

BCG における c-di-GMP の菌体内過剰合成の増殖への影響
に関する研究

妹尾 昌紀

Study on the influence of the overproduction of
cyclic-di-GMP to the growth of BCG

Masaki Seno

(平成 27 年 12 月 14 日受付)

緒言

抗酸菌のひとつであるヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) が引き起こす結核症は世界の三大感染症のひとつであり、世界保健機関 (World Health Organization) の 2014 年の報告では、全世界で約 30 億人が結核菌に感染し、その中から年間約 960 万人が結核症を発症し、約 150 万人が死亡している (1)。中でも発展途上国での結核症の増加が問題となっている (2)。わが国では、戦後に公衆衛生の向上や医療技術の革新により結核症は急速に減少したが、近年は免疫力の低下を伴う高齢者の増加、抗結核薬に抵抗性を示す多剤耐性結核症、超多剤耐性結核症の増加に伴い、結核症は再び増加した。1999 年には厚生省 (当時) から「結核非常事態宣言」が出され、再興感染症として今なお大きな問題となっている (3)。このように結核症は世界の人々だけでなく、わが国の国民の健康にも大きな影響を及ぼしている。

結核菌に感染すると、約 1 割はすぐに結核症を発症する 1 次結核症となり、大多数である約 9 割は保菌者となる。この保菌者のうちのほとんどは一生発症することはないが、その一部が免疫力の低下などに伴い再燃し、2 次結核症を発症する (4-6)。この持続感染状態のときに結核菌は活動をほとんど停止した休眠状態にあると推測されている。従来から行われている発症後の治療に加え、発病するリスクが高い者に対する潜在性結核症 (latent tuberculosis infection) の治療を行うことの有用性は確立しており、わが国においても結核の根絶を目指すために重要な戦略になると考えられている (7)。しかし持続感染時に結核菌は休眠状態にあると推測されているもののその確証は無く、また休眠に至るまで、そして休眠状態から覚醒する過程には未だ不明な点が多い。これらのことを明らかにすることは、潜在性結核症の治療法を確立する上で重要である。

最近になり細菌のセカンドメッセンジャーのひとつ cyclic diguanylate monophosphate (c-di-GMP) が、結核菌の持続感染時における生理、また休眠状態からの覚醒に関与していることが報告された (8)。

c-di-GMP は多くの菌が産生し、また利用している。菌種によってその作用は異なるが、これまでにバイオフィルムの形成 (9-11)、菌体外基質の産生 (12)、病原性因子の発現調節 (13)、細胞増殖の調節 (14)、細胞周期の調節 (15) 菌体表層の付着性への関与 (16) 等、多様な機能が報告されている。また、ヒトをはじめ真核生物は c-di-GMP を産生しないが、感染した細菌から産生された c-di-GMP が、ヒトやマウスの細胞に存在するレクチン受容体のひとつ stimulator of interferon gene (STING) と結合することで、細胞内のシグナル伝達を活性化させ、自然免疫系とそれに引き続く獲得免疫系を賦活することが報告されている (17-19)。

c-di-GMP は2分子の GTP から diguanylate cyclase (*dgc*) 活性を有する GGDEF ドメインによって合成される。そして c-di-GMP は phosphodiesterase (*pde*) 活性を有する EAL ドメインによって合成される (20)。これらのドメインをコードする遺伝子の数は菌種により大きく異なり (21)、例えば大腸菌 *Escherichia coli* K-12 株のゲノム上には GGDEF ドメインをコードする遺伝子 12 個、EAL ドメインをコードする遺伝子 10 個、そして GGDEF ドメインと EAL ドメインの両方をコードする遺伝子 7 個が存在する。またコレラ菌 O1 エルトール型 N16961 株 *Vibrio cholera* O1 biovar *El Tor* str. *N16961* のゲノム上には GGDEF ドメインをコードする遺伝子 31 個、EAL ドメインをコードする遺伝子 12 個、GGDEF ドメインと EAL ドメインの両方をコードする遺伝子 10 個、そして HD-GYP ドメインをコードする遺伝子 9 個が存在する。一方でインフルエンザ菌 *Haemophilus influenzae*, ピロリ菌 *Helicobacter pylori*, そして

肺炎球菌 *Streptococcus pneumoniae* などではそれらのゲノム上にこれらのドメインをコードする遺伝子が1つも存在しない。結核菌を含む結核菌群のゲノム上では EAL ドメインをコードする遺伝子が1個と GGDEF ドメインと EAL ドメインの両方をコードする遺伝子1個が存在する。そして GGDEF ドメインのみをコードする遺伝子と HD-GYP ドメインをコードする遺伝子は存在しない。結核症のワクチンとして本邦で使用されているウシ型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) 弱毒株 bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo 株では, JTY1390 は GGDEF ドメインと EAL ドメインの両方をコードし, JTY1393 は EAL ドメインのみをコードする。そのため, c-di-GMP の合成には JTY1390 が関与し, 加水分解には JTY1390 と JTY1393 の両者が関与すると考えられている (22)。

