

201028039A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御

を介した治療予防法の開発戦略

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

平成23(2011)年3月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御  
を介した治療予防法の開発戦略

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

平成23(2011)年3月

## 目 次

|   |    |
|---|----|
| 総括研究報告書：結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御を介した治療予防法の開発戦略<br>牧野 正彦（国立感染症研究所） .....                      | 1  |
| 分担研究報告書：初回免疫ワクチンの開発<br>牧野 正彦（国立感染症研究所） .....  | 9  |
| 分担研究報告書：結核及び非結核性抗酸菌の迅速な菌種同定法の確立と治療法開発<br>荒川 宜親（国立感染症研究所） .....                              | 15 |
| 分担研究報告書：新規ワクチン開発のための基礎研究<br>－Th1 誘導型ペプチドによる細胞障害性メモリーT細胞の分化誘導機構の開発－<br>田村 敏生（国立感染症研究所） ..... | 21 |
| 分担研究報告書：慢性持続感染機構解明のための抗酸菌制御システムの解析<br>星野 仁彦（国立感染症研究所） .....                                 | 27 |
| 分担研究報告書：自然免疫系による結核感染防御機構の解析<br>竹田 潔（大阪大学） .....   | 31 |
| 分担研究報告書：結核慢性感染の成立・維持における肺環境内恒常性に関する研究<br>河村 伊久雄（京都大学） .....                                 | 35 |
| 研究成果の刊行に関する一覧表 .....  | 41 |



平成22年度 厚生労働科学研究費補助金  
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御  
を介した治療予防法の開発戦略

総括研究報告書

研究代表者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
総括研究報告書

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御を介した治療予防法の開発戦略

研究代表者 牧野 正彦（国立感染症研究所・感染制御部・部長）

研究要旨.

多剤耐性結核菌の出現と拡散に的確に対処する最善の方策を人類は未だ獲得していない。本問題に対処するためには抜本的対策が必要である。そこで、国民をこの恐怖から救うために、発展性に富んだ基礎及び開発研究を行うことを大目標として設定した。免疫抑制性シグナル伝達を担う PD-1 分子欠損マウスにおいては、期待した結核菌の生体外排除は誘導できず、逆に、強い壊死性炎症・サイトカインバースト・マウスの早期個体死が誘導された。このことは、結核菌の制御においては結核菌と宿主免疫応答のバランスを保つことが重要で、結核菌をマクロファージ等の細胞内へ封じ込め、結核菌潜伏感染を誘導することが、生体防御反応の最初の目標として設定することが重要であると考えられた。結核に対するワクチン開発にあっては、結核菌の主要抗原として MMP-II が新しく同定された。従来のワクチンターゲット分子に新しい仲間が加わり、予防方策を樹立する上で重要な知見が得られた。今後 MMP-II を利用したリコンビナント BCG にワクチンとしての期待が高まった。高齢者の再燃による結核発症を予防するためには、追加免疫用ワクチンの開発が必要で、CD8 陽性キラー T 細胞活性化分子機構の同定が必須となる。CD8 陽性 T 細胞の活性化には、タイプ 1 CD4 陽性 T 細胞の選択的活性化が必須であり、T-bet・TAF7・STAT43 の 3 者の介在が必要かつ十分条件を提供することが判明した。今後開発されるワクチンの有効性を試験管内でスクリーニングする方策の開発へも繋がる。同時に、今後のワクチン開発の道筋が同定された。治療薬の開発においては、結核菌の増殖に必須な酵素を同定した。本酵素は結核菌特異的であって、新しいタイプの抗結核治療薬の開発が可能となった。多剤耐性菌に対する治療法が行き詰る中で、非常に大きな光明が得られたといっても過言ではない。さらに、結核菌感染に伴い活性化される自然免疫応答の中で、宿主因子として直接的に結核菌の細胞死を誘導し得る分子が初めて同定された。今後本分子を活性化する方策が明らかとなると新しい治療方法が開発可能と考えられた。さらに、高濃度結核菌排出患者接触者に対して、予防的治療薬の開発が期待できる。以上、結核に対する新しい予防・治療法の開発に新しい道筋が同定され、今後の展開が期待された。

研究分担者

荒川 宜親（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）  
田村 敏生（国立感染症研究所・感染制御部・室長）  
星野 仁彦（国立感染症研究所・感染制御部・室長）  
竹田 潔（大阪大学大学院医学研究科・免疫制御学・教授）  
河村 伊久雄（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・准教授）

## A. 研究目的

MDR・XDRに代表される多剤耐性菌の出現と拡散は全世界の恐怖であり、全ての国がこの恐怖から逃れることはできないと考えられている。世界の現状において、多剤耐性菌感染患者をみた時、患者を隔離し公衆衛生学的に菌の拡散を防止する以外の方策は無く、抜本的対策開発は極めて遅れている。日本においても同様であり、日本人結核患者から分離される結核菌の70~80%は北京株であり耐性を獲得し易い。したがって、日本においては日本の実情に合わせた抜本的対策が必要で、詳細かつ発展性のある基礎研究に立脚した開発戦略をいち早く打ち立てなければならない。基本的には、結核菌感染により発症する結核の発症予防方策の樹立、すなわちワクチンの開発・早期発見技術の開発・有効な治療薬及び免疫学的治療方法の樹立である。当研究班においては、こうした問題に立ち向かうため、治療・予防方策の開発を重点に研究に取り組んだ。さらに、結核菌はエアロゾル感染した後、肺胞にまで達すると肺胞内の免疫学的特殊性を利用して、増殖または潜伏感染し発症に至る基本的戦略を勝ち取る。そのため、肺胞内での免疫応答機構を詳細に検討し、発症予防法の樹立のための基礎的研究に取り組んだ。

