

BCG に存在する転写抑制因子 Rv3405c の解析

白崎 かおり

Study on the Transcriptional Regulatory Mechanisms of Rv3405c
from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG).

Kaori SHIRASAKI

(平成29年6月13日受付)

緒言

抗酸菌の一つであるヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) が引き起こす結核症は、世界三大感染症の一つであり、未だ世界規模で患者数・死亡数が多い。世界保健機関 (World Health Organization) の報告によると、2015年の世界における結核症の新規患者数は年間約1,040万人、結核症による死亡者数は約180万人に上る。この数値は2015年の世界死亡原因第9位であり、単一の病原体による感染症としては第1位となっている¹⁾。わが国に目を向けると、平成27年における結核罹患率は14.4であり、低蔓延国の水準値である10を上回っている。平成27年の新登録結核患者数は18,280人であり、死亡数は1,955人であった。このように、結核症は、未だ国内外において人々の健康の脅威となっている²⁾。

結核症の予防には、現行の唯一のワクチンとしてBCG (bacille-Calmette-Guérin) ワクチンが使用されている。BCGは、フランスのパスツール研究所のAlbert Calmette博士とCamille Guérin博士により、結核性乳腺炎のウシから分離された強毒性ウシ型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) を、1908年から1921年までの13年間、230代に亘り継代培養したことにより病原性を失わせた弱毒株であり、両博士の名前に因みBCGと名付けられた。1924年以降、BCGはCalmette博士によってパスツール研究所から世界各地に分与された³⁾。各国独自の方式による継代培養の結果、現在では、細菌学的に性状の異なる十数種のBCG亜株が世界に存在する⁴⁻⁶⁾。日本ではBCG Tokyo株がワクチンの製造に使用されている⁷⁾。

BCG Tokyo株は遺伝学的にヘテロな集団であり、2つのサブポピュレーション (I型菌とII型菌) が混在している^{8,9)}。これまでに両者の違いが調べられており、コロニー形態がI型菌ではスムーズ型が主であるのに対してII型菌ではラフ型が主であること、I型菌では細胞壁構成成分であるphthiocerol dimycocerosate (PDIM) とphenolic glycolipid (PGL)

が存在するが、II型菌ではこれらが欠損していること¹⁰⁾、この原因としてPGLとPDIMの合成に必須である*pps* オペロン中の1遺伝子*ppsA*の1塩基挿入が報告されている。さらに、region of difference (RD) 16に存在するRv3405c遺伝子は、II型菌では変異の無い野生型であるのに対し、I型菌では223番目から244番目までの22塩基が欠失している。このためフレームシフトが生じるとともにオープンリーディングフレーム (ORF) の途中で終止コドンが新たに出現し、I型菌におけるRv3405c遺伝子産物は部分タンパク質になっている¹¹⁾。Rv3405cタンパク質のN末端側にはTetRファミリーに属する転写因子に特徴的なhelix-turn-helix (HTH) ドメインが含まれており (図1)、転写因子としての機能を有することが推測されていた。2013年には、BCG Pasteur株における野生型のRv3405c遺伝子はRv3406遺伝子の転写を負に制御すること、Rv3405c遺伝子に変異が生じているBCG Moreau株では、Rv3406遺伝子の転写が制御されないことが報告された¹²⁾。BCG Moreau株とはブラジルで使用されているワクチン株であり、Rv3405c遺伝子の3'側からRv3400遺伝子の3'側までの7,608塩基が欠失しているため、I型菌と同様に、Rv3405cタンパク質は短くなるとともに、C末端側に野生型とは異なるアミノ酸配列を持つタンパク質となっている。この事実から、Rv3405cタンパク質のC末端側領域の必要性が推測された¹²⁾。Rv3405c遺伝子に関する報告は未だ少なく、転写抑制因子として機能するこの遺伝子の変異がもたらす影響を明らかにすることは、I型菌とII型菌の性状の違いを解明していく上で重要であると考えた。そこで、本研究では、Rv3406、Rv3407およびRv3408の各遺伝子の転写単位とRv3405c遺伝子による転写制御の有無を検討した。さらに、Rv3405cタンパク質が転写抑制因子として機能するのに必要な領域とRv3405cタンパク質が特異的に結合するDNA領域を解析した。

材料ならびに方法

1. 使用菌株と培養条件

BCG Tokyo-172 株の I 型菌、II 型菌および各変異株の培養には、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% Tween 80 添加 Middlebrook 7H9 液体培地 (Difco Laboratories) (7H9-ADC-Tween 80 液体培地)、ADC 添加 Middlebrook 7H10 寒天培地 (Difco Laboratories) (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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (SIGMA-ALDRICH) を添加した。

プラスミドの作製には、*Escherichia coli* DH5 α 株を使用した。*E. coli* DH5 α 株の培養には、Luria-Bertani (LB) 培地 (ナカライテスク) を使用した。必要に応じて、KM (終濃度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) あるいはカルベニシリン (Carbenicillin : Car, 終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (ナカライテスク) を添加した。

ヒスチジntag融合組換え Rv3405c タンパク質の合成には、*E. coli* BL21 (DE3) 株を使用した。*E. coli* BL21 (DE3) 株の培養には、LB 培地を用いた。必要に応じて、Car を添加した。イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノース (Isopropyl- β -D-thiogalactoside : IPTG, 終濃度 0.1 mM) (SIGMA-ALDRICH) を添加することで目的タンパク質の発現を誘導した。

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。制限酵素はタカラバイオから購入した。Polymerase chain reaction (PCR) 法は、PrimeSTAR GXL™ (タカラバイオ) を使用して行った。本研究で使用したプライマーは表 1 に示した。プラスミド構築におけるライゲーションは、DNA ligation Kit<Mighty Mix>

(タカラバイオ) を用いて 16°C で 1 時間反応させることで行った。その後、*E. coli* DH5α への形質転換に供試した。

3. *E. coli* DH5α への形質転換

E. coli DH5α 100 μL とライゲーション反応液 10 μL をチューブに入れて、氷上で 10 分間静置した。42°C で 60 秒間加温し、直ちに氷中に戻し 10 分間静置した。LB 培地を 100 μL 加えて 37°C で 1 時間培養した後、KM 含有 LB 寒天培地に播種し、37°C で一晩培養した。

