

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
印	
印	
印	

## 学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野	社会環境生命科学	身分	大学院生	氏名	野崎 高儀
論 文 題 名 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					
論文内容の要旨（2000字程度）					
<p><b>【緒言】</b></p> <p>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。</p> <p><b>【材料・方法】</b></p> <p>1. 使用菌株</p> <p><i>Mycobacterium abscessus</i> 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、<i>Mycobacterium avium</i> 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。</p> <p>2. 薬剤感受性試験</p> <p>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有する7H10-ADC-Tween80寒天培地に播種し、<i>M. abscessus</i> は37°Cで5日間、<i>M. avium</i> は14日間培養した。</p> <p>3. プラスミドの作製</p> <p>ハイグロマイシン耐性遺伝子（<i>hyg<sup>r</sup></i>）、ゼオシン耐性遺伝子（<i>zeo<sup>r</sup></i>）、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-<i>hyg<sup>r</sup></i>、pNPP-<i>zeo<sup>r</sup></i>、pNPP-DsRed、およびpNPP-EGFPを得た。</p> <p>次にpYT937を制限酵素で消化することで、複製起点(<i>oriM</i>)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、pYTskを構築した。そして、pNPP-<i>hyg<sup>r</sup></i>あるいはpNPP-<i>zeo<sup>r</sup></i>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、pYTsk に挿入した。</p>					

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。