以下に主な研究課題を挙げる。

1. 結核患者末梢リンパ球のマイクロ RNA を利用し、結核菌の生体内活動性を把握し、同時に結核菌と宿主免疫応答、とりわけ生体防御反応の量的・質的把握方法についての解析（星野）
2. 結核菌と宿主免疫応答の相互作用の結果、結核菌をマクロファージ等の抗原提示細胞内に封じ込めるために必要な宿主因子の解析（河村）
3. 結核菌に対する宿主自然免疫応答に基づく自然免疫応答を利用した結核治療法の開発（竹田）
4. 結核菌の増殖に必須な酵素を選択的に阻害する化合物の同定を通じた新規抗結核薬の開発（荒川）
5. 都市型ストブレイク誘導性結核菌によ

る結核発症を予防するための新規リコンビナント BCG の開発とリコンビナント BCG に組み込む結核菌主要抗原の同定（牧野）

6. 農村型再燃型結核発症を抑制し得るタイプ 1 CD4 陽性 T 細胞の選択的活性化のための免疫学的戦略の開発（田村）

## B. 研究方法

1. 正常健常者及び結核患者より末梢血の提供を受け、末梢単核球から miRNA を抽出し、human miRNA array kit を用い miRNA を検出し解析した（星野）。
2. ワイルドタイプマウス及び PD-1 欠損マウスから CD4 陽性 T 細胞を回収し、RAG2 欠損マウスに移入した後、結核菌を感染させた。移入後の感染動態及び移入した CD4 陽性 T 細胞の免疫応答を観察し、結核菌感染後の PD-1 欠損マウス肺における過剰な炎症反応が抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の機能異常に起因する可能性を検討した（河村）。
3. TLR2 依存性に感染初期に肺胞上皮細胞より分泌されるリポカイン 2、secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) の結核菌感染防御における機能をマウス個体レベルで解析した。さらに、自然免疫関連遺伝子の結核感染防御における役割を明らかにするため、Geanylase-binding protein (GBP) family 欠損マウスを作製する。作製にあたっては、クロモゾーム 3 及び 5 に存在する GBP ファミリー遺伝子を全て削除し、その機能を統括的に検討する（竹田）。
4. 結核菌新規 diadenosine polyphosphate 加リン酸分解酵素 (Rv2613c) の立体構造を結晶を用いた単波長異常分散法により決定した。さらに、結核菌とヒト上記加リン酸分解酵素の全体構造及び共通の基質である diadenosine polyphosphate が結合する部位の立体構造を比較検討した（荒川）。
5. 結核菌の MMP-II をコードする遺伝子

及び BCG 菌の HSP70 をコードする遺伝子を *M. smegmatis* に導入し、リコンビナント MMP-II 蛋白及びリコンビナント HSP70-MMP-II 融合蛋白を LPS-free のコンディションで作製し、その抗原提示能を CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の活性化能をヒト末梢血を用いて検索した。らい菌由来のリコンビナント蛋白を同様にして作製しコントロールとして用いた（牧野）。

6. TAF7 遺伝子をレンチウイルス発現ベクターを用いて T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4 陽性 T 細胞に導入し、選択的 Th1 分化誘導における TAF7 の役割を検討した。また、Peptide-25 刺激による STAT4 の活性化はチロシンリン酸化及びセリンリン酸化で評価した（田村）。

倫理面への配慮 国立感染症研究所および当該研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解（インフォームドコンセント）を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。動物実験は、当該研究施設の動物実験委員会の承認を得た上で、実験動物倫理指針に基づいて実施した。

### C. 研究結果

1. 治療前結核患者末梢血リンパ球の microRNA を測定すると、自然免疫あるいは獲得免疫応答を制御し得る microRNA が上昇または減少しているものが存在した。今後、臨床分離結核菌の microRNA を測定し、潜伏期から活動期に移行し易い結核菌の同定を試みる（星野）。
2. PD-1 KO マウスにおいては、結核菌エアロゾル感染後 3 週で PD-L1 の発現が

上昇し、T 細胞の抗原特異的免疫反応を活性化し、その結果としてマクロファージを活性化し、種々のサイトカイン/ケモカインを大量産生させた。マクロファージの機能不全・細胞死を誘導し、個体の早期死亡を誘導した。感染早期の結核菌と宿主免疫の相互作用のバランスが崩れると結核菌の異常増殖を許す結果となることが明らかとなった（河村）。

