

Mycobacterium bovis BCG Tokyo株の培養濾液より単離したMPB63：遺伝子と免疫学的特性

河尻 克秀

要旨：MPT63は *M. tuberculosis* H₃₇Rvの培養濾液から最初に永井らにより分離された分泌タンパクである。本研究では *M. bovis* BCG Tokyo株のソートン培地8日目の培養濾液から、永井らの方法によりこのタンパクの分離精製を行った。その結果、*M. bovis* BCG Tokyo株も、このタンパクを分泌しており、さらに種々抗酸菌についてMPT63をコードする *mpt63* 遺伝子の存在をPCR法で調べた結果、*M. tuberculosis* complexに特異的であった。従って *M. bovis*由来のタンパクについては、抗酸菌の他の主要分泌タンパクであるMPB59やMPB64などと同じように、MPB63またはMPB/T63と呼ぶのが適切である。またMPB63とMPT63のタンパクをコードする遺伝子の塩基配列を比較した結果、一塩基のみの違いであり、アミノ酸レベルでこの両者は全く同じタンパクであることが分かった。

M. bovis BCGの生菌、加熱死菌または *M. tuberculosis*の加熱死菌で免疫したモルモットのいずれにおいても、皮内注射したMPB63に対して遅延型反応はみられなかった。しかし、MPB63を抗原としてELISA法により結核患者血清の抗体を調べたところ、感度74%、特異性96%であった。従って、結核の血清診断用抗原の1つとして有望なタンパクであると考えられる。

キーワード：MPB63, 分泌タンパク, 培養濾液, BCG, PCR, ELISA

はじめに

永井は *M. tuberculosis* および *M. bovis* BCGの培養濾液中のタンパクについて広範な研究を行い電気泳動パターンに基づいて主要なタンパクスポットに対する命名法を確立した。*M. tuberculosis*の場合はMPT、*M. bovis*の場合はMPBとし、電気泳動の相対移動度の値を附する方式である。MPT63は *M. tuberculosis*の培養濾液から最初に永井らにより分離命名された分泌タンパクである¹⁾。*M. kansasii*、*M. avium*培養濾液の電気泳動後のスポットには抗MPT63抗体と反応するものはなく、また、サザンハイブリダイゼーションによる *mpt63* 遺伝子の解析でも *M. avium*、*M. kansasii*、*M. smegmatis* および *M. he-mophilum*はこの遺伝子を持っていない²⁾。さらに抗MPT63抗体は *M. bovis*のPPDにより吸収されるが、*M. avium*のPPDでは吸収されないことから²⁾、このタンパクは *M. tuberculosis* complexに特異的であると考えられ

ている。また Sugdenら³⁾は、*M. bovis* BCG Tokyo株の培養濾液から ConA-Sepharoseクロマトグラフ法により17kDaのタンパクを分離した。永井らが *M. tuberculosis*の培養濾液から、Phenyl Sepharoseカラム等を組み合わせた方法で分離した18kDaのMPT63とN-末端のアミノ酸配列の相同性が高いことから、彼らはこの17kDaのタンパクを、*M. bovis*の他の主要分泌タンパクであるMPB59やMPB64などと同じように⁴⁾、*M. bovis*由来であることからMPB63と呼ぶのが適切である、と記述したのがMPB63の最初の報告である。

この報告はMPB63とMPT63の全アミノ酸159個¹⁾のうち、N-末端の5アミノ酸を比較したもので、全アミノ酸配列について検討した結果ではない。またMPB63とMPT63が同じタンパクであるか、どの程度異なるのかを知るためにそれぞれの菌種でこのタンパクをコードしている遺伝子の塩基配列の差異を比較した報告はない。さらに遺伝子増幅法を用いた *mpt63* 遺伝子の有無か

ら、*M. bovis* BCGの亜株や非結核性抗酸菌中での、このタンパクの分布の報告はない。そこで、著者は永井らが*M. tuberculosis*の培養濾液からMPT63を分離精製した方法で、*M. bovis* BCG Tokyo株の培養濾液からMPB63が分離精製できるかどうかを検討した。

また各種の抗酸菌で*mpt63*遺伝子の存在を調べ、さらにこのタンパクの免疫学的特性を検索し、結核の血清診断用または遅延型反応を利用した診断用の抗原としての可能性を探るため、基礎的検討を行った。

材料と方法

[*M. bovis* BCG Tokyo 172株培養濾液からのMPB63の分離精製]

永井らが*M. tuberculosis*の培養濾液からMPT63を分離精製した方法¹⁾で行った。

培養濾液：MPB63を単離する原料として、*M. bovis* BCG Tokyo 172株をソートン合成培地で8日間表面培養した後の培養濾液を用いた。

検体の濃縮：ミリポアペリコンカセットシステムXX42PEL60（ミリポア製）およびアミコンYM-5メンブレン（Amicon YM-5 membrane, アミコン製）、攪拌式セルSTIRRED CELLS 8400（ミリポア製）を用いた。

透析：スライド-A-ライザー（Slide-A-Lyzer, PIERCE製）を用いた。

カラム：DEAE-Sepharose CL-6B, Sephacryl S200HRおよびPhenyl Sepharose CL-4B（ファルマシアLKB製）を組み合わせて用いた。

フラクションコレクター：FRACTION COLLECTOR SF-2100（アドバンテック東洋製）を用いた。

電気泳動：カセット電気泳動槽「第一」、SDS-PAGEグラジエントゲルプレート、2D-銀染色試薬・II「第一」（第一化学薬品製）を用いた。

タンパク定量：Bio-Rad Protein Assay（Bio-Rad Laboratories製）とBCA Protein Assay Reagent A, B（PIERCE製）を用いた。

なお、精製の詳細を「結果」の項に記した。

[抗酸菌中の*mpt63*遺伝子の検索]

使用菌株：*M. tuberculosis* 2株、*M. bovis* BCG 5株および臨床分離株を含む抗酸菌33株を用いた。

PCR反応：サーマルサイクラー（ミニサイクラー、MJリサーチ製）、TaKaRa Ex Taq（TaKaRa製）を用いた。

電気泳動：Mupid-2（ミリポア製）、NuSive 3:1 Agarose（TaKaRa製）を用いた。

① *mpt63*のPCR用プライマーの構築

MancaによるMPT63タンパクをコードする遺伝子の塩基配列²⁾から、プライマーの設計を行った。

プライマー T-63-S：

5'-CCTAACGATGACCGACACCG-3'

