

氏名	野崎 高儀
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第6171号
学位授与の日付	令和2年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	非結核性抗酸菌の遺伝子解析における pYT プラスミド使用の検討
論文審査委員	森田 学 教授      仲野 道代 教授      山本 直史 准教授

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

日本における結核症の新規発症数と死亡者数は漸減傾向にある。一方で類似の疾患である非結核性抗酸菌 (NTM) 症は中年以降の女性を中心に急増し、肺 NTM 症の罹患率は結核症を上回り、さらに増加することが予測される。NTM には多くの菌種が含まれるが、病原性を有する菌種のほとんどの侵入門戸は口腔であり、また歯科診療室で NTM 症が集団発生した例もあることから、歯学領域においても無視できない疾患と考えられる。結核菌の研究は古くから活発に行われており、分子生物学的にも多くの研究が行われている。一方で NTM 症は環境菌による日和見感染症的に発症し、ヒト-ヒト感染は無いと考えられてきたために、結核菌と比べると起因菌の解析に乏しいことは否めない。中でも分子生物学的解析は使用可能な解析ツールに制限があり、解析を進めることが容易ではない状況にある。本研究では、NTM の分子生物学的解析を行うための手法を開発することを目的とし、NTM で使用するプラスミドの開発を目指した。

pNPP-hyg<sup>r</sup> あるいは pNPP-zeo<sup>r</sup> から制限酵素処理によりハイグロマイシン耐性遺伝子カセットあるいはゼオシン耐性遺伝子カセットを取得し、pYT<sub>SK</sub> に挿入した。

### 【材料・方法】

#### 1. 使用菌株

*Mycobacterium abscessus* 標準株 ATCC 19977 株および臨床分離株 38 株と 39 株を用いた。また、*Mycobacterium avium* 標準株 104 株および臨床分離株 545 株と 552 株を用いた。大腸菌株は DH5a 株を用いた。

#### 2. 薬剤感受性試験

各菌株を培養後、OD<sub>600</sub>=1.0 に調整し、10<sup>3</sup> 倍に希釈した。希釈した菌液を各濃度の抗生物質を含む 7H10-ADC-Tween80 寒天培地に播種し、*M. abscessus* は 37°C で 5 日間、*M. avium* は 14 日間培養した。

#### 3. プラスミドの作製

ハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hyg<sup>r</sup>*)、ゼオシン耐性遺伝子 (*zeo<sup>r</sup>*)、DsRed 遺伝子、および EGFP 遺伝子を PCR 法で増幅し、制限酵素により両端を消化したのちに pNPP のカナマイシン耐性遺伝子プロモーター直下に繋げることで、薬剤耐性遺伝子あるいは蛍光タンパク質遺伝子発現カセット pNPP-hyg<sup>r</sup>、pNPP-zeo<sup>r</sup>、pNPP-DsRed、および pNPP-EGFP を得た。

次に pYT937 を制限酵素で消化することで、複製起点 (*oriM*) を含む 2.3 kb の断片を取得し、この断片を大腸菌クローニングベクター pBlueScript II SK(-) に挿入することで、pYT<sub>SK</sub> を構築した。そして、pNPP-hyg<sup>r</sup> あるいは pNPP-zeo<sup>r</sup> から制限酵素処理によりハイグロマイシン耐性遺伝子カセットあるいはゼオシン耐性遺伝子カセットを取得し、pYT<sub>SK</sub> に挿入した。

さらに得られたpYT-hygとpYT-zeoに、制限酵素を使用してpNPP-DsRedから切り出したDsRed遺伝子発現カセットを挿入することで、pYT-HgyDsRedおよびpYT-ZeoDsRedを得た。

pNN2-EGFP は、pNPP-EGFP を制限酵素で消化することにより得られたEGFP遺伝子発現カセットを、pNN2に挿入することにより作製した。

#### 4. 菌株へのプラスミドの導入

各菌株へのプラスミドの導入は電子穿孔法によって行った。1反応にはOD<sub>600</sub> = 1.0の菌液100 μLとプラスミド5 μgを使用し、電界強度:1.7kV/mmの電気パルスをかけた。*M. abscessus* は6時間、*M. avium* は24時間の回復培養を行った後、抗生物質含有7H10-ADC-Tween80寒天培地に播種し、37°Cで培養を行った。

