橋本和樹

緒言

結核症は Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis)の感染によって生じる感染症である。飛沫感染および飛 沫核感染によって生じる慢性呼吸器疾患で、臨床症状として咳や痰、発熱など風邪に似た症状が長期間継続する。 世界保健機関(World Health Organization: WHO)の2018年の報告では、世界で年間1,000万人以上が発症し、 130万人以上が死亡している¹⁾。我が国においても年々減少傾向ではあるが、いまだ年間16,000人以上が発症し、 2,000人以上が死亡している²⁾。罹患率は13.3と人口10万人当たり10人以上の中蔓延国に分類され、現在でも 対策が求められている重要な感染症のひとつである。

結核症の治療は抗結核薬を用いた化学療法が基本となるが、*M. tuberculosis* では他の病原菌と同じく薬剤耐性 菌の出現が問題となっており、新規抗結核薬の開発が急務となっている。その標的のひとつとして、メチオニン 合成経路が考えられている。メチオニン合成経路の一部を図1に示す。ホモセリンが順にホモセリン *O*-スクシニ ルトランスフェラーゼ (MetA)、シスタチオニンγ-シンターゼ (MetB)、シスタチオニンβ-リアーゼ (MetC) お よびメチオニンシンターゼ (MetH、MetE) によって代謝されることでメチオニンが合成される³。ヒトは体内 でメチオニンを合成できないが、細菌はこの経路を用いてメチオニンを合成する。Berney らは *M. tuberculosis* の MetA の遺伝子 *metA* の欠損株 (*AmetA*) を作製し、*AmetA* はメチオニンが添加されていない培地では生存できず、 生体内濃度以上の高濃度のメチオニン要求性を示し、菌体内でのメチオニン合成が *M. tuberculosis* の生体内での 増殖に必須であることを報告している⁴。

メチオニン合成経路の最終段階において、ホモシステインに 5-メチルテトラヒドロ葉酸のメチル基が付加され てメチオニンが合成される。この反応は MetH と MetE の 2 種類の酵素によって触媒される^{5.6)}。MetH はその活 性にビタミン B₁₂を補酵素として必要とするが、MetE はビタミン B₁₂を必要としない。また、MetH は基質とし て 5-メチルテトラヒドロ葉酸およびそれにグルタミン酸が付加されたものを用いるが、MetE は 3 つ以上のグル タミン酸が付加されたものでなければ基質として用いることができない。この 5-メチルテトラヒドロ葉酸へのグ ルタミン酸の付加は菌体内での葉酸の保持に関与していると考えられている⁷⁾。メチル基の供与体である 5-メチ ルテトラヒドロ葉酸は 5.10-メチレンテトラヒドロ葉酸が還元されて合成される。この反応はメチレンテトラヒド ロ葉酸レダクターゼ (MetF) によって触媒される。しかし、*M. tuberculosis* ではそのゲノム情報から古典的な MetF は存在しない。既知のメチオニン合成経路では、MetF が存在しない場合、5-メチルテトラヒドロ葉酸が合成できず、菌体内でのメチオニン合成が不可能となる。このことは、*M. tuberculosis* において古典的な MetF と同じ反応 を触媒する他の酵素が存在するか、あるいは未知の酵素反応によってホモシステインに付加されるメチル基が供給されることを示唆する。いずれの場合においてもその存在が明らかにされれば、それは新規抗結核薬の標的と なる可能性がある。

未知の酵素の存在は遺伝学的方法によって明らかにできる場合がある。*M. tuberculosis* においても種々の遺伝 学的解析方法が開発されているが、解決困難な問題もある。まず、病原性が高くバイオセーフティーレベルも高 い。また、増殖速度が遅く集落の形成に 4 週間から 8 週間を要するため解析に時間がかかる。これらの点を回避 すべく *M. tuberculosis* をはじめとする抗酸菌の実験モデルに使用される非病原性の迅速発育菌である *Mycolicibacterium smegmatis* (*M. smegmatis*)⁸⁾ を使用して解析することを考えた。*M. smegmatis* には、MetF が存 在するため、そのままでは *M. tuberculosis* 代替えモデルとはならない。しかし、MetF の欠損株が作製でき、さら にその株がメチオニン非存在下で増殖すれば、MetF に代わる酵素、あるいは代替え経路解析のモデルとなる可 能性がある。

そこで、本研究では M. smegmatis の MetF の遺伝子 metF の欠損株作製を試みることで、メチオニン合成経路に おけるホモシステインへのメチル基供給において、M. smegmatis が M. tuberculosis と同じ酵素あるいは代替え経 路を有している可能性を探り、M. tuberculosis に代わるモデルとなりうるかを検討することを目的とした。

