

氏 名	西谷 悠希
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7457号
学位授与の日付	令和 8年 3月 25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	結核菌における S-アデノシルメチオニン合成酵素 (MetK) の活性低下は PAS 耐性を付与する
論文審査委員	仲野 道代 教授 美藤 純弘 准教授 大原 直子 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

結核は、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) によって引き起こされる感染症で、依然として世界的な公衆衛生上の脅威となっている。結核治療の中心は複数の抗菌薬を併用した抗菌化学療法であるが、多剤耐性結核の蔓延が深刻な問題となっている。そのため、新規抗結核薬とさらに効果的な結核化学療法レジメンの開発が急がれている。

パラアミノサリチル酸 (para-amino-salicylic acid : PAS) は古典的な抗結核薬の一つで、葉酸代謝経路を標的とする。服用量が多いことに加え、副作用の発生率や耐性菌の出現頻度が比較的高いという問題から、その使用頻度は大幅に減少していた。しかし近年、多剤耐性結核への PAS の有効性が再認識されており、現在 PAS は世界保健機構の多剤耐性結核の治療レジメンにおいて追加薬の一つとして推奨されている。

これまで PAS 耐性に関与する遺伝子としては、葉酸代謝経路上の酵素をコードする遺伝子の変異が複数報告されてきた。しかし、葉酸代謝経路上にない遺伝子の変異も示唆され、PAS 耐性の機序には未だ不明な点が多い。

本研究では、*M. tuberculosis* variant *bovis* bacillus Calmette Guérin (BCG) を親株として人為的 PAS 耐性株を作製し、PAS 耐性の新規メカニズムを見出すことを目的とした。

【材料ならびに方法】

1 µg/mL PAS 含有 7H10 寒天培地に BCG Tokyo-172 株 (WT) を播種し、21 日間培養した。得られた複数のコロニーからゲノム DNA を抽出し、WT とともに全ゲノム配列を解読し、ゲノム上の変異箇所を探索した。

得られた人為的 PAS 耐性株に、変異の認められた遺伝子の野生型をプラスミド pNN2 に挿入後、このプラスミドを人為的 PAS 耐性株に導入することで相補株を作製した。

増殖速度は 7H9 液体培地を用いて測定し、PAS 感受性の評価には種々の濃度の PAS を含有する 7H10 寒天培地上を用いた。

S-アデノシルメチオニン (S-adenosylmethionine : SAM) 合成活性は菌体ライゼートを用いて測定し、L-[³⁵S]Met を基質として合成される [³⁵S]SAM を定量することにより算出した。

遺伝子の発現量を評価するために、菌体から全 RNA を抽出し、それをもとに合成した相補 DNA を用いて定量 RT-PCR を行った。発現レベルは $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて *gyrA* に対する相対発現量で算出した。

2 群間の統計的有意差は対応のない Student の t 検定,あるいは二元配置混合効果モデルにより判定した. p 値が 0.05 未満を有意差ありと判定した.

【結果】

1 $\mu\text{g/mL}$ PAS 含有 7H10 寒天培地に WT を播種したところ複数のコロニーを得た. その中に, locus tag JTY_RS07395 (JTY_1428) 内の 356 塩基目が G→A に置換された株を認め, この株を PAS13 とした. JTY_RS07395 は, メチオニン代謝の中で SAM 合成酵素 MetK をコードする遺伝子 *metK* で, この点変異によりコドンは CGG→CAG に変化し, 119 番目のアミノ酸はアルギニン (R) からグルタミン (Q) に非同義置換していた.

PAS 含有 7H10 寒天培地にて WT および PAS13 を培養した結果, PAS13 は WT と比較して PAS 耐性を示すことが確認された. 一方で, 7H9 液体培地中の増殖速度は, WT と PAS13 の間に差異は認められなかった. 野生型 *metK* を pNN2 上に持つ PAS13 相補株 (PAS13::pWT-*metK*) を作製し, PAS 含有 7H10 寒天培地上で培養したところ, PAS に感受性を示した.

L-[^{35}S]Met を用いた測定の結果, 野生型 MetK と比較して MetK R119Q の SAM 合成活性は約 6 分の 1 に低下していた.

定量 RT-PCR の結果, PAS13 では WT と比較し, 葉酸代謝経路に関わる *folC*, *dfrA*, *gcvT*, *glyA*, *thyA*, および *thyX* の発現量が有意に高かった ($p < 0.05$). また, メチオニン代謝経路に関わる *metF* と *metE* の発現量も有意に高く ($p < 0.05$), さらに *metH* の発現量の増加傾向を認めた ($p = 0.054$). 一方, *metK* の発現量には両者間で有意差を認めなかった ($p = 0.333$).

