

# BCG *thyX* 変異株の作製とその解析

有村友紀

Construction and characterization of a *thyX* deletion mutant from  
*Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) .

Yuki ARIMURA

(平成27年12月11日受付)

## 諸言

ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) が引き起こす結核症は 3 大感染症のひとつで、その再燃に対して世界保健機構 (World Health Organization : WHO) が 1993 年に結核非常事態を宣言し、本邦においても厚生大臣 (当時) が 1999 年に結核緊急事態宣言を発表してから久しい。その後様々な対策が講じられたにもかかわらず、結核症は今なお世界レベルで蔓延しており、WHO の報告では 2014 年に全世界で約 960 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<sup>1)</sup>。我が国においても減少傾向にはあるものの、2014 年の新登録結核患者数は 19,615 人で、死亡者数は 2,099 人である<sup>2)</sup>。このように結核症は、今なお国内外の人々の健康への脅威をもたらす感染症として存続し続けている。

結核症の治療の中心は、複数の薬剤を併用する標準治療と呼ばれる化学療法である。これは一次抗結核薬であるリファンピシン (Rifampicin : RFP)、イソニアジド (Isoniazid : INH)、ピラジナミド (Pyrazinamide : PZA) にエタンブトール (Ethambutol : EB) あるいはストレプトマイシン (Streptomycin : SM) の組み合わせか、またはこれからピラジナミドを除いた組み合わせを長期に服用するものである。起因菌がこれらのいずれかに耐性を示す場合、また患者側の問題でこれらのいずれかが服用できない場合には二次抗結核薬であるカナマイシン (Kanamycin : KM)、カプレオマイシン (Capreomycin : CPM)、アミカシン (Amikacin : AMK)、エチオナミド (Ethionamide TH)、サイクロセリン (Cycloserine : CS)、パラアミノサリチル酸 (para-amino-salicylic acid : PAS)、レボフロキサシン (Levofloxacin : LVFX) およびその他のニューキノロン剤 (NQ 剤) が使用される。

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の蔓延が問題となっている。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。MDR-TB は RFP と 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 (CPM、AMK、KM) の 1 剤以上、かついずれかの NQ 剤 1 剤以上にも耐性を示す結核と定義される<sup>3)</sup>。

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。服用量が多いことに加えて比較的耐性菌の出現頻度が高いことから、近年ではその使用頻度が低い。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。PAS の作用機序と PAS 耐性菌における PAS 耐性機序は長らく不明であったが、Rengarajan らはチミジル酸合成酵素 thymidylate synthase (TS) 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<sup>4)</sup>。これまでに PAS 耐性の機序として *thyA* の変異に加え、ジヒドロ葉酸合成酵素 dihydrofolate synthase (DHFS) の遺伝子 *folC*<sup>5)</sup> と

リボフラビン生合成タンパク質 riboflavin biosynthesis protein の遺伝子 *ribD*<sup>6)</sup>の変異が報告されている。一方、PAS の作用機序として Chakraborty らは PAS がプロドラッグとして働くことを明らかにした<sup>7)</sup>。PAS は葉酸の前駆体であるパラアミノ安息香酸 para-aminobenzoate (PABA) と構造が類似しているため、PABA の代わりにジヒドロプロテロイン酸合成酵素 dihydropteroate synthase (DHPS) によりヒドロキシジヒドロプロテロイン酸 hydroxyl-dihydropteroate (HDHP) に代謝され、そして HDHP は DHFS によりヒドロキシジヒドロ葉酸 hydroxyl-dihydrofolate (HDHF) に代謝される。しかし、次の段階であるジヒドロ葉酸還元酵素 dihydrofolate reductase (DFRA) は HDHF を基質として利用できないため、HDHF が菌体内に蓄積されることになる。また HDHF は DFRA を阻害するため、葉酸代謝がこの段階で止まり、静菌作用を示す。