材料および方法

1. 使用菌株と培養条件

使用菌株とプラスミドは表1に示した。

Escherichia coli DH5α株は Luria-Bertani (LB) 液体培地 (ナカライテスク、京都、日本) と LB 寒天培地を用い、 必要に応じ、カナマイシン(KM) 20 µg/mL (Meiji Seika ファルマ、東京、日本)、スクロース 0.1 g/mL (Sigma-Aldrich、 MO、USA)、メチオニン 50 µg/mL (富士フイルム和光純薬、大阪、日本) を添加した。*M. smegmatis* mc²155 株 の培養には 10% ADC {アルブミン 50 mg/mL (富士フイルム和光純薬)・デキストロース 20 mg/mL (ナカライテ スク)・カタラーゼ 40 µg/mL (Sigma-Aldrich) } と 0.05% Tween80 (Becton Dickinson、NJ、USA) を添加した Middlebrook 7H9 液体培地 (Becton Dickinson) (7H9-ADC-Tween80 液体培地)、Sauton 培地 {0.5 g リン酸水素ニカリウム、0.5 g 硫酸マグネシウム七水和物、2.0 g クエン酸三ナトリウム二水和物、4.0 g L-アスパラギン一水和物、60 mL グリ セリン、0.05gクエン酸鉄(III)アンモニウム(それぞれ1Lあたり)、pH7.4、すべて富士フイルム和光純薬}、 Sauton 寒天培地およびLB 寒天培地を用いた。必要に応じメチオニン 50 μg/mL と 0.05% Tween80 を添加した。

2. 遺伝子操作

特別な記載がない限り遺伝子操作は分子生物学実験で使用される一般的な方法に従った。また、M. smegmatis mc²155 株への核酸導入は ECM399(BTX、MA、USA)を用いて電気穿孔法で行った⁹⁾。なお、本研究で使用し たプライマーを表 2 に示した。

3. 遺伝子欠損株の作製

M. smegmatis mc²155 株の MetF の遺伝子 metF の欠損株 ($\Delta metF$)、MetH の遺伝子 metH の欠損株 ($\Delta metH$)、 MetE の遺伝子 metE の欠損株 ($\Delta metE$) および metH と metE の二重欠損株 ($\Delta metH/\Delta metE$) は枯草菌 Bacillus subtilis 由来のレバンサッカラーゼをコードする sacB を選択マーカーとして利用した 2 段階相同組換え法により作製し た¹⁰)。

まず、 $\Delta metF$ 作製用プラスミド pSVMETF を構築するために、*M. smegmatis* mc²155 株ゲノム上の *metF* の上下 流領域をそれぞれプライマーセット METFUF-METFUR と METFDF-METFDR を用いて polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅した。上流領域の増幅産物を Zero Blunt TOPO PCR クローニングキット(サーモフィッシ ャーサイエンティフィック)を用いて pCR-Blunt II-TOPO にクローニングした。下流領域の増幅産物を EcoRI と HindIII で消化し、得られたクローニングベクターの EcoRI と HindIII サイトに挿入し、pTOPOMETF を得た。 pTOPOMETF を XhoI と HindIII で消化し、pBluescript II SK (-) の XhoI と HindIII サイトに挿入し、pDMETF を 得た。次に、 $\Delta metH$ 作製用プラスミド pSVMETH を構築するために、*M. smegmatis* mc²155 株ゲノム上の *metH* の 上下流領域をプライマーセット METHUF-METHUR と METHDF-METHDR を用いて PCR 法により増幅した。上 流領域の増幅産物を Zero Blunt TOPO PCR クローニングキットを用いて pCR-Blunt II-TOPO にクローニングした。 下流領域の増幅産物を EcoRI と HindIII で消化し、得られたクローニングベクターの EcoRI と HindIII サイトに挿 入し、pTOPOMETH を得た。pTOPOMETH を XhoI と HindIII で消化し、pBluescript II SK (-) の XhoI と HindIII サイトに挿入し、pDMETH を得た。そして、 $\Delta metE$ 作製用プラスミド pSVMETE を構築するために、*M. smegmatis* mc²155 株ゲノム上の *metE* の上下流領域をそれぞれプライマーセット METEUF-METEUR と METEDF-METEDR を用いて PCR 法により増幅した。上流領域の増幅産物を Zero Blunt TOPO PCR クローニングキット用いて pCR-Blunt II-TOPO にクローニングキット用いて グベクターの EcoRI と HindIII サイトに挿入し、pTOPOMETE を得た。pTOPOMETE を XhoI と HindIII で消化し、 pBluescript II SK (-) の XhoI と HindIII サイトに挿入し、pDMETE を得た。KM 耐性遺伝子 *aphII* の発現カセット は pNN2¹¹⁾を鋳型としてプライマーセット APHF-APHR を用いて増幅した。増幅産物を HindIII と XbaI で消化し、 pDMETF、pDMETH および pDMETE の HindIII と XbaI サイトに挿入し、pDMETF-KM、pDMETH-KM および pDMETE-KM を得た。*B. subtilis* の *sacB* は pDNR-Dual を鋳型としてプライマーセット SACBF-SACBR を用いて 増幅した¹²⁾。増幅産物を XbaI と NotI で消化し、pDMETF-KM、pDMETH-KM および pDMETE-KM の XbaI と NotI サイトに挿入し、pSVMETF、pSVMETH および pSVMETE を得た。

