

今村賞受賞記念講演

ミコバクテリアに特異な抗原性蛋白質の研究

永井 定

大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所
受付 平成元年7月3日

Commemorative Lecture of Receiving Imamura Memorial Prize

ANTIGEN PROTEINS SPECIFIC TO MYCOBACTERIA

Sadamu NAGAI*

(Received for publication July 3, 1989)

More than 10 mycobacterial proteins (MPB or MPT) have been isolated from the nutrient fluids after cultivation of *Mycobacterium bovis* BCG (Japanese substrain) or *M. tuberculosis* H37Rv on Sauton medium. The genes for 4 antigens, MPB70, MPB64, α -antigen (MPB59), and MPB57, were cloned so far and the complete nucleotide and amino acid sequences were determined. MPB70 is a quite unique protein in 3 points ; a highly species-specific antigen for *M. bovis*, a large amount of secretion more than 10% of the total protein amount in the culture fluid when the cells are actively growing, and a composition with hydrophobic amino acids in a high rate. MPB64 was also a unique antigen specific to *M. bovis* and *M. tuberculosis* with a strong reactivity in delayed-type hypersensitivity. MPB59, corresponds to α -antigen, was a protein of a group of several similar configurations and was commonly found in the mycobacterial species. These 3 antigens are synthesized in the cells binding with each signal peptide which is characteristic of secreted proteins. A heat stable protein, MPB57, a dominant component of PPD, corresponded to BCG-a or 10kD protein and is supposed to be one of the heat shock proteins.

Key words : *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, Antigenic protein, Nucleotide sequence, Signal peptide

キーワード : 牛型結核菌, 人型結核菌, 抗原性蛋白質, 核酸塩基配列, シグナル・ペプチド

ミコバクテリア由来の抗原性蛋白質を得ようとする研究は数多くなされ、長年の歴史を持つが、PPDが発表されて以来50年を経た今日でもなおこれに代わるものは得られていない。感染菌種を鑑別することは、結核の

早期診断に重要であり、PPDに匹敵する力価を有し、さらに菌種に特異な精製抗原を得ることは、今もなお強く求められているところである。

われわれは、*Mycobacterium bovis* BCG 日本株あ

* From the Toneyama Institute for Tuberculosis Research, Osaka City University Medical School, Toneyama 5-1-1, Toyonaka 560 Osaka.

表1 遺伝子クローニングにより構造解析されたミコバクテリア培養濾液内主要蛋白質

	菌種特異性	等電点*	分子量 (kD)		シグナル ペプチド 残基数	皮内反応力価 (対 PPD)	対応蛋白質	備考***
			SDS** PAGE	アミノ酸 配列 (残基数)				
MPB 70	<i>M. bovis</i>	4.6	22	16.3 (163)	30	1/20-1/40	Antigen 15 ⁵⁾	分泌時二量体 70から80に変化
MPB/MPT64	<i>M. bovis</i>	4.8	26	22.4 (205)	22	1-1/10		
MPB/MPT59	<i>M. tuberculosis</i> mycobacteria	5.05	30	30.5 (283)	40	1-1/10	α -antigen ²²⁾ BCG antigen 85B ¹⁸⁾	MPT44 (85A) MPT48, 45 (85C)
MPB/MPT57	mycobacteria	4.9	12	10.8 (99)	None	1/5,000	BCG-a ²⁶⁾ 10kD protein ²⁸⁾	PPD 主成分 熱ショック蛋白

* 一次元電気泳動 (O' Farrell) 後のゲル断片溶出液について測定。

** 分子量マーカー (Pharmacia) からの算定値。

*** 本文参照。

るいは *M. tuberculosis* H37Rv 株をソートン培地に培養し、その非加熱培養濾液からその中に含まれる主要蛋白質を精製単離 (MPB あるいは MPT) し、既に 10 種をこえる精製蛋白質を得ているが、そのうちその遺伝子をクローニングし構造解析を行ったものは 4 つを数える (表 1)。それぞれ特色ある蛋白質であるが、ここでは特に、その特異性が際立ち、またすでに多くの検討がなされた MPB70 に重点をおいて述べることにする。

