



ヒト型結核菌Mycobacterium tuberculosis 遺伝子のクローニングと組み換え遺伝子の大腸菌に おける発現

メタデータ	言語: jpn 出版者: 室蘭工業大学 公開日: 2014-03-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 菊池, 慎太郎, KOLLATTUKUDY, Papachan メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10258/760

ヒト型結核菌Mycobacterium tuberculosis 遺伝子のクローニングと組み換え遺伝子の大腸菌における発現

その他（別言語等）のタイトル	Cloning and Expression of Mycobacterium tuberculosis DAN in Escherichia coli
著者	菊池 慎太郎, KOLLATTUKUDY Papachan
雑誌名	室蘭工業大学研究報告．理工編
巻	38
ページ	123-130
発行年	1988-11-10
URL	http://hdl.handle.net/10258/760

ヒト型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* 遺伝子のクローニングと 組み換え遺伝子の大腸菌における発現

菊 池 慎太郎・Papachan E. KOLLATTUKUDY*

Cloning and Expression of *Mycobacterium tuberculosis* DAN in *Escherichia coli*

Shintaro KIKUCHI and Papachan E. KOLLATTUKUDY*

Abstract

Although *Mycobacterium tuberculosis* is one of the first identified pathogenic bacteria in man, the biochemical and immunochemical characterization of the bacterial antigens have been limited by difficulties in dealing with this bacilli *in vitro*.

As the the cloning and DNA recombination technique have been considered to be an effective strategy to survey the genes encoding protein antigens relevant for such studies, *M. tuberculosis* genomic DNA was isolated and the fragments with randomly generated endpoints were used to construct a lambda gtlI recombinant library. The antigens encoded by the recombinant could be accumulated in *Escherichia coli* strain defective in protein degradation (*lon*), because gtlI permits insertion of foreign DNA in the β -galactosidase structural gene, *lac Z*, and promotes synthesis of hybrid proteins. A very low molecular weight polypeptide, compared with the size of recombinant DNA, was detected by Western blotting with hyperimmune rabbit serum. These results have indicated that mycobacterial DNA could be expressed in *E. coli*, but the transcription-translation apparatus of this enterobacteria would recognize some *M. tuberculosis* amino acid-coding-DNA sequence as the initiation or termination codon.

1. はじめに

Mycobacterium 属細菌はグラム陽性の桿菌で、*Mycobacterium smegmatis* や *M. phlei* などのように土壌中に生息するものから、ヒト型結核菌 *M. tuberculosis* やらい（癩）菌 *M. leprae* に代表される病原菌にいたるまで自然界にひろく分布し、それらの共通の性質である抗酸性にちなんで抗酸菌と総称されている¹⁾。抗酸菌は、また、その生育速度にもとづいて、世代時間が3～4時間の速育菌 fast-grower (*M. smegmatis* や鳥型結核菌 *M. avium* など) と、生育がきわめて緩慢でときとして世代時間が数週間にもおよぶ遅育菌 slow-grower (*M. tuberculosis* あるいは *M. intracellulare* など) とに大別されるが、菌種によって生育速度に差異の生じる原因についてはまだ不明な点が多く、わずかに、その遺伝子サイズが速育菌では平均 4.8×10^9 ダルトン、また遅育菌では平均 3.5×10^9 ダルトンと、前者が後者よりも幾分大きな遺伝子を有していることが報告されているの

* Professor and the Chair-man at Institute of Biological Chemistry, Washington state University, 99163 U.S.A.