pSVMETF、pSVMETH および pSVMETE を電気穿孔法で *M. smegmatis* mc²155 株に導入し、KM 含有 LB 寒天培 地に播種した。pSVMETF、pSVMETH および pSVMETE がシングルクロスオーバーによってゲノム上の *metF*、 *metH* および *metE* 領域に挿入されたものを PCR 法による増幅産物をアガロースゲル電気泳動によるバンドサイ ズの確認により選択し、1st *metF*、1st *metH* および 1st *metE* とした。1st *metF*、1st *metH* および 1st *metE* はメチオニン 含有 7H9-ADC-Tween80 液体培地に継代し、その一部をスクロースとメチオニンを含有する LB 寒天培地に播種 した。ダブルクロスオーバーによって *metF*、*metH* および *metE* の読み枠が欠失したものを PCR 法による増幅産 物をアガロースゲル電気泳動によるバンドサイズの確認により選択し、*AmetF*、*AmetH* および*AmetE* とした。*AmetH* に pSVMETE を電気穿孔法で導入し、KM 含有 LB 寒天培地に播種した。pSVMETE がシングルクロスオーバー によってゲノム上の *metE* 領域にシングルクロスオーバーによって挿入されたものを PCR 法による増幅産物をア ガロースゲル電気泳動によるバンドサイズの確認により選択し、*AmetH* 1st *metE* とした。*AmetH* 1st *metE* をメチオ ニン含有 7H9-ADC-Tween80 液体培地に継代し、その一部をスクロースとメチオニン含有 LB 寒天培地に播種し た。ダブルクロスオーバーによって *metE* の読み枠が欠失したものを PCR 法による増幅産物をア ガロースゲル電気泳動によるバンドサイズの確認により選択し、*AmetH* 1st *metE* とした。*AmetH* 1st *metE* をメチオ

4. 発現プラスミド導入株の作製

*metH*の発現用プラスミド pNNMETH は以下の手順にて作製した。*M. smegmatis* mc²155 株のゲノム上の *metH* をプロモーターとともにプライマーセット METHEXF と METHEXR を用いた PCR 法で増幅した。増幅産物を XbaI で消化し、pNN2 の XbaI サイトに挿入することで pNNMETH を得た。pNNMETH を電気穿孔法でΔ*metH* に 導入し、KM 含有 LB 寒天培地に播種した。pNNMETH が導入されたものを PCR 法による増幅産物をアガロース ゲル電気泳動によるバンドサイズの確認により選択し、Δ*metH/metH*⁺とした。

5. Sauton 寒天培地における欠損株の増殖能および増殖速度の確認

M. smegmatis mc²155 株、 $\Delta metF$ 、 $\Delta metH$ 、 $\Delta metH/metH^+$ 、 $\Delta metE$ および $\Delta metH/\Delta metE$ を 7H9-ADC-Tween80 液体 培地で一晩培養した。前培養後、菌液を OD₆₀₀ = 0.3(菌数にして 3.0 x 10⁷ cell/mL に相当)に調整した。4 時間 振盪培養し菌の増殖を確認した後、3,000 rpm で集菌した。上清を捨て、Tween80 含有 Sauton 培地で希釈し、 OD₆₀₀ = 0.001, 0.01, 0.1(菌数にして 1.0 x 10⁵, 1.0 x 10⁶, 1.0 x 10⁷ cell/mL に相当)に調整した。それぞれを Sauton 寒天培地およびメチオニン含有 Sauton 寒天培地に 3 μ L ずつ播種し、37℃で 3 日間培養した。観察は培養開始か ら 24 時間ごとに行った。

結果

1. M. smegmatis 変異株の作製

まず、M. smegmatis mc²155 株のゲノムから metF を削除することを試みた。pSVMETF を電気穿孔法で M. smegmatis mc²155 株に導入し、KM 含有 LB 寒天培地に播種した。pSVMETF がシングルクロスオーバーによって ゲノム上の metF の上流領域または下流領域に挿入されているものを PCR 法により選択し、1st metF とした。 pSVMETF 後方 1,200 bp と metF 前方 100 bp に設計したプライマーセット SINGLE check1 F-METF check1 R およ び metF 後方 200 bp と pSVMETF 前方 1,100 bp に設計したプライマーセット METF check2 F-SINGLE check2 R を 用いて PCR 法を行った。1st metF では METF check2 F-SINGLE check2 R で 1,300 bp の増幅産物が得られ、pSVMETF が metF の下流領域に挿入されていることが確認された (図 2B)。1st metF をメチオニン含有 7H9-ADC-Tween80 液体培地に継代し、その一部をスクロースとメチオニン含有 LB 寒天培地に播種した。ダブルクロスオーバーに よって metF が欠失しているものを PCR 法により選択し、AmetF とした。metF の上流領域 1,500 bp と下流領域 1,500 bp に設計したプライマーセット METF check3 F-METF check3 R を用いて PCR 法を行った。M. smegmatis mc²155 株では 4,000 bp の増幅産物が得られたが、AmetF では metF の遺伝子サイズである 1,000 bp 小さな増幅産物 (3,000 bp) が得られた (図 2C)。以上のことからAmetF を得た。

次に、*M. smegmatis* mc²155 株のゲノムから *metH* を削除することを試みた。pSVMETH を電気穿孔法で *M. smegmatis* mc²155 株に導入し、KM 含有 LB 寒天培地に播種した。pSVMETH がシングルクロスオーバーによって ゲノム上の *metH* の上流領域または下流領域に挿入されているものを PCR 法により選択し、1st *metH* とした。 pSVMETH 後方 1,100 bp と *metH* 前方 200 bp に設計したプライマーセット SINGLE check1 F-METH check1 R およ び *metH* 後方 200 bp と pSVMETH 前方 1,100 bp に設計したプライマーセット METH check2 F-SINGLE check2 R を 用いて PCR 法を行った。1st *metH* では SINGLE check1 F-METH check1 R で 1,300 bp の増幅産物が得られ、

pSVMETH が *metH* の上流領域に挿入されていることが確認された (図 2B)。1st *metH* をメチオニン含有 7H9-ADC-Tween80 液体培地に継代し、その一部をスクロースとメチオニン含有 LB 寒天培地に播種した。ダブル クロスオーバーによって *metH* が欠失しているものを PCR 法により選択し、 $\Delta metH$ とした。*metH* の上流領域 1,200 bp と下流領域 1,100 bp に設計したプライマーセット METH check3 F-METH check3 R を用いて PCR 法を行った。 *M. smegmatis* mc²155 株では 6,100 bp の増幅産物が得られたが、 $\Delta metH$ では *metH* の遺伝子サイズである 3,800 bp 小さな増幅産物 (2,300 bp) が得られた (図 2C)。以上のことから $\Delta metH$ を得た。

