

が指摘されている PE/PPE 遺伝子群において CGH データの乱れが多く認められたため、このような遺伝子の解析にはさらに慎重な解析が必要となるだろう。また、CGH 解析では未知の挿入配列や転座などは検出できないという問題点があり、今後ゲノム解析を進める上で考慮する必要がある。現在、各株に検出された SNPs について、リシーケンス解析による正確な同定を進行中である。また、その遺伝子変異情報に基づいた表現型推定、各小系統群における変異頻度の集団解析などを行っていく予定である。

E. 結論

本研究によって得られたゲノム情報は、日本国内の結核菌として集団構造全体の多様性を損なわないように選択されたと言える。したがって、本邦に分布する北京型結核菌の遺伝的多様性の全容として統合的に検証可能である。ゲノム個性の網羅的情報として有用であるだけでなく、疫学的に何らかの特性が疑われる株の出現に応じて、全ゲノム情報を扱うためのリファレンスデータとして重要な指標となるだろう。近年の次世代シーケンサーの発達に伴い、臨床分離株の膨大な塩基配列情報が容易に入手可能となりつつある。このような技術的向上を踏まえ、小系統群に特有と思われる疫学的性質（多剤耐性化株の頻出、若年層での集団事例頻出等）にアプローチすることにより、結核ゲノム疫学の新たな研究展開が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表、著書

Takayuki Wada, Tomotada Iwamoto and Shinji Maeda

Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in East Asia revealed through refined population structure

analysis.

FEMS Microbiology Letters 291, 35-43 (2009)

長谷 篤、前田秀雄

第 83 回総会シンポジウム IV. 分子疫学研究の進歩と対策への応用

結核、第 84 巻、第 1 号、49-67 (2009)

和田崇之、前田伸司

「VNTR」

保健師・看護師の結核展望 92、印刷中 (2009)

2. 主要な学会発表

和田崇之

シンポジウム IV. 分子疫学研究の進歩と対策への応用—結核菌の反復配列多型 (VNTR) 解析におけるローカライジングと国際標準化

第 83 回日本結核病学会総会、東京 (2008.4.24-25)

結核、第 83 巻、第 3 号、233 頁、2008 年

和田崇之、岩本朋忠、吉田志緒美、長谷 篤

北京型結核菌のサブグループにおける遺伝的特徴：VNTR 多型解析を中心として

第 83 回日本結核病学会総会、東京 (2008.4.24-25)

結核、第 83 巻、第 3 号、314 頁、2008 年

長谷 篤、和田崇之、下内 昭

接触者調査における北京型結核菌サブグループの分布状況

第 83 回日本結核病学会総会、東京 (2008.4.24-25)

結核、第 83 巻、第 3 号、314 頁、2008 年

和田崇之、岩本朋忠、吉田志緒美、長谷 篤、前田伸司

ゲノム比較に基づいた結核菌臨床分離株の遺伝的多様性解析

第 3 回日本ゲノム微生物学会年会、東京 (2009.3.5-7)

和田崇之、岩本朋忠、吉田志緒美、前田伸司、長

谷 篤

結核ゲノム疫学の創出を目的とした結核菌臨床
分離株の全ゲノム比較解析

第 82 回日本細菌学会総会、名古屋市
(2009.3.12-14)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. CGH解析により検出された国内由来北京型結核菌株の遺伝子欠失領域 (Region of difference)

RDjp 番号	欠失遺伝子	欠失サイズ (bp)	欠失が認められた株				
			B5	B3	B1	B2/T	B4
既知欠失領域 †							
RD105	Rv0071, Rv0072, Rv0073, Rv0074	3557	x	x	x	x	x
RD149	Rv1572-Rv1587c (16 genes, mycobacteriophage phiRv1)	9280	x	x	x	x	x
RD152	Rv1754c - Rv1766c (3 transposase, PE/PPE, and function unknown genes)	12483	x	x	x	x	x
RD181	Rv2262c, Rv2263	758		x	x	x	x
RD207	Rv2814c - Rv2820c (2 transposase and CRISPR associated genes)	8863	x	x	x	x	x
新規同定領域							
RDjp04	Rv0355c (PPE8)	156	x	x	x	x	x
RDjp301	Rv0867c (rpfA)	189		x			
RDjp302‡	Rv1368, Rv1369, Rv1370, Rv1371	3187		x			
RDjp11	Rv1447c (zwf2)	754	x				
RDjp18	Rv1768 (PE_PGRS31)	1811			x		
RDjp50	Rv1787 (PPE family)	66	x				
RDjp21	Rv1878 (glnA3), Rv1879	1204	x				
RDjp24‡	Rv2016 - Rv2024 (2 transcriptional factors and function unknown genes)	5308				x	
RDjp304‡	Rv2335 (cysE), Rv2336 (PPE), Rv2337c (PPE), Rv2338c (moeW)	3858		x			
RDjp32‡	Rv2352c (PPE), Rv2353c (PPE)	1527			x	x	x
RDjp32.1‡	Rv2352c (PPE), Rv2353c (PPE)	2330		x			
RDjp33‡	Rv2356c (PPE)	2101			x		
RDjp34	Rv2434c	214					x
RDjp305	Rv2456c	127		x			
RDjp35‡	Rv2542, Rv2543 (lppA), Rv2544 (lppB), Rv2545	2172	x	x	x	x	x
RDjp37	Rv2713 (sthA)	537			x		
RDjp38‡	Rv2774c (PPE)	246		x	x	x	x
RDjp42	Rv3019c (esxR)	572					x
RDjp43	Rv3022A (PE29)	202			x		
RDjp307	Rv3299c (atsB), Rv3300c	3360		x			
RDjp45	Rv3343c (PPE54)	624				x	
RDjp308	Rv3391 (acrA)	533		x			
RDjp46‡	Rv3428c (transposase)	341					x
RDjp47	Rv3447c, Rv3448, Rv3449 (mycP4)	4763	x				
RDjp309	Rv3514 (PE_PGRS)	425		x			
RDjp310	Rv3529c	291		x			
RDjp311	Rv3765c	87		x			
RDjp49	Rv3785	89	x	x	x	x	x

† Tsolaki et al. (2004).

