

forming an *in vitro* methylation reaction using the 30S and 50S subunits instead of the intact 70S ribosome. We found that most of the radioactivity was incorporated into the 30S subunit (Fig. 4C), which includes the 16S rRNA. GidB was unable to methylate naked 16S rRNA (data not shown), implying that the enzyme requires 16S rRNA to be properly folded for efficient reaction.

GidB target is G527 of 16S rRNA

There are 10 known methylatable nucleosides within the *E. coli* 16S rRNA (Andersen and Douthwaite, 2006): m⁶A (N⁶-dimethyladenosine at positions 1518 and 1519), m⁴Cm (N⁴, C²-dimethylcytidine at position 1402), m⁵C (5-methylcytidine at positions 967 and 1407), m²G (2-methylguanosine at positions 966, 1207 and 1516), m⁷G (7-methylguanosine at position 527) and m³U (3-methyluridine at position 1498). In addition, the genes responsible for methylating m⁶A1518, 1519 (*rsmA = ksgA*), m⁵C967 (*rsmB = frmU*), m⁵C1407 (*rsmF = yebU*), m²G1207 (*rsmC = yjJT*) and m³U1498 (*rsmE = yggJ*) are well documented (Andersen and Douthwaite, 2006). We therefore postulated that *gidB* is involved in the methylation of m⁴Cm1402, m²G966, m²G1516 or m⁷G527, and that *gidB* mutants should fail to methylate one or more of those residues. To test this, we identified the methylated nucleosides using two-dimensional thin-layer chromatography (2D-TLC). Following *in vitro* methylation of the 30S ribosomal subunits using purified GidB and [*methyl*-³H]SAM, the ³H-labelled 16S rRNA was recovered and completely hydrolysed into 5'-monophosphate nucleosides using nuclease P1, and the hydrolysate was subjected to 2D-TLC followed by fluorography. We found that the migration characteristics of the radiolabelled compound were identical to those of m⁷G 5'-monophosphate (Fig. 4D). Because *E. coli* 16S rRNA has only one m⁷G residue (Andersen and Douthwaite, 2006), it is apparent that GidB catalyses the methylation of G527.

The formation of m⁷G by GidB was further confirmed by nucleoside analysis using high-performance liquid chromatography (HPLC) (Fig. 4E). When Δ *gidB* 16S RNAs were digested into nucleosides using nuclease P1 plus

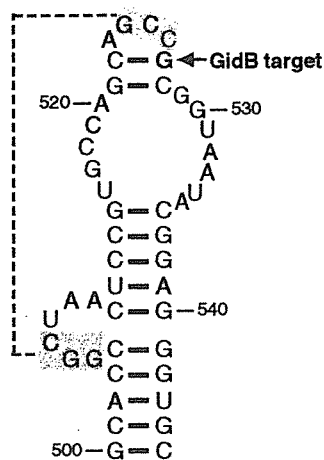


Fig. 5. Secondary structure of the 530 loop region of *E. coli* 16S rRNA. The GidB target site (G527) is indicated by an arrow. Nucleotides known to be involved in the binding of streptomycin are shown in red; those that participate in the formation of the pseudoknot structure are shown in light cyan and connected by a dotted line.

alkaline phosphatase and analysed by reverse-phase HPLC, the peak corresponding to m⁷G was absent, whereas the peaks for m⁵C, m²G and m³U were detected at normal intensity as was in wild-type 16S RNA. These results clearly demonstrated that GidB is responsible for the *in vivo* methylation of 16S rRNA apparently at G527. It is noteworthy that G527 is located within the 530 loop and that this nucleotide interacts directly with streptomycin (Fig. 5) (Carter *et al.*, 2000).

In contrast to most of streptomycin-resistant mutations in *E. coli*, *gidB* mutations did not lead to hyperaccuracy, as determined by a stop codon read-through assays (Table 2), thus suggesting, in turn, that the *gidB*-mutant ribosome has a reduced affinity for streptomycin.

gidB mutations occur at a high frequency in streptomycin-resistant clinical isolates of *M. tuberculosis*

Given the frequent occurrence of *gidB* mutations in spontaneous *M. tuberculosis* mutants showing low-level resis-

Table 2. Effects of *E. coli* *gidB* and *rpsL* mutations on read-through of the UAG nonsense codon.

Genotype	<i>lacZ</i> allele	β -Galactosidase activity ^a (Miller units)	Frequency of read-through (%)	Relative read-through
Wild type	<i>lacZ105</i> (Am)	21.1 \pm 1.57	0.57	1
	<i>lacZ</i> ⁺	3680 \pm 210		
Δ <i>gidB</i>	<i>lacZ105</i> (Am)	18.9 \pm 1.67	0.49	0.86
	<i>lacZ</i> ⁺	3881 \pm 492		
<i>rpsL</i> ^{K42T}	<i>lacZ105</i> (Am)	0.39 \pm 0.18	0.013	0.02
	<i>lacZ</i> ⁺	2892 \pm 219		

a. Mean \pm SD from four independent experiments.

Table 3. Overall profile for mutations within the *gidB*, *rpsL* and *rrs* genes from *M. tuberculosis* clinical isolates.

Sample group	Streptomycin susceptibility ^a	Number of strains sequenced	Number of mutants						
			<i>gidB</i>	<i>rpsL</i>	<i>rrs</i>	<i>gidB rpsL</i>	<i>gidB rrs</i>	<i>gidB rpsL rrs</i>	None
I	R (20 µg ml ⁻¹)	42	13	19	1	6	2	1	0
	S (20 µg ml ⁻¹)	54	15	0	2	0	1	0	36
II	R (10 µg ml ⁻¹)	15	6	8	0	0	1	0	0
	S (10 µg ml ⁻¹)	21	0	0	0	0	0	0	21
Total		132	34	27	3	6	4	1	57

a. Determined on Ogawa egg medium.
R, resistant; S, susceptible.

tant phenotype (Table 1), we suspected that these mutations should be present in a considerable number of streptomycin-resistant clinical isolates. To address this possibility, we examined 132 randomly selected clinical *M. tuberculosis* isolates from Japanese tuberculosis patients, including 57 that were streptomycin-resistant and 75 that were streptomycin-susceptible. The level of resistance to nine antituberculosis antibiotics and the presence or absence of mutations in *gidB*, *rpsL* and *rrs* are summarized in Tables S2 and S3, while the overall mutation profile is summarized briefly in Table 3. The *rrs* mutations, A514C and A1401, were not considered as streptomycin-resistance mutations in Table 3 because the presence of these mutations in clinical isolates susceptible to streptomycin (see Tables S2 and S3) indicates irrelevancy of these mutations to streptomycin resistance [A1401 mutation is reportedly known to confer kanamycin resistance (Suzuki *et al.*, 1998)]. Sample groups I and II represent *M. tuberculosis* strains isolated before and after 2000 respectively. In that year, the standard streptomycin concentration used to discriminate resistance and susceptibility in Japan was changed from 20 µg ml⁻¹ to 10 µg ml⁻¹.

As expected, in group II samples, *gidB* mutations were tightly associated with the streptomycin-resistant phenotype, while no mutations were found in streptomycin-susceptible strains ($P=0.003$, Fisher's exact test). In group I samples, however, which were clustered using 20 µg ml⁻¹ streptomycin, *gidB* mutations were found in both streptomycin-resistant and -susceptible fractions, indicating that the MICs for *M. tuberculosis gidB* mutants were higher than 10 µg ml⁻¹, most probably around 20 µg ml⁻¹ in the Ogawa egg medium used for drug susceptibility testing. The low-level streptomycin-resistance phenotype of *M. tuberculosis gidB* mutants was confirmed by streaking several representatives onto Middlebrook 7H11 agar medium containing streptomycin (Table S3). Notably, *gidB* mutations were found at a high frequency of 33% (19/57) among isolates classified to resistant strain. The frequency of *gidB* mutations was comparable to that of *rpsL* mutations (47%; 27/57), and even double (*gidB rpsL* and *gidB rrs*) and triple (*gidB rpsL rrs*) mutations

were detected at a frequency of 18% (10/57), indicative of the importance of *gidB* mutations to the development of high-level resistance (see below). Moreover, the *gidB rpsL* double mutants displayed a variety of *rpsL* mutations, including T35N, R86P, K88Q and K88T mutations (Table S2), that are found only rarely in high-level streptomycin-resistant clinical isolates (Böttger *et al.*, 1998).

