

- 'hot spots'.2000. INT J Tuberc Lung Dis. 4(5):387-394.
- 6) Park, Y., Bai,G., and Kim,S. 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the western pacific region. J. Clin. Microbiol. 38:191-197.
- 7) Yang,Z.H., de Hass,P.E.W.,van Soolingen,D.,et al. 1994. Restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Greenland during 1992. Evidence of tuberculosis transmission between Greenland and Denmark. J. Clin. Microbiol. 32: 3018-3025.
- 8) Woelffer, G.B., Bradford, W.Z.,Paz,A., and Small,P.A. A computer-assisted molecular epidemiologic approach to confronting the reemergence of tuberculosis. 1996. Am.J. Med. Sci. 311:17-22.
- 9) 大森正子.日本の結核の現状と将来予測.1994. 治療. 76: 17-24.
- 10) Orme,I.M. Virulence of recent notorious *Mycobacterium tuberculosis* isolates.1999. Tubercule and Lung Disease. 76:379-381.
- 11) Shafer. R.W., Singh, S.P., Larkin,C., and Small,P.M. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in an immunocompetent patient. 1995. Tubercule and Lung Disease. 76:575-577.
- 12) Robert, W.S., Small, P.M., Larkin, C., Singh,S.P.,Kelly,P.,Sierra,M.F.,Schoolnik,G., and Chirgwin,K.D. Temporal trends and transmission patterns during the emergence of multidrug-resistant tuberculosis in New York city: A molecular epidemiologic assessment. 1995. JID. 171:170-176.