【考察】

metK は必須遺伝子の一つと考えられているが, 本研究では *metK* に点変異を持つことで SAM 合成活性の低下した BCG の変異株 PAS13 を得た.

PAS13 では, MetK の機能低下によるメチオニン消費量の減少と, *metF*, *metE* および *metH* の発現量上昇によるメチオニン合成量の増加という 2 つの現象が生じ, これによりメチオニンの細胞内への蓄積が生じていることが推察される. 菌体外から取り込まれたメチオニンの増加が PAS に対して拮抗的に働き, Mtb の PAS 感受性を低下させることは以前から知られており, PAS13 においても細胞内メチオニン濃度の上昇が PAS 耐性を獲得した直接的な要因になっていることが推察される. また, PAS の静菌作用と直接関係する葉酸代謝経路に関わる遺伝子に関しても, 総じて発現量の上昇が認められ, 特にフラビン依存性チミジル酸合成酵素をコードする遺伝子 *thyX* の発現上昇が最も顕著であった. Mtb では *thyX* の過剰発現により PAS 耐性となることも報告されていることから, *thyX* の発現増強が PAS13 の PAS 耐性化に追加的に寄与している可能性が考えられた.

【結論】

本研究では, Mtb が SAM 合成酵素をコードする遺伝子 *metK* の変異により, PAS 耐性を獲得することが明らかになった. *metK* の変異はメチニン代謝経路のみならず, *metK* と直接関与しない葉酸代謝経路も間接的に変化させた. 本研究では, 必須遺伝子にも変異を導入することで耐性を獲得する, Mtb の巧妙な生存戦略が示された. Mtb の複雑な PAS 耐性メカニズムの一端を解明した本研究結果は, 臨床分野において治療戦略の強化に生かせる可能性がある.

論文審査結果の要旨

【緒言】結核は、結核菌*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) により引き起こされる感染症で、依然として世界的な脅威である。多剤耐性結核の治療に、葉酸代謝経路を標的とした古典的な抗結核薬であるパラアミノサリチル酸 (para-amino-salicylic acid : PAS) が用いられる。PASに対する耐性化も知られているが、耐性化の機序には未だ不明な点が多い。本研究では、結核ワクチン株であるBCGを親株として人為的にPAS耐性株を作製し、PASに対する耐性獲得機序を見出すことを目的とした。

【方法】PAS含有7H10寒天培地にBCG Tokyo-172株 (WT) を播種し、人為的にPAS耐性BCG株を作製した。得られたPAS耐性株とWTの全ゲノム配列を決定、比較した。次に、供試菌で変異が認められた*S*-アデノシルメチオニン (*S*-adenosylmethionine : SAM) を合成する酵素MetKをコードする遺伝子*metK*をプラスミドに導入することで、供試菌の相補株を作製し、菌の増殖速度とPAS感受性を評価した。SAMの合成活性は、菌体ライゼートにL-[³⁵S]Metを添加し、産生された[³⁵S]SAMを定量した。菌体から全RNAを抽出し、定量RT-PCRを行い、遺伝子の発現量を評価した。

【結果】PAS含有培地上で得られたPAS耐性株の中に、MetKのR119Q点変異を有する株を認め、PAS13とした。PAS13の増殖速度はWTと同等であった。*metK*相補株はPASに感受性を示した。MetK R119QのSAM合成活性は野生型MetKと比較して約6分の1に低下していた。さらに、定量RT-PCRの結果、PAS13ではWTと比較し、チミジル酸合成経路および、メチオニン合成経路上の遺伝子の発現上昇が認められた。また、*metK*の発現量には有意な変化を認めなかった。

【考察】PAS13ではMetKの機能低下によるメチオニン消費量の減少と、メチオニン代謝経路中の酵素*metF*、*metE*および*metH*の発現上昇によるメチオニン合成量の増加という2つの現象により、細胞内へのメチオニン蓄積が生じていると推察された。細胞内メチオニン濃度上昇がMtbのPAS感受性を低下させることはすでに知られており、PAS13においてもPAS耐性を獲得した直接的な要因になっていることが推察された。

本研究では、MtbがSAM合成酵素をコードする遺伝子*metK*の変異により、PAS耐性を獲得するという新しい知見を得た。得られた成果は新規性に富んでおり、また新規抗結核薬および、さらに効果的な結核化学療法レジメンを開発する上での礎となるものである。今後、SAM依存性代謝メカニズムの解明が期待される。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。