

学位論文

Mycobacterium bovis bacillus Carmette–Guérinの

人工的速育化と速育化メカニズムの探索

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 口腔微生物分野

竜門 亜矢子

Construction and analysis of a genetically engineering rapid growth strain of
Mycobacterium bovis bacillus Carmette–Guérin

Department of Oral Microbiology,

Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Ryumon Ayako

結 言

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) が引き起こす結核症は、単独の病原体としては年間死亡者数が世界で最も多い感染症であり、エイズ・マラリアとともに3大感染症のひとつとされている。世界保健機構 (World Health Organization : WHO) が1993年に結核非常事態を宣言し、その後様々な対策が講じられた。しかし、WHO の報告では、2018年においても全世界で年間約1,000万人が結核症を発症、約150万人が結核症により死亡している²⁾。我が国においても減少傾向にはあるものの、2019年の新登録結核患者数は14,460人で、死亡者数は2,088人である³⁾。このように結核症は、今なお国内外の人々の健康を脅かす感染症として存在し続けている。結核症に対する治療は複数の薬剤を併用する標準治療と呼ばれる化学療法が基本である⁴⁾が、結核症においても他の多くの病原菌と同様に薬剤耐性菌が多数存在する。特に多剤耐性結核 (multidrug-resistant tuberculosis : MDR-TB) や超多剤耐性結核 (extensively drug-resistant tuberculosis : XDR-TB) の蔓延が深刻化しているので、結核症は依然として公衆衛生上の脅威である⁵⁾。MDR-TBは、リファンピシン (Rifampicin : RFP) とイソニアジド (Isoniazid : INH) の2剤に耐性の結核と定義される。またXDR-TBは、MDR-TBの中で二次抗結核薬の注射薬であるカプレオマイシン (Capreomycin : CPM)、アミカシン (Amikacin : AMK)、カナマイシン (Kanamycin : KM) の1剤以上、かついずれかのニューキノロン (New Quinolone : NQ) 剤1剤以上にも耐性を示す結核と定義される⁶⁾。結核薬の1つであるパラアミノサリチル酸 (para-amino-salicylic acid : PAS) は1948年から臨床の場で使用されている使用実績の長い抗結核薬であるが、用量が多く比較的耐性菌の出現頻度が高かったことによって、使用頻度が減少していた。しかし、近年使用されていなかったことから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⁷⁾。

Chakraborty らは、PASが葉酸の前駆体であるパラアミノ安息香酸 (para-aminobenzoate : PABA) と構造が類似しており、プロドラッグとして働くことを明らかにした⁸⁾。通常PABAは葉酸経路に取り込まれ、ヒドロキシメチルジヒドロプテリンピロリン酸 (hydroxymethyl dihydropterin pyrophosphate) と結合することにより、ジヒドロプテロイン酸 (dihydropteroic acid : DHP) が合成される。ついでジヒドロ葉酸 (dihydrofolate : DHF)、テトラヒドロ葉酸 (tetrahydrofolate : THF)、さらに5,10メチレンテトラヒドロ葉酸 (5,10-methylene-THF : 5,10-CH₂-THF) と代謝される (図1)。しかし、PABAの代わりにPASが取りこまれた際には、DHFの代わりにヒドロキシルジヒドロ葉酸 (hydroxyl-dihydrofolate : HDHF) が合成されるが、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dihydrofolate reductase : DFRA) は水酸基が付与されているHDHFを代謝することができない。そのため、HDHFは

菌体内に蓄積されDFRAの酵素活性を阻害するため、葉酸代謝が止まり静菌作用を示す(図1)。ところで、Rengarajanらはチミジル酸合成酵素(thymidylatesynthase:TS)であるThyAの遺伝子*thyA*に変異が入り、ThyAのチミジル酸合成酵素活性が低下するとPASに対して耐性を示すことを報告した⁹⁾。現在までにPAS耐性の機序としては*thyA*の変異に加え、ジヒドロ葉酸合成酵素(dihydrofolate synthase)の遺伝子*folC*¹⁰⁾とリボフラビン生合成タンパク質(riboflavin biosynthesis protein)の遺伝子*ribD*¹¹⁾、そしてRNA合成酵素シグマ因子*sigB*¹²⁾遺伝子の変異が報告されている。

