

氏名	有村 友紀		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5322号		
学位授与の日付	平成28年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	BCG <i>thyX</i> 変異株の作製とその解析		
論文審査委員	鳥井 康弘 教授	友藤 孝明 准教授	大原 直也 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

ヒト型結核菌が引き起こす結核症は今なお世界レベルで蔓延し、人々の健康への脅威をもたらしている。特に多剤耐性結核 (MDR-TB) や超多剤耐性結核 (XDR-TB) の蔓延が深刻化している。

パラアミノサリチル酸 (PAS) は 1948 年から使用されているが、服用量が多く耐性菌の出現頻度が高いことから近年では使用頻度が低い。そのため逆に MDR-TB や XDR-TB の中に PAS が奏功する例があり、使用が見直されている。最近になり PAS はプロドラッグで、菌によって代謝されることで活性型となりさよふすることが明らかにされた。一方、PAS 耐性の原因としてチミジル酸合成酵素 (TS) の遺伝子 *thyA* の他に *folC* や *ribD* の変異が報告されたが、未だ不明な点が多い。

本研究では *ThyA* と同じく TS 活性を有する *ThyX* の遺伝子の変異が PAS 耐性に関与することを考え、ワクチン株である *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 株を親株として *thyX* の変異株を作製し、その性状を解析した。

【材料ならびに方法】

1. 遺伝子欠損株の作製

枯草菌由来 *sacB* を選択マーカーとして利用した 2 段階相同組換え法により BCG Tokyo 株を親株として *thyA* 欠損株 $\Delta thyA$ と *thyX* 欠損株 $\Delta thyX$ を作製した。

2. 発現プラスミド導入株の作製

BCG Tokyo 株のゲノム DNA を鋳型として PCR 増幅した DNA 断片を用いて *thyA* と *thyX* の発現ベクターを作製した。これらのプラスミドを親株に導入することにより過剰発現株を作製した。

3. 薬剤感受性試験

供試菌を 7H9-ADC-Tween80 液体培地で培養し、吸光度 0.1 に調整した。この菌液を 1 白金耳ずつ PAS 非含有、PAS 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有、およびスルファメトキサゾール (SMX) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有 7H10-ADC 寒天培地に播種し、37°C で 20 日培養した。

4. RNA の抽出と逆転写

7H9-ADC-Tween80 液体培地で培養した菌液を、吸光度 2.0 になるように調整後、7H10-ADC 寒

天培地に播種し 37°C で培養した。24 時間後に菌体を回収し、全 RNA の回収と精製を行なった。逆転写 (RT) は 1 µg の全 RNA を用いて行なった。

5. 定量 RT-PCR 法

相補 DNA (cDNA) を鋳型とし、*thyA* と *thyX* の転写産物量を計測した。

【結果】

1. BCG における *thyX* の必須性

2 段階相同組換え法により、*thyA* 欠損株 $\Delta thyA$ と *thyX* 欠損株 $\Delta thyX$ が作製された。最小培地で培養されたことにより $\Delta thyA$ とともに $\Delta thyX$ もチミジル酸とチミンに対する栄養要求性を示さなかった。

2. BCG 変異株の増殖能

7H9-ADC-Tween80 液体培地における対数増殖期の増殖速度を Tokyo 株、 $\Delta thyA$ 、 $\Delta thyX$ 、*thyA* と *thyX* それぞれの過剰発現株 Tokyo/*thyA*⁺ と Tokyo/*thyX*⁺ で比較したが、いずれの株間においても差は認められなかった。

3. 薬剤感受性

$\Delta thyA$ と Tokyo/*thyX*⁺ は PAS 耐性を示した。一方、Tokyo 株、 $\Delta thyX$ 、および Tokyo/*thyA*⁺ は PAS 感受性を示した。SMX に対してはいずれの株も感受性を示した。

4. *thyX* と *thyA* の発現量

Tokyo/*thyX*⁺ における *thyA* の発現量は親株に対して低下していた。*thyX* の発現量は $\Delta thyA$ と Tokyo/*thyX*⁺ とともに親株に対して有意に上昇していた。

【考察】

抗酸菌では *thyX* は必須遺伝子として扱われてきた。しかし、本研究において世界で初めて抗酸菌の *thyX* 欠損株が作製され、*thyX* は必須遺伝子ではないことが明らかとなった。