PAS 耐性に関与する遺伝子として最初に報告された *thyA* は古典的 TS である ThyA をコードする。ThyA は 2'-デオキシウリジン-5'-リン酸 2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (dUMP) をメチル化し 2'-デオキシチミジン-5'-リン酸 2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (dTMP) に変換する。真核細胞と多くの原核細胞は TS として ThyA を持つ。しかし、ThyA を持たない細菌が存在することが明らかになり、それらは ThyA と配列類似性を持たない新たに発見されたフラビン依存性 TS (FDTS) である ThyX を持つことが明らかにされた<sup>8)</sup>。さらに結核菌をはじめとした抗酸菌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<sup>9)</sup>。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<sup>10)</sup>。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ン酸 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) を必要とし、1 当量の水素化物イオンが FADH<sub>2</sub> 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<sup>11)</sup>。さらに ThyA の反応では一炭素供与体として 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 5,10-Methylenetetrahydrofolate (5,10-methylene-THF) を利用し、5,10-methylene-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-methylene-THF からテトラヒドロ葉酸 tetrahydrofolate (THF) が生成される<sup>11)</sup>。

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 耐性に関与する可能性があるため、牛型結核菌を弱毒化したワクチン株である *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) を親株として *thyA* と *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. 使用菌株と培養条件

使用菌株とプラスミドは表 1 に示した。

大腸菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  株は KM 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  またはカルベニシリン (Carbenicillin : Car) 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  含有 Luria-Bertani (LB) 液体培地と LB 寒天培地 (ともにナカライテスク) で培養した。

BCG の培養にはアルブミン・デキストロース・カタラーゼ (ADC) および 0.05% Tween80 添加 Middlebrook 7H9 液体培地 (Difco) (7H9-ADC-Tween80 液体培地)、ADC 添加 Middlebrook 7H10 寒天平板培地 (Difco) (7H10-ADC 寒天培地)、あるいはソートン (Sauton's) 培地 {0.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.0 g クエン酸、4.0 g L-アスパラギン、60 mL グリセリン、0.05 g クエン酸鉄アンモニウム (それぞれ 1 リットル当たり)、pH7.4} を用いた。なお必要に応じて培地には KM (終濃度 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、PAS (終濃度 0 から 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) およびスルファメトキサゾール (sulfamethoxazole : SMX、終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加した。

### 2. 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<sup>12)</sup>。なお、本研究で使用したプライマーを表 2 に示した。

### 3. 遺伝子欠損株の作製

BCG の *thyA* 欠損株  $\Delta thyA$  と *thyX* 欠損株  $\Delta thyX$  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した<sup>13)</sup>。自殺プラスミド pSVTHYA を構築するためには、はじめに、BCG Tokyo 株ゲノム上の *thyA* の上下流領域それぞれをプライマーセット THYAUF-THYAUUR と THYADF-THYADR を用いて polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅した。上流領域の増幅産物を BamHI と PstI で、また下流領域の増幅産物を PstI と EcoRI で消化したのち、pBlueScriptII SK (-) の BamHI と EcoRI サイトに同時に挿入し、pDTHYA を得た。次に自殺プラスミド pSVTHYX を構築するためには、BCG Tokyo 株ゲノム上の *thyX* の上下流領域それぞれをプライマーセット THYXUF-THYXUR と THYXDF-THYXDR を用いて PCR 法により増幅した。上流領域の増幅産物を BamHI と XhoI で、また下流領域の増幅産物を XhoI と EcoRI で消化したのち、pBlueScriptII SK (-) の BamHI と EcoRI サイトに同時に挿入し、pDTHYX を得た。KM 耐性遺伝子 *aphII* の発現カセットは pNN2<sup>14)</sup> を鋳型としてプライマーセット APHXBA1-APHXBA2 を用いて増幅した。増幅産物を XbaI で消化した後 pDTHYA と pDTHYX の SpeI サイトに挿入す

