

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	大原 由貴子
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 953 号
学位授与の日付	令和2年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Significance of a histone-like protein with its native structure for the diagnosis of asymptomatic tuberculosis (無症候性結核の診断における天然変性ヒストン様蛋白質の生来構造の重要性)
論文審査委員	主査 教授 片貝 智哉 副査 教授 中田 光 副査 准教授 高橋 雅彦

博士論文の要旨

背景と目的

結核は、結核菌感染によって生じる慢性感染症であるが、感染者のほとんどは無症候の潜在性結核であることが知られている。無症候感染者は、結核抵抗性の低下により結核を発症する。したがって、潜在性結核は主要な発生源であり、その対処は重要な問題と認識されている。

潜伏する結核菌は、ほとんど増殖せずに代謝を停止した休眠状態で、この時結核菌内で発現が上昇している主要タンパク質の一つが mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) である。MDP1 は潜在性結核で顕著に発現することから、MDP1 を認識する抗体は、潜在感染の診断マーカーとしての利用が期待されている。しかし、一部の非感染健康者にも抗体応答が検出されるなど、その特異性に問題があった。

一般に抗体は、抗原性蛋白質の一次構造に加え、立体構造を認識することが知られている。しかしながらこれまで、MDP1 の構造を考慮した抗原性解析はなされていなかった。MDP1 の C 末部位は天然変性領域と推定され特定の構造を有しないが、N 末部位には DNA への結合を担うアーム領域があり 2 量体を形成することが示されている。本研究では、特に N 末領域の構造に注目し、①予測される立体構造を有する組み換え MDP1 を精製すること、②その診断抗原としての有用性を検討することで結核の予防・治療の一助となすことを目的とした。

方法

国立遺伝学研究所の GTOP プログラムにより、一次構造配列から 2 次構造予測を行い MDP1 の立体構造を推測した。塩酸を使用しない新たな MDP1 の精製方法として、His-tag 精製後に硫酸沈殿、ヘパリンカラム精製、イオン交換カラム精製を実施して純度を上げ、さらに核酸を除去して全長 MDP1 を精製した。N 末端領域 MDP1 については、His-tag 精製後に硫酸沈殿、イオン交換カラムを 2 回繰り返して核酸を取り除き精製を行った。精製した蛋白質の二次構造を円偏光二色性分析で、多量体形成を沈降速度分析で行った。MDP1 が、潜在感染の診断マーカーとしての利用出来るかを検証するために、陈旧性結核、活動性結核、非感染

健常者由来の血清を用いて ELISA を行った。

結果

国立遺伝学研究所の GTOP プログラムにより、MDP1 の 1 次構造配列から 2 次元構造予測を行った結果、N 末端は、立体構造を形成し原核生物の DNA 結合蛋白質 HU 様で、C 末端部分は一定の構造を形成しない天然変性領域であることが予測された。従来法で精製した MDP1 と塩酸を使用しない新たな方法で精製した MDP1 を、円偏光二色性分析と沈降速度分析を行った結果、従来法では殆どの二次構造がこわれており、新法では立体構造が保持されていた。一方でいずれも生理的な塩濃度では、単量体であった。次ぎに ELISA により、新たな方法で精製した MDP1 が、潜在感染の診断抗原となり得るかを検証した。陳旧性結核、活動性結核、非感染健常者由来の血清を検体として用いた。その結果、従来法で精製した MDP1 を抗原とした場合、非感染健常者の血清で高い反応がみられた。一方で新しい精製法で精製した MDP1 を用いると無症候感染者では高値で、非感染健常者では低値であった。N 末端を抗原とした場合は、陳旧性結核、活動性結核、非感染健常者由来のすべてにおいて抗体価は低値であった。

考察

MDP1 に対する抗体応答で無症候感染を検出するには、予測したように、生来の構造をとる MDP1 を調整する必要があることが分かった。しかし MDP1 の N 末は 2 量体を形成する HU と類似する構造と予測されたが、実際には 2 量体を形成していないことも判明した。これは、MDP1 に特有の C 末の天然変性領域が関与していると考えられる。ELISA において N 末端のみでは抗原性に乏しかったことから、MDP1 の C 末端部分が抗体認識部位であることが推測された。この要因には、天然変性領域が親水性に富み表面に露出しやすいため、抗体の標的となりやすいことが考えられる。一方で、天然 N 末領域の正しい構造が、抗体が認識する C 末天然変性領域の構造に影響する可能性も示唆された。結核の発生源母体である潜在性結核を検出するために抗体の利用が期待される中、抗原の構造を考慮する必要性が本論文により示されたと考えられる。

審査結果の要旨

人類の 1/3 におよぶ無症候の結核菌感染が、結核の発生源母体となっている。したがって無症候感染を的確に検出できる診断法の開発が希求されている。Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) は、結核菌の静止期以降に顕著に発現が増強し、休眠を誘導する蛋白質である。したがって MDP1 を認識する抗体は、潜伏感染の診断マーカーとしての利用が期待されているが、非感染健常者にも抗体が検出されるなど、その特異性に問題があった。

本研究では、抗体が抗原の立体構造も認識することから、組み換え MDP1 蛋白質の構造に注目し、蛋白質の二次構造を円偏光二色性分析で、多量体形成を沈降速度分析やグルタルアルデヒド架橋実験等によって検討しながら、精製法を改善し、予測される生来の立体構造に近く、核酸の混入のない、組み換え蛋白質を精製することに成功した。実際に、非感染者、陳旧性結核、活動性結核患者の血清 IgG の反応性を解析した結果、抗 MDP1 抗体は、活動性結核に比べて陳旧性結核患者において高値で、従来法で精製した MDP1 を抗原とした場合、非感染健常者の IgG の反応が確認される一方、新しい精製法で精製した MDP1 を用いた場合、それは顕著に低減した。

本論文は、抗体診断における抗原の二次構造の重要性を再確認し、無症候結核菌感染診断法開発における有用な見解を示したことから、博士論文としての価値を認める。