

非結核性抗酸菌の遺伝子解析における
pYT プラスミド使用の検討

野崎 高儀

緒言

非結核性抗酸菌（non-tuberculosis mycobacteria; NTM）^{1, 2)}は、抗酸菌（mycobacteria、マイコバクテリア）の中で、結核症の起因菌である結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* とハンセン病の起因菌であるらい菌 *Mycobacterium leprae* 以外の菌種の総称で、現在 190 種類以上の菌種が確認されており、その数は年々増加している。NTM はその増殖速度から、孤立集落を形成するように希釈された新鮮菌液を卵培地に接種した場合に、肉眼的集落発生までに 1 週以上を要する遅発育抗酸菌（slowly growing mycobacteria）と、25℃および 37℃で 1 週以内に肉眼的集落の観察可能な迅速発育抗酸菌（rapidly growing mycobacteria）に分類される。NTM は環境菌として土壌、水系、および動物などの自然環境に加えて、上水道、浴室、シャワーヘッド、農地、庭などの土壌、およびハウスダストなどの生活環境に広く生息している³⁻⁷⁾。本邦ではこれまでに 30 種類以上の抗酸菌種による感染症が報告されている⁸⁾。特に臨床的に問題となる原因菌種は限られており、*Mycobacterium avium*、*Mycobacterium intracellulare*、*Mycobacterium kansasii*、および *Mycobacterium abscessus* complex の 4 菌種が大部分を占める^{9, 10)}。このうち *M. avium* と *M. intracellulare* は性状が類似しているため、併せて *Mycobacterium avium* complex (MAC) と呼ばれる。*M. avium* には subsp. *avium*、

subsp. paratuberculosis、*subsp. silvaticum*、および *subsp. hominissuis* の 4 亜種が報告されており、ヒトからは主に *M. avium subsp. hominissuis* が分離される。また *M. abscessus* は *subsp. abscessus*、*subsp. bolletii*、および *subsp. massiliense* の 3 亜種に分類される。*M. abscessus subsp. massiliense* はマクロライド療法に反応が良好であるのに対して、前二者は反応が乏しいため、これらの亜種同定は重要である。

NTM 症の多くは呼吸器に発症する肺 NTM 症である。NTM 症はヒト-ヒト感染により伝播される結核菌とは異なり、基本的にヒト-ヒト感染はない。そのため、感染症法に基づく届け出対象疾患ではなく、患者登録制度も整備されていないため、正確な患者数をはじめとする疫学情報を把握することが困難な疾患である。2014 年に日本医療研究開発機構（AMED）の研究班（研究代表者、阿戸学）による調査が行われ、肺 NTM 症の罹患率は 14.7（対人口 10 万人）と報告され、菌陽性結核の罹患率（人口 10 万対 10.7）を超えていることが示された⁹⁾。起病菌には地域性があり、東日本では *M. avium* が多く、四国以西では *M. intracellulare* が多い^{9,10)}。また、*M. kansasii* は近畿で多く、*M. abscessus complex* は九州・沖縄に多いことが併せて報告されている。

多くの場合、NTM の侵入門戸は口腔・鼻腔と皮膚である。健常人の口腔常在菌層にも含まれ¹¹⁾、頭頸部ではリンパ節炎を引き起こすことが多い¹²⁻¹⁶⁾。とこ

ろで、NTMは水環境を好むことと関連し、歯科診療ユニットの水路から検出されている¹⁷⁻²⁰⁾。小児歯科診療室で*M. abscessus*感染症が集団派生した事例も報告されている²¹⁾。このようにNTMは歯科領域においても無視のできない病原体である。

結核菌の病原性因子が多く研究されてきたことに対して、NTMの病原性に関しては不明な点が多い。また、NTMは抗結核薬の多くに耐性を示すことが多く、薬物療法に難渋する症例も散見されるが、薬剤に耐性を示す機構にも不明な点が多い。これらを明らかにするためには遺伝学的解析によるアプローチも必要である。遺伝学的解析に汎用されている遺伝要素のひとつにプラスミドがあり、これまでに多くの病原細菌の研究に用いられている。結核菌とらい菌ではこれまでにプラスミドは見つかっていないが、NTMでは多くのプラスミドが見つかっている。*M. avium*由来のプラスミド pLR7²²⁾と pMAV22²³⁾、*Mycobacterium fortuitum*由来の pAL5000²⁴⁾、 pJAZ38²⁵⁾、および pMF1²⁶⁾、そして *Mycobacterium ulcerans* の pMUM001²⁷⁾が代表的なものである。現在、抗酸菌の研究では pAL5000 を骨格に構築されたものが汎用されている。NTMの研究において pAL5000 から派生したプラスミドは、*M. abscessus*^{28, 29)}、*M. avium*²³⁾、*M. intracellulare*³⁰⁾、*Mycobacterium chelonae*²⁸⁾、*Mycobacterium terrae*²⁸⁾、*M. kansasii*³¹⁾、*Mycobacterium smegmatis*³²⁾、*Mycobacterium marinum*³³⁾、および *Mycobacterium yongonense*³⁴⁾など

の菌種で応用されている。しかし、pAL5000 以外のプラスミドを応用した例はこれまでに乏しい。Goto らは *Mycobacterium scrofulaceum* 由来の pMSC262³⁵⁾ と大腸菌用プラスミド pACYC177³⁶⁾ を元に pYT937 を構築し、*Mycobacterium bovis* bacille de Calmette et Guérin (BCG) で複製されることを報告している³⁷⁾。その後 Qin らは、pYT937 は BCG に加えて *Mycobacterium phlei*、と *M. fortuitum* で複製されるが *M. smegmatis* では複製されないことを報告している³⁸⁾。興味深いことに同じ報告の中で、pYT937 よりも広い領域の pMSC262 由来断片を含む pYT923 では *M. smegmatis* の中での J15CS 株は複製されるが、同じ *M. smegmatis* でも mc²155 株では複製されないことが示されている³⁸⁾。さらに pMSC262 は BCG において、pAL5000 から派生した pYUB75 と不和合性を示さないことも報告されている³⁸⁾。

本研究では、多くの NTM 菌種において pAL5000 を骨格としたプラスミドとともに使用可能な、汎用性のあるプラスミドの作製を目的とし、pYT937 に含まれる pMSC262 由来断片を骨格とした新規プラスミドを作製し、臨床において分離頻度の高い *M. abscessus* と *M. avium* への導入を試みた。

材料ならびに方法

1. 供試菌株と培養条件

供試菌株として、*M. abscessus* subsp. *abscessus* の標準株 ATCC 19977 株と、臨床分離株である 38 株および 39 株を使用した。また *M. avium* subsp. *hominissuis* の標準株 104 株と、臨床分離株 545 株および 552 株を使用した。臨床分離株は独立行政法人国立病院機構近畿中央呼吸器センター吉田志緒美博士より恵与された。本研究で使用した菌株とプラスミドを表 1 に示した。

大腸菌 *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α 株の培養には Luria-Bertani (LB) 液体培地 (ナカライテスク、京都、日本) と LB 寒天培地を使用した。なお必要に応じて培地には、カナマイシン (Km) {終濃度 : 20 μ g/mL (Meiji Seika ファルマ、東京、日本)} とカルベニシリン {終濃度 : 50 μ g/mL (ナカライテスク)} を添加した。

M. abscessus と *M. avium* の培養には、10% ADC {アルブミン 50 g/L (富士フイルム和光純薬、大阪、日本)・デキストロース 20 g/L (ナカライテスク)・カタラーゼ 40 mg/L (Sigma-Aldrich、MO、USA)、pH7.9} と Tween80 {終濃度 : 0.05%、(Becton Dickinson、NJ、USA)} を添加した Middlebrook 7H9 液体培地 (Becton Dickinson) (7H9-ADC-Tween80 液体培地) および 10% ADC を添加した Middlebrook 7H10 寒天培地 (Becton Dickinson) (7H10-ADC 寒天培地) を使用した。なお必要に応じて培地には、ゼオシン {Zeo、(Invitrogen、CA、USA)}、ハイグロマイシン (Hyg、富士フイルム和光純薬)、および Km を添加した。

2. 選択薬剤の検討

M. abscessus と *M. avium* を 7H9-ADC-Tween80 液体培地を用いて 37°C で振盪しながら培養した。培養開始から 24 時間後に培養物の濁度を濁度計 (CO8000 Biowave, Biochrom, England) を用いて測定した後、培養物を 7H9-ADC-Tween80 液体培地で希釈し、OD₆₀₀=1.0 に調整した。調整した菌液を同じ培地を用いて 10 倍希釈を繰り返すことにより、OD₆₀₀=1.0×10⁻³ の菌液を得た。希釈した菌液 100 μL を各濃度の抗菌薬 (Km : 20 μg/mL、50 μg/mL、あるいは 100 μg/mL、Hyg : 100 μg/mL または 200 μg/mL、Zeo : 10 μg/mL または 20 μg/mL) を含有する 7H10-ADC 寒天培地に播種し、37°C で培養した。*M. abscessus* は 5 日後に、また、*M. avium* は 14 日後に増殖の有無を判定した。対照として抗菌薬を含有しない 7H10-ADC 寒天培地を用いた。

3. 遺伝子操作

特別な記載がない限り遺伝子操作は分子生物学実験で使用される通法に従った。なお、本研究で使用したプライマーを表 2 に示した。

4. プラスミドの構築

本研究で用いたプラスミドの作製の概略を図 1 に示す。

Hyg 耐性遺伝子 (*Hyg^r*) はプライマー-HygNde と HygPst を用いて、また Zeo 耐性遺伝子 (*Zeo^r*) はプライマー-ZeoNde と ZeoPst を用いて、それぞれの Open Reading Frame (ORF) を PCR 法で増幅した。得られた PCR 産物を *NdeI* と *PstI* で消化し、pNPP³⁹⁾ の同じ制限酵素サイトに挿入することにより、pNPP-Hyg と

pNPP-Zeo を構築した (図 1A)。

EGFP 遺伝子 (*egfp*) はプライマー-EGFPNde と EGFPst を用いて、また DsRed 遺伝子 (*ds-red*) はプライマー-DsRedNde と DsRedPac を用いて、それぞれの ORF を PCR 法で増幅した。そして *egfp* の PCR 産物は *NdeI* と *PstI* で消化し、また *ds-red* の PCR 産物は *NdeI* と *PacI* で消化し、それぞれ pNPP の同じ制限酵素サイトに挿入することにより pNPP-EGFP と pNPP-DsRed を構築した (図 1B)。