The majority of the clinical isolates (70%; 93/132) had an amino acid substitution at codon 92 (Glu to Asp; E92D) of *gidB*. Glu-92 is thought to be the ancestral type, because this residue is conserved without exception in high G+C Gram-positive bacteria. However, examination of several mutant D92 strains and wild-type E92 strains showed that this substitution did not account for the difference in sensitivity to streptomycin (Table S3). Consequently, we do not consider this alteration to be a streptomycin-resistance mutation.

gidB mutations result in vigorous emergence of high-level streptomycin-resistant mutants

The results described above led us to hypothesize that cells may be more likely to acquire high-level streptomycin resistance if they carry a *gidB* mutation in their genetic background. This was tested by comparing the frequencies at which high-level streptomycin-resistant mutants emerge from wild-type and *gidB* mutant strains on plates containing a high concentration of streptomycin. In wild-type *E. coli*, the frequency at which high-level streptomycin-resistant mutants emerged was 1.1×10^{-9} , but the frequency was substantially higher (by 450-fold) in the *gidB* mutant (Table 4), always accompanied by an *rpsL* mutation (data not shown). This was also true for *M. smegmatis*, although the increase was only 11-fold. The results obtained with three *M. tuberculosis* strains carrying *gidB* mutations were remarkable. High-level streptomycin-resistant mutants (often accompanied by an *rpsL* mutation) emerged at an extraordinary frequency of 10^{-4} , which represents >2000-fold increase over the frequency of their emergence from wild-type strains ($<3 \times 10^{-8}$). In contrast, virtually no difference was

Table 4. Effect of *gidB* mutation on emergence of high-level streptomycin-resistant mutants.^a

Strain	Streptomycin ($\mu\text{g ml}^{-1}$) used for high-level resistance	Frequency of mutants	Relative frequency
<i>E. coli</i>	50		
Wild type		1.1×10^{-9}	1
<i>gidB</i> mutant		5.0×10^{-7}	450
<i>M. smegmatis</i>	100		
Wild type		6.3×10^{-9}	1
<i>gidB</i> mutant		6.8×10^{-8}	11
<i>M. tuberculosis</i>	16		
Wild type			
No. 05-028		$< 5.4 \times 10^{-8}$	1
No. 05-048		$< 3.1 \times 10^{-8}$	1
<i>gidB</i> mutant			
No. 05-029		1.7×10^{-4}	> 2000
No. 04-034		1.4×10^{-4}	> 2000
No. 03-075		1.2×10^{-4}	> 2000

a. Selected on LB (for *E. coli*), R (for *M. smegmatis*) or 7H11 (for *M. tuberculosis*) agar.

detected, as examined and compared between *M. smegmatis gidB* and wild-type strains, in the frequency of emergence of mutants resistant to antituberculosis drugs other than streptomycin (we tested kanamycin, rifampicin, ethambutol and isoniazid) (data not shown). These results indicate that the *gidB* mutations do not affect the overall mutation rate of cells.

Discussion

The bacterial ribosome is a major target for antibiotics (Poehlsgaard and Douthwaite, 2005). The aminoglycoside antibiotic streptomycin, the first antibiotic found to target the ribosome, has been important in the treatment of tuberculosis. In addition, streptomycin serves as an essential molecular probe to dissect 'decoding' process of protein synthesis (Ogle and Ramakrishnan, 2005). Recent publications of the crystal structures of the 30S and 50S ribosomal subunits (Ban *et al.*, 2000; Carter *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000), as well as the intact 70S ribosome (Korostelev *et al.*, 2006; Selmer *et al.*, 2006), have increased our understanding of the mechanism of protein synthesis and the actions of antibiotics. The A site of the 30S subunit consists of a pocket formed by the so-called 530 loop, a portion of the long helix 44, and helix 34 in the 16S rRNA (Wimberly *et al.*, 2000). The only protein locating in the vicinity of the A site is the S12 ribosomal protein. Streptomycin binds to the phosphate backbone of 16S rRNA in four different domains – U14 in helix 1, G526 and G527 in the 530 loop, A913 and A914 in helix 27/28, and C1490 and G1491 in helix 44 – through it also forms both salt bridges and hydrogen bonds and makes contact with the S12 protein (Carter *et al.*, 2000). Thus, streptomycin

perturbs the A site function, eventually leading to misreading of the genetic code during translation (Ogle and Ramakrishnan, 2005). The 530 loop region is one of the most highly conserved features of 16S rRNA and appears to play a key role in mediating the accuracy of protein synthesis (Powers and Noller, 1991; Wimberly *et al.*, 2000; Ogle and Ramakrishnan, 2005). Mutations in this region often result in resistance to streptomycin (Melancon *et al.*, 1988; Powers and Noller, 1991; Springer *et al.*, 2001). However, no mutations had ever been found in the invariant nucleotide G527. Consequently, our conclusion that failure to methylate G527 results in resistance to streptomycin is striking, although methylation at position G527 was not actually demonstrated in the present work.

The present work, however, demonstrated unambiguously that loss of the m⁷G modification in 16S rRNA due to *gidB* mutations results in resistance to streptomycin. This was somewhat unusual, given that resistance to most drugs that interact with ribosomes is associated with changes in the rRNA sequence (Springer *et al.*, 2001), acquisition of methylated bases (Cundliffe, 1989; Douthwaite *et al.*, 2005) or alteration of ribosomal proteins (Poehlsgaard and Douthwaite, 2005). Our findings are not unprecedented, however. Resistance to kasugamycin, another aminoglycoside antibiotic, results from the loss of a methylase, RsmA (also known as KsgA), which methylates bases 1518 and 1519 of the *E. coli* 16S rRNA (Helser *et al.*, 1972). Likewise, resistance to capreomycin, a cyclic peptide antibiotic used as a second-line antituberculosis drug, was recently shown to result from loss of another methylase, 2'-O-methyltransferase (encoded by *tylA*), which methylates the pentose moieties of nucleotides 1409 of 16S rRNA, 1920 of 23S rRNA (Johansen *et al.*, 2006). Thus, acquisition of drug resistance from a lack of rRNA methylation appears to be fairly common among bacteria, although unlike *gidB*, *tylA* homologues are found only in limited number of bacteria. As we have now established that *GidB* is an rRNA methyltransferase, we propose that *rsmG* (rRNA small subunit methyltransferase gene G) would be a more appropriate designation than *gidB*, based on James Ofengand's nomenclature system for rRNA modifying enzymes (Andersen and Douthwaite, 2006). (Nonetheless, to avoid confusion, we have used the gene name *gidB* through this paper.)

Homologues of *gidB* are highly conserved among eubacteria, so it was somewhat surprising that, despite the apparently important contribution made by *GidB* to ribosomal function, disruption of *gidB* had no effect on the growth of *E. coli* (Fig. 1C) or *M. smegmatis* (Y. Tanaka, S. Okamoto and K. Ochi, unpublished). In addition, high-level resistance to streptomycin in *M. tuberculosis* is predominantly linked to mutations in *rpsL* which do not carry a fitness cost (Böttger *et al.*, 1998; Sander *et al.*, 2002). Therefore, it is apparent that two major resistance mecha-

Table 5. Bacterial strains used in this study.

Strain	Description	Source ^a
<i>E. coli</i>		
BW25113	$\Delta(\text{araD-araB})567 \Delta\text{lacZ4787}::\text{rmb-3} \text{ lacIp-4000}(\text{lacI}^{\text{P}}) \lambda^- \text{ rph-1} \Delta(\text{rhaD-rhaB})568 \text{ hsdR514}$	CGSC
JWK3718	BW25113 $\Delta\text{gidB}::\text{kan}$	NBRP
CAG12080	MG1655 $\text{zah-281}::\text{Tn10}$	NBRP
DEV6	$\text{lacZ105}(\text{Am}) \lambda^- \text{ galU65 relA1 spoT1 thi-1}$	CGSC
SEC166	DEV6 $\text{zah-281}::\text{Tn10}$	This study
SEC167	DEV6 $\text{zah-281}::\text{Tn10 lacZ}^+$	This study
SEC170	DEV6 $\Delta\text{gidB}::\text{kan zah-281}::\text{Tn10}$	This study
SEC171	DEV6 $\Delta\text{gidB}::\text{kan zah-281}::\text{Tn10 lacZ}^+$	This study
SEC174	DEV6 $\text{rpsL}^{\text{K42T}} \text{ zah-281}::\text{Tn10}$	This study
SEC175	DEV6 $\text{rpsL}^{\text{K42T}} \text{ zah-281}::\text{Tn10 lacZ}^+$	This study
W3110	$\text{F}^- \lambda^- \text{ rph-1 Inv (rmD-rmE)}$	Laboratory stock
448T	W3110 gidB (frameshift)	This study
<i>S. aureus</i>		
209P	Prototroph, avirulent strain	JCM
<i>M. smegmatis</i>		
5866 ^T	Type strain, prototroph	JCM
205C	5866 ^T gidB (frameshift)	This study
<i>M. tuberculosis</i>		
05-028	Streptomycin-susceptible strain	Clinical isolate
05-048	Streptomycin-susceptible strain	Clinical isolate
03-075	gidB mutant with low-level streptomycin resistance	Clinical isolate
04-034	gidB mutant with low-level streptomycin resistance	Clinical isolate
05-029	gidB mutant with low-level streptomycin resistance	Clinical isolate

a. NBRP, National BioResource Project (NIG, Japan); CGSC, *E. coli* Genetic Stock Centre; JCM, Japan Collection of Microorganisms.

nisms (due to *gidB* or *rpsL* mutation) observed in strains isolated from clinical cases (Table 3) do not affect cell's fitness and thus their virulence (i.e. no reduction in virulence).

