

総括研究報告書

ハンセン病発症におけるらい菌の特性

主任研究者 柏原嘉子 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 病原微生物部長

研究要旨

ハンセン病の治療に最初に導入された化学療法剤でかつ現在の多剤併用化学療法の主要な構成成分であるダブソンに対する耐性獲得機構の解明を行い、葉酸合成に含まれる dihydropteroate synthase をコードする遺伝子 *foIP* の特定領域の点変異によることを明らかにし、遺伝子診断によるダブソン耐性菌の迅速検出法を確立した。前年度までに確立リファンピシン、ニューキノロン、マクロライド耐性検出法と併せて臨床分離株を検索した結果、わが国に主要ハンセン病治療薬 2 剤以上に耐性を獲得した多剤耐性らい菌がかなり出現していることが判明した。また流行国においても耐性菌の出現を認め、耐性菌出現調査やその対策が急務であることを示した。耐性菌に関する遺伝子診断法の確立は臨床へ迅速な情報を提供し治療方針作成に寄与するとともに、現在のハンセン病対策上、耐性菌問題の重要性を強く提唱した。らい菌の伝播経路解析手段としてらい菌の *rpoT* 遺伝子による型別法を用い、中国、韓国、フィリピン、バングラディッシュからの分離株で遺伝子型の分布を調査した。その結果、わが国へのらい菌の伝播に 2 経路が考えられることを示唆した。らい菌における宿主が産生する傷害性酸素代謝物処理機構・らい菌細胞壁合成機構・リポタンパクの解析が進み、新治療法や新治療薬開発の標的となるらい菌の細胞内生存・増殖機構或いは宿主との相互作用解明に手がかりを与えた。

分担研究者

松岡正典 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
室長
甲斐雅規 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
室長
前田伸司 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
主任研究官
中田 登 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター

研究員

青山由利 創価大学 工学部
助教授

A. 研究目的

ハンセン病制圧の世界戦略は活動性患者の早期発見と多剤併用化学療法を中心に推進されている。しかし、多剤併用化学療法の世界的普及によりハンセン病の登録患者数は減ってきたが、毎年 50 万人を越す新規患者発生は減少傾向を示さず、最近は増加傾向すら示している (WHO 報告: 1998 年度新規患者数 75 万人)。また治療

薬に対し耐性を獲得した菌の出現も報告されてきた。このようなハンセン病の現状から、2000年までにハンセン病の制圧(有病率対人口比 1/10,000 以下) という WHO の方針は修正のやむなきに至っている。感染症であるハンセン病の制圧にはワクチンや化学予防あるいは感染源・感染経路の解明とその除去等多面的な方策が必要である。しかしハンセン病に関しては、有効なワクチンも開発されておらず、薬剤耐性獲得機構、病原性に関与する因子も未解明である。また感染源解明の手段等も未開発で、ハンセン病制圧政策上隘路となっている。

ハンセン病はらい菌によって引き起こされ、皮膚と末梢神経を主病変とする慢性細菌感染症である。その発症には病原体であるらい菌と宿主の因子が複雑に関与する宿主・寄生体関係を介して成立し、らい菌と宿主の生存競争を反映している。その発症機構の解明はハンセン病の予防・治療に貢献することが期待される。

本研究はハンセン病発症に関与する菌側の要因、特に、現在のハンセン病対策で緊急に解決を求められている課題、薬剤耐性獲得機構の解明及び迅速・簡易耐性菌検出法の確立、感染源・感染経路の解明に資する分子疫学的手法の開発とそれを用いた疫学的研究、らい菌の宿主細胞内での生存・増殖機構・宿主への作用機作などの解明による新治療法・治療薬開発の基盤構築を目的とする。

B. 研究方法

薬剤耐性に関する研究：ハンセン病治療に最初に導入された化学療法剤であるダブソンに対する耐性獲得機構の分子生物学的研

究、とそれに基づく遺伝子診断によるダブソン耐性菌の迅速・簡易検出法を検討した。らい菌の型別法の開発：マウスにおける増殖速度の著しく異なるらい菌分離株間に認められた *rpoT* 遺伝子構造の差異を利用したらい菌の遺伝子型別法を用い、中国、韓国、フィリピン、バングラデシュからの分離株を検索した。

らい菌の宿主細胞内生存・増殖機構の解明：らい菌細胞壁合成酵素、リポタンパク遺伝子について遺伝子レベルで解析した。また結核菌ゲノムに21個存在するP450型一原子酸素添加酵素遺伝子に関してステロール脱メチル化酵素遺伝子を単離、大腸菌で発現させ、組換え体タンパクを用いて性状の検討を行い、抗酸菌では知られていない本酵素の機能に関して検討した。

C. 研究結果

薬剤耐性機構の解析並びに薬剤耐性菌の調査：現在世界のハンセン病制圧戦略は患者の早期発見と多剤併用化学療法を中心に推進されている。しかし、多剤併用化学療法導入後も新患発生数は減少せず、最近では増加傾向を示している。有効な治療薬に耐性を獲得した菌の出現が報告されはじめている。らい菌は人工培養ができず、迅速な薬剤感受性試験法が存在せず、迅速な薬剤感受性試験法の確立が臨床現場から急ぎ求められている。ダブソン(ジアミノジフェニルスルホン、DDS)は1940年代、ハンセン病治療に最初に導入された化学療法剤である。その作用機作は菌の葉酸合成における拮抗阻害と考えられているが、その耐性獲得機構については解明されていない。マウスでの感受性試験で DDS 耐性が確認された臨床分離株を用い、葉酸合成に含ま

れる dihydropteroate synthase(DHPS)をコードする *foP* 遺伝子の塩基配列を解析、感受性菌と比較した結果、耐性菌では *foP* 遺伝子の特定部位 2カ所に点変異を認めた。これらの変異は他の細菌のスルホン剤耐性で知られているものと同様であった。大腸菌 DHPS の X線解析研究から予測される本酵素の活性中心、特に基質或いはスルホン剤との結合に関与するアミノ酸に隣接して変異が存在した。この結果から DHPS の活性中心、特にスルホン剤との結合に関与する領域近傍の立体構造の変化により DDS 耐性が獲得されたと推定された。次いで *foP* 遺伝子の標的と成る部分を増幅する系を構築、臨床分離株について DDS 耐性に関与する変異の有無を検索した。その結果、14株でこの領域に変異を認めた。その内12株は耐性が確認された株で見られた変異と同一の部位の変異であった。2株はそれより5アミノ酸残基離れた部位の変異であった。

昨年度までに確立したリファンピシン、ニューキノロン、マクロライド耐性検出法と併せて臨床分離株を検索した結果、わが国において分離された多くのらい菌がハンセン病の主要な治療薬2剤以上に耐性を獲得していること、わが国の菌陽性患者や再発例がこれら耐性菌のため治療に抵抗性を示していることが判明し治療現場へその結果を還元し、治療方針作成に寄与すると共に耐性菌出現動向調査や耐性菌によるハンセン病の治療方針の確立が急がれることを指摘した。またハンセン病流行地からのらい菌分離株にも耐性菌が検出され、化学療法後の耐性菌調査、並びにその対策の重要性が示唆された。

抗結核薬であるピラジナミド (PZA) と同様な作用機序を持つが、結核菌にのみ抗菌活性を持つ PZA とは異なり、抗酸菌に広く抗菌活性を持つ5'クロロピラジナミド (5'Cl-PZA)耐性機構の分子生物学的解明が進み、脂肪酸合成酵素 I をコードする *fasI* 遺伝子の耐性への関与が初めて明らかにされ、結核菌の PZA 耐性機構の解明と併せ、5'Cl-PZA のハンセン病治療薬としての可能性を示唆するものとなった。