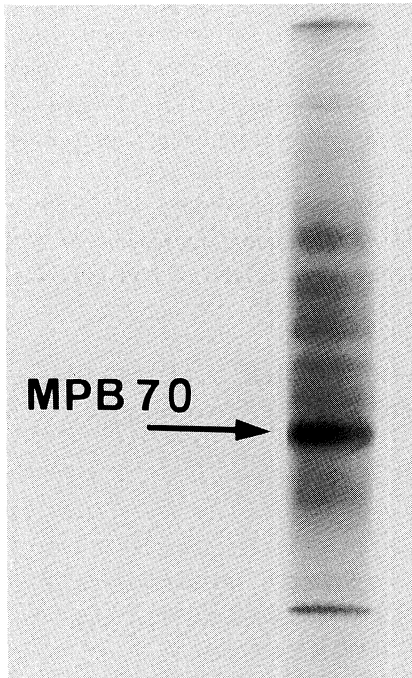


図1 BCG日本株培養濾液内蛋白質のディスク電気泳動像²⁾
Davis 法¹⁾, 7.7%アクリルアミド・ゲル。

われわれは蛋白質の追跡にあたり、免疫学的同定法をさけ、一定条件下の電気泳動¹⁾における易動度を目安として蛋白質を同定し追跡する方法をとった。加熱処理を経た PPD は、この同定法では明瞭なバンドとしてみられる成分は全くないが、非加熱の BCG 日本株培養濾液では、多数の明瞭なバンドとともに、異常に多量の蛋白質成分の存在が見られた²⁾ (図 1)。これを MPB70 と名付けた。Mycobacterin, protein fraction, from BCG, 易動度 0.70 の意である。かかる多量に分泌される蛋白質についての報告がそれまでになかったのは、多くの研究においては菌体に対する抗血清との沈降反応が追跡の指標として用いられたために、MPB70 のように菌種特異性が著しいものでは、用いた抗体如何によっては反応が見られなかったためと考えられる。

MPB70 は、培地内に分泌される蛋白質量の 10% にも及ぶ多量の故に、その精製は容易であり、硫酸で濃縮後の最初の DEAE イオン交換カラムによる精製では図 2 のごとく大きなピークに集中し、以後の分子ふるいなどの操作を経て多量の精製品が得られた。

BCG と *M. tuberculosis* との間には顕著な差はないものと予想していたが、皮内反応では、PPD が種々のミコバクテリア菌種により感作されたモルモットにおいて広く反応する抗原であるのに対し、この精製 MPB70 が反応を示したのは BCG 日本株で感作したモルモットのみであった。しかし、その反応抗原としての力価は、PPD のそれに対し 1/20 程度の強さであった²⁾ (図 3)。

さらに、MPB70 を多量に産出するのは、日本株を含む限られた BCG 菌株のみであるという意外なことが明らかになった³⁾⁻⁵⁾。現在までの報告を集約すると、BCG 15 株のうち 5 株で多量の産出が見られている (表 2)。MPB70 は分泌の時点では二量体であり、また当初では分泌蛋白質量の 23% にも達するともいわれている⁶⁾。