Most importantly, *gidB* mutants arose spontaneously and at high frequency (10^{-4} – 10^{-6}) in organisms including *M. tuberculosis* (Table 1). In addition, it is noteworthy that mutants showing high-level streptomycin resistance arose at an extraordinarily high frequency among cells that carried a *gidB* mutation in their genetic background. This was especially pronounced in *M. tuberculosis*, in which *gidB* mutation caused a > 2000-fold increase in the emergence of mutants with high-level streptomycin resistance (Table 4). Indeed, *gidB rpsL* and *gidB rrs* double mutants, together even with a *gidB rpsL rrs* triple mutant, are frequently detected in clinical isolates from tuberculosis patients (Table 3). As *gidB* mutation did not affect the frequency at which mutants resistant to antibiotics other than streptomycin emerged, it is not likely that *GidB* functions as an anti-mutator-like protein. Nonetheless, the emergence of high-level streptomycin-resistant mutants at an extraordinary high frequency due to *gidB* mutation is of considerable importance in the treatment of tuberculosis. Although clinical trials have shown the efficacy of streptomycin in the initial phase of tuberculosis treatment, the increasing frequency of resistance to streptomycin at global level has made this drug less useful. Our findings account for this clinical aspect.

Streptomyces coelicolor strain KO-179 with a mutation (*str-19*) conferring low-level streptomycin resistance exhib-

its an enhanced expression of SAM synthetase, eventually leading to overproduction of antibiotic (Okamoto *et al.*, 2003). As will be reported elsewhere, we have confirmed that *str-19* is a mutation within *gidB* and that a *gidB* knockout mutant constructed by gene manipulation displays similar phenotype as the mutant KO-179, accompanied by an increased protein synthesis activity at late growth phase (K. Nishimura, T. Hosaka, S. Tokuyama, S. Okamoto and K. Ochi, submitted). Although we do not know whether *M. tuberculosis gidB* mutants exhibit an enhanced expression of SAM synthetase and an increased protein synthesis activity as did the *S. coelicolor gidB* mutants, these findings may be helpful in considering the plausible physiological effects of *gidB* mutation in *M. tuberculosis*.

In conclusion, we have identified the mutation conferring low-level resistance to streptomycin that has remained obscure for long time and uncovered the resistance mechanism. Further studies will establish the precise function of *GidB* in the bacterial ribosome and unravel the molecular mechanisms underlying the vigorous emergence of high-level resistance to streptomycin in *M. tuberculosis*, and perhaps in other pathogenic bacteria.

Experimental procedures

Bacterial strains and culture conditions

The bacterial strains used in this study are listed in Table 5. Unless stated otherwise, *E. coli* BW25113 and an isogenic $\Delta\text{gidB}::\text{kan}$ strain JWK3718 were used as the wild-type and ΔgidB strains respectively (Baba *et al.*, 2006). *E. coli* and

S. aureus were grown in Luria–Bertani (LB) medium or on LB agar, *M. smegmatis* was grown on R agar, and *M. tuberculosis* was grown on Ogawa egg medium or Middlebrook 7H11 medium. All incubations were done at 37°C.

Generation of spontaneous streptomycin-resistant mutants

Spontaneous low-level streptomycin-resistant mutants (*gidB* mutants) were generated from the wild-type strains of *E. coli* (W3110), *M. smegmatis* (5866^T) and clinical isolates of *M. tuberculosis* (strain no. 05-028 and 05-048). Mutant exhibiting high-level streptomycin resistance (*rpsL* or *rrs* mutants) were obtained from wild-type strains and their respective *gidB* mutants. Portions of a cell suspension of each strain were spread on streptomycin-containing plates. Serial dilutions of the cell suspension were also plated on media without streptomycin to determine the numbers of viable cells in the original cell suspension. When measuring the frequency of resistant mutants, we first conducted single colony isolation, and cells originating from each clone (usually we tested 10–20 clones) were separately examined.

In vitro translation assay

Cell-free translation of GFP mRNA was performed as described previously (Hosaka *et al.*, 2006). Aliquots of reaction products were subjected to electrophoresis on 10% native-polyacrylamide gels, and GFP levels were determined using a Fluorolmager (Molecular Dynamics).

Plasmid constructions

The *E. coli gidB* gene was amplified using the forward primer, 5'-GGATCCATGCTCAACAACTCTCCTTACTG-3', containing a BamHI site, and the reverse primer, 5'-CTGCAGTTAAATTTTATTGCTTTAATCACCACCAG-3', containing a PstI site. The gene fragment was amplified using KOD-Plus- DNA polymerase (Toyobo, Japan) and cloned into the pTA2 vector (Toyobo, Japan) using a TArget clone -Plus- TA cloning kit (Toyobo, Japan). After sequence confirmation, the BamHI-PstI-fragment was inserted into pQE-80 L (Qiagen), generating the pQE-Eco_*gidB*. The *gidB* gene from *S. coelicolor* was amplified using the forward primer, 5'-GGATCCATGTCGGAGGCAGCGGAGCT-3', containing a BamHI site, and the reverse primer, 5'-CTGCAGC TATCCGCGGCGTTCGACGCGT-3', containing a PstI site, and cloned into pQE-80L in analogous fashion, generating the plasmid pQE-*Sco_gidB*.

Expression and purification of (His)₆-GidB protein

Escherichia coli BL21/pLysS cells harbouring pQE-Eco_*gidB* were grown at 37°C to an OD₆₀₀ of 0.6 in 200 ml of LB medium containing 0.2% glucose, 50 µg ml⁻¹ carbenicillin and 25 µg ml⁻¹ chloramphenicol. Expression was induced with 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, and incubation was continued at 37°C for an additional 4 h. Cells were harvested by centrifugation and frozen at -70°C. The cell pellet was resuspended in 16 ml of binding buffer [20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 500 mM NaCl, 50 mM imidazole,

3 mM dithiothreitol] containing Complete™ protease inhibitor cocktail (Roche) and sonicated. Insoluble material was removed by centrifugation, and the crude extract was chromatographed on a 1 ml HisTrap HP column (GE Healthcare Bio-Sciences) equilibrated in binding buffer. The (His)₆-GidB protein was eluted with a linear gradient of 50–300 mM imidazole in binding buffer. The fractions containing (His)₆-GidB were pooled, dialysed against storage buffer [20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM KCl, 3 mM dithiothreitol, 20% (v/v) glycerol], concentrated and stored at -70°C until use.

In vitro methylation assay

Methylation reactions were performed using 20 pmol of 70S ribosomes, 30S subunits, 50S subunits or 16S rRNA as substrates in 20 µl of 50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM NH₄Cl, 2 mM Mg(OAc)₂, 5 mM dithiothreitol, and 10% (v/v) glycerol containing 4–100 pmol of (His)₆-GidB as the methylase. The methyl donor [*methyl*-³H]SAM (15 Ci mmol⁻¹; GE Healthcare Bio-Sciences) was added to a final concentration of 3 µM, and the mixtures were incubated at 37°C for the indicated times (usually 1–6 h). The reactions were terminated by precipitation with 10% ice-cold trichloroacetic acid for kinetic analyses or by extraction with an ISOGEN reagent (Nippon Gene, Japan) for fluorographic analysis. To measure radioactivity, samples were collected on glass filters (Whatman GF/F), and radioactivity on the filter was measured by scintillation counting. For fluorographic analysis, extracted rRNAs were precipitated with isopropanol, dissolved in TE buffer, and applied onto acrylamide gels.

Identification of in vitro methylated nucleotide

In vitro methylation reactions were performed with 30S subunits as described above, and the ³H-labelled RNAs were extracted with ISOGEN, precipitated with isopropanol and digested with nuclease P1 (Yamasa, Japan). The 5'-monophosphate nucleosides thus generated were separated by 2D-TLC on cellulose plates using the solvent system I described previously (Grosjean *et al.*, 2004). Radioactive compounds were detected by fluorography using EN3HANCE spray (PerkinElmer).