ることにより pDTHYA-KM と pDTHYX-KM を得た。*B. subtilis* の *sacB* は pDNR-Dual<sup>15)</sup> を鋳型として、プライマーセット SACBORF1-SACBORF2 を用いて増幅した。増幅産物を NdeI と PstI で消化し、pNPP<sup>16)</sup>の同じサイトに挿入し、pNPPSA を得た。次に pNPPSA を XbaI で消化し、pDTHYA-KM と pDTHYX-KM の XbaI サイトに挿入することで pSVTHYA と pSVTHYX をそれぞれ得た。

pSVTHYA と pSVTHYX を電気穿孔法で BCG Tokyo 株に導入し、KM 含有 7H10-ADC 寒天培地に播種した。3 週後に生じた集落を PCR 法により調べ、pSVTHYA または pSVTHYX がゲノム上の *thyA* または *thyX* 領域にシングルクロスオーバーによって挿入された株を選択した。選択した株は 7H9-ADC-Tween80 液体培地に継代し、その一部をスクロースを 10% 濃度で含有する 7H10-ADC 寒天培地に播種した。3 週後に生じた集落を PCR 法により調べ、ダブルクロスオーバーによって *thyA* または *thyX* の読み枠が欠落した株を選択し、 $\Delta thyA$  と  $\Delta thyX$  を得た。

#### 4. 発現プラスミド導入株の作製

ThyA と ThyX の発現プラスミド pNNTHYA と pNNTHYX は次のように作製した。BCG Tokyo 株のゲノム DNA を鋳型とし、プライマーセット THYAEX1 - THYEX2 と THYXEX1 - THYXEX2 を用いた PCR 法で *thyA* と *thyX* をそれぞれのプロモーターとともに増幅した。*thyA* と *thyX* の増幅産物を SpeI と XbaI でそれぞれ消化し、pNN2 の XbaI サイトに挿入することで *thyA* あるいは *thyX* の発現ベクター pNNTHYA と pNNTHYX を得た。

相補株の作製は  $\Delta thyA$  と  $\Delta thyX$  に pNNTHYA と pNNTHYX をそれぞれ導入することで行ない、得られた株を  $\Delta thyA/thyA^+$  あるいは  $\Delta thyX/thyX^+$  とした。また過剰発現株は BCG Tokyo 株に pNNTHYA あるいは pNNTHYX を導入することで行ない、得られた株をそれぞれ Tokyo/*thyA*<sup>+</sup> と Tokyo/*thyX*<sup>+</sup> とした。

#### 5. 増殖速度の測定

親株 (BCG Tokyo 株)、2 つの欠損株  $\Delta thyA$  と  $\Delta thyX$ 、2 つの過剰発現株 Tokyo/*thyA*<sup>+</sup> と Tokyo/*thyX*<sup>+</sup> を 7H9-ADC-Tween80 液体培地で 24 時間培養し、新鮮な同培地で希釈することにより波長 590 nm における濁度を吸光度 (OD, 光学濃度) 0.2 に調整した。その後、24 時間毎に OD を測定した。

#### 6. 薬剤感受性試験

BCG の各株は 7H9-ADC-Tween80 液体培地で 24 時間培養し、OD を 0.1 に調整した。この菌液を 1 白金耳ずつ PAS 非添加、PAS 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加、および SMX 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加の 7H10-ADC 寒天培地に播種し、37°C で 20 日培養した。

#### 7. RNA の抽出と逆転写

BCG 菌体からの全 RNA 抽出には TRIzol® Plus RNA Purification Kit (Life technologies) を用いた。

7H9-ADC-Tween80 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-ADC 寒天培地に流し込み、過剰の菌液を除去したのちに 37°C で培養した。24 時間後に 7H10-ADC 寒天培地上の菌体を回収し、直径 100  $\mu\text{m}$  のガラスビーズ 300  $\mu\text{L}$  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。その後の全 RNA の回収と精製はキットに添付のマニュアルに従い行なった。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、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 1  $\mu\text{g}$  の全 RNA をランダムヘキサマープライマーと 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なった。

