

てタンパク合成や RNA 合成を阻害する薬剤に対する菌の感受性に関わる機構を調節していることが推察された。

D. 考察

一般に、生体内で休眠菌はすべてが完全に代謝を停止した状態ではなく、一部は再増殖しながら全体として viable な population が保たれていると考えられている。また、宿主の免疫低下などの環境変化に応じてすみやかに再燃できるような代謝経路を維持していると考えられる。

マイクロアレイを用いた増殖期—休眠期における遺伝子発現を比較すると、MDP1の有無に関わらず、増殖期ではタンパク合成などの遺伝子群の発現が休眠時より高く、活発に代謝・増殖を行っていることが推察された。一方、休眠期ではトランスポゾンなどの遺伝子組換えに関わる遺伝子群の発現が増殖期に比べて高いことが分かった。これは、休眠期におけるゲノムの不安定さを示すものなのか、さらなる検討が要求される。

次に、増殖期および休眠期のそれぞれにおいて、野性株と MDP1 欠失株における遺伝子発現を比較したところ、増殖期においては野性株—欠失株間において顕著に発現の差がある遺伝子群はなかった。これに対して、休眠期においては MDP1 欠失によりタンパク合成や細胞壁合成など多岐にわたる代謝に係る遺伝子群で発現の抑制が観察された。走査性電子顕微鏡による観察でも、休眠期における MDP1 欠失株の細胞壁に壁の脆弱化を思わせる変異が観察されており、MDP1 欠失により実際に壁合成系の抑制がもたらされていることが伺える。以上のことから、MDP1 が休眠時における代謝の極端な低下を抑制し、生存に必要な代謝を維持するよう調節を行っている可能性が示唆された。このことは、MDP1 欠失株が定常期以降になると死滅しやすいというデータとも合致する。

薬剤感受性については、増殖期での MDP1 欠失による顕著な変化は観察されなかったにも関わらず、休眠期においては MDP1 欠失により薬剤耐性の獲得が観察された。今回検討した薬剤(リファンピシン、エリスロマイシン、クロラムフェニコー

ル)は、RNA 合成もしくはタンパク合成の阻害剤であり、MDP1 欠失株において耐性が観察されたという結果は、休眠時において欠失株がこれらの代謝活動を活発に行っていない可能性を示唆し、先のマイクロアレイ解析の結果とも合致する。

E. 結論

以上のデータより、MDP1 が休眠期以降の生存に必要な最小限な生合成経路が過度に抑制されないよう調節し、再燃による菌の再増殖をすみやかに行えるように維持していると推察される。本研究は、休眠抗酸菌の長期生存に MDP1 が重要な役割を担うことを示すものである。したがって MDP1 は、有望な休眠期抗酸菌の薬剤標的であることが示された。

G. 研究発表

論文発表

原著論文

- 1) Nishimura, J., H. Saiga, S. Sato, M. Okuyama, H. Kayama, H. Kuwata, **S. Matsumoto**, T. Nishida, Y. Sawa, S. Akira, Y. Yoshikai, M. Yamamoto, and K. Takeda. 2008. Potent anti-mycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J. Immunol.* 180:4032-4039.
- 2) Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P.J. Brennan, K. Kobayashi, M. Makino, **S. Matsumoto**, H. Ogura, and S. Maeda. 2008. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 190:3613-3621.
- 3) Saiga H., Nishimura J, Kuwata H, Okuyama M, **Matsumoto S**, Sato S, Matsumoto M, Akira S, Yoshikai Y, Honda K, Yamamoto M and K Takeda. 2008. Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J. Immunol.* 181: 8521-8527
- 4) Tateishi, Y., Y. Hirayama, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura, J. Kang, A.

Shibata, K. Hirata, K. Kitada, S. Kitada, R. Maekura, H. Ogura, K. Kobayashi, and **S. Matsumoto**. 2009. Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from immune-competent patients. *Microb. Pathog.* 46:6-12.

総説

- 1) **松本 壮吉**、**小林 和夫**、結核ワクチン研究の現状と展望、臨床検査 Vol 52 p1149-1153, 2008

学会発表

- 1) **松本 壮吉**、**尾関 百合子**、**西内 由紀子**、**藤原 永年**、**吉村 満美子**、**小林 和夫**. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)による増殖と細胞壁合成の同調メカニズム. 第83回日本結核病学会 (東京、4月)
- 2) **仁木 誠**、**松本壮吉**、**和田崇之**、**小林和夫**. 抗酸菌の薬剤感受性におけるMDP1の調節機構の解析. 第83回日本結核病学会総会. (東京、4月)
- 3) **Matsumoto S**. Protection of DNA by mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) by preventing the iron-induced Fenton reaction. (USA. July, 2008)
- 4) **松本 壮吉**、**尾関 百合子**、**吉村 満美子**、**藤原 永年**、**西内 由紀子**、**立石 善隆**、**小林 和夫**. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)に見

いだされた Ferritin-superfamily 蛋白質様活性. 第61回日本細菌学会関西支部総会 (京都、11月)

- 5) **Suzuki D.**, **Nagata T.**, **Matsumoto S.**, **KOIDE Y.** MDP1タンパクのマウスT細胞エピトープの解析 / Characterization of murine T-cell epitopes in mycobacterial DNA-binding protein 1. 第38回日本免疫学会総会 (京都、12月)

G. 知的所有権の取得状況

① 特許取得

1. 出願番号：特願 2008-172640, 発明者：**山本 法明**、**松本 壮吉**, 発明の名称：MDP1による微生物を凝集および／または沈殿させる方法, 出願人：コニカミノルタホールディングス株式会社、公立大学法人大阪市立大学, 出願日：平成20年7月1日
2. 出願番号：特願 2008-277012, 発明者：**松本 壮吉**、**山本 法明**、発明の名称：MDP1を用いた炭水化物を有する物質の分離方法 出願人：コニカミノルタホールディングス株式会社、出願日：平成20年10月28日

② 実用新案登録

なし

③ その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

休眠結核菌の糖脂質代謝と免疫応答に関する研究

研究分担者 杉田 昌彦（京都大学ウイルス研究所細胞制御研究分野・教授）
研究協力者 松永 勇（京都大学ウイルス研究所細胞制御研究分野・助教）

研究要旨

結核菌細胞壁表層を構築する糖脂質群は宿主環境との接点に存在することから、宿主との相互作用の結果としてダイナミックに変容し、感染病態の形成に深く関わると考えられる。とりわけ、休眠菌のように年余にわたって宿主環境に暴露される場合、人工培養菌とは異なる糖脂質代謝とそれに対する宿主応答の存在が想定される。本研究では、通常の人工培地に比して生体内環境では高濃度のグルコースが存在することに着目し、グルコース依存的に誘起されるミコール酸含有糖脂質の変化を追究した。その結果、生体内や生体内環境を模倣した人工培地で増殖した菌は、自然免疫刺激活性の強いトレハロースジミコール酸(TDM)が活性の弱いグルコースモノミコール酸(GMM)に置換され、宿主自然免疫系の活性化を抑制していることを見いだした。一方、新たに生成された GMM は CD1b 分子を介して T 細胞に提示され、宿主獲得免疫系の標的となることが示された。これらの事実は、GMM 特異的免疫応答の検証が、潜伏感染の免疫病態の理解に不可欠であることを示唆している。