上述のように c-di-GMP が結核菌の休眠化や活性化に関与することを示唆する報告があるため, 本研究では BCG Tokyo 株の JTY1390 をクローニングし, その全長あるいは部分タンパク質を発現するプラスミドの構築を行い, さらにそれらを過剰発現する BCG を作製した。そして作製した組換え菌を用いて c-di-GMP の産生量が BCG の増殖に及ぼす影響を検討した。

材料ならびに方法

1. 使用菌株と培養条件

BCG Tokyo 株と変異株の培養には、アルブミン・デキストロース・カタラーゼ (Albumin-Dextrose-Catalase : ADC), および 0.05 % Tween80 添加 Middlebrook 7H9 液体培地 (Difco Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA) (7H9-ADC-Tween80 液体培地), ADC 添加 Middlebrook 7H10 寒天平板培地 (Difco) (7H10-ADC 寒天培地) を使用した。なお, 必要に応じて培地にはカナマイシン (Kanamycin: KM, 終濃度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) とアセトアミド (acetamide, 終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ または 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した。

大腸菌 DH5 α 株の培養には Luria-Bertani 培地 (Difco) を用い, 必要に応じて KM (終濃度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), またはカルベニシリン (Carbenicillin : Car, 終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した。

2. 遺伝子操作

特別な記載がない限り遺伝子操作は, 分子生物学実験で使用されている通法に従った。

3. JTY1390 のクローニング

BCG のゲノム DNA をフェノールクロロホルム法により抽出した。抽出したゲノムを鋳型とし, PrimeSTAR GXL™ (タカラバイオ, 滋賀) およびオリゴヌクレオチドプライマーセット JTY1390-1 (5'-CATATGTGCAACGACACCGCGACGCCGCAG-3') - JTY1390-2 (5'-CCTGCAGGGCGTCGGATTCGATACCACGTC-3') と JTY1390-1 -

JTY1390-3 (5'-CCTGCAGGTCAAGATAACGCCGGGTCAGTT-3') を使用して、JTY1390 全長 (F) 及び GAF ドメインと GGDEF ドメイン (T) をコードする領域を PCR 法にて増幅した。PCR 産物を High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて精製した。

4. c-di-GMP 発現プラスミドの構築

JTY1390 の全長遺伝子と部分遺伝子の PCR 産物を pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にクローニングし、pCR-F と pCR-T を構築した。pCR-F と pCR-T を NdeI と PstI で消化し、*Mycobacterium kansasii* アルファ抗原遺伝子プロモーターを付与するために pNPP (23) にサブクローニングし、pNPP-F と pNPP-T を構築した。そして pNPP-F と pNPP-T を XbaI で消化することにより得られた DNA 断片を pNN2 (24) にサブクローニングすることにより、抗酸菌発現ベクター pNN-F と pNN-T を構築した。

5. 誘導型発現プラスミドの構築

Mycobacterium smegmatis mc²155 のゲノム DNA を鋳型として PrimeSTAR GXL™ (タカラバイオ) およびプライマー acetamide1 (5'-GGATCCCGAGTACGGCGCCCTGCTGAC-3') と acetamide2 (5'-GCATATGGACTCCCTTTCTCTTATCGGGTG-3') を使用してアセトアミダーゼ遺伝子 (MSMEG_5358) 上流に存在する発現調節領域 (25) を PCR 法にて増幅した。増幅された PCR 産物を pCR-BluntII-TOPO にクローニングし、pCR-ACE を構築した。pCR-ACE を BamHI と NdeI で消化し、BamHI と NdeI で消化した pNPP-F と pNPP-T に挿入することにより pNPP-AF と pNPP-AT を構築した。pNPP-AF と pNPP-AT のプラスミドに由来する SmaI サイトにリ

ン酸化した SpeI リンカーを挿入後 SpeI-XbaI で消化し、得られた DNA 断片を pNN2 にサブクローニングすることによって、pNN-AF および pNN-AT を構築した。

6. BCG Tokyo 株へのプラスミド DNA の導入

プラスミド pNN2, pNN-F, pNN-T, pNN-AF, および pNN-AT を ECM399 (BTX, Holliston, MA, USA) を用いて電気穿孔法により BCG Tokyo 株へ導入した (26)。プラスミド導入後 KM20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加 7H10-ADC 寒天培地に播種し、37°C で 21 日間培養した。BCG がプラスミドを保持していることを PCR 法により確認した。pNN-AF あるいは pNN-AT を保持した BCG をそれぞれ BCG/pNN-AF と BCG/pNN-AT とした。

7. 7H10-ADC 寒天培地上における BCG 遺伝子導入株の増殖

各 BCG 変異株を KM 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加 7H9-ADC-Tween80 液体培地で 24 時間培養した。各株の菌液を波長 590nm における吸光度 (OD, 光学濃度) 1.0 (OD₅₉₀=1.0) に調整した。段階希釈後、各希釈段階の菌液 3 μL をアセトアミド非添加、およびアセトアミド 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、あるいは 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加 7H10-ADC 寒天培地に播種し、37°C で 21 日間培養した。対照に pNN2 を保持した BCG Tokyo 株 (BCG/pNN2) を用いた。