らい菌の型別法の開発：これまでらい菌の型別法確立を意図して多型を示す遺伝子部位を探索した結果、遺伝子発現調節因子遺伝子の1種である *rpoT* 遺伝子内の6塩基からなる繰り返し構造が3個のもの(3型)と4個のもの(4型)とに分けられること、2つの遺伝子型の分布が極めて特徴的であること認めた。即ち、わが国本州と韓国由来のらい菌は圧倒的に4型が多く、沖縄、アジア、ラテンアメリカ、及び自然感染アルマジロ(アメリカ合衆国)やマンガベイサル(ナイジェリア)由来のらい菌の型と(3型)異なった。この遺伝子型分布の偏りを説明するために韓国、中国からの分離株についてその遺伝子型の分布を調査した。中国の西部由来株は圧倒的に3型が多く、中国東北部、韓国では4型が多数を占めた。これらの地域に4型が多いことは、同時に調査したバングラディッシュ、フィリピンからの分離株が全て3型であったことと対照的であった。

らい菌の宿主細胞内生存・増殖機構：らい菌が宿主の防御機構から逃れて増殖する上で、脂質に富む複雑な構造の強固な細胞壁が寄与していると推定されている。またこれらの細胞壁合成に関与する酵素は新薬

開発の標的とも考えられ多くの研究がなされている。しかし、らい菌の細胞壁合成・構築機構は不明である。ホスファチジルイノシトール(PI)はらい菌の細胞膜を構成するリン脂質の1種であるが、抗酸菌においては、細胞外構造物を菌体上に固定するアンカーとして機能し、細胞壁形成上重要な因子であると考えられている。しかし、らい菌のPI合成酵素に関する知見は殆どない。らい菌ゲノムからホスファチジルイノシトール合成酵素(PIS)遺伝子をクローニングし、*Mycobacterium smegmatis*で発現に成功し、活性を保持した形で組換えPISを得ることに成功した。人工培養不能のため、多量の菌体を用いる一般生化学的研究方法が適用できないらい菌にあって、これはらい菌のPISに関する最初の知見である。

高等哺乳動物における薬物代謝あるいは酵母のステロール代謝に関与する1原子酸素添加酵素—P450スーパーファミリー酵素と推定される遺伝子が結核菌ゲノムに21存在する。ステロールを生合成していないとされる抗酸菌におけるステロール脱メチルP450と類似のタンパクをコードする遺伝子が結核菌からクローニングされ、大腸菌で発現させ、発現タンパクを精製しその性状を検討した。組換えステロール脱メチルP450は哺乳動物や酵母と同様の特徴を保持していたが、CO結合物は哺乳類やパン酵母ものとは非常に不安定であった。今回らい菌ゲノムDNAを用いたPCR法で用いた条件下では増幅されてくる遺伝子は検出できなかった。

D. 考察

化学療法の普及に伴い、薬剤に耐性を獲得した感染症の起原菌が出現し、耐性菌対策は今日の感染症対策の重要な課題となっている。

ハンセン病においては原因菌であるらい菌が人工培養不能のため、通常の薬剤感受性試験を実施することができず、マウスを用いた耐性菌の検出は困難かつ長時間を要し、臨床分離株全てに適用できるものとはなっていない。しかし、臨床症状からは耐性が疑われる症例が出ており、このような臨床分離株の薬剤感受性を迅速に検査する方法の確立が強く求められている。本年度はハンセン病治療に広く利用されているDDSに対する耐性獲得機構の解明とDDS耐性を検出する遺伝子診断法を確立した。昨年度までに確立したリファンピシン、ニューキノロン、マクロライド耐性獲得の遺伝子診断法による迅速検出法と併せるとハンセン病の主要治療薬6種類中4種類の治療薬に関し耐性菌検出の遺伝子診断法が確立され、臨床からの要請に応えることができた。また確立した検査法を用いて、わが国並びにハンセン病流行国からの分離菌を検索したところ、①わが国においては主要治療薬2剤以上に耐性を獲得した多剤耐性菌少なからず出現しており、難治性症例あるいは再発症例の多くがこれら耐性菌に起因していることが明らかになり、耐性菌によるハンセン病の治療法の確立・耐性菌出現状況調査が急務であることを提唱した。②ハンセン病流行国においても薬剤耐性らい菌が検出され、流行国での耐性菌出現動向調査並びにその対策の確立がハンセン病制圧戦略上急務であることを示した。今後、現在耐性機構が不明であるミノサイクリン、

クロファジミンの耐性機構の解明あるいはらい菌における排出ポンプタンパクの薬剤耐性における関与等を解明し、耐性菌全てを迅速に検出する系の確立と国内外における耐性菌出現動向調査・耐性菌による本疾病の治療法の確立が急ぎ行われるべきである。

薬剤耐性らい菌の出現は新治療薬開発の必要性を示唆する。その際にはらい菌の特性、特にその生存・増殖機構に関する知見に基づいた薬剤開発の標的が求められる。今回らい菌の脂質に富んだ複雑な構造の細胞壁合成・構築に関与する酵素の1つであるホスファチジルイノシトール合成酵素遺伝子のクローニング、発現に成功し、活性を保持した組換えタンパクを得ることに成功したこと、脂肪酸合成酵素遺伝子 *fasI* が5'クロロピラジナミド耐性に関与することが明らかにされたことは新治療薬開発やらい菌の細胞内生存・増殖機構の解明に糸口を与える。

らい菌の感染源・感染経路の解析や再燃と再発の区別に不可欠ならい菌分離株の識別に関する実用的手段は現在まで報告がない。らい菌の多様性に関しては Fsihi らが *polA* 遺伝子座について報告しているが、8株の分離株について比較を行ったのみで疫学研究での有効性は不明である。昨年までに *rpoT* 遺伝子内構造の差異に基づく遺伝子型別法を確立し、世界各地の患者及び自然感染アルマジロやマンガベイサルなど地域・由来を異にする多数の分離株を検索し、*rpoT* 遺伝子内繰り返し構造が3個のもの(3型)と4個のもの(4型)に分けられること、わが国に2つ遺伝子型のらい菌が存在することおよび2つの遺伝子型の

分布が極めて特徴的であることを明らかにした。この分布の偏りを説明するために、中国、韓国、フィリピン及びバングラデシュからの分離株について検索した。中国西部由来のらい菌分離株は圧倒的に3型が多く、中国東北部、韓国では4型が多かった。一方、バングラデシュ、フィリピン由来の分離株は全て3型であった。この結果からわが国へのらい菌の渡来には2つの経路即ち中国東北部、韓国、わが国本土(4型菌)と東南アジア、中国南西部、沖縄(3型菌)があると推測された。4型菌がなぜアジア東北部に局在しているかの理由は現在不明である。しかし、本研究は世界で始めて多数のらい菌分離株を用いた検証したらい菌の型別法である。今後感染経路・感染源の特定を可能にするため、一層細分化可能にする遺伝子型別法の確立が必要である。

E. 結論

①ハンセン病の主要治療薬であるダブソン(ジアミノジフェニルスルフォン、DDS)に関する主要な薬剤耐性獲得機構の解明を行い、らい菌 *foP* 遺伝子の特定領域内の点変異によることを明らかにした。また、それを利用し、人工培養不能のため、有効な簡易・迅速薬剤感受性試験法がないらい菌について遺伝子を利用した DDS 耐性検出方法を確立し臨床株に適用、わが国並びに流行国に DDS 耐性菌が出現していることを明らかにした。昨年度までに確立した遺伝子の変異によるリファンピシン、ニューキノロン、クラリスロマイシン耐性検出法と併せて分離株を検索したところ、わが国においてハンセン病主要治療薬2剤以上に耐性を獲得している多剤耐性菌がかなり出