A. 研究目的

TDM は抗酸菌細胞壁表層に多量に存在するミコール酸含有糖脂質のひとつであり、強力な生物活性を有することから、その生合成の制御は、菌にとってもまた宿主防御においても重要な意味を持つ。抗酸菌細胞壁脂質の構造や組成、生物学的活性を検証したこれまでの研究の多くは、最適化された標準人工培地で培養した菌を用いてきた。しかし、結核菌などの抗酸菌は細胞内寄生細菌であり、宿主との密接な相互作用を通して感染が成立する。したがって、抗酸菌による感染とりわけ長期に宿主環境に暴露される潜伏感染の理解においては、宿主環境により制御される糖脂質代謝の存在とその分子機構の解明が不可欠である。とくに TDM が持つ極めて強い宿主自然免疫刺激活性（アジュバント活性）は感染の成立に不都合であることから、生体内生育菌あるいは休眠菌ではその産生が負に制御されている可能性が考えられる。

そこで本研究では、標準人工培地に比し

て生体内環境には高濃度のグルコースが存在することに着目し、グルコース依存的なミコール酸含有糖脂質の生合成経路の検証とその分子機構の解明を通して、休眠菌を特徴付ける糖脂質代謝の同定ならびにそれに呼応した宿主免疫応答を実証することを目的とする。

B. 研究方法

抗酸菌株およびその培養 American Type Culture Collection より得た *M. tuberculosis* (Erdman) (以下 M.tb と記載) および *M. avium* (serovar 4) (以下 MAC と記載) を用いた。MAC は 0.05% Tween 80 および 10% ADC を含有した 7H9 メディウムを用い、37 度で培養した。また、7H9 メディウムで培養した M. tb をマウス一匹あたり 100 個経気道的に感染させ、約 3 週後に感染肺を回収し、脂質解析を行った。

脂質精製 脂質の精製は文献 2 の記載に従って行った。菌体より抽出した総脂質をクロロホルム/メタノール(2:1, v/v)に溶解した

のち冷アセトンを加え、不溶画分を回収した。さらにこの画分を薄層クロマトグラフィ(TLC)により展開し、TDM、GMM およびトレハロースモノミコール酸(TMM)を含んだ分画を単離精製した。

Ag85A リコンビナントタンパク質の作製
MAC ゲノム遺伝子を鋳型とし、シグナル配列を欠く Ag85A タンパク質をコードする遺伝子を PCR 法により増幅した。単離した遺伝子を pET-21c プラスミドベクターに挿入し、BL21(DE3)大腸菌株をトランスフォームすることにより、C 末端に His タグを組み込んだリコンビナント Ag85A タンパク質を発現させた。大腸菌を破碎した後可溶画分を回収し、Ni-レジンカラムを用いてタンパク質精製を行った。

ミコール酸転移酵素活性の測定 すでに報告された方法 (Lett. Appl. Microbiol. 34: 233, 2002)に準拠し、酵素としてリコンビナント Ag85A タンパク質、基質として精製 TMM および D-グルコースを用いて 37°C、1 時間の反応を行った。反応後、抽出した脂質を TLC プレート上に展開し、50%硫酸を噴霧してオープン中で焼き付けることにより生成物を検出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、生命倫理や動物愛護、安全対策の観点から、機関で定められた規定に則り、当該委員会での承認を得て遂行した。

C. 研究結果

グルコース濃度に依存して TDM 産生抑制ならびに GMM 産生亢進が誘起される さまざまな濃度 (0.01% - 10%) のグルコースを含有した 7H9 メディウム中で MAC を数日間培養し、菌体より抽出した脂質を TLC プレート上に展開したところ、グルコース濃度に依存した TDM 産生抑制が認められた。一方、グルコース濃度が高くなるにしたがって、TDM よりやや高い Rf 値を持つ分子種の顕著な産生増加を認めた。この脂質を抽出し mass spectrometry を行ったところ、ミコール酸に六単糖が 1 個付加された構造に合致する解析結果が得られた。

さらにこの付加糖を gas chromatography を用いて解析した結果グルコースであることが明らかとなった。さらにこの脂質は、ヒト GMM 特異的 CD1b 拘束性 T 細胞を活性化したことから、mass spectrometry および gas chromatography の結果が裏付けられた。以上より、グルコース濃度に依存して産生が増加した脂質は GMM であると結論づけた。したがって、MAC は細胞外グルコース濃度に依存して脂質代謝を変化させ、TDM の産生を抑制するとともに GMM 産生を亢進することが判った。

グルコース濃度に依存した TDM 産生抑制と GMM 産生亢進は、Ag85A によって触媒される リコンビナント Ag85A タンパク質の存在下に TMM を 37°C で 1 時間インキュベートすると、1 分子の TMM から別の 1 分子の TMM へのミコール酸の転移が起こり、TDM が産生される。この反応系にグルコースを添加すると、TDM の産生が抑制され、新たに GMM が産生されることが観察された。さらにこの反応は不活化した酵素では起きないことから、酵素の触媒作用の結果と考えられた。以上の結果から、TMM とグルコースを基質とした Ag85A の触媒作用により GMM が産生されることが明らかとなった。グルコースが高濃度に存在する場合には、ミコール酸のアクセプター分子として TMM とグルコースが競合し、TDM の産生抑制と GMM の産生亢進が起きると考えられた。

生理的なグルコース濃度において GMM の産生が起きる 生理的濃度である 0.1% のグルコースを含有した 7H9 メディウム中で MAC を培養すると、数時間後には GMM の産生が検出されることを観察した。また血清中で菌を培養しても同様の結果を得た。以上の結果は、MAC が宿主体内への感染後宿主由来グルコースを利用して迅速に TDM と GMM の置換を行う可能性を示唆した。

生理的なグルコース濃度で産生された GMM は、CD1b 拘束性 T 細胞によって認識

される MAC を 0.01%あるいは 0.1%グルコース含有 7H9 メディウムで数日間培養したのち菌より脂質を回収し、GMM 特異的 CD1b 拘束性 T 細胞の刺激活性を検討したところ、0.1%グルコース存在下に培養した菌より得た脂質では高い T 細胞刺激活性を認めたのに対し、0.01%グルコース存在下に培養した菌より得た脂質では、まったく T 細胞刺激活性を認めなかった。以上の結果は、GMM 特異的 T 細胞が、生体内増殖菌と生体外（環境）増殖菌を識別し、生体内増殖菌に対してのみ有効な応答を起こす可能性を示唆した。

D. 考察

休眠菌は年余にわたり生体内環境に暴露されることから、低いながらも維持され続けている菌の生存に必須の糖脂質代謝は、宿主環境の影響を強く受けることが予想される。その意味で、生体内環境での菌の代謝変化に着目した本研究のアプローチは、休眠菌の本態の一端を明らかにする研究と言える。