みである^{2,3)}。

よく知られているように *M. tuberculosis* は R. Koch によって初めて近代免疫学的、病原細菌学的な見地からの記述のなされた抗酸菌であるが^{4,5)}、かつては猛威をふるったこの病原菌も、その後の抗生物質の発見やイソコチン酸ヒドラジド (INH) などの化学療法剤の発展にともなって減少の方向にある。しかし、今日でもなお全世界で三千万人の人々がこの抗酸菌に感染しているものと推定されており、特に発展途上国においては毎年二百万以上の新たな感染者が発生しているといわれている⁶⁾。わが国においては結核予防法に基づく予防・治療の一貫した方策がとられ、ウシ型結核菌 BCG 株 (*M. bovis* Bacillus Calmette-Guerin) 培養濾液から調製された糖タンパク質を主たる抗原とする予防接種が実施されているが、この抗原は免疫化学的な特異性にとぼしく、その有効性について制限の付与される場合もあった。したがって、この抗原の生化学的、免疫化学的な解析は至急の研究課題とはされながらも、*M. bovis* が遅育菌であることや抗酸菌の取り扱いが繁雑であることなどのために有効な研究方法が確立されておらず、その開発のまたれる状況であった。

一般的に、このような抗原タンパク質の解析のためには、それをコードする遺伝子 (デオキシリボ核酸, DNA) のクローニングと、クローニングした遺伝子を生化学的に解析の容易な一般細菌細胞で発現させる、いわゆる遺伝子組み換え技術がきわめて有効なアプローチと考えられている。しかし抗酸菌は他の細菌とは異って、その細胞表面に多量の脂質を含有するため⁷⁻¹⁰⁾ 温和な条件下に細胞を破碎して遺伝子組み換えに使用しうる分子サイズの DNA を抽出することが困難であり、したがって従来の組み換え技術をそのまま抗酸菌に適用することはできないとされてきた。われわれは抗酸菌をシクロセリン存在下で培養するとこの細菌が細胞壁溶解酵素リゾチームに対して感受性となり、その結果一般細菌と同様きわめて温和な条件下に細菌から DNA を抽出しうることを見出した。さらに、こうして得た抗酸菌 DNA を発現ベクターファージ lambda gtl11 によって大腸菌 DNA に組み換えたところ、抗酸菌抗原タンパク質をコードしていると推定される遺伝子を検出することができ、その遺伝子構造について若干の知見を得たのでそれらの結果を以下に報告する。

2. 実験材料および方法

使用菌株の培養と DNA の抽出

ITR Biochemical Research (米国シカゴ市) より譲与された *M. tuberculosis* BCG 361 株を Davis らの方法¹¹⁾ に従って PTO 培地、および Sauton 培地で培養した。菌の生育が対数増殖期前期に達した時、あらかじめ濾過滅菌した D-シクロセリンを最終濃度 1 mg/ml となるように培地に添加し、さらに 7 日間培養を続けた。培養後、遠心分離によって集菌した菌体を 50mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) / 50mM トリスー塩酸緩衝液 (pH8.0) からなる溶菌緩衝液に懸濁し、こ

ヒト型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* 遺伝子のクローニングと組み換え遺伝子の大腸菌における発現

れに最終濃度 1 mg/ml となるように卵白リゾチームを加え 37°C で 90 分間溶菌反応をおこなった。反応後、溶菌液に最終濃度 1 M となるように塩化ナトリウム水溶液を加え、次いで等容のクロロホルム—フェノール混液 (1 : 1, v/v) を加えて室温で 15 分間攪拌した。3,000×g にて 30 分間遠心分離を行って水層を分取した後、これに等容のクロロホルム—イソアミルアルコール混液 (24 : 1, v/v) を加えて 15 分間攪拌した。3,000×g にて 15 分間冷却遠心分離を行って水層を分取し、これに 2.5 倍容の冷エチルアルコールを加えて粗 DNA を析出させた。こうして得た粗 DNA を 0.4 塩化ナトリウム水溶液に懸濁し、1.5% (w/v) セチルトリメチルアンモニウムブロマイド処理による多糖類の除去を行った後、0.5 μg のウシすい臓由来 RNA 分解酵素 (RNase A) によって残存するリボ核酸を除き、再度クロロホルム—フェノール処理、冷エチルアルコール沈澱をおこなって精製 DNA を得た。