真核細胞と多くの原核細胞はTSとしてThyAを持つ。近年、ThyAを持たない細菌の存在が判明し、それらは新たに発見されたThyAと配列類似性を持たないフラビン依存性TS(flavin-dependent thymidylate synthase)であるThyXを持つことが報告された¹³⁾。結核菌をはじめとする*Mycobacterium*属を含めた放線菌類には、ThyAとThyXの両者を併せ持つ菌種が多く存在することも明らかになった¹⁴⁾。ThyAはサブユニット当たり1つの活性部位をもつホモ二量体であるのに対して、ThyXはサブユニット間の接触部位に4つの活性部位を持つホモ四量体である¹⁵⁾。またThyAと異なりThyXはその反応にフラビンアデニンジヌクレオチド(flavin adenine dinucleotide:FAD)とニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate:NADPH)を必要とし、1当量の水素化物イオンが還元型FADから直接dUMPのウラシル環へと移され、中間体が異性化してdTMPが形成される¹⁶⁾。さらにThyAの反応では一炭素供与体として5,10-CH₂-THFを利用して5,10-CH₂-THFはDHFに酸化されるのに対して、ThyXは上述のように還元剤としてNADPHを利用することから、ThyXの反応では5,10-CH₂-THFからTHFが生成される¹⁶⁾。有村はThyXがThyAとともにPASに対する耐性に関与することを報告した¹⁷⁾。またワクチン株である*Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG)を用いてさらに研究を進めたところ、興味深いことに*thyA*と*thyX*の発現量はその増殖速度にも大きく影響する可能性があることを示唆する結果が得られた。

*Mycobacterium*属には遅発育性のものが多くみられ、中でも結核菌群はコロニー形成に3-4週間以上を有するため、病原体の同定や薬剤感受性試験などに時間がかかり臨床において大きな障害となっている。そしてこの発育の遅さは、新たな抗結核薬の迅速な開発を阻んでいる。そのため遅育菌を速育化することでできれば、新規抗結核菌剤候補の評価の短縮化を図ることが可能になると考えた。そこで本研究では、*thyA*と*thyX*の発現量がBCGの増殖速度に与える影響を明らかにすること、さらに*thyA*と*thyX*の変異株を用いてBCGの増殖速度に影響を与える因子を検討し、葉酸代謝経路での速育化のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

使用菌株と培養条件

大腸菌 *Escherichia coli* DH5 α 株 (タカラバイオ、大津、日本) は、KM 20 μ g/mL (Meiji Seika ファルマ、東京、日本) またはカルベニシリン (Carbenicillin : Car) 50 μ g/mL (富士フィルム和光純薬、大阪、日本) 含有 Luria-Bertani (LB) (ナカライテスク、京都、日本) 液体培地と LB 寒天培地で培養した。

BCG の培養には、10% アルブミン・デキストロース・カタラーゼ (albumin・dextrose・catalase : ADC) および 0.05% Tween80 添加 Middlebrook 7H9 液体培地¹⁸⁾ (7H9 液体培地) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)、10% ADC 添加 Middlebrook 7H10 寒天平板培地¹⁸⁾ (7H10 寒天培地) (Becton, Dickinson and Company) を、あるいはソートン (Sauton) 培地¹⁸⁾ [0.5 g リン酸二水素カリウム、0.5 g 硫酸マグネシウム七水和物、2.0 g クエン酸一水和物、4.0 g L-アスパラギン、60 mL グリセリン、0.05 g クエン酸鉄(III)アンモニウム (それぞれ 1 リットル当たり)、pH 7.4] を用いた。また必要に応じて 7H9 液体培地と 7H10 寒天培地には KM を終濃度 20 μ g/mL になるように添加した。

BCG は Tokyo 172 株を使用した。BCG::pNN は BCG Tokyo 172 株にアンピシリン Ampicillin 耐性遺伝子および KM 耐性遺伝子をもつ pNN2¹⁸⁾を導入して作製されたものを使用した。*thyA* 欠損株 BCG Δ *thyA* と *thyX* 欠損株 BCG Δ *thyX* は、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作製された株を使用し¹⁷⁾、*thyA* 過剰発現株 BCG::p*thyA*、*thyX* 過剰発現株 BCG::p*thyX* および *thyA* と *thyX* の過剰発現株 BCG::p*thyAX* は、BCG Tokyo 172 株に pNN*THYA*、pNN*THYX* あるいは pNN*THYAX* をそれぞれ導入して作製されたものを使用した¹⁷⁾。

遺伝子操作

制限酵素はタカラバイオから購入した。遺伝子操作は、岡山大学組換え DNA 安全管理委員会の承認の下 (承認番号 17117) に行った。なお、遺伝子操作は分子生物学実験で使用されている一般的な方法に従った。また BCG への核酸導入は ECM399 (BTX) を用いて電気穿孔法で行なった。¹⁸⁾

