

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790423

研究課題名（和文）結核菌の新規イソニアジド耐性機序の解明

 研究課題名（英文）Molecular characterization of novel isoniazid resistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*

研究代表者

安藤 弘樹（Ando Hiroki）

国立国際医療研究センター研究所・感染症制御研究部・上級研究員

研究者番号：70462786

研究成果の概要（和文）：結核菌における新しいイソニアジド（INH）耐性変異を同定し、変異がどのようにして INH 耐性を与えるかを解明した。INH 耐性結核菌臨床分離株の中には耐性機序が不明な菌株すなわち既知耐性変異を有していないものが多く存在する点に着目した。これらの菌株において、潜在的な耐性遺伝子及びその転写調節領域と翻訳調節領域を調べた結果、複数の新規変異を同定した。遺伝学的手法を用いて新規変異の特徴付けを行った。

研究成果の概要（英文）：Novel isoniazid (INH) resistance mutations were identified and characterized in *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). I collected INH-resistant *Mtb* clinical isolates and found that many of them have no mutations in known INH resistance genes. I identified several novel mutations in these isolates, and analyzed their roles in INH resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：結核、薬剤耐性、イソニアジド

1. 研究開始当初の背景

イソニアジド（INH）は強力な抗結核薬であり、治療の中軸をなしている。およそ半世紀にわたる使用によって INH 耐性菌が出現し、結核治療における大きな障害になっている。これまでに *katG* と *inhA* が INH 耐性遺伝子として報告されている。KatG は INH の活性化に必要であり、InhA は INH の標的である。しかし、INH の作用機序が完全に解明されたわけではなく、同様に耐性機序にも不明な点が多

い。耐性機序の解明は INH 耐性結核の診断や新規薬剤開発に直接繋がり、当該分野の最重要課題だと考えられる。

2. 研究の目的

既知の INH 耐性遺伝子に変異を持たない INH 耐性結核菌臨床分離株を同定し、これら菌株が有する新規 INH 耐性機序を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1). INH 耐性結核菌臨床分離株の収集

国立国際医療研究センターが保有している結核菌臨床分離株の中から INH 耐性菌を収集した。なお、これら臨床分離株は患者情報と完全に切り離されている。

(2). 既知耐性遺伝子の塩基配列解析

収集した INH 耐性菌の既知 INH 耐性遺伝子 (*katG* と *inhA* の全長及び *inhA* のプロモーター領域) の塩基配列を調べた。

(3). 潜在的 INH 耐性遺伝子の塩基配列解析

既知 INH 耐性遺伝子 (*katG*, *inhA*) はいずれもオペロンの下流遺伝子であること、既報論文の大多数は *katG* のプロモーター領域の変異を調べていないこと、*katG* の上流遺伝子はオペロンの負の転写制御因子をコードしていること、に着目し、オペロン全体とその上流 300bp の塩基配列を調べた。

(4). 新規 INH 耐性遺伝子候補の機能解析

①. *furA* c41t 変異の解析

furA は *furA-katG* オペロンの負の転写制御因子をコードしている。変異遺伝子産物を精製して、プロモーター領域に対する electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を行い、変異が負の転写制御に与える影響を調べる。また、結核菌 *furA-katG* 欠失株において当該変異を再構築し、当該変異によって INH 耐性が与えられることを確認する。

②. *furA-katG* 遺伝子間領域における変異の解析

furA と *katG* の遺伝子間領域に *katG* の発現に影響を与えるシスエレメントが存在することが報告されている。β-galactosidase assay を行い、変異が *katG* 発現量に与える影響を調べる。また、*furA-katG* 欠失株において当該変異を再構築し、INH 耐性が与えられることを確認する。

③. *fabG1* g609a 変異の解析

fabG1 は細胞壁構成成分ミコール酸の合成に関わる必須遺伝子をコードしている。g609a 変異がアミノ酸置換を伴わないサイレント変異であること、*fabG1* の過剰発現は INH 耐性を与えないことから当該変異が下流に位置する INH 耐性遺伝子 *inhA* の発現に与える影響を調べる。β-galactosidase assay を行い、*inhA* 発現量への影響を調べる。影響が見られた場合、当該変異を持つ株における *inhA* の転写開始点を決定する。また、H37Rv において変異を再構築し、当該変異によって INH 耐性が与えられることを確認する。

4. 研究成果

(1). INH 耐性結核菌臨床分離株の収集

108 株の INH 耐性結核菌臨床分離株を収集した。また対照群として INH 感受性結核菌臨床分離株を 400 株収集した。

(2). 既知耐性遺伝子の塩基配列解析

臨床分離株からゲノム DNA を抽出し、*katG* と *inhA* の全長及び *inhA* のプロモーター領域を PCR 増幅し、塩基配列を調べた。108 株の INH 耐性株のうち、42 株 (39%) はいかなる変異も有していなかった。この結果は、未知の INH 耐性機序の存在を示唆するものである。INH の作用機序及び耐性機序の更なる理解には、この 42 株が持つ未知耐性機序を解明することが不可欠である。