DNA ライブラリーの作成

精製 DNA を 0.1 M 塩化ナトリウム / 0.1 μM EDTA / 20 μM トリス—塩酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、25 ゲージの皮下針を通過させて平均 5,000 塩基対 (5 kb) の長さに切断した。切断の程度は水平型アガロースゲル電気泳動によってモニターした。次いで DNA 溶液に 50 μl の *Eco* RI メチラーゼ緩衝液 (1 μM EDTA / 50 μM トリス—塩酸緩衝液, pH 7.5) と 5 μl の 10 μM S-アデノシル-L-メチオニン、および過剰量の *Eco* RI メチラーゼを加えて DNA の *Eco* RI 切断をメチル化した後、T₄ DNA ポリメラーによって DNA 末端をプラント化した。この DNA 溶液に等容の冷エチルアルコールを加えて DNA を沈澱回収した後、これを 10 μM 塩化マグネシウム / 10 μM DTT / 50 mM トリス—塩酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解して T₄ DNA リガーゼによる *Eco* RI リンカー (8 量体) の接続をおこなった。以上のごとく処理した DNA フラグメントをエチジウムブロマイドをふくむアガロースゲルによって電気泳動的にサイズ別に分離し 1-10 キロ塩基対のフラグメントを Bio-Rad 社製の Bio-Trap 装置を用いて回収した。この DNA フラグメントを 0.01 μM EDTA / 10 μM トリス—塩酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解した後、定法に従ってファージ lambda gtl1 (Giga-Pack 社由来株) に *in vitro* でパッケージし、次いで大腸菌 Y-1088 株を宿主として増幅した¹²⁾。

ライブラリーのスクリーニング

ライブラリーのスクリーニングでは *M. tuberculosis* 菌体抽出液を抗原として家兎により作成した抗血清 (ガンマグロブリン画分) を用いて Young と Davis の方法に従っておこなった^{13,14)}。すなわち、0.2% (w/v) マルトース添加培地 (LB) で培養して細胞表面のファージ受容体を誘導した大腸菌 Y-1090 株懸濁液 0.2 ml を約 5×10^4 pfu (プラーク・フォーミング・ユニット) のファージ粒子と混合した。次いでこれを 37°C で 15 分間温置して細菌細胞表面にファージ粒子を吸着させた後、2.5 ml の LB ソフトアガーと混和してプレート上に分散した。プレートには、あらかじめ LB ハードアガーを入れて固化させておいた。プレートを 42°C にて約 4 時間培養したと

ころブランクの形成が認められたので、あらかじめイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) で飽和させておいたニトロセルロースフィルターをプレート表面に重層し、プレートを37°Cに移してさらに3時間培養を続けた。フィルターを取り出してTES緩衝液 (0.1M 塩化ナトリウム/0.01mM EDTA/50mM トリス—塩酸緩衝液, pH 8.0) で洗浄した後, 5% (w/v) の牛血清アルブミン (BSA) をふくむTES緩衝液 (B-TES) に30分間浸してブロックをおこない, 次いでフィルターをTES緩衝液で 10^3 倍に希釈した抗血清をふくむB-TESに移して室温で1時間抗原—抗体反応をおこなわせた。反応後フィルターを, TES緩衝液, および0.05% (w/v) Tween80をふくむTES緩衝液で洗浄し, さらに放射性ヨード標識プロテイン A (NEN 社, ^{125}I -Protein A, 比活性 25Ci/g) をふくむB-TESに移して抗原—抗体複合物の標識をおこなった。フィルターをTES緩衝液, およびTween80をふくむTES緩衝液で洗浄後, 風乾させて医療用レントゲンフィルム (コダック社, RX-グレード) によるオートラジオグラフィーをおこなった¹⁵⁾。

3. 結果と考察

M. tuberculosis DNA のlambda gt 11への組み換えとライブラリー作成の概略を図1に示した。シクロセリン存在下で培養してリゾチーム感受性とした *M. tuberculosis* より分離, 精製したDNAの260 μm および280 μm における吸光度比は1.83であり, この結果から精製標品にRNAの夾雑はないものと推定されたので (図2), これを機械的に切断して得られた1-10キロ塩基対のDNA断片に *Eco* RI リンカーを接続し lambda gt11 の *Eco* RI サイトに組み込んだ。その後, 定法

