

原 著

結核菌青山 B 株ペプチド抗原遺伝子のクローニング

— 60 kD を発現するクローン pAT 201 の解析, およびコンビ
ナントペプチド (15 kD, 60 kD) の免疫学的活性について —田中-林 公子・露 口 隆 一・青 山 和 枝
岡 村 春 樹・長 田 久美子・田 村 俊 秀

兵庫医科大学細菌学教室

山 本 義 弘・古 山 順 一

同 遺 伝 学 教 室

小 松 俊 憲・新 家 莊 平

同 免疫医動物学教室

受付 平成元年12月18日

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
AOYAMA B PEPTIDE ANTIGEN GENES IN *ESCHERICHIA COLI*— A Gene Encoding 60kD Antigen (AT201) and Immunological
Activity of Recombinant Peptides (15 and 60kD) —Tomoko TANAKA-HAYASHI*, Takaichi TSUYUGUCHI, Kazue AOYAMA,
Haruki OKAMURA, Kumiko NAGATA, Toshihide TAMURA,
Yoshihiro YAMAMOTO, Jun-ichi FURUYAMA,
Toshinori KOMATSU and Sohei SHIN-KA

(Received for publication December 18, 1989)

To obtain recombinant peptides related to PPDs, we constructed a genomic library from the DNA of *Mycobacterium tuberculosis* Aoyama B, a standard strain in Japan to manufacture PPDs, using plasmid vectors pUC18 series. Seven clones reacting the anti-PPDs-rabbit-serum on immunoblotting were obtained, and restriction map was analysed.

A nucleotide sequence and a putative open reading frame (ORF) of pAT01, encoding 15kD peptide, as well as the mode of expression was reported previously³⁾. In this study, nucleotide sequence of 60kD peptide gene was determined, and the comparative database analysis (GENBANK) revealed a striking level of homology to so called mycobacterial heat shock protein. The expression mode of pAT201 encoding 60kD, as well as pAT01 encoding

* From the Department of Bacteriology, Hyogo College of Medicine, 1-1 Mukogawa-cho, Nishinomiya, Hyogo 663 Japan.

15kD peptide, indicated that these peptides were not hybrid proteins with the *lacZ* gene product, but they were consisted of peptides only mycobacterial source. Therefore, 15kD and 60kD directly were subjected to immunological studies.

The peptides were extracted from *E. coli*, carrying pAT01 or pAT201, purified through series of DEAE chromatography and followed by Detoxi-Gel to remove LPS. 15kD peptide behaved almost similar to PPDs both in the DTH skin reaction and the lymphocyte proliferation response on guinea pigs or rats in respect to sensitivity. However, 60kD was unique in that, and it behaved like a general mitogen.

We discussed role of 60kD peptide, comparing with the common antigen, generally found in most species of bacteria as the heat shock protein.

Key words : *Mycobacterium tuberculosis* strain Aoyama B, DNA library, Immunological activity of recombinant peptides, PPDs, Mycobacterial heat shock protein

キーワード: 結核菌青山 B 株, DNA ライブラリー, リコンビナントペプチド免疫活性, ツベルクリン (PPDs), 結核菌熱ショックタンパク

緒 言

近年, 抗酸菌の研究において, 遺伝子組換え技術の導入により, 抗酸菌の分子生物学的研究の展望が開かれた。その一環として, 抗酸菌の様々なタンパク遺伝子のクローニングがなされてきたが¹⁾²⁾, 結核症の診断, 細胞性免疫の指標として古くから用いられている PPDs と, これらクローニングタンパクの関係を直接検討した試みは少ない。

私たちは PPDs の免疫学的活性最小単位の検索を目的として, 本邦 PPDs 標準株 *Mycobacterium tuberculosis* 青山 B 株 DNA ライブラリーを, プラスミドベクター pUC 18 を用いて作製した。抗 PPDs 家兔抗血清と反応するペプチド抗原の遺伝子のクローニングを行い, 得られた 7 個のクローン (pAT 01, pAT 101, pAT 102, pAT 103, pAT 104, pAT 105, pAT 201) の制限酵素地図, 発現ペプチドの分子量などについて報告した。このうち, 特に 15kD ペプチドを発現するクローン, pAT 01 挿入遺伝子について塩基配列, 発現ペプチドの構造遺伝子, および発現制御に関与する遺伝子について述べた³⁾。

今回は, 前報に引き続き, 60kD ペプチドを発現するクローン pAT 201 挿入遺伝子の塩基配列を決定し, その構造遺伝子について報告する。合わせて pAT 201 の発現する 60kD ペプチドと前報の pAT 01 の 15kD ペプチドを精製し, 免疫学的活性を, PPDs と比較して検討した。

材料および方法

1) 菌株およびプラスミド

Table 1 に示す。DNA ライブラリー作製に用いた *Mycobacterium tuberculosis* 青山 B 株 (以下, *M. tbc.* AB と略す), 大腸菌, プラスミドは前報のとおりである³⁾。非定型抗酸菌 *M. intracellulare*, *M. kansasii* は動物感作の対照として用いた。

2) 試薬, 培地

M. tbc. AB, *M. intracellulare*, *M. kansasii* は Sauton 培地で 8 週間, 培養した。大腸菌, ならび組換え体の培養には L 培地を使用した。制限酵素は, 宝酒造, ニッポンジーンから購入し, 供給元の指示に従い反応を行った。その他の試薬は Sigma 社, 和光純薬から購入した。