プライマー T-63-A：

5'-ATCAGCAGATCCTCCATGCC-3'

PCR Product size：348 bp, Annealing Temperature：59.8℃と計算された。

② Mycobacteria 40菌株のDNA抽出とPCR

DNA抽出とPCR：1%小川培地（日本ビーシージー製造）に培養した各菌株一白金耳をTritonX-100加 Tris-EDTA Buffer (pH 8.0) 100 μ l中に懸濁し、100℃30分間加熱して溶菌させた後、遠心分離した上清中のDNA含量を測定し、各株のDNA含量をそろえそれぞれPCR用DNA Templateとした。

このTemplate 2.0 μ l, PCR buffer 5.0 μ l, dNTPs 8.0 μ l, TaqDNAポリメラーゼ0.25 μ l, プライマー T-63-SとT-63-Aをそれぞれ2.5 μ lおよび滅菌水29.75 μ lを混合し、次の条件でPCR反応を行った。

First Denaturation	94℃	10 min.
Denaturation	94℃	1 min.
Annealing	60℃	1 min.
Extension	72℃	1 min.
Denaturation → Extension		30 cycles
Termination	72℃	10 min.

PCR反応終了後、PCR産物10 μ lとゲルローディングバッファー（プロモフェノールブルー含有）2 μ lを混合し、3% NuSive 3:1 Agarose gelで電気泳動を行った。泳動後Ethidium Bromideで染色し、UV-Transilluminatorでバンドを確認した。

[MPT63（結核菌由来）とMPB63（BCG由来）の遺伝子レベルでの比較]

DNAシーケンシング：GENECLEAN II kit（BIOFLOAT製）、日製産業（株）科学機器センターの協力でDNAシーケンサSQ5500E（日立製）を用いて行った。

[MPB63の免疫学的特性]

モルモット：ハートレイ系アルビノ種雌（日本医科学動物）体重約300gを用いた。

BCG生菌：*M. bovis* BCG Tokyo株生菌として、凍結乾燥BCGワクチン（日本ビーシージー製造）にPBSを5 mg/mlとなるように加え懸濁しその0.1 ml (0.5 mg/head)を下腹部皮下に接種し免疫した。

BCG加熱死菌：PBSで40 mg/mlに懸濁した凍結乾燥BCGワクチンを121℃で15分間高圧蒸気滅菌した。その4.0 mg/0.1 mlをメノウ乳鉢ですりつぶしながらアジュバントとして流動パラフィン10 mlを加え0.4 mg/mlとし、その0.25 mlずつ計0.5 ml (0.2 mg/head)を左右大腿部筋肉内に接種した。

結核菌加熱死菌：*M. tuberculosis* Aoyama B株を121℃で15分間高圧蒸気滅菌した後、100℃で乾燥し加熱乾燥

死菌体とし、その4.0 mgをメノウ乳鉢で擦りつぶしながらアジュバントとして流動パラフィン10 mlを加え0.2 mg/0.5 mlとし、その0.25 mlずつ計0.5 ml (0.2 mg/head)を左右大腿部筋肉内に接種した。これらのモルモットは免疫してから4週後に実験に用いた。

免疫4週間後にMPB63と対照として精製ツベルクリンPPD (日本ビーシージー製造)を0.0008 μ g, 0.003 μ g, 0.0125 μ g, 0.05 μ g, 0.2 μ gおよび2.0 μ g/0.1 ml/PBSを、脱毛したモルモットの背部の皮内に注射し、24時間後発赤を測定した。

[MPB63を抗原としたELISA法による結核診断]

ELISA: 96穴マイクロプレート (Nunc-Immuno Plate/PolySorp Surface, Nalgen Nunc製), マイクロプレートリーダー MPR-A4i II (東ソー製), ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG2次抗体 (HRP-Goat Anti-Human IgG, Zymed製), 基質としてo-Phenylendiamine (OPD, シグマ製)を用いた。その他の試薬は、和光純薬製を用い、次の方法でELISAを行った。

96穴のマイクロプレートにPBSに溶解したMPB63を0.25 μ g/wellとなるように加え、室温で1晩静置しコーティングした後、0.005% Tween20/PBS (PBS-T) 150 μ lで10分間ブロッキング→PBS-Tで洗浄(3回)→PBS-Tで201倍に希釈した血清を50 μ lずつwellに加える→室温で1時間反応→洗浄(3回)→PBS-Tで500倍に希釈した標識2次抗体 (HRP-Goat Anti-Human IgG)を50 μ lずつwellに加える→室温で1時間反応→洗浄(3回)→クエン酸緩衝液で1 mg/mlに溶解したo-Phenylendiamineを50 μ lずつwellに加え室温で30分間反応→1N H₂SO₄を50 μ lずつwellに加え反応を停止→492 nmのO.D.を測定→抗原がコートしてあるwellのO.D.からブランクのwellのO.D.を引き Δ O.D.を算出した。

対象: 臨床的に結核と診断された結核患者46名とツ反応陽性の健常者45名の血清を用いた。

結 果

(1) *M. bovis* BCG Tokyo172株培養濾液からのMPB63の分離精製

Step 1 培養濾液 (CFP) の濃縮

M. bovis BCG Tokyo172株をソートン培地で8日間培養し、菌体を遠心分離により除去した濾液約100 lを用いた。さらに残存する菌体をNo. 2の濾紙 (東洋濾紙製)で濾過し、ミリポアペリコンカセットシステムでPLCC00005 (分子量5,000)のフィルターを5枚セットし、分子量5,000以下の培地成分や代謝産物を除去して320 mlまで濃縮した。この際、濾液を40~45℃に加温しながら濃縮操作を行うことで、培地中に含まれるグリセリンによる粘度上昇が抑えられ、フィルターを通りや

すくなった。濃縮液をポアサイズ0.22 μ mのミリポアメンブレン (Milipac 60, ミリポア製)を通して除菌し、60%飽和になるように固型硫酸アンモニウムを156 g添加し、タンパクを沈殿させた。CFP 100 lより総タンパク約2.2 gが得られた。