本研究で用いた MAC は本来環境常在菌であり、概ね極めて低い濃度のグルコース環境で生育する。その結果、TDM を多量に産生して堅牢な細胞壁を構築し、菌集塊やバイオフィルムを形成することにより、種々の物理的あるいは化学的ストレスに対応することができる。しかし一旦宿主体内に入ると、TDM は TLR2 依存的にマクロファージを活性化し NO の産生を誘導するため、菌にとって極めて不都合である。菌はこの生体応答を回避するため、既存の酵素と宿主由来グルコースを最大限に活用して迅速に TDM を GMM に置換し、基本骨格を保持しながらも宿主自然免疫刺激活性の弱い細胞壁を構築するものと考えられる。

休眠菌のように長期に生体内グルコースに暴露された場合、細胞壁 TDM はほとんど消失し、GMM が主体となることが予想される。この変化は、菌が宿主自然免疫を回避するうえで極めて有効である。一方、研究分担者の杉田や研究協力者の松永らの最近

の研究から、ヒトやモルモットにおいて、GMM を標的とした獲得免疫機構の存在が明らかとなっている。したがって、TDM : GMM の置換によって自然免疫を回避した菌は、逆に効率的に宿主獲得免疫の標的となる可能性が考えられる。実際、tuberculoid leprosy 皮膚病変には、GMM 特異的 CD1b 拘束性 T 細胞の存在が証明されており、この想定を裏付けるものである。

以上の考察をもとに研究分担者は、GMM に対する T 細胞応答（皮膚反応も含む）と液性免疫応答を鋭敏にモニターすることが、潜伏感染の免疫診断に有用であると考え、次年度以降の研究を立案、遂行する予定である。

E. 結論

生体内環境に暴露された菌に特異的な糖脂質代謝経路を明らかにし、それを標的とした免疫応答の存在を実証した。この知見は、潜伏感染の免疫病態の理解に極めて重要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hava, D.L., N. van der Wel, N. Cohen, C.C. Dascher, D. Houben, L. Leon, S. Agarwal, M. Sugita, M. van Zon, S.C. Kent, H. Shams, P.J. Peters, and M.B. Brenner. 2008. Evasion of peptide, but not lipid antigen presentation, through pathogen-induced dendritic cell maturation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 11281-11286.
- 2) Matsunaga, I., T. Naka, R.S. Talekar, M.J. McConnell, K. Katoh, H. Nakao, A. Otsuka, S.M. Behar, I. Yano, D.B. Moody, and M. Sugita. 2008. Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in mycobacteria. J. Biol. Chem. 283: 28835-28841.
- 3) Matsunaga, I., T. Komori, A. Ochi, N. Mori, and M. Sugita. 2008. Identification of antibody responses

to the serotype-nonspecific molecular species of glycopeptidolipids in *Mycobacterium avium* infection. Biochem. Biophys. Res. Commun. 377: 165-169.

- 4) Morita, D., K. Katoh, T. Harada, Y. Nakagawa, I. Matsunaga, T. Miura, A. Adachi, T. Igarashi, and **M. Sugita**. 2008. Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules. Biochem. Biophys. Res. Commun. 377: 889-893.
- 5) Otsuka, A., I. Matsunaga, T. Komori, K. Tomita, Y. Toda, T. Manabe, Y. Miyachi, and **M. Sugita**. 2008. Trehalose dimycolate elicits eosinophilic skin hypersensitivity in mycobacteria-infected guinea pigs. J. Immunol. 181: 8528-8533.

2. 学会発表

- 1) 大塚篤司、松永勇、小森崇矢、富田和沙、戸田好信、真鍋俊明、宮地良樹、杉田昌彦. 2008. Eosinophilic DTH : 脂質を標的とした新しい皮膚アレルギー応答. 第 11 回京都免疫ワークショップ学術集会 (京都、3 月).
- 2) Otsuka, A., I. Matsunaga, T. Komori, K. Tomita, Y. Toda, T. Manabe, Y. Miyachi, and M. Sugita. Eosinophilic skin reactions to glycolipids in mycobacterial infection represent a

novel form of delayed-type hypersensitivity. 2008. The International Investigative Dermatology 2008. (Kyoto, Japan, 5 月).

- 3) Sugita, M. Eosinophilic skin hypersensitivity to glycolipids in mycobacteria-infected guinea pigs. 2008. 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (Baltimore, MD, USA, 7 月).
- 4) Otsuka, A. I. Matsunaga, Y. Miyachi, and M. Sugita. Eosinophilic skin reactions to glycolipids define a novel form of hypersensitivity in mycobacterial infection. 2008. 第 38 回日本免疫学会総会 (京都、12 月).
- 5) 松永勇、中崇、加藤久美子、中尾瞳、大塚篤司、矢野郁也、杉田昌彦. 2008. ミコール酸転移酵素による脂質 T 細胞抗原の生合成. 第 81 回日本生化学会総会 (神戸、12 月).

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
なし
3. その他
なし

休眠性非結核性抗酸菌における菌体構成分子の解析

研究分担者 宮本 友司（国立感染症研究所ハンセン病研究センター・主任研究官）

研究要旨

非結核性抗酸菌 *Mycobacterium avium* complex (MAC)の糖脂質抗原 GPL について、病原性との関連が指摘されている 8 型血清型 GPL の生合成を解析した。本血清型 GPL は、その糖鎖が重要な役割を果たすとされているが、生合成機構及び関与遺伝子は未解明である。そこで、これまでに明らかになっている他血清型 GPL の生合成遺伝子情報を基に、8 型血清型 GPL の糖鎖生合成に関与することが予想される 4.6 kb の遺伝子領域を PCR 等により増幅・単離した。本領域に含まれる各遺伝子を 1 型血清型 GPL 生産組換え *M. smegmatis* 株に導入し、得られた GPL 成分の TLC 及び GC/MS 分析を行うことにより各遺伝子の機能を解析した。その結果、3 遺伝子が 8 型血清型 GPL 糖鎖に特徴的なグルコース残基の形成に関与することが判明した。

A. 研究目的

結核菌を含む抗酸菌の細胞表層には豊富な糖脂質成分が存在する。これらは休眠性等の病原性への関与が指摘されているが、その詳細な分子機構については不明な点が多い。本研究では、他の糖脂質成分に比べ多種多様な構造群からなる非結核性抗酸菌 *Mycobacterium avium* complex (MAC) の糖脂質 glycopeptidolipid (GPL) に注目し、これらの中でも分離頻度として主要な位置を占める 8 型血清型 GPL が病原性に与える影響について検討を行うため、その生合成機構の解明を行うことを目的とした。

B. 研究方法

MAC 8 型血清型株には ATCC35771 株を標準株として採用し、PCR 用ゲノム DNA の調製等へ使用した。他の血清型で判明している遺伝情報を利用し、*gtfB-drrC* 領域を増幅するようにプライマー GTFB-U4 及び DRRC-A を設計した。増幅した *gtfB-drrC* 領域の塩基配列を決定し、frame plot 解析により ORF 予測を行った。1 型血清型 GPL 生産株は、*M. smegmatis* mc² 株に *rfa* 遺伝子をプラスミドベクター pMV261 によって導入することにより構築