そして、 Δ metH に metH を相補した株の作製を試みた。pNNMETH を電気穿孔法で Δ metH に導入し、KM 含有 LB 寒天培地に播種した。metH が欠失し、pNNMETH が導入されたものを PCR 法により選択し、 Δ metH/metH⁺と した。metH が欠失していることをプライマーセット METH check3 F-METH check3 R を用いて PCR 法により確認 した (図 2C)。また、metH の内部に設計したプライマーセット METH inside F-METH inside R を用いて PCR 法を 行った。*M. smegmatis* mc²155 株と Δ metH/metH⁺では 390 bp の増幅産物が得られたが、 Δ metH では増幅産物が得ら れなかった (図 3)。以上のことから Δ metH/metH⁺を得た。

さらに、*M. smegmatis* mc²155 株のゲノムから *metE* を削除することを試みた。pSVMETE を電気穿孔法で*M. smegmatis* mc²155 株に導入し、KM 含有 LB 寒天培地に播種した。pSVMETE がシングルクロスオーバーによって ゲノム上の *metE* の上流領域または下流領域に挿入されているものを PCR 法により選択し、1st *metE* とした。 pSVMETE 後方 1,000 bp と *metE* 前方 200 bp に設計したプライマーセット SINGLE check1 F-METE check1 R およ び *metE* 後方 100 bp と pSVMETH 前方 1,000 bp に設計したプライマーセット METE check2 F-SINGLE check2 R を 用いて PCR 法を行った。1st *metE* では SINGLE check1 F-METE check1 R で 1,200 bp の増幅産物が得られ、pSVMETE が *metE* の上流領域に挿入されていることが確認された(図 2B)。1st *metE* をメチオニン含有 7H9-ADC-Tween80 液体培地に継代し、その一部をスクロースとメチオニン含有 LB 寒天培地に播種した。ダブルクロスオーバーに よって *metE* が欠失しているものを PCR 法により選択し、*AmetE* とした。*metE* の上流領域 1,100 bp と下流領域 1,100 bp に設計したプライマーセット METE check3 F-METE check3 R を用いて PCR 法を行った。*M. smegmatis* mc²155 株では 4,500 bp の増幅産物が得られたが、*AmetE* では *metE* の遺伝子サイズである 2,300 bp 小さな増幅産 物(2,200 bp)が得られた(図 2C)。以上のことから*AmetE* を得た。

最後に、 $\Delta metH$ のゲノムから metE を削除することを試みた。pSVMETE を電気穿孔法で M. smegmatis mc²155 株に導入し、KM 含有 LB 寒天培地に播種した。pSVMETE がシングルクロスオーバーによってゲノム上の metE の上流領域または下流領域に挿入されているものを PCR 法により選択し、 $\Delta metH$ 1st metE とした。プライマーセ ット SINGLE check1 F-METE check1 R およびプライマーセット METE check2 F-SINGLE check2 R を用いて PCR 法を行った。 $\Delta metH 1^{st}$ metE では METE check1 F-METE check1 R で 1,200 bp の増幅産物が得られ、pSVMETE が metE の上流領域に挿入されていることが確認された(図 2B)。 $\Delta metH 1^{st}$ metE をメチオニン含有 7H9-ADC-Tween80 液体培地に継代し、その一部をスクロースとメチオニン含有 LB 寒天培地に播種した。ダブルクロスオーバーに よって metE が欠失しているものをプライマーセット METE check3 F-METE check3 R を用いて PCR 法により選択 した (図 2C)。また、選択した株の metH が欠失していることを METH check3 F-METH check3 R を用いて PCR 法により確認した (図 2C)。以上のことから $\Delta metH/\Delta metE$ を得た。

2. M. smegmatis における変異株の増殖能および増殖速度

M. smegmatis mc²155 株、 Δ *metF*、 Δ *metH*、 Δ *metH*/*metH*⁺、 Δ *metE* および Δ *metH*/ Δ *metE* を最小培地である Sauton 寒 天培地で培養を行った(図 4)。

その結果、*M. smegmatis* mc²155 株、Δ*metF* およびΔ*metE* はいずれもメチオニンの有無に関係なく Sauton 寒天培 地において播種 48 時間後にコロニー形成が認められ、増殖速度に明らかな差を認めなかった。

Δ*metH*は Sauton 寒天培地において播種 72 時間後でコロニー形成が認められ、他の欠損株と比較して増殖速度 が遅かった。Sauton 寒天培地にメチオニンを添加することで播種 48 時間後にコロニー形成が認められ、増殖速 度が回復した。また、Δ*metH/metH*⁺もメチオニンの有無に関係なく Sauton 寒天培地において播種 48 時間後にコ ロニー形成が認められた。