現していることが明らかになった。研究成果を臨床へ還元し治療方針作成に寄与すると共に、耐性菌発生動向調査や耐性菌によるハンセン病の治療方針の確立が急務であることを提唱した。さらに、ハンセン病流行地からの分離株にもハンセン病主要治療薬に耐性を獲得したらい菌が検出され、世界的に普及している化学療法後の耐性菌出現動向調査やその対策の必要性を示した。抗酸菌に広く抗菌活性を有する 5'クロロピラジナミド耐性に脂肪酸合成酵素 I をコードする遺伝子(*fasI*)の関与を明らかにし、本剤のハンセン病治療薬としての可能性が示唆された。

②らい菌 *rpoT* 遺伝子内構造の差による型別法を用い、中国、韓国、バングラデシュ、フィリピン由来のらい菌を検索した。中国西部由来らい菌は圧倒的に 3 型が多く中国東北部、韓国ではわが国本土と同様 4 型が多かった。バングラデシュ、フィリピン由来のらい菌は全て 3 型であった。この結果からわが国へのらい菌の渡来には 2 つの経路即ち、中国東北部、韓国わが国本州に多い 4 型菌の渡来経路と東南アジア、中国南西部、沖縄に分布する 3 型菌の経路が推定された。多数の分離株を用いたらい菌の型別調査は世界にも例がなく、この結果は初めての例であり、本法が型別に利用可能であることを示した。

③らい菌の宿主内生存・増殖機構の解析に関しては、らい菌が宿主の防御機構から逃れて生存・増殖する上で、らい菌が持つ脂質に富んだ複雑な構造の細胞壁の寄与が想定されている。らい菌細胞膜構成成分の 1 種であるりん脂質ホスファチジルイノシトール合成酵素遺伝子及びリポタンパク遺

伝子をクローニング、*M.smegmatis* で発現に成功し、酵素活性を保持した形で組換え体を得、らい菌の細胞内生存・増殖機構あるいは宿主との相互作用解析の手段を得た。また哺乳動物の薬物代謝や酵母のステロール代謝に関与する酵素 P450 ファミリー遺伝子が結核菌で検出され、そのうちのステロール脱メチル活性を持つ P450 を組換え体タンパクとして得た。得られた結核菌の P450 タンパクは哺乳動物や酵母の酵素と類似の特徴を有したが、一酸化炭素結合体は極めて不安定であった。本タンパクの生理的役割の解析、並びにらい菌における存在を検討中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kai, M., Matsuoka, M., Nakata, N., Maeda, S., Gidoh, M., Maeda, Y., Hashimoto, K., Kobayashi, K., Kashiwabara, Y.: Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. FEMS Microbiol. Lett. 177: 231-235. 1999.
- Yamaguchi, H., Ohsaki, T., Kurihara, N., Kitajima, M., Kai, M., Takahashi, M., Taguchi, H., Kamiya, S.: Induction of secretion of interleukin-8 from human gastric epithelial cells by heat-shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori*. J. Med. Microbiol. 48: 927-933, 1999.
- Nakanaga, K., Maeda, S., Myojin, Y., Xu, D. L., Goto, Y.: Sequence analysis and expression of *Nramp-1* gene in *Bcg^r* and *Bcg^s* mice. J. Vet. Med. Sci. 61: 717-720, 1999.
- Matsuoka, M., Izumi, S., Budiawan, T.,

- Nakata, N.: *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. *India J. Lepr.* 71: 61-67, 1999.
- Izumi, S., Budiawan, T., Saeki, K., Matsuoka, M., Kawatsu, K.: An epidemiological study on *Mycobacterium leprae* infection and prevalence of leprosy in endemic villages by molecular biological technique. *Indian J. Lepr.* 71: 37-43, 1999.
- Yoshida, Y., Aoyama, Y., Noshiro, M., Gotoh, O.: Evolution and functional diversification of sterol-metabolizing P450. Evidence for the intervention between diversification of P450 and expansion of metabolic pathways. *Curr. Topics in Biochem. Res.* 1: 103-112, 1999.
- Nitahara, Y., Aoyama, Y., Horiuchi, T., Noshiro, M., Yoshida, Y.: Purification and characterization of rat sterol 14-demethylase P450 (CYP51) expressed in *Escherichia coli*. *J. Biochem (Tokyo)* 126: 927-933, 1999.
- Hori, K., Sakaguchi, A., Kudoh, M., Ishida, K., Aoyama, Y., Yoshida, Y.: Structure-activity relationship of a new antifungal imidazole, AFK-108 and related compounds. *Chem. Pharm. Bull.* 48: 60-64, 2000.
- Naito, M., Matsuoka, M., Ohara, N., Nomaguchi, H., Yamada, T.: The antigen 85 complex vaccine against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. *Vaccine* 18: 795-798, 2000.
- Ohara, N., Matsuoka, M., Nomaguchi, H., Naito, M., Yamada, T.: Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by recombinant bacillus Carumette-Guerin (BCG). *Vaccine* 18: 1294-1297, 2000.
- Hanawa, T., Kai, M., Kamiya, S., Yamamoto, T.: Cloning, sequencing, and transcriptional analysis of the *dnaK* heat shock operon of *Listeria monocytogenes*. *Cell Stress Chaperons* 5: 21-29, 2000.
- Jamal, M. A., Maeda, S., Nakata, N., Kai, M., Fukuchi, K., Kashiwabara, Y.: Molecular basis of clarithromycin-resistance in *Mycobacterium avium intracellulare* complex. *Tuber. Lung Dis.* 80: 1-4, 2000.
2. 学会発表
- Yamazaki, T., Sato, N., Haga, S., Fujii, H., Kobayashi, K., Kashiwabara, Y., Hayashi, K., Tamura, T., Yamashita, K., Toyoda, K., Okazawa, Y., Tanno, K.: Antimicrobial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* by measuring mycobacterial ATP. 99th General Meeting of American Society of Microbiology Chicago, May, 1999,
- Maeda, S., Matsuoka, M., Kai, M., Nakata, Maeda, Y., Kashiwabara, Y.: Mutations in the *gyrA* gene of *Mycobacterium leprae* isolates resistant to fluoroquinolones. 39th Inter Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) San Francisco, September 1999.
- Kai, M., Nakata, N., Gidoh, M., Maeda, S., Kashiwabara, Y.: Cloning of a novel gene involved in Dapsone resistance in mycobacteria. 39th Inter Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), San Francisco, September, 1999.
- Nitahara, Y., Aoyama, Y., Horiuchi, T., Yabusaki, Y., Kishimoto, K., Gotoh, O., Yoshida, Y. : Analysis of the structures

necessary for the activity of sterol 14-demethylase by site-directed mutagenesis of rat CYP51. 11th International Conference on Cytochrome P450. Sendai, September 1999.

Yoshida, Y., Aoyama, Y., Noshiro, M., Asai, K., Okonogi, K., Gotoh, O.: Modulation of substrate specificity during the evolution of CYP51 and associated P450s. International Conference on Cytochrome P450. Sendai, September 1999.