8. 7H9-ADC-Tween80 液体培地における BCG 遺伝子導入株の増殖

各 BCG 変異株を KM 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加 7H9-ADC -Tween80 液体培地で 24 時間前培養し、各株の菌液を OD₅₉₀=0.1 に調整した。調整後の菌液を振盪培養し、24 時間後に 2 群に分け、一方にアセトアミドを終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように

添加し、他方は無添加とした。さらに振盪培養を行なった。対照として BCG/pNN2 を用いた。なお、濁度は 24 時間毎に測定した。使用した分光光度計 CO7500B Colorwave (BiochromWPA, Cambridge, UK) の測定限界は $OD_{590}=2.0$ であった。

9. 全 RNA の抽出と精製のための液体培地における各 BCG 変異株の培養

各 BCG 変異株を KM 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加 7H9-ADC-Tween80 液体培地で 24 時間前培養した。前培養後、各株の菌液を $OD_{590}=1.0$ に調整した。調整した菌液を 37°C で 24 時間振盪培養後、2 群に分けた。一方にアセトアミドを終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加し、他方は無添加とした。両群をさらに 24 時間培養した後、10,000 回転 2 分間の遠心分離を行なうことにより菌体を回収し、全 RNA の抽出に供した。

10. 全 RNA 調整のための各 BCG 変異株の培養

各 BCG 変異株を KM 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加 7H9-ADC-Tween80 液体培地で 24 時間前培養した。前培養後、各株の菌液を $OD_{590}=1.0$ に調整し、アセトアミド 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加した、あるいは無添加の 7H10-ADC 寒天培地に播種し 24 時間培養した。

11. 全 RNA の精製と cDNA への逆転写

全 RNA の抽出と精製には TRIzol® Plus RNA Purification Kit (Invitrogen) を用い、添付のマニュアルに従って行った。混入した DNA は DNaseI (タカラバイオ) を用いて消化した。精製した全 RNA を鋳型とした cDNA の合成には Prime ScriptII 1st Strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) を用いた。

合成した cDNA は鋳型としてプライマー JTY1390-1 と JTY1393-2 を用いた RT-PCR に供した。

1 2. 統計処理

各菌におけるアセトアミドの添加，非添加により得られた結果の統計解析には，Tukey's test を用いた。

結果

1. 遺伝子クローニングとプラスミド構築

図 1 に今回クローニングした JTY1390 とクローニング部位を示す。BCG のゲノム DNA を鋳型としてプライマーセット JTY1390-1 - JTY1390-2 あるいは JTY1390-1 - JTY1390-3 を用いて PCR を行い, JTY1390 全長 1872 bp (F) と JTY1390 の中で GAF-GGDEF domain をコードする 1106 bp の部分遺伝子(T) を得た。F, T を pCR-BluntII-TOPO にクローニング後, 「材料ならびに方法, 4. c-di-GMP 発現プラスミドの構築と 5. 誘導型発現プラスミドの構築」に示した方法に従い, pNN-F, pNN-T, pNN-AF, および pNN-AT を構築した。

2. BCG 変異株の作製

プラスミド pNN2, pNN-F, pNN-T, pNN-AF, および pNN-AT を BCG Tokyo 株に電気穿孔法により導入し KM 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加 7H10-ADC 寒天培地に播種した (図 2)。21 日後, pNN-F と pNN-T を導入した BCG を播種した寒天培地上には集落が認められなかった。一方で pNN2, pNN-AF, pNN-AT を導入した BCG を播種した寒天培地上には集落が形成された。これらの集落にプラスミドが保持されていることはプラスミドの塩基配列をもとに設計したプライマーを用いた PCR によって確認した (データは示さない)。pNN2, pNN-AF, および pNN-AT を保持した BCG をそれぞれ BCG/pNN2, BCG/pNN-AF, および BCG/pNN-AT とした。

3. 7H9-ADC-Tween80 液体培地中における BCG 遺伝子導入株の増殖

菌体内で合成される c-di-GMP の量が BCG の液体培地における増殖に与え

る影響を評価するため、BCG/pNN2, BCG/pNN-AF, および BCG/pNN-AT をアセトアミド非添加およびアセトアミド 5 μ g/mL あるいは 10 μ g/mL 添加 7H9-ADC-Tween80 液体培地で培養した。図 3A に示すように BCG/pNN2, BCG/pNN-AF, および BCG/pNN-AT とともにいずれの培地においても時間の経過とともに濁度の上昇がみられた。また, いずれの株もアセトアミドの存在により濁度が下降したが, BCG/pNN2, BCG/pNN-AF とともに濁度が有意に下降したのに対し, BCG/pNN-AT のみ濁度の下降に有意差を認めなかった。なお, RT-PCR の結果, アセトアミド非存在下ではいずれの株も JTY1390 の転写産物は認められず, アセトアミド存在下においては BCG/pNN2 は JTY1390 の転写産物は認められなかったのに対して, BCG/pNN-AF と BCG/pNN-AT では JTY1390 の転写産物が認められた (図 3B)。