Analysis of in vivo methylation profiles of 16S rRNA

16S RNAs were extracted from 30S subunits isolated from *E. coli* wild-type and Δ*gidB* strains. A 25 µg aliquot of each extract was digested for 3 h at 37°C with nuclease P1 (3 U) and alkaline phosphatase (0.04 U) in 25 µl of reaction mixture containing 20 mM HEPES-KOH (pH 7.5). The resulting nucleosides were analysed by HPLC using an Inertsil ODS-3 column (250 × 2.1 mm, GL Science, Japan) as described (Ikeuchi *et al.*, 2006).

Stop codon read-through assay β-galactosidase activity was measured according to standard protocols (Miller, 1992), except that all incubations were at 30°C. Read-through frequency is expressed as the activity obtained with the *lacZ105*(Am) strain divided by the activity obtained with the wild-type *lacZ* strain.

Acknowledgements

This work was supported by a grant to K.O. from the Effective Promotion of Joint Research of Special Coordination Funds (Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan). We are grateful to the Genefrontier (Tokyo) for supporting the mutation search using the CGS technique. The *E. coli* strains used in this study were kindly provided by CGSC (the *E. coli* Genetic Stock Centre, Yale University) and the National BioResource Project (NIG, Japan): *E. coli*.

References

- Albert, T.J., Dailidienė, D., Dailide, G., Norton, J.E., Kalia, A., Richmond, T.A., *et al.* (2005) Mutation discovery in bacterial genomes: metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Nat Methods* **2**: 951–953.
- Andersen, N.M., and Douthwaite, S. (2006) YebU is a m⁶C methyltransferase specific for 16S rRNA nucleotide 1407. *J Mol Biol* **359**: 777–786.
- Andersson, D.I., and Levin, B.R. (1999) The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* **2**: 489–493.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., *et al.* (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**: 2006.008.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**: 905–920.
- Böttger, E.C., Springer, B., Pletschette, M., and Sander, P. (1998) Fitness of antibiotic-resistant microorganisms and compensatory mutations. *Nat Med* **4**: 1343–1344.
- Brégeon, D., Colot, V., Radman, M., and Taddei, F. (2001) Translational misreading: a tRNA modification counteracts a +2 ribosomal frameshift. *Genes Dev* **15**: 2295–2306.
- Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interaction with antibiotics. *Nature* **407**: 340–348.
- Cundliffe, E. (1989) How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu Rev Microbiol* **43**: 207–233.
- Cundliffe, E. (1990) Recognition sites for antibiotics within rRNA. In *The Ribosome: Structure, Function and Evolution*. Hill, W.E., Dahlberg, A., Garrett, R.A., Moore, P.B., Schlessinger, D., and Warner, J.R. (eds). Washington DC: American Society for Microbiology, pp. 479–490.
- Demerec, M. (1948) Origin of bacterial resistance to antibiotics. *J Bacteriol* **56**: 63–74.
- Douthwaite, S., Fourmy, D., and Yoshizawa, S. (2005) Nucleotide methylations in rRNA that confer resistance to ribosome-targeting antibiotics. In *Fine-tuning of RNA Functions by Modification and Editing*. Grosjean, H. (ed.). New York: Springer Verlag, pp. 287–309.
- Finken, M., Kirschner, P., Meier, A., Wrede, E., and Böttger, E.C. (1993) Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol* **9**: 1239–1246.
- Gillespie, S.H. (2002) Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 267–274.
- Grosjean, H., Keith, G., and Droogmans, L. (2004) Detection and quantification of modified nucleotides in RNA using thin-layer chromatography. *Methods Mol Biol* **265**: 357–391.
- Helser, T.L., Davies, J.E., and Dahlberg, J.E. (1972) Mechanism of kasugamycin resistance in *Escherichia coli*. *Nat New Biol* **235**: 6–9.
- Honoré, N., and Cole, S.T. (1994) Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 238–242.
- Honoré, N., Marchal, G., and Cole, S.T. (1995) Novel mutation in 16S rRNA associated with streptomycin dependence in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 769–770.
- Hosaka, T., Xu, J., and Ochi, K. (2006) Increased expression of ribosome recycling factor is responsible for the enhanced protein synthesis during the late growth phase in an antibiotic-overproducing *Streptomyces coelicolor* ribosomal *rpsL* mutant. *Mol Microbiol* **61**: 883–897.
- Hosoya, Y., Okamoto, S., Muramatsu, H., and Ochi, K. (1998) Acquisition of certain streptomycin-resistant (*str*) mutations enhances antibiotic production in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 2041–2047.
- Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A., and Suzuki, T. (2006) Mechanistic insights into sulfur relay by multiple sulfur mediators involved in thiouridine biosynthesis at tRNA wobble positions. *Mol Cell* **21**: 97–108.
- Johansen, S.K., Maus, C.E., Plikaytis, B.B., and Douthwaite, S. (2006) Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using *tlyA*-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Mol Cell* **23**: 173–182.
- Kagan, R.M., and Clarke, S. (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse *S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys* **310**: 417–427.
- Klein, M., and Kimmelman, L.J. (1946) The role of spontaneous variants in the acquisition of streptomycin resistance by the shigellae. *J Bacteriol* **52**: 471–479.
- Korostelev, A., Trakhanov, S., Laurberg, M., and Noller, H.F. (2006) Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements. *Cell* **126**: 1065–1077.
- Meier, A., Sander, P., Schaper, K.-J., Scholz, M., and Böttger, E.C. (1996) Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2452–2454.
- Melancon, P., Lemieux, C., and Brakier-Gingras, L. (1988) A mutation in the 530 loop of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA causes resistance to streptomycin. *Nucleic Acids Res* **16**: 9631–9639.
- von Meyenburg, K., and Hansen, F.G. (1980) The origin of replication, *oriC*, of the *Escherichia coli* chromosome: genes near to *oriC* and construction of *oriC* deletion mutations. In *Mechanistic Studies of DNA Replication and Genetic Recombination*. New York: Academic Press, pp. 137–159.
- Miller, J.H. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and*

- Related Bacteria*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Montandon, P.E., Wagner, R., and Stutz, E. (1986) *E. coli* ribosomes with a C912 to U base change in the 16S rRNA are streptomycin resistant. *EMBO J* 5: 3705–3708.
- Nair, J., Rouse, D.A., Bai, G.-H., and Morris, S.L. (1993) The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 10: 521–527.
- Ochi, K., and Hosoya, Y. (1998) Genetic mapping and characterization of mutations which suppress the effect of a *relC* mutation on antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Antibiot* 51: 592–595.
- Ochi, K., Okamoto, S., Tozawa, Y., Inaoka, T., Hosaka, T., Xu, J., and Kurosawa, K. (2004) Ribosome engineering and secondary metabolite production. *Adv Appl Microbiol* 56: 155–184.
- Ogle, J.M., and Ramakrishnan, V. (2005) Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem* 74: 129–177.
- Okamoto, S., Lezhava, A., Hosaka, T., Okamoto-Hosoya, Y., and Ochi, K. (2003) Enhanced expression of *S*-adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 185: 601–609.
- Pinard, R., Payant, C., Melancon, P., and Brakier-Gingras, L. (1993) The 5' proximal helix of 16S rRNA is involved in the binding of streptomycin to the ribosome. *FASEB J* 7: 173–176.
- Poehlsgaard, P., and Douthwaite, S. (2005) The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 3: 870–881.
- Powers, T., and Noller, H.F. (1991) A functional pseudoknot in 16S ribosomal RNA. *EMBO J* 10: 2203–2214.
- Selmer, M., Dunham, C.M., Murphy, F.V., 4th, Weixlbaumer, A., Petry, S., et al. (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* 313: 1935–1942.
- Ramaswamy, S.V., Dou, S.J., Rendon, A., Yang, Z., Cave, M.D., and Graviss, E.A. (2004) Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol* 53: 107–113.
- Romanowski, M.J., Bonanno, J.B., and Burley, S.K. (2002) Crystal structure of the *Escherichia coli* glucose-inhibited division protein B (GidB) reveals a methyltransferase fold. *Proteins* 47: 563–567.
- Sander, P., Springer, B., Prammananan, T., Sturfels, A., Kappler, M., Pletschette, M., et al. (2002) Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1204–1211.
- Schatz, A., and Waksman, S.A. (1944) Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc Soc Exp Bio Medical* 57: 244–248.
- Shima, J., Hesketh, A., Okamoto, S., Kawamoto, S., and Ochi, K. (1996) Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 178: 7276–7284.
- Springer, B., Kidan, Y.G., Prammananan, T., Ellrott, K., Böttger, E.C., and Sander, P. (2001) Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2877–2884.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Williams, D.L., Kreiswirth, B.N., and Musser, J.M. (1996) Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 1024–1026.
- Suzuki, Y., Katsukawa, C., Tamaru, A., Abe, C., Makino, M., Mizuguchi, Y., et al. (1998) Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 36: 1220–1225.
- Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Jr, Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vornheim, C., et al. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407: 327–339.
- Yim, L., Moukadir, I., Björk, G.R., and Armengod, M.-E. (2006) Further insights into the tRNA modification process controlled by proteins MnmE and GidA of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 34: 5892–5905.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

Fig. S1. Alignment of GidB homologue from various bacteria.