柏原嘉子、松岡正典、甲斐雅規、前田伸司、中田登、前田百美、長尾榮治、金城邦浩、後藤正道、北島信一、並里まさ子、尾崎元昭、柳橋次雄、L.E.Takaoka:キノロン耐性が疑われた症例から得られたらい菌の *gyrA* 遺伝子の変異。第72回 日本ハンセン病学会、東京、1999年4月

松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、中田登、小林和夫、柏原嘉子、和泉眞蔵、Gue-Tae Chae、Tomas P. Gillis : らい菌 *rpoT* 遺伝子の多型性とその地理的分布 第72回 日本ハンセン病学会、東京、1999年4月

Mohamed A. Jamal, Shinji Maeda, Noboru Nakata, Masaichi Gidoh, Yoshiko Kashiwabara : Molecular basis of clarithromycin-resistance in mycobacteria.

第72回 日本ハンセン病学会、東京、1999年4月

甲斐雅規、中田登、Netnaphis Chinanonwait, 儀同政一、松岡正典、柏原嘉子: RAP-PCR 法を用いた Dapsone 耐性に関する遺伝子のクローニング 第72回 日本ハンセン病学会、東京、1999年4月

中田登: らい菌のカタラーゼ遺伝子に関する研究。第72回 日本ハンセン病学会、東京、1999年4月

山崎利雄、佐藤直樹、芳賀伸治、小林和夫、柏原嘉子、林公子、田村俊秀、山下研也、岡沢豊、丹羽和信: 生物発光を用いた結核菌迅速薬剤感受性試験法の検討 第69回実験結核研究会 宇都宮、1999年4月

山崎利雄、佐藤直樹、芳賀伸治、小林和夫、柏原嘉子、田村俊秀、山下研也、岡沢豊、丹羽和信: 結核菌のアデノシン三リン酸 (ATP) 測定による迅速薬剤感受性試験法の検討(第II報) 第74回日本結核病学会総会 宇都宮、1999年4月

山崎利雄、芳賀伸治、小林和夫、柏原嘉子、田村俊秀: 結核菌 ATP 測定による薬剤感受性試験法—既存法都の比較検討 第21回結核・非定型抗酸菌症治療研究会 東京、1999年4月

山田毅、内藤真理子、松岡正典、野間口博子、大原直也: 抗酸菌の主要抗原である Antigen 85 を用いたハンセン病予防ワクチンの開発。第72回 日本ハンセン病学会、東京、1999年4月

中村昌弘、松岡正典: アデノシン含有無細胞液体培地におけるらい菌 Thai53 株の増殖。第72回 日本ハンセン病学会、東京、1999年4月

和泉眞蔵、Budiawan T、佐伯圭介、松岡正典: インドネシア北マルク県におけるらい菌感染とハンセン病蔓延の現状。第72回 日本ハンセン病学会、東京、1999年4月

佐伯圭介、和泉眞蔵、松岡雅則、Budiawan T.: Nose-swab PCR 法を用いたハンセン病濃厚流行地住民の鼻腔表面からのらい菌遺伝子の検出状況。第72回 日本ハンセン病学会、東京、1999年4月

松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、中田登、川津邦雄、柏原嘉子、Gue-Tae Chae, Wu Qinxue, Abraham T. Agdamag: らい菌 *rpoT* 遺伝子の

多型性とその地理的分布 II. 韓国、中国におけるそれぞれの型の分布。第73回 日本ハンセン病学会、鹿児島、 2000年3月

柏原嘉子、松岡正典、甲斐雅規、前田伸司、中田登、前田百美、長尾榮治、後藤正道、北島信一、並里まさ子、尾崎元昭、柳橋次雄、小原安喜子、L. E. Takaoka, Mohammad Ali Abbasi, Abraham T. Agdamag: 薬剤耐性に関与するらい菌の遺伝子変異。第73回 日本ハンセン病学会、鹿児島、 2000年3月

前田百美、柏原嘉子、Mahapatra, S., Brennan, P. J.: らい菌のリポ蛋白質をコードする遺伝子の単離とその産物の生理的役割。第73回 日本ハンセン病学会、鹿児島、 2000年3月
中永和枝、儀同政一、松岡正典、柏原嘉子: NASBA 法によるらい菌メッセンジャー RNA 検出の試み。第73回 日本ハンセン病学会、鹿児島、 2000年3月

らい菌の *rpoT* 遺伝子の多型とその地理的分布

II 中国、韓国由来株のタイプ

(分担研究者) 松岡正典 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
生体防御部 第1研究室

研究要旨：これまでにらい菌の型別法確立を意図し、多型を示す遺伝子部位を検索した結果、*rpoT* 遺伝子内に6塩基からなる直列配列があり、それが3コピーのもの(3型)と4コピーのもの(4型)とに分けられることを明らかにした。本州由来株と韓国由来株に多かった4型は2重構造モデルによって説明される弥生人と共に広まり、沖縄由来の株は縄文人と共に広まったと仮定されたことから、韓国ならびに中国由来株について更に調査した。中国の西部由来株は圧倒的に3型が多く、中国東北部、韓国では4型が多数をしめた。これら地域に4型が多いことは同時に行ったフィリピン、バングラディッシュの株は全て3型であったことと際だって異なり、民族によりその保有する微生物の型が異なることが示された。

A. 研究目的

ハンセン病の感染経路解明の為に必須であり、また再燃、再感染を区別し、治療の有効性判定の為に必要な手法であるらい菌の型別法を開発することを意図している。これまでらい菌についてはその目的にかなう実的手法はほとんど報告されていなかった。

上記目的にかなう多型性を示す遺伝子部位の検索を行った結果、らい菌株間において、*rpoT* 遺伝子内に存在する6塩基からなる直列配列のコピー数に違いがあり6塩基配列を3回繰り返す株と(3型)、4回繰り返す株(4型)に分けられることを明らかにし、更に国内外において分布する型は地域により、際だった特徴的分布を示すことを明らかにした。即ち、本州、および韓国では圧倒的に4型が多数を占め、沖縄をはじめ、世界のその他の地域では殆どが3型であった。日本、韓国での4型および3型の分布は過去の日本人形成の過程として広く認められている2重構造モデルに伴って形成

されたものと推察された。この検証のために韓国および中国由来株について更に検討を加え、併せて他の地域からのらい菌についても解析を行った。

B. 研究方法

韓国からは79検体、中国からは42検体を得た。更に比較の為にバングラディッシュの11株、フィリピンより得た28株についても併せて検査した。

凍結ないしアルコール浸漬 Biopsy 材料、パラフィンブロック、70%エタノールに浸漬した結節部位 Skin scraped 材料より、DEXPAT kit あるいは Lysis buffer による 60°C、1夜処理により適宜 DNA を調製した。

標的部位を含む97または91bpの*rpoT* 遺伝子の一部をPCRにより増幅し、4%Meta Phor agarose を用いてその差異の簡易検出を行った。さらに300bp長の断片をPCRにより増幅し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction kit により塩基配列を決定した。

C. 研究成果

検査した材料はこれまで通り、*rpoT* 遺伝子中の繰り返し配列の差異により2群に分類された。即ち6 bp 配列が3回直列するもの(3型)、あるいは6 bp 配列が4回繰り返して直列するもの(4型)が認められそのほかの型は検出されなかった。

