

結核菌および抗酸菌外膜の
薬物非透過性メカニズムの研究

神戸薬科大学薬学部

長谷川 健

結核菌および抗酸菌外膜の薬物非透過性メカニズムの研究

1. 研究の背景と目的

国民病とまで言われた自然の脅威、結核は、栄養状況の劇的な改善と、薬物治療の効果が効を奏し、過去 20 年ほどの間に“結核は過去の病気である”という観念が定着するにいたった。しかし、近年になって、減少傾向にあった結核患者の数が増加に転じ、加えて HIV 感染者の結核感染や多剤耐性結核菌の出現により、再び結核は現実に脅威となりつつある。過去 20 年の間に、結核菌研究者人口も激減し、結核菌の構造に関する研究が宙に浮いたまま現在の脅威を迎えたことになり、今後の抗結核薬開発に、結核菌の性質を詳しく知ることは急務と考えられる。

結核菌は、グラム陽性桿菌に分類される抗酸菌の一種で、染色を受けにくいことや、一度染色されると容易には脱色されない性質、それに細胞分裂の速度が非常に遅い事で知られている。しかし、マクロファージに捕食された後、なぜ死滅しないことがあるのか、あるいは、薬物投与に対して頑丈で居られる理由は何か、といった根本的な性質が何もわかっていない。これまでの結核菌研究は、薬物のスクリーニングテストだけがよりどころであった。

そこで、本研究では、結核菌を取り巻く外膜 (cell envelope) の化学構造と物性を詳しく調べ、特に分子の機械的特性を明らかにして、薬物非透過性などに関連させて議論することを目標とした。

2. 研究方法・研究内容

抗酸菌外膜には、ミコル酸と呼ばれる大きな非対称性に特徴付けられる特異な分子がある。このうち、ほとんどの抗酸菌に見られる、最も疎水性の強い α -ミコル酸の化学構造を図 1 に示した。

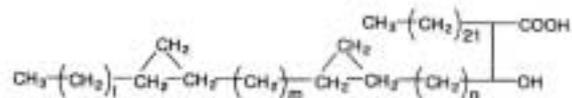


図 1 α -ミコル酸の化学構造式

この化学構造は、本研究の共同研究者である David E. Minnikin が世界で最初に決定したものであるが、物理化学的な役割はわかっていなかった。

そこで、まず、この分子が水面上で抗酸菌外膜のモデルとなり得る単分子膜を形成するかどうかを調べ、その単分子膜の界面化学的性質を研究し、併せて分光学的な解析を試みることにした。界面化学的性質の解析には、表面圧-面積 (π -A) 曲線の測定や、原子間力顕微鏡 (AFM) によるトポグラフィの解析を行った。分光学的な解析には、ミコル酸の一部である、C24 または C26 の飽和炭化水素カルボン酸の単分子膜の構造と物性を、赤外外部反射分光法を用いて行った。なお、赤外分光法による解析は、解析に必要な理論の構築も合わせて行うことにした。

3. 研究結果

これまでミコル酸の解析には、ミコル酸が二個トレハロースに結合した TDM と呼ばれる分子の単分子膜が研究のターゲットとなったが、このたびの研究で、ミコル酸単一で単分子膜を形成できることがわ