図.1. コンピューター患者管理システムによる分子疫学のデータベース

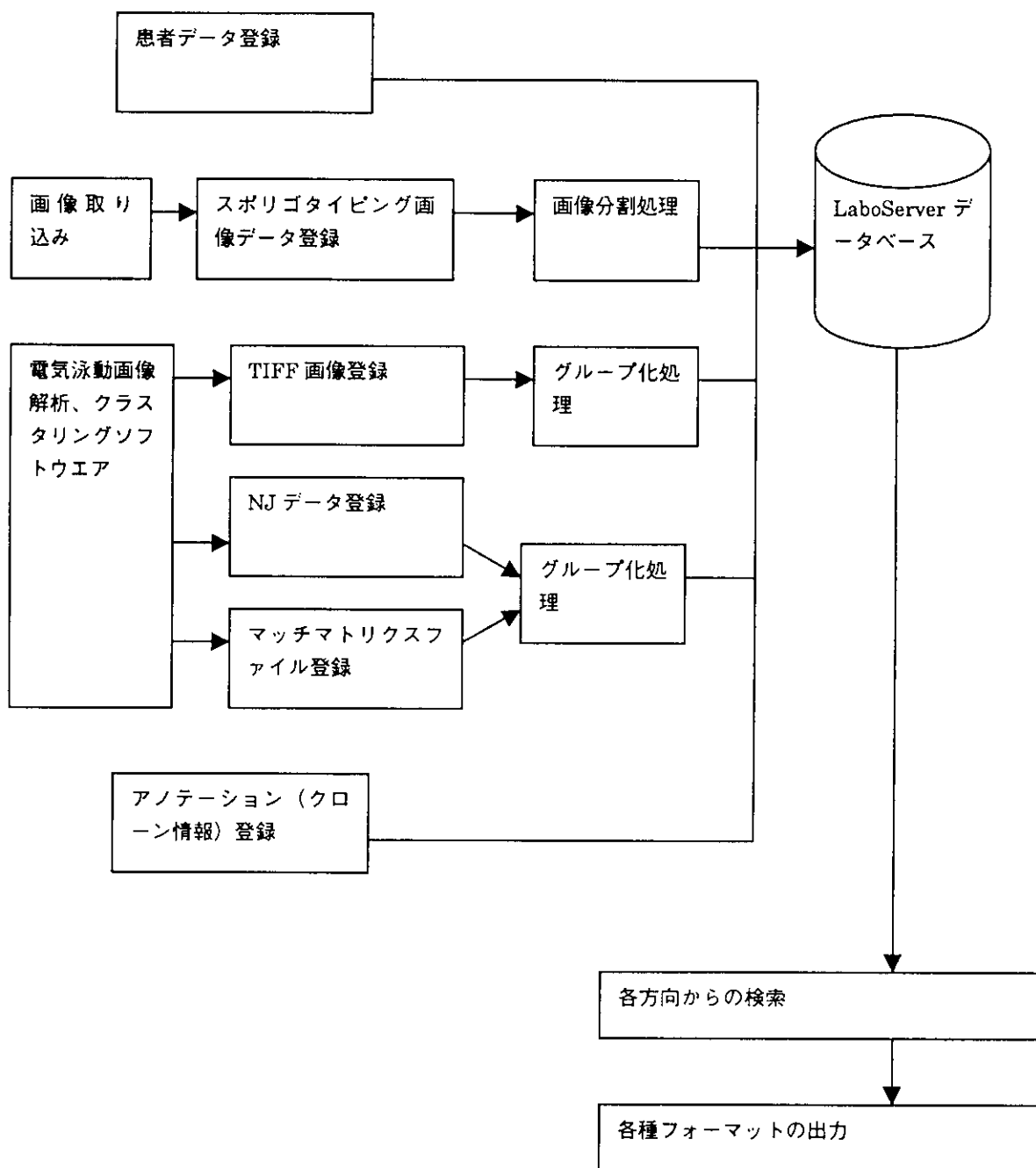


表1. 同一パターンを示した結核菌株のクラスター

クラスター 番号	菌株	IS6110コピ ー数	Drug resistance*	治療歴	性別	年齢	地区
1	A-3-4	15	S	未	男	59	東京
	A-4-31	15	S	既	男	51	東京
	A-4-52	15	S	未	男	29	東京
	A-5-4	15	S	未	男	42	東京
	C-3-23	15	S	未	男	52	神奈川
	D-3-3	15	S	未	男	29	埼玉
	H-1-2	15	S	未	女	31	青森
	M-2-31	15	S	未	女	67	静岡
	N-5-40	15	S	未	男	41	愛知
	P-1-34	15	S	未	男	66	大阪
V-2-37	15	S	既	男	49	福岡	
2	P-4-5	19	I	未	男	65	大阪
	P-4-8	19	I	既	男	51	大阪
	Q-1-48	19	I	-	-	-	京都
3	R-1-19	11	S,K	未	女	23	兵庫
	U-7-6	11	S	未	男	75	高知
	Y-2-26	11	S	未	男	72	大分
4	I-1-28	1	I	未	女	60	北海道
	I-3-7	1	K	未	男	83	北海道
	Q-5-3	1	I	既	女	72	京都
	R-1-27	1	I	未	男	85	兵庫
	R-1-36	1	I,K	未	男	67	兵庫
5	V-2-49	13	S	未	男	55	福岡
	V-2-51	13	S	既	女	49	福岡
	N-4-11	13	I,R,S,E,K	既	男	44	愛知
6	C-2-35	14	I,S	未	男	57	神奈川
	I-1-43	14	S	未	男	48	北海道
7	Q-4-21	15	K	未	男	57	京都
	T-2-18	15	S,K	未	男	51	鳥取
8	B-1-13	9	I,R	既	男	64	東京
	B-3-2	9	S	未	男	24	東京
9	O-5-14	16	S	既	男	77	三重
	O-6-24	16	I,R	既	男	48	奈良
	V-1-11	16	S	未	男	56	福岡
	V-2-23	16	S	未	女	54	福岡
10	A-4-25	13	I,S	既	女	65	東京
	B-3-5	14	S	未	男	31	東京
	C-3-8	14	I	既	女	59	神奈川
11	C-2-14	15	I,R	未	男	53	神奈川
	M-2-12	15	S	未	女	68	静岡
	P-1-21	15	I,R,E	既	男	49	大阪
	V-1-12	15	S	未	男	92	福岡
12	C-3-22	13	I,R,S,K	未	男	55	神奈川
	C-3-54	13	I,R,S,K	-	男	72	神奈川
13	P-1-50	14	I,R,S,E	既	女	50	大阪
	P-4-11	14	I,R,S,E,K	既	男	69	大阪
	U-4-4	14	I,S,E,K	既	男	76	高知

*: I, isoniazid; R, Rifampin; S, Streptomycin; E, Ethambutol; K, Kanamycin

表2. クラスターの大きさの分布

クラスター		総計人数
大きさ	個数	
2	4	8
3	5	15
4	2	8
5	1	5
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	1	11
計	13	47
非クラスター	-	177
総数	-	224

表3. 抗結核薬に見たクラスター形成の分布

Drug resistance*	No. of strains / total no. of strains(%)
INH	5/47(10.6%)
RIF	-
SM	25/47(53.2%)
EB	-
KM	1/47(2.1%)
2 drugs	5/47(10.6%)
>3 drugs	1/47(2.1%)
MDR	10/47(21.3%)

*: INH, isoniazid(0.2 μ g/ml); RIF, rifampin(40 μ g/ml);
 SM, Streptomycin(10 μ g/ml); EB, Ethambutol(2.5 μ g/ml);
 KM, Kanamycin(25mg/liter)

表.4. 地区別に見たクラスター形成率

地区	クラスター (%)	非クラスター	総計
北海道	3(30.0%)	7	10
東北	1(25.0%)	4	5
北陸	-	18	18
関東	15(25.9%)	43	58
東海	2(18.2%)	9	11
近畿	16(29.1%)	39	55
山陰	1(5.0%)	19	20
九州	7(20.6%)	27	34
四国	2(20.0%)	8	10
沖縄	-	3	3
総数	47(21.0%)	177	224

表.5. 薬剤耐性 47 株の年齢階級別に見たクラスター形成率

	クラスター (%)	非クラスター	総計
0-9 歳	-	-	-
10-19 歳	-	3	3
20-29 歳	4(23.5%)	13	17
30-39 歳	2(10.0%)	18	20
40-49 歳	8(23.5%)	26	34
50-59 歳	14(36.8%)	24	38
60-69 歳	9(18.8%)	39	48
70-79 歳	6(13.6%)	38	44
80 以上	3(16.7%)	15	18
不明	1	1	2
総数	47(21.0%)	177	224

表.6. 薬剤耐性菌 224 株中のクラスター47 株
におけるリスク因子

リスク因子	患者数	クラスター中の%
性別		
男	35(15.6%)	74.5
女	11(4.9%)	23.4
不明	1(0.5%)	2.1
年齢		
<60	28(12.5%)	56.9
≥60	18(8.0%)	38.3
不明	1(0.5%)	2.1
治療歴		
有	15(6.7%)	31.9
無	30(13.4%)	63.8
不明	2(0.9%)	4.3

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核菌のカナマイシン耐性の分子遺伝学的解析

分担研究者 谷口初美 産業医科大学・医学部・微生物学教室・教授

共同研究者 小川みどり、野本まり 産業医科大学・医学部・微生物学教室

研究要旨： 16S rRNA 遺伝子の A site に変異を有しないカナマイシン耐性結核菌の約 90% が putative multidrug resistant efflux pump protein をコードする *tap* 遺伝子の 581 番目にシトシンの挿入変異を有していた。また、25% は 23S rRNA 遺伝子の 236 番目の T → C 変異を有していた。しかし 5S rRNA 遺伝子に関しては、調べた 9 株は全株変異を有していなかった。大腸菌へのクローニング実験で、変異型 *tap* 遺伝子はベクターの *lac promoter* に対して、正方向にはクローニングできたが、逆方向にはできなかった。しかし、野性型 *tap* 遺伝子は、*lac promoter* に対して、正逆両方向でクローニングできた。変異型 *tap* 遺伝子は、野性型 *tap* 遺伝子に比べ、極めて脱落しやすく、その組換え体を有する大腸菌の増殖速度は遅くなっていた。またこれら大腸菌の、ストレプトマイシン、ゲンタミシン、テトラサイクリンの MIC を調べた結果、野性型、変異型の間で差は見られなかった。

A. 研究目的

これまで我々は、結核菌のカナマイシン耐性変異について遺伝学的な解析を行ってきた。その結果、臨床分離株のカナマイシン耐性結核菌の約 70% が 16S rRNA 遺伝子の 3' 末端近傍の amino acyltransferase 結合部位、タンパク合成の A site に変異を有することを明らかにした。しかし、残り約 30% のカナマイシン耐性結核