ΔmetH/ΔmetE は Sauton 寒天培地において播種 72 時間後もコロニー形成が認められず、メチオニン要求性を示した。Sauton 寒天培地にメチオニンを添加することで播種 48 時間後にコロニー形成が認められ、増殖速度も回復した。

考察

結核症の治療は、リファンピシン、イソニアジド、ピラジナミド、エタンブトールおよびストレプトマイシン などの抗結核薬を組み合わせた多剤併用療法である¹³⁾。治療期間は6か月から9か月と長期に及ぶため、服薬中 断や不規則服薬などの問題が生じることがある。これは、*M. tuberculosis* が薬剤耐性を獲得する原因となってお り、多剤耐性結核(multidrug-resistant tuberculosis: MDR-TB)や超多剤耐性結核(extensively drug-resistant tuberculosis: XDR-TB)の出現が大きな問題となっている¹⁴⁾。MDR-TBとはリファンピシンとイソニアジドに耐 性を示す*M. tuberculosis*を、XDR-TBとはそれに加えてニューキノロン系剤の1剤以上に耐性を持ち、かつ注射 剤である KM、アミカシン、カプレオマイシンの3剤のうち、少なくとも1剤に耐性を示す*M. tuberculosis*のこ とと定義されている¹⁵⁾。これらの耐性菌に対する抗結核薬として、デラマニド¹⁶⁾ やベタキリン¹⁷⁾ などが開発され、臨床で用いられているが、今後も新たな耐性菌の出現の可能性があり、継続した新規抗結核薬開発が不可欠である。本研究では、その標的の候補とされるメチオニン合成経路において、ホモシステインへのメチル基供与体の合成を触媒する MetF の遺伝子欠損株を *M. smegmatis* にて作製し、それが *M. tuberculosis* における MetF に代わる酵素、あるいは代替経路解析のモデルとなるかを検証した。

ΔmetF はメチオニンを含まない最小培地である Sauton 寒天培地で増殖し、メチオニン要求性を示さなかった。 このことから、M. smegmatis において metF は必須遺伝子ではないことが明らかとなった。また、ΔmetF が Sauton 寒天培地で増殖したことから M. smegmatis のメチオニン合成経路の最終段階では、5-メチルテトラヒドロ葉酸と は異なるメチル基の供与体を利用する酵素を有しているか、あるいは 5-メチルテトラヒドロ葉酸の合成を触媒す る MetF 以外の酵素を有している、という可能性が示された。

まず、*M. smegmatis* が 5-メチルテトラヒドロ葉酸とは異なるメチル基の供与体を利用する酵素を有している可能性を検証するため、AmetH、AmetE およびAmetH/AmetE を作製した。AmetH とAmetE はいずれも Sauton 寒天培地で増殖し、メチオニン要求性を示さなかった。このことから、*M. smegmatis* において metH と metE は必須遺伝子ではないことが明らかとなった。また、AmetE が Sauton 寒天培地で増殖したことから *M. smegmatis* は MetH の 補酵素であるビタミン B₁₂を最小培地で合成できることがわかった。そして、AmetH とAmetE の増殖速度の結果から *M. smegmatis* のメチオニン合成経路の最終段階は主に MetH によって触媒されていることが示唆された。 AmetH/AmetE は Sauton 寒天培地で増殖できず、メチオニン要求性を示した。このことから、メチオニン合成にはMetH または MetE いずれか一方の酵素が必要であることが明らかになった。そして、MetH と MetE はいずれもメチル基の供与体として 5-メチルテトラヒドロ葉酸を必要とすることから、メチオニン合成に際して *M. smegmatis* は 5-メチルテトラヒドロ葉酸とは異なるメチル基の供与体を利用する酵素を有していないということが示唆された。

次に、*M. smegmatis* が 5-メチルテトラヒドロ葉酸の合成を触媒する MetF 以外の酵素を有している可能性を検 証した。このような酵素を有する細菌はいくつか報告されている^{18,19,20,21,22,23)}。例えば、Zhuang らは *Dehalococcoides mccartyi* を報告しており、アセチル CoA 経路 (Wood-Ljungdahl 経路)²⁴⁾ を利用してアセチル CoA を分解し、5-メチルテトラヒドロ葉酸を合成するとされている。また、Abe らは *Sphingomonas paucimobilis* を報 告しており、バニリン酸代謝の際に 5-メチルテトラヒドロ葉酸を合成するとされている。これらの酵素について、 *M. smegmatis* mc²155 株²⁵⁾ と *M. tuberculosis* H37Rv 株²⁶⁾ の公開された DNA およびアミノ酸配列データベースを 用いてホモロジー検索²⁷⁾ を行ったが、相同性のある配列は認められなかった。このことから、*M. smegmatis* と *M. tuberculosis* は MetF以外の既知の 5-メチルテトラヒドロ葉酸の合成を触媒する酵素を有していないと考えられる。そして、*M. smegmatis* はメチオニン合成におけるメチル基の供与体として 5-メチルテトラヒドロ葉酸を必要とすることから、MetF とは異なる未知の酵素によっても 5-メチルテトラヒドロ葉酸を合成し、メチル基の供与体を獲得していることが示唆された。