Step 2 Phenyl Sepharoseによるアフィニティ分離

Phenyl Sepharose CL-4Bをカラム (ϕ 25 mm, bed vol. 80 ml, Bio-Rad製)に充填した。Step 1で得られたタンパクの懸濁液のうち約160 ml, 総タンパク量1.1 gを6,000 rpm, 30分間遠心してタンパク部分を集め、カラム上端に添加した。10 mM Tris-HCl (TH7.5)に濃度が500 mM, 200 mM, 100 mMおよび0 mMとなるように硫酸アンモニウムを加えたものを溶出Bufferとして、それぞれ200 ml, 100 ml, 200 mlおよび200 mlで溶出した。溶出は室温で行い10 mlずつ分画した。各分画の溶出パターンをBio-Rad法より求めた。すなわち各分画より20 μ lのSampleを採取し、96穴のマイクロプレートに分注し、5倍希釈したBio-Rad試薬を、それぞれ100 μ l加え発色させ、直ちにOD595nmを測定し溶出パターンを求めた。このパターンとMPT63を標準としたSDS-PAGEによりMPB63が含まれる分画を確認し、硫酸アンモニウム濃度が500 mMと200 mMで溶出した分画No. 17からNo. 37までの210 mlを集め、アミコンYM-5メンブレンをセットした攪拌式セルに入れ13.0 mlに濃縮した。Fig. 1Aに溶出パターンを示す。濃縮液をスライド-A-ライザーに入れて、10 mM TH7.5で透析後、0.45 μ mのフィルターで濾過し、次のstepに用いるまで凍結保存した。

Step 3 DEAE-Sepharose CL-6B / 3% Methylcelluloseによる精製

DEAE-Sepharose CL-6Bをカラム (ϕ 15 mm, bed vol. 75 ml, Bio-Rad製)に充填し、10 mM TH8.7 + 3% MC + 20 mM NaCl Buffer 500 mlで平衡化した。Step 2で得られたサンプルを添加し、平衡化に用いたBufferに20 mMから350 mMの濃度勾配となるようにNaClを加えた溶出Bufferで溶出した。溶出は10℃で行い5 mlずつ分画した。前Stepと同様に各分画の溶出パターンおよび電気泳動パターンから集める分画を決定した。ただし、溶出パターンには、BCA試薬 (PIERCE製)を用いた。MPB63を含む分画No. 34からNo. 42までの40 mlを集め、同様に3.6 mlに濃縮し、透析後凍結保存した。

Step 4 Phenyl Sepharoseによるアフィニティ分離

Phenyl Sepharose CL-4Bをカラム (ϕ 25 mm, bed vol. 80 ml, Bio-Rad製)に充填し、10 mM TH7.5 + 900 mM硫酸アンモニウム150 mlで平衡化した。Step 3で得られたタンパク溶液3.6 mlに900 mMとなるように硫酸アンモニウム428 mgを加えカラム上端に添加し、10 mM

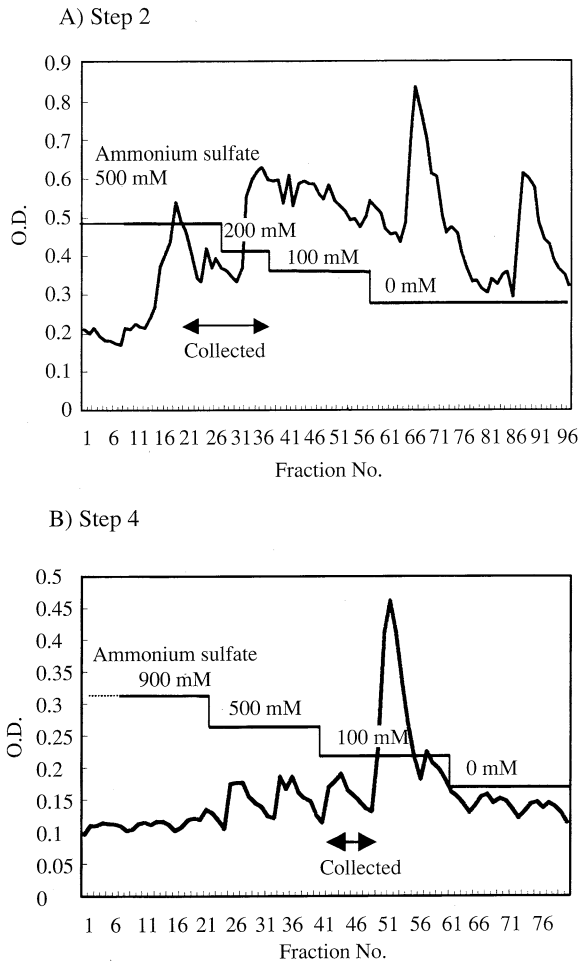


Fig. 1 Isolation step 2 and 4.

- A) The concentrated culture fluid was applied to a Phenyl Sepharose CL-4B column and eluted with Tris buffer containing stepwise decreasing concentrations of Ammonium sulfate.
- B) Elution pattern from a Phenyl Sepharose CL-4B column with Tris buffer containing stepwise decreasing concentrations of Ammonium sulfate.

Tris-HCl (TH7.5) に、濃度が900mM, 500mM, 100mM および 0mM となるように硫酸アンモニウムを加えたものを溶出 Buffer として、それぞれ150ml, 200ml, 200ml および 200ml で溶出した。溶出は室温で行い10ml ずつ分画した。前 Step 同様各分画の Bio-Rad 法による溶出パターンおよび電気泳動パターンから集める分画を決定し、MPB63 を含む分画 No. 40 から No. 49 までの100ml を集め、3.0ml に濃縮し、透析後凍結保存した。Fig. 1B は Step 4 の溶出パターンを示す。以下のステップには、同様の行程で得られた2回分のサンプル計約6.0ml を合わせて用いた。

Step 5 DEAE-Sepharose CL-6B / 3M Urea, Gradient NaCl による精製

DEAE-Sepharose CL-6B をカラム (ϕ 25mm, bed vol.

230ml, Bio-Rad 製) に充填し、30mM TH7.5 + 3M Urea + 20mM NaCl Buffer 500ml で平衡化した。Step 4 で得られたタンパク溶液6.0ml に3M となるように尿素1.2g を加えた。これをカラムに添加し、平衡化に用いた Buffer に20mM から100mM の濃度勾配となるように NaCl を加えた溶出 Buffer で溶出した。溶出は10°C で行い5ml ずつ分画した。前 Step と同様に各分画の溶出パターンおよび電気泳動パターンから集める分画を決定し、MPB63 を含む分画 No. 97 から No. 120 までの120ml を集め、4.0ml に濃縮し透析後保存した。ただし、溶出パターンには BCA 試薬 (PIERCE 製) を用いた。

Step 6 S200HR/10% EG, 0.3M NaCl による分子篩い

Sephacryl S-100 High Resolution をカラム (ϕ 2.5mm, bed vol. 545ml, Bio-Rad 製) に充填し、10mM TH7.5 + 10% EG + 0.3M NaCl Buffer 500ml で平衡化した。Step 5 で得られたサンプル4.0ml に最終10% となるように EG (Ethylene Glycol Monomethyl Ether) 0.44ml および微量の NaCl を加え、カラム上端に添加し、平衡化に用いた Buffer で溶出した。溶出は10°C で行い5ml ずつ分画した。前 Step と同様に各分画の溶出パターンおよび電気泳動パターンから集める分画を決定し、MPB63 を含む分画 No. 65 から No. 74 までの50ml を集め、5.0ml に濃縮、透析後凍結保存した。

Step 7 DEAE-Sepharose CL-6B による精製

DEAE-Sepharose CL-6B カラム (ϕ 15mm, bed vol. 70ml, Bio-Rad 製) を30mM TH8.7 + 40mM NaCl Buffer 500ml で平衡化した。Step 6 で得られたサンプル5.0ml をカラム上端に添加し、平衡化に用いた Buffer に40mM から70mM の濃度勾配となるように NaCl を加えた溶出 Buffer で溶出した。溶出は10°C で行い5ml ずつ分画した。前 Step と同様に各分画の溶出パターンおよび電気泳動パターンから集める分画を決定し、MPB63 を含む分画 No. 43 から No. 51 までの45ml を集め3.0ml に濃縮し、透析後最終精製 MPB63 として凍結保存した。Fig. 2A は、Step 7 の溶出パターン、Fig. 2B に得られた分画の SDS-PAGE の結果を示す。

M. bovis BCG Tokyo172 株の培養濾液からも、永井らの方法で MPB63 の分離精製が可能であった。ただし収量に関しては、各過程で得られた分画を適宜合わせて最終行程まで行ったので、正確な数値は出せなかったが、100l 当たり換算すると約0.5mg であった。これは同様に培養8日目の濾液から精製した同じ分泌タンパクである MPB64⁵⁾ に比べ、かなり少ない収量であった。

また、分画を集め透析後の最終精製とした MPB63 の SDS-PAGE を行った結果、18kDa のバンドの他に36kDa にもバンドが見られたことにより、このタンパクは Dimer を形成するものと思われる (Fig. 3)。

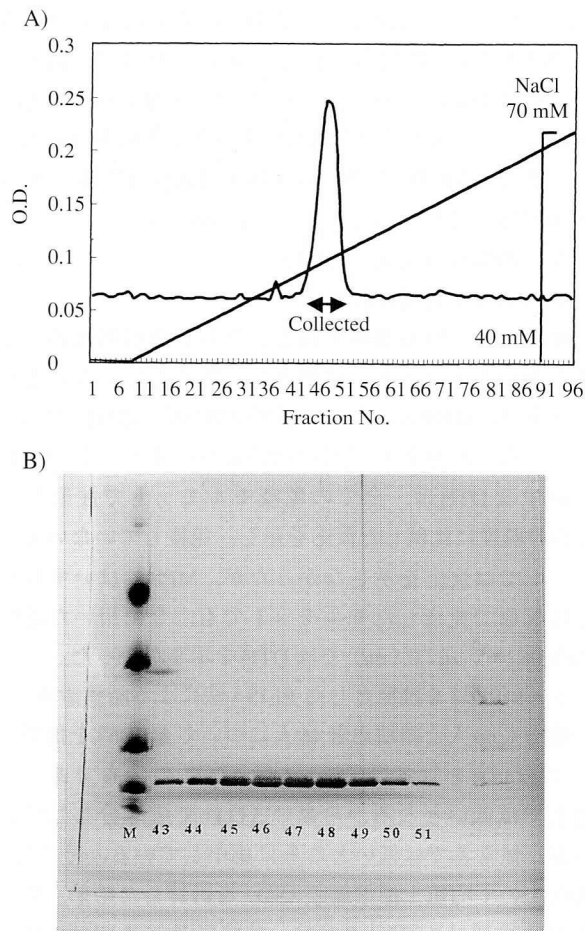


Fig. 2 Isolation step 7.

A) Elution pattern from a DEAE-Sepharose CL-6B column with a NaCl gradient in Tris buffer.

B) SDS-PAGE analysis of the fractions.

M : Molecular size marker—6.5(lowest), 14.3, 20.1, 30 and 45kDa. The gel was stained with silver staining.

(2) 抗酸菌中の *mpt63* 遺伝子の検索

MPT63は、分子量18 kDaの分泌タンパクでありDNAハイブリダイゼーションと、抗MPT63抗体を用いたイムノブロットングの結果から、結核菌群に特異的であるといわれている。しかしながら、BCG菌株間でこのタンパクをコードする遺伝子の有無についての報告はなく、また抗酸菌菌株間での比較も少ない。

そこで、PCR法により種々のBCG菌株および抗酸菌菌株について *mpt63* 遺伝子の有無を調べた結果、PCR産物について分子量348bpのバンドが確認できたのは *M. bovis* BCGの5株と *M. tuberculosis* H₃₇Rvと Aoyama Bのみであった。すなわちこれら結核菌群の菌株には *mpt63* 遺伝子が存在したが、他の非結核性抗酸菌株には存在しなかった (Fig. 4, Table)。このことよりMPT63は結核菌群に特異的なタンパクであると思われる。

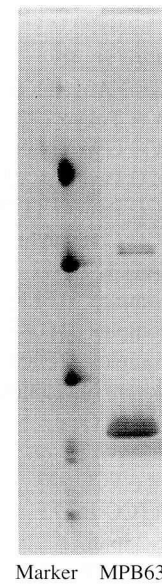


Fig. 3 SDS-PAGE of final product after isolation step 7. Molecular size marker—6.5 (lowest), 14.3, 20.1, 30 and 45kDa. The gel was stained with silver staining.