4. 7H10-ADC 寒天培地における BCG 遺伝子導入株の増殖

菌体内で合成される c-di-GMP の量が BCG の寒天培地上における増殖に与える影響を評価するため, BCG/pNN2, BCG/pNN-AF, および BCG/pNN-AT をアセトアミド添加 7H10-ADC 寒天培地と非添加 7H10-ADC 寒天培地で培養した。図 4A に示すように, BCG/pNN2 と BCG/pNN-AF ではアセトアミドの存在により集落の大きさが減少した。しかし BCG/pNN-AT ではアセトアミドが存在しない場合でも他の菌に比べ集落は顕著に大きく, アセトアミド存在下では集落がさらに大きくなる傾向が認められた。RT-PCR の結果, 7H10-ADC 寒天培地上ではいずれの株も JTY1390 の転写産物が認められ, アセトアミド存在下では BCG/pNN-AF と BCG/pNN-AT で JTY1390 の転写産物量の増加が認められた (図 4B)。

考察

c-di-GMP は様々な細菌が産生・利用しているセカンドメッセンジャーとして知られており、これまでに種々の菌における c-di-GMP の作用が報告されている。c-di-GMP の合成と分解を行なうドメインを有する分子の種類数は菌種によって大きく異なるが (21)、結核菌群では EAL ドメインをコードする遺伝子が 1 種類と GGDEF ドメインと EAL ドメインの両方をコードする遺伝子が 1 種類存在するのみである。このため、c-di-GMP の解析を行いやすいと考えられるが、抗酸菌の研究においてバイオフィルムの概念が無かったためか、c-di-GMP に関する研究は他の菌よりも逆に遅れていた。抗酸菌では Chatterji のグループが *M. smegmatis* において c-di-GMP が栄養飢餓状態における長期生存に関与していることを報告したのが最初である (27)。最近になり、*M. smegmatis* において c-di-GMP は菌体の長さや集落形態にも関与することが報告されている (28)。BCG Pasteur 株においては c-di-GMP の分解を行なうホスホジエステラーゼ活性を有する 2 つのタンパク質の遺伝子を破壊すると、集落の形態やペリクルの産生性、ニトロ化合物に対するストレス応答、細胞壁の合成に関与するフェノールグリコリピドやフェノプチオセロールジミコセロセートの産生量が変わることが報告されている (29)。興味深いことに同じ報告において、この遺伝子破壊株をマウスに接種した場合、肺および脾臓における生存率が親株よりも高かったことが示されている。さらに結核菌では JTY1390 に相当する GGDEF ドメインと EAL ドメインの両方をコードする Rv1354c *dgc* を破壊すると休眠様状態における生存率が上昇するが、JTY1393 に相当する EAL ドメインをコードする Rv1357 *pde* を破壊すると休眠様状態における生存率が減少することが示されている (8)。さらに宿主細胞や宿主個体に感染後の菌数は *dgc* 破壊株では

親株よりも増加し、*pde*破壊株では親株よりも減少した。

今回の我々の実験において、図 2 に示されたように、*M. kansasii* アルファ抗原遺伝子プロモーターの支配下に、JTY1390 全体あるいは JTY1390 の中で *c-di-GMP* の合成を行なうドメインのみを恒常的に発現するように構築したプラスミドを BCG に電気穿孔法で導入した場合には集落を得ることができなかった。集落が存在しないため解析することが不可能であるが、電気穿孔法は菌体にとっては強いストレスであり、*c-di-GMP* 量の変化がその後の回復に影響したことも考えられる。

一方でアセトアミド誘導型の発現プラスミドの場合には導入した BCG の集落が形成された。図 3 に示すように液体培地においてはアセトアミドが存在しない場合には BCG/pNN-AF と BCG/pNN-AT とともに JTY1390 の発現が認められないため、電気穿孔法を行った後に行なう液体培地中での 24 時間の回復培養中に過剰の負荷がかからなかった可能性が考えられる。このことを検証するためにはさらなる解析が必要である。

液体培地中ではアセトアミドの有無にかかわらず BCG/pNN2, BCG/pNN-AF と比べ BCG/pNN-AT の増殖に有意に差を認めた。また、図 4 に示されるように寒天培地上ではアセトアミドの非存在下において BCG/pNN-AT の集落の大きさは他の 2 株よりも大きく、そして、アセトアミドの存在により BCG/pNN2 と BCG/pNN-AF では集落の大きさが減少したが、BCG/pNN-AT では逆に大きくなった。BCG/pNN-AF と BCG/pNN-AT ではアセトアミドによる誘導で JTY1390 の発現量が増加していたこと、BCG/pNN-AF ではなく BCG/pNN-AT のみでこの現象がみられた。以上より、*c-di-GMP* は BCG の休眠状態や宿主内での生存を負に制御していることが推測されるのに対し、好気においては BCG の増殖を正に制御していることが示唆された。