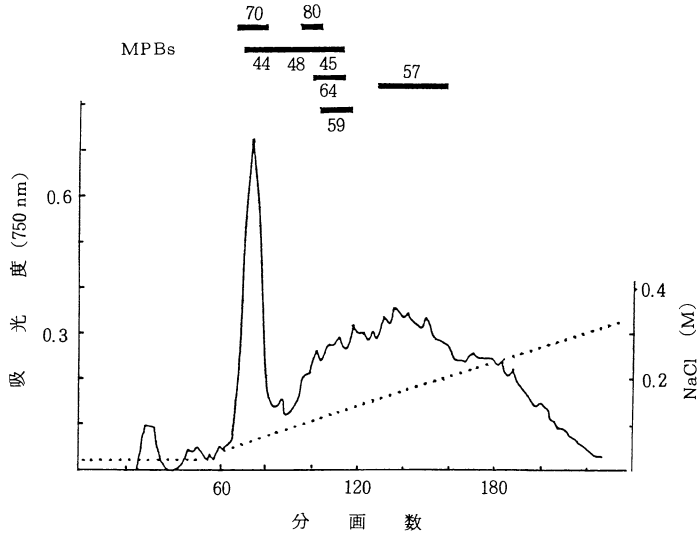


図2 BCG日本株の培養濾液内蛋白質のDEAEカラム溶出像

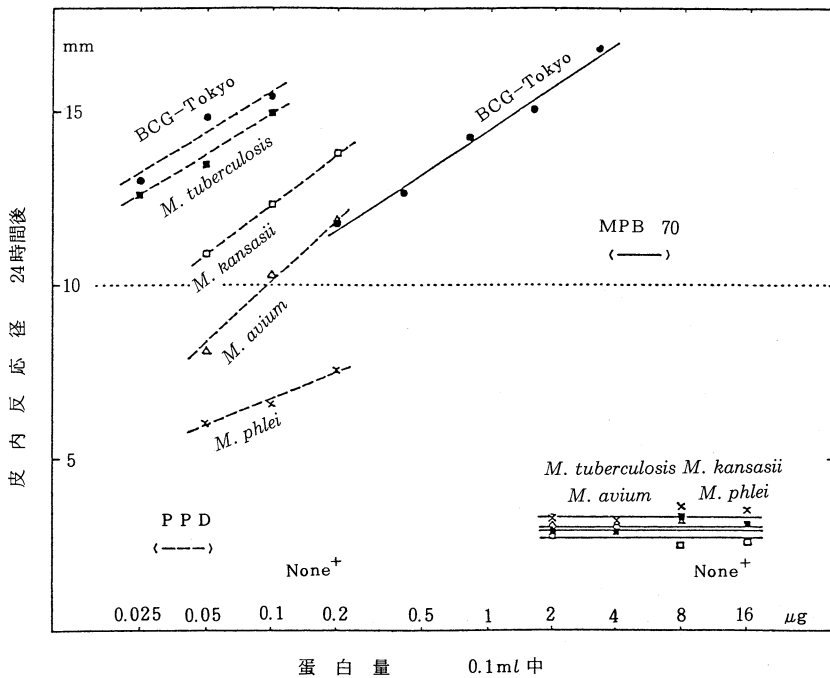


図3 PPDとMPB70の皮内反応抗原性比較²⁾
モルモット、加熱死菌体の流動パラフィン懸濁液により感作。

また、BCGの親株といえる *M. bovis* については、現在までに調べられたすべての菌株においてMPB70の多量の産生がみられており、一方、*M. tuberculosis* に

おいてはほぼすべての菌株において産生がない⁷⁾⁻¹¹⁾。この結果からすれば、MPB70は *M. bovis* に特異的に産出されるものとみられ、BCG株のうちこれを多く産

表2 MPB 70 分泌量からみたBCG菌株差

BCG菌株名	特異成分名	MPB70 ^{2) 3) 4)}		46 kDa (23 kDa) ⁶⁾	Antigen 15 ⁵⁾
	評価方法	皮内反応および 二次元電気泳動	R I A 阻害反応	³⁵ S・Met 含有量	免疫電気泳動
Japanese (Tokyo)		◎	1.0	◎	○
Brazilian (Moreau)		◎	0.7	◎	○
Russian (Moscow)		◎	0.7	◎	○
Swedish		◎	0.5	—	—
Roumanian		—	—	—	○
British (Glaxo)		●	0.06	○	—
Merieux (Lyon)		—	—	○	—
Tice (Chicago)		●	0.01	●	—
French (Paris)		●	0.006	●	●
Danish (Copenhagen)		●	0.007	●	●
Dakar (Inst. Pasteur)		—	—	●	—
Dutch (Bilthoven)		—	—	●	—
Czechoslovakian (Prague)		—	—	●	●
Indonesian (Bandung)		—	—	●	—
Chinese (Beijing)		●	—	—	—
		◎強反応 ●反応なし	培地内の 相対含量	◎培地内蛋白量の23% ○同 2~3% ●存在なし	○反応あり ●反応なし