発現プラスミド導入株の作製

ジヒドロ葉酸還元酵素 (dihydrofolate reductase : DfrA)、グリシンデヒドロゲナーゼ (glycine dehydrogenase : GcvT)、そしてメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (5,10-methylenetetrahydrofolate reductase : MTFHR) のそれぞれの遺伝子を発現するプラスミド pdfrA、pgcvT、そして pmthfr は、次のように作製した。dfrA と gcvT は、BCG Tokyo 172 株のゲノム DNA を鋳型とし、プライマーセット DFRAEX1・DFRAEX2 と GCVTEX1・GCVTEX2 を用いた PCR 法によってそれぞれのプロモーター領域とともに増幅した。mthfr は *Mycobacterium smegmatis* mc²155 株のゲノム DNA を鋳型とし、プライマーセット MTHFREX1・MTHFREX2 を用いた PCR 法によってプロモーター領域とともに増幅した。dfrA と mthfr の増幅産物は XbaI で切断し、また gcvT の増幅産物は SpeI と XbaI で切断し、pNN2 の XbaI サイトに挿入することでそれぞれ pdfrA、pgcvT、そして pmthfr を得た。そして、それぞれを BCG Tokyo 172 株に導入することによって BCG::pdfrA、BCG::pgcvT、そして BCG::pmthfr を得た。

増殖速度の比較

BCG は、Sauton 培地を用いて培養した 3 週以内の菌を用いた。Sauton 培地の表層に存在する菌を 7H9 液体培地に継代し、37°C、160 rpm で振とう培養を行った。6 時間後、培養物を 50 mL 容量のコニカルチューブに移し、25°C、100×g、5 分間の遠心分離により塊状の菌を沈殿させた。上清中の菌を新鮮な同培地で希釈することによって波長 590 nm における濁度を 0.2 から 0.4 [OD (590nm) = 0.2-0.4] に調整し、さらに 37°C、160 rpm で振とう培養を行った。24 時間後に新鮮な同培地で希釈することによって OD = 1.0 × 10⁻³ (菌数 1.0 × 10⁵/mL) 相当と 1.0 × 10⁻⁴ (菌数 1.0 × 10⁴/mL) 相当の菌液を得た。次に 3 μL の菌数 300 相当と菌数 30 相当の菌液を 7H10 寒天培地上にスポットし、37°C で 42 日培養した。なお、液体培地中の増殖速度の測定には OD = 1.0 × 10⁻² に調整した菌液を用い、独立した実験を 3 回行った。

RNA の抽出と逆転写

BCG の全 RNA 抽出には TRIzol® Plus RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた。7H9 液体培地で 24 時間培養した BCG 各株を、波長 590 nm における濁度が 2.0 になるように調整した。この菌液 10 mL を 7H10 寒天培地上に重層し、5 分間静置した。そして過剰の菌液を除去した後、37°C で 24 時間培養した。培養後 7H10 寒天培地上の菌を回収し、直径 100 μm のガラスビーズ約 300 μL を入れた 2 mL 容

量のサンプリングチューブに回収した。その後 1 mL の TRIzol 試薬を加え、ビーズビータを用いて菌体を破碎した。破碎物からの全 RNA の抽出と精製はキットに添付のマニュアルに従い行った。精製した全 RNA に残存する DNA は、DNase I (タカラバイオ) を 37°C で 1 時間反応させることで消化して除去した。そして DNA が残存していないことは PCR 法により標的遺伝子が増幅しないことで確認した。

逆転写 reverse transcription (RT) は PrimeScript®II 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) を用いて、添付のマニュアルに従い行った。1 µg/µL に調節した全 RNA 1 µL を 50 µM Oligo dT Primer 1 µL、10 mM each dNTP Mixture 1 µL、そして RNase Free Water 7 µL と混合することで全量を 10 µL とし、65°C で 5 分間熱処理後に氷上で急冷させた。その後に 5 × primescript II Buffer 4 µL、40 U/µL RNase Inhibitor 0.5 µL、200 U/µL PrimeScript II RTase 1 µL、そして RNase Free Water 4.5 µL を加えて 42°C で 1 時間の逆転写反応を行うことで、cDNA を合成した。その後、95°C で 5 分間加温することで逆転写酵素の不活化を行った。

RNA シークエンス解析

RNA シークエンス解析は北海道システムサイエンス (札幌、日本) に外部委託した。mRNA を断片化したのちに逆転写して得られた相補 DNA (cDNA) 断片の両端にインデックス付きアダプター配列を付加した。これを用いて発現解析し、シーケンスデータを取得した。

定量 RT-PCR 法

定量 RT-PCR には、前述の方法によって作製した cDNA を鋳型とし、表 1 に記載したプライマーを用いた。なお、cDNA の作製には、RNA シークエンス解析に用いた全 RNA の調整を行った菌体とは異なるときに培養した菌体を用いた。定量 RT-PCR の反応には SYBR green master mix (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて反応させ、その際に PCR 産物が発する蛍光量を LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) にて測定し、標準曲線と遺伝子増幅曲線を作成後、サンプルごとに threshold cycle (Ct) 値と標的遺伝子量を算出した。なお、定量 PCR 用プライマーの塩基配列は、オンラインソフトウェアである Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3/>) で検索して決定した。またそれぞれのプライマーが他の遺伝子と相同性がないことを National Center for Biotechnology Information (NCBI) が提供している Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて確認した。