Table S1. *gidB* mutations in spontaneous streptomycin-resistant mutants from various bacteria.

Table S2. Mutations and drug susceptibility in *M. tuberculosis* clinical isolate (sample group I).

Table S3. Mutations and drug susceptibility in *M. tuberculosis* clinical isolate (sample group II).

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>

6. 多剤耐性結核菌検出法の進歩

鈴木 定彦^{*1)} 田丸 亜貴^{**} 中島 千絵^{*2)}
西原 みづき^{*3)} 福島 由華里^{*4)} 松葉 隆司^{***}

結核菌の迅速薬剤感受性試験は、的確な治療による多剤耐性結核菌の出現と蔓延の防止には必須である。しかしながら、従来から実施されている小川培地や寒天培地上での培養をベースとした方法では現在以上の迅速化を望むことはできない。最近では液体培地をベースとした方法により迅速化が計られている。更に培養をベースとした薬剤感受性試験法として新たな試みも見られる。その中でミコバクテリオファージを用いた方法と光学顕微鏡による観察法は有望なものと考えられる。一方、全く異なったアプローチとして遺伝子診断法も数多く開発されてきている。成長速度の著しく遅い結核菌において迅速な薬剤耐性の判定を可能にするためには、結核菌の薬剤耐性に関連する遺伝子変異について解析をすすめ、遺伝子診断へと応用することが選択肢の一つと考えられる。本稿では最近新たに開発された薬剤耐性結核菌検出法について解説する。

Key Words: 薬剤耐性結核菌/ミコバクテリオファージ/顕微鏡観察法/
遺伝子変異/ DNA マイクロアレイ

I はじめに

わが国の結核症は国民病と恐れられていたが、栄養事情、衛生状態の改善や化学療法の普及、更には結核予防法に基づいた措置により、死亡数、新規登録患者数は大きく低下した。しかしながら、1985年頃より減少率が鈍化し始め、1997年には患者登録制度が実施されて以降初めて前年を上回った。その後2000年には減少傾向に戻ったものの、2004年には依然として2,328人が結核で死亡している。また、新規登録患者数29,736人、感染源となりうる塗抹陽性患者数11,445人と、共にいまだ高い水準に留まっている。

今日のわが国では結核が流行していた時期に結

核菌に感染した中高年の既感染者からの発病が多く、若年層の結核患者は減少している。結果として、結核未感染者の割合が年々増加し、中年層においても未感染者の増加が認められているのが現実である。一方では、再発患者における薬剤耐性結核の割合が増加傾向を示している。若年層の薬剤耐性結核発病の危険性が増加しているのが現実であり、実際にそのような症例も報告されている。

薬剤耐性結核の蔓延を防止するためには、的確な治療に繋がる迅速で正確な薬剤感受性試験の実施が重要である。しかしながら、従来の結核菌の薬剤感受性試験は固形培地上での培養をベースとしており、正確な耐性判定には約2カ月間を要す

Advances of methods for detection of multidrug-resistant tubercle bacilli

* Yasuhiko Suzuki, Chie Nakajima, Mizuki Nishihara, Yukari Fukushima

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター国際疫学部門¹⁾教授²⁾博士研究員³⁾共同研究員⁴⁾研究補助員

** Aki Tamaru 大阪府立公衆衛生研究所感染症部 主任研究員

*** Takashi Matsuba 鳥取大学医学部感染制御学分野 講師

特集● 多剤耐性結核の現状と今後

るという欠点がある。一方、近年開発された Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 法を用いることにより耐性判定に要する時間が大幅に短縮されたとはいえ、依然として判定までに3週間以上の期間が必要である。著しく遅い結核菌の増殖速度を考えると、MGIT 法でもこれ以上の迅速化を望むのは困難と考えられる。

現在、より迅速な薬剤耐性結核菌検出のための様々な方法が開発されてきている。本稿では、それらについて解説する。

II 生菌を用いた検査法

1. バクテリオファージを用いたアッセイ

ミコバクテリオファージを基盤とした試験は結核の診断と薬剤感受性試験の両者に用いられている。この技術は生きた結核菌に感染するバクテリオファージを用いて生物発光またはファージの増幅を指標として実施するものである。

1) 生物発光を用いた検査法¹⁾

ルシフェラーゼ遺伝子を挿入したミコバクテリオファージが結核菌に感染した場合、結核菌の中でミコバクテリオファージ由来の蛋白質をコードする遺伝子の転写と翻訳が起こる。このとき同時にミコバクテリオファージゲノム内に挿入されて

いるルシフェラーゼ遺伝子の転写と翻訳も起こり、結核菌内にルシフェラーゼが蓄積されることになる(図1)。結核菌が存在しない場合にはその限りではない。ルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定することにより生きた結核菌存在の有無が判定できる。抗結核剤の存在下に本法を実施した場合、耐性菌ではルシフェラーゼ活性が見られ、感受性菌ではこれが見られないことになる。現在米国の Sequella 社が Bronx Box という名称で本法の実用化に関する検討を行っている。

2) ファージの増殖を基盤とした検査法²⁾

本法ではミコバクテリオファージが結核菌に感染し、結核菌内で子孫ファージが増殖するのを見るものである。結核菌そのものでファージによるプラーク形成を見るためには2~3週間の期間を要するため、検出には迅速発育抗酸菌の一種のスメグマ菌 (*Mycobacterium smegmatis*) を用いる。原理を図2に示した。この方法により結核菌の検出が3~4日に短縮された。実際の耐性検査では 0.75×10^5 CFU の結核菌懸濁に被検抗結核剤を加え、72時間 37℃ で培養した後 5×10^5 PFU のミコバクテリオファージ D29 を添加し、37℃ で90分間培養する。感染できなかったミコバクテリオファージは硫酸第一鉄アンモニウムにて不

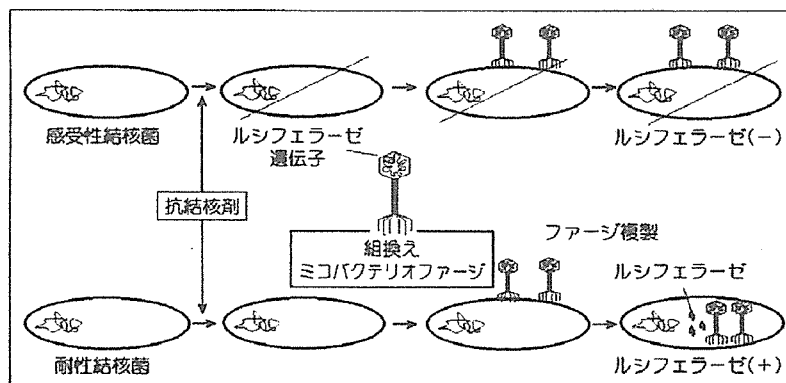


図1 生物発光を用いた薬剤感受性試験法

ルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれた組換えミコバクテリオファージが結核菌に感染すると、結核菌内でミコバクテリオファージの複製が起こる。このときミコバクテリオファージゲノムに組み込まれているルシフェラーゼ遺伝子も同時に発現し、ルシフェラーゼ蛋白質が生産される。薬剤感受性菌の場合は結核菌自体が薬剤存在下には生存できないためルシフェラーゼ蛋白質は生産されない。ルシフェラーゼ蛋白質による生物発光が見られれば耐性と判定する。