#### 8. 定量 RT-PCR 法

BCG の各株における *thyA* と *thyX* の発現量は、Fivian-Hughes らの方法に従って定量 RT-PCR を行なうことで計測した<sup>17)</sup>。定量 RT-PCR には前項で作製した相補 DNA (cDNA) を鋳型とし、プライマーセット *thyA*qF-*thyA*qR、*thyX*qF-*thyX*qR、そして 16srRNAF-16srRNAR を用いた。反応試薬として SYBR green master mix (Biosystems) を用い、LightCycler 1.5 (Roche) を使用して行った。

#### 9. 統計処理

各実験系における統計解析には Student's test を用いた。なお、*p* 値が 0.05 以下を以て有意差ありと判定した。

## 結果

### 1. BCG における *thyX* の必須性

結核菌では *thyX* は必須と推定されているが<sup>18)</sup>、BCG について言及した報告は無い。そのため BCG のゲノムから *thyX* を削除することを試みた。2 段階相同組換え法を行ったところ、*thyA* 欠損株と同様に *thyX* 欠損株が作製された。*thyA* 欠損株を  $\Delta thyA$ 、*thyX* 欠損株を  $\Delta thyX$  とし、以下の実験に用いた。なお、 $\Delta thyA$  において *thyA* の発現が無いこと、 $\Delta thyX$  において *thyX* の発現が無いことは THYAPCR1-THYAPCR2 と THYXPCR1-THYXPCR2 を用いた RT-PCR 法により確認された (図 1)。そしてそれぞれの遺伝子相補株  $\Delta thyA / thyA^+$  と  $\Delta thyX / thyX^+$  では *thyA* と *thyX* の発現が認められた。

*thyX* を欠損させたことでチミジル酸あるいはチミン要求性を示す可能性を考え、これらを含まない最小培地であるソートン培地を用いた表面培養を行った。その結果、図 2 に示すように、 $\Delta thyA$  と同様に  $\Delta thyX$  もソートン培地表面で増殖し、チミジル酸およびチミンに対して栄養要求性を示さないことが明らかとなった。

### 2. BCG 変異株の増殖能

次に増殖速度を検討した。親株 (BCG Tokyo 株)、2 つの欠損株  $\Delta thyA$  と  $\Delta thyX$ 、2 つの過剰発現株 Tokyo/*thyA*<sup>+</sup> と Tokyo/*thyX*<sup>+</sup> の増殖速度を比較したが、いずれの株間においても対数増殖期では差が認められなかった (図 3)。ただし、*thyX* の過剰発現株 Tokyo/*thyX*<sup>+</sup> では定常域における濁度が親株の濁度よりも統計学的に有意に高かった。

### 3. 薬剤感受性

BCG Tokyo 株、 $\Delta thyA$ 、 $\Delta thyX$ 、Tokyo/*thyA*<sup>+</sup>、および Tokyo/*thyX*<sup>+</sup> の 5 株の PAS 感受性を検討した。PAS 非含有 7H10-ADC 寒天培地では 5 株ともに増殖が認められた (図 4)。PAS 含有培地では供試したいずれの PAS の濃度においても  $\Delta thyA$  と Tokyo/*thyX*<sup>+</sup> のみ増殖を認め、PAS 耐性を示した。一方、 $\Delta thyX$  は PAS 感受性のままであった。

SMX (終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 含有 7H10-ADC 寒天培地では PAS 耐性を示した  $\Delta thyA$  と Tokyo/*thyX*<sup>+</sup> を含めて、いずれの株も増殖を認めなかった (図 5)。