菌の変異部位については未解明のままである。そこでこの A site に変異を有しないカナマイシン耐性株のカナマイシン耐性変異について、その変異部位を明らかにする事を目的とした。前回までに 23S rRNA 遺伝子の 236 番目の T → C 変異と、putative efflux pump protein をコードする *tap* 遺伝子の 581 番目のシトシン残基の挿入変異がカナマイシン耐性と関連

している可能性が高いと報告した。今回はこれら2つの変異と、50S リボゾームの 5S rRNA 遺伝子の変異について調べた。また、カナマイシン耐性株の有する変異型 *tap* 遺伝子2種類と、野性型 *tap* 遺伝子1種類、カナマイシン感受性株の有する野性型 *tap* 遺伝子1種類と、H37Rv 株の野性型 *tap* 遺伝子が大腸菌にクローニングし、大腸菌における薬剤耐性への影響、増殖様態への影響などを調べた。

B. 研究方法

臨床分離のカナマイシン耐性結核菌 29 株、感受性株 6 株、コントロールとして H37Rv, BCG を用いた。16S rRNA 遺伝子の A site の変異、23S rRNA 遺伝子の 236 番目の T->C 変異については、これらの変異部位を含む primer を合成し、その PCR product について dye terminator 法で塩基配列を決定した。16S rRNA 遺伝子の A site に変異を有しない 12 株及び、コントロールとして BCG の *tap* 遺伝子 1260bp の全塩基配列を、6 種類の primer を合成して dye terminator 法で決定し、比較した。Primer は *M. tuberculosis* の *tap* 遺伝子をコードする orf Rv1258 の塩基配列から合成した。16S rRNA 遺伝子の A site に変異を有する 17 株およびカナマイシ

ン感受性株 6 株については、*tap* 遺伝子の変異部位を PCR 法で増幅し、塩基配列の決定を行った。また、5S rRNA 遺伝子については、16S rRNA 遺伝子の A site に変異を有しない 12 株のうち 9 株及び、カナマイシン感受性株 6 株のうち 5 株について、全塩基配列を決定した。塩基配列の決定は PCR 反応を行い、その産物について direct sequencing を行った。Sequencing 反応は ABI 社の Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit を、解析は ABI 社の 377 DNA sequencer を用いた。

大腸菌へのクローニングは、カナマイシン耐性株の変異型 *tap* 遺伝子2種類と、野性型 1 株、及びカナマイシン感受性株の野性型 *tap* 遺伝子1種類と H37Rv の野性型 *tap* 遺伝子を TA ベクターを用いて、*E. coli* K12 KP 7600 株にクローニングした。これらの株の増殖曲線、顕像、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリンの MIC (Minimal Inhibitory concentration) を倍数希釈法で測定した。

C. 研究結果

1) カナマイシン耐性株で、16S rRNA 遺伝子の A site に変異を有しない 12 株のうち 11 株 (91%)、が *tap* 遺伝子の 581 番目にシトシンの挿入変異

を有していた。3株(25%)が23S rRNA 遺伝子の236番目の T → C 変異を有していた。しかし、調べた9株は全株5S rRNA 遺伝子に変異を有しなかった。

2) カナマイシン耐性株で、16S rRNA 遺伝子の A site に変異を有する17株のうち、2株が *tap* 遺伝子に変異を有し、6株が23S rRNA 遺伝子の236番目の T → C 変異を有していた。

3) カナマイシン感受性株6株のうち、2株が *tap* 遺伝子に変異を有し、1株が23S rRNA 遺伝子の236番目の T → C 変異を有していた。しかし、調べた5株とも5S rRNA 遺伝子に変異は見られなかった。

4) H37RV 株、BCG は *tap* 遺伝子、16S, 5S, 23S rRNA 遺伝子のいずれにも変異は見られなかった。

5) 大腸菌へのクローニング実験で、カナマイシン耐性株の変異型 *tap* 遺伝子はベクターの *lac promoter* に対して、正方向のものはクローニングできたが、逆方向のものはクローニングできなかった。しかし、野性型 *tap* 遺伝子は、その由来がカナマイシン耐性株、感受性株であっても共に *lac promoter* に対して、正逆両方向でクローニングできた。

6) 変異型 *tap* 遺伝子を *lac promoter* に正方向にクローニングした大腸菌は、野性型 *tap* 遺伝子をクローニ

ングした大腸菌に比べ、増殖速度が遅く、*tap* 遺伝子は極めて脱落しやすくなっていた。またその顕像は、菌体の伸長、溶菌像を呈していた。

7) 変異型 *tap* 遺伝子を *lac promoter* に正方向にクローニングした大腸菌と、野性型 *tap* 遺伝子をクローニングした大腸菌の、ストレプトマイシン、ゲンタミシン、テトラサイクリンの MIC を調べた結果、いずれも低い MIC を示し、それらの間で差は見られなかった。

8) 結核菌の *tap* 遺伝子破壊のため、破壊用ベクターを作成した。このベクターは、大腸菌ベクター pBR322 に *Bacillus subtilis* の sucrose 感受性の *sac* 遺伝子と、結核菌の heat shock protein (hsp) 60 のプロモーターの下流に *xylE* 遺伝子を fusion させたものを組み込み、multiple cloning site を有する pMT7-1 である。

D. 考察

16S rRNA 遺伝子の A site に変異を有しないカナマイシン耐性結核菌12株のうち11株、91% が putative efflux pump をコードする *tap* 遺伝子に同一の変異を有していた。しかし、16S rRNA 遺伝子の A site に変異を有するカナマイシン耐性結核菌17株のうち2株だけがこの *tap* 遺伝子に同一の変異を有していた。この結果は、*tap*

