医学細菌の分類・命名の情報

17. 結核菌群のゲノム構造の相違を利用した分類

大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学

前田伸司 小林和夫

はじめに

2001 (平成 13) 年の日本国内における結核の新登録患者数は約 3 万 5 千人であり, 平成 9 年より 3 年連続で増加していた新登録患者は, 2 年続けて減少した。しかし, 罹患率 (27.9 対人口 10 万人) は世界的にみて依然として高く, 結核など抗酸菌感染症患者数減少への更なる努力が必要となっている。抗酸菌感染症の新しい診断・治療法を開発するため, 抗酸菌ゲノム解析計画が進められており, 全遺伝子構造が明らかにされつつある。結核菌¹⁾, らい菌²⁾ 及び *Mycobacterium bovis*³⁾ についてゲノム解析計画が既に終了し, 全ゲノム情報が判明し, かつ, 公開されている。さらに, *M. avium*, *M. marinum* 及び *M. smegmatis* についてゲノム解析計画が進行中で一部の成績が公開されている。

1998 年の S.T. Cole らによって報告された結核菌 H37Rv 株の全ゲノム配列⁴⁾ は, 抗酸菌属では最初の報告であり, このゲノム情報を利用して他の抗酸菌との遺伝子比較 (comparative genomics) が容易に行えるようになった。結核菌と他の抗酸菌間でのゲノム構造の相違が報告されており, これらの違いを利用して抗酸菌の分類が試行されているので概説する。

1. 結核菌 (H37Rv 株), *M. bovis* 及び *M. bovis* BCG (Pasteur 株) のゲノム構造の比較

現行ワクチン株として使われている BCG は, 非病原性である。しかし, その親株の *M. bovis* は結核菌と同様にバイオセーフティレベル 3 に分類されている。*M. bovis* の病原性因子を規定している遺伝子が, 長期にわたる培養過程で欠失し, 非病原性 BCG に変化したと考えられてきた。

菌種間の DNA-DNA ハイブリダイゼーション

を利用したサブトラクション法で *M. bovis* に存在するが, BCG で欠落している部位が 3 カ所あることが報告された⁴⁾。その後, 結核菌の全ゲノム塩基配列が明らかになり, 結核菌と BCG の遺伝子構造比較が行われた。結核菌の塩基配列から予想される蛋白質を規定している読み枠 DNA をすべてスポットした DNA チップを作製し, マイクロアレイを利用して遺伝子欠落の有無を詳細に解析することにより, 遺伝子の比較が検索された。その結果, 結核菌 H37Rv には存在するが BCG では欠落している部位, つまり, RD (regions of difference) と呼ばれる部位が 16 カ所存在することが明らかになった⁵⁾。このうち RD1 から RD3 については, *M. bovis* と BCG でのサブトラクション法で報告された 3 カ所の欠落部位と一致していた。

2. 結核菌の病原性に関与する遺伝子群

BCG で欠落している 16 カ所の遺伝子部位 (特に, RD1 領域) は, 結核菌病原性因子を規定している遺伝子を含む可能性が高い。RD1 (約 9.5kbp) の欠落により, 7 個の遺伝子 (Rv3872 から Rv3878) が完全に失われ, さらに 2 個の遺伝子 (Rv3871 と Rv3879) の蛋白質コード領域の分断が生じる。

結核菌の病原性における RD1 の役割は, 遺伝子の 'knock-out' 及び 'knock-in' 実験結果から強く支持されている。RD1 欠失 H37Rv ('knock-out') をヒト急性単球性白血病 (THP-1) 細胞株, ヒト末梢血単核細胞由来マクロファージ及び C57 BL/6 マウスに感染させたところ, 野性株 H37Rv と比べて病原性が減弱し, BCG と同様に感染細胞やマウスから排除されることが報告されている⁶⁾。逆に, RD1 領域に存在する 9 個の遺伝子を

表1 結核菌群のRD領域とIS1561'遺伝子の有無

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. africanum</i>		<i>M. microti</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> BCG
		subtype II	subtype I			
RD1	+	+	+	+	+	-
RD2	+	+	+	+	+	+/-
RD3	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-
RD4	+	+	+	+	-	-
RD5	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-
RD6	+/-	+	+	-	-	-
RD7	+	+	-	-	-	-
RD8	+	+	-	-	-	-
RD9	+	+/-	-	-	-	-
RD10	+	+/-	+/-	-	-	-
RD11	+	+/-	+/-	+	-	-
RD12	+	+	+	+	-	-
RD13	+	+	+	+	-	-
RD14	+	+	+	+	+	Pasteur ^a
RD15	+	+	+	+	+	Frappier ^a , Connaught ^a
RD16	+	+	+	+	+	Moreau ^a
IS1561' ^b	+	+	+	-	+	+