c-di-GMP はシグナル分子であるため、転写因子等のように増殖速度等に直接関与している分子とは考えにくい。抗酸菌における c-di-GMP によるシグナル伝達機構は徐々に解明されつつあるが (28, 30, 31), 大部分は未知の状態である。今後 c-di-GMP シグナルの下流分子を明らかにしていくことで、抗酸菌における c-di-GMP の役割を明らかにし、さらに病原性を有する抗酸菌の病原性の解明につながるものと考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり，懇篤なるご指導，ご高閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔微生物学分野，大原直也教授，そして主任教授であります岡山大学大学院医歯薬学総合研究科顎口腔再建外科学分野，飯田征二教授に謹んで感謝の意を表します。また，懇切なるご指導を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔微生物学分野，中山真彰助教に心より感謝いたします。最後に本研究を行うに当たり，貴重なご援助とご助言を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科顎口腔再建外科学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文献

1. World Health Organization. Fact sheet on tuberculosis.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Control
2014.http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
3. 厚生労働省. 平成 26 年結核登録者情報調査年報集計結果 (概況).
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou03/14.html>
4. Muñoz L, Stagg HR, Abubakar I. Diagnosis and management of latent
tuberculosis infection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5. pii: a017830.
Review.
5. Getahun H, Matteelli A, Chaisson RE, Raviglione M.
Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *N Engl J Med.*
2015;372:2127-2135. Review.
6. Dutta NK, Karakousis PC. Latent tuberculosis infection: myths, models,
and molecular mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014;78:343-371. Review.
7. 日本結核病学会予防委員会・治療委員会. 潜在性結核感染症治療方針. 結核.
2013;88:497-512.
8. Hong Y, Zhou X, Fang H, Yu D, Li C, Sun B. Cyclic di-GMP mediates
Mycobacterium tuberculosis dormancy and pathogenicity. *Tuberculosis*
(Edinb). 2013;93:625-634.
9. Cotter PA, Stibitz S. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and
biofilm formation. *Curr Opin Microbiol.* 2007;10:17-23. Review.
10. Römling U, Gomelsky M, Galperin, MY. c-di-GMP: the dawning of a novel
bacterial signalling system. *Mol Microbiol.* 2005;57:629-639. Review.

11. Sharma IM, Petchiappan A, Chatterji D. Quorum sensing and biofilm formation in mycobacteria: role of c-di-GMP and methods to study this second messenger. *IUBMB Life*. 2014;66:823-834. Review.
12. Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, Hyodo M, Hayakawa Y, Lory S. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol*. 2007;65:1474-1484.
13. Tischler AD, Camilli A. Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect Immun*. 2005;73:5873-5882.
14. Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Römling U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic-di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol*. 2004;53:1123-1134.
15. Paul R, Weiser S, Amiot NC, Chan C, Schirmer T, Giese B, Jenal U. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev*. 2004;18:715-727.
16. Aldridge P, Paul R, Goymer P, Rainey P, Jenal U. Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*. 2003;47:1695-1708.
17. Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, Hayakawa Y, Vance RE. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature*. 2011;478:515-518.
18. Ouyang S, Song X, Wang Y, Ru H, Shaw N, Jiang Y, Niu F, Zhu Y, Qiu W, Parvatiyar K, Li Y, Zhang R, Cheng G, Liu ZJ. Structural analysis of the STING adaptor protein reveals a hydrophobic dimer interface and mode of cyclic di-GMP binding. *Immunity*. 2012;36:1073-1086.

19. Yin Q, Tian Y, Kabaleeswaran V, Jiang X, Tu D, Eck MJ, Chen ZJ, Wu H. Cyclic di-GMP sensing via the innate immune signaling protein STING. *Mol Cell*. 2012;46:735-745.
20. Gomelsky M. The core pathway: diguanylatecyclases, cyclic di-GMP-specific phosphodiesterases, and cyclic di-GMP-binding proteins. *In* Wolfe A, Visick KL et al. The second messenger cyclic di-GMP. ASM Press, Washington, DC, 2010, pp.37-56.
21. Galperin MY. Ubiquity of cyclic di-GMP pathway: a bioinformatics analysis. *In* Wolfe A, Visick KL et al. The second messenger cyclic di-GMP. ASM Press, Washington, DC, 2010, pp.24-36.
22. Seki M, Honda I, Fujita I, Yano I, Yamamoto S, Koyama A. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine*. 2009;27:1710-1716.
23. Fujiwara N, Ohara N, Ogawa M, Maeda S, Naka T, Taniguchi H, Yamamoto S, Ayata M. Glycopeptidolipid of *Mycobacterium smegmatis* J15cs affects morphology and survival in host Cells. *PLoS One*. 2015;10:e0126813.
24. Ohara N, Nishiyama T, Ohara-Wada N, Matsumoto S, Matsuo T, Yamada T. Characterization of the transcriptional initiation regions of genes for the major secreted protein antigens 85C and MPB51 of *Mycobacterium bovis*BCG. *MicrobPathog*. 1997;23:303-310.
25. Parish T, Mahenthiralingam E, Draper P, Davis EO, Colston MJ. Regulation of the inducible acetamidase gene of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*. 1997;143:2267-2276.

26. Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Terasaka K, Totsuka M, Kobayashi K, Yukitake H, Yamada T. Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. *Infect Immun*. 1990;58:4049-4054.
27. Bharati BK, Sharma IM, Kasetty S, Kumar M, Mukherjee R, Chatterji D. A full-length bifunctional protein involved in c-di-GMP turnover is required for long-term survival under nutrient starvation in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*. 2012;158:1415-1427.
28. Gupta KR, Kasetty S, Chatterji D. Novel functions of (p)ppGpp and Cyclic di-GMP in mycobacterial physiology revealed by phenotype microarray analysis of wild-type and isogenic strains of *Mycobacterium smegmatis*. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81:2571-2578.
29. Flores-Valdez MA, Aceves-Sánchez Mde J, Pedroza-Roldán C, Vega-Domínguez PJ, Prado-Montes de Oca E, Bravo-Madrigal J, Laval F, Daffé M, Koestler B, Waters CM. The Cyclic Di-GMP Phosphodiesterase Gene Rv1357c/BCG1419c affects BCG pellicle production and in vivo maintenance. *IUBMB Life*. 2015;67:129-138.
30. Li W, He ZG. LtmA, a novel cyclic di-GMP-responsive activator, broadly regulates the expression of lipid transport and metabolism genes in *Mycobacterium smegmatis*. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:11292-11307.
31. Deng J, Bi L, Zhou L, Guo SJ, Fleming J, Jiang HW, Zhou Y, Gu J, Zhong Q, Wang ZX, Liu Z, Deng RP, Gao J, Chen T, Li W, Wang JF, Wang X, Li H, Ge F, Zhu G, Zhang HN, Gu J, Wu FL, Zhang Z, Wang D, Hang H, Li Y, Cheng L, He X, Tao SC, Zhang XE. *Mycobacterium tuberculosis* proteome microarray for global studies of protein function and immunogenicity. *Cell*

Rep. 2014;9:2317-2329.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 顎口腔再建外科学分野

(指導 飯田 征二教授)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔微生物学分野

(委託 大原 直也教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 64 回日本細菌学会中国・四国支部総会

(2015 年 10 月, 岡山)

第 57 回歯科基礎医学会

(2015 年 9 月, 新潟)

図の説明

図 1. BCG JTY1390 の模式図

A. BCG JTY1390 の模式図とクローニングした領域を模式図の下に示す。番号は遺伝子のオープンリーディングフレームの塩基番号を示す。B. PCR 産物のアガロースゲル電気泳動像を示す。

図 2. 7H10-ADC 寒天培地における BCG 遺伝子導入株の集落の形成

各プラスミドを BCG に電気穿孔法にて形質転換後、KM 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む 7H10-ADC 寒天培地に播種し、37°C で 3 週間培養した。導入したプラスミドの名前を記載した。

図 3 : 7H9-ADC-Tween80 液体培地中における BCG 遺伝子導入株の増殖

A. 各 BCG 遺伝子導入株を KM 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加 7H9-ADC-Tween80 液体培地で 24 時間前培養を行い、分光光度計 590nm における菌の濁度を OD0.1 に調整したのち培養を始めた。培養 24 時間経過時にアセトアミド非添加群、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加群に分け、さらに振盪培養を行った。B. 各株を 7H9-ADC-Tween80 液体培地で培養し、全 RNA を抽出したのち、JTY1390 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行なった。PCR 産物のアガロースゲル電気泳動像を示す。アセトアミドの終濃度は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