遺伝子の変異がカナマイシン耐性と関連がある事を強く示唆している。しかし、カナマイシン感受性株 2 株も同一の変異を有していた。この感受性を再度確認する事が出来なかったため、*tap* 遺伝子の変異とカナマイシン耐性との関係を明らかにするため、変異型 *tap* 遺伝子と、野生型 *tap* 遺伝子は大腸菌にクローニングした。野生型 *tap* 遺伝子はベクターの *lac promoter* に両方向にクローニングできたが、変異型 *tap* 遺伝子は、ベクターの *lac promoter* に正方向にのみクローニングできた。*lac promoter* に正方向にクローニングされた変異型 *tap* 遺伝子は宿主に対する増殖抑制作用を示したので、*lac promoter* に逆方向にクローニングされた変異型 *tap* 遺伝子は、宿主大腸菌に致死的に作用すると考えられる。一方、581 番目のシトシン挿入変異を有しない野生型 *tap* 遺伝子であっても、カナマイシン耐性株由来のものは大腸菌の増殖を抑制した。この抑制程度は、変異型 *tap* 遺伝子のそれに比べ低度であった。この理由を調べるために、カナマイシン耐性株由来の野生型 *tap* 遺伝子の 581 番目の変異以外の全塩基配列の決定を行っている。また、次に大腸菌の薬剤耐性に対する *tap* 遺伝子の変異の影響を見るため、*tap* 遺伝子が影響を与えると報告されて

いるアミノ配糖体のストレプトマイシン、ゲンタミシン、及びテトラサイクリンに対する MIC を測定した。しかし、いずれの組み換え体でも、違いは見られず、低い MIC を示した。この方法では結核菌内で *tap* 遺伝子の変異を起こした場合の影響を正確には見ることは出来ないため、次の段階として変異型または野生型 *tap* 遺伝子は大腸菌・結核菌シャトルベクターに組み込み、スメグマ菌および結核菌に導入することを試みている。また、結核菌の染色体上の *tap* 遺伝子を破壊する実験を行うため、遺伝子破壊ベクター pMT7-1 の作成を行った。現在この破壊ベクターが、スメグマ菌、結核菌内で有効に働くか否かを確認するため、スメグマ菌、結核菌の *sig* 遺伝子、*lysA* 遺伝子を組み込み、Tn903 のカナマイシン耐性遺伝子で破壊した。現在これらの組み換え体を、スメグマ菌、結核菌に形質転換を行っている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1: 谷口初美 多剤耐性結核菌—その耐性機構を中心に—

J. UOEH 22:269-282, 2000

2: Molecular analysis of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.

Thirty fifth US-Japan joint conference on tuberculosis-leprosy-2000, p28 – 33

Hatsumi Taniguchi, Bin Chang, Yasuo Suzuki

3: Molecular analysis of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.

Hatsumi Taniguchi, and Bin Chang

Proceeding of the 7th China-Japan international congress of microbiology Shanghai symposium -2000, p179-180

4: Morphological varieties of microcolonies of *Legionella* species grown in Vero cells. Midori Ogawa, Akemi Takade, Hatsumi Taniguchi, Shin-ichi Yoshida.

Proceeding of the 7th China-Japan international congress of microbiology Shanghai symposium 2000, p184 – 185

5: 野村和代、小川みどり、常彬、宮本比呂志、谷口初美、松本哲朗
産業医科大学病院における *Mycobacterium chelonae* による内視鏡自動洗浄機の汚染とその対策
J. UOEH 22:159-165, 2000

2.学会発表

1: ファイバースコープ自動洗浄機における抗酸菌汚染とその対策 2000, 2, 18. 第15回環境感染学会 野村和代、小川みどり、谷口初美、田辺忠夫、松本哲朗

2: Molecular analysis of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.

2000, July 19-21 Thirty fifth US-Japan joint conference on tuberculosis-leprosy, Hatsumi Taniguchi, Bin Chang, Yasuo Suzuki

3: Molecular analysis of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.

The 7th China-Japan international congress of microbiology Shanghai symposium 2000, August 4-6, Hatsumi Taniguchi, Bin Chang

4: Morphological varieties of microcolonies of *Legionella* species grown in Vero cells. Midori Ogawa, Akemi Takade, Hatsumi Taniguchi, Shin-ichi Yoshida.

The 7th China-Japan international congress of microbiology Shanghai symposium 2000.

5: 結核菌のカナマイシン耐性機構の検討、小川みどり、常彬、野本摩利、福田和正、宮本比呂志、谷口初美
2000, 9, 2 細菌学会九州地方会

6: 抗酸菌の薬剤耐性メカニズム, 2000, 9, 23 九州微生物検査システム研究会

平成12年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

ピラジナミド耐性結核菌の迅速鑑別法の開発：
分子生物学的手法による迅速ピラジナミダーゼ試験

分担研究者 鈴木定彦 大阪府立公衆衛生研究所 主任研究員

【研究要旨】

本研究ではピラジナミド（PZA）耐性結核菌の多くがPZAをピラジン酸へと変換する能力を持つピラジナミダーゼをコードしている遺伝子（*pncA* 遺伝子）に変異を持ち、その菌自体もピラジナミダーゼ活性を欠損していることおよび実際のPZA感受性検査においてピラジナミダーゼ試験が有効であると考えられていることに着目して実験系を構築した。その第一段階として臨床分離PZA耐性結核菌52株についてピラジナミダーゼ試験を行い、検査した全ての株においてピラジナミダーゼ活性が検出されないことを確認した。また、この52株のうち50株の*pncA*遺伝子中に塩基置換（39種類）を見出した。次にこれらの臨床分離PZA耐性結核菌のDNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行い大腸菌T7ファージプロモーター配列を結合させた*pncA*遺伝子を増幅させた。これを大腸菌T7ファージRNA合成酵素を含むウサギ網状赤血球ライセート中に投入し、転写と翻訳を行った後ピラジナミダーゼ試験を行った。その結果、40種類の変異*pncA*遺伝子のうちの39種類においてピラジナミダーゼ活性の低下が見られた。このことはPCRとそれに引き続いた*in vitro*転写・翻訳系により結核菌の持つピラジナミダーゼ活性の検定が可能であることを示すものである。さらにピラジナミド耐性結核菌の迅速鑑別の可能性を示すものであると考えられる。

A. 目的

これまでの本研究班での分担研究では抗結核剤のうちリファンピシン、イソニアジド、ストレプトマイシン、エタンブトール、カナマイシンに対する耐性結核菌に見られる塩基置換を検出することによりこれらの薬剤に対する耐性菌の検出をすることができるDNAチップの開発を行って

きた。これらの薬剤耐性においては耐性に関与する遺伝子変異が比較的限局しており、限られた数のオリゴヌクレオチドをガラス基盤の上に固定したDNAチップを作成し、これを用いることにより耐性の判定が可能であった。しかし、ピラジナミド（PZA）耐性結核菌の遺伝子変異に関するいくつかの報告によると耐