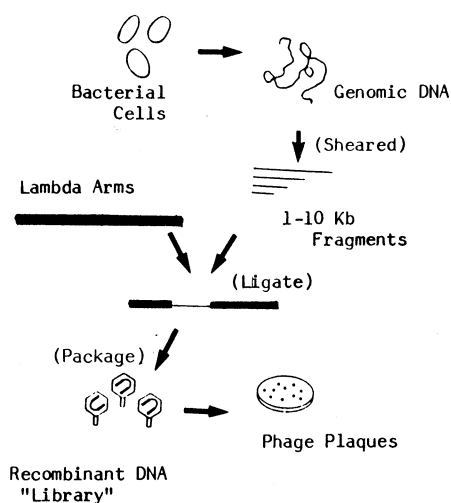


Fig. 1 Strategy of construct a comprehensive recombinant DNA expression library.

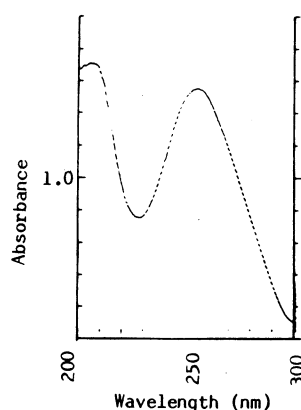


Fig. 2 Absorption spectrum of the purified DNA preparation scanned with a Beckman UV/VIS computing scanner Model DU-8.

に従って、*in vitro* パッケージを行ってファージ粒子とし、これを大腸菌に感染させライブラリーを作成した。lambda gt11 は、その粒子内にイニシエータ（転写開始領域）をふくむ大腸菌の β -ガラクトシダーゼ遺伝子（*lac Z*）を有するので、外来遺伝子がこの酵素遺伝子に融合遺伝子として組み込まれると大腸菌のタンパク質合成装置による外来遺伝子からのタンパク質合成がおこなわれる。すなわちファージ粒子内に組み換えられた外来遺伝子がコードするタンパク質は β -ガラクトシダーゼとの融合タンパク質として大腸菌細胞内で合成されるので、この酵素活性を指標として組み換えの可否を容易にスクリーニングすることができる。この方法によってわれわれは 3×10^4 pfu の一次ファージ粒子を得、さらに大腸菌 Y-1088 株を宿主として 1 ml 当り 10^{11} pfu にまで増幅した。これら増幅二次ファージ粒子について 5-クロモ-4-クロロ-3-インドイル- β -ガラクトシド（X-gal）を基質とする β -ガラクトシダーゼ活性による組み換え率の測定をおこなったところ、その約 66% が *M. tuberculosis* DNA を組み込んでいることが明らかとなった。次いで、*M. tuberculosis* 抽出液を抗原として作成した抗血清をプローブとし、これら組み換え体のスクリーニングを行ったところ 4 個のプラークに陽性シグナルが認められた。その一例を図 3 に示した。図 3 においては強く検出された陽性シグナルと微弱な陽性シグナルとを示してあり、これらはそれぞれ検出される陽性シグナルの上限と下限とを示すものである。シグナルの強

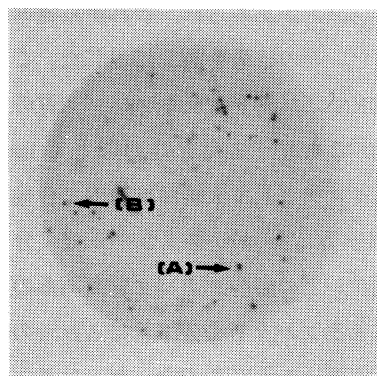


Fig. 3 Arrays of antigens from mycobacterial DNA clones probed with rabbit hyper-immune serum. The arrow (A) and (B) were typical examples of a strong signal and a weak one, respectively.