3. マクロファージ等の抗原提示細胞以外の自然免疫関連細胞が結核菌の感染を受けて産生する SLPI は、結核菌の膜の透過性を増大させ、結核菌の細胞死を誘導した。さらに、活動期結核患者接触者の結核発症を予防する新規薬剤になり得る可能性がマウスの生体内実験で明らかとなった（竹田）。
4. 結核菌の生育に深く関与するポリリン酸化を誘導する抗酸菌特異的酵素は 4 量体を形成し、特異的基質結合部位を提供していた。本結合部位は、新規薬剤ターゲットとして有効に作用する可能性が極めて高く、既存薬剤とは全く異なる新規薬剤が産出できる可能性が高い（荒川）。
5. 結核菌由来の MMP-II 及び HSP70-MMP-II 融合蛋白は共に強い免疫原性示し、樹状細胞・未感作 CD4 陽性 T 細胞及び未感作 CD8 陽性 T 細胞を活性化し、大量の IFN- $\gamma$  の産生を誘導した。両抗原を比較すると HSP70-MMP-II 融合蛋白の方が免疫活性は強く、さらにメモリータイプ CD8 陽性 T 細胞を刺激すると、パーフォリン産生性のキラー T 細胞を産生した。また、結核菌をマクロファージ及び樹状細胞に感染すると細胞表面に MMP-II を発現した。したがって、MMP-II は抗結核ワクチンのターゲット分子であることが判明した（牧野）。
6. T 細胞レセプターを介した抗原刺激を受けると抗原提示細胞は、TAF7 及び T-bet の転写活性を増強し IFN- $\gamma$  産生を誘導し、かつ STAT-4 の転写活性を増



強して IL-12R $\beta$ 2 の発現を誘導し、選択的にタイプ 1 T 細胞の活性化を誘導した。この選択的活性化誘導には、TAF7・T-bet・STAT-4 の 3 者の活性化が必須であり、3 者を活性化する蛋白分子が有効に作用するワクチンとなり得ることが判明した（田村）。

#### D. 考察

結核菌は BSL3 実験室で取り扱うことが義務付けられている病原性が極めて高い病原体である。多剤耐性菌の出現及び拡散に伴い、結核発症を予防し結核患者を的確に治療する方策の早期開発が強く求められているが、現状においては多剤耐性結核菌により発症した患者への対応は、患者を医療機関に封じ込め、公衆衛生的に対処する方策しか存在しない。世界レベルにおいて、抜本的対策及び予防・治療戦略の開発が必須であり、かつ急務である。PD-1 は、免疫抑制シグナルを付与する分子である。しかし、PD-1 を欠損させたマウスにおいては、結核菌の早期排除は観察されず、逆に結核菌の強烈的な増殖を誘導し個体の早期死亡をもたらした。このことは、結核菌の増殖をコントロールするためには宿主免疫応答のバランスを良好に保つことが重要であり、結核対策のゴールは結核菌の生体外排除を図ることではなく、マクロファージ等の抗原提示細胞への潜伏化を誘導することにあることを指し示している。

結核は以前が高齢者の病気であり、潜伏化した結核菌の再燃が中心と考えられてきた。しかし、近年では大都市を中心に、かつ青壮年を中心に集団感染・集団発症する事例が多くなっている。高齢者の発症と若年層の発症は機序を異にすることから、予防方策の開発にあっても異なるストラテジーの樹立が求められる。集団発症を予防する方策では、安価で安全性の高いワクチンが必要であり、その候補として改良型 BCG の開発が極めて有望と考えられる。しかし、現在開発途中にあるリコンビナント BCG は 3 種類のみであり、何れもその有効性は若干なりとも疑問視されている。BCG に組み

込む主要抗原も開発が極めて遅れている。本研究班においては、こうした状況を鑑みて新しい主要抗原の開発に取り組んだ。その結果として、MMP-II 抗原が新たに見出された。結核菌の新しい主要抗原が同定されたことは、世界的にも画期的であり、ワクチン開発のバリエーションが大きく広がった。今後、この蛋白の有効性が試験管レベル及び動物実験で評価されるが、その結果には大きな期待が寄せられている。一方、高齢者の発症を予防するための追加免疫用ワクチンの開発においては、追加免疫ワクチンとして必須となる因子がようやく同定されつつある。本因子は、ワクチンの有効性を試験管内で評価する方策の開発にもつながる。長期間を要する動物実験の結果を待たずにスクリーニング可能となることは大きな進歩である。こうした因子が確立されれば追加免疫ワクチンの開発は容易に進むものと予想される。

治療方法開発においては、新規薬剤の開発と自然免疫応答を利用した治療法の開発が行われた。新規薬剤開発にあっては、結核菌が増殖する上で必須となる酵素が同定され、この酵素の薬理作用を担う部位が同定された。本部位は結核菌特異的であり、本部位に結合する化合物の同定は新規薬剤の開発に自動的に繋がることと期待される。自然免疫応答を担う分子の中には、結核菌を直接的に殺戮することが可能な宿主因子がすでに同定されている。今後こうした宿主因子を効率的に利用する方策を開発する必要があるが、こうした研究は世界でもほとんど行われておらず、その研究成果は画期的な結核治療戦略に結びつく可能性があり、今後の研究の進展が望まれる。

結核研究は 200 年以上の歴史があり、これまでの研究で実に多くの新事実が積み重ねられてきた。しかし、多剤耐性菌の出現と拡散という新しい時代を迎え、これに立ち向かうために必要な新しい戦略の開発が強く望まれる。確固たる基礎研究の成果に立脚した新戦略の開発が必須である。