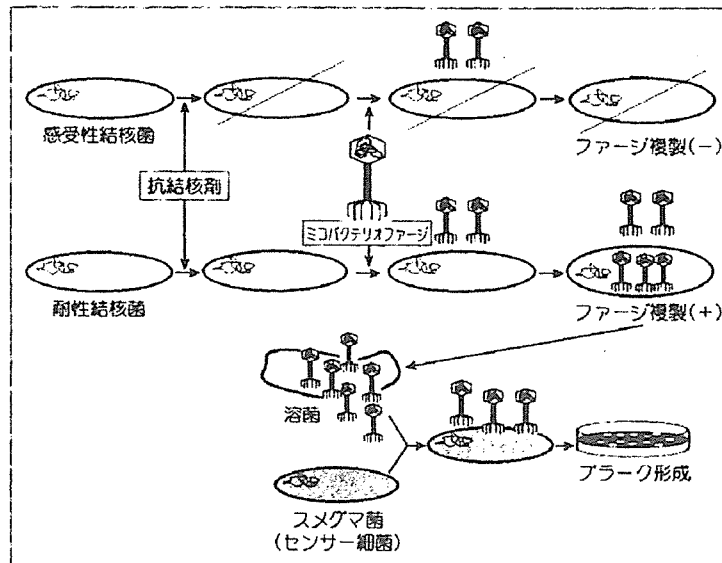


図2 ファージの増殖を基盤とした薬剤感受性試験法

ミコバクテリオファージが結核菌に感染すると、結核菌内でミコバクテリオファージが増殖する。この結核菌と迅速発育抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* (スメグマ菌) を混合し平板上に蒔く。結核菌内で増殖したミコバクテリオファージはスメグマ菌にも感染し、スメグマ菌の菌膜上でブランクを形成する。薬剤感受性菌の場合は結核菌自体が薬剤存在下には生存できないためミコバクテリオファージは増殖しない。ブランク形成が見られれば耐性と判定する。

活化する。結果として得られた懸濁液の一部をスメグマ菌を敷き詰めた寒天平板に蒔き 37℃、一晚培養することで結果が得られる。従って薬剤感受性試験が4日間を終了する(図2)。本法は既に英国 Biotec Laboratory より FASTPlaque-TB[®] という名称で市販されている。

上記2つの方法が様々な研究室で試験された結果、どちらの方法も臨床分離菌に対しては十分な感度および特異性を有しているといった評価を受けた。しかしながら、喀痰等の臨床検体を用いた評価も複数実施されているが現在のところ一致した結論には至っていない。つまり、現状ではミコバクテリオファージを基盤とした薬剤感受性試験法は分離菌に限定して使用されるべきであると考えられる。

2. 顕微鏡観察をベースとした薬剤感受性試験 (Microscopic observation drug-susceptibility assay (MODS))

Microscopic observation drug-susceptibility assay (MODS) は倒立光学顕微鏡を用いて液体培地 (Middlebrook 7H9) 中での結核菌の増殖を観察することにより薬剤感受性を判定する方法である。液体培地中で結核菌はコードファクターの関与による紐状の増殖 (Cord formation) を見せる。本法では抗結核剤を含む培地と含まない培地中での結核菌の紐状増殖を光学顕微鏡で観察するという単純なものである。最近この方法の有効性に関するいくつかの評価結果が報告されている^{3, 4)}。中でも Moore らの研究では数多くの検体についてその有効性が示されている。彼らは MODS 法と従来法である Lowenstein-Jensen (LJ) 培地を用いた培養試験を行い、検出率が MODS 法では 94% であるのに対して LJ 培地法では 86.9% と MODS 法が明らかに優れていたと報告している。

(1707) 61

特集◎ 多剤耐性結核の現状と今後

また、検出に要する期間も MODS 法では 8 日間と LJ 培地法 (塗抹陽性: 16 日間, 塗抹陰性: 28 日間) に対して優れたものであった。MODS 法を用いてイソニコチン酸ヒドラジド (INH), リファンピシン (RFP), これら両剤, エタンプトール (EB), およびストレプトマイシン (SM) に対する感受性試験が実施され, INH, RFP, これら両剤に対する感受性試験においては従来法と良好な一致が見られたが, EB, および SM 感受性試験における MODS 法の有用性は示されなかった。

3. 新規検出系を用いた迅速薬剤感受性試験

新規検出試薬を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験には ATP (adenosine triphosphate) 測定法, アラモア-ブルー法等がある。ATP 測定法は生菌中の ATP を測定することでこれまでにない迅速な薬剤感受性試験を可能としたものである。微生物をはじめとする生細胞はエネルギー源として ATP を含有している。従って, ATP を測定することにより生死の判定ができることになる。抗結核剤存在下で 5 日間培養した被検菌株の持つ ATP を測定し, 生死を判定することにより薬剤に対する感受性を判定するのが本法である⁵⁾。

III 遺伝子増幅を基盤とした迅速薬剤耐性結核菌検出法

細菌が薬剤耐性を獲得する場合, プラスミド, トランスポゾン, インテグロンあるいは染色体に存在する遺伝子により決定されることが考えられている。プラスミドやトランスポゾンによって決定される耐性では, 抗生物質を分解または修飾して不活化する酵素をコードする遺伝子がよく研究されている。一方, 染色体遺伝子上に存在する薬剤耐性形質はおもに薬剤の標的となる蛋白質をコードする遺伝子の突然変異によって決定されている。通常の細菌では上記の様々な機構で薬剤耐性を獲得することが知られているが, 結核菌での薬剤耐性獲得は染色体上の遺伝子変異によって決定されている。結核菌は自然突然変異と選択によって, 耐性を獲得するのである。つまり, 抗結核剤による治療により感受性菌が全て死滅した後も低い頻度で自然に起こった耐性変異を持った菌が生き残り, 増殖することにより全て耐性菌となるもので

ある。

抗結核剤の作用機序と耐性を決定する変異について数多くの報告がなされている。抗結核剤のうち INH はカタラーゼにより活性化され, ミコール酸の生合成を阻害することが報告されている。INH 耐性を引き起こす原因の一部が *katG* 遺伝子の全体欠損あるいは部分欠損にあることが Zhang ら⁶⁾ により 1993 年に報告された。次いで, *katG* 遺伝子上の塩基置換, 挿入等によっても INH 耐性となることが判明した⁷⁾。さらに, INH 耐性に関与する *inhA*, *kasA*, *aphC*, *ndh* 遺伝子上の変異が次々と明らかとなった。RFP は原核生物の DNA 依存 RNA ポリメラーゼの β サブユニットに結合して, RNA 合成開始の過程を特異的に阻害する。Telenti ら⁸⁾ は結核菌の RNA ポリメラーゼ β サブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子上の点突然変異と RFP 耐性の間に強い相関性があることを見出した。筆者ら⁹⁾ は日本で分離された結核菌においても同様な現象を見出した。その後様々な研究室から出されたデータを総合して考えると, 95% 以上の RFP 耐性結核菌において *rpoB* 上に点突然変異が存在することになる。ピラジナミド (PZA) は結核菌自身の持つピラジナミダーゼ活性によりピラジン酸へと変換され, 結果として脂肪酸合成酵素 I (FAS- I) に作用し, 短鎖脂肪酸の合成を阻害することが報告された。Scorpio ら¹⁰⁾ は結核菌のピラジナミダーゼをコードする *pncA* 遺伝子上の点突然変異と PZA 耐性の間に強い相関性があることを見出した。93% 以上の PZA 耐性結核菌において *pncA* 上に点突然変異が存在することも報告された。EB を低濃度で結核菌と同属の菌に作用させて培養した場合に, 菌体の表面に存在するアラビノガラクトタン (AG) とリポアラビノマンナン (LAM) の分子量が著しく低下する現象が見られた。この結果から耐性に関与する遺伝子としてアラビノース転移酵素をコードする *embB* 遺伝子が同定された¹¹⁾。SM はリボソームに不可逆的に結合し, 蛋白質合成開始の阻害を引き起こす。Finken ら¹²⁾ は SM 耐性結核菌の *rrs* 遺伝子および S12 リボソーム蛋白質をコードする遺伝子 (*rpsL*) の塩基配列を分析し, 約 80% の耐性菌においてこれらどちらかあるいは両方の遺

表1 主要抗結核剤の作用点と耐性に関与する遺伝子

薬剤	作用機序	耐性に関与する遺伝子
PZA	C16 ~ 24 脂肪酸 合成阻害	<i>pncA</i> : pyrazinamidase 遺伝子 <i>fas I</i> : fatty acid synthase I 遺伝子
RFP	RNA 合成阻害	<i>rpoB</i> : RNA polymerase β サブユニット 遺伝子
INH	ミコール酸合成阻害	<i>katG</i> : catalase 遺伝子 <i>inhA</i> : enoyl acyl carrier protein reductase 遺伝子 <i>kasA</i> : β -ketoacyl acyl carrier protein synthase 遺伝子 <i>ahpC</i> : alkyl hydroperoxide reductase 遺伝子 <i>ndh</i> : NADH dehydrogenase 遺伝子
EB	アラビノガラクトサン 合成阻害	<i>embB</i> : arabinosyltransferase 遺伝子 <i>embR</i> : arabinosyltransferase regulator 遺伝子
SM	蛋白質合成阻害	<i>rrs</i> : 16S rRNA 遺伝子 <i>rpsL</i> : ribosomal protein S12 遺伝子
KM	蛋白質合成阻害	<i>rrs</i> : 16S rRNA 遺伝子
CS	ペプチドグリカン 合成阻害	<i>alrA</i> : D-アラニンラセマーゼ遺伝子
PAS	核酸合成阻害	<i>thyA</i> : チミジレート合成酵素遺伝子
キノロン	DNA 複製阻害	<i>gyrA</i> : DNA gyrase A サブユニット 遺伝子