3) 組換え DNA 手技

プラスミド DNA の抽出, 制限酵素切断, 大腸菌への形質転換は, 前報のとおり行った³⁾⁵⁾。pAT 201 挿入断片の塩基配列の決定は M 13 ファージを用いたジデオキシ法で行った⁶⁾。

4) リコンビナントペプチドの精製

a) 15kD ペプチド (AT 01)

15kD ペプチド (AT 01) を発現するクローン pAT 01 を保持した大腸菌をアンピシリン 100 µg/ml 加 L 培地 6 l に 37°C 16 時間培養し, 集菌した。菌体をトリス緩衝液 I (30 mM トリス, pH 8.7, 1 mM EDTA, 5 mM 2-メルカプトエタノール) で洗浄し, 1/30 容量のトリス緩衝液 I に再懸濁した。リゾチーム (終濃度 100 µg/ml) 消化上清の 20~80 % 飽和硫酸分画をトリス緩衝液 II (トリス緩衝液 I に 0.1 % Triton X-100 を加えたもの) で透析し, 粗抽出液とした。あらかじめトリス緩衝液 II で平衡化した DEAE Sepharose CL-6B (1.7×14 cm) に粗抽出液を吸着させ, 食塩濃度

Table 1. Bacterial Strains and Plasmids

Strains and plasmids	Relevant properties	Source or reference
Strains		
<i>M. tuberculosis</i> Aoyama B	NIHJ 1635	Dr. Takahashi (NIH, Tokyo)
<i>M. kansasii</i>	ATCC 12478	Kobayashi Pharm. Co. Ltd.
<i>M. intracellulare</i>	TMC 1406	Kobayashi Pharm. Co. Ltd.
<i>E. coli</i> K-12 JM103	Δ (<i>lac pro</i>) Δ <i>thi</i> , <i>strA</i> , <i>supE</i> , <i>endA</i> , <i>sbcB</i> , <i>hsdR</i> ⁻ , <i>F'</i> <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ⁸ , <i>Z</i> Δ <i>M15</i>	4)
plasmids		
pAT01	pUC18 derivative, carrying the 15 kD gene containing <i>M. tbc.</i> AB DNA fragment	3)
pAT201	pUC182 derivative, carrying the 60 kD gene containing <i>M. tbc.</i> AB DNA fragment	3)

0~0.5 M の直線勾配 200 ml で溶出した。AT 01 溶出分画を集め、脱塩後、同条件（ただし食塩濃度 0.05~0.3 M, 60 ml）で再クロマトグラフィーした。緩衝液中の Triton X-100 は、Biobeads SM-2（日本 Bio-Rad）で除去した。

b) 60 kD ペプチド (AT 201)

60 kD ペプチド (AT 201) を発現するクローン pAT 201 を保持した大腸菌リゾチーム消化上清の 20~50 % 飽和硫酸分画を、トリス緩衝液 I で透析後 AT 01 と同様に精製した。ベクター pUC 18 のみを保持した大腸菌を同様の方法で処理し、対照大腸菌抽出標品として用いた。

精製各ステップの抗原純度の検定は、SDS-PAGE, pUC 18 保持大腸菌で吸収した家兎抗 PPDs 抗血清を用いたドットプロット、ウェスタンブロットで行った。タンパク量の測定は Protein Assay Kit（日本 Bio-Rad）を用いた。すべての精製標品は、最終的にエンドトキシン除去カラム Detoxi-Gel を通した後、免疫活性の検討に用いた。エンドトキシン定量は、トキシカラシステム（生化学工業）を用いて行った。

5) 免疫学的活性の測定

a) 惹起抗原

上記方法で分離したリコンビナントペプチド 15 kD (AT 01), 60 kD (AT 201), および陽性対照として、PPDs (CIP: 試験管内反応用 PPD, 日本 BCG), PPD-B (*M. intracellulare* 由来, 小林製薬), PPD-Y (*M. kansasii* 由来, 小林製薬), 陰性対照として、pUC 18 保持大腸菌抽出標品を用いた。

b) DTH 型皮内反応

モルモット（雌, 8 週齢, オリエンタル酵母）に、感作抗原 ① *M. tbc.* AB, ② *M. kansasii*, ③ *M. intra-*

cellulare（各 3 mg 乾燥重量）の超音波抽出液, ④ 生理的食塩水を、Imcomplete Freund adjuvant (IFA) とともに四肢足趾に投与した。3 週後、上記各惹起抗原を背部に皮内注射し、24 時間後の発赤を測定した。被験動物は各感作抗原に対し 4 匹を用い平均した。

c) リンパ節リンパ球増殖反応

ルイスラット（雌, 8 週齢, オリエンタル酵母）に、モルモット同様に、各惹起抗原を乾燥重量 2 mg 投与し、3 週後、腋窩、鼠径リンパ節からリンパ球を分離した。細胞数は 2×10^6 /ml となるよう、RPMI 1640, (10 % FCS) に懸濁し、96 穴プレートに 100 μ l ずつ加えて、種々の濃度の上記各抗原と、37°C, 5 % CO₂ 下で 72 時間培養した。ハーベスト前、16 時間の [³H] サイミジン（Amersham, 0.25 μ Ci/穴）取り込みをパックード 460 液体シンチレーションカウンターで測定した。各反応は、2 匹を 1 群として、3 穴の平均を取った。