#### E. 結論



結核ワクチンのターゲットは、結核菌を細胞内に封じ込めることを目的とすることが妥当と考えられる研究成果が得られた。さらに、結核ワクチンとしてリコンビナント BCG の開発及び追加免疫ワクチン開発戦略の道筋が同定された。新規結核治療として新しい治療薬及び自然免疫を介した治療法の開発の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayashi, D., T. Takii, T. Mukai, M. Makino, E. Yasuda, Y. Horita, R. Yamamoto, A. Fujiwara, K. Kanai, M. Kondo, A. Kawarazaki, I. Yano, S. Yamamoto, and K. Onozaki. 2010. Biochemical characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG substrains. FEMS Microbiol. Lett., 306: 103-109.
- 2) Miyamoto, Y., T. Mukai, T. Naka, N. Fujiwara, Y. Maeda, M. Kai, S. Mizuno, I. Yano, and M. Makino. 2010. Novel rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. J. Bacteriol., 192: 5700-5708.
- 3) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2010. Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant *Bacillus Calmette-Guérin* producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. J. Immunol., 185: 6234-6243.
- 4) Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, A. Kariyone, M.D. Begum, K. Kawakami, Y. Okamoto, S. Hamada, K. Oshiro, H. Kohama, T. Arakawa, N. Ohara, K. Takatsu, and G. Matsuzaki. 2010. Suppressed induction of

mycobacterial antigen-specific Th1-type CD4<sup>+</sup> T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection. Int. Immunol., 22:307-318.

- 5) Sakai, S., I. Kawamura, T. Okazaki, K. Tsuchiya, R. Uchiyama, and M. Mitsuyama. 2010. PD-1-PD-L1 pathway impairs Th1 immune response in the late stage of infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. Int. Immunol., 22: 915-925.
- 6) Kai, M., N. P. N. Ha, N. H. An, P. T. H. B. Diu, N. K. Hoa, Y. Miyamoto, Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Makino, and N. T. Tan. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. Clin. Infect. Dis., in press.
- 7) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Vaccine Immunol., in press.
- 8) Kobayashi, H., A. Nolan, B. Naveed, A. L. Comfort, W. N. Rom, Y. Hoshino, and M. D. Weiden. Neutrophils activate alveolar macrophages by producing caspase-6-mediated cleavage of IL-1 receptor-associated kinase-M. J. Immunol. in press.
- 9) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Era, K. Matsumoto, Y. Kanazawa, A. Tomita, M. Furuta, M. Washizu, M. Makino, and N. Ishii. Multiple cases of cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection in a "hot spa" in Japan. J. Clin. Microbiol., in press.

2. 学会発表

- 1) Tamura, T., Y. Shimohakamada, M. Makino, and K. Takatsu. Peptide-25

- of Ag85B induces Th1 differentiation in a T-bet-independent manner. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
- 2) Makino, M., T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, Y. Tsukamoto, and M. Matsuoka. Induction of crosspriming of naïve CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by recombinant BCG that secretes HSP70-MMP-II fusion protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
  - 3) Sakai, S., I. Kawamura, and M. Mitsuyama. PD-1 inhibitory signal is required for an orchestrated protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in lung. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
  - 4) Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, and M. Makino. The fate of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells. 11<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology. 26-30 September, 2010, Lugano, Switzerland.
  - 5) Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, A. Kariyone, M.D. Begum, K. Kawakami, Y. Okamoto, S. Hamada, K. Oshiro, H. Kohama, T. Arakawa, N. Ohara, K. Takatsu, and G. Matsuzaki. Suppressed induction of mycobacterial antigen -specific Th1-type CD4<sup>+</sup> T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 22-27 August, 2010. Kobe, Japan.
  - 6) Takeda, K., and H. Kayama. Regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 22-27 August, 2010, Kobe, Japan
  - 7) Sakai, S., I. Kawamura, K. Tsuchiya, T. Okazaki, and M. Mitsuyama. PD-1 inhibitory receptor prevents immunopathological responses in murine tuberculosis. The 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 22-27 August, Kobe, Japan.
  - 8) Takeda, K. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. International Symposium on Organelle Network: Microbiology, Immunology, and Cell Biology, 12-13 July, 2010, Osaka, Japan
  - 9) Mori, S., K. Shibayama, J. I. Wachino, and Y. Arakawa. Cloning, purification, and molecular characterization of a novel diadenosine 5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. The 110<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology 2010, 23-27, May, San Diego, CA.
  - 10) Takeda, K. Innate immune responses at the intestinal mucosa. Annual Meeting of The Society for Leukocyte Biology & The International Endotoxin and Innate Immunity Society, 7-9 October, 2010, Vancouver, Canada
  - 11) 田村敏生. 結核分泌蛋白由来ペプチドによる Th1 型免疫応答誘導機序の解析. 第 85 回日本結核病学会総会 2010 年 5 月 京都