した。*gtfB-drrC* 領域に含まれる各 ORF を、染色体組み込みベクター pYM301a を用いて 1 型血清型 GPL 生産株に導入し、得られたそれぞれの株から GPL 成分を単離・精製した。GPL 成分は TLC、GC/MS 及び MALDI-TOF/MS によって解析し、それぞれに含まれる糖鎖構造を決定した。

（倫理面への配慮）

特になし

C. 研究結果

8 型血清型 GPL の生合成遺伝子については、これまで全く未解明であるため、遺伝子探索にはこれまで判明している他の血清型 GPL 生合成遺伝子の情報を利用した。多くの血清型 GPL 生合成遺伝子領域には *gtfB-drrC* と呼ばれる領域が存在し且つ血清型毎に特徴的な遺伝子配列を持つ。従って、8 型 GPL 生合成遺伝子もこの領域に存在する可能性があることから、PCR による増幅を目指した。GTFB-U4 及び DRRC-A をプライマーとして用い PCR を実施した結果、約 4.6 kb の DNA 断片の増幅が認められた（図 1）。塩基配列の決定により、増幅断片は *gtfB* 及び *drrC* に挟まれる形で構成されていること、さらには 4 つの ORF

が含まれることが判明した(図 1)。相同性検索の結果、ORF1 は *gtfD* と相同性を示す糖転移酵素を、ORF2 は *gtfTB* として登録されている糖転移酵素をそれぞれコードすることが明らかとなった(*gtfD* 及び *gtfTB* は他の MAC 株に存在することが知られている)。一方、ORF3 及び ORF4 は他の抗酸菌や細菌に存在する polysaccharide pyruvyltransferase 及び methyltransferase 遺伝子と高い相同性が認められた。

次に4つの ORF の中から、ORF2 (*gtfTB*)、ORF3 及び ORF4 を選択し、1 型血清型 GPL 生産株への導入を行い TLC 解析を行った。*gtfTB* 導入株(図 2B)では、コントロール株(図 2A)に存在する 1 型血清型 GPL が変化していることが観察された。一方、*gtfTB*、ORF3 及び ORF4 の 3 遺伝子を同時に導入した株(図 2C)では、*gtfTB* 導入株の生産物に変化していることが確認された。このことから、ORF3 及び ORF4 の遺伝子産物によりさらなる構造的修飾が起こったことが示唆された。

さらに詳細な構造解析を行うため、各 ORF 導入株に含まれる GPL 成分の GC/MS 解析を行った。その結果、*gtfTB* 導入株(図 3B)で過剰な glucose の存在が認められ、*gtfTB* が 1 型血清型 GPL への glucose 転移に関与する糖転移酵素遺伝子であることが推測された。一方、3 遺伝子導入株(図 3C)及びポジティブコントロールとして使用した MAC 8 型血清型株(図 3D)からは、8 型血清型 GPL の糖鎖に特徴的な 4,6-O-(1-carboxyethylidene)-3-O-methyl-glucose が検出された。従ってこれらの結果から、3 遺伝子はこの糖鎖形成に関与することが示唆された。さらに、*gtfTB* の糖転移酵素遺伝子としての機能を確認するため、*gtfTB* 導入株で認められた生産物を精製し、重水素メチル化処理後 GC/MS 解析を行った。その結果、本生産物は glucose が 1,3-結合で 1 型血清型 GPL の rhamnose 残基に結合していることが判明し、*gtfTB* は glucosyltransferase 遺伝子であることが確認された。

D. 考察

本研究で注目した *gtfB-drrC* 領域には、8 型血清型 GPL の生合成遺伝子が存在していた。他の血清型 GPL に関しても、同様の現象が報告されていることから、未解明の他血清型 GPL の生合成を解析する上で本領域は重要な手掛かりの一つとなりうる可能性がある。

Glucose 残基形成に関わる糖転移酵素遺伝子として機能することが判明した *gtfTB* は、1 型及び 4 型血清型 GPL 生産株にも存在する。しかしながら、これらの血清型 GPL には 8 型 GPL に見られる glucose 残基は存在しないことから、これらの株では、*gtfTB* が機能しない状態へ変化していると考えられる。事実、1 型血清型 GPL 生産株においては *gtfTB* の上流領域にトラスポゾンに関与する塩基配列が挿入されていることから、これらの現象は転写・翻訳等のレベルで制御されている可能性もある。

8 型血清型 GPL の glucose 残基には、特徴的な側鎖として 4,6-O-(1-carboxyethylidene) 及び 3-O-methyl 基が導入されている。これらの側鎖が果たす役割については未だ不明であるが、他の細菌では菌体の物理化学的性状を変化させる重要な因子とされている。従って、本血清型生産株においては、これらの側鎖の存在が休眠性に深く関わる細胞内寄生という病原性に何らかの影響を与えていることも考えられる。

本研究では、8 型血清型 GPL の生合成機構の解明を目指し、関与する生合成遺伝子群の同定を行った。更なる展開としては、8 型血清型 GPL が宿主に与える影響を直接的に解析する必要がある。その手法として、今回同定した遺伝子群の変異株を 8 型血清型 GPL 生産株において作製し、構造の変化した GPL と野生株由来の 8 型血清型 GPL との比較・検討を行うことが有効であると考えられる。

E. 結論

MAC の 8 型血清型株が有する GPL の糖

鎖について、その生合成に関わる 3 つの遺伝子を同定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2) Kai, M., Phuc N. H. Nguyen, Thi T. H. Hoang, A. H. Nguyen, Y. Fukutomi, Y. Maeda, **Y. Miyamoto**, T. Mukai, T. Fujiwara, T. T. Nguyen, and M. Makino. 2008. Serological diagnosis of leprosy in patients in vietnam by enzyme-linked immunosorbent assay with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein II. *Clin. Vaccine Immunol.* 15: 1755-1759.

3) Mukai T., Y. Maeda, T. Tamura, **Y. Miyamoto**, and M. Makino. 2008. 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.

2. 学会発表

- 1) 甲斐雅規、前田百美、福富康夫、宮本友司、向井徹、牧野正彦. 2008. らい菌由来免疫原性タンパク、MMP-II を用いた血清診断. 第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 (熊本、5 月).
- 2) 向井徹、和泉眞藏、Teky Budiawan、宮本友司、Cita Rosita、Indropo Agusni、松岡正典、牧野正彦. 2008. 常温輸送臨床検体の LAMP 法によるらい菌遺伝

子検出. 第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 (熊本、5 月).

