の減少が解除された(図)。つまり ESAT-6 の N 末端 30-60bp の間に ESAT-6 の cytolysis activity に重要な領域が存在することが示



唆される。現在より詳細な解析を進めているところである。(4)Hsu T et.al., The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003.100. 12420-12425.

(4) CFP-10/ESAT-6 を恒常的に発現するマクロファージ cell line の作製

CFP-10 および ESAT-6 を組み込んだ pcDNA 発現ベクターを RAW 細胞にエレクトロポレーション法で組み込むことによって、恒常的に CFP-10 もしくは ESAT-6 を発現するマクロファージを作製した。CFP-10 を恒常的に発現するマクロファージに CFP-10/ESAT-6 を分泌しない BCG を感染させて細胞内での BCG の生存率を解析したところ、CFP-10 を恒常的に発現させたマクロファージでは生存している BCG 数がコントロールに比べて高かった(図)。このことから、CFP-10 が結核菌の何らかの病原性を示す因子であること、また菌由来のタンパク質を発現ベクターで細胞に発現させても病原性因子として作用することが明らかになった。今後 ESAT-6 を恒常的に発現する細胞を作製し、結核菌の生存率および会合タンパク質 A の発現量などを解析することで ESAT-6 が宿主細胞内で結核菌の病原性因子としてどのような役割を担っているかを明らかにする予定である。



[総括]

我々はこれまでの研究で結核菌の分泌タンパク質である CFP-10 および ESAT-6 と会合するタンパク質群をいくつか同定した。そのうちタンパク質 A が ESAT-6 と会合すること、ESAT-6 の N 末端 30-60bp の間に cytolysis activity に重要な領域が存在し、ESAT-6 がタンパク質 A の発現を抑制あるいはタンパク質 A を分解していることを明らかにした。今後

CFP-10、ESAT-6による宿主防御機構回避メカニズムを解明するためにまず CFP-10と会合するタンパク質の同定を試みる予定である。また in vitro での解析を可能にするために ESAT-6 を恒常的に発現するマクロファージを作製する。さらにタンパク質 A 欠損マウスおよび CFP-10/ESAT-6 欠損結核菌株を用いて個体レベルで CFP-10、ESAT-6 の役割を解析する予定である。

[意義、展望]

結核は未だ毎年約 200 万人もの人が死亡する世界中で脅威とされる感染症のひとつであり、特に免疫力が低下したエイズ患者へのリスクをはじめ、近年では抗結核薬に抵抗性を持った多剤耐性結核菌の出現が大きな問題になっている。日本のような先進国であっても年々結核患者は微増しており、いつパンデミックが起きてもおかしくない状況である。そのため早い段階で結核菌の病原性に関わる分子を特定し、その分子メカニズムを解明することが求められていると考える。本研究で標的としている分子 CFP-10/ESAT-6 は結核菌の病原性因子として最も有力視される分子である。したがって、これらのタンパク質の病原性因子としての分子メカニズムが解明されれば、今後抗結核薬の開発の分子基盤につながると信じている。