既知のメチオニン合成経路を踏まえると、MetF が存在しない場合、5-メチルテトラヒドロ葉酸が合成できず、 ホモシステインへのメチル基の供与体が欠乏し、メチオニン要求性を示すと考えられた。しかし、M. smegmatis において MetF は必須ではなかった。そして、MetF が必須ではない一方、ホモシステインからメチオニンへの代 謝を触媒する酵素はメチル基の供与体として 5-メチルテトラヒドロ葉酸を必要とする MetH と MetE のみであっ た。また、5-メチルテトラヒドロ葉酸の合成を触媒する MetF 以外の既知の酵素の存在はデータベース上では認 められず、未知の酵素の存在が示唆された。これらの結果から、メチオニン合成経路におけるメチル基供給にお いて、M. smegmatis は古典的な MetF が存在しない M. tuberculosis と同じ MetF に代わる酵素を有している可能性 がある。そして、非病原性の迅速発育菌である M. smegmatis は M. tuberculosis と比較して遺伝学的解析が容易な ことからも本研究において作製されたΔmetF は M. tuberculosis におけるシステインへのメチル基供給経路の解析 に有用である可能性が示された。

結論

*M. smegmatis*は 5-メチルテトラヒドロ葉酸を合成する未知の酵素を有していることが示唆された。本研究で作製した *M. smegmatis metF* 欠損株は *M. tuberculosis* におけるシステインへのメチル基供与経路の解析に有用である可能性がある。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御高閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科ロ腔微生物 学分野大原直也教授に深甚なる謝意を表します。また様々な面にわたり貴重な御助言と御協力を下さいました岡 山大学大学院医歯薬学総合研究科顎ロ腔再建外科学分野飯田征二教授、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科ロ腔 微生物学分野橘理人助教に心より感謝いたします。最後に本研究を行うに当たり、貴重な御援助と御助言をいた だきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科顎ロ腔再建外科学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科顎口腔再建外科学分野(指導 飯田征二教授)

文献

- World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. Available at: http://www.who.int/tb/publications/en/.
 Accessed Dec 12, 2018.
- 2) 厚生労働省. 平成 29 年結核登録者情報調查年報集計結果. Available at: https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095_00001.html. Accessed Dec 12, 2018.
- Urbanowski, M.L., Stauffer, G.V.: Role of homocysteine in *metR*-mediated activation of the *metE* and *metH* genes in Salmonella typhimurium and Escherichia coli. J Bacteriol., 171, 3277-3281, 1989.
- 4) Berney, M., Berney-Meyer, L., Wong, K.W., Chen, B., Chen, M., Kim, J., Wang, J., Harris, D., Parkhill, J., Chan, J., Wang, F., Jacobs, W.R. Jr.: Essential roles of methionine and S-adenosylmethionine in the autarkic lifestyle of Mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A., 112, 10008-10013, 2015.
- 5) Foster, M.A., Tejerina, G., Guest, J.R., Woods, D.D.: Two enzymic mechanisms for the methylation of homocysteine by extracts of *Escherichia coli*. *Biochem J.*, 92, 476-488, 1964.
- 6) Chu, J., Shoeman, R., Hart, J., Coleman, T., Mazaitis, A., Kelker, N., Brot, N., Weissbach, H.: Cloning and expression of the *metE* gene in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.*, 239, 467-474, 1985.
- Moran, R.G.: Roles of folylpoly-gamma-glutamate synthetase in therapeutics with tetrahydrofolate antimetabolites: an overview. *Semin Oncol.*, 26, 24-32, 1999.
- 8) O'Toole, R.: Experimental models used to study human tuberculosis. Adv Appl Microbiol., 71, 75-89, 2010.
- Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., Terasaka, K., Totsuka, M., Kobayashi, K., Yukitake, H., Yamada, T.: Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. *Infect Immun.*, 58, 4049-4054, 1990.
- 10) Pelicic, V., Reyrat, J.M., Gicquel, B.: Generation of unmarked directed mutations in mycobacteria, using sucrose counter-selectable suicide vectors. *Mol Microbiol.*, 20, 919-925, 1996
- Ohara, N., Nishiyama, T., Ohara-Wada, N., Matsumoto, S., Matsuo, T., Yamada, T.: Characterization of the transcriptional initiation regions of genes for the major secreted protein antigens 85C and MPB51 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Microb Pathog.*, 23, 303-310, 1997.
- 12) GenBank accession number DQ666273.1.
- 13) 日本結核病学会治療委員会. 結核. 93, 61-68, 2018.
- 14) 日本結核病学会治療委員会. 社会保険委員会. 抗酸菌検查法検討委員会. 結核. 86, 523-528, 2011.

