

課題番号 : 29指1028

研究課題名 : 結核菌の薬剤耐性化能推定方法の確立と薬剤耐性化抑制法開発のための基礎的研究

主任研究者名 : 竹本 訓彦

分担研究者名 :

キーワード : 薬剤耐性化、突然変異、ミスマッチ修復

研究成果 : Takemoto et al., 2018 Nucleic Acid Res. in press (doi: 10.1093/nar/gky481)

結核菌の薬剤耐性化については耐性遺伝子の水平伝搬の例はなく、既存遺伝子への突然変異によることが知られている。生物における突然変異を抑制する機構としては DNA 複製時のエラーを除去・修復するシステムと、ダメージを受け変異原となりうる損傷 DNA を修復する経路がある。ミスマッチ修復機構は DNA 複製時のエラーを修復するシステムとして知られ、中心的役割を果たす MutS は大腸菌からヒトまで報告されている。MutS の欠損は変異率を大幅な上昇を引き起こし、細菌であれば薬剤耐性化・人などにおいては細胞の癌化につながる。興味深いことに結核菌の属する放線菌門のバクテリアは *mutS* 遺伝子をゲノム上に持たないにもかかわらず変異率がそれほど高くない。私たちは放線菌門に特異的に保存されている遺伝子の中から、放線菌において変異率抑制に関わる遺伝子のスクリーニングを行い、*Corynebacterium glutamicum* において endoMS/nucS 遺伝子の破壊により、変異率が大幅に上昇することを見出した。残念ながら、同遺伝子破壊による変異率上昇については、スペインのグループにより先に報告されてしまったが、私たちは NCGM において遺伝学的・分子生物学的解析を進めるとともに、合成生物学分野で世界をリードする成果を上げている立教大の末次正幸准教授との共同研究により生化学的解析をすすめた。結果、EndoMS/NucS がミスマッチ特異的な DNA 切断活性をもち、複製複合体の sliding clamp と直接相互作用する事で活性化され、複製時に生じるミスマッチを修復することを示した。また、MutS とは異なり EndoMS/NucS が特定のミスマッチのみを基質とすることから、DNA 複製時には G/T ミスマッチの出現頻度が大幅に高い可能性を見出した。これらの結果を論文としてまとめ、Nucleic Acid Research 誌 (Impact factor 11.561) に発表した。

C. glutamicum において変異率に関わる遺伝子のスクリーニングを進め、現在までに計 45 遺伝子の破壊株及び 2 遺伝子の変異体を作製した。これらについて変異率への影響を検討した結果、予想通り、DNA 複製を担う DNA polymerase への変異により変異率の大幅な上昇を確認した。また、これまでに報告のない機能未知遺伝子 1 つの欠失により変異率上昇が観察された。さらなる解析から、この変異率上昇は複製エラーとは独立していたことから、同遺伝子が何らかの損傷 DNA 修復機構に関わることを予想している。また、酸化ストレスによる変異に着目し、酸化ストレスの解消 (catalase; *katA*)、酸化ストレスによる損傷 DNA の分解 (Formamidopyrimidine-DNA glycosylase; *mutM*)、酸化ストレスによる損傷 DNA (7,8-Dihydro-8-oxo-guanine) を含むミスマッチ DNA の解消 (N-glycosylase/AP endonuclease; *mutY*) について *C. glutamicum* の遺伝子破壊株を作製し、変異率への影響を検討した。なお、結核菌において catalase は抗結核第一選択薬として使用されているイソニアジドの抗菌活性に必須であり、イソニアジド耐性結核菌の約 7 割が catalase をコードする *katG* (*C. glutamicum* *katA* のホモログ) に機能欠損変異を有することが知られている。*C. glutamicum* の *katA* 破壊株は単独では Rifampicin 耐性株出現頻度に影響がないものの、*mutM* や *mutY* との二重・三重欠損によりその出現頻度が優位に上昇することを見出した。

結核菌が属する *Mycobacterium* 属細菌の遺伝子組み換え技術としてはこれまでファージを用いた方法が利用されてきた。しかし、この方法ではファージの調製に手間がかかるうえ、破壊した遺伝子の中に破壊の痕跡が残るため染色体上の遺伝子に 1 アミノ酸変異などを導入することは不可能である。私たちは、ファージを用いた方法に代わる新たな手法として、Suicide vector を用いる新規 *Mycobacterium* 属染色体組換え法を開発した。すでに 1 遺伝子の破壊に成功しており、現在、評価を続けている。

Subject No. : 29A1028

Title : Construction of methods to estimate the strain-specific risk for emergence of drug-resistant strains in *Mycobacterium tuberculosis*

Researchers : Takemoto Norihiko

Key word : mismatch repair, mutation, replication error

Abstract :