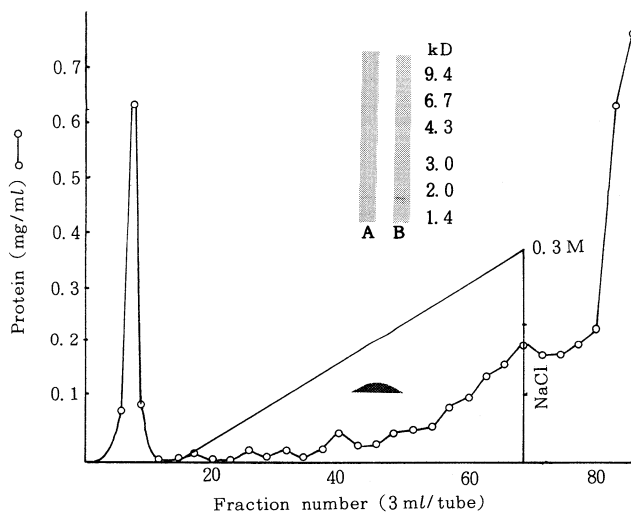
結 果

1) 15 kD ペプチド (AT 01) 発現クローン pAT 01 について

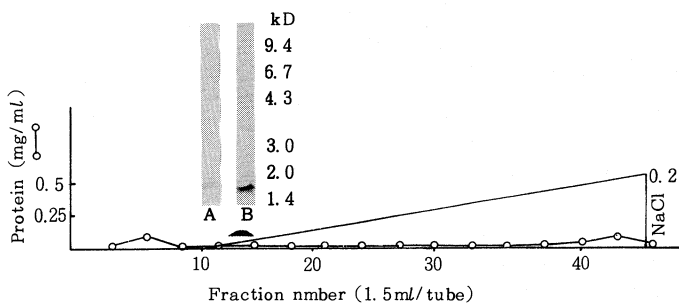
pAT 01 挿入遺伝子の塩基配列は前報で報告した³⁾。即ち、15 kD ペプチドのコーディングフレームは 5' 末端 892 塩基から 1.369 塩基で、推定分子量 15,095 ダルトンであった。

2) 60 kD ペプチド (AT 201) 発現クローン pAT 201 挿入遺伝子の塩基配列, およびオープンリーディングフレーム

前報で述べたように³⁾, pAT 201 (約 2.6 kb) の欠失変異株の抗原性を検討したところ, *Sma* I 部位以下 2.3 kb にオープンリーディングフレームが存在することが推定されたので、この 2.3 kb の塩基配列をジデオキシ



A : Step 1 ; Crude extract from *E. coli* DHI carrying pAT 01 was applied to a column of DEAE Sepharose CL-6 B (1.7 ×14 cm), equilibrated with Tris-buffer II (30 mM Tris-HCl, pH 8.7, 1 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100), was washed with 50 ml of the same buffer and then eluted with a linear gradient from 100 ml of 0 M NaCl to 100 ml of 0.3 M NaCl both in Tris-buffer II. Fractions of No.43-51, reacted with anti-PPDs serum by dot blotting (●), were collected.



B : Step 2 ; The fraction step 1 was loaded to a column (0.8 × 3.0 cm) under the same condition as step 1 and eluted with a linear gradient from 30 ml of 0 M NaCl to 0.2 M NaCl in Tris buffer II. The fractions of No.12-14 (●) were pooled.

Fig. 2. Purification of 15 kD Peptide (AT 01) by DEAE-Sepharose CL-6 B

スタンブロットの値と一致した。次に、これらの発現はベクタープラスミドのプロモーター誘導の有無にもかかわらず認められ、挿入遺伝子内の、結核菌由来の signal による発現が示唆されたことなどから、AT 01, AT 201 はベクター由来のペプチドとの融合タンパクではなく、結核菌由来の構造遺伝子からのみ構成されたも

のと考えられた。よって、リコンビナントペプチドの免疫活性が、直ちに結核菌ペプチドの免疫活性を反映すると考え、次にこれらペプチドの精製を試みた。

4) リコンビナントペプチドの精製

Fig. 2 は 15 kD (AT 01) の溶出パターンを示す。第 1 回目 DEAE クロマトグラフィー (Fig. 2-A) では、

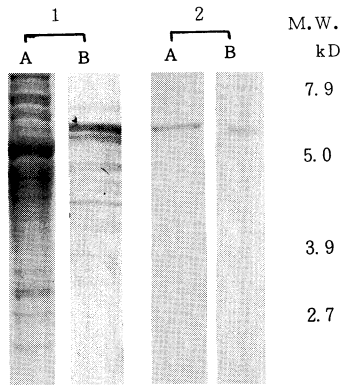


Fig. 3. Analysis of Purification Steps of DEAE-Chromatography 60 kD Peptide (AT 201) by SDS-PAGE and Westernblotting
Lane 1-A, B : fractions of the first step reacted with anti PPDs serum.
Lane 2-A, B : the second step.
A ; Coomassie brilliant blue staining.
B ; Westernblotting. M. W. ; Molecular weight marker.