弱は合成されたタンパク質の大きさ（すなわち、組み換えられた遺伝子の大きさ、あるいは転写・翻訳の効率）、そのタンパク質のもつ抗原決定基の数などによって生じるものと考えられる。これらの結果は、4 種の *M. tuberculosis* DNA が lambda gt11 の β ガラクトシダーゼ遺伝子下流に正当な方向性で組み換えられ、また組み換えられた DNA は大腸菌タンパク質合成装置による読み取りが可能な塩基配列を有していること、したがってその結果、プローブである抗血清と免疫化学的に反応する抗原タンパク質が合成されたことを示すものである。

次いで二次および三次スクリーニングをおこなって、これら 4 種のファージをそれぞれ単一に精製することを試み、最終的に 1 種の精製

ファージ粒子を得た。このファージ粒子を大腸菌 Y-1088 株で増幅した後、定法に従ってファージ DNA を抽出し¹⁶⁾、これを制限酵素 *Sac* I、あるいは *Kpm* II、または両者の混合酵素液で切断した。その切断パターンを水平型アガロースゲル電気泳動によって検討した結果を図 4 に示した。

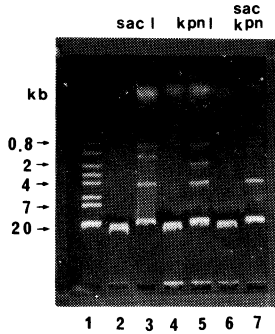


Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of DNA from gtl1: *M. tuberculosis* recombinant molecules before (lanes 2, 4, and 6) and after (lanes 3, 5, and 7) digestion with restriction enzymes indicated. Bacteriophage lambda DNA digested with Sty I was used as size marker (lane 1). The sizes of fragments were given, in Kb, to the left of the gel.

約 10^4 に相当する泳動位置に抗血清と反応するタンパク質バンドが認められ、これから組み換え DNA にコードされているタンパク質の分子量が推定された。その結果を図5に示した。ここでアミノ酸の平均分子量を150とすると、2キロ塩基対の DNA にコードされるタンパク質の分子

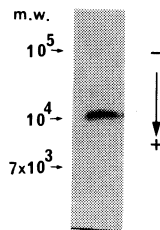


Fig. 5 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting analysis of hybrid protein accumulated. Lysate were loaded on polyacrylamide, subjected to electrophoresis, and blotted on a nitrocellulose filter. The filter was incubated with anti-serum followed by incubation with 125 I-protein-A, and processed for autoradiography.

対照として lambda DNA (全長48.6キロ塩基対) の制限酵素 *Sty* I 消化物を使用した。図4に示されるごとく、ファージ粒子は約2キロ塩基対の *M. tuberculosis* DNA を組み込んでいた。この精製ファージをタンパク質分解酵素欠損変異株 (*lon*⁻) である大腸菌 Y-1089株に感染させ、37°C で3時間培養してタンパク質合成を誘起した。次いで培養温度を42°C にシフトして、ファージ・サイクルを溶原サイクルから溶菌サイクルへ変換しファージ溶菌能の誘導によって大腸菌を溶菌させ、組み換え DNA にコードされているタンパク質をふくむ大腸菌抽出液を得た。この抽出液を定法に従ってポリアクリルアミドゲル電気泳動した後¹⁷⁾、ウエスタン・ブロッティング法によって組み換え DNA 由来のタンパク質を解析した¹⁸⁾。その結果、分子量

量は約 10^5 であり、また上述のごとく lambda gtl1 をベクターとして大腸菌細胞内で合成されるタンパク質は β -ガラクトシダーゼ (分子量約 1.8×10^6) との融合タンパク質であるので、検出されるタンパク質の分子量はこれらの総計と考えられる。しかしながら、ウエスタン・ブロッティングにおいてタンパク質バンドが分子量約 10^4 に認められたことは、組み換えられた2キロ塩基対の *M. tuberculosis* DNA のうちのわずかに数百塩基対のみが大腸菌細胞内で転写・翻訳されたにすぎないことを示すものであり、このことから、組み換えられた *M. tuberculosis* DNA 鎖には *M. tuberculosis* にとってはアミノ酸をコードする塩基配列であるが、大腸菌に

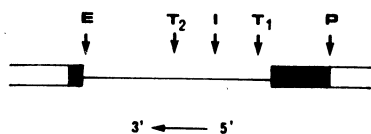


Fig. 6 Molecular map of galactosidase: *M. tuberculosis* recombinant region. ■, β -galactosidase structural gene; —, *M. tuberculosis* DNA inserted; T₁, T₂, base sequences recognized as the termination codon by *E. coli*; I, base sequences recognized as the initiation codon by *E. coli*; E, *Eco* RI cleaving site. The orientation of transcription was indicated by 5' and 3' ends.