- 12) 竹田潔. 自然免疫系の活性制御と腸管炎症. 第22回微生物シンポジウム(特別講演)、2010年9月3-4日、大阪
- 13) 河村伊久雄. 結核菌の感染成立とPD-1シグナル伝達経路. 第85回日本結核病学会総会 2010年4月 京都
- 14) 河村伊久雄, 楊瑞麗, 陳曦, S. R. Dewamitta, 酒井俊祐, 土屋晃介, 原英樹, 光山正雄. 結核菌感染マクロファージの interleukin-1 $\alpha$  産生における結核菌病原性関連遺伝子領域RD1の役割. 第63回日本細菌学会関西支部総会 2010年11月 枚方
- 15) 森茂太郎, 柴山恵吾, 和知野純一, 荒川宜親. 結核菌由来新規 diadenosine 5', 5'''- $P^i$ ,  $P^j$ -tetrphosphate 加リン酸分解酵素の構造と機能の相関解析. 第92回日本細菌学会関東支部総会 2010年10月 東京
- 16) 森茂太郎, 柴山恵吾, 和知野純一, 荒川宜親. 結核菌由来新規 diadenosine 5', 5'''- $P^i$ ,  $P^j$ -tetrphosphate 加リン酸分解酵素の機能構造相関解析. 第62回日本生物工学会大会 2010年10月 宮崎
- 17) 森茂太郎, 柴山恵吾, 和知野純一, 荒川宜親. 結核菌由来新規 diadenosine 5', 5'''- $P^i$ ,  $P^j$ -tetrphosphate 加リン酸分解酵素の活性発現に必要な構造的要因. 日本農芸化学会 2011年度大会 2011年3月 京都
- 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

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金  
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

初回免疫ワクチンの開発

分担研究報告書

研究分担者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・部長)



厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

初回免疫ワクチンの開発

研究分担者 牧野 正彦 （国立感染症研究所・感染制御部・部長）  
研究協力者 塚本 裕美子 （国立感染症研究所・感染制御部・研究員）

研究要旨.

結核に対するワクチンとして弱毒化牛型結核菌 *Mycobacterium bovis* BCG が歴史的に使われてきたが、現在では BCG 菌がワクチンとして有効に作用する場合は小児の粟粒結核などに限られ、成人あるいは高齢者の肺結核を予防することはできないと考えられている。一方、同じ抗酸菌に分類されるらい菌の感染により発症するハンセン病においても、BCG 菌の有効性は 26%にとどまると報告されている。これまでに、ハンセン病の発症を抑制するワクチンとして改良型 BCG の作製に成功している。改良型 BCG においては、らい菌の主要抗原として Major Membrane Protein (MMP)-II を同定し、BCG に対して MMP-II 単独あるいは HSP70-MMP-II 連結遺伝子を組み込ませる方策が有効であることを報告してきた。MMP-II は結核菌にも存在するため、同様に作製した BCG が結核菌に対しても有効に作用する可能性が示唆される。しかし、らい菌の MMP-II と結核菌の MMP-II とでは、アミノ酸レベルでの相同性は 90%にとどまり、結核菌の MMP-II の抗原性、特に獲得免疫応答惹起能については報告されていない。そこで本年度は、結核菌由来 MMP-II の抗原提示細胞及び CD4 陽性あるいは CD8 陽性 T 細胞の活性化能を評価した。HSP70-MMP-II 融合蛋白についても同様の解析を行った。結核菌 MMP-II は、ヒト単球由来樹状細胞を活性化 IL-12 の産生を誘導するとともに、樹状細胞を介しヒトナイーブ CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞を活性化しインターフェロンガンマ (IFN- $\gamma$ ) の産生を誘導した。その程度は、らい菌由来 MMP-II よりも強かった。さらに、MMP-II と HSP70-MMP-II 融合蛋白を比較すると、後者においてより強く T 細胞を活性化した。また、両抗原はヒトメモリータイプ CD8 陽性 T 細胞を活性化し、パーフォリン産生性キラー T 細胞へと分化させた。さらに、結核菌感染樹状細胞及びマクロファージは、細胞表面に MMP-II 抗原を発現したことより、結核菌由来 MMP-II は抗原性に富んだワクチン候補分子であることが判明した。これまで、結核菌の主要抗原としては数種類のみが同定されていたにとどまっていたが、本研究により新しい免疫原性に富んだ主要抗原が同定され、結核ワクチン開発において新しい 1 ページが加わった。

A. 研究目的

結核・ハンセン病など病原性抗酸菌感染症に対する生体防御反応は、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を中心とした獲得免疫応答により営まれており、これら T 細胞を活性化する抗原提示細胞としては樹状細胞

が重要な働きを果たしている。これらの病原性抗酸菌感染症を予防するワクチンとして BCG が使われてきたが、その有効性は極めて限られていて、新たなワクチンの開発が切望されている。全世界的にも最重要研究課題の一つとして位置付けられている。

ワクチン開発に当たっては様々な試みがなされており、ESAT6 や Ag85complex、結核菌由来の融合蛋白が候補として研究が展開されている。しかし、未だに有効性は確立されておらず、新しい分子の探索の余地は十分残されている。これまでに、ハンセン病に対するワクチン開発を展開してきたが、らい菌の主要抗原として MMP-II を見出し、MMP-II は CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化する能力を有し、さらに、TLR2 に結合することから、ファゴゾームの内膜や細胞表面に発現した TLR2 を刺激し、宿主細胞の NF- $\kappa$ B を活性化し、その結果樹状細胞を活性化することが可能であった。また、MMP-II 遺伝子に結核菌由来の分泌シグナルあるいは BCG 菌由来の HSP70 遺伝子を連結して BCG に組み込んでリコンビナント BCG を作製すると、親 BCG に比し有意に強くらい菌の生体内での増殖を抑制することが可能であった。したがって、ハンセン病においては、MMP-II はワクチンの重要なコンポーネントとして極めて有望な抗原であると考えられている。らい菌と同じ抗酸菌に分類される結核菌の増殖も同様な方策で抑制できる可能性があると考えられるが、結核菌由来の MMP-II については、未知であって、T 細胞活性化能も検討されていない。そこで、結核菌由来の MMP-II 及び本 MMP-II を用いた HSP70-MMP-II 融合蛋白について、らい菌由来のこれらについて比較しつつ、結核菌由来の MMP-II の抗原性について検討を加えることを目的とした。