+: 存在; -: 欠落; +/-: 欠落している場合もある

^a 表記した株のみ欠落

^b IS1561': トランスポゼースの pseudogene 断片 (Rv3349c)

含むDNAをBCGの染色体に導入した菌('knock-in')をBALB/c, C57BL/6及び重症複合免疫不全症マウスに感染させたところ野性株H37Rvの病原性には及ばないが、親株BCGより病原性が亢進した⁷⁾。さらに、結核菌群である*M. microti*にRD1を導入した株は、RD1導入BCGと同様、病原性が亢進した。

しかし、結核菌病原性に関与するRD1領域における遺伝子の特定は未了である。なお、結核菌特異的T細胞抗原であるESAT-6(6kDa early secretory antigen target)及びCFP-10(10kDa culture filtrate protein)が有力な病原性関与遺伝子候補として考えられているが、現在までのところ確認はされていない。

3. 結核菌のRD部位を利用した抗酸菌の分類

結核菌H37RvのDNAチップとマイクロアレイを用いた実験系で、抗酸菌ゲノムのRD1からRD16領域の有無を容易に調べることが可能である(表1)^{8)~11)}。菌種によってこれらの領域の有無に関し、特徴的なパターンが存在することから分類も可能と考えられる。抗酸菌の同定に生化学的

性状、16S rRNAの塩基配列、ミコール酸の高速液体クロマトグラフィーの溶出パターン、薬剤感受性などの分析が標準的である。しかし、複数のRD領域等の有無を核酸増幅法(PCR)法で解析することにより、迅速・簡便に抗酸菌種の同定が可能となる⁸⁾⁹⁾。分類法の一例を挙げると、IS1561', RD1, RD4, RD7及びRD12のすべてが陽性の場合、結核菌または*M. africanum* subtype IIと、IS1561', RD1, RD4及びRD12が陽性の場合*M. africanum* subtype Iであり、RD1, RD4及びRD12が陽性の場合、*M. microti*, IS1561'とRD1が陽性の場合、*M. bovis*, IS1561'のみが陽性の場合、BCGに分類可能である⁹⁾。迅速な診断と的確な治療が必要な抗酸菌感染症にとって、この方法は利便性が高いものと考えられる。一方、全ゲノム情報が新たに報告された感染力の強い臨床分離結核菌(CDC1551株)と先に報告されたH37Rvのゲノム間で、86カ所に10bp以上のDNAの挿入による多型、1,075カ所に1塩基多型が存在した¹²⁾。また、RD6部位が欠落している株もあり、同じ結核菌であっても多様性が存在する。そのため、

ゲノム構造の違いを利用した分類法を利用する場合、このような多型が存在することを考慮する必要がある。

ま と め

本稿で述べた結核菌をはじめ細菌の全ゲノム構造が解明されたことにより、ゲノム同士の比較が容易に行うことができるようになった。その結果、菌種特異的な遺伝子領域が発見され、菌の分類・同定へ応用が報告され始めている。遺伝子比較 (comparative genomics) を応用することにより、迅速な原因菌種の特定など、感染症対策に寄与することが期待される。また、ゲノム構造の相異から、病原性因子を規定する遺伝子領域の特定が精力的に行われている。しかしながら、現在まで、結核菌の病原性を適確に発現する因子は同定されていない。今後、これらの研究が発展することにより、人類の健康に甚大な脅威を提供し続けている結核など抗酸菌感染症対策に寄与することが望まれる。

文 献

- 1) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, *et al.* : Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998 ; 393 : 537—44.
- 2) Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, *et al.* : Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001 ; 409 : 1007—11.
- 3) Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, *et al.* : The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 ; 100 : 7877—82.
- 4) Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK : Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 1996 ; 178 : 1274—82.
- 5) Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM : Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999 ; 284 : 1520—3.
- 6) Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR : Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *J Infect Dis* 2003 ; 187 : 117—23.
- 7) Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST : Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* 2002 ; 46 : 709—17.
- 8) Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskovi A, Loder A, Bretzel G, *et al.* : Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40 : 2339—45.
- 9) Huard RC, de Oliveira Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL : PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol* 2003 ; 41 : 1637—50.
- 10) Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST : Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol* 1999 ; 32 : 643—55.
- 11) Brosch R, Gordon SV, Eiglmeier K, Garnier T, Tekai F, Yeramian E, Cole ST : Genomics, biology, and evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. p. 19—36. In G.F. Hatfull & W.R. Jacobs Jr. (ed.), *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press Washington, DC
- 12) Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, *et al.* : Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* 2002 ; 184 : 5479—90.

Current Topics on Classification and Nomenclature of Bacteria Classification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of its Genomic Structures

Shinji MAEDA & Kazuo KOBAYASHI

Department of Host Defense, Osaka City University Graduate School of Medicine

[J.J.A. Inf. D. 77 : 651~653, 2003]