生しないものの方が特殊ということになる。パスツール株をはじめ欧米の標準とされているBCG株のほとんどがMPB70を産生しないということは、各国に分与された後、継代するうちに変異したものと考えざるをえない。遺伝子断片の比較からみてこの変異を示唆するような結果も得られている¹²⁾。

MPB70に関して*M. bovis*と*M. tuberculosis*との間に顕著な差があることは、BCGワクチンの有効性、結核感染との判別などに利用できないかと当然考えが及ぶが、現在までにその確定した判定法は得られていない。BCGワクチン接種を受けた学童についての皮内反応で

はPPDほどの確実さが見られなかった¹³⁾。インドで2歳以下の幼児については、ワクチン接種者の2/3に血清中の抗MPB70抗体価上昇が明瞭にみられたが、なお詳細な条件の検討が待たれるところである。一方、牧畜国において、家畜の非結核性抗酸菌と*M. bovis*による感染の鑑別にMPB70の利用が試みられている^{8)~10)}。

MPB70の構造については、既に化学的にエドマン分析法による結果がしめされていたが¹⁴⁾、遺伝子的な解析と異なる部分があり⁸⁾、その確定が必要であった。われわれはその遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定した¹⁵⁾。そのアミノ酸部分のみを表3に示した。

表3 MPB 70のアミノ酸配列¹⁵⁾

M	K	V	K	N	T	I	A	A	T	S	F	A	A	A	G	L	A	A	L
A	V	A	V	S	P	P	A	A	A	G	D	L	V	G	P	G	C	A	G
Y	A	A	A	N	P	T	G	P	A	S	V	Q	G	M	S	Q	D	P	V
A	V	A	A	S	N	N	P	E	L	T	T	L	T	A	A	L	S	G	Q
L	N	P	Q	V	N	L	V	D	T	L	N	S	G	Q	Y	T	V	F	A
P	T	N	A	A	F	S	K	L	P	A	S	T	I	D	E	L	K	T	N
S	S	L	L	T	S	I	L	T	Y	H	V	V	A	G	Q	T	S	P	S
N	V	V	G	T	R	Q	T	L	Q	G	A	S	V	T	V	T	G	Q	G
N	S	L	K	V	G	N	A	D	V	V	C	G	G	V	S	T	A	N	A
T	V	Y	M	I	D	S	V	L	M	P	P	A							