性に関与する変異はピラジナミダーゼ遺伝子 (*pncA* 遺伝子) 中に限局することなしに見い出されている。このことは PZA 耐性の判別のための DNA チップを構築するためには莫大な数 (約 3000) のオリゴヌクレオチドを固定する必要があることを意味しており、コスト等の面を考えた場合現実的ではない。そこで今年度の分担研究では PZA 耐性結核菌の多くがピラジナミダーゼをコードしている遺伝子 (*pncA* 遺伝子) に変異を持ち、それと同時にピラジナミダーゼ活性を欠損していることに着目し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を基盤とした試験管内転写・翻訳系を応用したピラジナミダーゼ活性測定系の構築とその PZA 耐性結核菌の迅速鑑別法への応用を試みた。

B. 研究方法

菌株 臨床分離 PZA 耐性結核菌 52 株、結核菌標準菌株 H37Rv および *Mycobacterium bovis* BCG 東京を用いた。

ピラジナミダーゼ試験 常法に従って実施した。

PZA 耐性結核菌の *pncA* 遺伝子の塩基配列の解析 結核菌株よりビーズ粉砕法により DNA を抽出した。得られた DNA を鋳型として PCR を行い *pncA* 遺伝子の増

幅を行った。この時用いたプライマーを図 1 に示した (ON2000-0091、ON2000-0045)。また、PCR は宝酒造社製 PCR Thermal Cycler Personal を用いて、プレヒート 98℃、1 分を行った後変性、98℃、5 秒、アニーリング、55℃、10 秒、伸長 72℃、1 分のサイクルを 35 回行った。得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にて展開した後、目的の 0.6 キロ塩基対のバンドを切り出した。得られたゲルブロックを凍結した後、9000g、10 分間遠心分離を行い上清を回収した。得られた DNA 断片の 5~25ng を鋳型として用いて塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定反応は宝酒造社製 PCR Thermal Cycler Personal を用いて PE アプライドバイオシステムズ社製の Big Dye ターミネーターシーケンシングキットによって行った。反応条件は PE アプライドバイオシステムズ社のマニュアルに従った。塩基配列決定は図 1 に示した ON2000-0091、ON2000-0045、ON2000-0094 および ON2000-0100 をプライマーとして用い、図 2 に示したストラテジーにのっとり行った。反応産物はエタノール沈澱、70% エタノールによる洗浄の後 TSR 溶液 (PE アプライドバイオシステムズ社製) に溶解し、ジェネティックアナライザー 310 (PE アプライドバイオシステムズ社製) にて分析を行った。

```

TGTCGCTCACTACATCACCGGCGTGATCTATCCCGCCGGTGGGTFGGCCG 50
|-----ON2000-0091---->
CCGCTCAGCTGGTCATGTTTCGCGATCGTCGCGGGCGTCATGGACCCATATAT 100
CTGTGGCTGCCCGCTCGGTAGGCAAACCTGCCCGGGCAGTCGCCCGAACGT 150
|-----ON2000-0016
ATGGTGGACGATGCGGGCGTTGATCATCGTCGACGTGCAGAACGACTTC 200
----->
|--A-----ON0036----->
TGGGAGGGTGGCTCGCTGGCGGTAACCGGTGGCGCCGCGCTGGCCCCGCGC 250
CATCAGCGACTACCTGGCCGAAGCGGCGGACTACCATCACGTCGTGGCAA 300
CCAAGGACTTCCACATCGACCCGGGTGACCACCTTCTCCGGCACACCGGAC 350
|-----ON2000-0094
TATTCCTCGTCGTGGCCACCGCATTCGCTCAGCGGTACTCCCGGCGCGGA 400
----->
CTTCCATCCCAGTCTGGACACGTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTACAAGG 450
GTGCCTACACCGGAGCGTACAGCGGCTTCGAAGGAGTCGACGAGAACGGC 500
ACGCCACTGCTGAATTGGCTGCCGCAACCGGCGTCGATGAGGTCGATGT 550
<-----ON2000-0100-----|
GGTCGGTATTGCCACCGATCATTTGTGTGCGCCAGACGGCCGAGGACGCGG 600
TACGCAATGGCTTGGCCACCAGGGTGTCTGGTGGACCTGACAGCGGGTGTG 650
TCGGCCGATACCACCGTCGCCCGGCTGGAGGAGATGCGCACCGCCAGCGT 700
CGAGTTGGTTTGCAGCTCCTGATGGCACCGCCGAACCGGGATGAACTGTT 750
<-----ON2000-0012
GGCGGCGGTGGAGCGCTCGCCGCAAGCGGCCCGCCGCGCACGACCGCGCCG 800
-----|
<-----ON2000-0045-----|

```

図 1. 本研究に用いたプライマー塩基配列決定のための *pncA* 遺伝子増幅には ON2000-0091 と ON2000-0045 を用いた。また、塩基配列決定反応には ON2000-0091、ON2000-0045、ON2000-0094 および ON2000-0100 を用いた。試験管内ピラジナミダーゼ合成のための鋳型増幅には ON2000-0016 と ON2000-0012 または、ON2000-0036 と ON2000-0012 のペアを用いた。

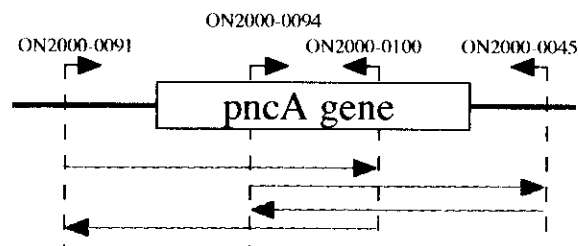


図 2. 結核菌 *pncA* 遺伝子塩基配列決定のための戦略—ON2000-0091、ON2000-0045 をプライマーとして用いて 5' および 3' 非コード領域を含む *pncA* 遺伝子の増幅を行う。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にて精製した後 ON2000-0091、ON2000-0045、ON2000-0094 および ON2000-0100 を用い、上図に示した戦略にのって塩基配列の決定を行った。