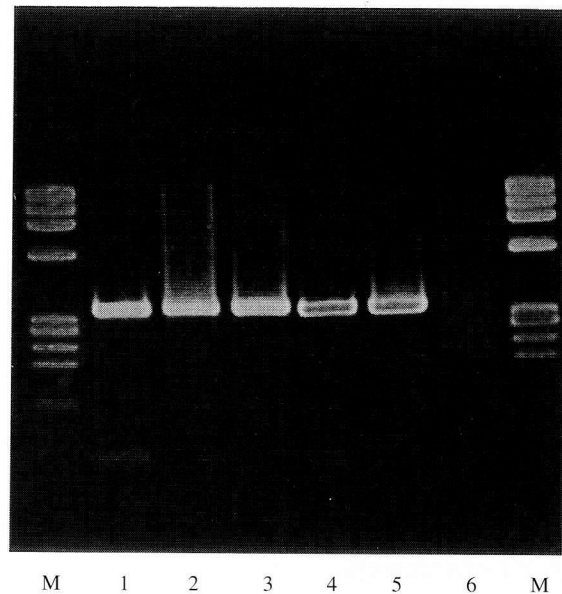


Fig. 4 Genomic analysis of the *mpt63* gene by PCR. PCR products were electrophoresed on 3% agarose gel. Lanes : M. Molecular size markers ϕ 174 *Hae* III digest.

1. *M. bovis* BCG Tokyo 172
2. *M. bovis* BCG Denmark 1331
3. *M. bovis* BCG Glaxo F10
4. *M. bovis* BCG Pasteur 117
5. *M. tuberculosis* H₃₇Rv
6. *M. fortuitum*

PCR product was 348 bp.

Table Genomic analysis of the *mpt63* gene by PCR

		<i>mpt63</i>
1.	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	+
2.	<i>M. tuberculosis</i> Aoyama B	+
3.	<i>M. bovis</i> BCG Tokyo 172	+
4.	<i>M. bovis</i> BCG Glaxo F10	+
5.	<i>M. bovis</i> BCG Denmark 1331	+
6.	<i>M. bovis</i> BCG Pasteur 1173P2	+
7.	<i>M. bovis</i> BCG Connaught	+
8.	<i>M. vaccae</i> ATCC 23002	-
9.	<i>M. avium</i> complex 31F130	-
10.	<i>M. avium</i> complex 31F083	-
11.	<i>M. avium</i> complex 31F008	-
12.	<i>M. scrofulaceum</i> Matsumoto	-
13.	<i>M. scrofulaceum</i> Cole	-
14.	<i>M. scrofulaceum</i> Pierson	-
15.	<i>M. marinum</i> ATCC 927	-
16.	<i>M. avium</i> ATCC 15773	-
17.	<i>M. avium</i> E-38686	-
18.	<i>M. intracellulare</i> Yandle	-
19.	<i>M. intracellulare</i> P41	-
20.	<i>M. intracellulare</i> Howell	-
21.	<i>M. intracellulare</i> Boone	-
22.	<i>M. intracellulare</i> Nakamura	-
23.	<i>M. fortuitum</i> P+Broussard	-
24.	<i>M. fortuitum</i> P+ATCC14407	-
25.	<i>M. fortuitum</i> P-Cruz#1	-
26.	<i>M. chitae</i> ATCC19627	-
27.	<i>M. smegmatis</i> SN-2	-
28.	<i>M. simiae</i> No. 29	-
29.	<i>M. simiae</i> No. 54	-
30.	<i>M. gordonae</i> ATCC 1470	-
31.	<i>M. gordonae</i> ATCC 19277	-
32.	<i>M. gordonae</i> ATCC 23283	-
33.	<i>M. chelonae</i> SN-281	-
34.	<i>M. chelonae</i> Ryder	-
35.	<i>M. triviale</i> WX-2199	-
36.	<i>M. flavescens</i> ATCC 23008	-
37.	<i>M. nonchromogenicum</i> ATCC 19530	-
38.	<i>M. nonchromogenicum</i> ATCC 19531	-
39.	<i>M. phlei</i> ATCC 19249	-
40.	<i>M. gastri</i> ATCC 15754	-

(3) MPT63 (結核菌由来)とMPB63 (BCG由来)の遺伝子レベルでの比較

Mancaらが決定した *M. tuberculosis* のMPT63タンパクをコードする遺伝子の塩基配列からPCR用のプライマーを設計し、*M. bovis* BCG Tokyo172株より前出の方法で抽出したDNAをTemplateとしてPCRを行った。PCR産物を1% Agarose gelで電気泳動し、クマシーブリリアントブルー (CBB) で染色後得られたバンドを切り取り、GENECLEAN II kitでPCR産物のDNAを抽出した。このDNAの塩基配列を解析し、得られた *M. bovis* BCG Tokyo172株由来のDNAの塩基配列と、*M. tuberculosis* 由来のものと比較した (Fig. 5)。

M. tuberculosis 由来の遺伝子では、474番目がアデニン

(A)であったのに対して、*M. bovis* BCG Tokyo172株由来ではチミン (T) であった点 (⇒印) を除けば、他の遺伝子配列は同じであった。さらにアミノ酸レベルで比較すると、この両者は全く同じであることから *M. tuberculosis* 由来のMPT63と *M. bovis* BCG Tokyo 172株由来のMPB63は、同じものであることが分かった。

(4) MPB63の免疫学的特性

MPB63の皮膚反応活性

BCG生菌、BCG加熱死菌および結核菌加熱死菌で免疫したモルモットと、対照として免疫していないモルモットで、MPB63による遅延型皮膚反応 (DTH) を調べたところ、対照として用いた精製ツベルクリン (PPD) に対するDTHは、全ての免疫モルモットで注射したPPDの濃度に比例した反応を示し、免疫していないモルモットでは反応を示さなかったが、MPB63はいずれの免疫抗原で免疫したモルモットでも、今回用いた濃度 (0.0008 ~ 2 μg/0.1ml) ではDTHを示さなかった。