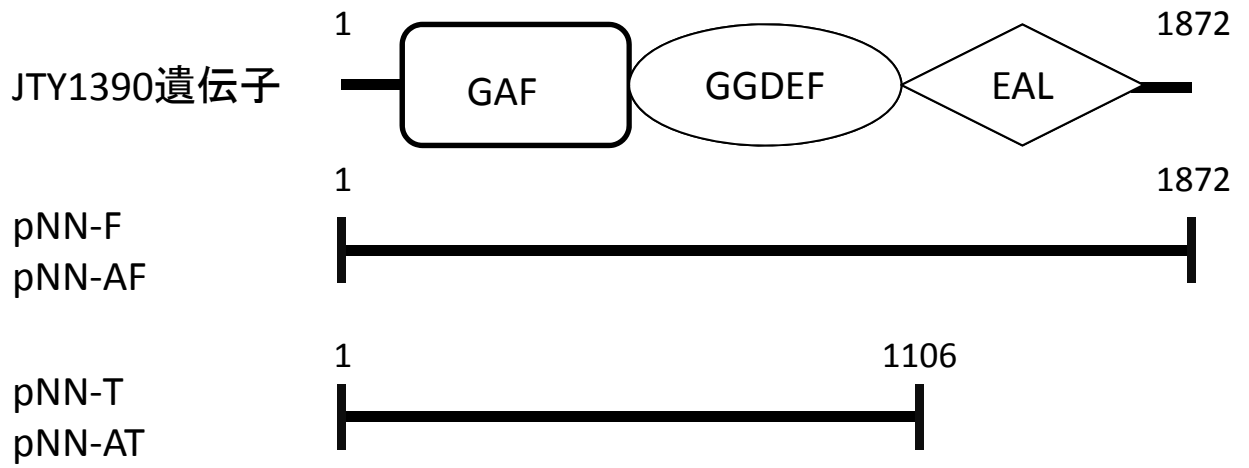
図 4 : 7H10-ADC 寒天培地における BCG 遺伝子導入株の集落形成

A. 各 BCG 遺伝子導入株を KM 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加 7H9-ADC-Tween80 液体培地で 24 時間前培養後、それぞれの濁度を OD₅₉₀ = 0.01, 0.1, および 1 に調整し、それぞれ 3 μL をアセトアミド非添加、アセトアミド 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加 7H10-ADC に播種し、37°C で 3 週間培養した。B. 各株を 7H9-ADC 寒天培地で培養し、全 RNA を抽出したのち、JTY1390 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行なった。PCR 産物のアガロースゲル電気泳動像を示す。アセトア