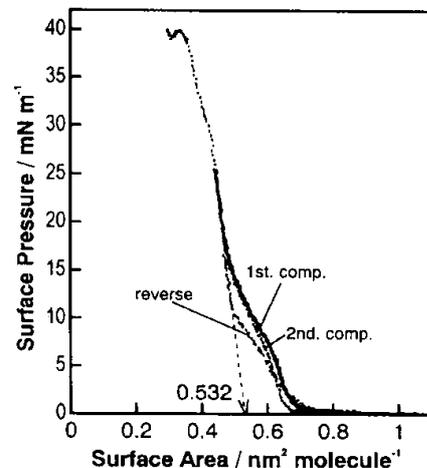


図 2 α -ミコル酸の π -A 曲線

かった¹。図2に、初めて得られた α -ミコル酸の π -A曲線を示す。用いたミコル酸は、*M. avium*—*M. intracellulare* complex (MAC)と呼ばれる抗酸菌から抽出した α -ミコル酸である。一度圧縮した単分子膜を一度緩め、再び圧縮した際のサイクリックな変化を示してあるが、ヒステリシスが見られるものの再圧縮では非常に再現性の良いカーブがえら得れており、この単分子膜が極めて安定した膜であることがわかる。ヒステリシスは、膜の圧縮過程と膨張過程で分子のコンフォメーションに大きな変化があること示唆しており、 π -A曲線に現れている大きなふくらみ($(d\pi/dA)_T$ の変動)もそのことを裏付けている。

そこで、この単分子膜を種々の異なる表面圧でマイカ基板上に Langmuir-Blodgett (LB) 法で転写し、そのLB膜のトポグラフィーをAFMで観察した。画像は省くが、図3に示すような変化がわかった。

圧縮が弱く、表面圧の低い状態(0.5 mN m^{-1})ではおよそ 27 \AA の厚さを示す。これは、およそ C22 の飽和炭化水素鎖程度の長さであり、ミコル酸の短鎖部分の長さにはほぼ匹敵する。したがって、圧力の低い膜の中では、ミコル酸は折れたたみ構造をとっていると考えられる。

この膜の圧縮を続けていくと、 5.0 mN m^{-1} 程度の圧縮でも膜の厚みが増え始め、 18.0 mN m^{-1} まで圧縮すると、厚みが最大値に達し、 115 \AA 程度まで厚くなった。この厚みは、ミコル酸がすべて伸びきったときの長さに相当し、高压下ではミコル酸の折れたたみ構造が解消し、伸びた構造になることが示唆された。

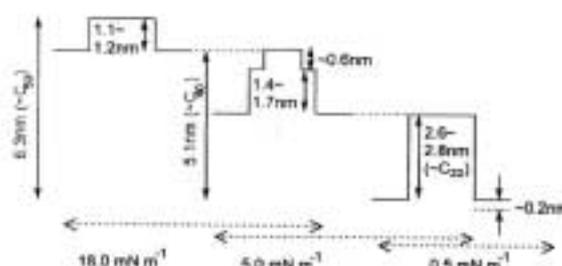


図3 α -ミコル酸単分子膜の圧縮に伴う膜厚の変化

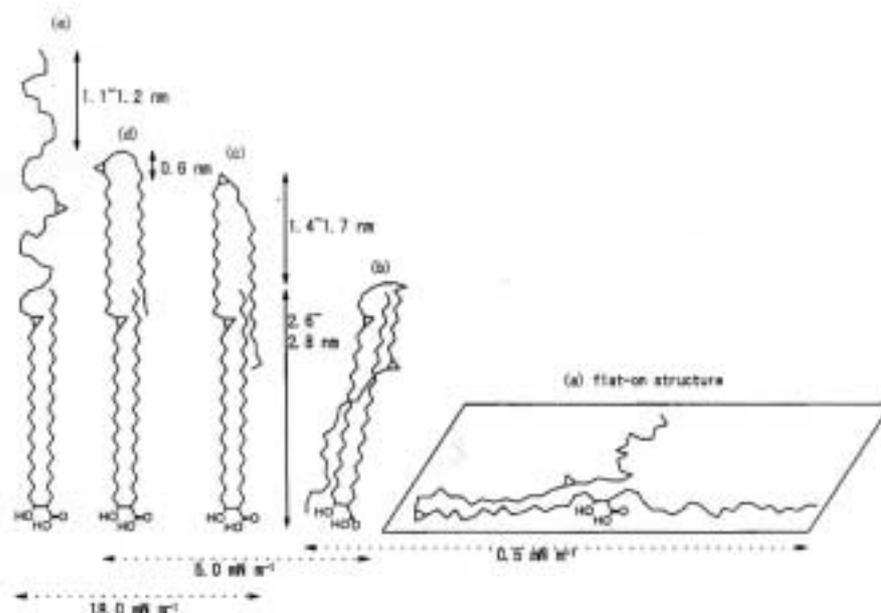


図4 ミコル酸単分子膜の圧縮に伴う分子コンフォメーションの変化

従来、ミコル酸の化学構造が、折れたたみ構造化伸びた構造化の議論は想像の範疇を出ておらず、菌の切断面を X 線で撮影した写真のみが有名であった。しかし、今回の研究により、ミコル酸は通常では考えられないほどの高