4. BCG Tokyo 株への形質転換

松尾らの方法に従って、ECM399 (BTX) を用いて電気穿孔法により、プラスミドを BCG Tokyo 株の I 型菌と II 型菌に導入した¹³⁾。プラスミド導入後、KM 含有 7H10-ADC 寒天培地に播種し、37°C で 21 日間培養した。

5. 蛍光顕微鏡による緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein : GFP) 発現の確認

倒立型ルーチン顕微鏡 CKX41 (OLYMPUS) を用い、形成されたコロニーを励起波長 490 nm で観察することで GFP の発現の確認を行った。

6. 野生型の Rv3405c 遺伝子発現プラスミド pNN(II)H の構築

II 型菌のゲノム DNA を鋳型とし、プライマーセット 3405c F と 3405c R を用いて野生型の Rv3405c 遺伝子を PCR 法にて増幅した。*Bam*HI と *Xho*I で消化した PCR 産物の断片を *Bam*HI と *Xho*I で制限酵素処理した pET-22b(+) (Novagen) に挿入することにより、pET-22(II)H を構築した。

次に、pET-22(II)H を鋳型とし、プライマーセット 3405c F と 113-pET-22b R を用いてヒスチジンタグを融合した野生型の Rv3405c 遺伝子を PCR 法にて増幅した。*Bam*HI と

EcoT22I で消化した PCR 産物の断片を *BamHI* と *EcoT22I* で制限酵素処理した大腸菌 - 抗酸菌シャトルベクター pNN2¹⁴)に挿入することにより、pNN(II)H を構築した。

7. 全 RNA の抽出と精製のための各 BCG 株の培養

I 型菌、II 型菌、pNN(II)H 導入 I 型菌および pNN2 導入 I 型菌を 7H9-ADC-Tween 80 液体培地を用いて、37°C で 24 時間前培養した。プラスミド保持株の培地には KM を添加した。前培養後の菌液を新鮮な同液体培地に継代し、Optical Density (OD) 590=1.0 になるまで培養した。培養後、4°C で 3,000 rpm、15 分間遠心することで菌体を回収し、全 RNA の抽出に供試した。

8. 全 RNA の抽出と精製および cDNA への逆転写

全 RNA の抽出と精製には TRIzol® Plus RNA Purification Kit (Invitrogen) を用いて、添付のプロトコールに従って行った。混入した DNA は DNase I (タカラバイオ) を用いて消化した。DNA が残存していないことは、プライマーセット 3405c F と 3405c R を用いた PCR 法により標的遺伝子 Rv3405c が増幅されないことで確認した。精製した全 RNA を鋳型とした cDNA の合成は ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いて、添付のプロトコールに従って行った。

9. PCR 法による遺伝子発現量の比較検討

Rv3406、Rv3407 および Rv3408 各遺伝子の発現を確認するため、各菌から得られた cDNA を鋳型とし、プライマーセット 3406-RT F と 3406-RT R、3407-RT F と 3407-RT R および 3408-RT F と Rv3408-RT R を用いて PCR 法を行った。この PCR 法にて想定されるバンドサイズは、順に 245 bp、318 bp、190 bp であった。また、Rv3406 遺伝子から Rv3408 遺伝子の融合転写産物の有無を調べるため、I 型菌と II 型菌から得られた cDNA を鋳型と

し、プライマーセット 3406-RT2 F と 3408-RT R を用いて PCR 法を行った。この PCR 法にて想定されるバンドサイズは 1,496 bp であった。反応後の試料 10 μ L を 2%アガロースゲルで電気泳動した後にエチジウムブロマイド（終濃度 1 μ g/mL）（ニッポン・ジーン）で染色し、ゲル撮影装置 Dolphin-View（クラボウ）を用いて紫外線照射（波長：320 nm）を行い、増幅バンドの有無を確認した。

10. ヒスチジインタグ融合組換え Rv3405c タンパク質発現プラスミド pET-21(II)H の構築

II 型菌のゲノム DNA を鋳型とし、プライマーセット 3405c-pCR F と 3405c-pCR R を用いて、野生型の Rv3405c 遺伝子を PCR 法にて増幅した。増幅した PCR 産物を pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) に挿入させることにより、pCR(II)を構築した。pCR(II)を *NdeI* と *XhoI* で消化することで得られた DNA 断片を *NdeI* と *XhoI* で消化した発現ベクター pET-21b(+) (Novagen) に挿入することにより、pET-21(II)H を構築した。

11. ヒスチジインタグ融合組換え Rv3405c タンパク質の精製

ヒスチジインタグ融合組換え Rv3405c タンパク質を調製するため、*E. coli* BL21 (DE3) に pET-21(II)H を形質転換した。*E. coli* BL21 (DE3) 100 μ L と pET-21(II)H 3 μ L をチューブに混和し、氷上で 10 分間静置した。42°C で 60 秒間加温し、直ちに氷中に戻し 10 分間静置した。LB 培地を 100 μ L 加えて 37°C で 1 時間培養した後、Car 含有 LB 寒天培地に播種し、37°C で一夜培養した。コロニーを Car 含有 LB 液体培地で培養した。OD₅₉₀=0.8 になったところで IPTG を終濃度 0.1 mM になるように添加した。さらに 20°C で 12 時間培養した後、4°C で 3,000 rpm、15 分間遠心することで菌体を回収した。回収した菌体を Native Binding Buffer (20 mM リン酸水素二ナトリウム, 500 mM 塩化ナトリウム, pH7.8) 20 mL に懸濁し、超音波破碎機 (ultrasonic processor, ASTRASON) を用いて破碎した。破碎条件は、output 4、30 秒間 \times 5 回とし、氷上にて行った。超音波破碎後、4°C で 3,000

rpm、20分間遠心した。上清を孔径 5 μm および 0.45 μm のフィルター (Millipore Millex-GV, Millipore) に順次通すことで細胞残渣を除去し、可溶性画分を得た。