食塩濃度 0.15 M, 再クロマトグラフィー (図 2-B) では, 食塩濃度 0.1 M 付近に抗 PPDs 抗体陽性分画が存在した。

第1回目 DEAE クロマトグラフィー陽性分画の SDS-PAGE-タンパク染色では, ウェスタンブロット陽性バンドに対応するバンド以外に数本のバンドが検出された。再クロマトグラフィーでは, 免疫染色に対応するタンパク染色のバンドのみ検出された。

Fig. 3 は, 60 kD (AT 201) の精製各ステップを示す。再クロマトグラフィーでは, ウェスタンブロット (Fig. 3-2, B) の陽性バンドに対応するタンパク染色 (A) のバンドは 1 本とみなされた。15 kD, 60 kD 両者とも, 再クロマトグラフィー後, Detoxi-Gel 処理して, 最終標品とした。

15 kD (AT 01), 60 kD (AT 201) とも, 組換え大腸菌 5 g (湿菌量) から約 150 μ g のリコンビナントペプチドが得られた。Detoxi-Gel 後の最終標品に含まれるエンドトキシン量は, 1 ng/ μ g 以下であった。

5) リコンビナントペプチドの免疫活性

a) DTH 型皮内反応 (Table 2)

PPD を用いた対照実験において, 感作, 惹起抗原の

Table 2. DTH Skin Reaction of Mycobacterial Antigens in Guinea Pigs Immunized with *M. tbc.* AB, *M. kansasii* or *M. intracellulare*

Stimulants (μ g)	Diameter (mm $\pm$ S.D.) of erythema ¹⁾ on guinea pigs (n=4) immunized with			
	<i>M. tbc.</i> AB. ²⁾	<i>M. kansasii</i> ²⁾	<i>M. intracellulare</i> ²⁾	Background ⁴⁾
Exp. 1				
PPDs (1)	11.2 $\pm$ 1.9	6.8 $\pm$ 1.1	6.8 $\pm$ 0.4	- ⁶⁾
PPD-Y (1)	8.8 $\pm$ 0.8	17.8 $\pm$ 0.4	5.8 $\pm$ 1.8	2.0 $\pm$ 0.0
PPD-B (1)	6.5 $\pm$ 3.3	5.0 $\pm$ 0.7	13.8 $\pm$ 1.8	1.0 $\pm$ 1.4
AT01 (10)	9.8 $\pm$ 3.3	7.0 $\pm$ 2.1	5.8 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.0
AT01 (5)	8.2 $\pm$ 3.2	N. D. ⁵⁾	N. D.	-
AT01 (1)	6.3 $\pm$ 2.1	N. D.	N. D.	-
<i>E. coli</i> ³⁾ (0.1)	0.7 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 1.1	1.5 $\pm$ 0.7	-
Saline	-	0.5 $\pm$ 0.7	-	-
Exp. 2				
PPDs (1)	14.3 $\pm$ 2.5	8.5 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	5.0 $\pm$ 0.0
PPD-Y (1)	11.3 $\pm$ 1.8	11.0 $\pm$ 1.4	10.8 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.7
PPD-B (1)	9.3 $\pm$ 1.1	5.3 $\pm$ 3.2	13.3 $\pm$ 1.8	6.0 $\pm$ 6.0
AT201 (10)	12.3 $\pm$ 0.4	13.5 $\pm$ 2.8	17.5 $\pm$ 3.5	2.8 $\pm$ 1.1
AT201 (1)	9.5 $\pm$ 3.2	5.3 $\pm$ 0.1	10.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
AT201 (0.1)	2.5 $\pm$ 3.5	1.5 $\pm$ 2.1	4.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
<i>E. coli</i> ³⁾ (0.1)	2.5 $\pm$ 0.0	2.5 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.7	0.0 $\pm$ 0.0
Saline	1.0 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.7	2.5 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 2.1

1) Erythema was determined 24h after challenge. Average $\pm$ S. D.

2) Sonic extract from mycobacterial cells.

3) *E. coli* K-12 DH1 carrying pUC18 only.

4) Saline + IFA. 5) Not done. 6) No response.

ホモログな組合せ, すなわち, *M. tbc.* AB 対 PPDs, *M. intracellulare* 対 PPD-B, *M. kansasii* 対 PPD-Y では, 強い反応を示し, ヘテログな組合せよりも, 特異性が見られた ($P < 0.1 \sim 0.01$). 次に 15 kD (AT 01) を惹起抗原として用いた場合, ホモログな *M. tbc.* AB 感作に対し, PPDs と同様発赤を惹起したが, PPDs に見られたような硬結は伴わなかった。なお, 15 kD (AT 01) による反応は, 投与量 $10 \sim 1 \mu\text{g}$ にわたって量依存性であった。PPDs $1 \mu\text{g}$ と AT 01 の $5 \sim 10 \mu\text{g}$ の反応には有意差が認められず, PPDs $1 \mu\text{g}$ と AT 01 の $1 \mu\text{g}$ では有意差 ($P < 0.1$) をもって AT 01 の方が弱かった。このことから, potency のうえで AT 01/PPDs は $1/5 \sim 1/10$ と推定された。ヘテログな *M. intracellulare*, *M. kansasii* 感作動物に対し, AT 01 の反応は弱かった ($P < 0.05$)。これらの結果から, AT 01 は, PPDs 同様の特異性を持つ DTH 型皮内反応を惹起しうる抗原であると考えられた。