圧下でのみ分子が伸びることがわかった。言い換えると、菌の中でミコル酸が伸びているということは、それだけミコル酸が高压で詰まっていることを意味し、抗酸菌の外膜が、鎧のように頑丈な壁面でできていることが示唆され、薬物透過性の低さや細胞分裂の遅さなどとも一致する結果となった。

これらの結果を元に、ミコル酸の分子コンフォメーションの変化を図にすると、図4のようになる。

このように、水面上ではじめ横たわっていたミコル酸も、圧縮とともに次第に起き上がるが、折れたたみ構造を維持している。これは、長鎖部分と短鎖部分の疎水的相互作用が主な要因と考えられる。折れたたみ構造の解除は、膜の圧縮とともに進むが、ステップワイズな変化として現れ、長鎖部分の折り返した先が、短鎖部分の先端と相互作用できる形(図4(c), (d))が重要なキーとなっていると考えられる。

こうした結果は、ミコル酸の単鎖と長鎖の相互作用を詳しく知ることが重要である、ということを示している。そこで、次に細かいパーツの検討として、短鎖部分の検討を行った。

長鎖部分は、抗酸菌の種類や株によって多くのバリエーションが知られており、その性質は非常に複雑である。一方、短鎖部分は、飽和カルボン酸で、長さもC24とC26の二種類しかない。また、このうちヒトに感染して発症する結核菌やらい菌などはC26型であるのに対し、ヒトで発症する事のほとんどない非定型抗酸菌はC24型である。このことから、短鎖のわずかにC2個分の長さの差が、ミコル酸全体の物性に大きな影響を与えている可能性が高い。そこで、短鎖部分を取り出して単分子膜とし、その構造物性を探ることにした。

C23からC26までの4種類の飽和カルボン酸を用意し、それぞれの π -A曲線を測定した。図5に示すように、C23~C25の単分子膜は、曲線の形こそ異なるものの極限面積が等しく、分子断面積が同じ状態になることを示している。それに対し、C26だけがまったく異なる形と値を示し、ドメイン形成をしている可能性を示唆した。

そこで、このC26膜を非金属材料であるGaAsウェハー上にLB法で転写し、その赤外反射スペクトルを測定した。赤外反射スペクトルは、通常金属材料上で測定し、その高感度性と表面選択律を利用した解析を行う。一方、非金属材料上での測定は感度が悪く、測定した結果の解析も難しいことから、実用的に使われることは少ない。しかし、光学的に分子配向に際立って鋭敏な特性をもつことから、今回はこの方法を利用した、詳細な分子配向解析を行った。とはいえ、一般には、官能基ごとの光学常数を知らないと解析ができない問題がある。

そこで、本研究では分子配向と光学常数を同時に決定できるまったく新しい方法を考案した。そのため、従来のような複素屈折率を使うのではなく、誘電率分散を仮定して、実測とパラメータフィッティングする方法を取った。また、同時に膜の一軸配向性を考えて理論を異方化した。実際には、独立したスペ

