

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 口腔微生物学	身分 大学院生	氏名 竜門 亜矢子
論 文 題 名 <i>Mycobacterium bovis</i> bacillus Calmette-Guérinの 人工的速育化と速育化メカニズムの探索		
論文内容の要旨 (2000字程度)		
<p>結核菌 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) が引き起こす結核症は、単独の病原体としては年間死亡者数が世界で最も多い感染症で、3大感染症のひとつとされている。真核細胞と多くの原核細胞はチミジル酸合成酵素 (TS) としてThyAを持つが、結核菌をはじめとする<i>Mycobacterium</i>属を含めた放線菌類には、ThyAとThyXの両者を併せ持つ菌種が多く存在する。ワクチン株である<i>Mycobacterium bovis</i> bacillus Calmette - Guérin (BCG) を用いて研究を進めたところ、<i>thyA</i>と<i>thyX</i>の発現量が菌の増殖速度に大きく影響する可能性があることを示唆する結果が得られた。結核菌は遅育菌であり、病原体の同定や薬剤感受性試験などに時間がかかるため臨床において大きな障害となっており、また、この発育の遅さは、新たな抗結核薬の迅速な開発を阻んでいる。そのため、遅発育性抗酸菌を速育化することでできれば、新規抗結核菌剤候補の評価の短縮化を図ることが可能になると考えた。本研究では、<i>thyA</i>と<i>thyX</i>の発現量がBCGの増殖速度に与える影響を明らかにすること、さらにそれらの変異株を用いてBCGの増殖速度に影響を与える因子を検討し、葉酸代謝経路での速育化のメカニズムを明らかにすることを目的とした。</p> <p><i>thyA</i>欠損株BCGΔ<i>thyA</i>、<i>thyX</i>欠損株BCGΔ<i>thyX</i>、<i>thyA</i>過剰発現株BCG::<i>pthyA</i>、そして<i>thyX</i>過剰発現株BCG::<i>pthyX</i>を用いて、7H10寒天培地上および7H9液体培地中での増殖速度を比較した。その結果、いずれの培地においても親株を含めた他の株と比べ、BCG::<i>pthyX</i>の増殖が有意に促進されていた。続いて<i>thyX</i>とともに<i>thyA</i>も同時に過剰発現するBCG::<i>pthyAX</i>を作製し、親株そしてBCG::<i>pthyX</i>の増殖速度と比較したところ、BCG::<i>pthyAX</i>の増殖速度は親株と同様であり、増殖</p>		

は促進されなかった。次に、BCG::pthyXにおいて葉酸代謝系の遺伝子群に変化がみられるかをRNAシーケンス法により検討した。その結果、テトラヒドロ葉酸 (THF) を5,10メチレンテトラヒドロ葉酸 (5,10-CH₂-THF) に代謝する酵素の遺伝子 *glyA* と *gcvT* とともに、ジヒドロ葉酸 (DHF) をTHFに還元する酵素の遺伝子 *dfrA* の発現も増加していた。そのため、*dfrA* 過剰発現株BCG::pdfrAと *gcvT* 過剰発現株BCG::pgcvTを作製し、寒天培地上と液体培地中において、それぞれの株の増殖を比較した。また5-メチルテトラヒドロ葉酸 (5-MTHF) をTHFに還元する酵素の遺伝子 *metE* と *metH* の発現量がそれぞれ1.50と-1.50と逆方向への変動を示したことから、BCGには存在しない5-MTHFを合成する遺伝子 *mthfr* (*Mycobacterium smegmatis*由来) の過剰発現株BCG::pmthfrを作製し、その増殖も比較した。その結果、BCG::pdfrAでは親株に比べて増殖が促進されたが、BCG::pmthfrとBCG::pgcvTでは増殖は促進されなかった。

BCGはTSとしてThyAとともにThyXを持つ。チミジル酸合成経路を介して、5,10-CH₂-THFからTHFに代謝される際、ThyAの場合には一旦DHFが合成された後にTHFとなるが、ThyXの場合には5,10-CH₂-THFから直接THFに代謝される。本研究において *thyX* の過剰発現株であるBCG::pthyXで増殖が促進されたのは、この短縮型ともいえる経路が主になった結果であることが推測される。*thyX* とともに *thyA* も同時に過剰発現させたBCG::pthyAXの増殖速度は親株と同様であり、増殖は促進されなかった。これは、ThyAとThyXが基質である5,10-CH₂-THFを競合し、ThyAが5,10-CH₂-THFをDHFに還元するようになったために、増殖速度が親株程度に戻ったことが考えられる。ところで、*M. smegmatis*由来 *mthfr* 発現株であるBCG::pmthfrの増殖速度は、親株と同様であり増殖が促進されることはなかった。本菌における5-MTHFの本来の合成経路が不明であることから、今回の結果だけではこの経路が増殖速度に影響するかの結論を出すことは困難であり、さらなる検討が必要と考えられる。また、*dfrA* の過剰発現株BCG::pdfrAでは増殖が促進されたが、*gcvT* の過剰発現株BCG::pgcvTでは増殖は促進されなかった。BCG::pthyXで増殖速度が促進されたことと合わせて考えると、THFの産生と蓄積が、BCGの増殖を促進させる要因になったことが推測された。

本研究では、BCGにおいて *thyA* 遺伝子発現量と増殖速度間に明瞭な関連は見出せなかったが、*thyX* 遺伝子を過剰発現させることで、増殖は有意に促進されることが示された。また、*dfrA* 遺伝子の過剰発現でも、同様に速育化することが示された。しかし、*gcvT* 遺伝子の過剰発現は増殖速度に変化はもたらさなかった。以上のことから、THFの産生量あるいは蓄積量が本菌の増殖速度に関与している可能性が示唆された。