ポリプレップクロマトグラフィー用カラム (Bio-Rad) に 2 mL の Ni-NTA Agarose (Qiagen) を充填し、Native Washing Buffer (20 mM リン酸水素二ナトリウム, 500 mM 塩化ナトリウム, pH6.0) を用いてカラムの平衡化を行った。平衡化を行ったカラムに可溶性画分を入れ、一晚攪拌させることで可溶性画分中の組換え Rv3405c タンパク質を Ni-NTA Agarose に吸着させた。タンパク質を吸着させた Ni-NTA Agarose を Native Binding Buffer と Native Washing Buffer を用いて順次洗浄した。その後、濃度の異なるイミダゾール (ナカライテスク) (50 mM, 200 mM, 350 mM および 500 mM) を含有する Native Washing Buffer をイミダゾール濃度の低いものから順次用いることで吸着タンパク質を溶出させた。透析チューブ (SnakeSkin™ Dialysis Tubing, Thermo Fisher Scientific) を用いて、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffer saline : PBS) 中にて透析を 4°C で一晚行った。透析処理後、遠心式限外ろ過フィルター (Amicon® Ultra Centrifugal Filter Units, Millipore) を用いてタンパク質液を濃縮した。濃縮後のタンパク質濃度を Bradford 法により測定した。試薬には Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) を用いた。検量線は、牛血清アルブミン (SIGMA-ALDRICH) と吸光光度計 (Biowave CO8000 Cell Density Meter, Biochrom) を用いて作成した。得られた組換え Rv3405c タンパク質は、分注して用時まで -80°C で保存した。

12. SDS-PAGE とウエスタンブロット法

Laemmli¹⁵⁾らの方法に従い、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate : SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis : PAGE) を行った。終濃度が 5%となるように 2-メルカプトエタノール (ナカライテスク) を添加した 4 × Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad) に精製した組換え Rv3405c タンパク質を溶解し、95°C、

10 分間の加熱処理したものを変性試料とした。組換え Rv3405c タンパク質を 4 × Laemmli Sample Buffer に溶解した後、加熱処理を行わないものを非変性試料とした。12%ポリアクリルアミドゲルと泳動用緩衝液（25 mM トリス塩酸緩衝液, pH6.8, 200 mM グリシン, 35 mM SDS)を用いて試料を泳動した。分子量測定マーカーとして、BLUE Star Prestained Protein-Ladder (NIPPON Genetics) を使用した。泳動した試料は湿式転写装置 (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad) を用い、転写用緩衝液 (25 mM トリス塩酸緩衝液, pH7.6, 192 mM グリシン, 20%メタノール) 中でポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride : PVDF) 膜 (Immobilon, Millipore) へ転写した (100 V 定電圧)。転写後の PVDF 膜を 5%スキムミルク (BD Biosciences) 含有トリス-ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート緩衝食塩水 (tris buffered saline with Tween : TBST) (20 mM トリス塩酸緩衝液, pH7.6, 150 mM 塩化ナトリウム, 0.05% Tween20) に 1 時間浸漬し、ブロッキング処理を行った。その後、一次抗体を 5%スキムミルク含有 TBST で希釈した溶液中に PVDF 膜を浸漬し、4°C で 12 時間反応させた。反応後、TBST で 15 分間洗浄し、次いで二次抗体を TBST で希釈した溶液中に PVDF 膜を浸漬し、常温で 3 時間反応させた。TBST で 1 時間洗浄後、Enhanced Chemiluminescence System (Thermo Fisher Scientific) と ChemiDoc MP system (Bio Lad) を用いて試料の分析を行った。一次抗体として His Tag Antibody Recombinant Monoclonal Mouse IgG1 Clone (R&D systems) を 1:1000 の希釈率で用いた。二次抗体として、Horseradish Peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare) を 1:1000 の希釈率で用いた。

13. I 型あるいは野生型の Rv3405c 遺伝子および Rv3406-GFP 融合遺伝子を載せたプラスミド p6G(I)と p6G(II)の構築

pAcGFP1-C1 Vector (タカラバイオ) を鋳型とし、プライマーセット AcGFP F と AcGFP R を用いて GFP 遺伝子を PCR 法にて増幅した。*ClaI* と *XbaI* で消化した PCR 産物の断片

を *ClaI* と *SpeI* で制限酵素処理した pNN2 に挿入することにより、pNN2-GFP を構築した。次に、I 型菌と II 型菌のゲノム DNA をそれぞれ鋳型とし、プライマーセット 3405c-D F と 3406 R を用いて Rv3405 遺伝子の下流から Rv3406 遺伝子までを PCR 法にて増幅した。*SpeI* と *XhoI* で消化した PCR 産物の断片を *SpeI* と *XhoI* で制限酵素処理した pNN2-GFP に挿入することにより、p6G(I) と p6G(II) を構築した (図 2A-1,2)。

14. I 型の Rv3405c と野生型の Rv3405c 遺伝子および Rv3406-GFP 融合遺伝子を載せたプラスミド p6G(I/II) の構築

pNN(II)H を鋳型とし、プライマーセット NN2/*SpeI* F と NN2/*NdeI* R を使用してヒスチジンタグを融合した野生型の Rv3405c 遺伝子領域を PCR 法にて増幅した。*SpeI* と *NdeI* で消化した PCR 産物を *SpeI* と *NdeI* で制限酵素処理した p6G(I) に挿入することにより、p6G(I/II) を構築した (図 2A-3)。

15. I 型の Rv3405c と野生型の C 末端側のドメインをコードする Rv3405c 部分遺伝子および Rv3406-GFP 融合遺伝子を載せたプラスミド p6G(I/IIC) の構築

II 型菌のゲノム DNA を鋳型とし、プライマーセット 3405c-211 F と 3405c R を用いて、HTH ドメインを含まず野生型の C 末端側のドメインのみをコードする Rv3405c 部分遺伝子を PCR 法にて増幅した。*BamHI* と *XhoI* で消化した PCR 産物の断片を *BamHI* と *XhoI* で制限酵素処理した pNN(II)H に挿入することにより、pNN(IIC) を構築した。次に、pNN(IIC) を鋳型とし、プライマーセット NN2/*SpeI* F と NN2/*NdeI* R を用いて、ヒスチジンタグを融合した野生型の C 末端側のドメインをコードする Rv3405c 部分遺伝子を PCR 法にて増幅した。*SpeI* と *NdeI* で消化した PCR 産物の断片を *SpeI* と *NdeI* で制限酵素処理した p6G(I) に挿入することにより、p6G(I/IIC) を構築した (図 2A-4)。