大腸菌-抗酸菌シャトルベクターを構築するため、はじめに pYT937 を *Pst I* と *Hind III* で消化し、抗酸菌内で機能する複製起点 *oriM* を含む 2.3 kb の断片を得た。得られた断片を大腸菌用クローニングベクター-pBlueScript II SK (-) の同じ制限酵素サイトに挿入することにより pYTSK を得た (図 1C)。次に pYTSK を *SpeI* で消化後、ウシ小腸由来アルカリホスファターゼ {Alkaline Phosphatase (Calf intestine, CIAP)} を用いて脱リン酸化処理を行い、pNPP-Hyg あるいは pNPP-Zeo を *XbaI* で消化することにより得られた *Hyg^r* 発現カセットあるいは *Zeo^r* 発現カセットを挿入することで pYT-Hyg および pYT-Zeo を得た。さらに pYT-Hyg と pYT-Zeo を *XbaI* で消化後、CIAP を用いて脱リン酸化処理を行い、pNPP-DsRed を *XbaI* で消化することにより得られた DsRed 発現カセットを挿入することで pYT-HygDsRed と pYT-ZeoDsRed を得た (図 1C)。

pAL5000 の複製起点を含み、EGFP を発現する大腸菌-抗酸菌シャトルベクター-pNN2-EGFP は、pNPP-EGFP を *XbaI* で消化して得られた *egfp* 発現カセットを、*XbaI* で消化後に CIAP を用いて脱リン酸化処理を行った pNN2²⁸) に挿入することで得た (図 1D)。

5. 抗酸菌へのプラスミドの導入

M. abscessus と *M. avium* へのプラスミドの導入は電気穿孔法により行った。*M. abscessus* と *M. avium* を 7H10-ADC 寒天培地上で培養後、7H9-ADC-Tween80 液体培地を用いて 37°C、24 時間の振盪培養を行った。培養後、室温下 500 rpm、10 分間の条件で遠心分離を行い、菌塊を形成した菌を除去して菌液とした。この菌液の濁度を OD₆₀₀=0.1 に調整後、再度 37°C で振盪培養を行った。24 時間後に 3,000 rpm、4°C、10 分間の条件で遠心分離を行い、集菌した。上清を除去したのち、エレクトロポレーションバッファー {72 mM mannitol、2 mM sodium-phosphate buffer (pH 7.1)、0.05 % Tween 80 (EP バッファー)} で菌を懸濁した。再度同じ条件で遠心分離を行い、上清を除去したのち、EP バッファーを用いて濁度を OD₆₀₀=1.0 (1.0×10⁸ CFU/mL) に調整した。この菌液 100 μL と 1 μg/μL 濃度のプラスミド 5 μL を混合後、氷上に 30 分静置した。静置後、1.0 mm gap キュベット (ネッパジーン、千葉、日本) に全量を入れ、ECM399 (BTX、MA、USA) を用いて電界強度 1.7 kV/mm の電気パルスを与えた。再度、氷上で 60 分静置後に 7H9-ADC-Tween80 液体培地を 100 μL 加え、37°C で回復培養を行った。*M. abscessus* は 6 時間後、*M. avium* は 24 時間後に抗菌薬含有 7H10-ADC 寒天培地に播種し、37°C で培養を行った。使用した抗菌薬の濃度は、Km は *M. abscessus* ATCC 19977 株に対しては 50 μg/mL、38 株と 39 株には 100 μg/mL、*M. avium* 104 株には 20 μg/mL、545 株と 552 株には 100 μg/mL とした。Zeo は *M. abscessus* の 3 株に対して 20 μg/mL とした。そして、Hyg は *M. avium* 104 株には 100 μg/mL、

545 株と 552 株は 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした (図 2)。

プラスミド導入実験は各 3 回行い、その平均値を転換効率とした。

6. 集落の観察

集落の観察は、蛍光顕微鏡 (BX51 OLYMPUS、東京、日本) を用いて行った。可視光および波長 510 nm と 575 nm の蛍光で観察した。

結果

1. 選択薬剤の検討

プラスミド保持菌の選択に使用する抗菌薬を決めるために、供試菌株の Km、Hyg、および Zeo に対する感受性を調べた。結果を図 2 に示す。*M. abscessus* は Km に対して、ATCC 19977 株では 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、38 株と 39 株では 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で集落は形成しなかった。Hyg に対しては 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でも集落を形成した。そして、Zeo に対しては 3 株ともに 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で集落は形成しなかった。*M. avium* は Km に対して、104 株では 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、545 株では 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、そして 552 株では 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で集落は形成しなかった。Hyg に対しては、104 株では 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、545 株と 552 株では 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で集落は形成しなかった。また、Zeo では 3 株ともに 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で集落は形成しなかった。

これらの結果をもとに、*M. abscessus* におけるプラスミド保持の選択には Km と Zeo を使用し、*M. avium* において Km と Hyg を使用することにした。なお、培地に添加する抗菌薬の濃度は、材料および方法の項に示した濃度を使用した。

2. 大腸菌－抗酸菌シャトルベクターの構築

材料および方法の項に示したとおりに蛍光タンパク質を発現する 3 種類の大腸菌－抗酸菌シャトルベクター、pYT-ZeoDsRed、pYT-HygDsRed、および pNN2-EGFP を構築した。構築途上に作製された、*egfp* と *ds-red* がサブクローニングされた pNPP の派生プラスミドである pNPP-EGFP と pNPP-DsRed を保持した大腸菌は、それぞれ緑色蛍光と赤色蛍光を発色していた。さらに最終構築物である pNN2-EGFP は緑色蛍光を発色し、pYT-ZeoDsRed と pYT-HygDsRed は赤色蛍光を発色していた (図 3)。これらのことから、蛍光タンパク質遺伝子の発現のための構築は正しく行われたことが示された。

3. 抗酸菌への大腸菌－抗酸菌シャトルベクターの導入

M. abscessus 標準株 ATCC19977 株と臨床分離株である 38 株と 39 株に pNN2-EGFP を電気穿孔法で導入したところ、緑色蛍光を発色した集落がみられた (図 4A)。菌数 1.0×10^7 CFU を使用した際のプラスミド 1 μ g あたりの転換効率は、ATCC19977 株、38 株、および 39 株それぞれ $3.81 \times 10 \pm 1.19 \times 10$ 、 5.24 ± 2.41 、および 6.38 ± 3.22 であった (表 3)。同様にこれら 3 株に pYT-ZeoDsRed を導入したところ、赤色蛍光を発色した集落がみられた (図 4B)。転換効率は、ATCC19977 株、38 株、および 39 株それぞれ $1.18 \times 10^3 \pm 3.44 \times 10$ 、 6.84 ± 1.42 、および $1.03 \times 10 \pm 1.95$ であった。次に *M. avium* 標準株 104 株と臨床分離株である 545 株と 552 株に pNN2-EGFP を導入したところ、緑色蛍光を発色した集落がみられた (図 5A)。

菌数 1.0×10^7 CFU を使用した際のプラスミド $1 \mu\text{g}$ あたりの転換効率は、104 株、545 株、および 552 株それぞれ $3.08 \times 10^2 \pm 2.03 \times 10$ 、 7.63 ± 0.93 、および $3.26 \times 10 \pm 1.04 \times 10$ であった。同様にこれら 3 株に pYT-HygDsRed を導入したところ、赤色蛍光を発色した集落がみられた (図 5B)。転換効率は、104 株、545 株、および 552 株それぞれ 7.62 ± 2.86 、 4.18 ± 1.60 、および $5.51 \times 10 \pm 1.37 \times 10$ であった。

4. プラスミドの不和合性

M. abscessus と *M. avium* における pMSC262 を骨格としたプラスミドと pAL5000 を骨格としたプラスミドの不和合性を検討した。このため、pYT-ZeoDsRed を保持する *M. abscessus* 株に pNN2-EGFP を導入したところ、標準株と臨床分離株 2 株のいずれにおいても緑色蛍光と赤色蛍光を同時に発色する株を得た (図 6A)。また pYT-HygDsRed を保持する株に pNN2-EGFP を導入したところ、*M. avium* 標準株と臨床分離株 2 株のいずれにおいても緑色蛍光と赤色蛍光を同時に発色する株を得た (図 6B)。以上のことから、pMSC262 を骨格としたプラスミドと pAL5000 を骨格としたプラスミドは *M. abscessus* と *M. avium* において不和合性を示さないことが示された。

考察

本研究で pMSC262 を骨格とした pYT-ZeoDsRed と pYT-HygDsRed は、*M. abscessus* 標準株と臨床分離株、および *M. avium* 標準株と臨床分離株それぞれの中で複製すること、またこれらの菌株において pAL5000 を骨格とした pNN2-

EGFP と共存し、不和合性を表さないことが示された。pAL5000 を骨格としたプラスミドが *M. abscessus* と *M. avium* で機能することはこれまでも報告されているが、pMSC262 を骨格としたプラスミドがこれらの菌種で機能することは、我々の知る限り、今回が初めての報告である。

pMSC262 の複製起点の領域の塩基配列は Qin らによって決定され^{38,41)}、その後、この領域を含むプラスミド pYT923hyg の全塩基配列が同じグループによって決定されている^{42, 43)}。この中で 1,546 bp を複製に必要な最小領域としている³⁸⁾。彼らはこの領域に ORF1 から ORF5 までの 5 つの ORF を見出しているが、特に ORF2 は複製に必須の遺伝子としている³⁸⁾。