統計処理

2 群間の差の検定には、Student's *t*-test を用いた。3 群間以上の検定には Tukey 法を用いた。統計解析は PASW Statistics18 (SPSS Japan、東京、日本) を用いて行った。なお、*p* 値が 0.05 未満をもって有意差ありと判定した。多重比較における *p* 値の補正には Bonferroni 法を用いて、*p* 値が $0.05/18=0.0028$ 未満をもって有意差ありと判定した。

結 果

BCG 各株の増殖能

親株 (BCG Tokyo 172 株)、2 つの欠損株 BCG Δ thyA と BCG Δ thyX、そして 2 つの過剰発現株 BCG::pthyA と BCG::pthyX の増殖速度を比較した。7H10 寒天培地上において、BCG::pthyX のコロニーの大きさは、35 日目においてのみ統計学的に親株のコロニーとの間で有意差はなかったが、21 日目、28 日目、そして 42 日目では親株、BCG Δ thyA、BCG Δ thyX、そして BCG::pthyA のコロニーと比べて統計学的に有意であり、明瞭なコロニーを形成した (図 2)。一方で BCG Δ thyA のコロニーは、統計学的には 28 日目と 35 日目においてのみ、他の 4 株全てのコロニーの大きさとの間に有意差があったが、目視上は全ての期間において明らかに BCG Δ thyA のコロニーは他のものと比べて小さかった。7H9 液体培地中においては、BCG Δ thyA、BCG Δ thyX、そして BCG::pthyA 株は親株と同程度の増殖速度であったのに対し、これらのうち BCG::pthyX の増殖は統計学的に有意に促進されていた (図 3)。次に、*thyA* と *thyX* を同時に発現する BCG::pthyAX の増殖を親株と BCG::pthyX の増殖と比較したところ、7H9 液体培地中での BCG::pthyAX の増殖速度は親株のものと同程度であった (図 4)。

遺伝子発現プロファイル

RNA シークエンス解析によって BCG Tokyo 株と BCG::pthyX の遺伝子発現プロファイルを比較した (表 2)。親株を基準としたときの相対値 (\log_2 fold change) は、葉酸代謝関連遺伝子の中では *dfrA*、*glyA*、*gcvT*、そして *metE* が、それぞれ 1.54、1.43、1.74、そして 1.50 と高い値を示した。一方、*folC*、*folD*、*metH*、*purU*、そして *fnt* は、それぞれ -1.55、-1.09、-1.50、-1.04、そして -1.47 と低い値を示した。次に定量 RT-PCR 法を用いてこれらの遺伝子の発現量を検証したところ、RNA シークエンス解析と同じ傾向を示し (図 5)、RNA シークエンス解析の結果が正しいことが検証された。

BCG::pdfra、BCG::pgcvT、そして BCG::pmthfr の増殖能

*dfrA*と*gcvT*の発現量がBCGの増殖に与える影響を調べるため、両遺伝子の過剰発現株 BCG::pdfraとBCG::pgcvTを作製し、7H10寒天培地上における両者の増殖速度を親株と BCG::pthyXの増殖速度と比較した。またRNAシーケンス解析の結果、5-メチルテトラヒドロ葉酸 (5-methyl-THF : 5-MTHF) をTHFに還元する*metE*と*metH*の発現量がそれぞれ 1.50と-1.50と逆方向の変動を示したことから、BCGには存在しない5-MTHFを合成するメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ MetFの遺伝子*mthfr* (*M. smegmatis*由来) の過剰発現株BCG::pmthfrを作製し、その増殖も調べた。15日目において親株、BCG::pgcvT、およびBCG::pmthfrではコロニーは形成されなかったのに対して、BCG::pdfraとBCG::pthyXでは肉眼的に観察されるコロニーが形成された。そして、22日目と29日目におけるBCG::pdfraとBCG::pthyXのコロニーの大きさは、親株、BCG::pgcvT、そしてBCG::pmthfrのものに比べて明確に大きく、統計学的に有意な差があった(図6)。7H9液体培地におけるBCG::pdfraの増殖は、親株に対して統計学的に有意に促進された。一方、BCG::pgcvTの増殖は親株と同程度であった(図7)。

考 察

葉酸代謝経路においてDHPはDHFとなったのち活性型であるTHFとなる。そしてこの、THFは、5,10-CH₂-THFに代謝される。5,10-CH₂-THFは、複数の経路によりDHFに還元され(図1)、主経路によってTHFに戻される。TSでは、ThyAが5,10-CH₂-THFからDHFへの還元を担っている。抗酸菌を含む放線菌類の一部では、TSとしてThyAとともにThyXを持つ。ThyXは5,10-CH₂-THFをTHFに還元するため、5,10-CH₂-THF - DHF - THFの段階が省かれる。本研究においてThyXの過剰発現株であるBCG::pthyXで増殖が促進されたのは、この短縮型ともいえる経路が主となり、THFに直接戻ることが主になった結果であることが推測される。DHFとTHFは同じ葉酸誘導体であるが、THFはC1基の転移に関与し、プリンヌクレオチドの*de novo*合成の活性型補酵素として働くことによって直接的に細胞分裂・細胞増殖に関わっている。PAS耐性について、以前の研究では*thyX*の過剰発現株 BCG::pthyXは耐性を示した¹⁷⁾が、*thyX*に加えて*thyA*を同時に過剰発現する株 BCG::pthyAXはPAS感受性であった(未発表データ、パーソナルコミュニケーション)。そこで、ThyXとともにThyAも同時に過剰発現するBCG::pthyAXの増殖速度を、親株とBCG::pthyXの増殖速度と比較したところ、7H9液体培地中ではBCG::pthyAXの増殖速度は親株と同様であり、増殖は促進されなかった(図4)。ThyXの過剰発現株にThyAをさらに過剰発現させた場合には、ThyAとThyXが基質である5,10-CH₂-THFを競合し、その結果、

ThyAが5,10-CH₂-THFをDHFに還元するようになったために増殖速度が親株程度に戻ったことが考えられる。ところで、ThyAの欠損株BCGΔthyAではTSはThyXのみであるため、この推測からすると増殖速度は増加することが考えられるが、BCGΔthyAの増殖速度は7H9液体培地中では親株と同等であり（図3）、また7H10寒天培地では逆に増殖の遅延が観察された（図2）。BCGや結核菌では通常TSとしてThyAが主に働いており、ThyXの発現量は低い¹⁷。このためBCGΔthyAではTSはThyXのみで、その反応速度は上昇すると考えられるものの、発現量が低いために十分なチミジル酸の供給ができず、増殖は抑制されたことが推測される。このことを検証するためにはさらなる検討が必要である。

ThyXの増加によって増殖は促進されたが、BCG::pthyXにおける葉酸代謝系の遺伝子群の変化をRNAシーケンス法により検討したところ、THFを5,10-CH₂-THFに代謝するGlyAとGevTの遺伝子とともに、DHFをTHFに還元するDfrAの遺伝子の発現も増加していた。そのため、*dfrA*と*gcvT*の過剰発現株BCG::pdfraとBCG::pgcvTを作製してその増殖を調べたところ、BCG::pdfraでは増殖が促進されたが、BCG::pgcvTでは増殖は促進されなかった（図6、7）。BCG::pthyXで増殖速度が促進されたことと合わせて考えると、THFの産生と蓄積が、BCGの増殖を促進させる要因になったことが推測される。*gcvT*を過剰発現することはTHFの消費量を増加させ、菌体内のTHF量は減少すると考えられるが、*gcvT*を過剰発現させても増殖速度は低下しなかった。この理由として、1) 消費した量と同等の量が合成された、2) GevTの量は増加したが、THFの消費量は変化しなかった、あるいは3) 遅発育菌であるため、表現型としてそれ以上の発育の遅延化は生じなかった可能性が考えられる。これらを明らかにするためにはさらなる検討が必要である。

ところで、多くの生物では5,10-CH₂-THFはMetFにより還元され、5-MTHFに代謝される。その後、5-MTHFはメチオニンシンターゼ methionine synthase MetHによってTHFとメチオニンに代謝される。この反応はもう1つのメチオニンシンターゼであるMetEによっても行われる。しかし、BCGや結核菌ではそのゲノム情報から5,10-CH₂-THFから5-MTHFを合成する古典的なMetFは存在せず、他のアイソザイムも明らかにされていない。RNAシーケンス解析の結果では、*metE*と*metH*の発現量がそれぞれ1.50と-1.50と逆方向の変動を示した。この経路が増殖速度に関係するかを明らかにすることを目的として、MetEとMetHの基質である5-MTHFの量を増やすために、BCGには存在しないMetFの遺伝子*mthfr*をBCGに過剰発現させることを試みた。*M. smegmatis*由来*mthfr*発現株であるBCG::pmthfrの増殖速度は、親株と同様であり増殖が促進されることはなかった。本菌における5-MTHFの本来の合成経路が不明であることから、今回の結果だけではこの経路が増殖速度に影響するかの結論を出すことは困難であり、さらなる検討が必要と考えられる。

RNAシーケンス解析および定量RT-PCRの結果では、葉酸代謝経路に存在する*folD*、ホルミルテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ (formyltetrahydrofolate dehydrogenase) 遺伝子*purU*そしてホスホリボシルグリシンアミドホルミルトランスフェラーゼ (phosphoribosylglycinamide formyltransferase) 遺伝子*fmt*の発現は、*thyX*の過剰発現により顕著に低下しており、5,10-CH₂-THFから続く他の代謝経路は抑制されたことが推測された。この現象はTSの過剰発現によりチミジル酸合成経路が活性化されたために、代償的にこれら2つの経路が抑制されたと推測される。本研究ではこれら2つの経路の増殖速度変化への関与は明らかにしていないが、興味深い点であり、今後解明することが待たれる。