- 15) World Health Organization.: Addressing the threat of tuberculosis caused by extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Wkly Epidemiol Rec.*, 81, 386-390, 2006.
- 16) 日本結核病学会治療委員会. 結核. 89, 679-682, 2014.
- 17) 日本結核病学会治療委員会. 結核. 93, 71-74, 2018.
- 18) Wagner, C., Lusty, S.M. Jr., Kung, H.F., Rogers, N.L.: Preparation and properties of trimethylsulfonium-tetrahydrofolate methyltransferase. *J Biol Chem.*, 242, 1287-1293, 1967.
- 19) Clark, J.E., Ljungdahl, L.G.: Purification and properties of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, an iron-sulfur flavoprotein from *Clostridium formicoaceticum*. *J Biol Chem.*, 259, 10845-10849, 1984.
- Ragsdale, S.W., Wood, H.G.: Acetate biosynthesis by acetogenic bacteria. Evidence that carbon monoxide dehydrogenase is the condensing enzyme that catalyzes the final steps of the synthesis. *J Biol Chem.*, 260, 3970-3977, 1985.
- Roberts, D.L., Zhao, S., Doukov, T., Ragsdale, S.W.: The reductive acetyl coenzyme A pathway: sequence and heterologous expression of active methyltetrahydrofolate:corrinoid/iron-sulfur protein methyltransferase from *Clostridium thermoaceticum. J Bacteriol.*, 176, 6127-6130, 1994.
- 22) Abe, T., Masai, E., Miyauchi, K., Katayama, Y., Fukuda, M.: A tetrahydrofolate-dependent *O*-demethylase, LigM, is crucial for catabolism of vanillate and syringate in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J Bacteriol.*, 187, 2030-2037, 2005.
- 23) Zhuang, W.Q., Yi, S., Bill, M., Brisson, V.L., Feng, X., Men, Y., Conrad, M.E., Tang, Y.J., Alvarez-Cohen, L.: Incomplete Wood-Ljungdahl pathway facilitates one-carbon metabolism in organohalide-respiring *Dehalococcoides mccartyi. Proc Natl Acad Sci U S A.*, 29, 6419-6424, 2014.
- 24) Drake, H.L., Gössner, A.S., Daniel, S.L.: Old acetogens, new light. Ann N Y Acad Sci., 1125, 100-128, 2008.
- 25) *Mycobacterium smegmatis* str. mc² 155, complete genome. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP000480.1. Accessed Dec 12, 2018.
- 26) *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv complete genome. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AL123456.3. Accessed Dec 12, 2018.
- 27) Basic Local Alignment Search Tool. Available at: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Accessed Dec 12, 2018.

表1. 本研究に使用した菌株とプラスミド

名称	説明	由来あるいは文献		
大腸菌株				
DH5a	クローニング用宿主	ニッポンジーン		
M. smegumatis 菌株				
mc ² 155	実験室株、親株として使用	American Type Culture Collection		
$\Delta metF$	ΔMSMEG_6664	本研究で作製		
$\Delta metH$	ΔMSMEG_4185	本研究で作製		
$\Delta metH/metH^+$	ΔMSMEG_4185(pNNMETH), KM ^r	本研究で作製		
$\Delta metE$	ΔMSMEG_6638	本研究で作製		
$\Delta metH/\Delta metE$	Δ MSMEG_4185, Δ MSMEG_6638	本研究で作製		
大腸菌用プラスミド				
pCR-Blunt II-TOPO	KM ^r , cloning vector	Thermo Fisher Scientific		
pBluescript II SK(-)	Ap ^r , cloning vector	Agilent Technologies		
pDNR-Dual	Ap ^r , Cm ^r , clonig vector	タカラバイオ		
pSVMETF	Ap ^{r} , KM ^{r} , suicide vector containing <i>metF</i> 5' and	本研究で作製		
	3' flanking regions and the <i>sacB</i> cassette			
pSVMETH	Ap ^r , KM ^r , suicide vector containing <i>metH</i> 5' and	本研究で作製		
	3' flanking regions and the <i>sacB</i> cassette			
pSVMETE	Ap ^{r} , KM ^{r} , suicide vector containing <i>metE</i> 5' and	本研究で作製		
	3' flanking regions and the <i>sacB</i> cassette			
抗酸菌-大腸菌用シャトルベクター				
pNN2	Ap ^r , KM ^r , shuttle vector	文献 11		
pNNMETH	Ap ^r , KM ^r , Expression vector MSMEG_4185	本研究で作製		
	promoter, full-length MSMEG_4185			

表 2. 本研究に使用した PCR プライマー

名称	配列 (5'-3')	目的	
METFUF	AAA <u>CTCGAG</u> TGATCCCGACCGGTCTGTTC	metF上流領域複製	
METFUR	AAA <u>GAATTC</u> AGTCCGGCGAGGCAGACGAG		
METFDF	AAA <u>GAATTC</u> GGTCGTCGAAAATACAAGGGC	metF 下流領域複製	
METFDR	AAA <u>AAGCTT</u> CGGCTTTCTGATCTTCGGC		
METHUF	AAA <u>CTCGAG</u> TCGGCAGGAGAGTGATACCG	metH 上流領域複製	
METHUR	AAA <u>GAATTC</u> GCGCTACCCGAACAATCCGG		
METHDF	AAA <u>GAATTC</u> GTGCACTCCTTCCGTAGCGG	metH 下流領域複製	
METHDR	AAA <u>AAGCTT</u> ATCGCGGCCCAGAACGTCAC		
METEUF	AAA <u>CTCGAG</u> CCTGTACGTCTTGCCAGTTG	metE 上流領域複製	
METEUR	AAA <u>GAATTC</u> CCACCCGGAGAAGTCACT		
METEDF	AAA <u>GAATTC</u> CCTTGAGACGTCGAACCGA	metE 下流領域複製	
METEDR	AAA <u>AAGCTT</u> CTGTCGTTCGAGGGCCTG		
METHEXF	AAA <u>TCTAGA</u> CTCAGTCCTCCGGGTTGTAG	metH 複製	
METHEXR	AAA <u>TCTAGA</u> GGACTACTCTGGCGATGTGA		
APHF	AAA <u>AAGCTT</u> AAGCACTCAGGGCGCAAGGGCTG	KM 耐性遺伝子複製	
APHR	AAA <u>TCTAGA</u> TTGACCAAAGCGGCCATCGTG		
SACBF	AAA <u>TCTAGA</u> AACATCAAAAAGTTTGCAAAAC	サッカロース感受性遺伝子複製	
SACBR	AAA <u>GCGGCCGC</u> TTATTTGTTAACTGTTAATTGTC		
SINGLE check1 F	ACGACTCACTATAGGGCGAA	欠損株作製用プラスミド組換え確認	
SINGLE check1 R	TTCTGCGGACTGGCTTTCTA		
METF check1 R	ACACAAATTCTTCACCCGCC	pSVMETF 組換え確認	
METF check2 F	CGGAAAATCGGGCTTGTTCT		
METF check3 F	GCCAAGATCGTCGGTAAGGA	metF 欠損確認	
METF check3 R	ACAAGAAGCCCAGTGTGTTG		
METH check1 R	GAGAAGGCCACGTTGTTCAA		
METH check2 F	GGTTGAGCAGGTCGTTGTTG	povmein 租換入確認	