During the course of this research project, we have recently published a research article in Nucleic Acid Research (Impact factor: 11.561). It is known that drug-resistance of *M. tuberculosis* is due to mutations but not to horizontal gene transfer of drug-resistant genes. Mismatch repair (MMR) systems based on MutS eliminate mismatches originating from replication errors. Despite extensive conservation of *mutS* homologues throughout the three domains of life, Actinobacteria (including *M. tuberculosis*) and some archaea do not have genes homologous to *mutS*. In the article, we demonstrated that EndoMS/NucS of *Corynebacterium glutamicum* is the mismatch-specific endonuclease that functions cooperatively with a sliding clamp. EndoMS/NucS function in MMR was fully dependent on physical interaction between EndoMS/NucS and sliding clamp. A combination of *endoMS/nucS* gene disruption and a mutation in *dnaE* (encoding replication DNA polymerase), which reduced the fidelity of DNA polymerase, increased the mutation rate synergistically and confirmed the participation of EndoMS in replication error correction. EndoMS specifically cleaved G/T, G/G, and T/T mismatches *in vitro*, and such substrate specificity was consistent with the mutation spectrum observed in genome-wide analyses. The observed substrate specificity of EndoMS, together with the effects of *endoMS* gene disruption, led us to speculate that the MMR system, regardless of the types of proteins in the system, evolved to address asymmetrically occurring replication errors in which G/T mismatches occur much more frequently than C/A mismatches.

We also developed a new genetic method to edit genes of bacteria belonging to *Mycobacteria* family. So far, utilization of phage-based genetic editing methods was general. However, preparation of phage, which is designed to edit chromosomal genes, is complicating and takes time. In addition, when this phage based method was used, it is impossible to eliminate the trace of edition and therefore it is impossible to introduce point mutations into original chromosomal locus of target gene. To overcome these difficulties, we developed a new genetic method using suicide vector. Using this new method, we became able to reproduce point mutations found in clinically isolated strains and to test the effects of the mutation on drug susceptibility in genetically identical background.

課題番号 : 29指1028

研究課題名 : 結核菌の薬剤耐性化能推定方法の確立と薬剤耐性化抑制法開発のための基礎的研究

主任研究者名 : 竹本 訓彦

結核菌薬剤耐性化は
突然変異が原因

↓
各菌株の突然変異率

↓
その菌株の薬剤耐性化リスク

↓
変異率抑制に関わる遺伝子を同定し
それぞれの遺伝子への変異が
変異率に与える影響を確認する

損傷DNA修復に関する研究

カタラーゼ遺伝子は抗結核第一選択薬である
isoniazid (INH)の活性化に必要で、同遺伝子の
破壊は INH 耐性化を引き起こす

↓
C. glutamicum においてカタラーゼ遺伝子と酸化
ストレス損傷DNA除去遺伝子を同時に破壊
することで変異率上昇を確認した

↓
INH 耐性株は遺伝的バックグラウンドによって
は他の薬剤に対する耐性を獲得しやすくなる
可能性が示唆された

モデル生物として結核菌と同じ放線菌門 *Corynebacterineae* 亜目に属
する *Corynebacterium glutamicum* を使用
(遺伝子工学技術が発達しており、遺伝学的・生化学的解析が容易)

DNA複製エラー修復機構に関する研究

放線菌門の細菌はMutSによるミスマッチ修復機構を欠
損するにもかかわらず、変異率は低く抑えられている

↓
放線菌門の細菌で低い変異率を担保する因子を探索

↓
ミスマッチ特異的DNA切断酵素 EndoMS/NucS を同定

↓
EndoMS/NucS がsliding clamp (複製複合体) と相互作用する
ことで活性化し、複製エラー修復に関わることを確認した。

Nucleic Acids Research, 2018, 1
doi: 10.1093/nar/gky481

**Bacterial EndoMS/NucS acts as a clamp-mediated
mismatch endonuclease to prevent asymmetric
accumulation of replication errors**

Norihiko Takemoto^{1,*}, Itaru Numata², Masayuki Su'etsugu^{2,*} and Tohru Miyoshi-Akiyama¹

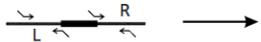
¹Pathogenic Microbe Laboratory, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, 1-21-1,
Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan and ²Department of Life Science, College of Science, Rikkyo
University, 3-34-1 Nishi-Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 171-8501, Japan

Received March 23, 2018; Revised May 11, 2018; Editorial Decision May 15, 2018; Accepted May 19, 2018