チミジル酸の合成過程において ThyA は 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (5,10-methenyl-THF) をジヒドロ葉酸 (DHF) に酸化するが、ThyX は 5,10-methenyl-THF をテトラヒドロ葉酸 (THF) に生成する。野生株では TS として ThyA が主に働いているため、PAS の代謝産物であるヒドロキシジヒドロ葉酸 (HDHF) によってジヒドロ葉酸還元酵素 (DFRA) の活性が阻害されると DHF が蓄積され THF が枯渇し、菌体のアミノ酸代謝や核酸代謝が止まる。*thyA* の変異や欠損により ThyA の活性が低下あるいは消失した場合には ThyX が主に働き 5,10-methenyl-THF から THF に循環されるため、DHF の蓄積と THF の枯渇が回避される。このことが $\Delta thyA$ と Tokyo/*thyX*⁺ における PAS 耐性の機序と考えられた。また SMX に対しては両株ともに感受性を示したことから、*de novo* の THF 合成は PAS 耐性菌においても必須であると考えられた。

論文審査結果の要旨

ヒト型結核菌が引き起こす結核症は今なお世界レベルで蔓延し、人々の健康への脅威をもたらしている。パラアミノサリチル酸（PAS）は1948年から使用されているが、服用量が多く耐性菌の出現頻度が高いことから近年では使用頻度が低い。そのため逆に多剤耐性結核や超多剤耐性結核の中にPASが奏功する例があり、治療薬として使用が見直されている。PASはプロドラッグであり、その代謝産物がジヒドロ葉酸還元酵素（DfrA）を阻害することが作用機序と考えられている。これまでPAS耐性の原因としてチミジル酸合成酵素（TS）の遺伝子 *thyA* の他に *folC* や *ribD* の変異が報告されているが、未だ不明な点が多い。

本研究ではPAS耐性機序を明らかにすることを目的とし、ThyAと同じくTS活性を有するThyXがPAS耐性に関与すると推測し、実験を行なった。そして以下の結果が得られた。

1. ワクチン株である *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 株を親株とした2段階相同組換え法により、*thyA* 欠損株 $\Delta thyA$ と *thyX* 欠損株 $\Delta thyX$ を作製した。また、*thyA* あるいは *thyX* の発現プラスミドを作製し、Tokyo 株に導入することで *thyA* 過剰発現株 Tokyo/*thyA*⁺ と *thyX* 過剰発現株 Tokyo/*thyX*⁺ を作製した。
2. $\Delta thyA$ と $\Delta thyX$ はいずれも最小培地で培養された。
3. 対数増殖期における増殖速度は Tokyo 株、 $\Delta thyA$ 、 $\Delta thyX$ 、Tokyo/*thyA*⁺ および Tokyo/*thyX*⁺ のいずれの株間においても差は認められなかった。
4. Tokyo 株、 $\Delta thyX$ 、および Tokyo/*thyA*⁺ が PAS 感受性を示したのに対して、 $\Delta thyA$ と Tokyo/*thyX*⁺ は PAS 耐性を示した。スルファメトキサゾール（SMX）に対してはいずれの株も感受性を示した。
5. Tokyo/*thyX*⁺ における *thyA* の発現量は親株に比して有意に低下していた。 $\Delta thyA$ と Tokyo/*thyX*⁺ における *thyX* の発現量はともに親株に対して有意に上昇していた。

抗酸菌では *thyX* は必須遺伝子として扱われてきた。しかし、本研究において抗酸菌の *thyX* 欠損株が作製されたことから、*thyX* は必須遺伝子ではなく、また *thyX* の欠損によってチミジル酸とチミンに対する栄養要求を示さないことがわかった。

BCG における *thyX* の過剰発現は PAS 耐性を付与した。野生株では ThyA が主に働き 5,10-methylene-THF からジヒドロ葉酸（DHF）が合成され、DHF は DfrA によってテトラヒドロ葉酸（THF）になる。 $\Delta thyA$ と Tokyo/*thyX*⁺ では *thyX* の発現量が上昇していた。ThyX が主に働くと 5,10-methylene-THF から DHF を介することなく THF に直接循環されるため、DHF の蓄積と THF の枯渇が回避される。このことが $\Delta thyA$ と Tokyo/*thyX*⁺ における PAS 耐性の機序と考えられた。

本論文は、薬剤耐性の新たな機序を明らかにしたものであり、細菌の代謝を理解するうえでも大変意義のあるものと評価できる。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。