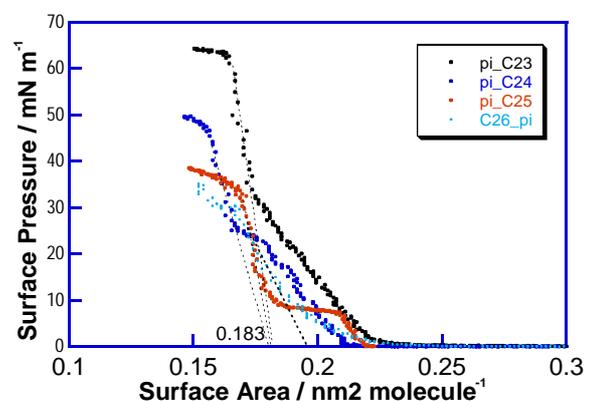


図5 種々の飽和カルボン酸の π -A曲線

クトル情報を持たせるため、異なる入射角 (25°と 50°) で測定した二つのスペクトルを用い、これらを同時に満足する二つの誘電率関数を、downhill-simplex 法で求めた。

その結果、狙いどおり、光学常数を正しく求め、分子配向も決められるようになった(投稿中²⁾)。この方法(振動子強度法)を利用して、C26 単分子膜の構造と物性を詳しく評価した。

その結果、C26 単分子膜は非常に高度に配向した薄膜を形成していることがわかった。これは図5に示した π -A 曲線の結果と符合し、ドメイン形成を起こすほどに C26 単分子膜中の分子は高度に凝集していると考えられた。そこで、これを確かめるため、Cd 塩の単分子膜(Cd(C26)₂)をつくり、同様の解析を行った。すると、金属塩にすることで大幅に配向が乱れ、屈折率の実部も等方的な値を示していた。通常、金属塩にすることで配向は向上するが、この結果は C26 の特異な凝集力の強さを物語るものとなった。これらは、Brewster 角顕微鏡による膜の観察でも裏付けられた(投稿準備中³⁾)。

4. 研究がもたらす効果と波及効果

以上の研究から、結核菌はミコル酸による高圧の膜を鎧のようにまとい、菌そのものを守っているメカニズムを明らかにできた。さらに、ヒトに感染した後の発症の程度に、この鎧の強さが大きくかかわっており、ミコル酸の短鎖部分のわずかな炭素数の違いが決定的なミコル酸全体の、ひいては抗酸菌全体の性質を決めていることも示唆された。

このように、結核菌を初めとする抗酸菌の自己防護メカニズムが初めて明らかにできた。これにより、薬物療法の際に、短鎖部分の構造を決める蛋白の合成阻害を検討して、結核菌を弱らせる療法などへの応用が考えられる。根本的な治療薬の開発に影響を与えることができると考えている。

5. 謝辞

本研究推進にあたり、名古屋大学物質科学国際研究センター教授の今栄東洋子先生に、AFM 測定と詳細な議論をいただきました。厚く御礼を申し上げます。また、赤外分光法による測定をマイアミ大学の Roger M. Leblanc 先生のグループと共同で行い、その際、日本学術振興会および NSF の渡航資金援助も受けました。さらに、振動子強度法のプログラム開発に、アーヘン工科大学の Wolfgang Theiß 先生のご協力を得ました。なお、ミコル酸の抽出は、東京薬科大学の渡辺素子先生の多大なご協力を得ており、その議論には英国 New Castle 大学の David E. Minnikin 先生のご協力もえりました。これらの方々に厚く御礼を申し上げます。

6. 文献

- 1: “Conformational Characterization of α -Mycolic Acid in Monolayer Film by the Langmuir-Blodgett Technique and Atomic Force Microscopy” by **Takeshi Hasegawa**, Jujiro Nishijo, Motoko Watanabe; Katsuya Funayama and Toyoko Imae, *Langmuir* **16**(18), 7325 - 7330 (2000).
- 2: “Simultaneous Evaluation of Molecular-Orientation and Optical Parameters in Ultrathin Films by Oscillator-Model Simulation and Infrared External Reflection Spectroscopy” by **T. Hasegawa**, J. Nishijo, J. Umemura, and W. Theiß on the reviewing process by *Anal. Chem.*
- 3: “Characteristics of Long-Chain Fatty Acids Monolayers Studied by

Infrared Spectroscopy” by **Takeshi Hasegawa**, Jujiro Nishijo, Motoko Watanabe, and Junzo Umemura to be submitted to *J. Phys. Chem. B*