(3). 潜在的 INH 耐性遺伝子の塩基配列解析

3-(3) の理由から、*furA-katG* と *fabG1-inhA* の両オペロン全体とその上流 300bp の塩基配列を調べた。4-(2) の結果も合わせると、*katG* において 15 種類の新規変異、*furA* において 1 種類の新規変異、*furA-katG* オペロンの遺伝子間領域において 3 種類の新規変異、*fabG1* において 1 種類の新規変異を同定した。これらの変異は INH 感受性株では見つからなかった。INH 耐性に関与している可能性がある。

(4). 新規 INH 耐性遺伝子候補の機能解析

①. *furA* c41t 変異の解析

結核菌 *furA-katG* 欠失株において当該変異を再構築した。INH 耐性は与えられなかった。また、FurA が *furA-katG* オペロンの負の転写制御因子であることから、EMSA によって変異が FurA の結合能に影響を与えるか調べた。EMSA において変異の影響は確認できなかった。

②. *furA-katG* 遺伝子間領域における変異の解析

結核菌 *furA-katG* 欠失株において当該変異を再構築した。3 種類の変異のうち、Int g-7a 変異と Int a-10c 変異が INH 耐性を与えた。これらの変異は *katG* の上流のポリプリン配列内にある。変異が SD 配列を変えることで、*katG* の発現が抑制されるのではないかと考えた。そこで、当該変異を含む *furA-katG-lacZ* gene fusion を作製し、Int 変異の *katG* 発現量への影響を調べた。当該変異によって *katG* の発現は抑制されていた。また、ウェスタン解析において *katG* 発現量が抑制されていることを再確認した。「*katG* の発現を抑制すること」による INH 耐性を立証した。

③. *fabG1* g609a 変異の解析

g609a 変異は、アミノ酸置換を伴わないサイレント変異である。しかし、結核菌標準株

H37Rvにおいて変異を再構築するとINH耐性が与えられた。この結果は、変異もしくは変異を含む周辺領域がINH耐性遺伝子の発現に関与している可能性を示唆している。そこで、INH耐性遺伝子であり、*fabG1*の下流に位置する*inhA*の発現量を調べた。ウェスタン解析の結果、当該一変異によって*inhA*発現量が増加していた。また、*fabG1-inhA*の本来のプロモーターを持たない*fabG1-inhA-lacZ* gene fusionを作製し、変異の*inhA*発現量への影響を調べた。当該変異によって発現量は増加していた。これらの結果は、変異を含む周辺領域が*inhA*のプロモーターとして機能している可能性を示唆している。当該変異による*inhA*転写産物量の増加と転写開始点を定めるためにRNA-seq解析を実施した。その結果、当該変異を基点とした*inhA*転写産物が確認され、変異の下流から新たに転写が始まっていることが判明した。これらの結果から、当該変異を含む周辺領域は*inhA*の新たなプロモーターとして機能していると考えられる。「*inhA*の発現を促進すること」によるINH耐性化を立証した。

本研究によって複数のINH耐性機序が明らかになった。本研究結果は迅速遺伝子診断法、抗結核薬の開発に繋がると考えられる。今後は、INHの作用機序、耐性機序の全容解明を目指すとともに、変異情報を用いた診断法の開発にも注力していきたい。

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4件)

- ① Ando H, Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Kato S, Mori T, Kirikae T.
Downregulation of *katG* expression is associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.
Mol Microbiol, 79(6):1615-1628, 2011.
doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07547.x.
査読有.
- ② Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Kato S, Mori T, Kirikae T.
Evaluation of a line probe assay for rapid detection of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*.

J Med Microbiol, 60(Pt 2):184-188, 2011.
doi: 10.1099/jmm.0.024729-0. 査読有.

- ③ Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Sekiguchi JI, Kato S, Mori T, Kirikae T.
Pyrazinamide resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Japan.
Clin Microbiol Infect, 16(8):1164-1168, 2010. doi:
10.1111/j.1469-0691.2009.03078.x. 査読有.

- ④ Ando H, Kondo Y, Suetake T, Toyota E, Kato S, Mori T, Kirikae T.
Identification of *katG* mutations associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.
Antimicrob Agents Chemother, 54(5):1793-1799, 2010. doi:
10.1128/AAC.01691-09. 査読有.

[学会発表] (計4件)

- ① Ando H, Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Kato S, Mori T, Kirikae T.
Downregulation of *katG* expression is associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.
IUMS 2011 Congress, Poster No. P-BA28-23, Japan, September 2011.
- ② Ando H, Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Kato S, Mori T, Kirikae T.
Mutations in the *furA-katG* intergenic region decrease *katG* expression and confer isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.
4th Congress of European Microbiologists: FEMS 2011, Poster No. 67, Switzerland, June 2011.
- ③ 安藤弘樹, 加藤誠也, 森亨, 切替照雄.
結核菌の*fabG1*遺伝子内サイレント変異によるイソニアジド耐性機序の解明.
第33回日本分子生物学会年会・第83回日本

生化学会大会 合同大会, ポスター番号
1P-1072, 兵庫県神戸市, 2010年12月.

④ Ando H, Kato S, Mori T, Kirikae T.
Down-regulation of *katG* expression is
associated with isoniazid resistance in
Mycobacterium tuberculosis.
110th General Meeting of the American
Society for Microbiology, Poster No.
U-3153, USA, May 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 弘樹 (Ando Hiroki)
国立国際医療研究センター研究所・感染症
制御研究部・上級研究員
研究者番号 : 70462786

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :