

Mycobacterium kyorinense 及びその近縁非結核性抗酸菌における RNAポリメラーゼβサブユニット遺伝子塩基配列の決定

工藤翔平¹ 大西宏明² 大塚弘毅² 渡邊卓²

杏林大学医学部6年¹
杏林大学医学部臨床検査医学教室²

【緒言】

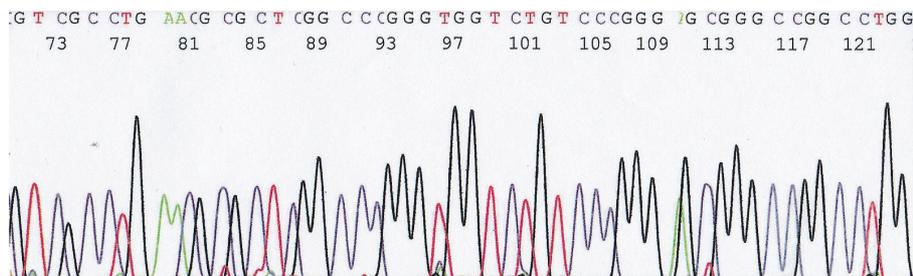
Mycobacterium kyorinense は杏林大学医学部附属病院を含む国内数カ所で分離培養され、同大学の名前にちなんで命名された新種の非結核性抗酸菌である⁽¹⁾。その後国内他施設及び国外でも本菌による感染例が報告された⁽¹⁻⁴⁾。本菌の感染は呼吸器感染症やリンパ節炎、関節炎を引き起こす。*M. kyorinense* 感染症に対して通常の抗結核療法の効果は低く、マクロライドやフルオロキノロンを含む抗菌療法が有効であるとされる。*M. kyorinense* に対する抗菌薬の最少発育阻止濃度(MIC)の測定では、リファンピシンのMICが全ての株で著明に高値であった⁽⁴⁾。

結核菌(*M. tuberculosis*)においては、リファンピシンの耐性に関わる遺伝子変異としてRNAポリメラーゼβサブユニット(*rpoB*)蛋白のアミノ酸の置換が知られている⁽⁵⁾。一方、*rpoB* 遺伝子の相同性は、抗酸菌の分類にも用いられている。著者らは、6株の*M. kyorinense* 及び近縁種である*M. celatum*, *M. branderi* について*rpoB* 遺伝子の配列を決定し、*M. kyorinense* と近縁の非結核性抗

酸菌との比較、およびリファンピシン耐性と遺伝子配列との関連の検討を行った。

【方法】

M. kyorinense は国内6カ所から分離され杏林大学に収集された6株を、*M. celatum* 及び*M. branderi* については理化学研究所から購入した代表株(ATCC51131^T および ATCC51789^T) を用いた。*Mycobacterium tuberculosis* の *rpoB* 遺伝子配列をもとに菌種ごとに11~13領域に分割してPCR用のプライマーを作成した。抽出された各株のDNAに対してPCR法を行い、電気泳動で目的の領域が増幅されている事を確認した。試薬はGene Amp® Fast PCR (Applied Biosystems) を用いた。増幅されたDNAについて3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてダイレクトシーケンスにより塩基配列の決定を行った(図1)。最後に11~13領域に分割して得られた塩基配列の結果をつなぎ合わせ、各株の*rpoB* 遺伝子全長の塩基配列を得た。



(図1) *M. kyorinense* のリファンピシン耐性に関わる *rpoB* 遺伝子のシーケンス結果の一部

【結果及び考察】

ダイレクトシーケンスの結果, *M. kyorinense*, *M. celatum*, 及び *M. branderi* の *rpoB* 遺伝子について全 3057bp の塩基配列を決定できた。

M. kyorinense の 6 株については, *rpoB* の塩基配列は全株とも 100% 一致していた。一方, *M. kyorinense* と *M. celatum* の間においては 96.8% の相同性, *M. kyorinense* と *M. branderi* の間においては 95.7% の相同性であった。

また, リファンピシン耐性に関与することで知られる *rpoB* コドン 511~533 領域において, *M. kyorinense* では *M. tuberculosis* と比較して 15 塩基の差異がみられた。アミノ酸レベルでは Ser531 が Asn に置換されていた。この Ser531 の Asn への置換はリファンピシン抵抗性の *M. tuberculosis* でみられる *rpoB* 変異の中で最も多いものである。この結果より *M. kyorinense* のリファンピシン抵抗性が *M. tuberculosis* の一部に見られるそれと分子レベルで同様の機序で引き起こされている事が推察された。

尚, 本実験結果は臨床経過やその他実験結果とともに *Emerging Infectious Diseases* 誌に掲載された⁽⁴⁾。また *M. kyorinense* 代表株の KUM 060204^T について, 決定した

3057bp の *rpoB* 全遺伝子配列は GenBank: JQ717032 に登録された。

引用文献

1. Okazaki M, Ohkusu K, Hata H, Ohnishi H, Sugahara K, Kawamura C, et al. *Mycobacterium kyorinense* sp. nov., a novel, slow-growing species, related to *Mycobacterium celatum*, isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009; 59: 1336-41.
2. Wada H, Yamamoto M, Okazaki M, Watanabe T, Goto H. Isolation of *Mycobacterium kyorinense* in a patient with respiratory failure. *Ann Intern Med.* 2009; 150: 568-70.
3. Campos CED, Caldas PCS, Ohnishi H, Watanabe T, Ohtsuka K, Matsushima S. First isolation of *Mycobacterium kyorinense* from clinical specimens in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 2477-8
4. Ohnishi H, Yonetani S, Matsushima S, Wada H, Takeshita K, Kuramochi D, et al. *Mycobacterium kyorinense* infection. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19: 508-10.
5. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* 1993; 341: 647-51.