よってイニシエーター（開始領域）あるいはターミネーター（終結領域）として認識される配列の存在することが推定された。すなわち、図6に示したごとく、組み換えDNA鎖において、まず、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子プロモーターに依存したタンパク質合成が開始され、これは *M. tuberculosis* 由来DNA鎖上に存在すると推定される“大腸菌にとっての終結配列 T₁”によって終了する。ウエスタン・ブロッティングによってこのタンパク質が検

出されないことから、T₁は β -ガラクトシダーゼ遺伝子の下流に位置し、しかもこの酵素遺伝子のきわめて近傍に存在していることが示唆された。その後、開始領域Iからの第二のタンパク質合成がはじまり、終結領域T₂まで継続すると考えられる。IおよびT₂の β -ガラクトシダーゼ遺伝子下流における配位順は図6に示された通りであり、また前述のウエスタン・ブロッティングの結果からこれらふたつの遺伝子領域間の距離は、分子量 10^4 のタンパク質をコードする塩基数であることが推定される。

微生物界における一般的な“タンパク合成開始塩基配列”あるいは“終結配列”以外の固有の配列によって、抗酸菌がタンパク質合成の調節をおこなっていることは遺伝子工学的にきわめて興味深く、さらに、この固有の塩基配列の詳細な解析は、抗酸菌タンパク質抗原の生化学的、免疫化学的研究と抗原の生物工学的生産に有意な情報を提供するものと考えられる。

参考文献

- 1) Ratledge, C. and Stantord, J.: The Biology of the Mycobacteria p. 471 (Academic Press 1982)
- 2) Sela, S.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 136, 1136 (1986)
- 3) Patel, R.: J. Gen. Microbiol. 132, 1136 (1986)
- 4) Koch, R.: Dtsch. Med. Wochenschr. 17, 101 (1881)
- 5) Koch, R.: Berl. Klin. Wochenschr. 5, 765 (1881)
- 6) Bloom, B. R. and Godal, T.: Rev. Infect. Disease 5, 765 (1983)
- 7) Kikuchi, S. and Kusaka, T.: J. Biochemistry 92, 839 (1982)
- 8) Kikuchi, S. and Kusaka, T.: J. Biochemistry 94, 1045 (1983)
- 9) Kikuchi, S. and Kusaka, T.: J. Biochemistry 96, 841 (1984)
- 10) Kikuchi, S. and Kusaka, T.: J. Biochemistry 99, 723 (1986)
- 11) Davis, J. B. and Kollattukudy, P. E.: J. Biol. Chem. 260, 9695 (1984)
- 12) Glover, D. M.: DNA Cloning p. 49 (IRL Press 1985)

- 13) Young, R. A., Mehra, V., Sweeter, D., Buchanan, T., Clark-Curtiss, J. Davis, R. W. and Bloom, B. R.: *Nature* (London) 316, 450 (1985)
- 14) Young, R. A., Bloom, B. R. and Davis, R. W.: *Pro. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 2583 (1985)
- 15) Kikuchi, S.: *Kawasaki Medical Journal* 13, 99 (1987)
- 16) Beuson, S. A. and Taylar, R. K.: *Bio Techniques* 18, 127 (1984)
- 17) Burnett, W. N.: *Anal. Biochemistry* 112, 195 (1981)
- 19) Gershoni, J. M. and Palade, G. E.: *Anal. Biochemistry* 131, 1 (1983)

本研究の一部は、1985年アメリカ生物化学会（於、ボストン）において発表したものである。