- 3) **Miyamoto, Y.**, Mukai, T., Maeda, Y., Makino, M. 2008. Characterization of the glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium avium* complex serovar 8. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 43rd Tuberculosis and leprosy Research Conference. (Baltimore, United States of America, 7 月)

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 なし
3. その他 なし

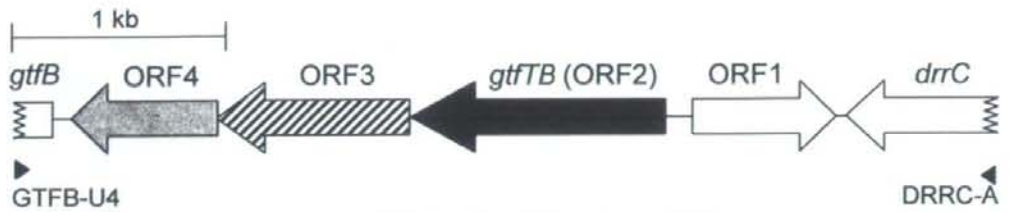


図1. 8型血清型GPL生産株の*gtfB*-*drrC*領域

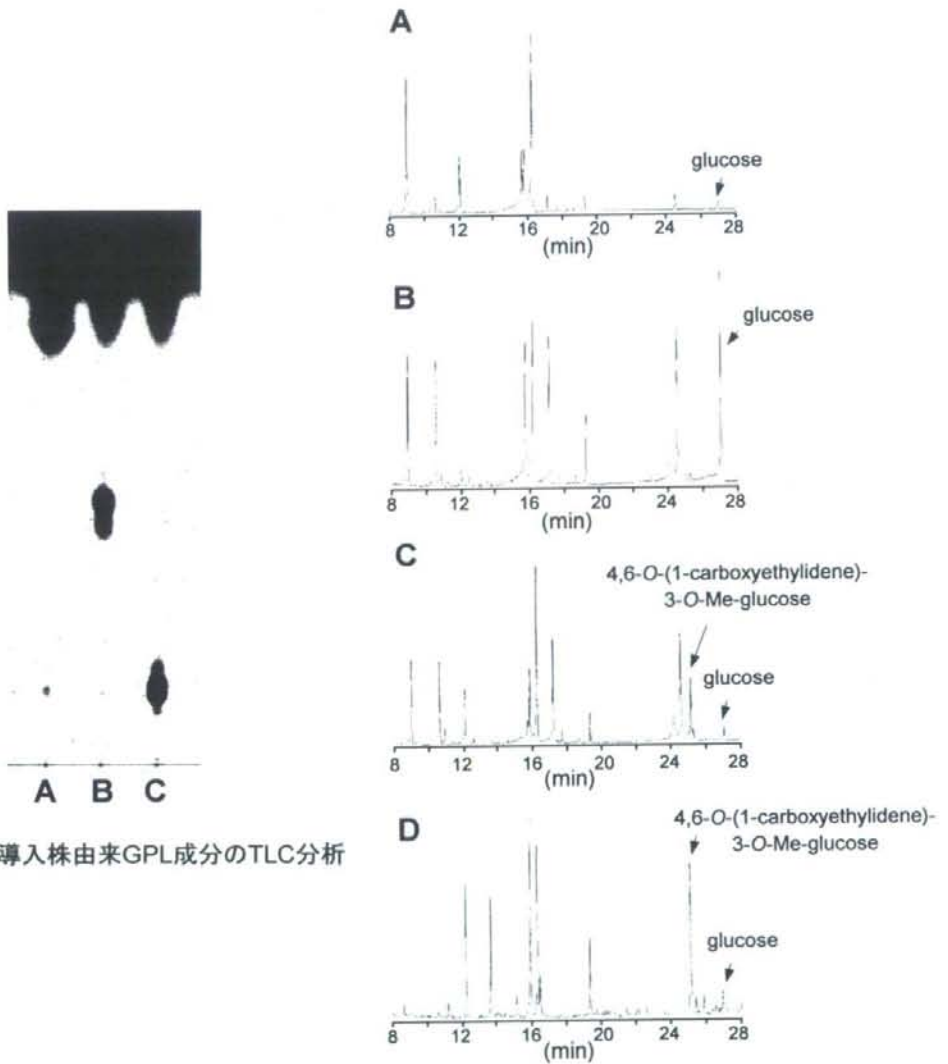


図2. 各ORF導入株由来GPL成分のTLC分析

図3. 各ORF導入株由来GPL成分のGC/MS分析

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

休眠期結核菌由来遺伝子を用いた DNA ワクチンの開発研究

研究分担者 小出 幸夫（浜松医科大学・理事）

研究要旨

成人結核のほとんどが内因性再燃に起因するため、結核菌の再燃を抑制する新規ワクチンの開発を計画した。潜伏期の結核菌が発現する DosR regulon 蛋白（48 種）および結核菌の再活性化に関与する Resuscitation promoting factor 蛋白（5 種）を候補抗原として、DNA ワクチン・ライブラリーの作製を進め約 9 割を完成した。さらに、一部についてはマウスに免疫を施してスクリーニングを開始した。

上記の候補抗原に先行し、結核菌の休眠期に高発現する Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) に対する細胞性免疫応答をマウスで検討し、C57BL/6 の最小 CD8⁺ T 細胞エピトープおよび BALB/c の最小 CD4⁺ T 細胞エピトープをそれぞれ 1 つ決定した。

また、将来同定できた候補抗原蛋白を用いて、より効率良い免疫応答を誘導すべく、新たな抗原デリバリーシステムとして、オリゴマンノース被覆リポソームを開発した。

A. 研究目的

結核菌感染に対するワクチンとしては、BCG が 60 年以上前から用いられており、世界の人口の約半分がこの接種を受けている。しかし、BCG の乳幼児粟粒結核に対する有効性は確認されているが、成人の肺結核に対する有効性は疑問視されている。これは BCG の効果が長くても 10~20 年しか維持できないため、「長期潜在性・持続感染から発症する二次性結核（内因性再燃）」が主体である成人の肺結核には対応できないためと考えられる。

結核菌は約 4,000 の遺伝子を保有するが、増殖期に発現する遺伝子と潜伏期に発現する遺伝子は異なることが知られている。そこで、本研究では潜伏期の結核菌が発現する DosR regulon 蛋白（48 種）および結核菌の再活性化に関与する Resuscitation promoting factor (rfp) 蛋白（5 種）を標的として、結核菌の再燃を抑制する新規ワクチンの開発を計画した（潜伏感染および再燃に関連する蛋白についても随時追加する予定）。これらの検索を通じて、BCG を初回免疫に、抗潜伏期ワクチンを追加免疫に用いることで、成人の肺結核をも制御できるワクチン戦略を構築することを目的とす

る。

B. 研究方法

1. DNA ワクチンの作製と免疫

結核菌ゲノム情報に基づき、DosR regulon 蛋白および Rfp 蛋白をコードする遺伝子を PCR によって単離し、哺乳類細胞用の発現ベクターである pCI に挿入し、DNA ワクチン・ライブラリーを作成した。また、それと平行して目的遺伝子を pET28b ベクターに挿入し、大腸菌発現系によって目的蛋白を調製した。