‡ CGH解析により欠失が疑われるが、PCR増幅および従来法 (サンガー法) による塩基配列の確認が行われていないもの。欠失サイズはCGHデータによる概算値。

表2. CGH解析によって蛍光波形の乱れが確認された遺伝子群

HV領域名	遺伝子群	波形の乱れが認められた株				
		B5	B3	B1	B2/T	B4
HVjp02	Rv0095c	x	x	x	x	x
HVjp03	Rv0278c (PE_PGRS), Rv0279c (PE_PGRS)	x	x	x	x	x
HVjp08	Rv1296 (thrB)	x	x	x	x	x
HVjp09	Rv1371			x	x	x
HVjp10	Rv1394c (cyp132)	x				
HVjp12	Rv1448c (tal)			x	x	x
HVjp13	Rv1450c (PE_PGRS)	x	x	x	x	x
HVjp14	Rv1451 (ctaB), Rv1452c (PE_PGRS)	x	x	x	x	x
HVjp14.1	Rv1452c (PE_PGRS)	x	x	x	x	x
HVjp20	intragene (VNTR locus)		x	x	x	x
HVjp23	Rv2015c	x	x	x	x	x
HVjp26	Rv2080 (lppJ), Rv2081c	x				
HVjp303	Rv2258c		x			
HVjp36	Rv2650c, Rv2651c (mycobacteriophage)	x	x	x	x	x
HVjp41	Rv3018c (PPE), Rv3018A (PE)	x				
HVjp306	intragene		x			
HVjp44	Rv3280 (accD5), Rv3281, Rv3282	x	x	x	x	x
HVjp48	Rv3508 (PE_PGRS)	x				

結核菌による臓器侵襲の分子機構

分担研究者 大原 直也 国立感染症免疫部室長

研究要旨 すべての生物に必須と考えられるチミジル酸の合成を担う酵素としては古くから知られているThyAと、近年その存在が明らかになったThyXがある。現在ゲノムが明らかになっているほとんどの生物はThyAとThyXの片方のみを持つが、抗酸菌とその近縁種のみがThyAとThyXを同時に持つ。その意義を明らかにする目的でBCGの*thyX*の性状を解析した。その結果、完全合成培地であるSauton培地上ではThyXを必要としないこと、富栄養である7H10を基本とした培地上で*thyX*欠損株を発育させるためにはカタラーゼを含有させることが必要であることが明らかになった。変異型*thyX*遺伝子を複数作製し、プラスミドに載せることで*thyX*欠損株を相補したところ、チミジル酸合成活性は有しないが、NADPHオキシダーゼ活性を有する変異型ThyXをコードする遺伝子がカタラーゼ不含有培地での発育、7H9・ADC・Tween80用いた振とう培養での発育を相補することができた。このことからThyXの持つNADPHオキシダーゼ活性が本菌の発育に重要であることが示された。さらにThyXを過剰発現すると抗結核剤であるパラアミノサリチル酸（PAS）に耐性になることが明らかになった。

A. 研究目的

結核菌は培養した時と宿主内に存在する時では遺伝子の発現パターンが異なることが知られている。このことは結核菌による臓器侵襲性の菌側の要因を考える際に重要である。結核菌が宿主に侵入した時に発現が上昇する遺伝子で、これまでに解析がされている遺伝子も多いが、まだ解析の進んでいない遺伝子が多いのも現状である。

チミンの合成系はほとんどの生物にとって必須であり、古くから解析されてきた代謝系である。その中のチミジル酸合成酵素 *thymidylate synthase* (TS) である *ThyA* は細菌からヒトまで広く保存されている酵素である。しかし、古細菌を中心に *ThyA* を持たない細菌の存在が知られ、それらは *ThyA* の代わりに *ThyX* を持つことが明らかになった。さらに、*Mycobacterium* とその近縁種である *Corynebacterium*、*Nocardia*、*Rhodococcus* は例外的に *ThyA* と *ThyX* の両者を持つことが明らかになった。*ThyA* と *ThyX* は同じチミジル酸合成活性を持ちながら両者に相同性は無く、また *ThyA* と異なり *ThyX* は補酵素として FAD を必要とし、その反応に NADPH オキシダーゼ反応を伴うことが明らかになっている。我々はこれまでに BCG *thyX* 欠損株を作製し、同株が 7H9-ADC-Tween80 用いた振とう培養では発育できないことを明らかにした。本研究では BCG における *ThyX* の存在意義を明らかにする目的でさらなる解析を行った。

B. 研究方法

BCG Tokyo 株を親株とした TS の遺伝子 *thyA* あるいは *thyX* の遺伝子欠損株 ($\Delta ThyA$ および $\Delta ThyX$) はショ糖感受性遺伝子 (*sacB*) を利用した 2 段階の相同組み換えによって行なった。遺伝子相補株 $\Delta ThyA$: *thyA/pNN* および $\Delta ThyX$: *thyX/pNN* は $\Delta ThyA$ および $\Delta ThyX$ それぞれをプラスミド pNN-*thyA* あるいは pNN-*thyX* で形質転換することにより作製した。*thyX* 変異型遺伝子は点変異を導入法することにより作製した。

BCG Tokyo 株および遺伝子組み換え

BCG 株の培養には Sauton 培地、Sauton 平板、7H10-ADC (albumin-dextrose-catalase) 平板、7H10-ADS (albumin-dextrose) 平板、7H9-ADC-Tween80 培地を用いた。

カタラーゼ活性および NADP/NADPH 比の測定には市販のキットを用いた。

酸化ストレスに対する抵抗性試験には過酸化水素およびクメンペルオキシダーゼを用いた。

マウスマクロファージへの BCG の感染は MOI 10 で行った。1 時間感染後、ゲンタマイシン含有培地で洗浄、計時的に感染細胞から菌を回収し、7H10-OADC 培地に塗布し、CFU を計測した。

(倫理面への配慮)