伝子上に点突然変異が見出されることを報告した。筆者ら¹³⁾は日本で分離された結核菌においても同様な変異が見られることを報告した。カナマイシン (KM) は 16S リボソーム RNA 上の塩基に結合し、伸長因子 G のリボソームへの結合を阻害することが知られている。筆者ら¹⁴⁾は臨床分離結核菌の KM 耐性菌株の 16S リボソーム RNA 遺伝子において一定領域に点突然変異が見られることを発見した。サイクロセリン (CS) は D-アラニンのアナログとして働きペプチドグリカンの生合成を阻害することが知られている。CS 耐性菌における D-アラニンラセマーゼ遺伝子の変異と耐性の関係が報告された。ニューキノロン (FQ) は DNA ジャイレースを阻害し、結果として DNA 複製を阻害する薬剤である。FQ 耐性菌における *gyrA* 遺伝子の変異が報告されている。パラアミノサリチル酸 (PAS) はチミジレートシンターゼを阻害することが明らかとなっている。PAS 耐性菌においてチミジレートシンターゼをコードする *thyA* 遺伝子の変異が報告されている。

これまでに明らかとなっている主な抗結核剤の作用機序と耐性獲得に関与する遺伝子について表

1にまとめた。これらの情報を基にして遺伝子変異検出による様々な迅速薬剤耐性結核検出法が考案された。それらどの方法も長所と短所を併せ持つものであった。

1. ラインプローブアッセイ

ラインプローブアッセイは PCR (polymerase chain reaction) とリバースハイブリダイゼーションを組み合わせた方法である。図3にラインプローブアッセイの概要を示した。リバースハイブリダイゼーション法とは固相化したプローブに対して標的 DNA をハイブリダイズさせるものである。ラインプローブアッセイではメンブレンフィルター上に固定したプローブに対してピオチンで標識した PCR 産物をハイブリダイズさせた後、メンブレンフィルター上のピオチンをアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンにて検出するものである。この方法により特定の遺伝子上の変異を検出し、薬剤耐性結核菌を検出する。市販品として入手可能なものには INNO-LiPA -Rif. TB kit (Innogenetics NV, ベルギー) と GenoType[®] MTBDR assay (Hain Lifescience GmbH, ドイツ) がある。INNO-LiPA -Rif. TB

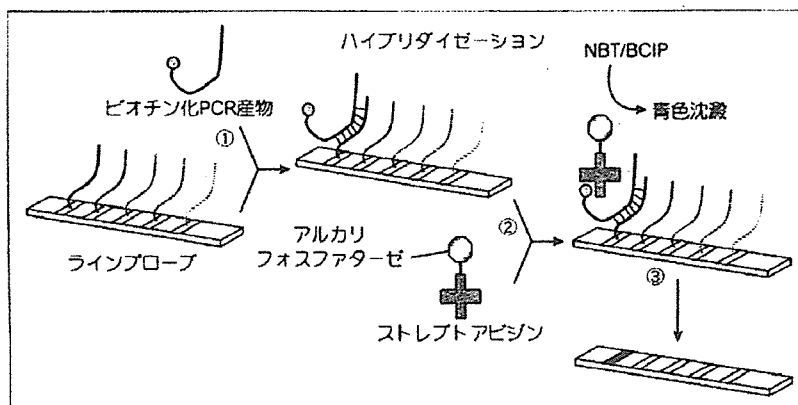


図3 ラインプローブアッセイ

① メンブレンフィルター上に固定したプローブに対してビオチン標識した PCR 産物をハイブリダイズさせる。② ハイブリダイズした DNA 上のビオチンにアルカリフォスファターゼ標識したストレプトアビジンを反応させる。③ メンブレンフィルター上のアルカリフォスファターゼ活性を NBT/BCIP の発色反応で検出する。

kit では RFP 感受性試験の結果のみが得られるが、GenoType[®] MTBDR assay では RFP と INH に対する感受性試験の成績が得られる。最近の RFP 耐性を対象としたメタ分析により INNO-LiPA -Rif. TB kit は臨床分離株を対象とした場合に 95 ~ 100% という高い感受性と特異性を有していることが示された¹⁵⁾。しかしながら、喀痰等の臨床検体を対象とした場合には正確性が大幅に減少することも報告された。GenoType[®] MTBDR assay においても INNO-LiPA -Rif. TB kit と同様な結果が得られた¹⁶⁾。

2. DNA マイクロアレイ

一方、我々は DNA マイクロアレイ技術を応用することにより 5 薬剤に対する感受性判定を同時に可能とするシステムを開発した (オリゴアレイ[®] TB, H 清紡, 日本)。図 4 A にオリゴアレイ[®] TB の操作手順を示した。また図 4 B および図 4 C にはそれぞれオリゴアレイ[®] TB 上のキャプチャーオリゴヌクレオチドの配置および本法により得られた結果の一例を示した。本法による判定結果と従来の小川培地を用いた薬剤感受性試験の一致率について検討した。その結果、本法では感受性結核菌における一致率は 96% 以上と総じて高いものの、耐性菌においては一致率が RFP で 93%、INH で 69%、SM で 69%、EB で 61%、KM で 64 (1710)

80% であった¹⁷⁾。DNA マイクロアレイ技術を応用した感受性試験法は他にもいくつか報告されているが、感度、特異性共に我々が開発したオリゴアレイ[®] TB と同様なものであった¹⁸⁾。

3. 分子ビーコン

分子ビーコンはステム-ループ構造を形成する一本鎖オリゴヌクレオチドで、両末端にはそれぞれ蛍光色素と消光のためのクエンチャーが結合してある。標的となる DNA が存在しない場合には蛍光色素を持ったステムの一方がクエンチャーを持ったもう一方のステムと結合し、結果として蛍光色素とクエンチャーが物理的に接近するために蛍光が観察されることはない。一方、標的 DNA が存在している場合には分子ビーコンは標的 DNA と結合する。この場合は蛍光色素とクエンチャー間の物理的位置が遠くなるため、もはやクエンチャーは蛍光色素に影響を及ぼすことができなくなり蛍光が検出できるようになる (図 5)。本法の短所は蛍光の検出に高価なリアルタイム PCR 用の機器を必要とすることである。最近分子ビーコン法を用いた 1 塩基置換検出による迅速薬剤感受性試験法の評価に関する報告がなされた。その報告によると分子ビーコン法は RFP 感受性試験では高い感度 (89 ~ 98%) と特異性 (99 ~ 100%) を示したが、INH 耐性検出に関する感度は

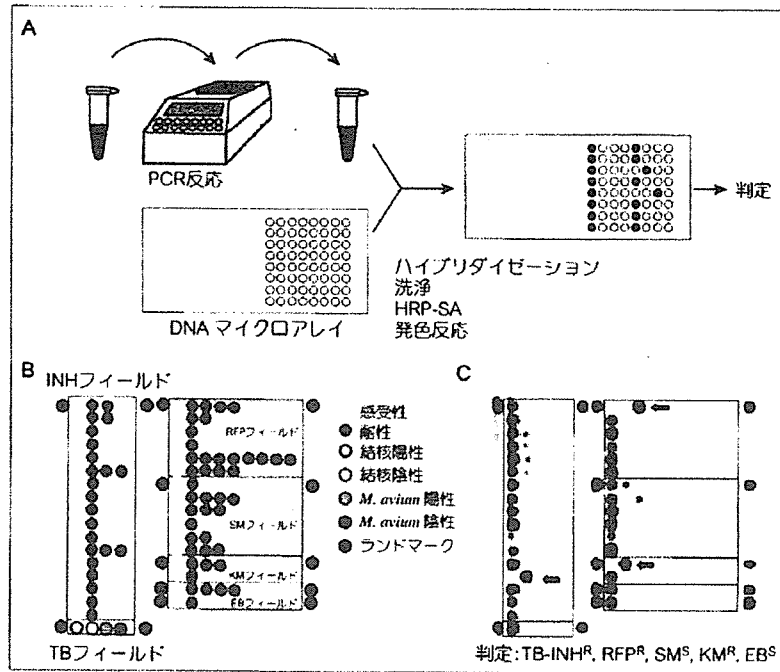


図4 DNA マイクロアレイによる迅速薬剤感受性試験

A. DNA マイクロアレイの操作手順。PCRにより増幅させたビオチン標識DNA断片をDNA マイクロアレイ上のキャプチャーオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせたのち発色反応により検出する。B. オリゴアレイ® TB上のキャプチャーオリゴヌクレオチドの配置。C. オリゴアレイ® TBによる迅速薬剤感受性試験結果の一例。この検体はINH 耐性、RFP 耐性、SM 感受性、KM 耐性、EB 感受性と判定された。

