

氏名	橋本 和樹
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5941号
学位授与の日付	平成31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	スメグマ菌におけるメチオニン関連遺伝子欠損株作製とその解析
論文審査委員	浅海 淳一 教授      仲野 道代 教授      江國 大輔 准教授

### 学位論文内容の要旨

#### 論文内容の要旨（2000字程度）

結核症はヒト型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) によって生じる感染症である。エイズ、マラリアとともに三大感染症のひとつであり、現在でも対策が求められている重要な感染症のひとつである。結核症の治療は抗結核薬を用いた化学療法が基本となるが、*M. tuberculosis* では他の病原菌と同じく薬剤耐性菌の出現が問題となっており、新規抗結核薬の開発が急務となっている。

その標的のひとつとしてメチオニン合成経路が考えられる。Berney らは *M. tuberculosis* のホモセリン O-スクシニルトランスフェラーゼの遺伝子 *metA* の欠損株を作製し、この欠損株がメチオニン含有培地では生存できず、宿主生体内濃度以上のメチオニン要求性を示し、*de novo* のメチオニン合成が宿主内での本菌の増殖に必須であることを報告した。

メチオニン合成経路の最終段階はビタミン B<sub>12</sub> 依存性メチオニンシンターゼ (MetH) とビタミン B<sub>12</sub> 非依存性メチオニンシンターゼ (MetE) によって触媒され、ホモシステインにメチル基が付加されてメチオニンが合成される。この反応で用いられるメチル基の供与体となる 5-メチルテトラヒドロ葉酸は、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸が還元されて合成される。ヒトを含む多くの生物においてこの反応はメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ (MetF) によって触媒される。そして、MetF が存在しない場合には 5-メチルテトラヒドロ葉酸が合成できず、菌体内でのメチオニン合成が障害される。しかし、*M. tuberculosis* ではゲノム配列上に古典的な MetF が存在しない。このことは、*M. tuberculosis* に古典的な MetF と同じ反応を触媒する他の酵素が存在するか、あるいは未知の酵素反応によってホモシステインに付加されるメチル基が供給されることを示唆する。いずれの場合においてもその存在が明らかになれば、それを標的とすることで新規抗結核薬を開発できる可能性がある。

そこで、本研究では *M. smegmatis* の MetF の遺伝子 *metF* の欠損株作製を試みることで、メチオニン合成経路におけるホモシステインへのメチル基供給において、*M. smegmatis* が *M. tuberculosis* と同じ酵素あるいは代替経路を有している可能性を探り、*M. tuberculosis* に代わるモデルとなりうるかを検討する

ことを目的とした。

まず、枯草菌 *Bacillus subtilis* 由来のレバンサッカラーゼ酵素をコードする *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、*M. smegmatis* のゲノムから *metF*、*MetH* の遺伝子 *metH*、および *MetE* の遺伝子 *metE* を欠失させ、*metF* 欠損株 ( $\Delta metF$ )、*metH* 欠損株 ( $\Delta metH$ ) および *metE* 欠損株 ( $\Delta metE$ ) をそれぞれ作製した。次に  $\Delta metH$  のゲノムから *metE* を欠失させ、*metH* と *metE* の二重欠損株 ( $\Delta metH/\Delta metE$ ) を作製した。さらに大腸菌-抗酸菌用シャトルベクター pNN2 をもとに *metH* 発現用プラスミドを作製し、 $\Delta metH$  に導入することで、*metH* の相補株 ( $\Delta metH/metH^+$ ) を作製した。これらの変異株を最小培地である Sauton 寒天培地に塗布し、増殖の可否ならびに増殖速度を確認した。

$\Delta metF$  は Sauton 寒天培地で増殖し、メチオニン要求性を示さなかった。このことから、*M. smegmatis* において *metF* は必須遺伝子ではないことが明らかとなった。そして、*M. smegmatis* は 5-メチルテトラヒドロ葉酸とは異なるメチル基の供与体を利用する酵素を有しているか、あるいは 5-メチルテトラヒドロ葉酸の合成を触媒する *MetF* 以外の酵素を有している可能性が示された。

$\Delta metH$  と  $\Delta metE$  を Sauton 寒天培地で培養したところいずれも増殖し、*M. smegmatis* の *metH* と *metE* は必須遺伝子でないことが示された。 $\Delta metE$  の増殖速度は親株と変わらなかったが  $\Delta metH$  の増殖速度は顕著に遅くなった。このことから *M. smegmatis* のメチオニン合成経路の最終段階は主に *MetH* によって触媒されていることが示唆された。 $\Delta metH/\Delta metE$  は Sauton 寒天培地では増殖せず、メチオニン要求性を示した。このことから、*M. smegmatis* はメチオニン合成経路において 5-メチルテトラヒドロ葉酸とは異なるメチル基の供与体を利用する酵素を有していないことが示唆された。