(5) MPB63を抗原としたELISA法による結核診断

健常人45人と結核患者46人についてMPB63を抗原としてELISAを行った。Fig. 6はΔO.D.の分布である。患者では低いところから高いΔO.D.で広く分布しているが、健常人では低いところに集中している。そこで、ΔO.D.の平均値±標準偏差 (SD) を計算した結果、健常人45人の値は0.027 ± 0.0235、結核患者46人では0.22 ± 0.261であり、StudentのT-testでこの両群に有意差を認めた (P < 0.05)。健常人で求めたΔO.D.の平均 + 2S.D.である0.074をカットオフ値とすると、結核患者46人のうち陽性と判定された人は34人、健常人のうち陽性と判定された人は2人であった。この結果から、MPB63を抗原とするELISAの感度73.9%、特異性95.6%、擬陽性率26.1%、擬陰性率4.4%、陽性的中率94.4%、陰性的中率78.2%および有効性84.6%と計算された。

考 察

MPT63は、最初永井らにより *M. tuberculosis* H₃₇Rv株培養濾液より分離され、SDS-PAGEによる分子量18 kDa、159のアミノ酸からなり計算上の分子量は16.5 kDa、そのうち29アミノ酸のシグナルペプチドを持つ結核菌の分泌タンパクである¹⁾。このタンパクは結核菌群に特異的であるといわれているが¹⁾²⁾、*M. bovis* BCG Tokyo 172株もこのタンパクを分泌し、N-末端がMPT63と同じ17 kDaのタンパクとして分離されている³⁾。

このタンパクを発現する遺伝子配列を、*M. tuberculosis* H₃₇Rv株と *M. bovis* BCG Tokyo172株で比較した結果、474番目が前者ではアデニン (A) であったのに対して後者ではチミン (T) であったが、アミノ酸レベルでは両者は同じタンパクであった (Fig. 5)。従って、抗酸菌の

GAC ACC GTT GGC CAA GTC GTG CTC GGC TGG AAG GTC AGT GAT CTC AAA TCC AGC ACG GCA	300
Glu Thr Val Gly Gln Val Val Leu Gly Trp Lys Val Ser Asp Leu Lys Ser Ser Thr Ala	
GTC ATC CCC GGC TAT CCG GTG GCC GGC CAG GTC TGG GAG GCC ACT GCC ACG GTC AAT GCG	360
Val Ile Pro Gly Tyr Pro Val Ala Gly Gln Val Trp Glu Ala ACT Ala Thr Val Asn Ala	
ATT CGC GGC AGC GTC ACG CCC GCG GTC TCG CAG TTC AAT GCC CGC ACC GCC GAC GGC ATC	420
Ile Arg Gly Ser Val Thr Pro Ala Val Ser Gln Phe Asn Ala Arg Thr Ala Glu Gly Ile	
	⇒ T
AAC TAC CGG GTG CTG TGG CAA GCC GCG GGC CCC GAC ACC ATT AGC GGA GCC ACA ATC CCC	480
Asn Tyr Arg Val Leu Trp Gln Ala Ala Gly Pro Glu Thr Ile Ser Gly Ala Thr Ile Pro	
CAA GGC GAA CAA TCG ACC GGC AAA ATC TAC TTC GAT GTC ACC GGC CCA TCG CCA ACC ATC	540
Gln Gly Glu Gln Ser Thr Gly Lys Ile Tyr Phe Asp Val Thr Gly Pro Ser Pro Thr Ile	
GTC GCG ATG AAC AAC GGC ATG GAG GAT CTG CTG ATT TGG GAG CCG TAG ATC GTA GCT AAT	600
Val Ala Met Asn Asn Gly Met Glu Asp Leu Leu Ile Trp Glu Pro *	

Fig. 5 Nucleotide sequence of the gene encoding the MPT63 protein of *M. tuberculosis* and MPB63 protein of *M. bovis* BCG.

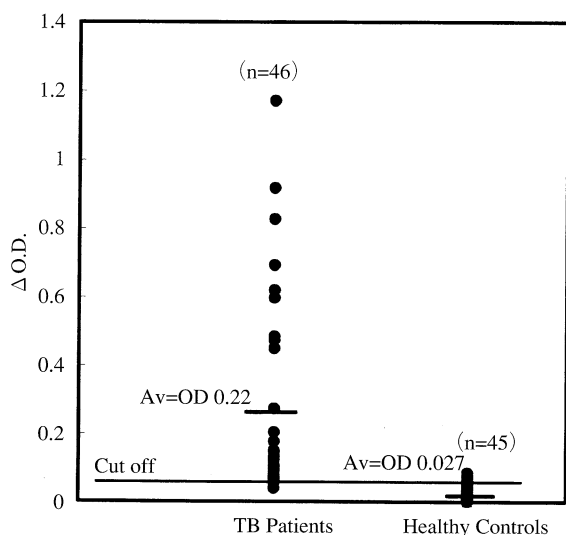


Fig. 6 Distribution of the antibody titers against MPB63 among TB patients and Healthy controls. The cutoff value (0.074) determined as mean delta OD₄₉₂ plus 2 SD by use of Healthy controls.