該当しない。遺伝子組み換え実験については一般の組み換え DNA 実験に準じ、機関内承認を得た。

C. 研究結果

これまでに BCG を最小培地、富栄養培地いずれを用いて培養した場合においても *thyA* および *thyX* が発現していることを確認しており、また両遺伝子は大腸菌 *thyA* 欠損株を相補できることからチミジル酸合成酵素としての活性を有していることが確認されている。

thyA、*thyX* それぞれの遺伝子欠損株 $\Delta ThyA$ および $\Delta ThyX$ は通常行われるどおり 7H10-OADC 平板培地を用いて作製することができた。作製した欠損株の培養条件を変えたところ、最小培地に相当する Sauton 培地では液体培地および寒天平板いずれにおいても増殖した。しかし、栄養豊富な 7H9-ADC-Tween80 培地を用いた振とう培養では $\Delta ThyA$ は増殖することができたが、 $\Delta ThyX$ は増殖が顕著に抑えられた。 $\Delta ThyX$ へ *thyX/pNN* を導入した相補株 $\Delta ThyX$: *thyX/pNN* は親株と同程度に増殖した。この増殖抑制の原因として振とうによる酸素への暴露が考えられたため、次に通常の 7H10-ADC 平板培地とカタラーゼを含有させない 7H10-ADS 平板培地を用いて欠損株の増殖を試みた。 $\Delta ThyA$ は 7H10-ADC 平板培地、7H10-ADS 平板培地いずれにおいて

も増殖することができたが、 Δ ThyXは7H10-ADC平板培地では増殖したが、7H10-ADS平板培地では増殖しなかった。また相補株 Δ ThyX: *thyX*pNN は7H10-ADS平板培地上でも親株と同程度に増殖した。

次に7H10-ADS平板培地上での発育に必要なThyXの活性がチミジル酸合成活性か、NADPHオキシダーゼ活性かを明らかにするため、変異型 *thyX* 遺伝子を作製し、 Δ ThyXを形質転換した。チミジル酸合成活性は有しないが、程度の異なるNADPHオキシダーゼ活性を有する *thyX* Y44F、*thyXH69E*、*thyXL104A*、*thyXS105E*はいずれも Δ ThyXを相補した。このことからThyXのNADPHオキシダーゼ活性がBCGの生理機能に重要な役割を果たすことが示された。

BCGはカタラーゼを産生するが、カタラーゼ不含有培地における増殖抑制が菌体からのカタラーゼ産生量が増加したためかを確認するために Δ ThyXのカタラーゼ活性を測定したが、親株との間に差は認められなかった。次に酸化物の影響を酸化物含有培地での培養法およびディスク法で調べたが、過酸化水素およびクメンペルオキシダーゼに対しては親株、 Δ ThyX、 Δ ThyX: *thyX*pNNの間で差を認めなかった。またNADP/NADPHについても測定したが、これまでに親株、 Δ ThyX、 Δ ThyX: *thyX*pNNの間で明らかな差は認められなかった。

次にThyX欠損による宿主細胞内における生存への影響をマウスマクロファージ内での生存率を指標に評価した。C57BL/6マウス骨髄由来マクロファージに宿主細胞対菌を1:10で感染させ、感染24時間後および48時間後にマクロファージを破砕し、寒天平板に形成させたコロニー数を計測したところ、 Δ ThyX、 Δ ThyX: *thyX*pNNの間で明らかな差は認められなかった。

Rengarajan は結核菌の para-aminosalicylic acid (PAS) 耐性の原因のひとつとしてThyAの変異によるメカニズムを明らかにしている (Mol. Microbiol.53, 275-282,

2004)。同じチミジル酸合成活性を持つThyXの変異によってもPAS耐性を獲得する可能性を考え、PAS含有7H10-OADC平板培地で親株、 Δ ThyX、 Δ ThyX:*thyX*pNN、 Δ ThyA、 Δ ThyA: *thyA*pNNを培養した。PAS非含有培地ではいずれも増殖したが、PAS 0.1 ug/ml含有培地では Δ ThyAおよび Δ ThyX:*thyX*pNNは増殖したが、親株、 Δ ThyX、 Δ ThyA: *thyA*pNNは増殖しなかった。PAS濃度を250 ug/mlまで増加させても Δ ThyAおよび Δ ThyX:*thyX*pNNは増殖し、250 ug/mlまで濃度依存的に増殖速度が増加した。親株、 Δ ThyX、 Δ ThyA: *thyA*pNNはいずれのPAS濃度においても増殖は認められなかった。

D. 考察

Mycobacterium とその近縁種である *Corynebacterium*、*Nocardia*、*Rhodococcus* はチミジル酸合成酵素 thymidylate synthase (TS) として古典的な酵素であるThyAと近年発見されたFAD/NADPH依存性のThyXの両者を持つ。ThyAについてはRengarajan, Jらが結核菌の *thyA* 遺伝子破壊株を作製し (Mol. Microbiol.53, 275-282, 2004)、増殖に必須でないことが示されている。またThyAに変異が生じることでPASに対する耐性を獲得することを報告している。一方ThyXについては構造解析、機能解析を含め、タンパク質レベルの解析が詳細に行われているが、菌体内での役割については明らかにされてこなかった。そのため我々が作製したBCG *thyX* 遺伝子欠損株について細菌学的な検討を加えた。 Δ ThyXは完全合成培地においても増殖し、BCGの増殖に必ずしも必須ではなかった。しかしカタラーゼを含有しない7H10-ADS平板培地および7H9-ADC-Tween 80を用いた振とう培養で Δ ThyXが増殖しなかったことから過酸化物に対する防御にThyXが関与していることが推測された。このことはチミジル酸合成活性を有しないがNADPHオキシダーゼ活性は保持する変異型 *thyX* 遺伝子を導入した Δ ThyXが7H10-ADS平

板培地および7H9-ADC・ Tween 80を用いた振とう培養で増殖することからも推測される。そのため、 Δ ThyXのカタラーゼ活性、過酸化物質に対する抵抗性、NADP/NADPH比、宿主マクロファージ内での短期生存率について調べたが、これらの性状については親株であるBCG Tokyo株との間に顕著な差を見いだせなかった。

*thyA*の変異によりPASに対する耐性を獲得することから*thyX*の変異(欠損)によってもPASに対して耐性になる可能性を考えた。抗酸菌の薬剤の感受性を調べるためには7H9-ADC・Tween80培地が汎用されるが、 Δ ThyXがこの培地を用いた振とう培養で増殖しなかったことから、種々の濃度のPASを含有する7H10-OADC平板培地を用いて測定した。その結果、予測とは反し、 Δ ThyXはいずれのPAS濃度においても増殖しなかった。さらに興味深いことに、結果的にThyXの過剰発現株となっている Δ ThyX:*thyX*pNNが Δ ThyAとともに高濃度のPAS含有培地においても増殖した。しかも250 μ g/mlまでは増殖が促進し、PAS依存性のような動向を示した。このことから結核菌がPAS耐性になるメカニズムのひとつとして、遺伝子には変異を生じず、ThyXに関連した遺伝子の発現レベルの変化に起因するメカニズムが存在することが示唆された。この可能性を証明するためにはさらなる解析が必要である。