#### 5. 集落の観察

プラスミドの集落の観察には蛍光顕微鏡を用いて、可視光および波長510 nmと575 nmの蛍光で観察した。

##### 【結果】

##### 1. 薬剤感受性

*M. abscessus* ではカナマイシンに対して、ATCC 19977株は50 μg/mLで、38株と39株は100 μg/mLで増殖を示さなかった。ハイグロマイシンに対しては200 μg/mLでも増殖をした。ゼオシンに対しては3株とも20 μg/mLで増殖を示さなかった。*M. avium* ではカナマイシンに対して、104株、38株、および39株はそれぞれ20 μg/mL、100 μg/mL、および50 μg/mLで増殖を示さなかった。ハイグロマイシンに対しては104株は100 μg/mLで、38株と39株は200 μg/mLで増殖を示さなかった。ゼオシンに対しては3株とも20 μg/mLで増殖を示さなかった。

##### 2. pYTプラスミドとpNN2プラスミドの導入

*M. abscessus* の3株にpYT-ZeoDsRedを、また*M. avium* の3株にpYT-HgyDsRedを導入したところ、いずれの株においても波長575 nmで赤色蛍光を発する集落が観察された。また、これら6株にpNPP-EGFPを導入したところ、いずれの株においても波長510 nmで緑色蛍光を発する集落が観察された。

##### 3. 不和合性

*M. abscessus* と*M. avium*においてpYTプラスミドとpNN2プラスミドが不和合性を示すかを検討するため、pYT-ZeoDsRedを保持した*M. abscessus* とpYT-HgyDsRedを保持した*M. avium*にpNPP-EGFPを導入したところ、いずれの株においても波長510 nmで緑色蛍光を発するとともに、波長575 nmで赤色蛍光を発する集落が観察された。

##### 【考察】

pYTプラスミドは*M. abscessus* と*M. avium* に導入することができ、両菌種の中で維持されることが示された。プラスミド保持の選択には*M. abscessus* ではゼオシンとカナマイシンが有用であり、*M. avium* ではハイグロマイシンとカナマイシンが有用であることが示された。さらに、pYTプラスミドとpNN2プラスミドは*M. abscessus* と*M. avium* で不和合性を示さず、共存できることが示された。以上のことから、pYTプラスミドは*M. abscessus* と*M. avium* における分子生物学的解析に有用なベクターとなることが期待される。

## 論文審査結果の要旨

近年、非結核性抗酸菌（non-tuberculous mycobacteria : NTM）感染症によるNTM症は、罹患率および死亡者数の急激な増加が明らかとなっており、その対策が急務となっている。NTMの病原性発現機構、薬剤耐性の機序などについては不明な点が多く、分子遺伝学的解析に用いる解析ツールも乏しい。そこで、分子遺伝学的解析に汎用されるプラスミドに着目し、NTMの研究において従来使用されてきたプラスミド（pAL5000）とともに使用可能な新規プラスミドの構築を試みた。

本研究では、pMSC262を骨格としたpYTプラスミドに抗菌薬耐性遺伝子カセットと赤色蛍光タンパク質遺伝子カセットを挿入し、pYT-ZeoDsRedおよびpYT-HygDsRedを構築した。また、pAL5000に抗菌薬耐性遺伝子カセットと緑色蛍光タンパク質遺伝子カセットを挿入し、pNN2-EGFPを構築した。構築したプラスミドを、NTM症患者から臨床分離頻度の高い*Mycobacterium abscessus*と*Mycobacterium avium*に電気穿孔法にて導入した。得られた結果は以下の通りである。

- 1) *M. abscessus*用の選択マーカーとしては $Km^r$ と $Zeo^r$ が使用可能であり、*M. avium*用の選択マーカーとしては $Km^r$ と $Hyg^r$ が使用可能であることが明らかとなった。
- 2) 構築したプラスミドを保持した大腸菌は、蛍光を発色していた。
- 3) 構築したプラスミドを*M. abscessus*および*M. avium*の標準株、臨床分離株に電気穿孔法で導入したところ、蛍光を発色する株が得られた。
- 4) 構築したpYTプラスミドを保持する株にpNN2-EGFPを導入したところ、赤色蛍光と緑色蛍光を同時に発色する株が得られた。

以上のことから、pMSC262を骨格としたpYTプラスミドは、*M. abscessus*および*M. avium*の中で複製すること、またpAL5000プラスミドと共存し不和合性を表さないことが示された。

本研究によって得られた結果は、pYTプラスミドはpAL5000プラスミドとともに、NTMの遺伝子解析に有用なプラスミドであることを示唆するものであり、NTMの分子遺伝学的解析の大きな一助となるものである。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。