他の主要タンパクと同じように、結核菌由来のものを MPT63, *M. bovis* 由来のものを MPB63, あるいは両者を統合的に MPT/B63 と呼ぶのが適当であると思われる。

Manca ら²⁾は、種々抗酸菌の *mpt63* 遺伝子の分布をサザンハイブリダイゼーションにより調べた結果、結核菌群に特異的であったとしている。本研究では、PCR 法により *mpt63* 遺伝子の分布を、臨床分離株を含む抗酸菌で調べた結果、Manca らの結果と同様に、結核菌群に特異的であり、*M. tuberculosis* の H₃₇Rv と Aoyama B 株に、また *M. bovis* BCG の 垂株 では Tokyo, Glaxo, Copenhagen,

Pasteur および Connaught 株のいずれにも *mpt63* 遺伝子が存在していたが、非結核性抗酸菌には欠損していた。このことより、結核菌群に特異的な診断用抗原の候補として有望だと思われる。今回、BCG ワクチン製造時に使用される *M. bovis* BCG Tokyo172 株をソートン液体培地で 8 日間培養した培養濾液から、永井らの方法で MPB63 の分離精製を行った。この際に、BCG では MPB70 が多量に分泌され混在しており、初期の Step 2 と Step 3 において溶出 buffer の量を増やし分離を試みたが、この段階では MPB70 を除去することは困難であった。そこで、MPB63 と MPB70 が混在する分画を大胆に除き、Step 4 でもう一度 CL-4B カラムによるアフィニティ精製を行い精製を進めた。しかし、各分画の電気泳動像からみると、培養 8 日目の濾液に含まれる MPB63 の量は非常に少なく、同じ方法で分画した別のサンプルと合わせて精製を行う必要があった。そのために正確な収量は算出できなかったが、計算上は *M. bovis* BCG Tokyo172 株の培養濾液 100l 当たり約 0.5mg と推定された。これは同じ培養 8 日目の *M. bovis* BCG Tokyo 172 株の濾液中に含まれる MPB64 の収量約 15mg に比べると、分泌量が少ないタンパクであるといえる。この MPT63 はシグナルペプチドを持つことより菌体内には蓄積されず、培養液中に蓄積され、*M. tuberculosis* H₃₇Rv 株をソートン液体培地で 3 週間培養した濾液中の分泌量は多い。 *M. bovis* BCG Tokyo 172 株の場合も、培養期間の長い濾液中には、8 日目のものより多く含まれると思われるが、相対的に MPB70 など、他のタンパクの含有量も増加するので、単離できる MPB63 の量は H₃₇Rv 株由来のものに比較して少ないことが予想される。

本研究では単離した MPB63 のアミノ酸配列については検討していないが、先の *mpb63* 遺伝子の検討、および *M. tuberculosis* 培養濾液からの精製法と同様の方法で MPT63 と同じ分子量のものが単離できたことより、*M. bovis* BCG 由来の MPB63 と *M. tuberculosis* 由来の MPT63 は、同じタンパクであると考えられる。

Harth ら⁶⁾は、病原性がない速育菌の *M. smegmatis* と *M. vaccae* を宿主として、*M. tuberculosis* の 16 kDa タンパクをコードする遺伝子を挿入し、リコンビナントタンパクを産生させた。この 16 kDa タンパクは、N-末端の配列と計算上の分子量から、比較・同定されていないが MPT63 と同一タンパク、すなわち MPB63 と同じであると思われる、このリコンビナント MPT63 の収量は、培養液 1 l 当たり 2.5 mg と大量であった。また Manca ら²⁾は、大腸菌を宿主としてリコンビナント MPT63 を産生させ、native MPT63 と比較した結果、これらは同じタンパクであったと報告している。従って、大量の MPB63 が必要な場合、このような遺伝子組み換え技術を用いることができよう。

M. bovis BCG Tokyo172 株の生菌、死菌および *M. tuberculosis* H₃₇Rv 株の死菌でモルモットを免疫し、MPB63 の皮内注射に対する DTH をみた結果、いずれの免疫条件でもコントロールの PPD に対する反応はみられたものの、MPB63 に対しては反応がみられなかった。しかし Lyashchenko ら⁷⁾は、HsdPos:DH 系のモルモットを *M. bovis* BCG 日本株あるいは *M. avium* 生菌で免疫し、MPT63 を 2 μg/0.1 ml 濃度で注射したところ、BCG で免疫したモルモットでは 7.5 ± 1.6 mm、*M. avium* で免疫したものは 0.5 ± 1.0 mm の反応があり、このことより MPT63 は結核菌群に特異的に皮膚反応を惹起するとしている。また、ハートレイ系モルモットに MPT63 にアジュバントを加えて免疫した場合、MPT63 は DTH を誘導するとの報告がある⁸⁾⁹⁾。MPB63 に対して DTH が惹起されたり、されなかったりするものは動物の系統差によるものか、今回使用した抗原濃度 2 μg/0.1 ml が閾値であるのか不明であるが、MPT63 そのもので免疫した場合は反応が惹起されることと、BCG 生菌で免疫して得られた反応は、結核菌群の主要な分泌タンパクである MPB64 に対する反応⁵⁾に比べても非常に弱いことより、生体内でも MPB63 の分泌量が少ないものと思われる。DTH の成立が *in vivo* で分泌される抗原量に依存するとすれば、*in vitro* での *M. tuberculosis* の MPT63 分泌量は BCG に比べ多い¹⁾ことから、*in vivo* での分泌量も BCG に比べ多いと予想され、*M. tuberculosis* 生菌で免疫した場合には、DTH が成立する可能性が想定される。また、MPB64 の場合、結核菌群で免疫したモルモットでは皮内注射で強い DTH が得られるが、ヒトでは皮内注射で反応が出な

い。しかし、投与をパッチ法で行うとヒトでも反応が認められる¹⁰⁾¹¹⁾。MPB63 もこのタンパクと同じように、BCG 生菌で免疫した場合でもパッチ法なら反応が認められるかも知れない。

一方、*M. bovis* BCG Tokyo172 株あるいは *M. tuberculosis* H₃₇Rv 株の死菌をアジュバントと共に注射した免疫動物では、MPB63 は DTH を起こさなかった。他の報告でも、同様な結果であった¹⁾²⁾。これは、MPB63 は分泌性が強く死菌菌体には残存していないためだと思われる。このことより MPB63 は、結核菌が体内で活発に増殖している状態、すなわち活動性の結核症患者のみに特異的に反応する可能性が示唆されるが、前述のように反応が安定しないので DTH による結核診断用抗原として利用については、さらなる検討が必要である。また、末梢血単核球の *in vitro* 刺激による IFN-γ 産生については今後検討する予定である。

また、*M. tuberculosis* を経気道感染させたモルモットの血清について、MPT63 を抗原として ELISA を行った結果、高い抗体価がみられたという報告がある²⁾。さらに、*M. bovis* を感染させた実験的ウシ結核において、種々のタンパクを抗原としてその血清中の IgG を調べたところ、MPT63 は ESAT-6、14-kDa タンパク、MPB70、MPT64 および MPT32 と同様、強い抗体応答を示したことより、ウシ結核の体液性免疫の指標として有望であるとの報告がある¹²⁾。