▲印以前の30残基はシグナル・ペプチド

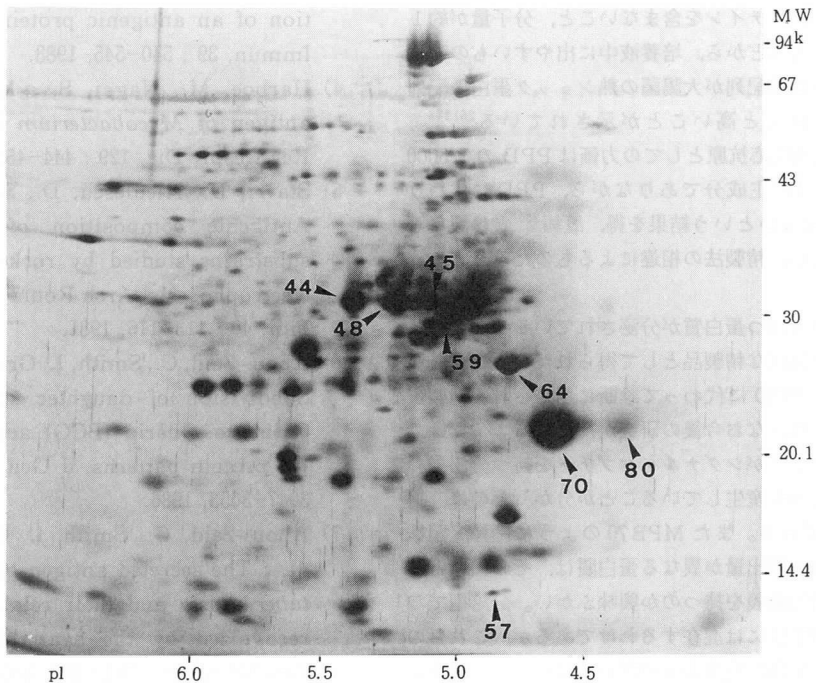


図4 BCG日本株の培養濾液内蛋白質の二次元電気泳動像³⁾¹⁶⁾¹⁹⁾
O' Farrell法¹⁷⁾。ソートン2週培養濾液, 蛋白質量150 μ g。第一次(左から右へ), 等電点電気泳動; 第二次(上から下へ), SDS電気泳動(12.8%アクリルアミド・ゲル)。コマジープルーの後, 銀染色。

MPB70は, 本来は30個のアミノ酸からなるシグナル・ペプチドとともに合成されるが, 分泌される時点ではそれから切断された163個のアミノ酸からなる蛋白質となる。この蛋白質の特徴は疎水性が極めて強いことであり, MPB64, α 抗原(MPB59), MPB57に比べて疎水性アミノ酸の含量が高い。シグナル・ペプチドについてもその40%がアラニンから成っている。この著しい疎水性が, 強い分泌性を示しているであろう。

MPB80¹⁶⁾は, N末端のアミノ酸配列が30残基にわたりMPB70と一致する。分子量も近似であるが, 等電点が異なるため二次元電気泳動像¹⁷⁾(図4)では別のスポットとして現れる。MPB70との違う点はまだ明らかでないが, このものはMPB70が分泌された後に改変されたものらしく, 培養期間が長くなるほどMPB80のスポットが大きく現れる。

MPB/MPT64は, MPB70を産生するBCG株において常に共存するスポットとして見つけられた。したがって, MPB70を産生しないBCG株を除いた*M. bovis*においてみられる。しかしMPB70を全くつくりたくない*M. tuberculosis* H37Rvおよび青山B株においてもMPT64が明瞭にあらわれる¹⁶⁾。*M. bovis*, *M. tuber-*

*culosis*の2菌種のみに限られることは, MPB70に次いで特異性が強い分泌蛋白質ということになり, その構造も遺伝的に解明された¹⁸⁾が, MPB70に近似する部分は全くない。比較的強い皮内反応抗原性を示すので, その特異性と相俟って今後の検討が期待される。

MPB/MPT59は, ミコバクテリアに共通して存在する蛋白質であり¹⁹⁾, α 抗原²⁰⁾²¹⁾に一致するものであることが分かった。その全構造は遺伝的に解明されており²²⁾, シグナル・ペプチドを持つ分泌型の蛋白質である。このMPB59とN末端アミノ酸配列を同じくするMPB44, および抗MPB59抗血清に同様に反応するMPB48, 45が培養濾液内に混在し(図2, 4), またBCG antigen A, B, C²³⁾とも名付けられているが, 構造上の詳細な差異は分かっていない。ただMPB59は皮内反応の力価がPPDと同程度に大きく, また*M. leprae*でも産生される点が注目されている。

MPB/MPT57は, 加熱処理を経ているPPDでもなお低分子部にスポットとして残存する蛋白質である。その構造を遺伝的に解析したところ²⁴⁾, その後相次いで発表されたBCG-a²⁵⁾²⁶⁾, 10kD蛋白²⁷⁾²⁸⁾の構造と比較して, それらと一致することになった。この蛋白質