HRP-SA : horseradish peroxidase-streptavidin

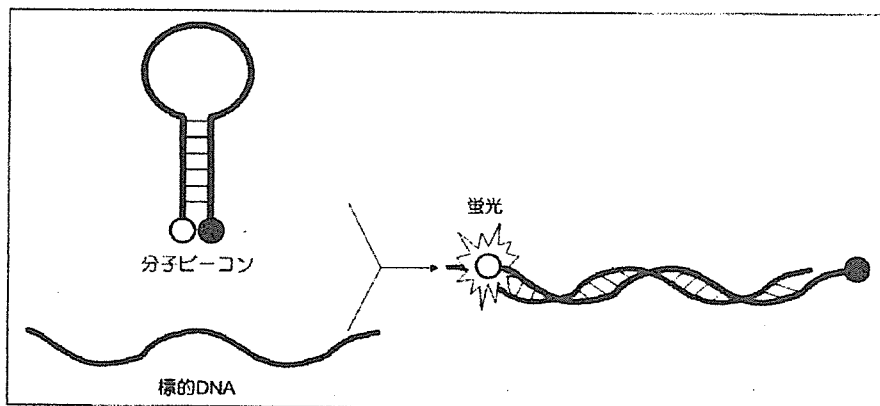


図5 分子ビーコンによる特異配列検出

分子ビーコンは両末端にそれぞれ蛍光色素とクエンチャーを結合させたステム-ループ構造を形成する一本鎖オリゴヌクレオチドで、標的となるDNAが存在している場合に蛍光色素とクエンチャー間の物理的位置が遠くなるため蛍光検出が可能となる。

特集●多剤耐性結核の現状と今後

相対的に低いものであった¹⁹⁾。

他にもリアルタイムPCRを基盤とした薬剤耐性菌検出法は報告されているが高価な機器を必要とすることが分子ビーコン法との共通の欠点となっている。

4. PCRをベースとした試験管内ピラジナミダーゼ試験

PZAは酸性条件下で強い抗結核作用を発揮する抗結核剤であるため感受性試験も酸性条件下で培養を実施する必要があるが、その再現性に問題があることが知られている。従って現行のPZA感受性試験は培養ではなくピラジナミダーゼ活性を測定することにより実施されている。本試験は臨床分離株を用いて実施しなければならないため、結果が得られるまでに長期間を要する。筆者らは迅速なPZA感受性試験を実現するためにピラジナミダーゼをコードする*pncA*遺伝子をPCRにより増幅し、これを試験管内転写-翻訳系にて蛋白質へと合成し、ピラジナミダーゼ活性を測定する系を構築した。この方法により、臨床分離株から90%以上の感度と特異性でピラジナミド耐性結核菌の検出が可能であった²⁰⁾。

IV おわりに

以上、新しい薬剤耐性結核菌検出法について解説してきた。これらの方法は何れも臨床検体からの直接薬剤感受性試験をめざして開発されてきたものであるが、現在のところ満足できる結果が得られている訳ではない。しかしながら、臨床分離菌を対象とした場合には感度、特異性共に優れていると言っても過言ではない。生菌を用いた検査法のうちでは倒立顕微鏡さえあれば実施可能なMODS法が特に期待できるものと考えられる。この方法は、結核菌を扱っている検査室で容易にできるため世界中の至る所で実施することが可能である。しかしながら、臨床検体からの直接的な薬剤感受性試験を可能とするための改良の余地が残されているものと考えられる。

一方、遺伝子変異の検出による薬剤感受性試験は、DNAが得られればその日のうちに感受性判定ができるという迅速性にメリットがある。しかしながら、RFPとFQをのぞいては耐性菌の検出率

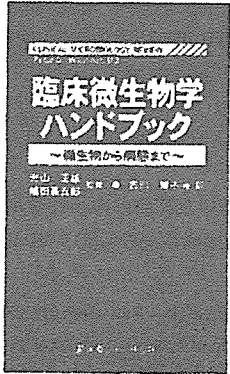
が十分であるとは言い難い。これは耐性に関与する遺伝子変異の一部が未だに解明されていないことに起因する。今後の研究により耐性に関与する遺伝子変異が全て解明され、これらを網羅できるシステムが開発されれば、迅速で精度の高い薬剤感受性試験法となるものと期待される。

文 献

- 1) Hazbon MH, et al.: Photographic and luminescent detection of luciferase reporter phages for drug susceptibility testing of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* **41**: 4865-4869, 2003
- 2) Eltringham LJ, et al.: Evaluation of a bacteriophage-based assay (phage amplified biologically assay) as a rapid screen for resistance to isoniazid, ethambutol, streptomycin, pyrazinamide, and ciprofloxacin among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **37**: 3528-3532, 1999
- 3) Moore DA, et al.: Tuberculosis Working Group in Peru. Microscopic observation drug susceptibility assay, a rapid, reliable diagnostic test for multidrug-resistant tuberculosis suitable for use in resource-poor settings. *J Clin Microbiol* **42**: 4432-4437, 2004
- 4) Caviedes L, et al.: Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru. *J Clin Microbiol* **38**: 1203-1208, 2000
- 5) 山崎利雄ほか: 生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験法(第Ⅲ法). *臨床病理* **48**: 167-173, 2000
- 6) Zhang Y, Young DB: Molecular mechanisms of isoniazid: a drug at the front line of tuberculosis control. *Trends Microbiol* **1**: 109-113, 1993
- 7) Altamirano M, et al.: Mutations in the catalase-peroxidase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis* **169**: 1162-1165, 1994
- 8) Telenti A, et al.: Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*.

6. 多剤耐性結核の菌検出法の進歩

- Lancet **341** : 647-650, 1993
- 9) Suzuki Y, et al. : Mutations in *rpoB* gene of rifampicin resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. 感染症学雑誌 **69** : 413-419, 1995
 - 10) Scorpio A, Zhang Y : Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med **2** : 662-667, 1996
 - 11) Telenti A, et al. : The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. Nat Med **3** : 567-570, 1997
 - 12) Finken M, et al. : Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : alterations of the ribosomal protein S12, gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. Mol Microbiol **9** : 1239-1246, 1993
 - 13) Katsukawa C, et al. : Characterization of the *rpsL* and *rrs* genes of streptomycin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. J Appl Microbiol **83** : 634-640, 1997
 - 14) Suzuki Y, et al. : Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol **36** : 1220-1225, 1998
 - 15) Morgan M, et al. : A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis **5** : 62, 2005
 - 16) Cavusoglu C, et al. : Evaluation of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol **44** : 2338-2342, 2006
 - 17) 吉川陽子ほか : DNA マイクロアレイを用いた臨床分離結核菌の薬剤耐性判定. 臨床微生物迅速診断研究会誌 **14** : 45-50, 2003
 - 18) Kim SY, et al. : Evaluation of the CombiChip Mycobacteria Drug-Resistance detection DNA chip for identifying mutations associated with resistance to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*. Diagn Microbiol Infect Dis **54** : 203-210, 2006
 - 19) Lin SY, et al. : Rapid detection of isoniazid and rifampin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex from cultures or smear-positive sputa by use of molecular beacons. J Clin Microbiol **42** : 4204-4208, 2004
 - 20) Suzuki Y, et al. : Rapid detection of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by a PCR-based *in vitro* system. J Clin Microbiol **40** : 501-507, 2002




臨床微生物学ハンドブック ～微生物から病態まで～

聖マリアンナ医科大学・昭和薬科大学客員教授 **嶋田 基五郎** 監修
 京都大学大学院医学研究科微生物感染症学教授 **光山 正雄**
 新潟市民病院感染症担当医 **吉川 博子** 他 訳

B 6 変型判 412頁 定価 4,095円(本体 3,900円+税 5%) 送料実費
 ISBN4-7532-1893-7 C3047

◎微生物学を学ぼうとする全ての方に!
 ◎米国最新知見を盛り込んだテキストブックを、完全翻訳!
 ◎微生物の名前、特徴から予防ワクチンなどの臨床的側面までを、見開きで見やすく掲載。


株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (編集番号) 〒101-0261 東京都千代田区上野町3丁目3番1号・TKビル 電話 03(3265)7581(代) FAX 03(3265)8359 (09104-7335)