本研究で、臨床的に結核と診断された人 46 名について、MPB63 を抗原として血清中の IgG 抗体価を調べた結果、陽性率は約 74% であり、この検査だけで血清診断を行うには低い感度であったが、特異性は 96% と高かった。Lyashchenko ら¹³⁾は、MPT63 を含む 10 種類のタンパク抗原を用い結核患者の IgG 抗体を ELISA 法で調べ、健康人の OD 値の平均 + 3SD をカットオフ値として陽性率を算出すると、それぞれ単一抗原の陽性率は低いものの、使用する抗原を何種類か組み合わせることにより、いずれか一種以上の抗原に対して陽性の場合を総合的に「陽性」とすると、結核患者のほぼ 90% を検出できるとしている。これは結核患者により抗原を認識する免疫機構が遺伝的に異なるためだと思われる。従って、何種類かの抗原を組み合わせることで感度を上げることができるが、その反面組み合わせを考えないと、特異性が低下することになる。MPB63 は結核菌群に特異的なタンパクであり、血清診断用の抗原の一つとしてかなり有望な候補タンパクであると思われる。さらに、患者背景と抗体価との関係を検討する必要がある。

抗酸菌の分泌タンパクの中で、その生理機能が分かっているものは少なく、非常によく研究されている

ESAT-6, MPB/T64やMPB70でさえもその機能は分かっていない。MPB/T63についてもその生理的役割についても今後の解明が必要である。

謝 辞

本稿を作成するに当たり、終始ご親切なご指導とご教示を賜りました兵庫医科大学細菌学教室 田村俊秀教授、元日本BCG研究所 中村玲子博士に深謝いたします。また、タンパク精製法に関してご親切なご指導と、MPT63を供与下さいました元大阪市立大学医学部 永井定博士、原稿のご校閲を賜りました日本BCG研究所 戸井田一郎先生、矢野郁也先生に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Nagai S, Wiker HG, Harboe M, et al.: Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1991; 59: 372-382.
- 2) Manca C, Lyashchenko K, Wiker HG, et al.: Molecular cloning, purification, and serological characterization of MPT63, a novel antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1997; 65: 16-23.
- 3) Edward AS, Well KS, Watson DC, et al.: Purification of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo antigens by chromatofocusing, lectin-affinity chromatography, and hydrophobic interaction chromatography. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996; 3: 541-546.
- 4) Li H, Ulstrup J, Jonassen T, et al.: Evidence for absence of the MPB64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 1993; 61: 1730-1734.
- 5) Haga S, Kawajiri K, Niinuma S, et al.: Effective isolation of MPB64 from a large volume of culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo. *Jpn J Med Sci Biol.* 1996; 49: 15-27.
- 6) Harth G, Lee BY, Horwitz MA: High-level heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic mycobacteria of four major *Mycobacterium tuberculosis* extracellular proteins considered to be leading vaccine candidates and drug targets. *Infect Immun.* 1997; 65: 2321-2328.
- 7) Lyashchenko K, Manca C, Colangeli R, et al.: Use of *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific antigen cocktails for a skin test specific for tuberculosis. *Infect Immun.* 1998; 66: 3606-3610.
- 8) Horwitz MA, Lee BW, Dillon BJ, et al.: Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 1530-1534.
- 9) Lee BY, Horwitz MA: T-cell epitope mapping of the three most abundant extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in outbred guinea pigs. *Infect Immun.* 1999; 67: 2665-2670.
- 10) Nakamura RM, Velmonte MA, Kawajiri K, et al.: MPB64 mycobacterial antigen: a new skin-test reagent through patch method for rapid diagnosis of active tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2: 541-546.
- 11) Nakamura RM, Einck L, Velmonte MA, et al.: Detection of active tuberculosis by an MPB-64 transdermal patch: a field study. *Scand J Infect Dis.* 2001; 33: 405-407.
- 12) Lyashchenko KP, Pollock JM, Colangeli R, et al.: Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 1998; 66: 5344-5349.
- 13) Lyashchenko KP, Colangeli R, Houde M, et al.: Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect Immun.* 1998; 66: 3936-3940.

Original Article

ISOLATION OF MPB63 IN THE CULTURE FLUID OF *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG
TOKYO : GENETICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION

Katsuhide KAWAJIRI

Abstract MPT63 is a secretory protein first isolated from a culture fluid of *M. tuberculosis* H₃₇Rv by Nagai et al. In this study, this protein was isolated from an 8-day-culture fluid (Sauton synthetic medium) of *M. bovis* BCG Tokyo 172 according to Nagai's method. It was shown that *M. bovis* BCG Tokyo 172 secreted this protein in the medium. The *mpt63* gene was detected only in the species of *M. tuberculosis* complex by polymerase chain reaction (PCR) among 40 different mycobacterial species. Therefore, it is appropriate to designate this protein as MPB63 or MPB/T63 from *M. bovis* BCG, in similar way as other major secretory proteins of Mycobacteria, such as MPB59 and MPB64. Comparison of the nucleotide sequences of the genes encoding MPB63 protein of *M. bovis* BCG and MPT63 protein of *M. tuberculosis* showed only single nucleotide difference at the position 474 where thymine (T) in the former was replaced by adenine (A) in the latter. Amino acid sequences of both proteins were completely identical. MPB63 didn't show delayed-type hypersensitivity

(DTH) skin reaction in the sensitized guinea pigs with live or heat-killed *M. bovis* BCG or heat-killed *M. tuberculosis*.

However, the measurements of serum IgG antibody titers of active tuberculosis patients by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) showed 74% sensitivity and 96% specificity compared to healthy subjects. Therefore, MPB63 seems to be a promising candidate as an antigen for serodiagnosis of active tuberculosis.

Key words: MPB63, Secretory protein, Culture fluid, BCG, PCR, ELISA

Japan BCG Laboratory

Correspondence to : Katsuhide Kawajiri, Japan BCG Laboratory, 3-1-5, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-0022 Japan. (E-mail : kawajiri@bcg.gr.jp)