## B. 研究方法

非病原性抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* に結核菌由来 MMP-II 遺伝子あるいは HSP70-MMP-II 遺伝子を導入し、リコンビナント蛋白を作製し、アフィニティーカラムを用いて蛋白を精製した。正常健康人末梢血より、CD3 モノクローナル抗体付着ダイナビーズを用いて T 細胞を除去した後、プラスティック付着性単球を得て樹状細胞のプレカーサーとして用いた。単球に対して、リコンビナント(r)GM-CSF および rIL-4 を添加して 4 日間培養することで、未熟樹

状細胞を分化誘導した。この未熟樹状細胞に対して、精製蛋白をパルスし、GM-CSF および IL-4 存在下で、さらに 2 日間培養することで成熟樹状細胞を得た。BCG 感染樹状細胞の T 細胞活性化能は、抗原パルスした樹状細胞をマイトマイシン C 処理した後、自己の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞と 4 日間混合培養し、T 細胞が産生する IFN- $\gamma$  および IL-2 を ELISA 法で測定して評価した。T 細胞は、CD4 モノクローナル抗体あるいは CD8 モノクローナル抗体付着ダイナビーズを用いて精製し、ナイーブ T 細胞分画は、これら T 細胞から CD45RO 陽性 T 細胞を除去して得た。CD45RO 抗体は市販の抗体を用い、さらに抗マウス IgG 抗体ダイナビーズ抗体(市販)を用いて精製した。IFN- $\gamma$  および IL-2 は、市販の ELISA 用キットを用いて測定した。樹状細胞から産生される各種サイトカインも市販のキットを用いて ELISA 法で測定した。抗原添加樹状細胞における T 細胞活性化の抗原特異性は、樹状細胞を抗 MHC 抗原抗体および抗 CD86 抗体で処理することで T 細胞の活性化の減弱の有無で評価した。樹状細胞表面の抗原の発現程度は、FACSCalibur を用いて行った。抗体は市販の抗体を用いた。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

## C. 研究結果

結核菌由来の MMP-II (MMP-II (MTB)) と本 MMP-II と BCG 由来の HSP70 の融合蛋白 (Fusion (MTB)) を用いて樹状細胞を刺激すると、樹状細胞表面の MHC 抗原、CD86・CD83 抗原の発現が上昇した。両者を比較す

ると Fusion (MTB) でより強い発現が誘導された。また、MMP-II (MTB) 及び Fusion (MTB) で樹状細胞を刺激すると IL-12p40 の産生が誘導され、さらに、刺激直前に樹状細胞表面を TLR2 に対する抗体で処理すると IL-12 の産生は有意に低下した。本現象は、何れの蛋白を用いても確認された。また、両抗原を比較すると Fusion (MTB) でより大量のサイトカインが産生された。これらの結果は、両蛋白は TLR2 を介して樹状細胞を活性化し得ることを示している。また、樹状細胞に精製蛋白をパルスし、抗原提示細胞として用いると、ヒト末梢 CD4 陽性 T 細胞を非常に強く活性化した。その際にも Fusion (MTB) が有意に強く T 細胞を活性化し、極めて少量の抗原で強く T 細胞を活性化することが可能であった。このことは、BCG ワクチンにより CD4 陽性 T 細胞は生体内で MMP-II 抗原により感作されている可能性を示唆している。さらに、末梢単球由来マクロファージを介してもヒト CD4 陽性 T 細胞を活性化することが可能であった。これら蛋白はさらに未感作 (ナイーブ) CD4 陽性 T 細胞を活性化することが可能で、とりわけ Fusion (MTB) は、大量の IFN- $\gamma$  の産生を誘導することが可能であった。さらに、らい菌由来 MMP-II を用いて作製した HSP70-MMP-II 融合蛋白 (Fusion (ML)) と Fusion (MTB) を比較すると、後者がより強く T 細胞を活性化した。Fusion (MTB) によるナイーブ CD4 陽性 T 細胞の活性化は、抗原特異的であって、抗原パルス樹状細胞の表面を MHC class II あるいは CD86 抗原に対する中和抗体で処理することで、T 細胞の活性化は有意に抑制された。また、MMP-II に対する抗体を用いても、T 細胞の活性化は抑制された。したがって、CD4 陽性 T 細胞の活性化はパルスした MMP-II に依存した反応であることが判明した。MMP-II (MTB) ・ Fusion (MTB) は樹状細胞を介してヒトメモリータイプ CD8 陽性 T 細胞及び未感作 CD8 陽性 T 細胞をも活性化した。MMP-II (ML) ・ MMP-II (MTB) ・ Fusion (ML) ・ Fusion (MTB) の 4 種を比較すると、Fusion (MTB) が最も強く未感作 CD8 陽性 T 細胞を活