一方, 60 kD (AT 201) は, ホモログな *M. tbc.* AB 感作では, 15 kD (AT 01) 同様, 量依存性を伴う反応を惹起している。しかし, ヘテログな組合せでも強い発赤を示し, 15 kD (AT 01) と異なり, 特異性は

認められなかった。

b) リンパ節リンパ球増殖反応 (Table 3)

対照実験の PPDs, PPD-B, PPD-Y は, DTH 型皮内反応とは異なり, すべての抗原感作リンパ球に対しても, 増殖反応を惹起し, 特異性は明瞭でなかった。15 kD (AT 01) は, 各感作リンパ球に対し, PPDs に比肩する取り込みを認めた。ここでは $0.6 \mu\text{g}$ の方が $6 \mu\text{g}$ よりも取り込みが高い結果が認められた。即ち, 抗原量が多くなると抑制的に作用していた。

60 kD (AT 201) は *M. tbc.* AB 感作だけでなく, ヘテログな *M. intracellulare*, *M. kansasii* さらに background に対しても取り込みが高く, 特異性を検討するに至らなかった。

考 案

pAT 201 挿入遺伝子, *Sma* I 部位以下の塩基配列を検討したところ, 発現ペプチド 60 kD (AT 201) と考えられるオープンリーディングフレームは, 2 個考えられた。前報³⁾に述べたように, このペプチド遺伝子の大腸菌内での発現が, ベクターの *lac* プロモーターによらず, *M. tbc.* AB 由来の signal で発現していることか

Table 3. Proliferative Response of Lymphnode Cells from Lewis Rats Immunized with *M. tbc.* AB, *M. kansasii* or *M. intracellulare*

Stimulants (μg)	[³ H] TdR incorporation [mean Δ cpm($\pm$ SD)] from rats(n=2) immunized with			
	<i>M. tbc.</i> AB, ¹⁾	<i>M. kansasii</i> ¹⁾	<i>M. intracellulare</i> ¹⁾	Background ³⁾
Exp. 1				
PPDs (1)	4926 $\pm$ 102	938 $\pm$ 234	1482 $\pm$ 359	402 $\pm$ 129
PPD-Y (1)	1334 $\pm$ 247	997 $\pm$ 349	1541 $\pm$ 140	242 $\pm$ 46
PPD-B (1)	969 $\pm$ 168	647 $\pm$ 156	2705 $\pm$ 162	228 $\pm$ 18
AT01 (6)	1443 $\pm$ 346	N. D. ⁴⁾	N. D.	496 $\pm$ 154
AT01 (0.6)	3187 $\pm$ 115	633 $\pm$ 98	1755 $\pm$ 509	806 $\pm$ 154
AT01 (0.06)	2101 $\pm$ 7	809 $\pm$ 144	2511 $\pm$ 419	501 $\pm$ 83
<i>E. coli</i> ²⁾ (0.1)	489 $\pm$ 98	156 $\pm$ 18	349 $\pm$ 57	347 $\pm$ 42
Saline	434 $\pm$ 102	141 $\pm$ 10	159 $\pm$ 13	196 $\pm$ 59
Exp. 2				
PPDs (1)	1875 $\pm$ 291	780 $\pm$ 60	2407 $\pm$ 80	823 $\pm$ 73
PPD-Y (1)	N. D.	532 $\pm$ 45	N. D.	889 $\pm$ 60
PPD-B (1)	N. D.	N. D.	2595 $\pm$ 48	1215 $\pm$ 57
AT201 (10)	2123 $\pm$ 120	1315 $\pm$ 61	2445 $\pm$ 138	2063 $\pm$ 232
AT201 (1)	1493 $\pm$ 99	547 $\pm$ 26	1890 $\pm$ 278	1415 $\pm$ 192
AT201 (0.1)	892 $\pm$ 91	265 $\pm$ 55	1265 $\pm$ 33	794 $\pm$ 127
<i>E. coli</i> ²⁾ (0.1)	696 $\pm$ 13	355 $\pm$ 43	1128 $\pm$ 251	799 $\pm$ 19
Saline	579 $\pm$ 22	264 $\pm$ 26	726 $\pm$ 226	553 $\pm$ 169

1) Sonic extract from mycobacterial cells.

2) *E. coli* K-12 DHI carrying pUC18 only.

3) Saline+ IFA.

4) Not done.