遺伝子銃を用いて、作成した DNA ワクチンでマウス (BALB/c および C57BL/6) を免疫 (2 μ g、2 週間隔で 3 回) した。最終免疫 2 週間後、免疫マウスの脾細胞を対応する組換え蛋白で 37 $^{\circ}$ C、48 時間刺激し、培養上清中の IFN- γ 産生を指標として、免疫の効果を検討した。

2. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) の T 細胞エピトープの同定

MDP1 遺伝子 (大阪市大・松本壮吉氏より分与) を pCI に挿入し、1. と同様のプロトコールでマウス (BALB/c、C57BL/6 および C3H/He) を免疫した。免疫マウスの脾細胞をオーバーラッピング・ペプチド

(20mer 長、松本壮吉氏より分与)で刺激し、IFN- γ 産生を指標として、免疫の効果と T 細胞エピトープを検討した。さらに、同定した候補ペプチドについては、BIMAS / SYFPEITHI / RANKPEP の3つのアルゴリズムの予想に基づいて、より短い抗原ペプチドを合成し、T 細胞応答を検討して最小エピトープを決定した。

3. オリゴマンノース被覆リポソーム (OML) による免疫効果の増強

Ovalbumin (OVA) を封入した OML で C57BL/6 マウスを免疫 (2週間隔で腹腔内注射、3回) し、その抗原特異的免疫誘導能を検討した。免疫マウスの脾細胞を H-2K^b 拘束性の OVA ペプチド (257-264 番目のアミノ酸) で刺激して細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導し、非免疫マウスまたは OML 非被覆リポソーム封入 OVA で免疫したマウスの脾細胞と誘導効率を比較した。CTL 活性の測定には OVA 遺伝子導入 EL4 細胞 (EG.7-OVA) と EL4 細胞を用いた。さらに、免疫マウスに EG.7-OVA と EL4 を接種し、マウスの生存を観察した。(東海大学・小島および産総研・池原との共同研究)

(倫理面への配慮)

1~3の遺伝子組換え実験および動物実験に関しては、それぞれ「研究開発二種省令」および「浜松医科大学動物実験規定」に従って行った。

C. 研究結果

1. DNA ワクチンの作製と免疫

これまでに、DosR regulon 遺伝子群 48 種中 44 種および Rfp 遺伝子群 5 種中 4 種を単離し、pCI へ挿入し終えた。現在、未単離遺伝子の単離と既単離遺伝子の pET28b への挿入を遂行中である。一部の遺伝子については、マウスへ免疫を開始したが、これまでに免疫効果が確認できたものを得るには至っていない。

2. MDP1 の T 細胞エピトープの同定

BALB/c (CD4⁺ T 細胞エピトープ 1 個)、C57BL/6 (CD4⁺ T 細胞エピトープ 2 個および CD8⁺ T 細胞エピトープ 1 個) および C3H/He (CD4⁺ T 細胞エピトープ 3 個) の

すべてのマウスで候補ペプチドを同定した。さらに、C57BL/6 の最小 CD8⁺ T 細胞エピトープ (MDP1 23-31) および BALB/c の CD4⁺ T 細胞エピトープ (MDP1 46-65) を決定した。

3. OML による免疫効果の増強

OML に封入した OVA は、非封入 OVA の約 1/50 量で効率良く細胞性免疫応答を誘導し、アジュバントを特に必要としなかった。また、OML 封入 OVA で免疫したマウスは、接種した OVA 陽性腫瘍を抗原特異的に拒絶した。

D. 考察

1. DNA ワクチンの作製と免疫

単離が完了していない遺伝子は、配列が GC rich であるため、PCR がかかりにくかったと予想される。PCR 条件を個別に再検討し、単離を急ぐ必要がある。

2. MDP1 の T 細胞エピトープの同定

最小エピトープが未決定のものについて、その決定を急ぐとともに、ヒトにおける MDP1 の抗原エピトープの決定を試みる予定である。さらに、1. で同定できた抗原とともに、MDP1 を用いた免疫による抗結核菌効果をマウスの潜伏感染モデルで検証する予定である。

3. OML による免疫効果の増強

仮想がん抗原で良好な結果が得られたため、そのアジュバント効果について、1. で同定できた抗原を用いてマウスの潜伏感染モデルで検証する予定である。

E. 結論

1. DNA ワクチンの作製と免疫

DosR regulon 遺伝子群 48 種中 44 種および Rfp 遺伝子群 5 種中 4 種を単離し、DNA ワクチン・ライブラリーの約 9 割を完成した。

2. MDP1 の T 細胞エピトープの同定

MDP1 が、BALB/c、C57BL/6 および C3H/He に対して免疫原性を持つ事を示し、C57BL/6 の最小 CD8⁺ T 細胞エピトープ (MDP1 23-31) および BALB/c の最小 CD4⁺ T 細胞エピトープ (MDP1 46-65) を

決定した。

3. OMLによる免疫効果の増強

OML が優れたアジュバント効果を持つ事を、OVA を仮想抗原とした系で明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aoshi, T., J. A. Carreoro, V. Konjufca, Y. Koide, E. R. Unanue, and M. J. Miller. 2009. The cellular niche of *Listeria monocytogenes* infection changes rapidly in the spleen. *Eur. J. Immunol.* Jan 7. [Epub ahead of print]
- 2) Aoshi, T., B. H. Zinselmeyer, V. Konjufca, J. N. Lynch, X. Zhang, Y. Koide, and M. J. Miller. 2008. Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8⁺ T cells. *Immunity* 29: 476-486.
- 3) Uchijima, M., T. Nagata, and Y. Koide. 2008. Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 protein efficiently induces antigen-specific T-cell responses. *Vaccine* 26: 5165-5169.
- 4) Nagata, T., T. Aoshi, M. Uchijima, and Y. Koide. 2008. In vivo hierarchy of individual T-cell epitope-specific helper T-cell subset against an intracellular bacterium. *Vaccine* 26: 5123-5127.
- 5) Hashimoto, D., T. Nagata, M. Uchijima, S. Seto, T. Suda, K. Chida, H. Miyoshi, H. Nakamura, and Y. Koide. 2008. Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific CD8⁺ T-cell responses in the lung. *Vaccine* 26: 5095-5100.
- 6) Aoshi, T., T. Nagata, M. Suzuki, M. Uchijima, D. Hashimoto, A. Rafiei, T. Suda, K. Chida, and Y. Koide. 2008. Identification of an

HLA-A*0201-restricted T-cell epitope on the MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis*, by MPT51 overlapping peptide screening. *Infect. Immun.* 76: 1565-1571.

- 7) Ikehara, Y., N. Shiuchi, S. Kabata-Ikehara, H. Nakanishi, N. Yokoyama, H. Takagi, T. Nagata, Y. Koide, K. Kuzushima, T. Takahashi, K. Tsujimura, and N. Kojima. 2008. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal phagocytic cells. *Cancer Lett.* 260: 137-145.