4型の株からは97bpのPCR産物が得られ、3型のらい菌からは91bpの産物が得られ4% agarose 泳動により分別できた。

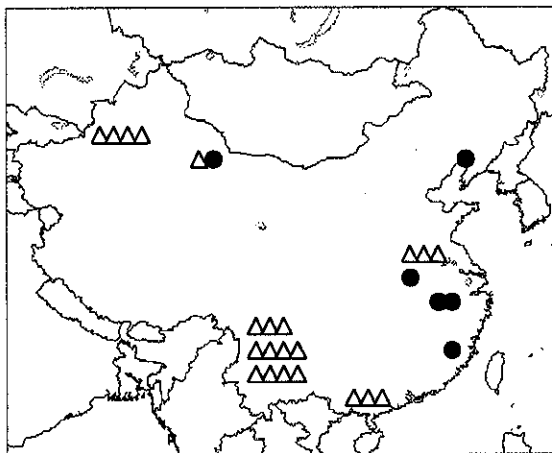


図1. 中国における異なる遺伝子型の分布
●: 4型、△: 3型

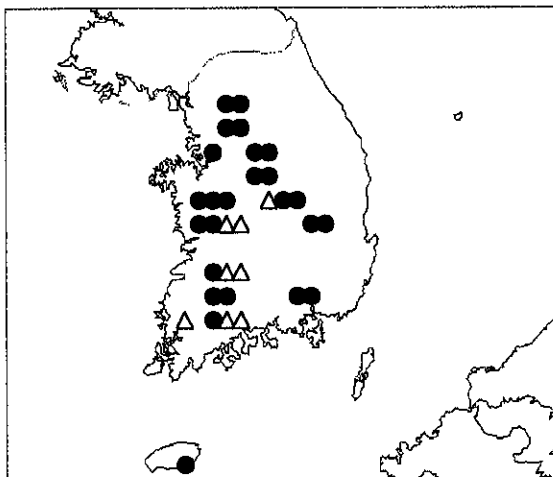


図2. 韓国における異なる遺伝子型の分布
●: 4型、△: 3型

全てのサンプルから目的とするPCR産物を

得ることはできなかったが、得られたPCR産物の解析の結果示されたそれぞれの遺伝型の分布について、図1に中国での分布、図2に韓国での分布を示す。韓国の材料にはバングラディッシュ人出稼ぎ者の材料が1検体含まれていたが興味あることに4型であった。

フィリピンの材料は24検体から解析可能なPCR産物が得られたが、全て3型であった。バングラディッシュの検体からは図3に示す8検体が増幅されたが、全て3型であった。

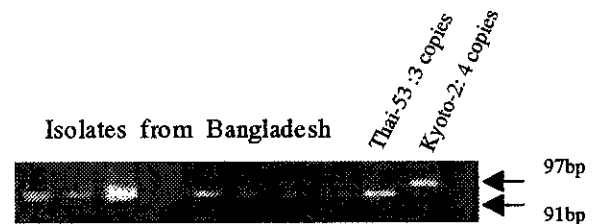


図3. バングラディッシュ由来株のPCR産物

D. 考察

ハンセン病の個々の症例における原因らい菌を識別し、疫学的解析を行うことは感染経路解明のために必須の要件であるにもかかわらず、これまでらい菌についてはWilliamsらの報告に示された様に遺伝子の多様性が極めて少なく、その目的に適った方法が無く、有用な手法の開発望まれている。分子疫学に应用可能な多型性を示す遺伝子を見出し、型別法の確立を行うことを試みた結果、らい菌の*rpoT* 遺伝子中に分離株を2群(6塩基配列3コピー直列: 3型、6塩基配列4コピー直列: 4型)に分別可能な多型を見出した。国内外の分離株についてその分布を調べたところ日本の本州および韓国に分布するらい菌は殆どが4型であり、他の地域とは際だった相違があることを報告した。その特徴的分布は日本人の形成過程である2重構造モデルと関連して成立したと推測されたことから弥生人由来の地域とされる中国、韓国のらい菌についてについて更に調査を行ってその検証を試みた。

2重構造モデルによると現代日本人は以下

の過程を経て成立したと考えられている。約90万年前、現在のインドネシアを基点とする民族が中国南部に進出し、その後更に北上した。その一部は台湾、沖縄を経由して一万年より日本全土に分布し縄文人を形成した。その後2,300年から1,700年前にかけて極東地域北部において寒冷地適応した民族の一部が朝鮮半島を経由して日本に渡来し、弥生人となり縄文人を駆逐あるいは混血して、現代の本州を中心に分布する日本人が成立した。現在の沖縄の人々およびアイヌの人々は縄文人の形質を受け継ぐヒトであるとされる。人類移動と関連して人種により保有する微生物の遺伝子型が異なることは例えば、*Helicobacter pylori* の *vacA* 遺伝子がヨーロッパ人、中国中央部、日本および韓国の間で異なることが報告されており、らい菌も人類の移動と共に異なる型の分布が形成されたと考えられる。

2重構造モデルによれば中国東北部には4型が多いことが推測され、そこより分離されるらい菌の遺伝子型を検証する必要があると考えた。現在それらの地域では有病率が低く材料採取に困難を伴い、十分な解析にたえる検体は収集できなかった。中国での分布は西部および南部に3型が多く東北部に4型が多い傾向が見られた。その違いはおそらく上記推察によって成立したと思われる。

韓国の分離株はこれまでに行った結果では全て(11株)が4型であったが今回は23%の株が3型であった。

中国における東部、北部に分布する4型の由来についてはそれが一旦北上し、寒冷地に適応した人種の間で4型が派生し、優位に保有されるようになった後に人類の南下と共に拡散したものか、あるいはそれ以前人類の北上の途中で4型が発生しそれが残存したものかは不明で

あった。人類の地球規模での移動の歴史から東南アジア地域あるいはそれ以前に人類が分布した地域では3型が殆どであることから3型から4型が派生したと推察される。人類の過去の移動については、モンゴロイドがベーリング海を渡って南米まで南下し、現在のインドオとなったことが明らかとなっておりこれまでの結果から、彼らの有するらい菌は4型であること推察される、インドオより得られるらい菌の型別は今後の課題として残った。

韓国から得た材料中にバングラディッシュからの出稼ぎ労働者のハンセン病例が1例含まれており、その型は4型であった。バングラディッシュより分離されるらい菌は今回の材料を含めて11例全てが3型であることから、このバングラディッシュ人が国内で4型に感染した確立は極めて低く、この患者は韓国内で感染を受けたのではないかと推察された。本研究の当初の目的は感染経路の追及手段の開発にあったが、この例において行った推察はまさにその目的に合致したものであった。

らい菌の型別の手段としては本法のみが実用化されているに過ぎず、更に詳細な分類可能な方法の開発が強く望まれており、最近開かれた第5回新興・再興感染症汎太平洋国際会議においてもその必要性が強調された。その為にも更なる材料の収集とその解析が必要と考える。

E. 結論

中国、韓国より分離されるらい菌の *rpoT* 遺伝子の相違に基づく分布を調べた。それぞれ特徴ある異なるタイプのらい菌の偏った存在が示され、過去の人類移動と関連してその分布が形成されたと考えられた。

F. 研究発表

紙上発表

- 1) Matsuoka M., Izumi S., Budiawan T. and Nakata N.: *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. Ind. J. Lepr. Vol.71 No.1 61-67 1999
- 2) Izumi S., Budiawan T., Saeki K., Matsuoka M. and Kawatsu K.: An epidemiological study on *Mycobacterium leprae* infection and prevalence of leprosy in endemic villages by molecular biological technique. Ind. J. Lepr. Vol.71 No.1 37-43 1999
- 3) Kai. M., Matsuoka M., Nakata N., Maeda S., Gidoh M., Maeda Y., Hashimoto K., Kobayashi K. and Kashiwabara Y.: Diaminodiphenilsulphone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutation in the dihydropoteroate syntethase gene. F E M S Microbiol. letters Vol. 177 231-235 1999
- 4) Naito M., Matsuoka M., Ohara N., Nomaguchi H. and Yamada T. The antigen 85 complex vaccine against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. Vaccine vol.18 795-798 2000
- 5) Ohara N., Matsuoka M., Nomaguchi H., Naito M. and Yamada T.: Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by recombinant bacillus Carumette-Guerin (BCG). Vaccine Vo.18