性化した。さらに、抗原パルスした樹状細胞を CD40 リガンドを用いて再刺激すると、CD8 陽性 T 細胞の活性化は増強した。Fusion (MTB) による未感作 CD8 陽性 T 細胞の活性化も抗原特異的反応であった。MMP-II (MTB) ・ Fusion (MTB) は、CD8 陽性 T 細胞からパーフォリン産生性のキラー T 細胞を産生した。また、結核菌 H37Ra 及び H37Rv を樹状細胞及びマクロファージに感染させると細胞表面に MMP-II が発現した。

#### D. 考察

BCG がワクチンとして充分効果を発揮できない最大の原因は、BCG は生きた抗酸菌であり、抗原提示細胞に取り込まれるとファゴゾームを形成し、ライソゾームとの融合を阻止することにある。そのため、BCG 由来の抗原は抗原提示細胞の表面に発現されず、T 細胞の抗原特異的活性化が損なわれてしまう。とりわけ、クロスプレゼンテーションを有効に利用することができず、未感作 CD8 陽性 T 細胞を活性化することは極めて難しい。BCG のこの欠点を凌駕するためには、感染した細胞のファゴゾームの中で主要抗原を分泌させ、分泌された蛋白をライソゾーム及び細胞質へ移動させることが必要である。したがって、抗酸菌感染症に対するワクチン開発に当たっては、抗原性に富んだ主要抗原を同定することが極めて重要である。この点において、結核菌由来 MMP-II 及び HSP70 との融合蛋白は、TLR2 を介し樹状細胞を活性化する能力を有し、未感作の CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化する能力を持っていたことから、主要抗原としての役割を果たすことが充分期待できる。また、BCG ワクチン接種を受けた日本人正常健康者 (結核菌の潜伏感染の有無は不明) のメモリータイプ CD4 陽性 T 細胞は MMP-II 抗原により感作されている可能性が考えられた。さらに、結核菌を樹状細胞やマクロファージに感染させると、その細胞表面に MMP-II 抗原が発現したことから、MMP-II はヒト生体内で T 細胞により認識され得る蛋白であることを示し、さらに結核菌感染を受けた抗原提示細胞は

ヒト CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化し得る可能性があることを示唆している。

また、これまでのハンセン病に対するワクチン開発研究において、MMP-II または HSP70-MMP-II 融合蛋白を BCG に組み込ませたリコンビナント BCG は、親 BCG に比し有意に強くらい菌の増殖を抑制することを見出している。したがって、結核菌由来 MMP-II は結核に対するワクチンとして極めて有用な役割を果たすことが可能と期待される。したがって、MMP-II は結核菌の主要抗原の一つであり、結核ワクチン開発において極めて重要な位置を占めると考えられる。新しい主要抗原の同定は、結核ワクチンの開発に大きな一歩を印す可能性がある。

#### E. 結論

結核菌由来 MMP-II 蛋白は、樹状細胞及びヒト CD4 陽性 T 細胞・CD8 陽性 T 細胞を活性化する抗原性に富んだ分子であることが判明した。ワクチン開発に応用し得るものと期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hayashi, D., T. Takii, T. Mukai, M. Makino, E. Yasuda, Y. Horita, R. Yamamoto, A. Fujiwara, K. Kanai, M. Kondo, A. Kawarazaki, I. Yano, S. Yamamoto, and K. Onozaki. 2010. Biochemical characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG substrains. FEMS Microbiol. Lett., 306: 103-109.
- 2) Miyamoto, Y., T. Mukai, T. Naka, N. Fujiwara, Y. Maeda, M. Kai, S. Mizuno, I. Yano, and M. Makino. 2010. Novel rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. J. Bacteriol., 192: 5700-5708.
- 3) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2010. Enhanced activation of

T lymphocytes by urease-deficient recombinant *Bacillus Calmette-Guérin* producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. J. Immunol., 185: 6234-6243.

- 4) Kai, M., N. P. N. Ha, N. H. An, P. T. H. B. Diu, N. K. Hoa, Y. Miyamoto, Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Makino, and N. T. Tan. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. Clin. Infect. Dis., in press.
  - 5) Tsukamoto Y., H. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai and M. Makino. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Vaccine Immunol., in press.
  - 6) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Era, K. Matsumoto, Y. Kanazawa, A. Tomita, M. Furuta, M. Washizu, M. Makino, and N. Ishii. Multiple Cases of Cutaneous *Mycobacterium massiliense* Infection in a "Hot Spa" in Japan. J. Clin. Microbiol. in press.
- ##### 2. 学会発表
- 1) Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, and M. Makino. The fate of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells. 11<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology. 26-30 September, 2010, Lugano, Switzerland.
  - 2) Tamura, T., Y. Shimohakamada, M. Makino, and K. Takatsu. Peptide-25 of Ag85B induces Th1 differentiation in a T-bet-independent manner. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge,



