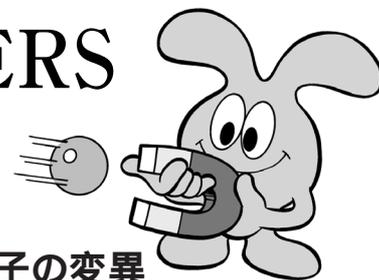


DYNABEADS LETTERS



わが国のリファンピシン耐性結核菌におけるrpoB遺伝子の変異 Dynabeads® M-280 Streptavidin を用いた迅速検査法

大阪府立公衆衛生研究所・病理課

鈴木 定彦

1. 目的

薬剤耐性結核菌は以前から治療面で大きな問題になっている。ところが、今日の薬剤耐性試験はその結果が得られるまでに2～3週間の長い期間を要するという欠点がある。この欠点を補うためのより迅速な検査法の開発が切望されている。

薬剤耐性のうちでも、リファンピシン耐性遺伝子についてはTelentiらによりrpoB遺伝子の一定の領域の塩基置換と耐性が相関することが報告されている。本研究では、このリファンピシン耐性に着目し、わが国の耐性結核菌においてもTelentiらの報告と同様な相関性が認められるかについて検討する目的で実験を進めた。

2. 方法

結核菌

リファンピシン耐性株は広島由来5株、大阪由来23株、東京およびその他由来19株、感受性株は広島由来5株、大阪由来6株、東京およびその他由来6株を用いた。

また、結核菌標準菌株 H37Rv, H37Ra, Aoyama B, および ATCC - 35416 株を陰性対照とした。

DNA の抽出

- 1) 菌体懸濁液(小川培地の1コロニー)をエーゼでガラスビーズ(直径0.5mmのもの1ml)の入ったスクリーキャツプバイアルにとる。
- 2) Lysis buffer (0.3M Tris, pH 8.0, 0.1M NaCl, 6 mM EDTA), 0.5 ml, クロロフォルム 0.5 mlとともにビーズピーターで高速振とうし破壊する。
- 3) 遠心分離を行い、上清の0.5 mlをとる。これに50μlの3M 酢酸ナトリウムと1 mlのエタノールを加えDNAを沈殿させる。遠心分離後、沈殿物を100 μlのTEバッファーに溶解する。

耐性菌株のDNAは、リファンピシンを含む小川培地に生育したコロニーより上記の方法で抽出した。

PCR

Telentiらの報告にしたがってプライマーを合成した。

Dynabeadsを用いて、より迅速に塩基配列を決定するためにプライマーの一方をビオチン化したものを作製しPCRに用いた。

TR1 : TACGGTCGGCGAGCTGATCC

TR2b: ビオチン - TACGGCGTTTCGATGAACC

塩基配列の決定

PCR産物の精製は Dynabeads M-280 Streptavidinを用いて行った。

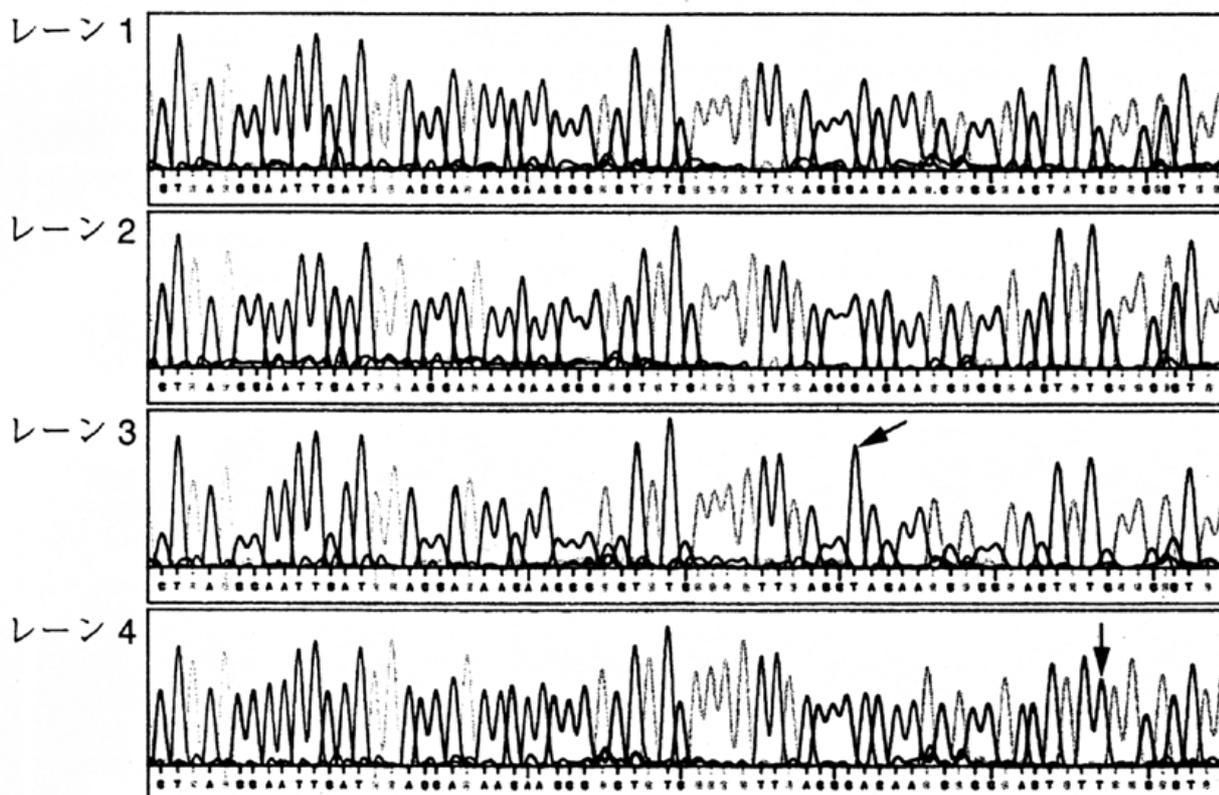
すなわち、PCRで増幅した後、Dynabeads M-280 Streptavidin に結合させ、磁石を用いてエツペンドルフチューブ内に集めた。固相化DNAを水酸化ナトリウムにより変性して一本鎖とした後これを鋳型とし、A.L.F.オートシーケンサーにより、下記プライマー TR3Fを用いて塩基配列の決定を行った。

TR3F : FITC-GGTGCACGTCGCGGACCTCCAGCCC

3. 結果

わが国で分離されたリファンピシン耐性株および感受性株の *rpoB* 遺伝子の500番目から600番目のアミノ酸をコードする領域の塩基配列を決定し、比較検討したところ、表1に示す結果が得られた。この結果は、Telentiらの報告に述べられている表2の成績と同様に⁵¹¹Leuから⁵³³Leuをコードする遺伝子領域に集中して塩基置換が見られた。

図1はオートシーケンサーのチャートである。



レーン 1 は結核菌標準株H37Rv,レーン 2 はリファンピシン感受性臨床分離株、レーン 3 および 4 はリファンピシン耐性臨床分離株のデータである。チャート上の矢印でマークした箇所が変異した塩基を示す。この結果から、わが国における臨床分離結核菌においてもこの領域の塩基置換を見出すことにより、リファンピシン耐性株であると判断できる可能性を示すものである。

表 1 Mutation frequency in clinical isolates in Japan

Phenotype	Genotype			Number of isolates
	Mutation position	Frequency of codon substitution number (%)	Aminoacid substitution	
Resistant	Ser 531	23 (48.9%)	Leu	22
Resistant	His 526	13 (27.6%)	Trp	1
			Tyr	6
			Asp	1
			Asp	1
			Arg	5
Resistant	Thr525His526	1 (2.1%)	Thr Pro Gln	1
	Lys527			
Resistant	Ser 522	1 (2.1%)	Leu	1
Resistant	Asp 516	4 (8.5%)	Gln	4
Resistant	Met 515	1 (2.1%)	Leu	1
Resistant	Gln 513	1 (2.1%)	Gln	1
Resistant	*****	3 (6.4%)	*****	3

表 2 Mutation frequency from the report of Telenti et. al.

Phenotype	Genotype			Number of isolates		
	Mutation position	Frequency of codon substitution number (%)	Aminoacid substitution			
Resistant	Leu 533	1 (1.5%)	Pro	1		
Resistant	Ser 531	33 (51.5%)	Leu	31		
			Gln	1		
			Trp	1		
			Tyr	8		
			Asp	5		
Resistant	His 526	18 (28 %)	Arg	2		
			Asn	1		
			Pro	1		
			Gln	1		
Resistant			Ser 522	1 (1.5%)	Leu	1
Resistant			Asn 518	1 (1.5%)	Deletion	1
Resistant			Asp 516	6 (9%)	Val	6
Resistant	Gln 513	2 (3%)	Leu	2		
Resistant	Leu 511	2 (3%)	Pro	2		
Resistant	*****	Sensitive	*****	2		

4. 考察

わが国におけるリファンピシン耐性株および感受性株の*rpoB*遺伝子の塩基配列を検討した結果、⁵¹¹Leuから⁵³³Leuをコードする遺伝子領域に集中して塩基置換が見られたが、今回塩基配列を決定した47株のうち3株(6.4%)においてはこの領域に塩基の置換が見い出せなかった。このような例外は、Telentiらが行った実験においても見い出されている(66例中2例、3.0%)。大腸菌では687番目と146番目のアミノ酸置換がリファンピシン耐性の原因となっていることも報告されている。今回塩基置換が見い出されなかった

3例については、687番目と146番目のアミノ酸置換についても検討を加える必要があるものと考えられる。今回得られた結果は、わが国における臨床分離結核菌においてもこの領域の塩基置換を見い出すことにより、リファンピシン耐性株であると判断できる可能性を示すものである。従来、PCR産物をEcoR IとHind IIIにより切断した後、同一の制限酵素で切断したpUC18に導入してクローニングし、塩基配列を決定していた。しかしこの方法はその全行程に少なくとも3日を要するという欠点があった。そこで、迅速にリファンピシン耐性結核菌を検出するために、Dynabeads[®]M-280 Streptavidinを用いてPCRで増幅した後直接塩基配列の決定を試みた。

リファンピシン耐性株および感受性株について検討したところ、PCR産物を一度クローニングした後塩基配列の決定を行ったものと同一の結果が得られた。Dynabeads[®]M-280 Streptavidinを用いることにより、DNAの抽出を行ったその日のうちに塩基配列決定反応まで行うことができる。

したがって、Dynabeads[®]M-280 Streptavidinを用いることにより、確実に、迅速なリファンピシン耐性結核菌の検出法の確立が可能になると考えられる。

参考文献

- 1) Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Lowrie D., Cole S., Colston M.J., Matter L., Schopfer K. & Bodmer T.
: Detection of rifampicin - resistance mutants in *Mycobacterium tuberculosis*.
Lancet 341: 647 - 650, 1993
- 2) Suzuki S. et al.,
Mutations in *rpo B* gene of rifampicin - resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*
in Japan. The Journal of the Japanese Association for infectious Diseases. [投稿中]

お問合せは 日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL(03)3593-3211(代) FAX(03)3593-3216