METH check3 F	GAACAGGAGACCGCCGAG	matu尔措碑题	
METH check3 R	GGCGGCTGTGACACGTAG	mein 入1頁4曲的	
METH inside F	TGGTCTCGACGATGATCAGG	metH 相補確認	
METH inside R	CAACAACGACCTGCTCAACC		
METE check1 R	GTTCGGCAGGTACAGCTTTC	pSVMETE 組換え確認	
METE check2 F	GTTTCCGGCCCAGTACTTCT		
METE check3 F	AGCACTTCGAGAGCGATAGG		
METE check3 R	CTGCATGAAAGCAACGAGAG	<i>Шец</i> 乃 俱唯 芯	

下線は制限酵素サイトを示す。

図1 M. smegmatis におけるメチオニン合成経路

M. smegmatis において提唱されているメチオニン合成経路を示す。

MetA:ホモセリン *O*-スクシニルトランスフェラーゼ、MetB:シスタチオニンγ-シンターゼ、MetC:シスタチオ ニンβ-リアーゼ、MetF:メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ、FolC:ホリルポリγ-グルタミン酸シンターゼ、 MetH:ビタミン B₁₂ 依存性メチオニンシンターゼ、MetE:ビタミン B₁₂ 非依存性メチオニンシンターゼ。

図2 欠損株の作製法

A. 欠損株の作製法の模式図を示す。欠損株作製用プラスミドを電気穿孔法で*M. smegmatis* mc²155 株に導入し、 KM を用いてゲノムとプラスミド間の相同組換えが生じた株を選択した。a と b は欠損株作製用プラスミドが標 的遺伝子の上流領域または下流領域に挿入されたかを確認するために行った PCR 法の増幅領域を示す。ゲノム とプラスミド間の相同組換えが生じた株を継代し、スクロースを用いてゲノム内の相同組換えが生じた株を選択 した。c は標的遺伝子が欠損したかを確認するために行った PCR 法の増幅領域を示す。

標的遺伝子
 上流 1,000 bp
 下流 1,000 bp
 AphII SacB

B. 図 A で示す a、b の領域の PCR 法の結果を示す (n=3)。欠損株作製用プラスミド由来の領域とゲノム由来の 領域に設計したプライマーを用いて PCR 法を行い、挿入領域の確認を行った。

C. 図 A で示す c の領域の PCR 法の結果を示す (n=3)。欠損株作製用プラスミドを作製した際に複製した上下流 領域よりもさらに上下流領域に設計したプライマーを用いて PCR 法を行い、得られる増幅産物の大きさが標的 遺伝子の大きさだけ小さくなることを確認した。

図3 相補株の作製法

A. 相補株の作製法の模式図を示す。発現用プラスミドを電気穿孔法で欠損株に導入し、KM を用いてプラスミドが導入された株を選択した。dはプラスミドが導入されたかを確認するために行ったPCR法の増幅領域を示す。
B. 図 A で示す d の領域の PCR 法の結果を示す (n=3)。標的遺伝子内部に設計したプライマーを用いて PCR 法を行い、*M. smegmatis* mc²155 株と相補株で同じ大きさの増幅産物が得られることを確認した。

標的遺伝子
 上流 1,000 bp
 下流 1,000 bp
 エエエエコaphII

- 図4 Sauton 寒天培地上における M. smegmatis mc²155 株、欠損株および相補株の増殖
- M. smegmatis mc²155 株と変異株をそれぞれ OD₆₀₀ = 0.001, 0.01, 0.1 に調整した。Sauton 寒天培地とメチオニン含
- 有 Sauton 寒天培地に 3 µL ずつ 2 か所に播種し、3 日間培養した。24 時間ごとの増殖を示す (n=5)。
- A. M. smegmatis mc²155 株と ΔmetF の増殖
- B. *M. smegmatis* $mc^{2}155$ 株、 $\Delta metH$ および $\Delta metH/metH^{+}$ の増殖
- C. M. smegmatis mc²155 株と ΔmetE の増殖
- D. M. smegmatis mc²155 株と ΔmetH/metE の増殖









metE



図2 橋本





B

bp



図3 橋本





メチオニン含有Sauton寒天培地



B

Sauton寒天培地



メチオニン含有Sauton寒天培地 9.001 0.01 0.001 0.01 9.001 0.01 0.1 1.0 1.0 5 ר ר ٦Г ٦ mc²155株 $\Delta metH$ $\Delta metH/metH^+$ 2日目 1日目 3日目



図4 橋本