16. C 末端側の 4 あるいは 5 アミノ酸を欠失させた野生型のタンパク質をコードする Rv3405c 部分遺伝子および Rv3406-GFP 融合遺伝子を載せたプラスミド p6G(II184)と p6G(II183)の構築

II 型菌のゲノム DNA を鋳型とし、プライマーセットの一方を 3405c F として、他方のプライマーを 3405c-184 R、あるいは 3405c-183 R とすることで、長さの異なる 2 種類の Rv3405c 部分遺伝子の断片を PCR 法にて増幅した。*Bam*HI と *Xho*I で消化した PCR 産物の断片を *Bam*HI と *Xho*I で制限酵素処理した pNN2-GFP に挿入することにより、p6G(II184)と p6G(II183)を構築した (図 2A-5,6)。

17. Rv3406 プロモーター領域検索のためのプラスミド pPROG の構築

II 型菌のゲノム DNA を鋳型とし、プライマーセットの一方を 3406 R として、他方のプライマーを 3406-100 F、3406-62 F、あるいは 3406-46 F とすることで、段階的に長さの異なる 3 種類の Rv3406 遺伝子上流の DNA 断片を PCR 法にて増幅した。*Xba*I と *Xho*I で消化した PCR 産物の断片を、*Spe*I と *Xho*I で制限酵素処理した pNN2-GFP に挿入することにより、pPRO6G100、pPRO6G62 および pPRO6G46 をそれぞれ構築した。次に、Rv3406 遺伝子上流の DNA 断片と GFP 遺伝子を直接連結させるため、これら 3 種類のプラスミド DNA を鋳型とし、プライマーセット AcGFP2 F と 3406-1 R を用いて PCR 法を行い、得られた DNA 断片を環状化させることにより pPROG100、pPROG62 および pPROG46 をそれぞれ構築した(附録 1)。DNA 断片の環状化は、精製した PCR 産物に T4 polynucleotide kinase (タカラバイオ) と DNA Ligation Kit<Mighty Mix>を 16°C で 1 時間反応させることで行った。

18. p6G(I)の Rv3406 遺伝子上流に変異を導入したプラスミド p6G(IM1)、p6G(IM2)の構築

p6G(I)を鋳型として、プライマーセット PAL F と PALM1 R を用いて PCR 法を行うことで、Rv3406 遺伝子上流に存在するパ lindローム配列中の 2 塩基を変異させた DNA 断片を増幅させた。得られた DNA 断片を環状化させることにより p6G(IM1) を構築した。同様の手順にて、p6G(I)を鋳型として、プライマーセット PAL F と PALM2 R を用いてパ lindローム配列中の 8 塩基を変異させた p6G(IM2) を構築した。

19. ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは、LightShift Chemiluminescent EMSA kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。ゲルシフトアッセイに使用する非標識 DNA プローブを作製するため、p6G(I)を鋳型とし、プライマーセット EMSA F と EMSA R を用いて Rv3405c 遺伝子と Rv3406 遺伝子の遺伝子間領域を含む 100 bp の領域を PCR 法にて増幅した。得られた PCR 産物は illustra MicroSpin S-300 HR Columns (GE Healthcare) を用いて精製し、これを非標識 WT DNA プローブとした。同様に、5'側をビオチン標識させたプライマーセット Bi-EMSA F と Bi-EMSA R を用いて PCR 法を行い、5'側をビオチン標識させたビオチン標識 WT DNA プローブを得た。同様の方法により、p6G(IM1) と p6G(IM2) を鋳型とし、非標識 Mut1 DNA プローブとビオチン標識 Mut1 DNA プローブ、また非標識 Mut2 DNA プローブとビオチン標識 Mut2 DNA プローブをそれぞれ作製した (図 4)。

製品プロトコールに準じ、10 × binding buffer 2 μL、50% glycerol 1 μL、poly dI-dC 1 μL、2 ng のビオチン標識 WT DNA プローブと 40 nM の組換え Rv3405c タンパク質を混合し、全量が 20 μL となるように超純水にて調整し、DNA-タンパク質結合反応を行った。競合実験として、標識 WT DNA プローブの 200 倍量の非標識 WT DNA プローブを反応系に加えた。組換え Rv3405c タンパク質を加えないものを陰性対照とした。混合後、室温で 30 分間静置した。Mut1 DNA プローブと Mut2 DNA プローブについても、同様の方法にて DNA-タンパク質結合反応を行った。結合反応後の 20 μL の各試料に 5 × binding buffer 5 μL を

混合し、トリス・ホウ酸・エチレンジアミン四酢酸緩衝液（tris-borate ethylenediaminetetraacetic acid buffer : TBE）（89 mM トリス塩酸緩衝液，89 mM ホウ酸塩，2 mM エチレンジアミン四酢酸，pH8.1）5%ポリアクリルアミドゲルのウェルに試料を流し入れ、0.5 × TBE 緩衝液を泳動用緩衝液として 4°C、100 V、60 分間の条件で泳動した。次に、湿式転写装置を使用し、0.5 × TBE 緩衝液中にて、4°C、380 mA、60 分間の条件で、ゲルからナイロンメンブレン（Hybond-N+, GE Healthcare）に DNA を転写した。メンブレンに転写された DNA を、ゲル撮影装置 Dolphin-View を用いて 312 nm の紫外線を 15 分間照射することで、メンブレンに固定させた。メンブレン上のビオチン標識 DNA プローブは、Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module kit（Thermo Fisher Scientific）と ChemiDoc MP system を用いて検出した。上記の実験は、製品プロトコールに準じて行った。

結果

1. 野生型と I 型の Rv3405c 遺伝子による Rv3406、Rv3407 および Rv3408 遺伝子の転写への影響

野生型 (II 型) と I 型の Rv3405c 遺伝子による Rv3406、Rv3407 および Rv3408 遺伝子の転写への影響を明らかにするため、野生型の Rv3405c 遺伝子を載せたプラスミド pNN(II)H を導入した I 型菌を作製し、I 型菌と II 型菌とともに、Rv3406、Rv3407 および Rv3408 遺伝子の発現の有無を reverse transcription PCR (RT-PCT) により確認した。図 5 に示すように、I 型菌では、Rv3406、Rv3407 および Rv3408 遺伝子において、各プライマーセットから想定された 245 bp、318 bp、190bp のバンドが明瞭に認められた (レーン 1)。しかし、pNN(II)H 導入 I 型菌 (レーン 3) では、II 型菌 (レーン 2) と同様に、Rv3406、Rv3407 および Rv3408 遺伝子において、明瞭なバンドは認められなかった。以上のことから、野生型の Rv3405c 遺伝子は、Rv3406、Rv3407 および Rv3408 遺伝子の転写を抑制することが示唆された。なお、pNN(II)H の構築時に用いたプラスミドである pNN2 を導入した I 型菌でも、Rv3406、Rv3407 および Rv3408 遺伝子において想定された 1,496 bp のバンドが認められた (レーン 4) ことから、Rv3406、Rv3407 および Rv3408 遺伝子の転写において、プラスミドを導入することによる影響はないと判断した。

2. Rv3406、Rv3407 および Rv3408 遺伝子の転写単位

野生型の Rv3405c 遺伝子が Rv3406 遺伝子、Rv3407 遺伝子および Rv3408 遺伝子の転写制御を行っていることが示唆されたことから、この 3 つの連続する遺伝子がオペロンである可能性が示唆された。そのため、I 型菌と II 型菌から得られた cDNA を鋳型とし、プライマーセット 3406-RT2 F と 3408-RT R を用いて RT-PCR を行った (図 6A)。図 6B で示すように、I 型菌においては、想定されるサイズのバンドが明瞭に認められた (レーン 1)。

II 型菌では、明瞭なバンドは認められなかった（レーン 2）。以上のことから、I 型菌で認められた PCR 産物は Rv3406、Rv3407 および Rv3408 が一連となった断片である可能性が高い。これらの遺伝子はオペロンを形成しており、Rv3405c 遺伝子に制御されていることが示唆された。

3. 野生型の Rv3405c 遺伝子による Rv3406 タンパク質の発現に対する影響

野生型の Rv3405c 遺伝子は、Rv3406、Rv3407 および Rv3408 遺伝子の転写を抑制していることが示された。転写レベルにおける調節がタンパク質の発現に反映されていることを明らかにするため、Rv3406-GFP 融合遺伝子を用いて検討した。I 型の Rv3405c 遺伝子と Rv3406-GFP 融合遺伝子を載せたプラスミド p6G(I)（図 2A-2）を I 型菌と II 型菌に導入し、得られたコロニーにおける GFP の発現を蛍光顕微鏡にて確認した。p6G(I)を I 型菌に導入した場合、GFP の強い発現が認められた（図 2B-1）が、II 型菌に導入した場合には、GFP の発現は認められなかった（図 2B-2）。また、野生型と I 型の両方の Rv3405c 遺伝子を同時に Rv3406-GFP 融合遺伝子とともに載せたプラスミド p6G(I/II)（図 2A-3）を I 型菌に導入したところ、GFP の発現は認められなかった（図 2B-3）。以上の結果から、野生型の Rv3405c 遺伝子は Rv3406 タンパク質の発現を抑制するが、I 型の Rv3405c 遺伝子は Rv3406 タンパク質の発現を抑制しないことが示唆された。

4. Rv3406 タンパク質の発現抑制に必要な Rv3405c 遺伝子領域

C 末端側の必要領域を詳細に検討するため、野生型の Rv3405c 遺伝子および Rv3406-GFP 融合遺伝子を載せたプラスミド p6G(II)（2A-1）を I 型菌に導入し、GFP の発現がみられないことを確認した（図 2B-4）。次に、野生型の C 末端側の 4 アミノ酸 (LEPH) あるいは 5 アミノ酸 (ILEPH) を欠失させた部分タンパク質をコードする Rv3405c 部分遺伝子を載せたプラスミド p6G(II184)（図 2A-5）と p6G(II183)（図 2A-6）を構築し、I 型

菌に導入した。その結果、p6G(II184)を導入した I 型菌では GFP の発現が認められなかった (図 2B-5) が、p6G(II183)を導入した I 型菌では GFP の発現を認めた (図 2B-6) 。 C 末端側から 5 番目のイソロイシンまでがその機能に必要であることが示唆された。また、Rv3405c タンパク質の N 末端側の領域が Rv3406 遺伝子の転写抑制に必要であるのかを検討するため、HTH をコードする領域を含まない 211 番目の塩基以降の Rv3405c 部分遺伝子と I 型の Rv3405c 遺伝子および Rv3406-GFP 融合遺伝子を載せたプラスミド p6G(I/IC) (図 2A-4) を I 型菌に導入した。その結果、GFP の強い発現が認められた (図 2B-7) 。以上のことから、Rv3405c タンパク質が転写抑制因子として機能するためには、N 末端側と C 末端側の両方のドメインが必要であることが示唆された。