E. 結論

BCGのチミジル酸合成酵素 thymidylate synthase (TS) *thyA*と*thyX*の遺伝子破壊株 Δ ThyAと Δ ThyXの細菌学的性状解析を行った。ThyXの持つNADPHオキシダーゼ活性がBCGの生理機能に重要であることが示唆された。結核菌のパラアミノサリチル酸(PAS)耐性メカニズムのひとつとしてThyXの過剰発現が原因である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Naito M, Hirakawa H, Yamashita A, Ohara N,

Shoji M, Yukitake H, Nakayama K, Toh H, Yoshimura F, Kuhara S, Hattori M, Hayashi T, Nakayama K: Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*, DNA Res 15: 215-225, 2008.

Yoshimura M, Ohara N, Kondo Y, Shoji M, Okano S, Nakano Y, Abiko Y, Nakayama K: Proteome analysis of *Porphyromonas gingivalis* cells placed in a subcutaneous chamber of mice, Oral Microbiol Immunol 23: 413-418, 2008.

大原直也、小林和夫: 結核菌, バイオメディカルサイエンス研究会編. バイオセーフティの事典—病原微生物とバイオハザード対策の実例— 医学評論社 194-197, 2008.

大原直也: ハンセン病, 渡邊信、西村和子、内山裕夫編. 微生物の事典 朝倉書店 470-471, 2008.

2. 学会発表

Ohara N, Okabe M, Yoshimura M, Nakayama K, Kobayashi K. Contribution of NADPH oxidase activity of thymidylate synthase ThyX to growth of BCG. US-Japan Cooperative Medical Science Program. Forty-third Annual Tuberculosis and Leprosy Conference. Jul 2008. Baltimore, MD (U.S.A).

大原直也、吉村満美子、岡部真裕子、中山浩次、小林和夫. *thyX* 遺伝子欠損株の作製による抗酸菌チミジル酸合成酵素の解析. 第78回実験結核研究会. 東京. 2008年4月.

菊池有一郎、大原直也、上田青海、平井要、柴田幸永、中山浩次、藤村節夫. *Porphyromonas gingivalis* ECFシグマ因子PG0162変異株の性状解析. 第50回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会. 東京. 2008年9月.

Tan C, Yamada H, Shibata K, Muta H, Ohara N, Wajjwalku W, Podack ER,

Yoshikai Y. CD30L/CD30 signaling by T-T cell interaction augments Th1 responses. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 2008年12月.

北里海雄、高塚昌孝、熊盛、布施隆行、郭朝万、劉格、大原直也 : MIP-T3のC末端は微小管結合と蛋白質の安定性制御に重要である、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月.

厚生労働科学研究補助金（社会保障国際協力推進研究事業）
分担研究報告書

抗酸菌症と *NRAMP-1* 遺伝子多型の関連とその意義に関する検討

分担研究者 慶長直人（国立国際医療センター）

研究協力者 Sapkota BR、土方美奈子、松下育美、櫻田紳策（国立国際医療センター）

田中 剛（東京大学医学部呼吸器内科）

研究要旨

nramp-1 遺伝子は、マウスにおける細胞内寄生細菌に対する感受性を規定する遺伝子として、ポジショナルクローニングにより発見され、その後、ヒトの相同遺伝子として、*NRAMP-1* が発見された。1998年に Bellamy らが、このヒト遺伝子の4つの遺伝子多型とアフリカ系集団での結核の関連解析で有意な結果を得たことから、*NRAMP-1* 遺伝子の結核感受性遺伝子としての研究が数多くなされたが、集団ごとに、合致しない結果が得られており、その理由について検討する必要がある。我々は、ヨーロッパ系集団 50 例、日本人 50 例の遺伝子タイピングの結果から、両集団の *NRAMP-1* 遺伝子領域における連鎖不平衡およびハプロタイプ構造の違いを明らかにし、遺伝子制御領域の新たな遺伝子多型を同定し、この問題の解決に向けて前進した。

A. 研究目的

抗酸菌感染症の発症に遺伝素因が関与していることは、古くから疫学的研究により、人種による感受性の違い、双生児研究などから、明らかにされてきた。メンデル式遺伝性疾患として、家族性の抗酸菌感染症をきたす、インターフェロン γ レセプター、STAT-1、IL-12、IL-12 レセプターの欠損例が知られているが、通常見られる結核症の疾患感受性遺伝子の候補としては、*NRAMP-1*（現在 *SLC11A1*）が最もよく研究されている。*NRAMP-1* 遺伝子は、マウスの *nramp-1* 遺伝子のヒト相同遺伝子として同定されたものである。マウスの *nramp-1* 遺伝子は、もともと *Salmonella*, *Leishmania*, BCG 菌など細胞内寄生細菌に対する感受性を規定する遺伝子 *Ity/Lsh/Bcg* として、ポジショナルクローニングにより発見され、Gly169Asp の非同義置換が、疾患感受性を決定していることが明らかになっている。この遺伝子は、鉄イオンのトランスポーターとして、細胞内寄生細菌の殺菌に関わることが知られている。1998年に Bellamy らが、このヒト遺伝子 *NRAMP1* の4つの遺伝子多型（5' (GT)_n, INT4 G/C, D543N, 3' UTR ins/del (TGTG)）とアフリカ系集団での結核の関連解析で有意な結果を得たことから、*NRAMP-1* 遺伝子の結核感受性遺伝子としての研究が数多くなされてきた。ところが集団や研究ごとに、合致しない結果が得られており、その理由については明らかでない。

我々は、ヨーロッパ系集団 50 例、日本人 50 例の遺伝子タイピングの結果から、両集団の *NRAMP-1* 遺伝子領域における連鎖不平衡およびハプロタイプ構造の違いを明らかにし、遺伝子制御領域の新たな遺伝子多型を同定し、この問題の解決に向けて、最初の手がかりを得た。