一般的に*Mycobacterium*属は遅発育性であれば病原性が強い傾向にあり、非病原性抗酸菌には増殖速度が早いものが多いが、増殖速度と病原性の関連性は未だ明らかにされていない。結核菌が速育化した場合に、宿主の免疫応答が従来よりも早くなり殺菌作用が強くなる可能性がある一方で、菌の増殖が宿主の抵抗性を上回り免疫応答が追いつかず従来よりも強い病原性を持つ可能性も考えられる。そのため、速育化メカニズムの解明と共に増殖速度と病原性の関連性を明らかにする研究も並行して行う必要がある。

特定の遺伝子の過剰発現が菌の増殖速度に影響を与えることは、これまでも以下のように報告されている。*Corynebacterium glutamicum*ではアミダーゼ様タンパク質をコードするNCgl2986 遺伝子を過剰発現させると、NCgl2986遺伝子産物がペプチドグリカン合成経路を活性化することで細胞の成長が促進され、菌数が有意に増加することが報告されている¹⁹⁾。*Mycobacterium*属では増殖速度に違いのある*Mycobacterium fortuitum*と*Mycobacterium smegmatis*でポーリン遺伝子*porM1*と*porM2*の発現を比較した結果、*M. fortuitum*よりも増殖の早い*M. smegmatis*で発現量が多く、また*porM1*と*porM2*を過剰発現することで増殖が促進されたことから、ポーリン遺伝子の発現量が菌の成長速度に影響を与えたことが報告されている²⁰⁾。また同一遺伝子が速育菌と遅育菌で異なる性状を示す例も報告されている。*yidC*は結核菌の呼吸代謝を制御するエンベロープタンパク質をコードする。遅発育性である結核菌に、自身の*yidC* (*yidC* (Mtb))と速育菌である*M. smegmatis*の*yidC* (*yidC* (Msm))を過剰発現させたところ、*yidC* (Msm)の場合にはわずかに増殖の低下が見られたが、*yidC* (Mtb)を過剰発現させた場合には、顕著に抑制されたことが報告されている²¹⁾。しかし、本研究で明らかになった*thyX*の過剰発現による速育化は我々の知る限りこれまでに報告は無く、初めての報告である。*thyX*の過剰発現がBCGの増殖速度を促進させる現象は、他の*Mycobacterium*属細菌や放線菌群においても生じるのか興味を持たれるところであり、今後解析する予定である。

結 語

本研究では、BCGにおいて *thyA* 遺伝子発現量と増殖速度間に明瞭な関連は見出せなかったが、*thyX* 遺伝子を過剰発現させることで、増殖は有意に促進されることが示された。また、*dfrA* 遺伝子の過剰発現でも、同様に速育化することが示された。しかし、*gcvT* 遺伝子の過剰発現は増殖速度に変化はもたらさなかった。以上のことから、THFの産生量あるいは蓄積量が本菌の増殖速度に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なるご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国際環境科学専攻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、様々な面にわたり終始ご指導賜り、貴重なご援助と御助言とご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口腔微生物学分野諸先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) World Health Organization. The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed 2020.12.22.)
- 2) World Health Organization. Tuberculosis. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>. (accessed 2020.9.16.)
- 3) 厚生労働省. 2019年結核登録者情報調査年報集計結果について.
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095_00003.html.
(accessed 2020.11.27.)
- 4) 日本結核病学会治療委員会. 「結核医療の基準」の改訂—2018年. 結核 **93**, 61-68, 2018.
- 5) Nguyen L, Jacobs MR. Counterattacking drug-resistant tuberculosis: molecular strategies and future directions. *Expert Rev Anti Infect Ther* **10**: 959-961, 2012.
- 6) World Health Organization. Addressing the threat of tuberculosis caused by extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Wkly Epidemiol Rec* **81**: 386-390, 2006.
- 7) Desai U, Jyotsna MJ. Utility of para-aminosalicylic acid in drug-resistant tuberculosis: Should it be classified as Group D3 or Group C? *Lung India* **35**: 488-493, 2018.
- 8) Chakraborty S, Gruber T, Barry CE 3rd, Boshoff HI, Rhee KY. Para-aminosalicylic