5. Rv3406 遺伝子プロモーター領域の予測

野生型の Rv3405c 遺伝子が Rv3406 遺伝子の転写を制御していることが示された。TetR ファミリーに属する転写因子はプロモーター領域下流にあるパリンドローム領域と結合することで転写因子として機能することが知られている¹⁵⁾。このため、Rv3406 遺伝子のプロモーター領域を検討した。原核生物の-35 および-10 領域のコンセンサス配列¹⁷⁾から、Rv3406 遺伝子の開始コドン ATG の塩基 A を塩基番号 1 とした場合、Rv3406 遺伝子における-35 領域は-79~-74 (TTGCCG)、-10 領域は-55~-50 (TACAGT) に存在すると推測した。推測された-35 領域と-10 領域が転写に関与していることを示すために、-100 から-1 までの Rv3406 遺伝子上流配列と GFP 遺伝子を連結させたプラスミド pPROG100、-62 から-1 までの配列と GFP 遺伝子を連結させたプラスミド pPROG62 および-46 から-1 までの配列と GFP 遺伝子を連結させたプラスミド pPROG46 を構築し (図 3A)、これらのプラスミドを I 型菌に導入した。pPROG100 を導入した場合には、GFP の強い発現が認められた (図 3B-1) 、pPROG62 を導入した場合、GFP の発現が著しく低下した (図 3B-2) 。さらに pPROG46 を導入した場合、GFP の発現は認めなかった (図 3B-3) 。以上の結果か

ら、Rv3406 遺伝子のプロモーター領域は塩基番号-100 から-62 近傍までの間に存在することが示唆された。なお、塩基番号-44 から-27 までの領域にパリンδροーム配列が存在する。

6. Rv3405c タンパク質の存在様式の検討

TetR ファミリーに属する転写因子は二量体を形成することで転写因子として機能することが知られているため¹⁵⁾、Rv3405c タンパク質の存在様式を検討した。精製した組換え Rv3405c タンパク質から変性試料と非変性試料を作製し、電気泳動を行った。抗ヒスチジンタグ抗体を用いて分析したところ、変性試料では、単量体の分子量（約 22 kDa）に相当する位置にバンドを検出した（図 7A）。非変性試料では、二量体の分子量（約 45 kDa）に相当する位置にバンドを検出した（図 7B）。以上のことから、Rv3405c タンパク質は二量体を形成することが示唆された。

7. Rv3405c タンパク質が結合する DNA 領域の検討

Galvão らは、Rv3405c タンパク質は Rv3405c と Rv3406 の遺伝子間領域を含む 100 bp の DNA 断片に結合することを報告している¹³⁾。前述のとおり、TetR ファミリーに属する転写因子はプロモーター領域下流に存在するパリンδροーム領域に結合することが知られている¹⁵⁾。そこで、DNA 結合領域をさらに詳細に特定するため、Rv3406 遺伝子上流に存在するパリンδροーム領域に着目した。Galvão らが用いたプローブ (WT DNA プローブ)、パリンδροーム配列の 2 塩基に変異を導入したプローブ (Mut1 DNA プローブ) およびパリンδροーム配列の 8 塩基に変異を導入したプローブ (Mut2 DNA プローブ) を作製し（図 4A）、組換え Rv3405c タンパク質と各プローブを用いてゲルシフトアッセイを行った。パリンδροーム配列を保存した WT DNA プローブを用いた場合、組換え Rv3405c タンパク質の存在により DNA プローブの上方シフトが観察された（図 8A-2）。上方にシフトしたバンドは非標識 WT DNA プローブの競合により消失した（図 8A-3）。このことから、WT DNA

プローブと組換え Rv3405c タンパク質は特異的に結合していることが示唆された。Mut1 DNA プローブと Mut2 DNA プローブを用いた場合には、組換え Rv3405c タンパク質の存在下であっても、DNA プローブの上方シフトは認められなかった (図 8-B, C)。以上のことから、Rv3405c タンパク質は Rv3406 遺伝子上流に存在するパリンドローム領域に特異的に認識していることが示唆された。

8. Rv3405c タンパク質の結合と Rv3406 遺伝子の転写・翻訳への影響

前項の結果から、Rv3405c タンパク質は Rv3406 遺伝子上流に存在するパリンドローム領域と特異的に認識することが示唆された。そこで、Rv3405c タンパク質と Rv3406 遺伝子上流の DNA との結合が Rv3406 タンパク質の発現に関与していることを確認するために、パリンドローム配列に変異を導入した p6G(IM1)、p6G(IM2) を構築し、これらのプラスミドを II 型菌に導入した。培養後、GFP の発現を蛍光顕微鏡にて確認することで、Rv3406 タンパク質の翻訳の有無を検討した。パリンドローム配列に変異のない p6G(I)を導入した場合には、GFP の発現が認められなかった (図 9-1)。しかし、パリンドローム配列に変異をもつ p6G(IM1) あるいは p6G(IM2) を導入した場合には GFP の強い発現が認められた (図 9-2,3)。以上のことから、Rv3405c タンパク質は Rv3406 遺伝子上流の DNA に結合することで、Rv3406 遺伝子の転写を抑制していることが示唆された。

考察

本研究において明らかになった重要な点は次の 5 点である。

1. Rv3406、Rv3407 および Rv3408 の各遺伝子は一つのオペロンを形成している。
2. このオペロンは Rv3405c 遺伝子によって負に制御されている。
3. Rv3405c タンパク質が転写抑制因子として機能するためには、N 末端側と C 末端側の両方のドメインが必要であり、C 末端側から少なくとも 5 番目までのアミノ酸が必要である。
4. II 型菌は完全長で機能的な Rv3405c を有するのに対し、I 型菌の Rv3405c は C 末端コード部位を欠いており制御機能を発揮しない。
5. Rv3405c タンパク質は二量体を形成する。
6. Rv3405c タンパク質は Rv3406 遺伝子上流に存在するパリンドローム領域を認識する。

BCG ワクチンは 1921 年に世界で初めてヒトに接種され今日に至るまで、世界中で最も多くの人に接種されたワクチンである¹⁸⁾。成人の肺結核症に対する効果は限定的とされているが、粟粒結核や結核性髄膜炎を含む小児の重症型結核症に対しては有効とされている。泌尿器科領域では、表在性膀胱癌に対して BCG ワクチンの膀胱療法が実施され、現在では有用性の確立した癌免疫療法となっている¹⁹⁾。このように、BCG ワクチンは結核予防のみならず、多岐に渡って利用できる可能性がある。