ら、大腸菌リボゾーム結合部位 (SD 配列) と類似の配列が存在すると考え、次のように考察した。すなわち、このコンセンサス配列に相当する AGGA が、481 塩基 ATG の上流、466~469 塩基に認められたが、439 塩基 GTG には認められなかった。したがって、前者の ATG を開始コドンとするオープンリーディングフレームを採用した。

すでに Shinnick⁹⁾ らは *M. tbc.* Erdman 株の λ gt11 ライブラリーからクローニングされた 65 kD モノクローナル抗体に反応するタンパク遺伝子の塩基配列を決定し、2 個のオープンリーディングフレーム、517 アミノ酸、540 アミノ酸を推定している。さらに Shinnick は、Erdman 株 540 アミノ酸オープンリーディングフレームの上流部分に β -galactosidase 遺伝子を連結したクローンに酵素活性発現が認められることから、540 アミノ酸の発現において、大腸菌内で機能できる、Erdman 株由来の transcriptional signal が稼働していることを示唆している⁹⁾。これは、本研究で推定されたクロンの、自己発現機構を支持するものである。

これらの塩基配列と、今回の 60 kD ペプチド遺伝子を比較すると、後者の 540 アミノ酸オープンリーディングフレームと、100 % の相同性を持ち、いわゆる mycobacterial heat shock protein の 1 つであることが分かった。Shinnick¹⁰⁾ は、このタンパクが細菌全体に共通してみられる common antigen (CAg) の性格、①分子量が 60~65 kD に分布している、②共通部分と特異部分の分子構造をとっている、③immunodominant である、この 3 点を備えていると述べている。アミノ酸レベルでは、先に述べた *E. coli*¹⁰⁾ のほか、*Legionella pneumophila*¹¹⁾、*Borrelia burgdorferi*¹²⁾、*Coxiella burnetii*¹³⁾、*Treponema pallidum*¹⁴⁾、*Chlamydia trachomatis*¹⁵⁾ の CAg と、mycobacterial heat shock protein の相互間の相同性が指摘されている。また、モノクローナル抗体レベルでは、*Pseudomonas aeruginosa*、*Neisseria flavescens*、*Rickettsia rickettsii*¹⁰⁾¹⁶⁾、などの CAg の間に交差が認められている。以上のことから、60~65 kD の CAg は、細菌種を超えて広く保存されているタンパクと考えられている。現在、生物進化の系統関係を解析するために、すべての生物に存在する 5S RNA 遺伝子が用いられている。今回私たちがクローニングして得た 60 kD (AT 201) 遺伝子は、細菌全体に保存され、共通に存在するという性格から、抗酸菌内の系統関係を探る 1 つの指標となるかもしれない。

この mycobacterial heat shock protein の免疫学的特性についての知見は報告されているが、細菌内の生理学的機能については不明である。分子進化から考えると、機能的に重要なものほど突然変異の影響を受けにく

く、よく保存されていることから、mycobacterial heat shock protein は、細菌内で何らかの重要な役割を果たしていると推定される。例えば、すでにクローニングされている *Coxiella* CAg *htp* B 遺伝子の 5' 末 1/3 は大腸菌 *ams* 遺伝子と相同性が高く¹³⁾、*ams* 遺伝子は、mRNA の安定性に関与している。今回クローニングした 60 kD ペプチド (AT 201) について類似の機能を検討することは興味ある課題であろう。CAg の発現に関する transcriptional signal については今回の 60 kD 遺伝子のほか *M. tbc.* Erdman 株 65 kD 遺伝子、*Borrelia*、*Coxiella* CAg 遺伝子についても、大腸菌内で機能することのできる signal により発現することが報告されている⁹⁾¹²⁾¹³⁾。分子進化の上でよく保存されているタンパク遺伝子が、種を超えて機能する signal により調節されていること、また、この signal の上位の調節機構の種による異同は重要な課題である。

今回の 60 kD リコンビナントペプチド AT 201 の精製は、2 回のイオン交換クロマトグラフィー操作で行うことができた。Fig. 3-1, B では、pUC18 保持大腸菌吸収抗 PPDs 抗血清と、第 1 回分画標品の反応では、なお 60 kD 以外の複数のバンドが認められた。この説明として、60 kD ペプチドが SDS-PAGE の過程において分解を受け、分解産物に対して抗 PPDs 血清が反応したと考えられる。

結核菌クローニングタンパクの抗原性については、多くの報告がなされている。Oftung¹⁷⁾ らは、ヒト T 細胞クローンに対する Erdman 株 65 kD タンパクの抗原性を検討し、ヘルパー T 細胞に認識されることを示している。Kaufmann¹⁸⁾ は、結核菌感作マウスでの末梢リンパ球に、65 kD タンパク反応性 T 細胞の割合が増加していることを述べている。しかし、これらほとんどの報告では、宿主大腸菌由来のエンドトキシンの混在した試験標品で免疫活性を検討しており、エンドトキシンの干渉については考慮していないか、または対照の background としてしか扱っていない。私たちは、強力な mitogen 活性を持つエンドトキシン混在による相乗作用は、考慮するべきであると考え、すべての標品をエンドトキシン除去カラム Detoxi-Gel 処理し、トキシカラートで確認のうえで実験に供した。今回の 15 kD ペプチド (AT 01) は DTH 型皮内反応、リンパ節リンパ球増殖反応ともにホモログな *M. tbc.* AB 感作動物に対し、惹起抗原として PPDs 様の作用を持つ一方、*M. intracellulare*、*M. kansasii* 感作では、比較的反応が低く、*M. tbc.* AB 感作に特異的であることが分かった。

しかし、60 kD ペプチド (AT 201) は、DTH 型皮内反応では、感作抗原による特異性は認められず、非特異的な惹起抗原として作用していた。一方、リンパ節リ