本研究では pMSC262 を骨格としたプラスミドと pAL5000 を骨格としたプラスミドを使用した。いずれも菌種により複製に必要な領域が異なることが報告されている。pYT923 では BCG、*M. smegmatis* J15CS 株、および *M. smegmatis* mc²155 株の 3 株間で、pAL5000 は *M. fortuitum* と *M. smegmatis* で異なる^{38, 44)}。このことは、プラスミドが保持される宿主であっても、導入する領域が複製に必要な領域であるかは各菌種で試みる必要がある。今回使用した pMSC262 の部分は pYT937 に用いられた領域で、BCG、*M. phlei*、および *M. fortuitum*、では複製されるが *M. smegmatis* では複製されない領域である³⁸⁾。本研究の結果、pMSC262 を骨格としたプラスミドは *M. abscessus* と *M. avium* においても複製可能であることが明らかとなった。他の NTM についても今後試行する必要がある。

プラスミド保持菌の選択マーカーには薬剤耐性遺伝子が使用されることが多い。抗酸菌では Km 耐性遺伝子 (*Km^r*) と *Hyg^r* が汎用される。次いでゲンタマイ

シン耐性遺伝子が使用されるが、ゲンタマイシン耐性遺伝子の選択性は前 2 者と比較すると低い。Raghunand らは *Zeo^r* が有効であるとしているが⁴⁵⁾、その後の報告はほとんどない。今回の供試菌株において Km、Hyg、および Zeo の感受性を調べたところ、*M. abscessus* の 3 株はいずれも高濃度の Hyg に対して耐性を示したものの、Km は 100 µg/mL で、また Zeo は 20 µg/mL で増殖しなかった。このことから *M. abscessus* 用の選択マーカーとしては *Km^r* と *Zeo^r* が使用可能と推測され、実証された。一方、*M. avium* では供試した 3 株とも Km は 100 µg/mL で、Hyg は 200 µg/mL で、また Zeo は 20 µg/mL で増殖しなかった。このことから *M. avium* 用の選択マーカーとしては *Km^r*、*Hyg^r*、および *Zeo^r* のいずれもが使用可能と推測された。費用の観点から *Km^r* と *Hyg^r* を使用したところ、両者は有効であることが示された。

Qin らは、pMSC262 の複製起点を持つプラスミドと pAL5000 の複製起点を持つプラスミドは、BCG において不和合性を示さないことを報告している³⁸⁾。しかし、他の抗酸菌では報告が無く、本研究で NTM の中で起因菌としての検出頻度の高い *M. abscessus* と *M. avium* で実験的に確認されたことは、解明が進んでいない両菌の病原因子を遺伝学的に解析していくうえで、大きな意味を持つものと考えられる。

本研究ではプラスミド保持菌はすべて抗生物質含有培地で増殖された。しかし、形質転換された菌株を感染実験などに応用する場合には、抗生物質が存在しない状況であることが一般的である。抗生物質が存在しない場合、プラスミドが脱落する可能性がある。今後の課題として、抗生物質非存在下においてプラスミ

ドが維持されるか、すなわち、プラスミド脱落率を計測する必要がある。

結論

pYT プラスミドは pAL5000 プラスミドとともに、NTM の遺伝子解析に有用なプラスミドであることが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御高閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔微生物学分野大原直也教授に深甚なる謝意を表します。また様々な面にわたり貴重な御助言と御協力を下さいました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科鳥井康弘教授に心より感謝いたします。そして、pYT937の使用をご快諾いただきました宮崎大学後藤義孝特別教授と恵与いただきました産業医科大学谷口初美名誉教授に深甚なる謝意を表します。さらに臨床分離株を恵与いただきました独立行政法人国立病院機構近畿中央呼吸器センター吉田志緒美博士に深甚なる謝意を表します。最後に本研究を行うに当たり、貴重な御援助と御助言をいただきました口腔微生物学分野、総合歯科学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 斎藤肇 : “非定型” 抗酸菌. *結核*, **63**, 667-676, 1988.
- 2) Wolinsky, E.: Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **119**, 107-159, 1979.
- 3) Covert, T.C., Rodgers, M.R., Reyes, A.L., Stelma, G.N.Jr.: Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2492-2496, 1999.
- 4) Falkinham, J.O.3rd.: Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin. Chest. Med.* **23**, 529-551, 23, 2002.
- 5) Nishiuchi, Y., Maekura, R., Kitada, S., Tamaru, A., Taguri, T., Kira, Y., Hiraga, T., Hirotsu, A., Yoshimura, K., Miki M, Ito M.: The recovery of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) from the residential bathrooms of patients with pulmonary MAC. *Clin. Infect. Dis.*, **45**, 347-351, 2007.
- 6) Nishiuchi, Y., Iwamoto, T., Maruyama, F.: Infection sources of a common nontuberculous mycobacterial pathogen, *Mycobacterium avium* complex. *Front Med (Lausanne)*. **4**, 27, 2017.
- 7) Arikawa, K., Ichijo, T., Nakajima, S., Nishiuchi, Y., Yano, H., Tamaru, A., Yoshida, S., Maruyama, F., Ota, A., Nasu, M., Starkova, D.A., Mokrousov, I., Narvskaya, O.V., Iwamoto, T.: Genetic relatedness of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from bathrooms of healthy volunteers, rivers, and soils in Japan with human clinical isolates from different geographical areas. *Infect. Genet. Evol.* **74**, 103923, 2019.
- 8) 斎藤肇, 岩本朋忠 : 定義・分類. 非結核性抗酸菌の基礎と臨床. 斎藤肇監修、医薬ジャーナル社, pp30-40, 2015,

- 9) Namkoong, H., Kurashima, A., Morimoto, K., Hoshino, Y., Hasegawa, N., Ato, M., Mitarai, S.: Epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Japan. *Emerg. Infect. Dis.*, **22**, 1116-1117, 2016.
- 10) Morimoto, K., Hasegawa, N., Izumi, K., Namkoong, H., Uchimura, K., Yoshiyama, T., Hoshino, Y., Kurashima, A., Sokunaga, J., Shibuya, S., Shimojima, M., Ato, M., Mitarai, S.: A Laboratory-based analysis of nontuberculous mycobacterial lung disease in Japan from 2012 to 2013. *Ann. Am. Thorac. Soc.*, **14**, 49-56, 2017.
- 11) Macovei, L., McCafferty, J., Chen, T., Teles, F., Hasturk, H., Paster, B.J., Campos-Neto, A.: The hidden 'mycobacteriome' of the human healthy oral cavity and upper respiratory tract. *J. Oral Microbiol.*, **7**, 26094, 2015.
- 12) Lindeboom, J.A., Prins, J.M., Bruijnesteijn van Coppenraet, E.S., Lindeboom, .R, Kuijper, E.J.: Cervicofacial lymphadenitis in children caused by *Mycobacterium haemophilum*. *Clin. Infect. Dis.*, **41**, 1569-1575, 2005.
- 13) Lindeboom, J.A., Kuijper, E.J., Prins, J.M., Bruijnesteijn van Coppenraet, E.S., Lindeboom, R.: Tuberculin skin testing is useful in the screening for nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children. *Clin. Infect. Dis.*, **43**, 1547-1551, 2006.
- 14) Lindeboom, J.A.: Surgical treatment for nontuberculous mycobacterial (NTM) cervicofacial lymphadenitis in children. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **70**, 345-348, 2012
- 15) Moe, J., Rajan, R., Caltharp, S., Abramowicz, S.: Diagnosis and management of children with *Mycobacterium abscessus* infections in the head and neck. *J. Oral Maxillofac.*, **76**, 1902-1911, 2018.
- 16) Willemse, S.H., Oomens, M.A.E.M., De Lange, J., Karssemakers, L.H.E.:

Diagnosing nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children: A systematic review. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, **112**, 48-54, 2018.

17) Walker, J.T., Bradshaw, D.J., Bennett, A.M., Fulford, M.R., Martin, M.V., Marsh, P.D.: Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 3363-3367, 2000.

18) Porteous, N.B., Redding, S.W., Jorgensen, J.H.: Isolation of non-tuberculosis mycobacteria in treated dental unit waterlines. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.*, **98**, 40-44, 2004.

19) Walker, J.T., Bradshaw, D.J., Finney, M., Fulford, M.R., Frandsen, E., ØStergaard, E., Ten Cate, J.M., Moorer, W.R., Schel, A.J., Mavridou, A., Kamma, J.J., Mandilara, G., Stösser, L., Kneist, S., Araujo, R., Contreras, N., Goroncy-Bermes, P., O'Mullane, D., Burke, F., Forde, A., O'Sullivan, M., Marsh, P.D.: Microbiological evaluation of dental unit water systems in general dental practice in Europe. *Eur. J. Oral. Sci.*, 2004 Oct;**112**, 412-418, 2004.

20) Dutil, S., Veillette, M., Mériaux, A., Lazure, L., Barbeau, J., Duchaine, C.: Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment: low exposure despite dental unit contamination. *Environ. Microbiol.*, **9**, 2836-2843, 2007.

21) Peralta, G., Tobin-D'Angelo, M., Parham, A., Edison, L., Lorentzson, L., Smith, C., Drenzek, C.: Notes from the field: *Mycobacterium abscessus* infections among patients of a pediatric dentistry Practice - Georgia, 2015. *MMWR*, **65**, 355-356, 2016.

22) Beggs, M. L., Crawford, J. T., and Eisenach, K. D.: Isolation and sequencing of the replication region of *Mycobacterium avium* plasmid pLR7. *J. Bacteriol.* **177**, 17, 4836-4840, 1995.