B. 方法

NRAMP1 (*SLC11A1*) 遺伝子は、ヒト第2染色体長腕 (2q.35) に位置し、全長 17 kb ほど、15 のエクソンからなる。

本遺伝子全域をカバーする遺伝子多型として、1998年 Bellamy らが、アフリカ系集団の結核症と関連すると報告した4つの多型（5' (GT)_n, INT4 G/C, D543N, 3' UTR ins/del (TGTG)）に加えて、HapMap パブリックデータベースより9個のSNPs、それ以外の既報より6個のSNPsの合計19個の遺伝子多型について、ヨーロッパ系集団50例、日本人50例の遺伝子タイピングをRFLP法によって、実施した。

これらの遺伝子多型の連鎖不平衡とハプロタイプ構造を推定するためには、フリーウェアである、PHASE 2.1 を利用した。これらの遺伝子多型から、tagSNP を選出するためには、Haploview Tagger（フリーウェア）を利用した。

さらに既報の転写開始点の上流 1 kb について、直接シーケンス法による網羅的な遺伝子変異の同定を試みた。

ヒト検体を用いた検討については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に準拠して、関連施設の倫理委員会の承認を得た。

C. 結果

NRAMP1 遺伝子全長約 17 kb に存在する 19 個の遺伝子変異について、ヨーロッパ系集団 50 例、日本人 50 例の遺伝子タイピングを RFLP 法によって、実施したところ、minor allele 頻度は、集団ごとにかなりの違いが認められた。どちらかの集団で、minor allele 頻度 0.1 以上の変異が 19 個中の 12 個に見られたため、これらによる、ハプロタイプの推定を行ったところ（図1）、日本人集団でも、ヨーロッパ系集団でも最頻ハプロタイプは、同一で、

日本人では66%、ヨーロッパ系では51%と推定され、大きな違いが見られなかった。ところが、日本人集団では、それに続くハプロタイプの頻度が4から6%とかなり低く、ひとつの major haplotype と多数の minor haplotype という構造をとっているのに対して、ヨーロッパ系集団では、日本人で5番目に推定される minor haplotype が23%に認められ、一つの major haplotype、それに続く second major haplotype とその他のハプロタイプという構造をとっていることが明らかになった。またヨーロッパ系集団の second major haplotype は、ヨーロッパ系集団に特徴的なイントロン7の SNP を含むものであった。さらにアジア系集団でしばしば関連が報告される、D543N, 3' UTR ins/del (TGTC) の遺伝子頻度は、ヨーロッパ系集団ではアジア系よりかなり低いため、ほとんど有意なハプロタイプとしては推定されなかった。

次に既報では、5' (GT)_n 以外にはほとんど遺伝子変異が認められないとされている5'側転写開始点上流約1,000 bp についての SNP 検索を実施したところ、少なくとも10個の変異、その中で、2個は minor allele 頻度0.1以上のSNPsとして同定された。

D. 考察

NRAMP1 遺伝子は、Bellamy らの結核症に関する関連解析の報告 (Bellamy R, et al. *N Engl J Med* 1998) 以来、ヒト抗酸菌感染症で最も多く検討されてきた候補遺伝子であり、我々も非結核性抗酸菌症で、有意な結果を得ている (Tanaka G et al. *Eur Respir J*, 2007)、そのとき報告された4つの遺伝子多型が、どのように抗酸菌感染症と関連するかについては、集団、報告によりかなりの違いが見られる。最近のメタ解析によっても、NRAMP1 の遺伝子多型と結核症との関連は、アフリカ系、アジア系では、有意であるが、ヨーロッパ系では、有意でないという結果が得られている (Li HT, et al. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006)。

このように、遺伝子関連解析により、合致しないデータが得られる場合、関連する遺伝子変異は、機能的に意味があるが、集団のちがいや、遺伝子と環境の相互作用により、異なる効果を示す可能性、関連する遺伝子変異は、マーカーに過ぎず、真の機能的遺伝子変異は、近傍にあり、ゲノム構造の人種差によって、マーカーとの関連が出たり出なかつたりする可能性、単なる type I エラー (偽陽性) である可能性の3つが主に考えられる。我々は特に、真の機能的遺伝子変異は、他にあるのではないかとの仮説のもとに検討を進めている。

これまでに5' (GT)_n は機能的変異であるという証拠が蓄積されており (Searle S and Blackwell JM. *J Med Genet* 1999)、allele 2; t(gt)₅ac(gt)₅ac(gt)₁₀g と allele 3; t(gt)₅ac(gt)₅ac(gt)₉g では、NRAMP1

遺伝子の転写活性が明らかに異なり、前者は低活性、後者は major allele で高活性である。また、前者が感染症に感受性、後者が自己免疫疾患に感受性であるとされている。またこのリピートの tacgtg 配列には転写因子の HIF-1 alpha が結合することが報告されている (Bayele, H. K. et al. *Blood* 2007) (図2)。しかしながら、このことだけでは、これまでの一連の関連解析の不一致を説明できないため、今後、今回得られた遺伝子全域のゲノム構造、制御領域の遺伝子変異、ハプロタイプ特異的遺伝子発現定量法などを組み合わせて、全貌を明らかにする必要がある。

E. 結論

NRAMP1 遺伝子全域の主要な遺伝子変異から構成されるハプロタイプ構造は、アジア系とヨーロッパ系で違いが認められた。また5'制御領域の新たな遺伝子変異を同定した。これらの知見により、これまで報告されている5' (GT)_n のリピート以外に、この遺伝子の機能に影響を与える変異を見だし、これまでの関連解析の結果を統一的に説明できるかもしれない。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 論文発表なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

Haplotype structure of the *SLC11A1* gene in Japanese and Caucasians

Japanese (N=50)			Haplotype													
Major Haplotype	Frequency	SE	1	2	5	9	12	13	15	16	17	18	19			
			-3890	MS	2262	3252	5626	8091	8672	12519	12981	13063	13093	14425		
H1	0.663	0.010	T	202 (A3)	C	G	C	T	G	G	G	ins	A	C		
H2	0.060	0.002	C	204 (A2)	T	C	C	C	A	A	G	ins	G	T		
H3	0.052	0.005	T	202 (A3)	C	G	C	T	A	A	A	del	G	T		
H4	0.040	0.000	T	206 (A1)	C	G	C	T	A	A	G	ins	G	C		
H5	0.039	0.002	C	204 (A2)	T	C	T	C	A	A	G	ins	G	T		

