

機関番号：82603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890309

研究課題名（和文） 非結核性抗酸菌における薬剤耐性メカニズムの解析

研究課題名（英文） Molecular characterization of antibiotic resistance mechanism in nontuberculous mycobacteria.

研究代表者 和知野 純一 (WACHINO JUN-ICHI)

国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官

研究者番号：00535651

研究成果の概要（和文）：

*Mycobacterium avium*における薬剤耐性因子を特定するためにランダム変異体を作製した。その結果、薬剤耐性に関わる因子として、排出システム、代謝、細胞壁合成などに関与する遺伝子が特定された。本研究では*kasB*欠損株、MAV\_2241欠損株に着目し研究をすすめた。*kasB*欠損株およびMAV\_2241欠損株は、リファンピシンやクラリスロマイシンなど多くの抗菌薬の最小発育阻止濃度(MIC)が野生株に比べ有意に低かった。さらに、界面活性剤に暴露に対する抵抗性が*kasB*欠損株では有意に減弱していた。*M. avium*に対して新たな抗菌薬を開発する場合、細胞壁の合成に関与する蛋白が標的部位として有望であることを示唆する結果となった。

研究成果の概要（英文）：

We generated a random transposon gene-knockout library of *Mycobacterium avium* to identify the genes responsible for antibiotic resistance. As a result, a variety of genes for efflux system, cell metabolism, and cell wall synthesis were identified as factors involved in antibiotic resistance. Among them, we focused on a *kasB*-knockout mutant ( $\Delta kasB$ ) strain and an MAV\_2241-knockout mutant ( $\Delta MAV_2241$ ) strain, and characterized them in detail. The  $\Delta kasB$  and  $\Delta MAV_2241$  strains showed the reduction in MICs (minimal inhibitory concentration) of various antibiotics including clarithromycin compared to that of wild-type strain. In addition, the  $\Delta kasB$  strain increased susceptibility to the detergent such as SDS. Proteins involved in cell wall synthesis in *Mycobacteria* seem to be attractive target for antibiotic development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000		1,070,000
2010年度	970,000		970,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000		2,040,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：非結核性抗酸菌，薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

MACを含む非結核性抗酸菌による新規罹

患患者は年間5000人程度とされ、本邦においてははけして少なくない状況である。非結核

性抗酸菌による感染症治療の戦略は、リファンピシン、エタンブトール及びクラリスロマイシンの3剤併用療法が基本である。それらの中でも治療に効果を示しているのはクラリスロマイシンであるとされ、他2剤の治療効果は付随的であるとされている。よって、クラリスロマイシン耐性MACに対し、現存する抗菌薬での治療効果はほぼ期待できない。さらに問題なことに、クラリスロマイシン耐性MACが近年漸増しており、今後MACによる感染症の治療の難渋化が懸念される。したがって、MACに対する効果的な新薬の開発は急務の課題となっている。

## 2. 研究の目的

結核菌に対してはリファンピシン、エタンブトール、イシニアジドなど多種類の抗菌薬の効果が認められているが、同属のMACにはリファンピシン、エタンブトール及びクラリスロマイシンの3種類しか基本的に認められていない。これはMACが生来多くの抗菌薬に対し自然耐性を有するためだと考えられる。しかし、それを裏付けるMAC特有の遺伝子や蛋白について特定された例はほとんどない。

また、MACに有用な新規抗菌薬開発のためには、MACが有する自然耐性メカニズムを回避するようなかたちで新たな化合物を探索する必要がある。しかし、上述したようにMACの自然耐性に関する基礎研究はほとんど行われておらず、耐性に関与する遺伝子や蛋白が報告された例は多くない。そこで本研究ではMACの薬剤耐性メカニズム(自然耐性)に関する基礎研究を行い、新たな抗菌薬開発の一助としたいと考えている。

## 3. 研究の方法

### a) ランダム変異体の作製

トランスポゾン変異体の作製には市販品のトランスポゾンTn5(EPICENTRE社)を利用する。臨床分離株およびATCC標準株を用いて変異体を作製する。

### b) 薬剤感受性試験の実施

測定対象とする薬剤としてクラリスロマイシン、エタンブトール、ストレプトマイシン、リファンピシン、アンピシリン等を用意する。薬剤感受性試験は寒天平板希釈法にて行い、培地は7H10(OADC) agarを用いる。微量液体希釈法による測定はプロスミック MTB-1(極東製薬)にて行う。

### c) トランスポゾン挿入位置の確認

薬剤感受性が変化した変異体については個別にDNAを抽出する。ランダムプライマーを利用したnested-PCRとシーケンス解析によりトランスポゾン挿入位置を特定する。

破壊された遺伝子の機能については *M. avium* 104株のゲノム情報を基に推定する。

d) 各種化合物に対する感受性の変化の観察  
SDS、リゾチーム、抗菌ペプチドなどに野生株と変異体を一定時間接触させ、その後の生菌数をカウントする。

### e) 増殖曲線の作成及び形態観察

7H9液体培地を用いて増殖曲線を作成する。各種顕微鏡を用いて形態観察を行う。

## 4. 研究成果

平成21年度は *M. avium* のランダム変異体の作製方法を確立した。まず、臨床分離株8株、ATCC標準株4株についてTn5によるランダム変異体の作製を試みた。臨床分離株においては1アッセイあたりの変異体の作製率が<100 cfu/assayと非常に低く、ランダム変異体の作製方法としては問題があった。培養条件や菌体回収時間等を検討したが、効率の改善には至らなかった。ATCC標準株について同様の方法で変異体作製を試みたところ、菌株間でバツキはあったものの、臨床分離株よりは概ね作製効率は良好であった。最も作製効率が良好であった株はATCC17942株であった(1000 cfu/assay)。そこで、本研究ではATCC17942株を使用し、ランダム変異体を作製するものとした。