### 4. BCG 変異株の *thyX* と *thyA* の発現量

定量 RT-PCR を行なうことで  $\Delta thyA$  と Tokyo/*thyX*<sup>+</sup> における *thyA* と *thyX* の発現量を親株である BCG Tokyo 株のそれらと比較した。図 6 に示すように Tokyo/*thyX*<sup>+</sup> における *thyA* の発現量は BCG Tokyo 株に対して低下していた。*thyX* の発現量は  $\Delta thyA$  と Tokyo/*thyX*<sup>+</sup> のいずれにおいても BCG Tokyo 株に対して有意に上昇していた。

## 考察

本研究において世界で初めて抗酸菌の *thyX* 欠損株が作製された。その結果、明らかとなった最も重要な点は次の2点である。

1. BCG では *thyX* は必須遺伝子ではなかった。

2. *thyX* 欠損株  $\Delta thyX$  は PAS 耐性を示さず、*thyX* の過剰発現株 Tokyo/*thyX*<sup>+</sup> は PAS 耐性を示した。

Sassetti らはトランスポゾンを用いたスクリーニングを行うことにより、ヒト型結核菌の必須遺伝子のリストを報告したが<sup>18)</sup>、彼らの報告では *thyX* は必須遺伝子のリストに含まれており、それ以来、抗酸菌では *thyX* は必須遺伝子として扱われてきた。さらに Fivian-Hughes らも、結核菌 H37Rv を用いて、野生株の結核菌では相同組換えによってゲノム上の *thyX* を欠損させることができなかつたが、*thyX* を挿入したプラスミドを保有する結核菌ではゲノム上の *thyX* を欠損させることができたことを報告し、抗酸菌では *thyX* は必須遺伝子であるとした<sup>17)</sup>。今回の実験では BCG Tokyo 株を用いたが、チミンの合成経路や葉酸代謝経路にある各酵素およびその遺伝子はヒト型結核菌と牛型結核菌で共通であり、*thyX* 欠損株作製の成否は種間の違いとは考えにくい。しかし、ヒト型結核菌においても *thyX* 欠損株の作製が可能である、と結論を下すためにはヒト型結核菌を用いて実証する必要がある。

今回  $\Delta thyX$  はゾートン最小培地で増殖を示したことは、ThyA と ThyX はともに TS 活性を有する点からは合理的である。また結核菌と BCG とともに、*thyA* の発現レベルに比較すると *thyX* の発現レベルは顕著に低いことから<sup>17)</sup>、妥当と考えられる。

抗酸菌の葉酸代謝経路と関連する経路の一部を図7に示す。抗酸菌の PAS 耐性に関与する遺伝子として Rengarajan らが *thyA* の変異を報告して以来<sup>4)</sup>、これまでに *folC*<sup>5)</sup> と *ribD*<sup>6)</sup> が報告されている。*ribD* の産物であるリボフラビン生合成タンパク質は本来葉酸代謝には直接関与しないが、PAS の代謝産物であり活性型であるヒドロキシジヒドロ葉酸を分解する。野生株における *ribD* の発現量は低い、*ribD* の上流領域に変異が入り転写量が増加すると PAS に耐性になることが報告されている<sup>6)</sup>。PAS 耐性となる *folC* の変異部位はその産物である DHFS のジヒドロプロテイン酸 DHP 結合部位であり、そのため HDHP から HDHF への合成能が低下するため、PAS 耐性を獲得すると考えられている<sup>5)</sup>。

これらの変異に対して *thyA* の変異が PAS 耐性につながる機構は明らかにされていなかった。しかし、今回 *thyX* の過剰発現株 Tokyo/*thyX*<sup>+</sup> が PAS 耐性を示したことから次のように考えられる。抗酸菌はチミンキナーゼ thymidine kinase (TK) を持たずチミンのサルベージ経路が働かない。そのため、チミンの合成には *de novo* の経路しか利用できない。すなわち TS の活性は必須である。dUMP をメチル化して dTMP に変換する際に、ThyA では 5,10-methylene-THF は DHF に酸化されるが、ThyX の反応では