Caucasians (N=50)			Haplotype													
Major Haplotype	Frequency	SE	1	2	5	9	12	13	15	16	17	18	19			
			-3890	MS	2262	3252	5626	8091	8672	12519	12981	13063	13093	14425		
H1	0.508	0.010	T	202 (A3)	C	G	C	T	G	G	G	ins	A	C		
H5	0.231	0.007	C	204 (A2)	T	C	T	C	A	A	G	ins	G	T		
H8	0.036	0.009	T	202 (A3)	C	G	C	T	A	G	G	ins	A	C		
-	0.033	0.005	C	202 (A3)	C	G	C	T	A	A	G	ins	G	T		
H2	0.030	0.003	C	204 (A2)	T	C	C	C	A	A	G	ins	G	T		

 = minor alleles
 = tagSNPs
 = well-studied variations

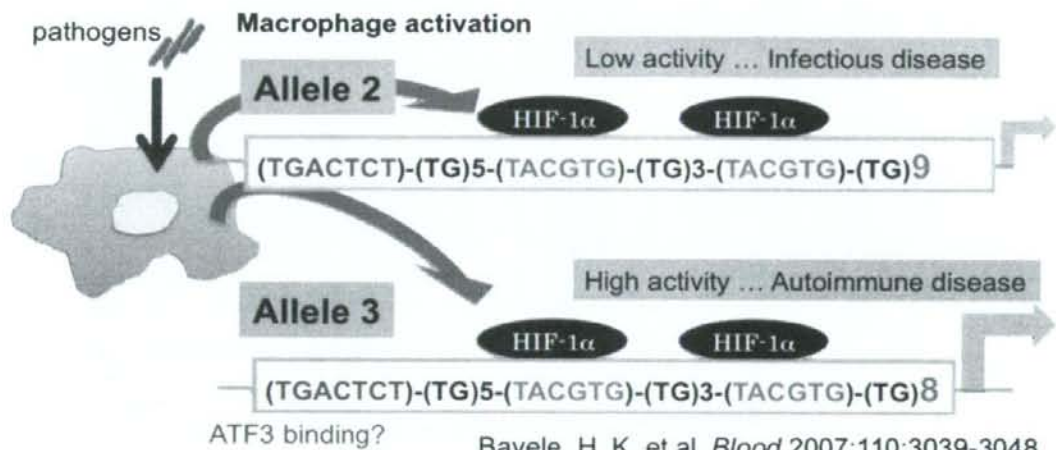
The polymorphisms with minor AF > 0.1 in either JP or CA are analyzed.
 Ins/del, MS and D/N in the previous studies were also analyzed.

Analytical software: Phase 2.1

图 2

Functional significance of promoter variants of the human *SLC11A1* gene

a Z-DNA-forming dinucleotide repeat of the human *SLC11A1* promoter region



厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

自然免疫系による結核感染防御機構に関する研究

分担研究者 竹田 潔 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨：結核菌の感染により肺で遺伝子発現が誘導される secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) の機能を解析した。マウスに結核菌の感染を感染させると、気道上皮細胞から気道腔内、肺胞腔内に SLPI が 2 日目をピークに分泌される。Recombinant SLPI は、結核菌の細胞膜の透過性を亢進させることにより殺菌作用を示し、in vitro での結核菌の増殖を抑制した。SLPI は 2 つの whey acidic protein (WAP) ドメインを有しているが、各 WAP ドメインが結核菌の増殖を抑制した。さらに、WAP ドメイン内の陽性電荷を有するアミノ酸が増殖抑制に必須であることが明らかになった。SLPI 欠損マウスは、結核菌の気道感染に対する感受性が高いことから、SLPI が生理的にも結核感染防御に関与していることが明らかになった。今後、SLPI を用いた多剤耐性結核菌などへの新規治療法の開発が期待される。

A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。最近、Toll-like receptor (TLR) ファミリーの機能解析により、自然免疫系の活性化機構が明らかになり、TLR を介した自然免疫系の活性化の生体防御における重要性が明らかになった。結核菌に対する生体防御においても、自然免疫系が結核菌の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、自然免疫系による結核感染防御機構を明らかにし、自然免疫系の活性化を利用した新規治療法の開発への基盤を提供することを目的とする。

B. 研究方法

自然免疫系の結核感染防御への関与について、これまで TLR を介したシグナルの消失する MyD88/TRIF 欠損マウスを用いて解析し、自然免疫系の活性化の重要性を明らかにしてきた。これまでの解析は、マクロファージ、樹状細胞を標的としてきたが、自然免疫応答はこれら貪食細胞に限らず、最初に結核菌に出会う上皮細胞も深く関与している。そこで、結核菌の気道感染により上皮細胞で誘導される遺伝子を検索した。さらに、この遺伝子 (secretory leukocyte protease inhibitor: SLPI) を発現ベクターに組み込み、組み換え分子を作製し、結核菌やワクチン株 BCG の試験管内で増殖に及ぼす影響を解析した。次に、SLPI による結核菌増殖抑制機構を解析するため、走査電子顕微鏡による結核菌の形態変化、さらに 1-*N*-phenylnaphthylamine (NPN) を用いた細胞膜透過性亢進試験を行った。また、SLPI タンパク質の結核菌増殖抑制に必須の部位を種々の変異タンパク質を作製し解析した。最後に、SLPI 遺伝子のノックアウトマウスを用いて、結核菌の気道感染を行い、感染感受性を解析した。

これらの、解析により SLPI の結核感染防御における役割を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

結核菌の経気道の感染により肺で誘導される遺伝子として、secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) を同定した。SLPI は、結核感染により肺で mRNA の発現が 2 日目をピークに上昇した。気道上皮では、通常時でも SLPI タンパク質が検出され、結核感染により気道腔内に分泌された。Recombinant SLPI タンパク質は、*in vitro* での結核菌の増殖を容量依存性に抑制した。増殖抑制の分子機構を次に解析した。蛍光ラベルした SLPI は結核菌と会合した。また、走査型電子顕微鏡を用いた解析により、SLPI とともに 3 時間培養した BCG の細胞膜には、多数の瘤が観察され、1 2 時間培養すると、ほとんどの結核菌の細胞膜は破壊されていた。NPN を用いた細胞膜透過性の測定により、SLPI が結核菌の細胞膜の透過性を亢進させることが明らかになった。このように、SLPI は結核菌の細胞膜の透過性を亢進させることにより殺菌効果を示すことが明らかになった。次に、SLPI のどの領域が結核菌細胞膜の透過性亢進に必要なかを種々の変異タンパク質を用いて解析した。SLPI は 2 つの whey acidic protein (WAP) ドメインを有している。N 末側、C 末側の各 WAP ドメインがそれぞれ、結核菌の細胞膜透過性を亢進させた。さらに、WAP ドメインのどの部位が重要なかを解析した結果、WAP ドメインに陽性電荷を有するア

ミノ酸が必須であることが明らかになった。さらに、SLPI の個体レベルでの結核感染防御における役割を、SLPI ノックアウトマウスを用いて解析した。SLPI ノックアウトマウスが結核菌の気道感染によりすべてが2ヶ月以内に死亡したことから、SLPI が個体レベルでも結核感染防御に重要であることが明らかになった。

D. 考察

結核感染に際し、いわゆる免疫細胞ではなく、感染防御の最前線となる上皮系細胞から分泌されるSLPIが結核菌の殺菌作用を有していることが明らかになった。今後、SLPIを用いた抗結核薬の開発などが期待される。

E. 結論

結核菌の感染において、上皮系細胞から分泌されるSLPIが、抗結核作用を担っていることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saiga, H., Nishimura, J., Kuwata, H., Okuyama, M., Matsumoto, S., Sato, S., Matsumoto, M., Akira, S., Yoshikai, Y., Honda, K., Yamamoto, M. and Takeda, K.: Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J. Immunol.* 181, 8521-8527 (2008).
2. Nakamura, K., Miyazato, A., Koguchi, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Saijo, S., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., Fujita, J., Ishii, K., Kaku, M., and Kawakami, K.: Toll-like receptor (TLR) 2 and dectin-1 contribute to the production of

IL-12p40 by bone marrow-derived dendritic cells infected with *Penicillium marneffeii*. *Microbes Infect.* 10, 1223-1227 (2008).

3. Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K., and Takeda, K.: ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature* 455, 808-812 (2008).
4. Nakamura, J., Fujimoto, M., Yasuda, K., Takeda, K., Akira, S., Hatayama, T., Takagi, Y., Nozaki, K., Hosokawa, N., and Nagata, K.: Targeted disruption of Hsp110/105 gene protects against ischemic stress. *Stroke* 9, 2853-2859 (2008).
5. Saito, F., Kuwata, H., Oike, E., Koike, M., Uchiyama, Y., Honda, K., and Takeda, K.: Inefficient phagosome maturation in infant macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 113-118 (2008).
6. Herrmann, J., Imura, T., Song, B., Ao, Y., Qi, J., Nguyen, T., Korsak, R., Takeda, K., Akira, S., and Sofroniew, M.: STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 28, 7231-7243 (2008).
7. Gong, L., Yao, F., Hockman, K., Heng, H. H., Morton, G. J., Takeda, K., Akira, S., Low, M. J., Rubinstein, M., and Mackenzie, R. G.: Stat3 is required in hypothalamic Agrp/Npy neurons for normal energy homeostasis. *Endocrinology* 149, 3346-3354 (2008).
8. Ueta, M., Hamuro, J., Ueda, E., Katoh, N., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., and Kinoshita, S.:

- Stat6-independent tissue inflammation occurs selectively on the ocular surface and perioral skin of IκBz^{-/-} mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3387-3394 (2008).
9. Kayama, H., Rairez-Carrozzi, V. R., Yamamoto, M., Mizutani, T., Kuwata, H., Iba, H., Matsumoto, M., Honda, K., Smale, S. T., and Takeda, K.: Class-specific regulation of pro-inflammatory genes by MyD88 pathways and IκBz. *J. Biol. Chem.* 283, 12468-12477 (2008).
 10. Nakamura, K., Miyazato, A., Gang, X., Hatta, M., Inden, K., Aoyagi, T., Takeda, K., Akira, S., Saijo, S., Iwakura, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Suzuki, K., Fujita, J., Kaku, M., and Kawakami, K.: Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J. Immunol.* 180, 4067-4074 (2008).
 11. Nishimura, J., Saiga, H., Sato, S., Okuyama, M., Kayama, H., Kuwata, H., Matsumoto, S., Nishida, T., Sawa, Y., Akira, S., Yoshikai, Y., Yamamoto, M., and Takeda, K.: Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J. Immunol.* 180, 4032-4039 (2008).
 12. Hisaeda, H., Tetsutani, K., Imai, T., Moriya, C., Tu, L., Hamano, S., Duan, X., Chou, B., Ishida, H., Aramaki, A., Shen, J., Ishii, K., J., Coban, C., Akira, S. Takeda, K., Yasutomo, K., Torii, M., and Himeno, K.: Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. *J. Immunol.* 180, 2496-2503 (2008).
 13. Owaki, T., Asakawa, M., Morishima, N., Mizoguchi, I., Fukai, F., Takeda, K., Mizuguchi, J. and Yoshimoto, T.: STAT3 is indispensable to IL-27-mediated cell proliferation but not to IL-27-induced Th1 differentiation and suppression of proinflammatory cytokine production. *J. Immunol.* 180, 2903-2911 (2008).
 14. Yamamoto, M., and Takeda, K.: Role of nuclear IκB proteins in the regulation of host immune responses. *J. Infect. Chemother.* 14, 265-269 (2008).
 15. Takeda, K., Yamamoto, M., Honda, K.: Assessing the response of cells to TLR stimulation. Signaling by Toll-like receptors, 1-21 (2008).
2. 学会発表
 1. Kiyoshi Takeda, Koji Atarashi, Kenya Honda: A mechanism for development of intestinal Th17 cells causing intestinal inflammation. The 7th Sino-Japan Joint Conference for Cancer Research. 2008. 12. 7-10, Guangzhou, China
 2. Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, Masahiro Yamamoto NFAT is responsible for TLR-independent innate immune responses to a protozoan parasite 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008. 12. 9-12、神戸
 3. Kiyoshi Takeda, Koji Atarashi, Kenya Honda Commensal bacteria-derived ATP mediates Th17 cell development