大腸菌 T7 ファージプロモーター配列結合 *pncA* 遺伝子の増幅 結核菌 DNA を鋳型として用いて PCR を行い大腸菌 T7 ファージプロモーター配列結合 *pncA* 遺伝子の増幅を行った。この時用いたプライマーを図 1 に示した (ON2000-0016 と ON2000-0012 または、ON2000-0036 と ON2000-0012 のペアを用いた。ON2000-0016 と ON2000-0036 の 5 側には GGATCCTAATACGACTCACTA TAGGGAGCCACC からなる大腸菌 T7 ファージプロモーター配列を付加したものをを用いた。)。PCR は宝酒造社製 PCR Thermal Cycler Personal を用いて、プレヒート 98℃、1 分を行った後変性、98℃、5 秒、アニーリング、50~60℃、10 秒、伸長 72℃、1 分のサイクルを 35 回行った。得られた PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により分析を行い濃度を決定し、エタノール沈澱後 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度になるように TE バッファー (10 mM トリス緩衝液、1 mM エチレンジアミン 4 酢酸、pH 8.0) に溶解した。

結核菌および BCG 菌 *pncA* 遺伝子よりの試験管内転写・翻訳系によるピラジナミダーゼの発現 PCR により得られた T7

ファージプロモーター配列を結合させた *pncA* 遺伝子の溶液 2 μL をあらかじめ用意した試験管内転写・翻訳ミックス (プロメガ社製、T7 Quick for PCR Rabbit reticulocyte lysate) 16 μL に加えた。30℃で一定時間保温した。

ピラジナミダーゼ活性の測定 上記反応で得られた反応溶液に PZA 溶液 (1 mg/mL) 100 μL を加え、1 時間 37℃で保温した。これに 10% 硫酸第一鉄アンモニウム溶液 10 μL を加え、さらに 2 時間 37℃で保温した。反応液中に存在するヘモグロビンを沈澱させる目的で 130 μL の 25% ポリエチレングリコール 6000 溶液を加え良く攪拌した後遠心分離操作を行った。得られた上清をアミコン社製 Micropure-EZ を通過させ、通過画分を Nunc 社製イムノプレートに映した後バイオラド社製モデル 550 マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm における吸光度の測定を行った。

C. 研究結果

PZA 耐性結核菌における *pncA* 遺伝子上の変異 結核菌標準菌株 H37Rv、*M. bovis* BCG 東京株および臨床分離 PZA 耐性結核菌 33 株についてピラジナミダーゼ試験を行った。その結果、結核菌標準菌株 H37Rv ではピラジナミダー

```

GTGCGTCACTACATCACCGGGGATCTATCCCGCCGGTTGGGTGCCCGCCGTCAGCTGGTCATGTTCCGGATCCGTCG -81
GGCGTCATGGACCCCTATATCTGTGGCTGCCCGCTGGGTAGGCAAACTCCCGGGCAGTCGCCGAAACCTATGGTGGAGGT -1
G 97-005
G 98-061
C 98-068
ATG CGG GCG TTG ATC ATC GTC GAC GTG CAG AAC GAC TTC TGC GAG GGT GGC TCG CTG GCG 60
C 94-019
M/I 94-018
C F/L 94-054
A 98-076
A/D 98-079
A I/M 98-111
A/D 98-111
GTA ACC GGT GGC GCC GCG CTG GCC CGC GCC ATC AGC GAC TAC CTG GCC GAA GCG GCG GAC 120
C 97-019
L/P 98-075
G 98-083
Y/D 98-085
G 98-086
Y/D 98-097
TAC CAT CAC GTC GTG GCA ACC AAG GAC TTC CAC ATC GAC CCG GCT GAC CAC TTC TCC GGC 180
C 94-048
H/P 97-009
D/A 97-012
C H/R 98-062
G H/D 98-091
C F/S 98-098
G F/V 98-098
ACA CCG GAC TAT TCC TCC TCG TGG CCA CCG CAT TGC GTG AGC GGT ACT CCC GGC GCG GAC 240
^ 94-067
IS6110 97-006
C H/P 97-001S
^ 98-047
T 98-052
C T/P 98-080
C G/R 98-087
T 98-087
F/L 97-004
TCC CAT CCC AGT CTG GAC ACG TCG GCA ATC GAG GCG GTG TTC TAC AAG GGT GCC TAC ACC 300
A STOP 98-047
T G/V 98-082
C T/P 98-060
A 98-084
A' 360
A' 97-010
A' 98-092
T 98-092
I/R 98-096
G 420
CGG CAA CGC GGC GTC GAT GAG GTC GAT GTG GTC GGT ATT GCC ACC GAT CAT TGT GTG CGC 420
GC 94-050
A 94-053
GG 96-004
V/G 97-001
A V/M 97-015
C 98-009
C/R 98-048
CG 98-078
G V/G 98-081
C 98-094
R/P 98-040
C 98-064
C T/P 98-040
C 98-064
CAG ACG GCC GAG GAC CGC GTA CGC AAT GGC TTG GCC ACC AGG GTG CTG GTG GAC CTG ACA 480
- 98-053
A 97-008
L/Q 98-073
GCG GGT GTG TCG GCC GAT ACC ACC GTC GCC GCG CTG GAG GAG ATG CGC ACC GAC AGC GTC 540
- - - - - 98-073
GAG TTG GTT TGC AGC TCC TGA TGGCACCAGCAACCCGGGATGAACCTGTTGGCGGGTGGAGCGCTCCCGCC 617
AAGCGCCCGCCGCGCAGCACCGCCCGC 639

```

図3. 臨床分離PZA耐性結核菌株のpncA遺伝子上に見いだされた変異 右の番号は臨床分離株名、^は塩基の挿入、-は塩基の欠失、塩基置換の場合は置換した塩基を表示し、その下に置換したアミノ酸を示してある。

ゼ活性が検出されたのに対して検査した全てのPZA耐性結核菌株および *M. bovis* BCG 東京株においてピラジナミダーゼ活性が検出されないことを確認した。また、この33株

のうち32株の *pncA* 遺伝子中に変異を見出した。それらは塩基置換、塩基挿入、塩基欠失であった。今回の研究で見い出された変異は全部で40種類であった(図3)。