5,10-methylene-THF から THF が生成される<sup>11)</sup>。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 HDHF によって DFRA の活性が阻害されると結果的に 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 5,10-methylene-THF から DHF への循環は行われなくなる。この場合、ThyX の活性は維持されているため、5,10-methylene-THF から THF に循環され、PAS の代謝産物である HDHF によって DFRA が阻害されることにより *de novo* の THF の合成が抑制されても THF の枯渇は防止されると考えられる。*thyX* 過剰発現株の場合には ThyA の活性は維持されていると考えられるが、図 6 に示したように *thyX* の発現量が顕著に高くなっていることから、ThyA の活性に対して ThyX の活性が相対的に高いため、5,10-methylene-THF から THF への循環が主になっていると考えられる。

5,10-methylene-THF から THF への循環が主となっている際における、*de novo* の THF の必要性について検討するために DHPS の強力な阻害剤である SMX 含有 7H10-ADC 寒天培地を用いて PAS 耐性株である  $\Delta$ *thyA* と Tokyo/*thyX*<sup>+</sup> の培養を行ったところ、PAS 感受性株同様にこれらの株も増殖が認められなかった。すなわち、5,10-methylene-THF から DHF への循環が行われずに THF に循環される場合においても *de novo* の THF 合成は必要であることを示している。PAS の作用機序は、PAS が PABA と拮抗して DHPS によって代謝されることによる<sup>7)</sup>。すなわち DHPS に対する PAS と PABA のアフィニティーの違いに由来する。従ってこの結果は PAS 存在下でも DHP への PABA の取込みは完全には無くなっていないことを反映していると考えられる。

ThyX は真核細胞には存在しないこと、またその構造及び酵素の作用機序は真核細胞に存在する ThyA と大きく異なることから、抗菌薬の新たな標的と考えられている。結核症においても結核菌では *thyX* が必須と考えられてきたことから、結核菌の ThyX を標的とした新規抗結核剤の開発が進められ、すでに候補化合物が報告されている<sup>19)</sup>。本研究の結果は結核菌の *thyX* も必須ではない可能性を示すものであり、ThyX を標的とする化合物単独では抗結核薬としての効果が十分に示されない可能性がある。しかしながら PAS と併用することにより効果的な治療法になると考えられる。

## 結論

1. BCG では *thyA* とともに *thyX* は必須遺伝子でないことが示された。
2. BCG における *thyX* の過剰発現は PAS 耐性を附与した。

## 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機能再生・再建科学穿孔顎口腔再建外科学分野飯田征二教授、ならびに口腔微生物学分野、顎口腔再建外科学分野、歯科矯正学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

## 文献

- 1) World Health Organization. Fact sheet on tuberculosis.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>
- 2) 厚生労働省. 平成 26 年結核登録者情報調査年報集計結果 (概況).  
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou03/14.html>
- 3) World Health Organization. Addressing the threat of tuberculosis caused by extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Wkly Epidemiol Rec 2006; 81:386-390.
- 4) 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. 2004;53:275-282.
- 5) 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. 2014;58:1479-1487.
- 6) 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. 2013;288:23447-23456.
- 7) 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 2013;339:88-91.
- 8) Myllykallio H, Lipowski G, Leduc D, Filee J, Forterre P, Liebl U. An alternative flavin-dependent mechanism for thymidylate synthesis. Science 2002;297:105-107.
- 9) 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. 2010;59:212-225.
- 10) Sampathkumar P, Turley S, Ulmer JE, Rhie HG, Sibley CH, Hol WG. Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* flavin dependent thymidylate synthase (MtbThyX) at 2.0Å resolution. J Mol Biol. 2005;352:1091-1104.
- 11) 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 2009;458:919-923.
- 12) Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Terasaka K, Totsuka M, Kobayashi K, Yukitake H, Yamada T. Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. Infect Immun. 1990;58:4049-4054.
- 13) Pelicic V, Reyrat JM, Gicquel B. Generation of unmarked directed mutations in mycobacteria, using sucrose counter-selectable suicide vectors. Mol Microbiol.