- 23) Sritharan, V., Iralu, J. V., and Barker, R. H. Jr.: Specificity of diagnostic PCR amplification for *M. avium* using the probe pMAV22. *Mol. Cell Probes.*, **9**, 1, 71-74, 1995.
- 24) Rauzier, J., Moniz-Pereira, J., and Gicquel-Sanzey, B.: Complete nucleotide sequence of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*. *Gene*, **71**, 2, 315-321, 1988.
- 25) Gavigan, J. A., Aínsa, J. A., Pérez, E., Otal, I., and Martín, C.: Isolation by genetic labeling of a new mycobacterial plasmid, pJAZ38, from *Mycobacterium fortuitum*. *J. Bacteriol.*, **179**, 13, 4115-4122, 1997.
- 26) Bachrach, G., Colston, M. J., Bercovier, H., Bar-Nir, D., Anderson, C., and Papavinasasundaram, K. G.: A new single-copy mycobacterial plasmid, pMF1, from *Mycobacterium fortuitum* which is compatible with the pAL5000 replicon. *Microbiology*, **146**, 2, 297-303, 2000.
- 27) Stinear, T.P, Mve-Obiang, A., Small, P.L., Frigui, W., Pryor, M.J., Brosch, R., Jenkin, G.A., Johnson, P.D., Davies, J.K., Lee, R.E., Adusumilli, S., Garnier, T., Haydock, S.F., Leadlay, P.F., Cole, S.T.: Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 1345-1349, 2004.
- 28) Cortesia, C., Bello, T., Lopez, G., Franzblau, S., de Waard, J., Takiff, H.: Use of green fluorescent protein labeled non-tuberculous mycobacteria to evaluate the activity quaternary ammonium compound disinfectants and antibiotics. *Braz. J. Microbiol.*, **48**, 151-158, 2017.
- 29) Viljoen, A., Gutiérrez, A.V., Dupont, C., Ghigo, E., Kremer, L.: A simple and rapid gene disruption strategy in *Mycobacterium abscessus*: on the design and application of glycopeptidolipid mutants. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **8**, 69, 2018.

- 30) Marklund, B.I., Speert, D.P., Stokes, R.W.: Gene replacement through homologous recombination in *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.*, **177**, 21, 6100-6105, 1995.
- 31) Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., Terasaka, K., Yamada, T.: Cloning and expression of the gene for the cross-reactive alpha antigen of *Mycobacterium kansasii*. *Infect. Immun.*, **58**, 550-556, 1990.
- 32) Stolt, P., Stoker, N.G.: Functional definition of regions necessary for replication and incompatibility in the *Mycobacterium fortuitum* plasmid pAL5000. *Microbiology*, **142**, 2795-2802, 1996.
- 33) El-Etr, S.H., Subbian, S., Cirillo, S.L., and Cirillo, J.D.: Identification of two *Mycobacterium marinum* loci that affect interactions with macrophages. *Infect. Immun.*, **72**, 6902-6913, 2004.
- 34) Lee, H., Kim, B.J., Kim, B.R., Kook, Y.H., Kim, B.J.: The development of a novel *Mycobacterium-Escherichia coli* shuttle vector system using pMyong2, a linear plasmid from *Mycobacterium yongonense* DSM 45126^T. *PLoS One*, **10**, 3, 2015.
- 35) Meissner, P.S., Falkinham, J.O.3rd.: Plasmid-encoded mercuric reductase in *Mycobacterium scrofulaceum*. *J. Bacteriol.*, **157**, 669-672, 1984.
- 36) Chang, A.C.Y., Cohen, S.N.: Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.*, **134**, 1141-1156, 1978.
- 37) Goto, Y., Taniguchi, H., Udou, T., Mizuguchi, Y., and Tokunaga, T.: Development of a new host vector system in mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **67**, 3, 277-282, 1991.
- 38) Qin, M., Taniguchi, H., Mizuguchi, Y.: Analysis of the replication region of a

mycobacterial plasmid, pMSC262. *J. Bacteriol.*, **176**, 419-425, 1994.

39) Fujiwara, N., Ohara, N., Ogawa, M., Maeda, S., Naka, T., Taniguchi, H., Yamamoto, S., and Ayata, M.: Glycopeptidolipid of *Mycobacterium smegmatis* J15cs Affects Morphology and Survival in Host Cells. *PLoS ONE*, **10**, 5, 2015.

40) Ohara, N., Nishiyama, T., Ohara-Wada, N., Matsumoto, S., Matsuo, T., Yamada, T.: Characterization of the transcriptional initiation regions of genes for the major secreted protein antigens 85C and MPB51 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Microb Pathog.*, **23**, 303-310, 1997.

41) Mizuguchi, Y., Taniguchi, H., Udo, T., Goto, Y., Tokunaga, T.: A part of DNA sequence of *Mycobacterium scrofulaceum* plasmid. GenBank: E04132.1., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/E04132.1>.

42) Nomoto, M., Ogawa, M., Fukuda, K., Miyamoto, H., Taniguchi, H.: A host-vector system for molecular study of the intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in phagocytic cells. *Microbiol. Immunol.* **53**, 550-558, 2009.

43) Fukuda, K., Taniguchi, H.: Cloning vector pYT923hyg DNA, complete sequence. GenBank: AB513495.1., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB513495.1>.

44) Villar, C.A., Benitez, J.: Functional analysis of pAL5000 plasmid in *Mycobacterium fortuitum*. *Plasmid*, **28**, 166-169, 1992.

45) Raghunand, T.R., Bishai, W.R., Chen, P.: Towards establishing a method to screen for inhibitors of essential genes in mycobacteria: evaluation of the acetamidase promoter. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **28**, 36-41. 2006.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻 長寿・社会医学
学講座 総合歯科学分野

(指導 鳥井 康弘教授)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻 国際環境科学講
座 口腔微生物学分野

(委託 大原 直也教授)

要旨の一部は以下の学会に於いて発表した。

第 92 回日本細菌学会総会 (2019 年 4 月 北海道)

第 94 回日本結核病学会 (2019 年 6 月 大分)

図の説明

図1 蛍光タンパク質発現プラスミドの作製

A. Hyg (Zeo) 耐性遺伝子発現カセットは, *NdeI* と *PstI* サイトを付与したプライマーを用いた PCR 法で増殖した Hyg (Zeo) 耐性遺伝子 ORF を *NdeI* と *PstI* で消化したのち、プロモーターとターミネーターを有する pNPP プラスミドの同じ制限酵素サイトに挿入することで構築した。B. EGFP (DsRed) 遺伝子発現カセットは同様に, *NdeI* と *PstI* (DsRed 遺伝子では *NdeI* と *PacI*) サイトを付与したプライマーを用いた PCR 法で増殖した EGFP (DsRed) 遺伝子 ORF を *NdeI* と *PstI* (*NdeI* と *PacI*) で消化したのち、pNPP の同じ制限酵素サイトに挿入することで構築した。C. pYT937 の複製起点を含む *Pst I* -*HindIII* 2.3 kb を pBlueScript II SK(-)の同じ制限酵素サイトに挿入することで pYTSK を構築した。次に A で作製した pNPP-Hyg (pNPP-Zeo) を *XbaI* で消化して得られた Hyg (Zeo) 耐性遺伝子カセットを、*SpeI* で消化した pYTSK をライゲーションすることで pYT-Hyg (pYT-Zeo) を構築した。さらに pYT-Hyg (pYT-Zeo) の *XbaI* サイトに、B で作製した pNPP-DsRed を *XbaI* で消化することで得られた挿入することで pYT-HygDsRed (pYT-ZeoDsRed) を構築した。D. EGFP 発現プラスミド pNN2-EGFP は、B で作製した pNPP-EGFP の EGFP 遺伝子発現カセットを含む *XbaI* 断片を pNN2 の *XbaI* サイトに挿入することで構築した。

図2 選択薬剤の検討

OD₆₀₀=1.0×10⁻³ に調整した菌液 100 μL を各濃度の抗生物質を含有する 7H10-

ADC 寒天培地に播種し、37°Cで *M. abscessus* は 5 日間 (A)、*M. avium* は 14 日間培養した (B)。

図 3 構築したプラスミドの大腸菌への導入

構築した pYT-ZeoDsRed、pYT-HygDsRed、および pNN2-EGFP を *E. coli* DH5α に導入し、抗菌薬含有寒天培地に播種した。培養後、形成された集落を蛍光顕微鏡を用いて観察した。スケールバー：500 μm

図 4 *M. abscessus* のプラスミド導入株の蛍光顕微鏡像

電気穿孔法によりプラスミドを導入し、抗菌薬含有寒天培地に播種した。培養後、形成された集落を蛍光顕微鏡を用いて観察した。スケールバー：500 μm

A. *M. abscessus* の標準株、臨床分離株に pNN2-EGFP を導入した集落。

B. *M. abscessus* の標準株、臨床分離株に pYT-ZeoDsRed pNN2-EGFP を導入した集落。

図 5 *M. avium* のプラスミド導入株の蛍光顕微鏡像

電気穿孔法によりプラスミドを導入し、抗菌薬含有寒天培地に播種した。培養後、形成された集落を蛍光顕微鏡を用いて観察した。スケールバー：500 μm

A. *M. avium* の標準株、臨床分離株に pNN2-EGFP を導入した集落。

B. *M. avium* の標準株、臨床分離株に pYT-HygDsRed を導入した集落。

図 6 pYT プラスミドと pAL5000 プラスミドを導入した株の蛍光顕微鏡像

pYT プラスミド導入株へ pAL5000 プラスミドを導入し、抗菌薬含有寒天培地に播種した。培養後、形成された集落を蛍光顕微鏡を用いて観察した。スケールバー：500 μm