*M. smegmatis* はメチオニン合成においてメチル基の供与体として 5-メチルテトラヒドロ葉酸を必要とする一方、ゲノム配列上には *MetF* 以外の 5-メチルテトラヒドロ葉酸の合成を触媒する既知の酵素は存在しなかった。このため、*M. smegmatis* では 5-メチルテトラヒドロ葉酸合成に関して未知の酵素の存在が示唆された。これは古典的な *MetF* が存在しない *M. tuberculosis* と同じ *MetF* に代わる酵素である可能性があり、本研究において作製された  $\Delta metF$  は *M. tuberculosis* におけるシステインへのメチル基供給経路の解析に有用である可能性が示された。

## 論文審査結果の要旨

*Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) は古典的な MetF を有していない。そのため、*Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) を実験モデルとして使用するためには、*metF* の欠損株 ( $\Delta metF$ ) が必要である。そこで本研究では、その欠損株作製を行い、メチオニン合成経路におけるホモシステインへのメチル基供給において、*M. smegmatis* が *M. tuberculosis* と同じ酵素を有している可能性を探り、 $\Delta metF$  が *M. tuberculosis* に代わるモデルとなりうるかを検討したものであった。

### 【材料と方法】

*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 株と *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  株を使用した。まず、枯草菌 *Bacillus subtilis* 由来のレバンサッカラーゼをコードする *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、*M. smegmatis* のゲノムから *metF*、MetH の遺伝子 *metH*、および MetE の遺伝子 *metE* を欠失させ、*metF* 欠損株 ( $\Delta metF$ )、*metH* 欠損株 ( $\Delta metH$ ) および *metE* 欠損株 ( $\Delta metE$ ) をそれぞれ作製した。次に、 $\Delta metH$  のゲノムから *metE* を欠失させ、*metH* と *metE* の二重欠損株 ( $\Delta metH/\Delta metE$ ) を作製した。最後に、大腸菌 - 抗酸菌用シャトルベクター pNN2 をもとに *metH* 発現用プラスミドを作製し、 $\Delta metH$  に電気穿孔法で導入することで *metH* の相補株 ( $\Delta metH/metH^+$ ) を作製した。これらの変異株を最小培地である Sauton 寒天培地に播種し、増殖の可否ならびに増殖速度を確認した。

### 【結果と考察】

$\Delta metF$  は Sauton 寒天培地で増殖し、メチオニン要求性を示さなかった。このことから、*M. smegmatis* において *metF* は必須遺伝子ではないことが明らかとなった。そして、*M. smegmatis* は 5-メチルテトラヒドロ葉酸とは異なるメチル基の供与体を利用する酵素を有しているか、あるいは 5-メチルテトラヒドロ葉酸の合成を触媒する MetF 以外の酵素を有している可能性が示された。 $\Delta metH$  と  $\Delta metE$  を Sauton 寒天培地で培養したところいずれも増殖し、*M. smegmatis* の *metH* と *metE* は必須遺伝子でないことが示された。 $\Delta metH/\Delta metE$  は Sauton 寒天培地では増殖せず、メチオニン要求性を示した。このことから、*M. smegmatis* はメチオニン合成経路において 5-メチルテトラヒドロ葉酸とは異なるメチル基の供与体を利用する酵素を有していないことが示唆された。*M. smegmatis* はメチオニン合成におけるメチル基の供与体として 5-メチルテトラヒドロ葉酸を必要とする一方、ゲノム配列上には MetF 以外の 5-メチルテトラヒドロ葉酸の合成を触媒する既知の酵素は存在しなかった。このため、*M. smegmatis* では 5-メチルテトラヒドロ葉酸合成に関して未知の酵素の存在が示唆された。これは古典的な MetF が存在しない *M. tuberculosis* と同じ MetF に代わる酵素である可能性があり、本研究において作製された  $\Delta metF$  は *M. tuberculosis* におけるシステインへのメチル基供給経路の解析に有用である可能性が示された。

本論文は、 $\Delta metF$  が *M. tuberculosis* に代わるモデルとして有用である可能性を示すものであった。本研究によって得られた知見は、新規抗結核薬の開発の一助となることが期待される。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。