にはシグナル・ペプチドがないので細胞内蛋白であるとみられるが、システインを含まないこと、分子量が約1万と小さいことなどから、培養液中に出やすいものと思われる。その塩基配列が大腸菌の熱ショック蛋白の配列と相同性が44%と高いことが示されている²⁶⁾²⁷⁾。MPT57の皮内反応抗原としての力価はPPDの1/5000と弱く、PPDの主成分でありながら、PPDに代わり得るものではないという結果を得、既報²⁵⁾とは異なることになったが、精製法の相違によるものだろう。

菌種特異性を持つ蛋白質が分泌されていることが分かり、それらが高度な精製品として得られたことは意義深い。しかし、PPDに代わって診断に用いられる精製蛋白質については、なお今後の研究が待たれる。

ミコバクテリアがシグナル・ペプチドを持つ分泌型の蛋白質をいくつも産生していることが分かったのは、目新しい知見である。またMPB70のように菌種・菌株によって大きく産出量が異なる蛋白質は、その菌にとってどんな生理的意義を持つのか興味ふかい。分泌型でない蛋白質もPPDには混在するわけであるが、これらの蛋白質群の寄生体の免疫系との係わりについて、次第に明らかになるものと期待される。

この研究は、次の方々の御協力をいただき共同してなされたものである。お名前を記し(敬称略)、厚く御礼申しあげる。

永管徳子、松本潤二郎(国療刀根山病)、芳賀伸治、木ノ本雅通、石森勇治、後藤義孝、高橋 宏、片岡哲朗、三浦 馨、徳永 徹(国立予研)、森 亨、豊原希一、阿部千代治、柄谷和広、山本節子、戸井田一郎(結核予防会結研)、鳥巢要道(九大医)、山口隆司、松尾和浩、山崎晤弘(味の素中央研)、寺坂邦広、山田 毅(阪大微研)、M. Harboe, H. G. Wiker(ノルウェー・オスロ大)、K. Hasløf(デンマーク・国立血清研)、M. E. Patarroyo(コロンビア・ボゴタ大)、C. Jaganath(インド・ASTRAリサーチセンター)。

文 献

- 1) Davis, B. J. : Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins, *Ann NY Acad Sci*, 121 : 404-427, 1964.
- 2) Nagai, S., Matsumoto, J., Nagasuga, T. : Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG, *Infect Immun*, 31 : 1152-1160, 1981.
- 3) Miura, K., Nagai, S., Kinomoto, M. et al. : Comparative studies with various substrains of *Mycobacterium bovis* BCG on the production of an antigenic protein, MPB70, *Infect Immun*, 39 : 540-545, 1983.
- 4) Harboe, M., Nagai, S. : MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG, *Am Rev Respir Dis*, 129 : 444-452, 1984.
- 5) Stavri, D., Niculescu, D., Stavri, H. et al. : Antigenic composition of different BCG substrains studied by rocket-line immunoelectrophoresis, *Arch Roum Path Exp Microbiol*, 40 : 113-116, 1981.
- 6) Abou-Zeid, C., Smith, I., Grange, J. M. et al. : Subdivision of daughter strains of Bacille Calmette-Guérin (BCG) according to secreted protein patterns, *J Gen Microbiol*, 132 : 3047-3053, 1986.
- 7) Abou-Zeid, C., Smith, I., Grange, J. M. et al. : The secreted antigen of *Mycobacterium tuberculosis* and their relationship to those recognized by the available antibodies, *J Gen Microbiol*, 134 : 531-538, 1988.
- 8) Radford, A. J., Duffield, B. J., Plackett, P. : Cloning of a species-specific antigen of *Mycobacterium bovis*, *Infect Immun*, 56 : 921-925, 1988.
- 9) Wood, P. R., Ripper, J., Radford, A. J. et al. : Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Mycobacterium bovis*, *J Gen Microbiol*, 134 : 2599-2604, 1988.
- 10) Fifis, T., Plackett, P., Corner, L. A. et al. : Purification of a major *Mycobacterium bovis* antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis, *Scand J Immunol*, 29 : 91-101, 1989.
- 11) 芳賀伸治, 高橋 宏, 後藤義孝他 : MPB70 に対する単クローン抗体の作製とこれを利用した蛍光サンドイッチ ELISA による MPB70 陽性菌株の同定とその意義, *結核*, 64 : 277-278, 1989.
- 12) Collins, D. M., DeLisle, G. W. : BCG identification by DNA restriction fragment patterns, *J Gen Microbiol*, 133 : 1431-1434, 1987.
- 13) 森 亨, 豊原希一 : BCG 由来ツベルクリン様精製物 (MPB70) の臨床応用可能性に関する検討 : *結核*, 55 : 142, 1980.
- 14) Patarroyo, M. E., Parra, C. A., Del Portillo, C. et al. : Immunogenic synthetic peptides