- Massachusetts, USA.
- 3) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. Anti-*M. leprae* activity and Phox expression in human macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
  - 4) Makino, M., T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, Y. Tsukamoto, and M. Matsuoka. Induction of crosspriming of naive CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by recombinant BCG that secretes HSP70-MMP-II fusion protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
  - 5) Mukai, T., Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Expression of the fluorescent protein in *Mycobacterium leprae*. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
  - 6) Miyamoto, Y., and M. Makino. Characterization of the glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium avium* complex serovar 20. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
  - 7) 宮本友司, 向井 徹, 甲斐雅規, 前田百美, 中 崇, 藤原永年, 水野淨子, 矢野郁也, 牧野正彦. *Mycobacterium avium* complex 血清型 4 型株における glycopeptidolipid の生合成解析. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
  - 8) 向井 徹, 前田百美, 福富康夫, 宮本友司, 松岡正典, 牧野正彦. 抗酸菌フェージ TM4 に由来する強力な抗酸菌プロモーターの同定. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
  - 9) 中田 登, 甲斐雅規, 牧野正彦. 抗酸菌 *rpoB* 遺伝子変異とリファンピシン感受性に関する解析. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
  - 10) 前田百美, 田村敏生, 甲斐雅規, 福富康夫, 牧野正彦. らい菌リポ蛋白由来リポペプチドによる宿主細胞内らい菌の殺戮. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
  - 11) 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. ヒトマクロファージの抗らい菌活性発現と phox タンパクの動態. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
  - 12) 福富康夫, 前田百美, 松岡正典, 牧野正彦. クロファジミンによる細胞死誘導の機序. 第 83 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2010 年 5 月 鹿児島市
  - 13) 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. らい菌のリポペプチドによる抗らい菌生体防御反応に及ぼす影響. 第 83 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2010 年 5 月 鹿児島市
  - 14) 甲斐雅規, 松岡正典, 宮本友司, 牧野正彦. 次世代シーケンス解析によるらい菌株のゲノム配列比較. 第 83 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2010 年 5 月 鹿児島市
  - 15) 向井 徹, 松岡正典, 前田百美, 宮本友司, 福富康夫, 牧野正彦. 抗酸菌フェージプロモーターによるらい菌の蛍光蛋白発現. 第 83 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2010 年 5 月 鹿児島市
  - 16) 鮫島朝之, 前田百美, 後藤正道, 牧野正彦. Major Membrane Protein (MMP)-II 血清抗体価とハンセン病の病型について. 第 83 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2010 年 5 月 鹿児島市

島市

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

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

結核及び非結核性抗酸菌の迅速な菌種同定法の確立と治療法開発

分担研究報告書

研究分担者

荒川 宜親

(国立感染症研究所・部長)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

結核及び非結核性抗酸菌の迅速な菌種同定法の確立と治療法開発

研究分担者 荒川 宜親（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）  
研究協力者 柴山 恵吾（国立感染症研究所・細菌第二部・室長）  
研究協力者 森 茂太郎（国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官）  
研究協力者 和知野純一（国立感染症研究所・細菌第二部・研究員）

研究要旨.

多剤耐性結核菌の広がりが世界中で問題となっている中、新しい作用機序を持つ新規抗結核薬の開発が急務となっている。そこで本研究グループでは、新規抗結核薬の標的と考えられる結核菌由来タンパク質を選び、その詳細な機能と構造の相関解析を行うことにより、新規抗結核薬の開発に結びつけることを目的としている。これまでに、候補として結核菌の新規 diadenosine polyphosphate 加リン酸分解酵素 (Rv2613c) を選び、その酵素機能と立体構造の決定を行ってきた。本年度は、立体構造のさらなる詳細な解析、並びにアミノ酸残基を置換した変異体の機能解析を行うことにより、Rv2613c の機能と構造の相関を明らかにした。その結果、Rv2613c が形成している特徴的な多量体構造が基質の結合において重要な役割を果たしていること、特に 160 番目の Trp 残基が活性の発現に必要なことを示した。さらに、他の diadenosine polyphosphate を基質とする酵素の立体構造と比較した結果、活性中心部位の構造は非常に良く似ているが、基質結合部位は Rv2613c に特徴的な構造であることが示された。これらの結果より、新規抗結核薬の開発に向けて Rv2613c の活性を特異的に阻害する新規化合物のデザインが可能であると考えられた。

A. 研究目的

多剤耐性結核菌や *Mycobacterium avium complex* に代表される非結核性抗酸菌が引き起こす重篤な感染症が世界中で問題となっているにもかかわらず、有効な抗菌薬がほとんど存在しないことから、新たな抗結核薬の開発が臨床現場では強く求められている。現在、いくつかの新規抗結核薬の開発が進められているものの、それらの多くは既存の抗菌薬の類縁化合物であることから、まったく新しい作用機序をもつ新規抗結核薬の開発が重要な課題となっている。そこで本研究グループでは、新規抗結核薬の標的候補と考えられる結核菌由来タンパク質を選び、その詳細な機能と構造の相関解析を行うことによって、新規抗結核薬の開発に結びつけることを目的としている。

これまでに、結核菌由来の機能未知タンパク質である Rv2613c をコードする遺伝子を破壊した株では生育能が低下すること (Sasseti, C.M., D.H. Boyd, and E.J. Rubin. 2003. *Mol. Microbiol.*, 48:77-84.) や、*in silico* 解析から Rv2613c が新規抗結核薬の標的候補の 1 つとして考えられること (Raman, K., K. Yeturu, and N. Chandra. 2008. *BMC Syst. Biol.*, 2:109.) が報告されていることから、本研究グループでは Rv2613c を新規抗結核薬の標的候補として選び、その酵素機能の解析と立体構造の決定を行ってきた (Mori, S., K. Shibayama, J.I. Wachino, and Y. Arakawa. 2010. *Protein Expr. Purif.*, 69:99-105., Mori, S., K. Shibayama, J.I. Wachino, and Y. Arakawa. 2010. *Acta Crystallogr.*,