1996;20:919-925.

14) 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.* 1997;23:303-310.

15) GenBank accession number DQ666273.1.

16) Fujiwara N, Ohara N, Ogawa M, Maeda S, Naka T, Taniguchi H, Yamamoto S, Ayata M. Glycopeptidolipid of *Mycobacterium smegmatis* J15cs affects morphology and survival in host Cells. *PLoS One.* 2015;10:e0126813.

17) Fivian-Hughes AS, Houghton J, Davis EO. *Mycobacterium tuberculosis* thymidylate synthase gene *thyX* is essential and potentially bifunctional, while *thyA* deletion confers resistance to *p*-aminosalicylic acid. *Microbiology.* 2012;158:308-318.

18) Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* 2003;48:77-84.

19) Parchina A, Froeyen M, Margamuljana L, Rozenski J, De Jonghe S, Briers Y, Lavigne R, Herdewijn P, Lescrinier E. Discovery of an acyclic nucleoside phosphonate that inhibits *Mycobacterium tuberculosis* ThyX based on the binding mode of a 5-alkynyl substrate analogue. *ChemMedChem.* 2013;8:1373-1383.

## 表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 顎口腔再建外科学分野

(指導 飯田 征二教授)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔微生物学分野

(委託 大原 直也教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 57 回歯科基礎医学会学術大会 (2015 年 9 月, 新潟)

第 68 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (2015 年 10 月, 岡山)

## 図の説明

### 図 1. *rrna*、*thyA*、および *thyX* の各遺伝子の発現

BCG Tokyo、 $\Delta thyA$ 、 $\Delta thyX$ 、 $\Delta thyA/thyA^+$ 、および  $\Delta thyX/thyX^+$  の cDNA を鋳型とし、*rrna*、*thyA*、および *thyX* の発現を確認した。

### 図 2. ソートン培地表面における各菌株の増殖

BCG Tokyo、 $\Delta thyA$ 、 $\Delta thyX$ 、Tokyo *thyA*<sup>+</sup>、および Tokyo *thyX*<sup>+</sup> をソートン培地に接種し、21 日後の結果を示す。

### 図 3. 7H9-ADC-Tween80 液体培地における各菌株の増殖

BCG Tokyo、 $\Delta thyA$ 、 $\Delta thyX$ 、Tokyo *thyA*<sup>+</sup>、および Tokyo *thyX*<sup>+</sup> の濁度を 0.2 に調整後 37°C で培養した。

### 図 4. PAS 添加 7H10-ADC 寒天培地における各菌株の増殖

BCG の各株は 7H9-ADC-Tween80 液体培地で 24 時間培養し、濁度を 0.1 に調整した。この菌液を 1 白金耳ずつ PAS 非添加、PAS 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加 7H10-ADC 寒天培地に播種し、37°C で 20 日培養した。

### 図 5. SMX 添加 7H10-ADC 寒天培地における各菌株の増殖

BCG の各株は 7H9-ADC-Tween80 液体培地で 24 時間培養し、濁度を 0.1 に調整した。この菌液を 1 白金耳ずつ SMX 非添加と SMX 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加 7H10-ADC 寒天培地に播種し、37°C で 20 日培養した。

### 図 6. $\Delta thyA$ と Tokyo *thyX*<sup>+</sup> における *thyA* と *thyX* の発現量

定量 PCR 法によって  $\Delta thyA$  と Tokyo *thyX*<sup>+</sup> における *thyA* と *thyX* の発現量を調べた。*rrna* の発現量で *thyA* と *thyX* の発現量を補正後、BCG Tokyo における *thyA* と *thyX* の発現量を 1 として比較した。

### 図 7. 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。PAS の代謝産物は斜体字で示した。