2. 学会発表

- 1) 右藤智啓、内嶋雅人、永田 年、辻村邦夫、小出幸夫. 2009. 結核菌の Heat-shock protein 70 (HSP70) を結核菌抗原 MPT51 に結合させた分子融合型 DNA ワクチンは抗原特異的 T 細胞を効率よく誘導する. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月発表予定).
- 2) 内嶋雅人、永田 年、辻村邦夫、小出幸夫. 2009. ケモカイン融合型 DNA ワクチンにより誘導される抗原特異的 CD8⁺および CD4⁺T 細胞の解析. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月発表予定).
- 3) 瀬戸真太郎、小出幸夫. 2009. 結核菌によるファゴソーム局在性 Rab GTPase の局在変化とファゴリソーム形成阻害機構の解析. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月発表予定).
- 4) 永田 年、鈴木大介、辻村邦夫、小出幸夫. 2008. DNA ワクチンを用いた結核菌低分子量分泌蛋白のマウス T 細胞エピトープの同定. 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋、3 月発表予定).
- 5) 鈴木大介、永田 年、辻村邦夫、松本

- 壮吉、小出幸夫。2008。DNA ワクチンを用いた *Mycobacterium* DNA-binding protein 1 (MDP1) のマウス T 細胞エピトープの同定。第 82 回日本細菌学会総会（名古屋、3 月発表予定）。
- 6) Seto, S., and Y. Koide. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* modulates the network of Rab GTPases in attenuation of phagosome maturation. Keystone symposium. (Keystone, USA, 1 月)
- 7) Nagata, T., L.-X. Wang, and Y. Koide. 2008. Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening. DNA Vaccines 2008. (Las Vegas, USA, 12 月)
- 8) Suzuki, D., T. Nagata, S. Matsumoto, and Y. Koide. 2008. Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1). DNA Vaccines 2008. (Las Vegas, USA, 12 月)
- 9) Tsujimura, K., Y. Ikehara, T. Nagata, Y. Koide, and N. Kojima. 2008. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposomes targeting to intraperitoneal macrophages. Vaccine 2nd Global Congress. (Boston, USA, 12 月)
- 10) Suzuki, D., T. Nagata, S. Matsumoto, and Koide Y. 2008. Characterization of murine T-cell epitopes in Mycobacterial DNA-binding protein 1. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会（京都、12 月）。
- 11) Uto, T., M. Uchijima, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. Genetic fusion of Heat-shock protein 70 to a mycobacterial antigen enhances the antigen-specific T cell responses. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会（京都、12 月）。
- 12) Uchijima, M., T. Nagata, K. Tsujimura, K. Shibata, and Y. Koide. Analysis of antigen-specific CD8+ and CD4+ T-cell responses induced by MIP-1 α -MPT51 fusion DNA vaccination. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会（京都、12 月）。
- 13) 瀬戸真太郎、小出幸夫。2008。結核菌感染マクロファージにおける Rab GTPase の網羅的局在解析。第 91 回細菌学会関東支部総会（千葉、10 月）。
- 14) Seto, S., and Y. Koide. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* modulates the network of Rab GTPases to inhibit phagolysosome biogenesis in macrophage. 第 8 回あわじ感染症・免疫フォーラム（淡路、9 月）。
- 15) Seto, S., and Y. Koide. 2008. Live *Mycobacterium tuberculosis* inhibits phagolysosome biogenesis in macrophages by modulating localization of Rab GTPase proteins on its phagosomes. 43rd US-Japan conference on tuberculosis and leprosy. (Baltimore, USA, 7 月)

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 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

持続性潜在結核菌感染を検出する臨床診断法の開発に関する研究

研究分担者 前倉 亮治（国立病院機構刀根山病院・副院長）
研究協力者 松本 壮吉（大阪市立大学大学院医学研究科細菌学・准教授）

研究要旨

本邦における肺結核の罹患率は近年低下傾向にあり、人口 10 万人当たり 20 人を切って低蔓延国になる日が近く訪れることが予想される。このとき、感染性のある活動性肺結核患者を隔離して治療することと同じように、潜在結核菌感染を発病前に診断し予防することが重要になってくる。そこで、潜在結核菌感染を正確かつ迅速に診断する方法を確立することを目的に研究を行っている。現在までに、肺結核の既往歴を持ち抗酸菌潜在感染が疑われる 270 例から血清検体が得られ、抗酸菌糖脂質抗原（TBGL）、リポアラビノマンナン（LAM）に対する抗酸菌抗体・末梢血インターフェロン遊離試験（QFT-2G）・*Mycobacterium avium* complex 糖ペプチド脂質抗原（GPL-core）抗体を測定した。このうち 31 検体を抽出し、新しく開発される検査法；1）ESAT-6（結核菌の増殖期に発現）、2）CFP10（増殖期に発現）、3）MDP1（常に発現、休眠期で増）、4）Acr（低酸素で誘導）、5）GlnA1（低酸素で誘導）、6）HSP(Rv0251c（後期休眠期に発現）や7）Rv2658c（後期休眠期に発現）を用いて、臨床診断法として最も適切な抗原の組み合わせを検討中である。

A. 研究目的

本邦における肺結核の罹患率は近年低下傾向にあり、人口 10 万人当たり 20 人を切って低蔓延国になる日が近く訪れることが予想される。このとき、感染性のある活動性肺結核患者を隔離して治療することと同じように、潜在結核菌感染（LTBI）を発病前に診断し予防することが重要になってくる。そこで、潜在結核菌感染を正確かつ迅速に診断する方法を確立することを目的に研究を行う。

B. 研究方法

対象；

1. 肺結核の既往歴を持つ症例（入院、外来の別は問わず）を対象とする。
2. 喀痰：塗抹培養検査・遺伝子増幅検査・胸部レントゲンなどで活動性肺結核が否定されること。
3. 結核の既往歴・家族歴・接触歴のない若年健常者を対照者とする。

（臨床実習に出る前の医学部の学生を考慮している）

潜在結核菌感染の検出法；

1. TBGL や LAM の抗酸菌抗体測定（保険収載）
2. QFT-2G の測定（保険収載）
3. 新しく開発される検査法（組み換え結核菌抗原名）
 - 1) ESAT-6（結核菌の増殖期に発現）
 - 2) CFP10（増殖期に発現）
 - 3) MDP1（常に発現、休眠期で増）
 - 4) Acr（低酸素で誘導）
 - 5) GlnA1（低酸素で誘導）
 - 6) HSP(Rv0251c（後期休眠期に発現）
 - 7) Rv2658c（後期休眠期に発現）これらを抗原として酵素抗体法（ELISA）を用いて血清抗体価を測定する。
4. GPL-core (*Mycobacterium avium* complex : MAC 抗原)
持続性潜在結核菌感染例の抽出；

国立病院機構刀根山病院を受診した肺結核の既往歴を持ち結核菌感染を疑われる症例に対して、結核菌感染を診断する目的で抗酸菌糖脂質抗原 (TBGL)、リポアラビノマンナン (LAM) および末梢血インターフェロン遊離試験 (QFT-2G) の検査を行い、この時に患者の同意を得て潜在結核菌感染の新しい診断法の確立を目的に、余分に 5 mL 採血をする。