緒言で述べたように、フランスのパスツール研究所から世界各国に分与された BCG ワクチン株は、それぞれの国において長年に亘り継代されたため、各亜株のゲノムに変異が生じ、遺伝学的に多様性を示している^{4,5)}。これらの遺伝学的差異は表現型に影響し、細胞壁脂質、炭素代謝、抗原性などが亜株間で異なることが報告されているが、未だ不明な点が多い^{5,20-23)}。

日本の亜株である BCG Tokyo 株では、亜株内にも多様性が生じていることが報告されて

いる^{5,8,11)}。和田らは、BCG Tokyo 株を元に作製された BCG ワクチン株のロットに含まれる全菌体の DNA を、次世代シーケンサーを用いて解析した。以前から知られていた 2 つのサブポピュレーションである I 型菌と II 型菌以外のサブポピュレーションは見つからなかったが、Rv3405c 遺伝子以外にも 7 か所の変異がゲノム上に存在することを報告した⁹⁾。1 か所は遺伝子間領域に存在していた。残りの 6 か所は、ORF の途中に存在し、アミノ酸の変異を伴っていた。cAMP receptor protein をコードしている Rv3676 遺伝子は、Rv3405c 遺伝子と同様に HTH ドメインを有している。結核菌の Rv3676 遺伝子と比較すると、BCG Tokyo 株を含めた BCG 全亜株の Rv3676 遺伝子は 1 塩基置換に伴う 1 アミノ酸置換を HTH ドメイン内に有しており、この変異によって Rv3676 タンパク質と DNA との結合能や菌の発育速度に影響が生じていることが示されている^{9,24)}。I 型菌ではさらにアミノ酸の変異を伴う 1 塩基置換が生じているため、結核菌の Rv3676 遺伝子と比較すると、HTH ドメインをコードする領域内における 2 か所の塩基置換により 2 アミノ酸の変異が生じている。糖代謝やエネルギー産生に関与することが知られている Rv0211 遺伝子 (*pckA*) をノックアウトした BCG の病原性は低下することが報告されている²⁵⁾。RNA ポリメラーゼの β サブユニットをコードする Rv0668 (*rpoC*) 遺伝子の変異は薬剤感受性に変化を生む可能性がある²⁶⁾。Rv3235c 遺伝子と Rv0183 遺伝子に関しては機能不明である。Rv2931 遺伝子 (*ppsA*) は、II 型菌では ORF における 1 塩基挿入によりフレームシフトが起こり、その 4 塩基後に終止コドンが新たに生じている。このため、その遺伝子産物は部分タンパク質となっており、II 型菌では細胞壁構成成分である PGL と PDIM が欠損している^{10,27)}。PDIM はポリケタイドの一種で、結核菌の病原性に関与し、またレドックスストレスに対する抵抗性や抗生物質の耐性にも関与している²⁸⁾。このように、I 型菌と II 型菌に変異が生じている遺伝子の多くは、菌の性状を左右する遺伝子として注目されている。

本研究で注目した Rv3405c 遺伝子は、緒言で述べたように、II 型菌では変異が無く野生型であるのに対して、I 型菌では 22 塩基の欠失がある。しかし、I 型菌、II 型菌ともに N

末端側に存在する TetR ファミリーに属する転写因子に特徴的な HTH ドメインは保存されている。TetR ファミリーに属する転写因子とは、DNA 結合ドメインのアミノ酸配列の類似性を指標に分類された転写因子の一群で、主にリプレッサーとして、土壌細菌を始めとする変化の著しい環境に生息している細菌に広く分布している。TetR ファミリーに属する転写因子は、ホモ二量体を形成することによって対称的な塩基配列であるパリンδροーム領域に結合すること、DNA への結合に必要な HTH ドメインのみならず C 末端側に存在する二量体形成ドメインも転写因子として機能するうえで必要であることが知られている²⁹⁻³¹⁾。本研究において、I 型の Rv3405c 遺伝子は転写抑制因子として機能しないこと、Rv3406、Rv3407 および Rv3408 遺伝子はひとつのオペロンを形成しており、野生型の Rv3405c 遺伝子は、Rv3406 遺伝子のみならず Rv3407 遺伝子と Rv3408 遺伝子の転写も抑制していることが示された (図 5,6)。Rv3405c タンパク質が転写抑制因子として機能するために C 末端側のドメインが必要であることは、Rv3405c 遺伝子の 3' 側に変異を有する I 型菌と BCG Moreau 株からも推測されたため、本研究では C 末端側の必要領域を詳細に検討した。その結果、C 末端側から 5 番目までのアミノ酸が必要であることが明らかになった (図 2B-5,6)。また、HTH ドメインを欠失させ C 末端側のドメインのみをコードする Rv3405c 部分遺伝子も Rv3406 遺伝子の発現を抑制しなかったことから、転写抑制因子として機能するためには C 末端側だけでなく N 末端側の両方のドメインが必要であることが明らかになった (図 2B-7)。電気泳動により Rv3405c タンパク質は非変性下において二量体を形成することが示された (図 7)。Rv3405c タンパク質は、Rv3406 遺伝子のプロモーター領域と Rv3406 遺伝子の開始コドンの間にあるパリンδροーム領域を特異的に認識することが示唆された (図 8)。このパリンδροーム配列に変異が生じると、Rv3405c タンパク質は DNA と結合せず、Rv3406 遺伝子の転写を抑制しなかった (図 9)。これらのことから、Rv3405c タンパク質は HTH ドメインを N 末端に、二量体形成ドメインを C 末端側に持つ TetR ファミリーに属する転写抑制因子であり、二量体を形成することで Rv3406 遺伝

子上流に存在する DNA に結合し、Rv3406 遺伝子の転写を抑制していることが示された。

Mattow らは結核菌 H37Rv 株と Erdman 株、BCG Chicago 株および BCG Copenhagen 株におけるそれぞれのタンパク質を 2 次元電気泳動法により比較し、結核菌および BCG それぞれに特異的に発現しているタンパク質を報告している³²⁾。その中で Rv3407 タンパク質は BCG では発現しておらず、結核菌に特異的に発現しているタンパク質に分類されている³³⁾。BCG Chicago 株および BCG Copenhagen 株では Rv3405c 遺伝子が野生型であるため、Rv3406-Rv3407-Rv3408 オペロンの発現は抑制されていることが推測される。この結果は、野生型の Rv3405c 遺伝子を持つ II 型菌についての今回の結果に一致する。