- acid acts as an alternative substrate of folate metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **339**: 88-91, 2013.
- 9) Rengarajan J, Sasseti CM, Naroditskaya V, Sloutsky A, Bloom BR, Rubin EJ. The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Mol Microbiol* **53**: 275-282, 2004.
 - 10) Zhao F, Wang XD, Erber LN, Luo M, Guo AZ, Yang SS, Gu J, Turman BJ, Gao YR, Li DF, Cui ZQ, Zhang ZP, Bi LJ, Baughn AD, Zhang XE, Deng JY. Binding pocket alterations in dihydrofolate synthase confer resistance to para-aminosalicylic acid in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 1479-1487, 2014.
 - 11) Zheng J, Rubin EJ, Bifani P, Mathys V, Lim V, Au M, Jang J, Nam J, Dick T, Walker JR, Pethe K, Camacho LR. Para-Aminosalicylic acid is a prodrug targeting dihydrofolate reductase in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **288**: 23447-23456, 2013.
 - 12) Yang SS, Hu YB, Wang XD, Gao YR, Li K, Zhang XE, Chen SY, Zhang TY, Gu J, Deng JY. Deletion of *sigB* causes increased sensitivity to para-aminosalicylic acid and sulfamethoxazole in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **61**: e00551-17, 2017.
 - 13) Myllykallio H, Lipowski G, Leduc D, Filee J, Forterre P, Liebl U. An alternative flavin-dependent mechanism for thymidylate synthesis. *Science* **297**: 105-107, 2002.
 - 14) Stern A, Mayrose I, Penn O, Shaul S, Gophna U, Pupko T. An evolutionary analysis of lateral gene transfer in thymidylate synthase enzymes. *Syst Biol* **59**: 212-225, 2010.
 - 15) Sampathkumar P, Turley S, Ulmer JE, Rhie HG, Sibley CH, Hol WG. Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* flavin dependent thymidylate synthase (MtbThyX) at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* **352**: 1091-1104, 2005.
 - 16) Koehn EM, Fleischmann T, Conrad JA, Palfey BA, Lesley SA, Mathews II, Kohen A. An unusual mechanism of thymidylate biosynthesis in organisms containing the *thyX* gene. *Nature* **458**: 919-923, 2009.
 - 17) 有村友紀. BCG *thyX*変異株の作製とその解析. *岡山歯誌* **35**: 学位論文, 2016.
 - 18) 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.

- 19) Utami MF, Matsuda Y, Takada A, Iwai N, Hirasawa T, Wachi M. Growth promotion in *Corynebacterium glutamicum* by overexpression of the NCgl2986 gene encoding a protein homologous to peptidoglycan amidases. *JGAM* **66**:1-7, 2020.
- 20) Sharbati S, Schramm K, Rempel K, Wang H, Andrich R, Tykiel V, Kunisch R, Lewin A. Characterisation of porin genes from *Mycobacterium fortuitum* and their impact on growth. *BMC Microbiol* **9**:31, 2009.
- 21) Thakur P, Choudhary E, Pareek M, Agarwal N. Regulation and overexpression studies of YidC in *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep* **8**:17114, 2018.

図の説明

図1 結核菌における葉酸代謝経路

抗酸菌において提唱されている葉酸代謝経路を示す。パラアミノサリチル酸 (para-aminosalicylic acid : PAS) の代謝産物は斜体字で示した。

図2 7H10寒天培地における各菌株の増殖

BCG Tokyo、BCG Δ thyAとBCG Δ thyX、BCG::pthyA、そしてBCG::pthyXを7H10寒天培地に接種し、21、28、35、42日後の結果を示す。なお、図は計測したコロニーの平均値 (n=3) を示し、エラーバーは標準偏差を示す。同一文字間に有意差なし。(Tukey法 P<0.05)

図3 7H9液体培地における各菌株の増殖

BCG Tokyo、BCG Δ thyAとBCG Δ thyX、BCG::pthyA、そしてBCG::pthyXの濁度を 0.05 に調整後 37°C で培養した。なお、図は実験の平均値 (n=5) を示し、エラーバーは標準偏差を示す。* : BCG::pthyXと他のすべての群に対しての統計的有意差を示す (Tukey法、p<0.0028)

図4 7H9液体培地における各菌株の増殖

BCG Tokyo、BCG::pthyX、およびBCG::pthyAXの濁度を 0.05 に調整後 37°C で培養した。なお、図は実験の平均値 (n=5) を示し、エラーバーは標準偏差を示す。BCG TokyoそしてBCG::pthyAXに対するBCG::pthyXの統計的有意差を示す。(Tukey法 p<0.0028)

図5 BCG::pthyXにおける各遺伝子の発現量

定量PCR法によってBCG::pthyXにおける *dfpA*、*glyA*、*gcvT*、*metE*、*folC*、*folD*、*metH*、*purU*、そして*fnt*の発現量を調べた。rRNAの発現量でBCG::pthyXの発現量を補正後、BCG Tokyo におけるそれぞれの遺伝子の発現量を 1 として比較した。なお、図は独立した3回の実験の平均値 (n=3) を示し、エラーバーは標準偏差を示す。* : 親株に対する統計的有意差を示す。(Student's t-test * : p<0.05、** : p<0.01、*** : p<0.001)