ンパ球増殖反応では、非感作動物リンパ球に対しても刺激作用を示した。これは、① 60 kD ペプチド自体が mitogen 活性を持つ、② 60 kD ペプチドが細菌一般の CAg の性格をもち、すでに他の菌の CAg に感作されたリンパ球を刺激した、③ mycobacterial heat shock protein は細菌のみならず、動物抗原との共通性も報告されており^{19)~21)}、この場合自己応答性 T 細胞を活性化した、などが考えられる。③ の場合、リウマチなどの自己免疫疾患と CAg との関係も議論されており、現在、60 kD ペプチドは診断抗原よりも、感染防御や自己免疫疾患の面からの興味が持たれている^{18)22)~24)}。非感作動物に対する 60 kD ペプチド (AT 201) の、*in vivo* の DTH 型皮内反応と、*in vitro* のリンパ節リンパ球増殖反応の解離については、前者は後者に比べて多様な免疫細胞が関与しているためと考えられるが、さらに詳細な検討が必要である。

60 kD ペプチド (AT 201) の菌体内局在については、*M. leprae* 65 kD が細胞壁ペプチドグリカンに結合しているという報告がある²⁵⁾。今回 60 kD のスクリーニングに用いた抗体は抗 PPDs 抗血清であり、PPDs は菌体ではなく培養濾液から得られたものである。しかし、この 60 kD ペプチドは菌体に対するモノクローナル抗体でクローニングした Erdman 株 65 kD タンパクと同一であった。この説明として、① 培養濾液に菌体自己融解物として溶出している、② 60 kD ペプチドが菌体から遊離しやすい構造で存在している、③ 60 kD ペプチドには、15 kD ペプチドに認められるシグナルペプチドは認められなかったが、結核菌特有の分泌機構により、培養濾液中に分泌されている、などの可能性が考えられる。

本邦における、現在までの結核菌抗原遺伝子のクローニングには、2つの方法が取られている。1つは大腸菌で発現したペプチドを抗体でスクリーニングする方法である。この方法ではクローニングされるペプチドには、① 抗原活性があり、② 大腸菌内でも安定して合成されるペプチド、という制限がある。近年、新しい方法として、すでに物理化学的方法で、精製されたタンパクの N 末端アミノ酸配列をもとに合成された DNA プローブによるクローニングが行われている。この方法では、① タンパクが精製されたアミノ酸配列が既知であるものに限られること、② 大腸菌内で発現されるか否かが不明であること、などの問題があるが、すでに松尾、寺坂らは合成 DNA プローブを用い、 α 抗原²⁶⁾、MPB 57²⁷⁾、MPB 64²⁸⁾ のクローニングを行っている。

結核菌感染免疫は、今まで宿主と菌体の相互関係、ことに宿主の反応の解析に重きがおかれてきた。分子生物学的手法の発展によりクローニングされた結核菌タンパクの免疫能、感染防御能などが天然抗原と比較して論じら

れている。しかし、結核菌感染の菌体側の因子は、タンパク抗原だけでなくワックス D、コードファクター、多糖体、ペプチドグリカン等の biological response modifier (BRM) 因子、細胞内寄生に関与する多くの因子など、多岐にわたっている。これらさまざまな因子の中でのクローニングペプチドの位置付けが今後の問題となるであろう。

結 語

本邦 PPDs の標準株 *Mycobacterium tuberculosis* 青山 B 株 DNA ライブラリーを、プラスミドベクター pUC 18 を用いて作製し、抗 PPDs 抗血清と反応する 7 個のペプチド抗原の遺伝子をクローニングした。すでに塩基配列、オープンリーディングフレームを報告した 15 kD ペプチド (AT 01) を発現するクローン、pAT 01 に加え、60 kD ペプチド (AT 201) を発現するクローン pAT 201 挿入遺伝子について同様の検討を行った。データベースで参照したところ、60 kD 構造遺伝子は、いわゆる mycobacterial heat shock protein の 1 つと高い相同性が認められた。前報の pAT 01 と今回の pAT 201 の発現ペプチドは、その発現機構から、融合タンパクではなく結核菌ペプチドのみから構成されていると考えられた。そこで、DEAE クロマトグラフィーとエンドトキシン除去カラムを用いて組換え大腸菌からの 15、60 kD ペプチド (AT 01、AT 201) の精製を試み、これらに対して、15 kD ペプチド (AT 01) は、PPDs に類似した特異性を持つ惹起抗原であることが分かった。一方、60 kD ペプチド (AT 201) は結核菌以外の抗酸菌感作動物に、非特異的に反応するのみならず、*in vitro* では非感作動物のリンパ節リンパ球にも mitogen 活性を示し、bacterial common antigen としての免疫学的特徴を持つことが分かった。さらに、これらリコンビナントペプチドの結核菌感染における他の細菌成分との相互関係、本邦における結核菌タンパクのクローニングについて文献的に考察した。

文 献

- 1) Young, R. A., Bloom, B. R., Grosskinsky, C. M. et al. : Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. Proc Natl Acad Sci USA, 82 : 2583-2587, 1985.
- 2) Young, R. A., Mehra, V., Sweetser, D. et al. : Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite *Mycobacterium leprae*. Nature, 316 : 450-452, 1985.
- 3) 田中公子 : 結核菌青山 B 株ペプチド抗原遺伝子のクローニング—15 kilodalton (AT 01) ペプチド