1294-1297 2000

学会発表

- 1) Matsuoka M., Maeda S., Kai. M., Nakata N., Chae G., Kobayashi K., Izumi S. and Kashiwabara Y.: *M. leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes program. US-Japan cooperative medical science program. 34th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference. San Francisco, USA, July, 1999
- 2) Kashiwabara Y., Matsuoka M., Kai. M., Maeda S., Nakata N. and Maeda Y.: Mutations in *gyrA* gene of *Mycobacterium leprae* isolate resistant to fluoroquinolones. US-Japan cooperative medical science program. 34th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference. San Francisco, USA, July, 1999
- 3) Fukutomi Y., Kimura H., Toratani S. and Matsuoka M.: Opposing effect of INF- γ and TNF and IL-10 production in macrophages stimulated with *Mycobacterium leprae*. US-Japan cooperative medical science program. 34th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference. San Francisco, USA, July, 1999
- 4) Goto M., Kitajima S., Matsuoka M., Sueyoshi K. and Sato E.: *M. leprae* in the nervous tissue of leprosy. A trial to detect bacterial DNA from autopsy cases. US-Japan cooperative medical science program. 34th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference. San Francisco, USA, July, 1999
- 5) Maeda S., Matsuoka M., Kai. M., Nakata N., Maeda Y. and Kashiwabara Y.:

- Mutations in the *gyrA* gene of *Mycobacterium leprae* isolates resistant to fluoroquinolones. 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco, USA, September, 1999
- 6) Matsuoka M.: Leprosy, a possible reemerging disease. 5th international conference on emerging infectious diseases in the pacific rim. Chennai, India, January, 2000
 - 7) 松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、中田登、小林和夫、柏原嘉子、和泉眞蔵、Chae G.、Gillis T. P. : らい菌 *rpoT* 遺伝子の多型性と地理的分布。第 72 回日本ハンセン学会総会、東京、1999 年 4 月
 - 8) 甲斐雅規、中田登、Chinanonwait N.、儀同政一、松岡正典、柏原嘉子 : RAP-PCR 法を用いた Dapson 耐性に関与する遺伝子のクローニング。第 72 回日本ハンセン学会総会、東京、1999 年 4 月
 - 9) 山田毅、内藤真理子、松岡正典、野間口博子、大原直也 : 抗酸菌の主要抗原である Antigen85 を用いたハンセン病予防ワクチンの開発。第 72 回日本ハンセン学会総会、東京、1999 年 4 月
 - 10) 中村昌弘、松岡正典 : アデノシン含有無細胞液体培地におけるらい菌 Thai-53 株の増殖。第 72 回日本ハンセン学会総会、東京、1999 年 4 月
 - 11) 柏原嘉子、松岡正典、甲斐雅規、前田伸司、中田登、前田百美、長尾榮治、金城邦弘、後藤正道、北島真一、並里まさ子、尾崎元昭、柳橋次男、Takaoka L.E. : キノロン耐性が疑われた症例からの得られたらい菌の *gyrA* 遺伝子の変異。第 72 回日本ハンセン学会総会、東京、1999
 - 12) 和泉眞蔵、Budiawan T.、佐伯圭介、松岡正典 : インドネシア北マルク県におけるらい菌感染とハンセン病蔓延の現状。第 72 回日本ハンセン病学会総会、東京、1999
 - 13) 佐伯圭介、和泉眞蔵、松岡正典、Budiawan T. : Nose-swab PCR 法を用いたハンセン病濃厚流行地住民の鼻腔表面からのらい菌遺伝子の検出状況。第 72 回日本ハンセン病学会総会、東京、1999
 - 14) 松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、中田登、川津邦雄、柏原嘉子、Chae G.、Yin Y.、Wu Q.、Agdamag A.T. : らい菌 *rpoT* 遺伝子の多型性とその地理的分布。II 韓国、中国におけるそれぞれの型の分布。第 73 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島、2000
 - 15) 柏原嘉子、松岡正典、甲斐雅規、前田伸司、中田登、前田百美、長尾榮治、後藤正道、北島真一、並里まさ子、尾崎元昭、柳橋次雄、小原安喜子、L.E. Teraoka、M. A. Abbasi、Agdamag A.T. : 薬剤体制に関与するらい菌の遺伝子変異。第 73 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島、2000
 - 16) 中永和枝、義同政一、松岡正典、柏原嘉子 : NASBA 法によるらい菌メッセージ RNA 検出の試み。第 73 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島、2000
 - 17) 中村昌弘、松岡正典 : 無細胞系でのらい菌 ATPgeneration に影響する因子。第 73 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島

第 73 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島、2000

18) 福富康夫、木村博昭、虎谷聡、松岡正典、：らい菌刺激マクロファージのサイトカイン産生に対する PGE2 の影響。第 73 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島、2000

19) 野間口博子、与儀ヤス子、遠藤真澄、松岡正典、岡村春樹、宮田昌之、佐藤由起夫：ハンセン病に対する DNA ワクチンの開発：らい菌熱ショック蛋白質の効か。第 73 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島、2000

20) Shi. L., Yajima M., Kawatsu K., Matsuoka M., Kashiwabara Y. and Endoh M.: Investigation of polymerase Chain Reaction and Immunohistochemical Staining with Histopathology in the Diagnosis of Early Leprosy in Sichuan Province of China. 第 73 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島、2000

分担研究報告書

らい菌のダブソン耐性変異

分担研究者 甲斐雅規 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
病原微生物部第三研究室長

研究要旨：

らい菌のダブソン (DDS) 耐性は以前より報告されてきているが、その耐性機構については不明のままである。しかし大腸菌など他の数種の菌ではダブソンと近縁の薬剤であるスルホンアミド耐性について遺伝子の変異が関与することが知られている。その遺伝子は葉酸合成酵素の一種である dihydropteroate synthase (DHPS) の遺伝子 *folP* である。そこで、らい菌のダブソン耐性臨床分離株と感受性菌を用いて *folP* 遺伝子の塩基配列を決定して比較検討したところ耐性菌で特徴的な 2 カ所の点変異を確認した。それらの変異はアミノ酸の置換をもたらすものであり、そのアミノ酸置換による葉酸合成酵素タンパクの 2 次構造上の変化が耐性に関与することが示唆された。

A. 研究目的

ダブソン(DDS)はリファンピシン、クロファジミンとともに多剤併用療法に用いられる代表的なハンセン病治療薬である。ハンセン病の起因菌であるらい菌 (*M. leprae*) の中にこれら薬剤に対する耐性菌が存在することが以前より報告されてきている。DDS はサルファ剤の一種と考えられ、サルファ剤であるスルホンアミド耐性について他の菌では葉酸合成酵素(DHPS)の遺伝子 (*folP*) の変異などの報告がある。しかし、これまでらい菌の DHPS 遺伝子における変異の報告はなく、らい菌のダブソン耐性機構については現在のところまったく不明のままである。そこで、他の菌と同様の耐性機構の有無を知るために、ダブソン耐性の臨床分離らい菌と感受性菌の *folP* 遺伝子の塩基配列を決定しそれらの比較検討を試みた。

B. 研究方法

使用した菌は表 1 に示すような臨床分離株 7 株とハンセン病研究センターで維持・継代しているダブソン感受性株 Thai-53 である。臨床分離株は臨床的にダブソン耐性が疑われた株でこれらのうち 5 株