図6 7H10寒天培地における各菌株の増殖

BCG::pNN、BCG::pthyX、BCG::pgevT、BCG::pdfra、そしてBCG::pmtfrを7H10寒天培地に接種し、15、22、29日後の結果を示す。なお、図は計測したコロニーの平均値 (n=3) を示し、エラーバーは標準偏差を示す。同一文字間に有意差はなく、ab間に有意差ありと判定した。(Tukey法、 $p<0.05$)

図7 7H9液体培地における各菌株の増殖

BCG Tokyo、BCG::pthyXとBCG::pdfra、およびBCG::pgevTの濁度を 0.05 に調整後 37°C で培養した。なお、図は実験の平均値 (n=5) を示し、エラーバーは標準偏差を示す。* : 親株とBCG::pgevTに対するBCG::pthyX、親株とBCG::pgevTに対するBCG::pdfraの統計的有意差を示す (Tukey法、 $p<0.0028$)

表 1. 本研究で使用したプライマー

名称	配列 (5'-3')	増幅産物 (bp)	アニーリング温度 (°C)	目的
DFRAEX1	<u>AA</u> TCTAGAGATCCAGCTACCGCACTTGGATTC	830	62	遺伝子 クローニング
DFRAEX2	AAGGATCCGTAAGAACTACGATCCGCATCCG			
GCVTEX1	<u>AAGATCT</u> CGATTGACCGCACGTAACAC	1512	62	
GCVTEX2	AAGATCTCCGACGTCGTCGGCTGACAAC			
MTHFR1	<u>AA</u> TCTAGACAAGCCGTTGTGATGGCGATCGC	1684	55	
MTHFR2	T <u>TCTAGAC</u> GTGCACAACACACCCAGGCACCATG			
DFRA1	GGCTCATCCGTTAGTCCGCTTGGTG	164	62	定量 PCR
DFRA2	TGCTTGGCGAACTCGACATACCG			
GCVT1	GATGCAGATTGGTGATGCTCAGAC	181	62	
GCVT2	CAATACACCTTGTGCTGCGCCGAATC			
FOLD1	GTGCTTACCGCGCACGTAG	153	58	
FOLD2	GATCATGCTGGACGGCAAG			
FMT1	GCGTGCTATCGACCACGCTG	196	60	
FMT2	GTTTGACCCGTAAGTACCGATG			
PURU1	GACCACTGCTTGCTGGACTTG	123	56	
PURU2	CTTCCGTACGAGTGTGCGGAG			
GLYA1	GTCGACGAATTCACAGCCAC	153	60	
GLYA2	GAGCTGCGCCGTCAAGAATC			
FOLC1	CGATAGCATCGCGCAGGTTC	197	60	
FOLC2	CTGGAGCCGGTGTTCGATTC			
METE1	CGTCGACGGCCTTGCTCAGCAG	148	56	
METE2	CTGGAGATGACGAAGTGGTTC			
METH1	CTCGGCGATCATCGCCTCACG	136	56	
METH2	CTGCCGCGGTTGCGAACATCAAG			
16SrRNAF	AAGAAGCACCGCCAACACTAC	270	56	
16SrRNAR	TCGCTCCTCAGCGTCAGTTA			

下線は制限酵素サイトを示す

表 2. RNAseqによるBCG TokyoとBCG::pthyXの遺伝子発現の比較

Name	Region	Gene symbol	Protein name	Log ₂ fold change
JTY_RS00385	77647-78925	<i>glyA</i>	serine hydroxymethyltransferase	1.431
JTY_RS06040	1261819-1264099	<i>metE</i>	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase	1.504
JTY_RS07465	1579839-1580778	<i>fmt</i>	methionyl-tRNA formyltransferase	-1.473
JTY_RS10990	2355271-2358850	<i>metH</i>	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	-1.497
JTY_RS11450	2447457-2448561	<i>gcvT</i>	glycine cleavage system aminomethyltransferase T	1.740
JTY_RS12695	2704076-2705540	<i>folC</i>	folylpolyglutamate synthase protein	-1.547
JTY_RS14280	301935-3019837	<i>dhfrA</i>	dihydrofolate reductase	1.538
JTY_RS15335	3263517-3264450	<i>purU</i>	formyltetrahydrofolate deformylase	-1.042
JTY_RS16845	3572552-3573197	<i>tmk</i>	thymidylate kinase	-1.383
JTY_RS17185	3647242-3648526	<i>deoA</i>	thymidine phosphorylase	-1.026
JTY_RS17610	3755271-3756117	<i>folD</i>	5,10-methylene-tetrahydrofolate cyclohydrolase	-1.089
JTY_RS18835	4025413-4026256	<i>folP</i>	dihydropteroate synthase	-1.320