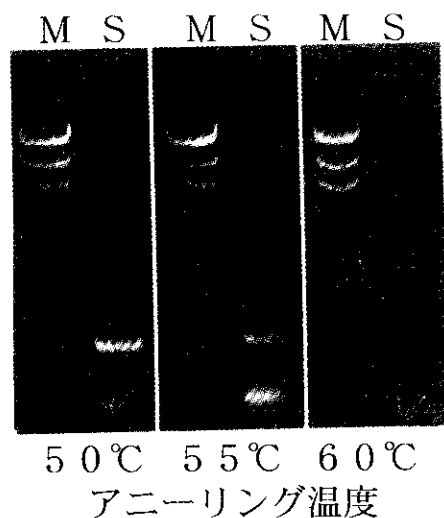


図4. T7プロモーターが連結した結核菌およびBCG菌の *pncA* 遺伝子の増幅 ON2000-0016 と ON2000-0012 のプライマーペアを用いてアニーリング温度を様々に変えて増幅試験を行った。M: 分子量マーカー、S: 増幅産物。50℃のアニーリングが最適と考えられた。

また、これはこれまでの報告と同様に局限した位置への変異ではなかった。

T7プロモーターが結合した結核菌およびBCG菌 *pncA* 遺伝子の増幅 結核菌およびBCG菌より得られたDNAを鋳型として用いてPCRを行いT7プロモーターが連結した結核菌およびBCG菌の *pncA* 遺伝子の増幅を行った。ON2000-0016 と ON2000-0012 のプライマーペアを用いてアニーリング温度を様々に変えて増幅試験を

行ったところ図4に示す様に50℃でアニーリングにおいてもっとも良好な増幅が見られた。また、ON2000-0036 と ON2000-0012 のプライマーペアを用いても同様な結果が得られたため以後はこの条件を採用した。

結核菌標準菌株H37RvおよびBCG菌 *pncA* 遺伝子の試験管内転写・翻訳の条件検討 結核菌標準菌株H37RvとBCG菌DNAを鋳型として ON2000-

0016 と ON2000-0012 のプライマーペアを用いて得られた PCR 産物の濃度を決定し、エタノール沈澱後 $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度になるように TE バッファーに溶解した。この溶液 $2 \mu\text{L}$ をあらかじめ用意した転写・翻訳ミックス $16 \mu\text{L}$ に加え 30°C で 30、60、90、120 および 240 分間保温した。上記反応で得られた反応溶液中のピラジナミダーゼ活性を研究方法で述べた方法に従って測定した。結果を図 5 に示した。

H37Rv の *pncA* 遺伝子より試験管内で合成されたピラジナミダーゼの活性は 30、60、90 分と時間を経るごとに直線的に上昇した。BCG 菌の *pncA* 遺伝子より試験管内で合成されたピラジナミダーゼの活性もこれと同様な時間依存性を見せたが、レベルは非常に低いものであった。H37Rv と BCG 菌由来の *pncA* 遺伝子よりのピラジナミダーゼ活性の差が最大となる 90 分を試験管内ピラジナミダーゼ合成の時間として以後の実験を進めた。

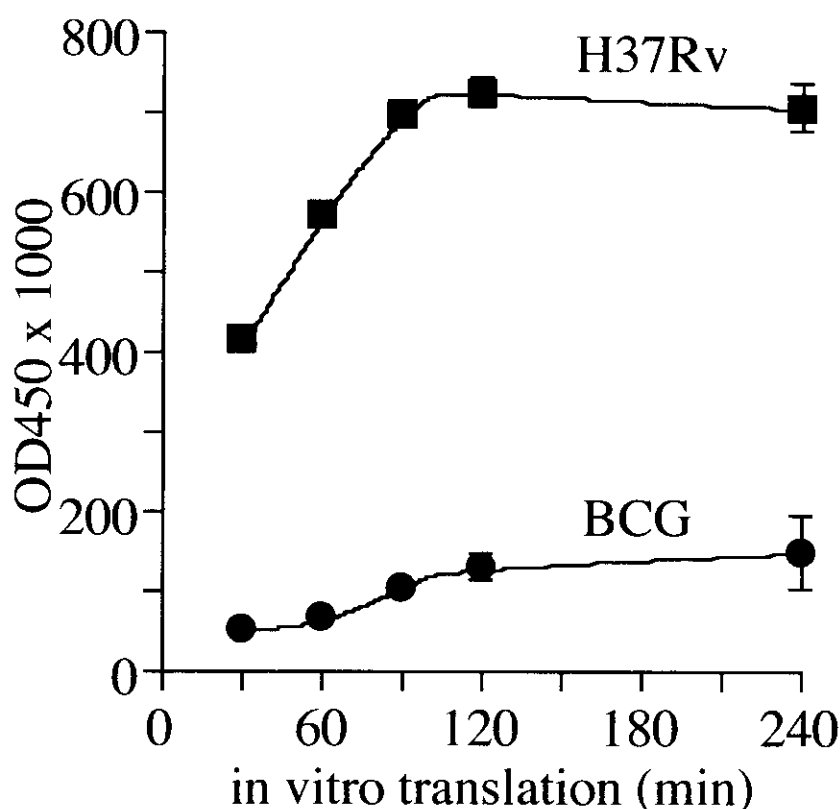


図 5. 試験管内ピラジナミダーゼ合成反応時間の検討 結核菌 H37Rv および BCG 菌 DNA より PCR により増幅させた T7 フェージプロモーター結合 *pncA* 遺伝子の溶液を転写・翻訳ミックスに加え 30°C で 30、60、90、120 および 240 分間保温した。次いで反応溶液中のピラジナミダーゼ活性を測定した。

臨床分離 P Z A 耐性結核菌から増幅させた *pncA* 遺伝子より合成されたピラジナミダーゼの活性測定 臨床分離 P Z A 耐性結核菌で菌株を用いてピラジナミダーゼ試験を行っているもの 25 種（それぞれ別の部位に変異を有するもの。ただしシャイン-ダルガーノ配列に変異を有するものは除外した。）および臨床分離 P Z A 耐性結核菌で菌株を用いてピラジナミダーゼ試験を行っていないもの 15 種（変異確認済みのもの）より ON2000-0016 と ON2000-0012 のプライマーペアを用いて得られた DNA を鋳型として PCR を行い T7 フェージプロモーター結合 *pncA* 遺伝子を得た。得られた PCR 産物の濃度を決定し、エタノール沈澱後 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度になるように TE バッファーに溶解した。この溶液 2 μL をあらかじめ用意した転写・翻訳ミックス 16 μL に加え 30°C で 90 分間保温した。上記反応で得られた反応溶液中のピラジナミダーゼ活性を研究方法で述べた方法に従って測定した。得られた結果を図 6 に示した。