は実際にヌードマウスを用いた耐性試験を行った。

多くの細菌の *folP* 遺伝子領域の一次構造をデータベースから得て比較し、*folP* 遺伝子全体を増幅する PCR 用プライマーを設定し、今回使用したらい菌 8 株の *folP* 遺伝子塩基配列を決定した。これらの配列を相互にあるいは大腸菌など他の菌の *folP* と比較検討した。

表 1 使用菌株と DDS 感受性試験

| 菌株 | 由来 | DDS 感受性試験 |
|-----------|-----|-----------|
| Thai-53 | タイ国 | S |
| Kanazawa | 石川県 | S |
| Zensho-2 | 東京都 | R |
| Zensho-5 | 東京都 | - |
| Airaku-2 | 沖縄県 | R |
| Airaku-3 | 沖縄県 | R |
| Zensho-4 | 東京都 | R |
| Shinsei-1 | 宮城県 | - |

S:感受性菌、 R:耐性菌

C. 研究結果

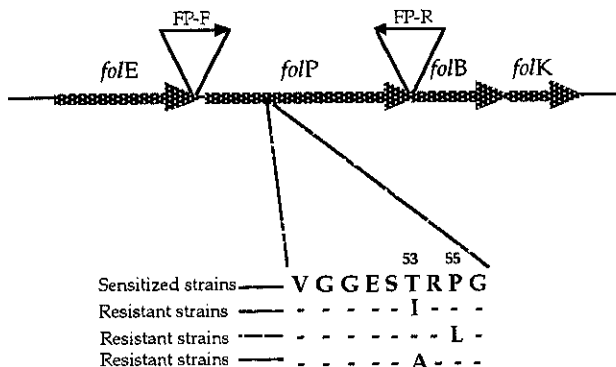
使用した7株の臨床分離株のうち5株をヌードマウスの足跡を用いて DDS 耐性検査を行った結果、1株が感受性であったが他の4株は耐性を示した(表1)。すべての株の *folP* 遺伝子の塩基配列を調べるために、それぞれの株より DNA を抽出し2種のプライマー FP-F (5'-GCTTCTCGTGCCGAAGC GCTCG-3') と FP-R (5'-CGCAACTCCATTCGGT CAGCCATC-3') (図2) を用いて *folP* 遺伝子約 0.9 kb を増幅した。それぞれの増幅産物を直接シーケンスして比較したところ、図1に示すように DDS 耐性菌では特徴的に 157 位、158 位、そして 164 位に変異が確認された。

図1

| 菌株 | 塩基配列の位置 | | |
|-----------|--------------------------------|-----|--|
| | 158 | 164 | |
| Thai-53 | CGTCGGTGGC GAATCGACCC GGCCCGGT | | |
| Kanazawa | CGTCGGTGGC GAATCGACCC GGCCCGGT | | |
| Zensho-2 | CGTCGGTGGC GAATCGACCC GGCTCGGT | | |
| Zensho-5 | CGTCGGTGGC GAATCGACCC GGCTCGGT | | |
| Airaku-2 | CGTCGGTGGC GAATCGACCC GGCTCGGT | | |
| Airaku-3 | CGTCGGTGGC GAATCGATCC GGCCCGGT | | |
| Zensho-4 | CGTCGGTGGC GAATCGATCC GGCCCGGT | | |
| Shinsei-1 | CGTCGGTGGC GAATCGGCC GGCCCGGT | | |

それらの点変異はアミノ酸の置換をもたらすことが予想された。すなわち、図2に示すように感受性菌で 53 位のトレオニンがイソロイシンあるいはアルギニンに、55 位のプロリンがロイシンに置換される。

図2



これら耐性菌の持つアミノ酸置換を、他の菌のスルホンアミド耐性変異におけるアミノ酸置換と比較検討したところ、表2に示すように 55 位のアミノ酸であるプロリンがロイシンもしくはセリンに変化していることがらい菌、大腸菌、ナイセリア菌で共通していることがわかった。一方 53 位のアミノ酸置換はらい菌のみに認められた。

表2

Localization of mutations in the DHPS in various strains

| Amino acid residue | ML ¹⁾ | EC ²⁾ | SP ³⁾ | NM ³⁾ |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 18 | S ³⁾ | - ³⁾ | - | - |
| 19 | F | - | - | F→L |
| 20 | S | - | - | - |
| 21 | D | - | - | - |
| 22 | G | - | - | - |
| 23 | G | - | - | - |
| 49 | G | - | - | - |
| 50 | G | - | - | - |
| 51 | E | - | - | - |
| 52 | S | - | - | - |
| 53 | T→I, A | - | - | - |
| 54 | R | - | - | - |
| 55 | P→L | P→S | - | P→L, S |
| 56 | G | - | - | - |
| 211 | S | - | - | - |
| 212 | R | - | - | - |
| 213 | K | - | - | - |
| 253 | R | - | - | - |
| 254 | V | - | - | - |
| 255 | H | - | - | - |
| 256 | D | - | - | - |

¹⁾ ML: *M. leprae*, EC: *E. coli*, SP: *S. pyogenes*, NM: *N. meningitidis*.

²⁾ Amino acid was expressed by the single letter.

³⁾ -: Identical to *M. leprae*.

Arrows indicate amino acid substitution.

D. 考察

数種の細菌でスルホンアミド耐性と DHPS の遺伝子の変異が報告されている。*S. pyogenes* や *N. meningitidis* などでは感受性株と比較し耐性株では約 10% の塩基配列の変異が認められたが、実験室内で作成された大腸菌のスルホンアミド耐性菌ではたった 1 塩基の変異しか見られなかった。その変異部位は大腸菌の DHPS アミノ酸残基数で 64 番目であり、これはらい菌の 55 位に相当するものであった。どちらも感受性菌がプロリン残基であるものが、大腸菌の耐性菌ではセリン残基、らい菌の耐性菌ではロイシン残基に置換するものであった。らい菌以外の細菌の臨床分離耐性株における DHPS 変異

が塩基配列レベルで 10%程であるのに対し、らい菌では点変異にとどまっているのは本菌に特徴的である DNA 塩基配列の多様性の少なさと一致することであり、興味深い。

大腸菌 DHPS の X 線回析からスルホンアミドの結合部位が 63 位のアルギニンと 221 位のリジンであることがわかっている。この 63 位のアルギニンはらい菌の 54 位のアルギニンに相当するのでその隣のらい菌での 55 位の変異も大腸菌の 64 位の変異もともに DDS あるいはスルホンアミドの結合する部位の立体構造上の位置の変化をもたらし、その結果として耐性化しているものと考えられた。らい菌における 53 位のアミノ酸の変異もこのことを裏付けるものと考えられるが、大腸菌では 62 位の変異は示されていない。さらにどの細菌でも大腸菌での 221 位のリジンに相当する周辺に変異は示されおらず、あるいはそのことは、221 位のリジン周辺に変異があくるとスルホンアミドの結合が起こらないのと同時に葉酸合成に必要なパラアミノ安息化酸 (PABA) の結合もできなくなり、結果として葉酸合成が阻害されるからかもしれない。

E. 結論

らい菌の臨床分離株を用いて DDS 耐性菌の遺伝子の変異を確認した。その変異は葉酸合成酵素である DHPS の遺伝子である *folP* 内の特徴的な点変異であり、その変異により DHPS の立体構造が変化して DDS 耐性となることが示唆された。

F. 研究発表

論文発表

- (1) Yamaguchi H., Ohsaki T., Kurihara N., Kitajima M., Kai M., Takahashi M., Taguchi H., Kamiya S.
Induction of secretion of interleukin-8 from human gastric epithelial cells by heat-shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori*
Journal of Medical Microbiology Vol.48 (10) 927-933, 1999.
- (2) Kai M., Matsuoka M., Nakata N., Maeda S.,

Gidoh M., Maeda Y., Hashimoto K., Kobayashi K., Kashiwabara Y.

Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene.

FEMS Microbiology Letters Vol.177, 231-235, 1999.

- (3) Hanawa T., Kai M., Kamiya S., Yamamoto T.

Cloning, sequencing, and transcriptional analysis of the *dnaK* heat shock operon of *Listeria monocytogenes*.

Cell Stress & Chaperones Vol.5 (1), 21-29, 2000.

- (4) Jamal M.A., Maeda S., Nakata N., Kai M., Fukuchi K., Kashiwabara Y.

Molecular basis of clarithromycin-resistance in *Mycobacterium avium intracellulare* complex

Tubercle and Lung Disease Vol.80(1),1-4,2000.

2. 学会発表

- (1) 甲斐雅規、中田 登、Netnaphis Chinanonwait 儀同政一、松岡正典、柏原嘉子
RAP-PCR 法を用いた Dapsone 耐性に関する遺伝子のクローニング
日本ハンセン病学会 第 72 回日本ハンセン病学会総会 1999.4
- (2) 柏原嘉子、松岡正典、甲斐雅規、前田伸司、中田 登、前田百美、長尾栄治、金城邦浩、後藤正道、北島信一、並里まさ子、尾崎元昭、柳橋次雄、L.E.Takaoka
キノロン耐性が疑われた症例から得られたらい菌の *gyr A* 遺伝子の変異
日本ハンセン病学会 第 72 回日本ハンセン病学会総会 1999.4
- (3) 松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、中田 登、小林和夫、柏原嘉子、和泉眞蔵、Gue-TaeChae、T.P.Gillis
らい菌の分離と *rpo T* 遺伝子の多型性とそ

の地理的分布

日本ハンセン病学会 第 72 回日本ハンセン病学会総会 1999.4

- (4) Matsuoka M., Maeda S., Kai M., Nakata N., Chae G.-T., Gillis T.P., Kobayashi K., Izumi S., Kashiwabara Y. *M. leprae* typing by genomic diversity and global distribution
Thirty-fourth Research Conference on Tuberculosis and Leprosy 1999.6
- (5) Kashiwabara Y., Matsuoka M., Kai M., Maeda S., Nakata N., Maeda Y. Mutations in *gyr A* gene of *Mycobacterium leprae* isolates resistant to fluoroquinolones infection in mice
Thirty-fourth Research Conference on Tuberculosis and Leprosy 1999.6
- (6) Kai M., Nakata N., Gidoh M., Maeda S., Kashiwabara Y. Cloning a novel gene involved in dapson resistance in Mycobacteria
39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1999.9
- (7) 松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、中田 登、川津邦雄、柏原嘉子、Gue-Tae Chae、Yin Yue-Ping、Wu Qinxue、Abraham T. Agdamag
らい菌 *rpoT* 遺伝子の多型性とその地理的分布 II. 韓国、中国におけるそれぞれの型の分布
日本ハンセン病学会 第 73 回日本ハンセン病学会総会 2000.3
- (8) 柏原嘉子、松岡正典、甲斐雅規、前田伸司、中田 登、前田百美、長尾榮治、後藤正道、北島信一、並里まさ子、尾崎元昭、柳橋次雄、小原安喜子、L.E.Takaoka Mohammad Ali Abbasi、Abraham T. Agdamag
薬剤耐性に関与するらい菌の遺伝子変異
日本ハンセン病学会 第 73 回日本ハンセン病学会総会 2000.3

分担研究報告書

らい菌のリン脂質合成酵素に関する研究

分担研究者 前田伸司 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
病原微生物部 主任研究官

[研究要旨]

ホスファチジルイノシトール (PI) は、リン脂質の一種として知られているが、抗酸菌ではそれ以外に、LAMなどの細菌表面上へのアンカーとしての機能があることが報告されている。このことは、抗酸菌にとって、PI が細胞膜形成だけでなく、細胞壁合成の際に、重要な因子のひとつであることを示唆している。らい菌の遺伝子バンクから酵母やほ乳類の組織等で報告されているホスファチジルイノシトール合成酵素 (PIS) が持つ、共通構造が存在する 4 種類の遺伝子を選び発現させることによって、PIS の特定と性質等の検討を試みた。その結果、*pgsA1* をコードする遺伝子を発現させた *Mycobacterium smegmatis* の膜面分中に PIS 酵素活性が検出された。

A. 研究目的

細胞壁は、菌にとってホストの生体防御システムから逃れ、生き続けるために必要な防御壁である。抗酸菌では、乾燥重量の約 40% が長鎖の脂肪酸を含んだ脂質等で、細胞壁が構成されることが知られている。らい菌の細胞壁は、ペプチドグリカンのアラニンがグリシンに置き換わっていることやミコール酸の α 側鎖の鎖長が他の抗酸菌と異なることが知られている。また、詳細に検討されている結核菌と同様にらい菌は、LAM と呼ばれる独特の構造を持っていることが明らかにされている。

ホスファチジルイノシトール (PI) は、生体膜を構成するリン脂質のひとつであるが、さらに抗酸菌では LAM 等の細胞外構造物を菌体上に固定するアンカーとして働いていることが報告され¹⁾、強固な細胞壁を形成する上で重要な因子であると考えられる。

そこで、本研究では PI に注目し、その合成に関わる酵素の発現や性質を明らかにするために、らい菌の遺伝子バンクからホスファチジルイノシトール合成酵素 (PIS) をコードする遺伝子を選び、その発現を試みた。

B. 材料と方法

発現ベクターの構築: いくつかの PIS の候補となる遺伝子をデータベースから選び出しプライマーを合成し、*Mycobacterium leprae* (Thai-53 株)

のゲノム DNA を鋳型とした PCR でそれぞれの遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子は、pMV261 に挿入し発現ベクターを構築した。

M. smegmatis の形質転換: エレクトロポレーション法 (2500V、25 μ F、800 Ω) で *M. smegmatis* mc² 155 株に構築したベクターを導入した。その後、カナマイシン (25 μ g/ml) 入り LB プレートで 37 $^{\circ}$ C、3 日間培養しコロニーを得た。

菌の破碎と分画: 超音波破碎機で菌を破碎後、10,000 x g で 30 分間遠心し、上清と沈殿を得た。沈殿には 60% になるように Percoll を加えて分画し P60 画分を、上清は 10 万 x g で 60 分間遠心し、膜面分とサイトソール画分を調製した。

PIS 活性の測定: 反応系 50 μ l 中に各画分 (蛋白質質量で 0.1-0.4mg)、0.1mM myo-[2-³H]-inositol (2.5 x 10⁵ cpm/ μ mol)、0.15mM CDP-DG、1mM DTT、0.01% Triton X-100、10mM MgCl₂、100mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) とするように加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた。生成した PI の放射活性をトップカウント (パッカー社) で測定した。

C. 研究結果

リン脂質の合成酵素に関しては、*E. coli* や *Saccharomyces cerevisiae* で既によく研究されており、それらの合成酵素は、一次構造上 “D-G-x(2)-A-R-x(8)-G-x(3)-D-x(3)-D” という共通な一次構造を持っていることが報告されている²⁾。そこで、この共通構造を持つ蛋白質をらい