A. pYT-ZeoDsRed を導入した *M. abscessus* の標準株、臨床分離株に pNN2-EGFP を導入した集落。

B. pYT-HygDsRed を導入した *M. avium* の標準株、臨床分離株に pNN2-EGFP を導入した集落。

表 1. 本研究に使用した菌株とプラスミド

大腸菌 <i>E. coli</i>		
DH5α	クローニング用宿主	ニッポンジーン
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>		
ATCC 19977	標準株	
38	臨床分離株	近畿中央呼吸器センター
39	臨床分離株	近畿中央呼吸器センター
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>		
104	標準株	
545	臨床分離株	近畿中央呼吸器センター
552	臨床分離株	近畿中央呼吸器センター
大腸菌プラスミド		
pBlueScript II SK (-)	Amp ^r , cloning vector	アジレントテクノロジー
pNPP	Amp ^r , cloning vector	Fujiwara et al. ³⁹⁾
pNPP-Hyg	Amp ^r , cloning vector containing hyg ^r ORF	本研究で作製
pNPP-Zeo	Amp ^r , cloning vector containing Zeo ^r ORF	本研究で作製
pNPP-DsRed	Amp ^r , cloning vector containing DsRed gene ORF	本研究で作製
pNPP-EGFP	Amp ^r , cloning vector containing EGFP gene ORF	本研究で作製
抗酸菌・大腸菌シャトルベクター		
pNN2	Amp ^r , Km ^r , shuttle vector	Ohara et al. ⁴⁰⁾
pNN2-KmGFP	Amp ^r , Km ^r , shuttle vector containing EGFP expression cassette	本研究で作製
pYT937	Amp ^r , Km ^r , shuttle vector	Goto et al. ³⁷⁾
pYT-Hyg	Amp ^r , Hyg ^r , shuttle vector	本研究で作製
pYT-Zeo	Amp ^r , Zeo ^r , shuttle vector	本研究で作製
pYT-HygDsRed	Amp ^r , Hyg ^r , shuttle vector containing DsRed expression cassette	本研究で作製
pYT-ZeoDsRed	Amp ^r , Zeo ^r , shuttle vector containing DsRed expression cassette	本研究で作製

表 2. 本研究でを使用した PCR プライマー

名称	配列 (5' - 3')
HygNde	CCC <u>CATATG</u> ACACAAGAATCCCTGTTACTTC
HygPst	CCCCTGCAGTCAGGCGCCGGGGGCGGTGTC
ZeoNde	GGG <u>CATATG</u> GCCAAGTTGACCAGTGCCGTTTC
ZeoPst	GGGCTGCAGTCAGTCCTGCTCCTCGGCCACGAAGTG
EGFPNde	CCC <u>CATATGG</u> TGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
EGFPPst	AA <u>ACTGCAGT</u> TACTTGTACAGCTCGTCCATG
DsRedNde	CCC <u>CATATGG</u> ACAACACCGAGGACGTCATC
DsRedPac	CCCT <u>TAAATTA</u> ACTCTACTGGGAGCCGGAGTGG

下線は制限酵素サイトを示す

表 3. プラスミドの転換効率

菌種	菌株	プラスミド	蛍光集落数 /使用菌数	転換効率
<i>M. abscessus</i>	ATCC19977		1.90×10^{-5}	$3.81 \times 10 \pm 1.19 \times 10$
	38	pNN2-EGFP	2.57×10^{-6}	5.24 ± 2.41
	39		3.11×10^{-6}	6.38 ± 3.22
<i>M. avium</i>	104		1.54×10^{-4}	$3.08 \times 10^2 \pm 2.03 \times 10$
	545	pNN2-EGFP	3.76×10^{-6}	7.62 ± 0.93
	552		1.63×10^{-5}	$3.26 \times 10 \pm 1.04 \times 10$

菌種	菌株	プラスミド	蛍光集落数 /使用菌数	転換効率
<i>M. abscessus</i>	ATCC19977		1.64×10^{-3}	$1.18 \times 10^3 \pm 3.44 \times 10^2$
	38	pYT- ZeoDsRed	1.24×10^{-6}	6.84 ± 1.42
	39		5.57×10^{-6}	$1.03 \times 10 \pm 1.95$
<i>M. avium</i>	104		3.42×10^{-6}	7.62 ± 2.86
	545	pYT-HygDsRed	4.00×10^{-7}	4.18 ± 1.60
	552		2.73×10^{-5}	$5.51 \times 10 \pm 1.37 \times 10$