- in the intestinal lamina propria なし
(Symposium) 第37回日本免疫学会学
術集会、2008. 12. 1-3, 京都 3. その他
なし
4. 竹田潔 自然免疫系と炎症性腸疾患
第29回日本炎症・再生医学会、
2008. 7. 9、東京
5. 竹田潔 腸内フローラと炎症性腸疾
患 第12回腸内細菌学会
2008. 6. 13、東京
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録

厚生労働科学研究費補助金(国際医学協力研究事業)
分担研究報告書

抗酸菌感染症予防法に関する研究

研究分担者 向井 徹 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・室長

研究要旨 ハンセン病に対するワクチン開発において、適切な抗原の探索・解析は重要である。しかし、菌蛋白等の調整を、未だ培養不可能であるらい菌体より行うことは非常に困難が伴う。そこで、迅速生育抗酸菌 *M. smegmatis* を宿主に、組換えらい菌蛋白高発現 promoter の検索を BCG および *M. smegmatis* ゲノムより検索した。その結果、BCG ゲノムより既存の hsp60 promoter より強い領域を同定した。本領域を用い、各種らい菌蛋白を発現したところ現在、最も強いとされる acetamidase promoter では、凝集し不溶画分となる蛋白が、可溶画分として蛋白調整が可能であった。今回同定した領域は、抗酸菌蛋白発現に有用な選択肢となることが考えられた。

A. 研究目的

ハンセン病の予防ワクチンの開発をする上で、候補抗原蛋白等の様々な解析が必要になる。しかし、らい菌は、未だ培養ができないため、菌体から蛋白等調整することは、非常に困難である。また、一般に大腸菌を用いた抗酸菌蛋白の発現は、菌体内で凝集し inclusion body として不溶画分に存在することが多い。これは均一な溶液として抗原添加を不可能にする。さらに、大腸菌の膜成分である LPS の調整最終精製物への混入は否めず、精緻な免疫学的な解析には、LPS の完全除去を必要とする。そこで、これまでに抗酸菌を宿主とした蛋白発現系が検討され、非常に強い acetamidase や、hsp60 promoter が同定・利用されている。今回、適切な強度の promoter 配列の検索を目的とした。

B. 研究方法

promoter 検索用ベクターとして、大腸菌-抗酸菌シャトルベクター pMV261 をベースに用いた。pMV261 の hsp60 promoter 領域を除去し、マーカーとして、赤色蛍光色素 DsRed Express 配列遺伝

子を組込んだ。BCG ゲノム遺伝子を超音波処理後、DsRed Express 遺伝子上流域に組み込み、抗酸菌 *M. smegmatis* へ遺伝子導入を行い、ライブラリーを作製した。1週間後、蛍光蛋白発現し、赤色を呈するコロニーを選択し、塩基配列を解析・同定を行った。同領域を、GFP 遺伝子のの上流および各種らい菌蛋白融合発現遺伝子のの上流に組み込み各蛋白の発現量を検討した(図1)。

C. 研究結果

ライブラリーより 2,000 コロニーを screening した結果、蛍光灯下で、赤色を示す 3 クロニーを選択した。そのクロニーよりプラスミド DNA を調整し、promoter 領域の塩基配列決定をした。また、同領域を用い GFP を用い、hsp60、acetamidase 各 promoter 活性を比較した。その結果、#6-800 と名付けた領域は、*M. smegmatis* では、hsp60 promoter より強かった。BCG を宿主とした場合は、hsp60 より低い活性であった(図2)。Asetamidase promoter との比較では、誘導後は明らかに asetamidase promoter が強いものであった(図3)。らい菌蛋白

にHis tagを付加し *M. smegmatis* を宿主に蛋白の調整を行った。その結果、hsp60 では、SDS-PAGE によるCCB染色で、確認されないほど発現量が低いものであるにもかかわらず、今回同定した領域では、バンドとして認める発現量であった(図4)。MMP IIとAg85Bの融合型では、acetamidase では、強力に発現したが、その蛋白のほとんどが不溶画分、inclusion bodyとして認められた(図5)が、6-800では、可溶画分に認められた。

D. 考察

一般に異種蛋白の発現調整には、大腸菌を用いられる。しかし、抗酸菌蛋白は、そのほとんどが inclusion bodyとして大腸菌に発現されるため、抗酸菌を宿主とした蛋白発現が試みられている。acetamidase promoterが非常に強い promoterとして知られているが、そのあまりにも強いため、本研究のMMP II-Ag85Bの融合型と同様に inclusion bodyの形成も多く認められる。次いでよく用いられる hsp60 promoterは、蛋白調整用として強いものではなく、十分量の調整に、多量の菌培養が必要になる。本研究において同定された領域は、hsp60 promoterと acetamidase promoterの中間の強度を持つため、各種抗酸菌蛋白の抗酸菌による発現に用いるプロモーターの選択肢の一つとして重要なものと考えられた。

E. 結論

抗酸菌蛋白発現に有用な選択肢となるBCGゲノム内のプロモーター領域を同定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, and M. Makino. CD4⁺ T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 53:96-106, 2008.
- 2) Kai, M., N. P. N. Ha, H. T. T. Huong, N. H. An, Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, T.

Mukai, T. Fujiwara, N. T. Tan, and M. Makino. Serological diagnosis of leprosy in patients in Vietnamese by enzyme-linked immunosorbent assay with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein-II. Clin. Vaccine Immunol., 15:1755-1759, 2008.

- 3) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. *Mycobacterium avium* complex *gltB* gene encodes glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific glycopeptidolipid. J. Bacteriol., 190, 7918-7924, 2008.

- 4) Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai. GM-CSF mediated T cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *Mycobacterium leprae*. FEMS Immunol. Med. Microbiol., in press, 2009.

2. 学会発表

- 1) CD4⁺ T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant BCG. Makino, M., T. Mukai, Y. Maeda, Y. Miyamoto, and T. Tamura. 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
- 2) Construction of *ureC*-disrupted BCG which expressing *M. leprae* MMP II antigen. Mukai, T., Y. Miyamoto, and M. Makino. 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
- 3) *Mycobacterium avium* complex serovar 8. Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, and M. Makino. 43rd Tuberculosis and Leprosy