ミドの終濃度は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

図 1

A



B

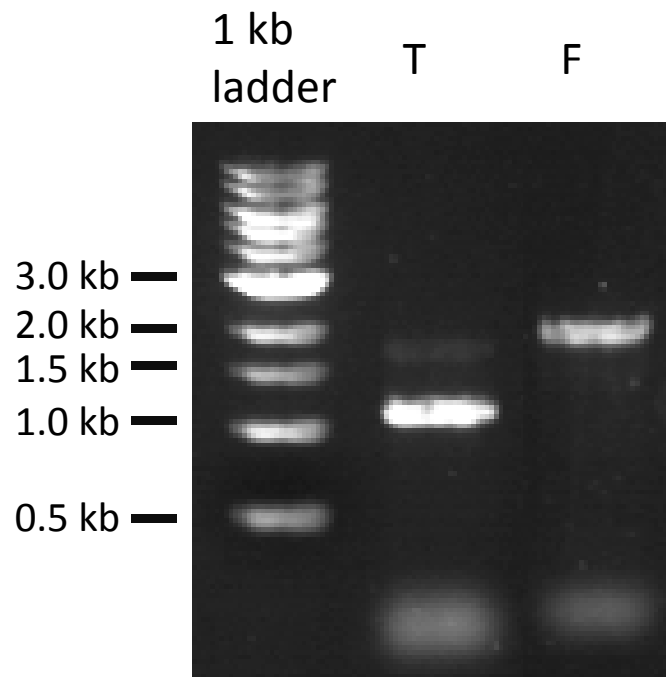


図2

pNN2



pNN-F



pNN-T



pNN-AF

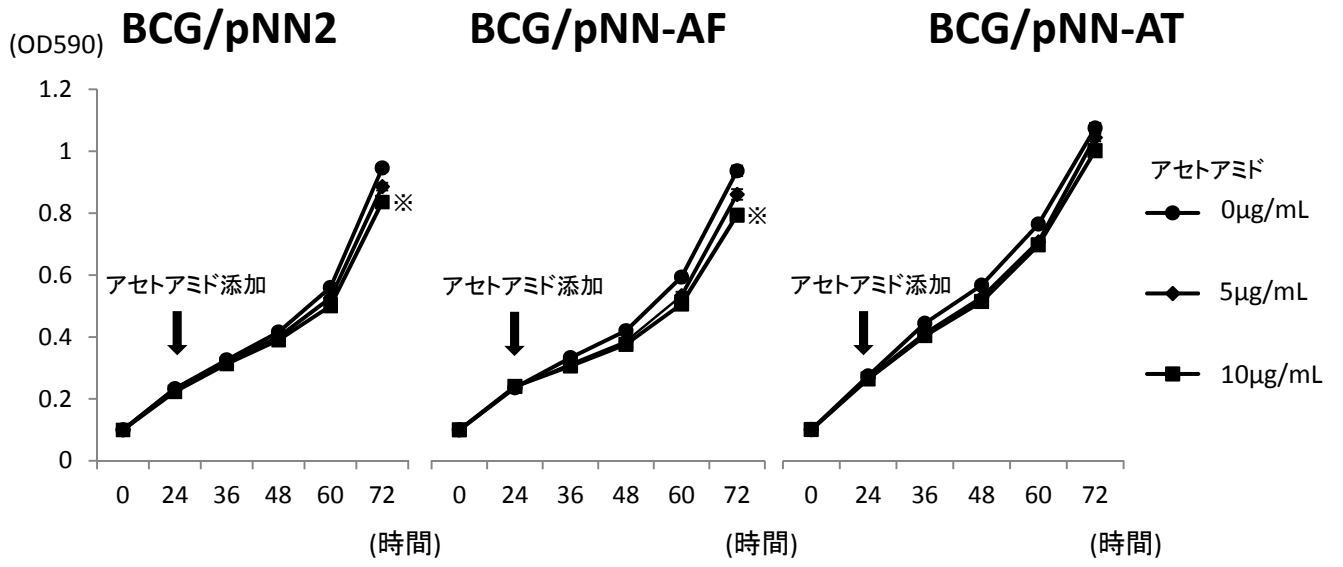


pNN-AT



図2

A



B

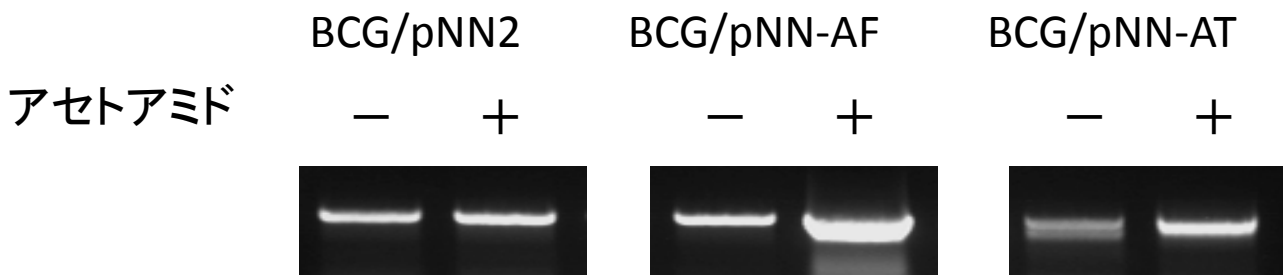
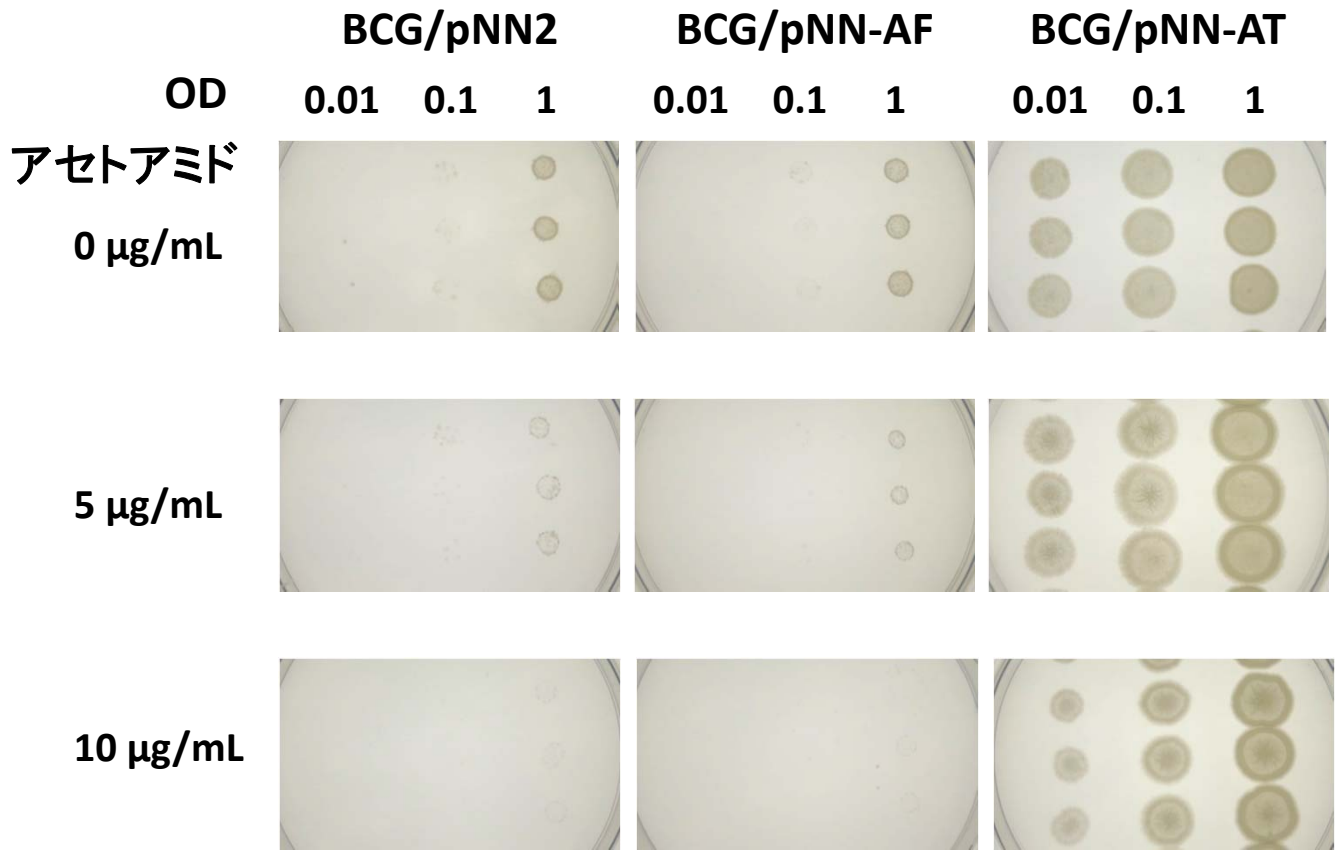


図4

A



B