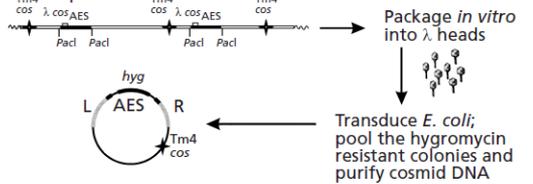
Mycobacterium 属細菌用新規染色体組換えシステムの作製

従来型 Mycobacterium 染色体組換えシステム

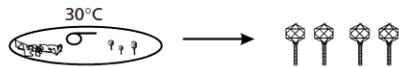
Step 1: Construction of AES



Step 2: Incorporation of AES into shuttle phasmid



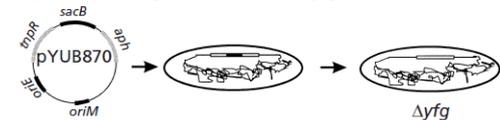
Step 3: Conversion of the cosmid into mycobacteriophage-packaged shuttle phasmid



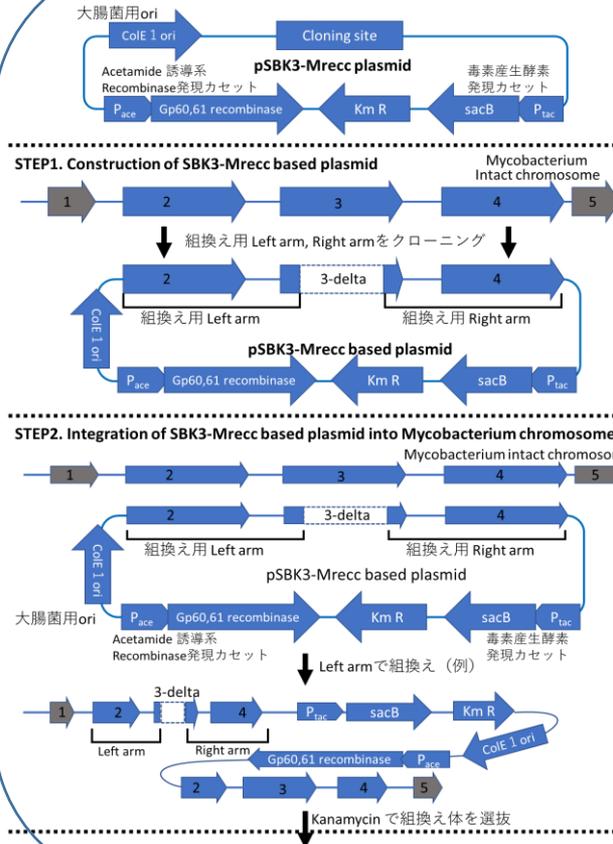
Step 4: Specialized transduction



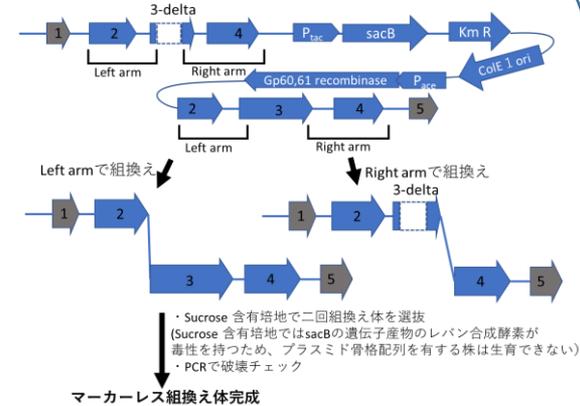
Step 5: Unmarking the mutation in Δyfg



Suicide vector による新規システム



STEP3. Selection of markerless gene-disruptant



- ・作業ステップを大幅に省略できた
- ・短時間で完成(*M. smegmatis*なら約2週間短縮)
- ・ももとのlocusにある遺伝子にマーカーレスで変異導入が可能になった

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：29指1028

研究課題名：結核菌の薬剤耐性化能推定方法の確立と薬剤耐性化抑制法開発のための基礎的研究

主任研究者名：竹本訓彦

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Bacterial EndoMS/NucS acts as a clamp-mediated mismatch endonuclease to prevent asymmetric accumulation of replication errors	Norihiko Takemoto Itaru Numata Masayuki Su'etsugu Tohru Miyoshi-Akiyama	Nucleic Acid Research	in press	2018

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
放線菌で見出した新規ミスマッチ修復機構の解析	竹本 訓彦 沼田 格 末次 正幸 秋山 徹	第14回21世紀大腸菌研究会	熱海	2017/6/9
放線菌において見出した新規DNAミスマッチ修復機構の解析	竹本 訓彦 沼田 格 末次 正幸 秋山 徹	2017年度生命科学系学会合同年次大会	神戸	2017/12/8
結核菌とその近縁種における薬剤耐性化抑制機構の解析	竹本 訓彦 祝 弘樹 沼田 格 末次 正幸 秋山 徹	第91回日本細菌学会総会	福岡	2018/3/27

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。