また、肺結核および非結核性抗酸菌症の診断する目的で、喀痰：塗抹・培養検査・遺伝子増幅検査・胸部レントゲン・CT (必要であれば気管支内視鏡検査) を行う。これらの検査結果から、活動性肺結核が否定された例を、陳旧性肺結核例として持続性潜在結核菌感染の有無を上記の検出法を用いて検討する。

(倫理的配慮)

ヒトを対象とする研究倫理審査委員会の承認を得て遂行した。なお、利益相反はなかった。

C. 研究結果

持続性潜在抗酸菌感染疑い例 270 例を抽出し、TBGL、LAM の抗酸菌抗体・QFT-2G・GPL-core 抗体の測定を行い、潜在抗酸菌感染例 31 例について他の抗体検査を検討している。

D. 考察

潜在性結核菌感染 (LTBI) における結核菌は分裂・増殖など代謝が低下していると考えられる。QFT-2G に用いられている結核菌抗原 (ESAT-6 や CFP10) は分裂・増殖期由来分泌蛋白質であり、LTBI 診断に改良が望まれる。

本研究では、分裂・増殖など代謝が低下した、或いは、低酸素培養結核菌に発現が増強した抗原 (MDP1、Acr、GlnA1、HSP や Rv2658c) を探索した。今後、ヒト臨床試料を用い、診断的有用性を確認する。

E. 結論

潜在性結核菌感染 (LTBI) の診断に有用な診断抗原を探索した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tateishi, Y., Y. Hirayama, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura, J. Kang, A. Shibata, K. Hirata, S. Kitada, **R. Maekura**, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2009. Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from immunocompetent patients. *Microb. Pathog.* 46: 6-12.
- 2) Kitada, S., K. Kobayashi, S. Ichiyama, S. Takakura, M. Sakatani, K. Suzuki, T. Takashima, T. Nagai, I. Sakurabayashi, M. Ito, and **R. Maekura**. 2008. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium*-complex pulmonary disease using an enzyme immunoassay kit. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177: 793-797.

2. 学会発表

- 1) **Maekura, R.**, S. Kitada, T. Hiraga, K. Yoshimura, Y. Tateishi, H. Hashimoto, and K. Fushitani. 2008 Long-term survival of patients with *Mycobacterium avium*-intracellular complex pulmonary disease (MAC-PD). 2008 Annual Congress of European Respiratory Society (Berlin, Germany, 10 月)

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 なし
3. その他 なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書 籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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	バイオセーフティーの辞典. 病原微生物とハザード対策の実際	みみずく舎	東京	2008	194 - 197
Fujiwara, N., <u>K. Kobayashi</u>	Mycobacterial glycolipids and host responses.	Sasaki, D.,	Glycolipids: New Research.	Nova Science Publishers	New York USA	2008	99 - 116

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kitada, S., <u>K. Kobayashi</u> , S. Ichiyama, S. Takakura, M. Sakatani, K. Suzuki, T. Takashima, T. Nagai, I. Sakurabayashi, M. Ito, <u>R. Maekura</u> .	Serodiagnosis of <i>Mycobacterium avium</i> -complex pulmonary disease using an enzyme immunoassay kit.	Am. J. Respir. Crit. Care Med.	177	793 - 797	2008
Nakata, N., N. Fujiwara, T. Naka, I. Yano, <u>K. Kobayashi</u> , S. Maeda.	Identification and characterization of two novel methyltransferase genes that determine the serotype 12-specific structure on glycopeptidolipids of <i>Mycobacterium intracellulare</i> .	J. Bacteriol.	190	1064 - 1071	2008
Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, <u>K. Kobayashi</u> , M. Makino, <u>S. Matsumoto</u> , H. Ogura, S. Maeda.	Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from <i>Mycobacterium intracellulare</i> .	J. Bacteriol.	190	3613 - 3621	2008
Nishimura, J., H. Saiga, S.	Potent antimycobacterial activity of mouse secretory	J. Immunol.	180	4032 -	2008

Sato, M. Okuyama, H. Kayama, H. Kuwata, S. Matsumoto , T. Nishida, Y. Sawa, S. Akira, Y. Yoshikai, M. Yamamoto, K. Takeda.	leukocyte protease inhibitor.			4039	
Saiga H., J. Nishimura, H. Kuwata, M. Okuyama, S. Matsumoto , S. Sato, M. Matsumoto, S. Akira, Y. Yoshikai, K. Honda, M. Yamamoto, K. Takeda.	Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium.	J. Immunol.	181	8521 - 8527	2008
Matsunaga I Naka T Talekar RS McConnell MJ Katoh K Nakao H Otsuka A Behar SM Yano I Moody DB Sugita M.	Mycolytransferase-mediated glycolipid exchange in mycobacteria.	J. Biol. Chem.	283	28835 - 28841	2008
Morita D Katoh K Harada T Nakagawa Y Matsunaga I Miura T Adachi A Igarashi T Sugita M.	Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	377	889 - 893	2008
Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, M. Makino.	The <i>Mycobacterium avium</i> complex <i>gtfTB</i> gene encodes a glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific glycopeptidolipid.	J. Bacteriol.	190	7918 - 7924	2008
Aoshi, T., J. A. Carreoro, V. Konjufca, Y. Koide , E. R. Unanue, M. J. Miller.	The cellular niche of <i>Listeria monocytogenes</i> infection changes rapidly in the spleen.	Eur. J. Immunol.	in press		2009

Aoshi, T., B. H. Zinselmeyer, V. Konjufca, J. N. Lynch, X. Zhang, Y. Koide , M. J. Miller.	Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8 ⁺ T cells.	Immunity	29	476 - 486	2008
Uchijima, M., T. Nagata, Y. Koide .	Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 protein efficiently induces antigen-specific T-cell responses.	Vaccine	26	5165 - 5169	2008
Nagata, T., T. Aoshi, M. Uchijima, Y. Koide .	In vivo hierarchy of individual T-cell epitope-specific helper T-cell subset against an intracellular bacterium.	Vaccine	26	5123 - 5127	2008
Hashimoto, D., T. Nagata, M. Uchijima, S. Seto, T. Suda, K. Chida, H. Miyoshi, H. Nakamura, Y. Koide .	Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> induces specific CD8 ⁺ T-cell responses in the lung.	Vaccine	26	5095 - 5100	2008
Aoshi, T., T. Nagata, M. Suzuki, M. Uchijima, D. Hashimoto, A. Rafiei, T. Suda, K. Chida, Y. Koide .	Identification of an HLA-A*0201-restricted T-cell epitope on the MPT51 protein, a major secreted protein derived from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , by MPT51 overlapping peptide screening.	Infect. Immun.	76	1565 - 1571	2008
Ikehara, Y., N. Shiuchi, S. Kabata-Ikehara, H. Nakanishi, N. Yokoyama, H. Takagi, T. Nagata, Y. Koide , K. Kuzushima, T. Takahashi, K. Tsujimura, N. Kojima.	Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal phagocytic cells.	Cancer Lett.	260	137 - 145	2008