- against mycobacteria of potential immunodiagnostic and immunoprophylactic value, *Lepr Rev*, 57, suppl 2 : 163-168, 1986.
- 15) Terasaka, K., Yamaguchi, R., Matsuo, K. et al. : Complete nucleotide sequence of immunogenic protein MPB70 from *Mycobacterium bovis* BCG, *FEMS Microbiol Letters*, 58 : 273-276, 1989.
 - 16) Harboe, M., Nagai, S., Patarroyo, M. E. et al. : Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG, *Infect Immun*, 52 : 293-302, 1986.
 - 17) O' Farrell, P. H. : High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J Biol Chem*, 250 : 4007-4021, 1975.
 - 18) Yamaguchi, R., Matsuo, K., Yamazaki, A. et al. : Cloning and characterization of the gene for immunogenic protein MPB 64 of *Mycobacterium bovis* BCG, *Infect Immun*, 57 : 283-288, 1989.
 - 19) Wiker, H. G., Harboe, M., Nagai, S. et al. : MPB59, a widely cross-reacting protein of *Mycobacterium bovis* BCG, *Int Archs Allergy appl Immun*, 81 : 307-314, 1986.
 - 20) Yoneda, M., Fukui, Y. : Isolation, purification, and characterization of extracellular antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, *Am Rev Respir Dis*, 92 : 361-370, 1965.
 - 21) Tasaka, H., Kiyotani, K., Matsuo, Y. : Purification and antigenic specificity of alpha protein (Yoneda and Fukui) from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium intracellulare*, *Hiroshima J Med Sci*, 32 : 1-8, 1983.
 - 22) Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A. et al. : Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular α antigen, *J Bacteriol*, 170 : 3847-3854, 1988.
 - 23) Wiker, H. G., Harboe, M., Lea, T. E. : Purification and characterization of two protein antigens from the heterogeneous BCG85 complex in *Mycobacterium bovis* BCG, *Int Archs Allergy appl Immun*, 81 : 298-306, 1986.
 - 24) Yamaguchi, R., Matsuo, K., Yamazaki, A. et al. : Immunogenic protein MPB57 from *Mycobacterium bovis* BCG : molecular cloning, nucleotide sequence and expression, *FEBS Letters*, 240 : 115-117, 1988.
 - 25) Minden, P., Kelleher, P. J., Freed, J. H. et al. : Immunological evaluation of a component isolated from *Mycobacterium bovis* BCG with a monoclonal antibody to *M. bovis* BCG, *Infect Immun*, 46 : 519-525, 1984.
 - 26) Shinnick, T. M., Plikaytis, B. B., Hyche, A. D. et al. : The *Mycobacterium tuberculosis* BCG-a protein has homology with the *Escherichia coli* GroES protein, *Nucl Acids Res*, 17 : 1254, 1989.
 - 27) Baird, P. N., Hall, L. M. C., Coates, A. R. M. : A major antigen from *Mycobacterium tuberculosis* which is homologous to the heat shock proteins groES from *E. coli* and the htpA gene product of *Coxiella burneti*, *Nucl Acids Res*, 16 : 9047, 1988.
 - 28) Baird, P. N., Hall, L. M. C., Coates, A. R. M. : Cloning and sequence analysis of the 10 kDa antigen gene of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Gen Microbiol*, 135 : 931-939, 1989.