合計 40 種類の臨床分離 P Z A 耐性株由来の DNA およびを用いて実験を行ったところ 37 株においては試験管内で合成されたピラジナミダーゼは H37Rv に較べて著しく低いピラジナミダーゼ活性を示した。ところが、3 株においては H37Rv よりもむしろ高いピラジナミダーゼ活性を示した。この理由の一つと

して翻訳効率を高めるためにプライマー ON2000-0016 にコザックコンセンサスを導入し、それを可能とするためにプライマーとして開始コドンから 21 番目までの塩基を含んだことに起因する可能性が考えられたため（図 7）、ON2000-0036 と ON2000-0012 のプライマーペアを用いて同様な実験を行った。

結核菌標準菌株 H37Rv より得られた DNA を元にして行った試験管内ピラジナミダーゼ合成実験では ON2000-0016 を用いた場合には ON2000-0036 を用いた場合に較べてピラジナミダーゼ活性が 4 分の一以下に低下していた。しかし臨床分離 P Z A 耐性結核菌より得られた DNA を元にして行った試験管内ピラジナミダーゼ合成実験におけるピラジナミダーゼ活性は H37Rv のそれよりも低値を示していた。臨床分離 P Z A 耐性株 98-092 以外の菌株では十分に H37Rv のそれと対比できるものであった。

D. 考察

本研究班で私はこれまでに抗結核剤のうちリファンピシン、イソニアジド、ストレプトマイシン、エタンブトール、カナマイシンに対する耐性菌の検出ができる DNA チップの開発を行ってきた。これらの薬剤耐性においては耐性に関与する遺伝子変異が比較的限局しており、限られた数のオリゴヌクレオチドをガラス基盤の上に固定した DNA チップを

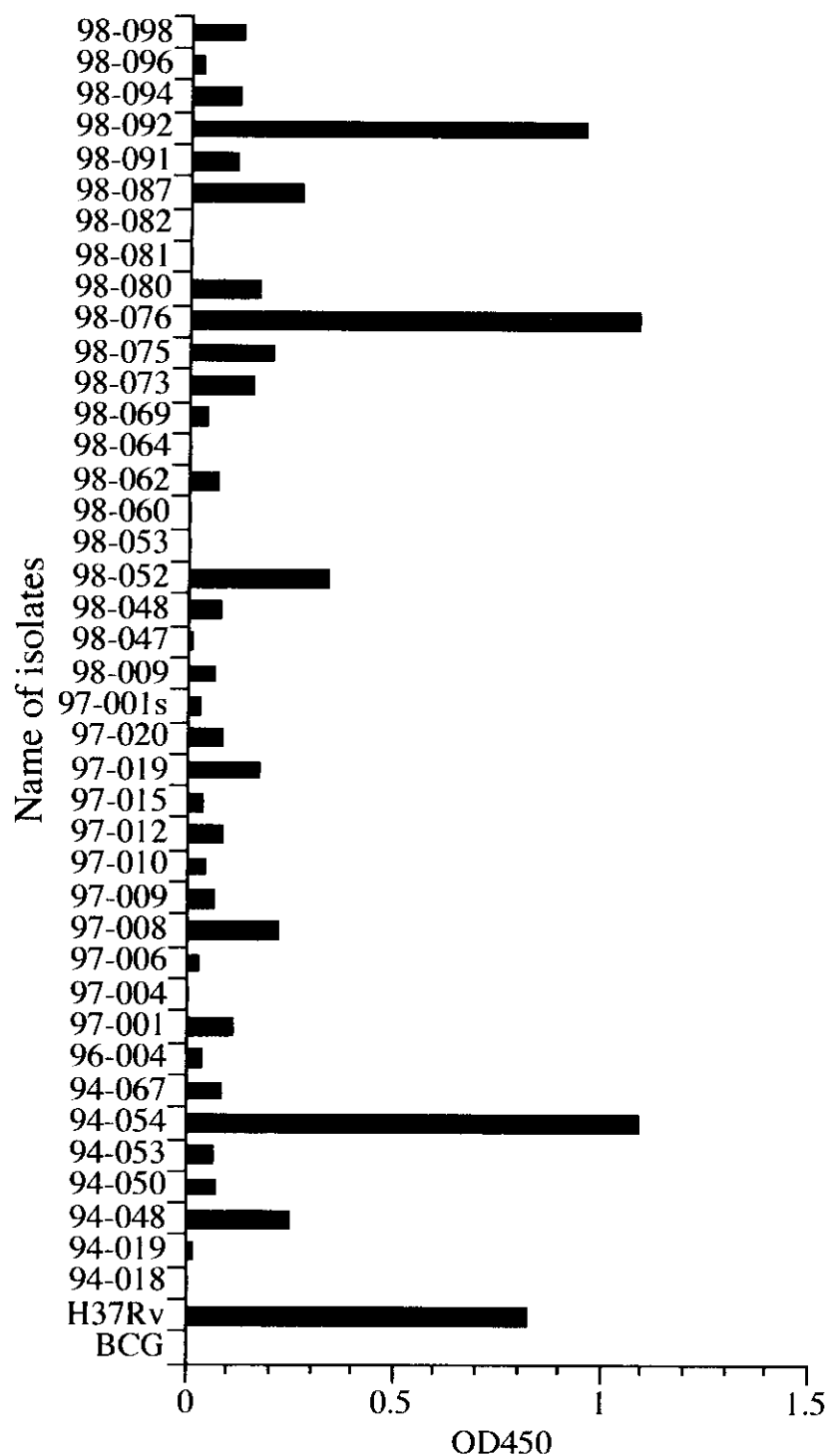


図6. プライマー ON2000-0036 と ON2000-0012 を用いたPCR産物によるピラジナミダーゼの試験管内転写・翻訳 PZA耐性結核菌株に対して ON2000-0016 と ON2000 0012 をプライマーとして用いてPCRを行い得られた産物により試験管内ピラジナミダーゼ合成とピラジナミダーゼ試験を行った。