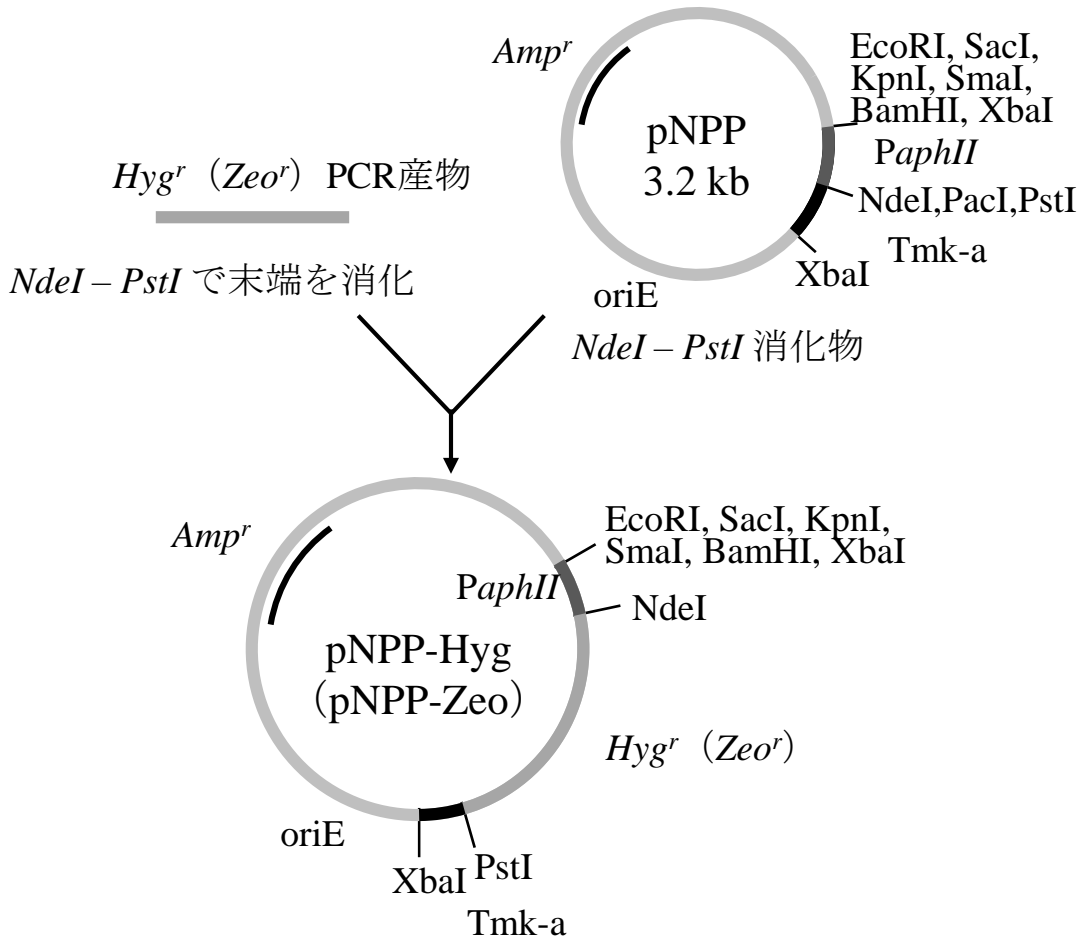
蛍光集落数 蛍光を発色した集落数

使用菌数 1×10^7 CFU

転換効率は、使用したプラスミド $1 \mu\text{g}$ あたりに得られた蛍光集落数の値とした。
値は平均±標準偏差を示す。N=3

図 1

A



B

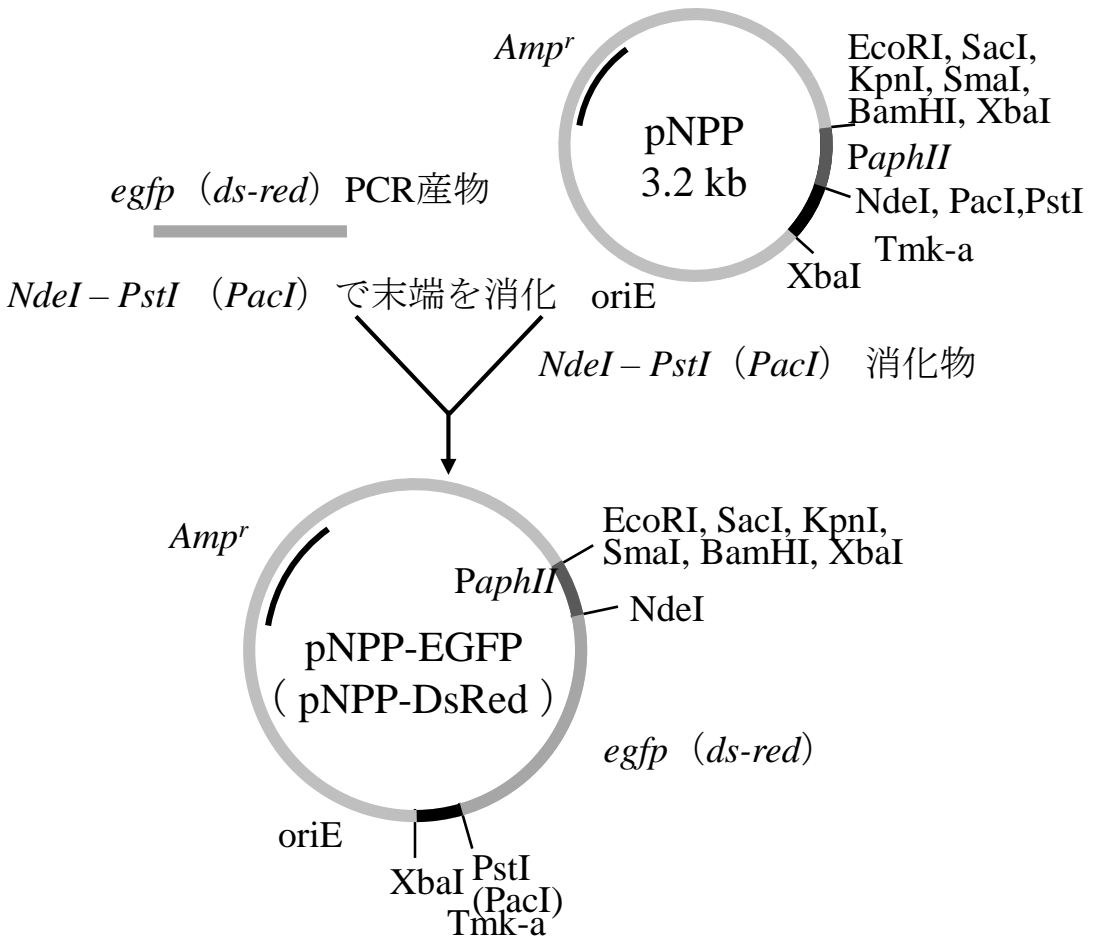


图 1

C

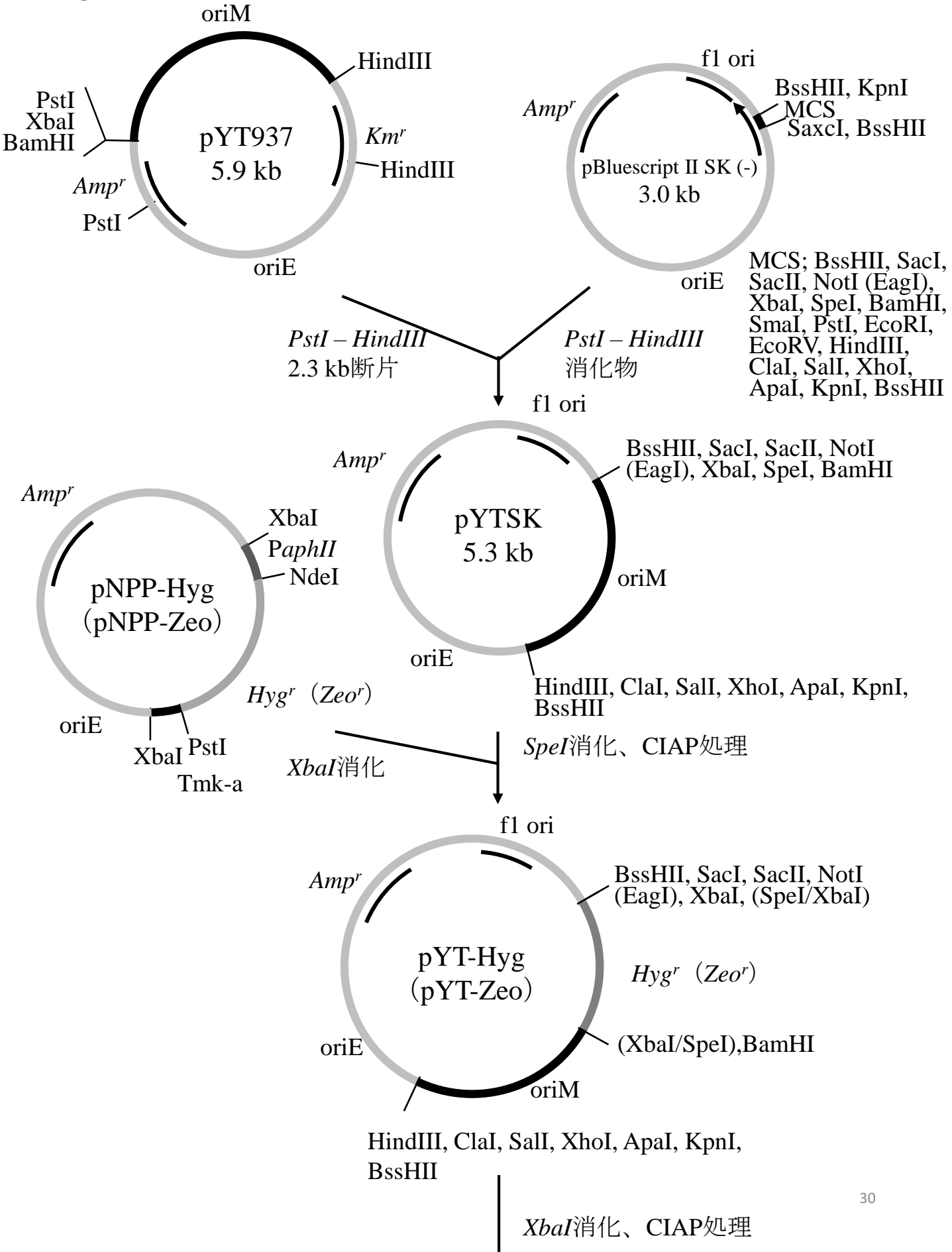


図 1 C (続き)

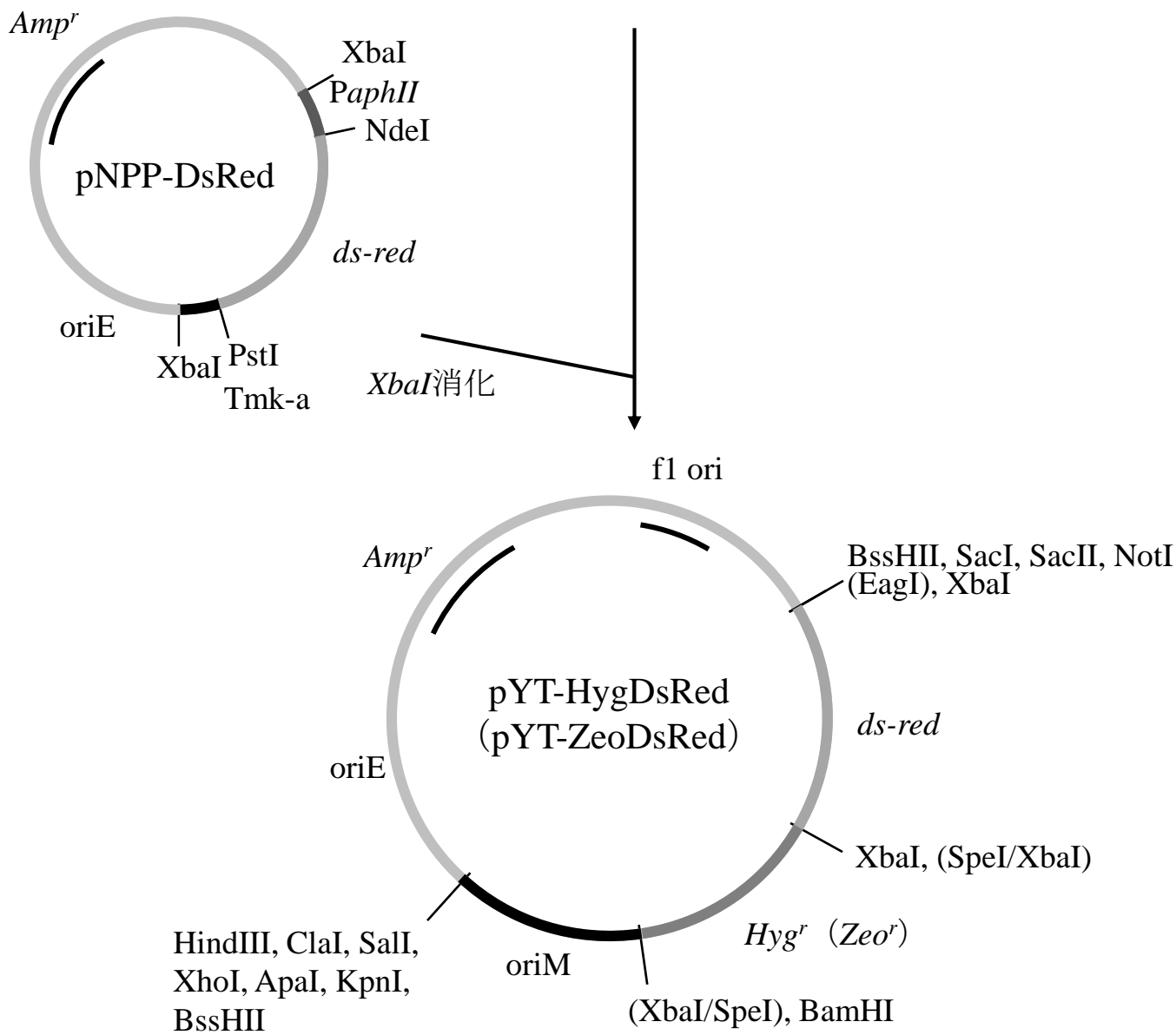


图 1 D

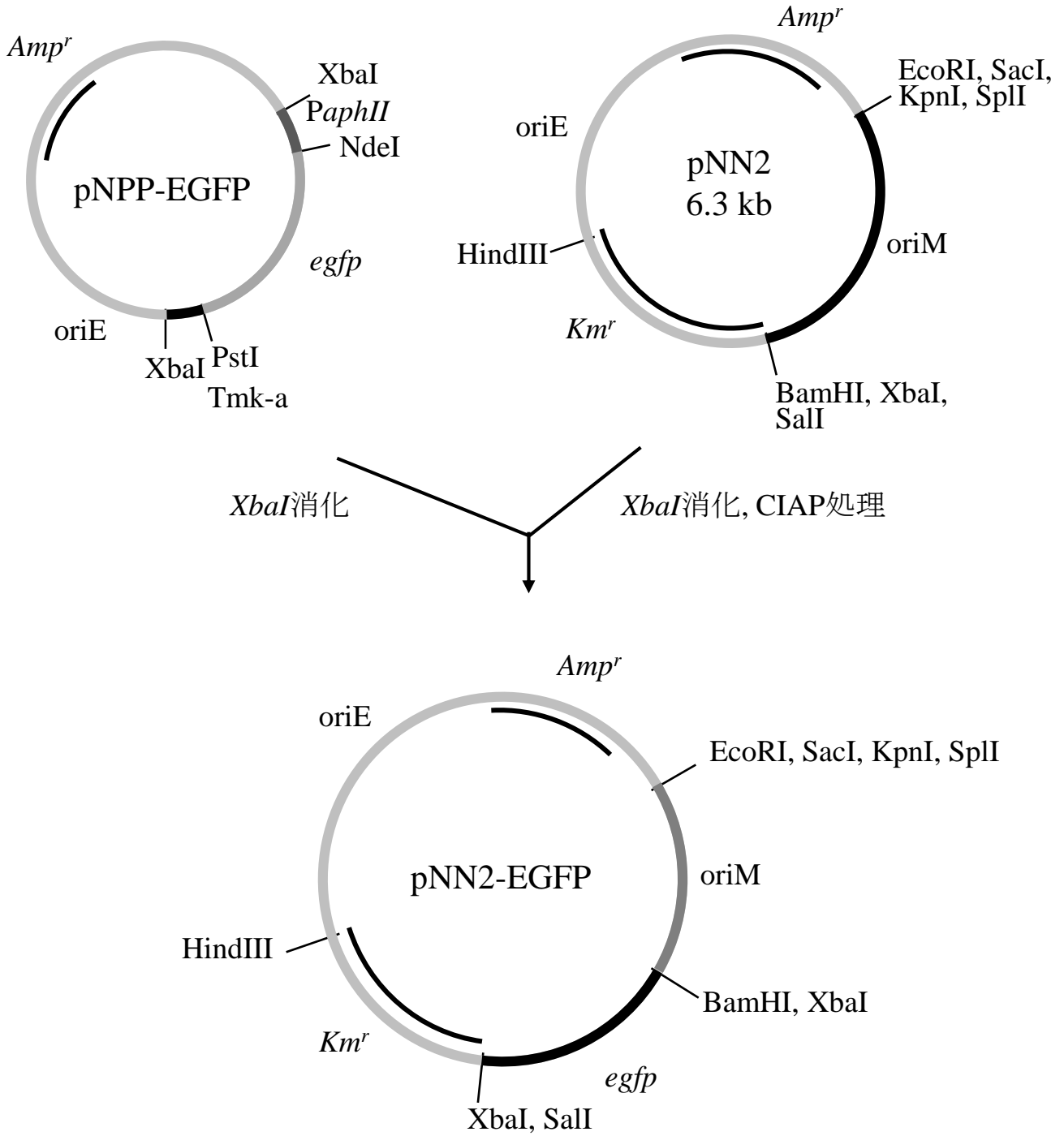
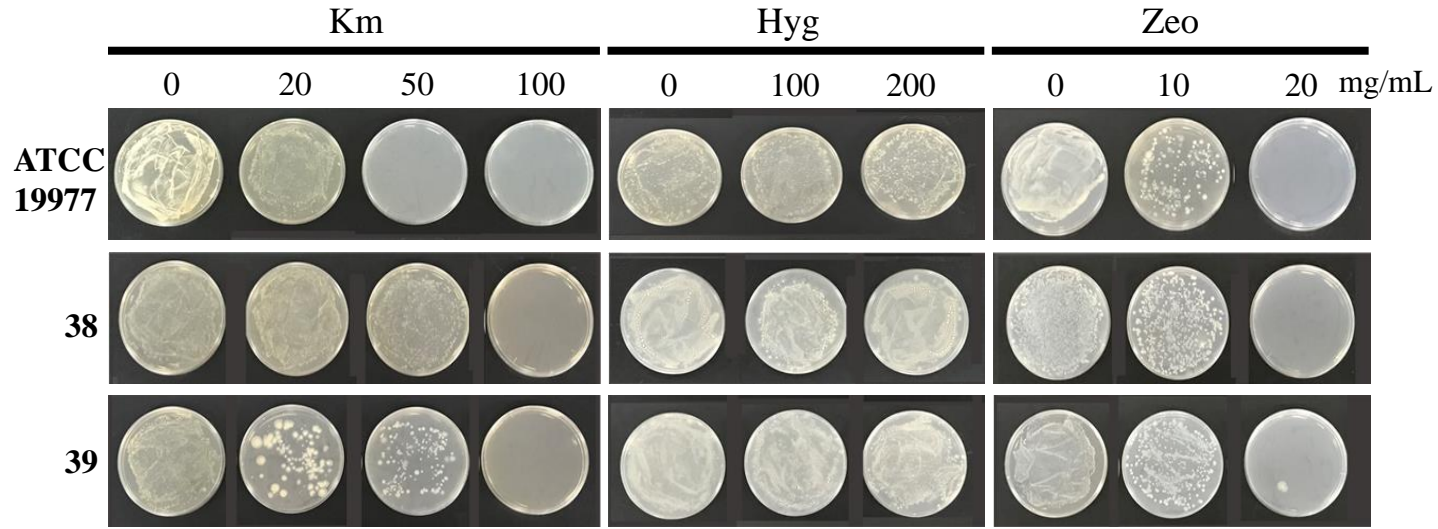


図2

A



B

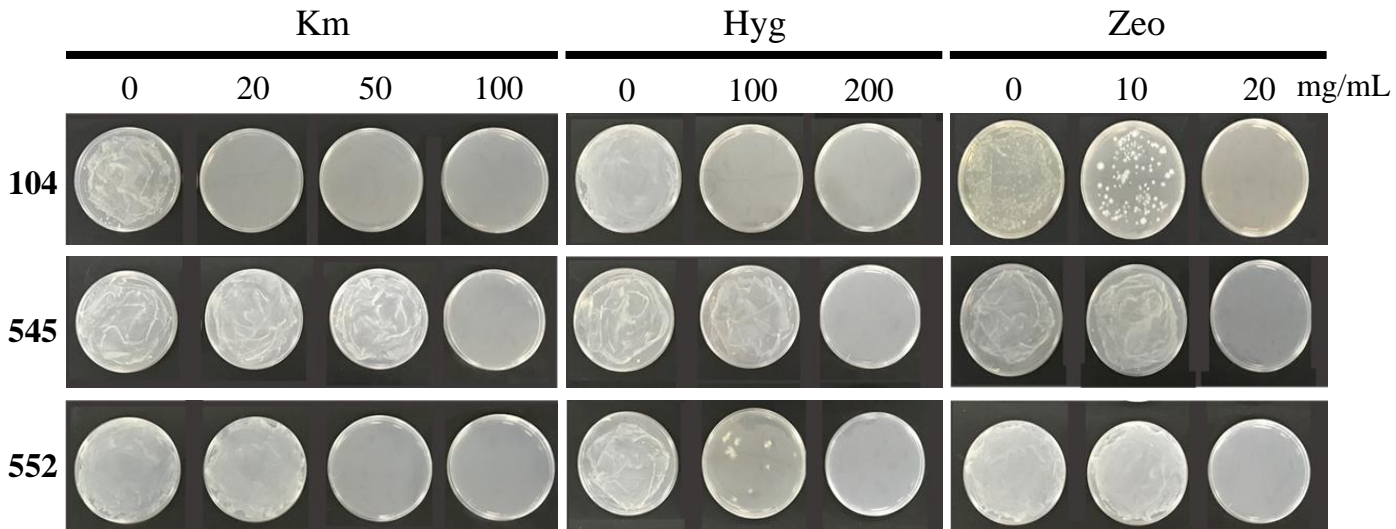


図3

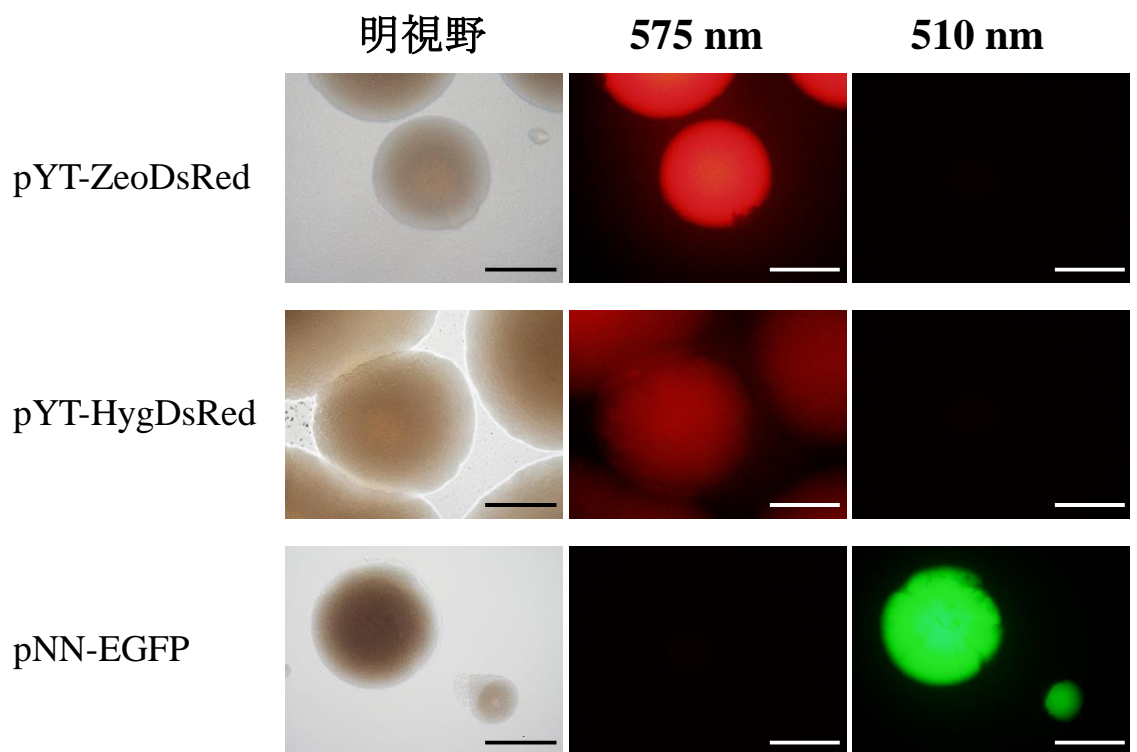
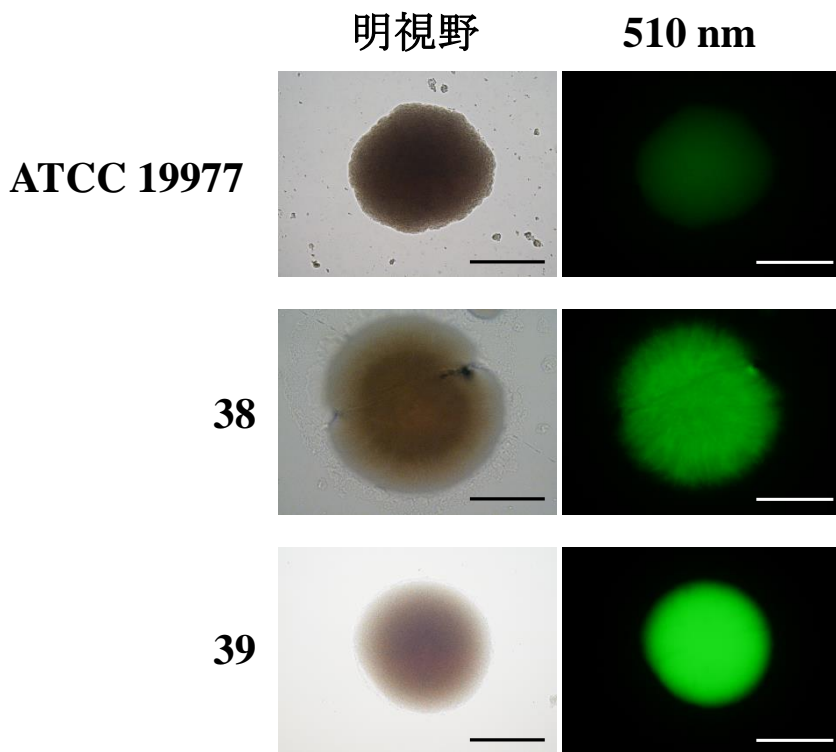


図4

A



B

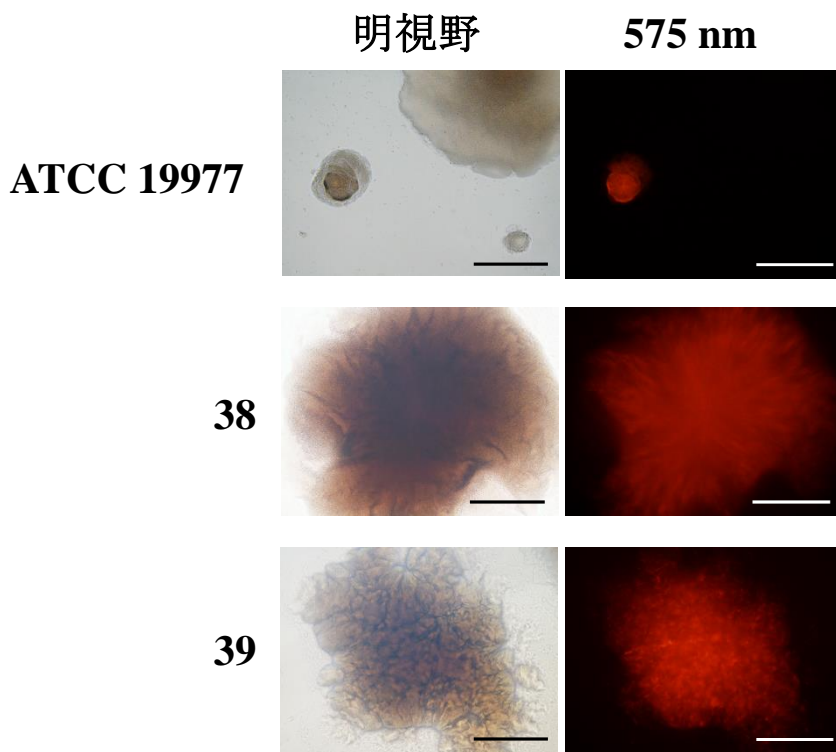
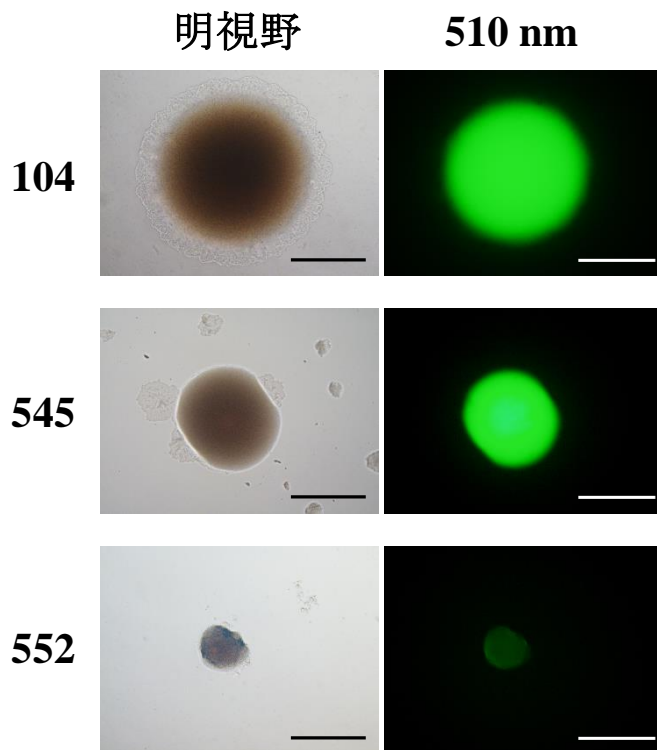


図5

A



B

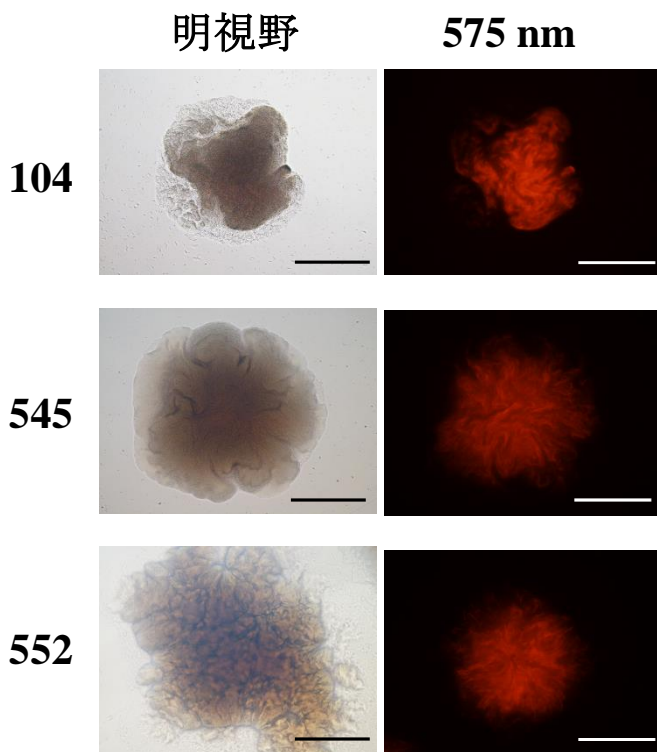
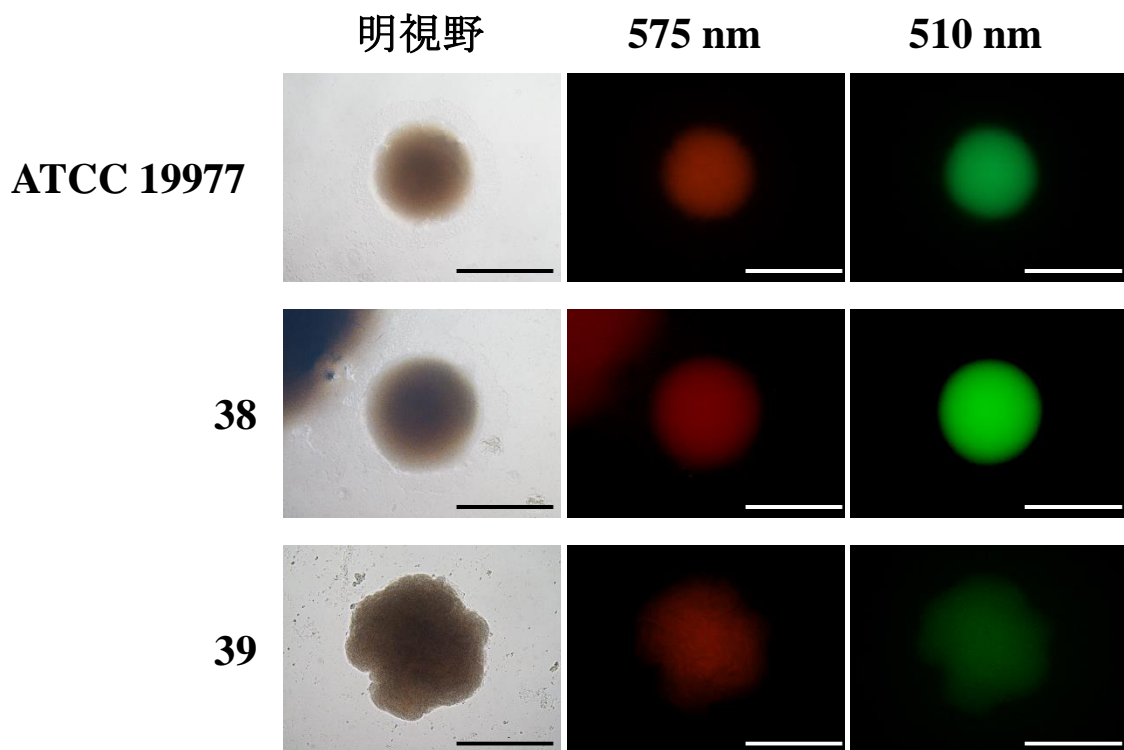


図6

A



B