ATCC17942株について合計3000程度の変異体を作製した。その中から1000株を任意に選び、それらのクラリスロマイシン、エタンブトール、アンピシリン、リファンピシン、ストレプトマイシンの4薬剤の最小発育阻止濃度(MIC)を寒天平板希釈法にて測定した。いずれかの薬剤に対する感受性が2管以上変化した変異体についてはgenomic DNAを抽出後、ランダムプライマーを用いたPCRおよび塩基配列解析によりTn5挿入位置を確認した。これらの作業により、*M. avium*の薬剤感受性に影響を与える因子(遺伝子)としてABCトランスポーターや細胞壁合成関連酵素など様々な因子が特定された。

平成22年度は前年度に作製された各種の変異体の中から *KasB* 遺伝子欠損株 ( $\Delta kasB$  株) を選び出し、解析を行った。*kasB* は抗酸菌群特有の細胞壁成分であるミコール酸の生合成に関与することが結核菌等の研究からあきらかとなっている。野生株と  $\Delta kasB$  株の最小発育阻止濃度を寒天平板希釈法にて測定した結果、ストレプトマイシン、エタンブトール、ガチフロキサシン、レボフロキサシン、アンピシリン、リファンピシン、クラリスロマイシン、エリスロマイシンの感受性において2~4管程度の差が確認された。

さらに、SDSなどの界面活性剤に一定時間暴露し、生存菌数をカウントしたところ、野生

株よりも  $\Delta kasB$ 株の方が有意に少なかった。液体培養における野生株と  $\Delta kasB$ 株の増殖速度に顕著な差は見られなかった。

これらの結果から  $\Delta kasB$ 株に見られた薬剤感受性の増加は、*kasB*遺伝子の機能不全により細胞壁の生合成に何らかの異常をきたし、抗菌薬の透過性が野生株よりも亢進したことに原因があるものと予測された。そこで、形態学的に野生株と  $\Delta kasB$ 株の間で差があるかどうかを検証するために、各種染色法を用いて観察を行った。しかし、両者に顕著な差は見られなかった。

また、MAV\_2241遺伝子欠損株 ( $\Delta$ MAV\_2241株)についても検討を行った。 $\Delta$ MAV\_2241株は野生株に比べ、アンピシリンで4管以上、レボフロキサシンで2管、ストレプトマイシンで2管のMIC低下が見られた。野生株と  $\Delta$ MAV\_2241株の形態を観察したところ、野生株がrough型の皺状のコロニー形態を示す一方、 $\Delta$ MAV\_2241株はsmooth型のコロニー形態を示し、顕著な差が見られた。MAV\_2241遺伝子は結核菌のRv2224c遺伝子と相同性があり、機能的には類似なものと考えられる。Rv2224c遺伝子はcell membrane lipoproteinをコードしている。Rv2224c遺伝子を欠損させた結核菌では、マウスに対する病原性の低下、リゾチームに対する感受性の増加、マクロファージにおける炎症性サイトカイン産生誘導能の低下等、様々な変化が生じることが報告されている。したがって、MAV\_2241遺伝子も*M. avium*の病原性や薬剤抵抗性に関与しているものと予測された。

本研究では、*M. avium*の薬剤耐性に関与する遺伝子として*kasB*遺伝子と  $\Delta$ MAV\_2241遺伝子を特定した。いずれの遺伝子も変異体作製が可能であったことから生育に必須な遺伝子ではないものと考えられたが、*M. avium*において薬剤の感受性に影響を与える因子であることがわかった。興味深いことに、いずれも抗酸菌群特有の細胞壁合成や構成成分に関連する遺伝子であり、細胞壁の存在が薬剤への抵抗性を示す上で重要な役割を果たしていることがあきらかとなった。また、抗酸菌群の細胞壁は薬剤への抵抗性を示す他に、病原性にも関与している場合が多い。したがって、*M. avium*などの抗酸菌群に対して有効な抗菌薬の開発を目指した場合、細胞壁の合成に関与する蛋白が標的部位として有望であるものと考えられた。これらを標的することで、既存の薬剤の効果を高めたり、病原性を減弱させることも可能であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

Mori Shigetaru, Shibayama Keigo, Wachino Jun-ichi, Arakawa Yoshichika.  
Structural Insights into the Novel Diadenosine 5',5'''-P(1),P(4)-Tetraphosphate Phosphorylase from Mycobacterium tuberculosis H37Rv.  
J Mol Biol. 2011 Jul 1;410(1):93-104. 査読あり

Mori Shigetaru, Shibayama Keigo, Wachino Jun-ichi, Arakawa Yoshichika.  
Crystallization and preliminary X-ray analysis of the diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate phosphorylase from Mycobacterium tuberculosis H37Rv.  
Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2010 Mar 1;66(Pt 3):279-81. 査読あり

Mori Shigetaru, Shibayama Keigo, Wachino Jun-ichi, Arakawa Yoshichika.  
Purification and molecular characterization of a novel diadenosine 5',5'''-P(1),P(4)-tetraphosphate phosphorylase from Mycobacterium tuberculosis H37Rv.  
Protein Expr Purif. 2010 Jan;69(1):99-105. 査読あり

[学会発表] (計2件)

結核菌由来新規 diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate 加リン酸分解酵素の機能構造解析  
森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親  
日本生物工学会 2010 年度大会, 2010 年 10 月, 福岡.

結核菌由来新規 diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate 加リン酸分解酵素の結晶構造解析.  
森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親  
日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月, 東京.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和知野 純一 (WACHINO JUN-ICHI)  
国立感染症研究所・細菌第2部・  
主任研究官

研究者番号：00535651

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：