- を発現する遺伝子について一, 結核, 64 : 351~360, 1989.
- 4) Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. : Improved M13 phage cloning vectors and host strains ; nucleotide sequences of M13-mp18 and pUC19 vectors, *Gene*, 33 : 103-119, 1985.
 - 5) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (ed) : *Molecular Cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N. Y., 1982.
 - 6) Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. : DNA sequencing chain terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci USA*, 74 : 5463-5467, 1977.
 - 7) Thole, J. E. R., Keulen, W. J., Kolk, A. H. J. et al. : Characterization, sequence determination and immunogenicity of a 64-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* BCG expressed in *Escherichia coli* K-12. *Infect Immun*, 55 : 1466-1475, 1987.
 - 8) Mehra, V., Sweetser, D. and Young, R. A. : Efficient mapping of protein antigenic determinants, *Proc Natl Acad Sci USA*, 83 : 7013-7017, 1986.
 - 9) Shinnick, T. M. : The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Bacteriol*, 169 : 1081-1088, 1987.
 - 10) Shinnick, T. M., Vodkin, M. H. and Williams, J. C. : *Mycobacterium tuberculosis* 65-kDa antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to the *Escherichia coli* GroEL protein, *Infect Immun*, 56 : 446-451, 1988.
 - 11) Hoffman, P. S., Butler, C. A. and Quinn, F. D. : Cloning and temperature-dependent expression in *Escherichia coli* of a *Legionella pneumophila* gene coding for a genus-common 60-kilodalton antigen, *Infect Immun*, 57 : 1731-1739, 1989.
 - 12) Hansen, K., Bangsbo, J. M., Fjordvang, H. et al. : Immunochemical characterization of and isolation of the gene for a *Borrelia burgdorferi* immunodominant 60-kilodalton antigen common to a wide range of bacteria, *Infect Immun*, 56 : 2047-2053, 1988.
 - 13) Vodkin, M. H. and Williams, J. C. : A heat shock operon in *Coxiella burnetii* produces a major antigen homologous to a protein in both mycobacteria and *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 170 : 1227-1234, 1988.
 - 14) Hindersson, P., Knudsen, J. D. and Axelsen, N. H. : Cloning and expression of *Treponema pallidum* common antigen (Tp-4) in *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol*, 133 : 587-596, 1987.
 - 15) Morrison, R. P., Belland, R. J., Lyng, K. et al. : Chlamydial disease pathogenesis. The 57-kD chlamydial hypersensitivity antigen is a stress response protein, *J Exp Med*, 170 : 1271-1283, 1989.
 - 16) Young, D. B., Ivany, J., Cox, J. H. et al. : The 65kDa antigen of mycobacteria—a common bacterial protein ? *Immunol Today*, 8 : 215-229, 1987.
 - 17) Oftung, F., Mustafa, A. S., Husson, R. et al. : Human T cell clones recognize two abundant *Mycobacterium tuberculosis* protein antigens expressed in *Escherichia coli*., *J Immunol*, 138 : 927-931, 1987.
 - 18) Kaufmann, S. H. E., V  th, U., Thole, J. E. R. et al. : Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein, *Eur J Immunol*, 17 : 351-358, 1987.
 - 19) Lamb, J. R., Bal, V., Mendez-Samperio, P. et al. : Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity, *Inter Immunol*, 1 : 191-196, 1989.
 - 20) Res, P. C. M., Schaar C. G., Breedveld, F. C. et al. : Synovial fluid T cell reactivity against 65kD heat shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis, *Lancet*, 8609 : 478-480, 1988.
 - 21) van den Broek, M. F., Hogervorst, E. J. M., van Bruggen, C. J. et al. : Protection against streptococcal cell wall-induced arthritis by pretreatment with the 65-kD mycobacterial heat shock protein, *J Exp Med*, 170 : 449-466, 1989.
 - 22) Shinnick, T. M., Sweetser, D., Thole, J. et al. : The etiologic agent of leprosy and tuberculosis share an immunoreactive protein antigen with the vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG., *Infect Immun*, 55 :

- 1932-1935, 1987.
- 23) Koga, T., Wand-Württenberger, A., De-Bruyn, J. et al. : T cells against a bacterial heat shock protein recognize stressed macrophages, *Science*, 245 : 1112-1115, 1989.
- 24) Hasson, R. N. and Young, R. A. : Genes for major antigens of *Mycobacterium tuberculosis* : the etiologic agents of tuberculosis and leprosy share an immunodominant antigen, *Proc Natl Acad Sci USA*, 84 : 1679-1683, 1987.
- 25) Hunter, S. W., Mcneil, M., Modlin, R. L. et al. : Isolation and characterization of the highly immunogenic cell wall-associated protein of *Mycobacterium leprae*, *J Immunol*, 142 : 2864-2872, 1989.
- 26) 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.
- 27) Yamaguchi, R., Matsuo, K., Yamazaki, A. et al. : Immunogenic protein MPB57 from *Mycobacterium bovis* BCG : molecular cloning, nucleotide sequence and expression, *FEMS Lett*, 240 : 115-117, 1988.
- 28) Yamaguchi, R., Matsuo, K., Yamazaki, A. et al. : Cloning and characterization of the gene for immunogenic protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG, *Infect Immun*, 57 : 283-288, 1989.