Rv3405c 遺伝子に制御される Rv3406、Rv3407 および Rv3408 の各遺伝子は、ストレスに対抗するタンパク質をコードする遺伝子であることが推測されている。Rv3406 遺伝子がコードするタンパク質は、硫酸エステル分解酵素の一つである³⁴⁾。Rv3406 タンパク質は decaprenylphosphoryl- β -d-ribose oxidase (DprE1) 阻害剤であるキノキサリン系化合物 Ty38c (3-((4-methoxybenzyl)amino)-6-(trifluoromethyl)quinoxaline-2-carboxylic acid) を脱炭酸し、不活型のケト体に変化させることが示されている。さらに Ty38c に対する抵抗性が亢進した結核菌株では、Rv3405c 遺伝子に変異が見つかっている³⁵⁾。

Rv3407 遺伝子と Rv3408 遺伝子はそれらの配列から、トキシン - アンチトキシン (TA) システムのひとつをコードしていると推定され、それぞれ vapB47 と vapC47 と名付けられている³⁶⁾。TA システムは原核生物のストレス応答システムであり、タンパク質であるトキシンとタンパク質あるいは RNA であるアンチトキシンによって構成される。通常、トキシンはアンチトキシンと結合しているが、環境変化によりアンチトキシンが分解され、トキシンとしての作用が発揮される。その結果、DNA の複製、細胞壁合成、細胞分裂や翻訳に影響を与え、増殖の抑制や細胞死がもたらされる^{3,38)}。結核菌のゲノム上には 79 個の TA システムが存在し、その役割が明らかにされているものも存在するが、vapB47 と vapC47 の機能は明らかにされていない³⁷⁾。

興味深いことに Kaufmann らのグループは Rv3407 タンパク質の免疫原性に着目し、Rv3407 タンパク質が感染防御抗原としての性質を有することでワクチン効果を持つこと³⁹⁾、活動型の結核患者よりも潜在性結核感染症患者で Rv3407 タンパク質を認識する T 細胞の保有者率が高いことを報告している⁴⁰⁾。このことは結核菌の潜伏感染時に Rv3407 遺伝子が発現されていることを示唆するものである。潜在性結核感染症とは、結核菌が飛沫感染した後、無症候感染が成立した状態をいう。感染者の約 9 割は潜在性結核感染症患者となり、感染後すぐに結核症を発症するのは感染者の約 1 割に過ぎない。潜在性結核感染症患者のうちのは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、二次結核症を発症する⁴¹⁻⁴³⁾。潜伏感染状態においては、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⁴⁴⁾。活動型の結核患者よりも潜在性結核感染症患者で Rv3407 タンパク質を認識する T 細胞の保有者率が高いという結果は、Rv3407 遺伝子は潜伏感染時により優位に発現する遺伝子であると推測される。

本研究の成果から、Rv3405c 遺伝子が I 型菌と II 型菌の抗原性の差をもたらしている可能性と、潜伏性感染症にも関与している可能性が示唆された。潜伏感染時により優位に発現する遺伝子群の同定を発端として、結核菌の休眠期への移行や覚醒・分裂開始期への移行のメカニズムを解明することができれば、発症を抑止するための効力の高いワクチンの開発、薬剤耐性菌への対応、さらには休眠菌を排除できる薬剤の開発につながり、結核の根絶に寄与するものと考えられる。

結語

野生型の Rv3405c 遺伝子は、TetR ファミリーに属する転写因子の特徴を有する転写抑制因子であること、Rv3405c 遺伝子が I 型菌と II 型菌の生物学的性状の差異を生み出していることが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始懇篤なる御指導と御高覧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歯科矯正学分野 上岡寛教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、終始懇切なる御指導、御鞭撻を頂きました同口腔微生物学分野 中山真彰助教、橋理人助教に心より感謝致します。最後に様々な面で御協力、御援助頂きました歯科矯正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. Available at :
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> Accessed Jun 3rd, 2017.
2. 厚生労働省. 平成 27 年結核登録者情報調査年報集計結果. Available at :
<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000132952.html> Accessed Jun 3rd, 2017.
3. Jackson M, Yamamoto S. Historical background of *Mycobacterium bovis* BCG. In Takii T, Maeyama J, Yamamoto S, eds.: BCG -vaccine and adjuvant-. JATA, Tokyo, 3-12, 2011.
4. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM.: Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*. **284**, 1520-1523, 1999.
5. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST.: Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 5596-5601, 2007.
6. Bedwell J, Kairo SK, Behr MS, Bygrave JA.: Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. *Vaccine*. **19**, 2146-2151, 2001.
7. Yamamoto S, Yamamoto T.: Historical review of BCG vaccine in Japan. *Jpn J Infect*. **60**, 331-336, 2007.
8. Shibayama K, Mochida K, Yagi T, Mori S, Arakawa Y, Yamamoto S.: Quantification of two variant strains contained in freeze-dried Japanese BCG vaccine preparation by real-time PCR. *Biologicals*. **35**, 139-143, 2007.

9. Wada T, Maruyama F, Iwamoto T, Maeda S, Yamamoto T, Nakagawa I, Yamamoto S, Ohara N.: Deep sequencing analysis of the heterogeneity of seed and commercial lots of the bacillus Calmette-Guérin (BCG) tuberculosis vaccine substrain Tokyo-172. *Sci Rep.* **5**, 17827, 2015.
10. Naka T, Maeda S, Niki M, Ohara N, Yamamoto S, Yano I, Maeyama J, Ogura H, Kobayashi K, Fujiwara N.: Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 substrain. *J Biol Chem.* **286**, 44153-44161, 2011.
11. Honda I, Seki M, Ikeda N, Yamamoto S, Yano I, Koyama A, Toida I.: Identification of two subpopulations of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo172 substrain with different RD16 regions. *Vaccine.* **24**, 4969-4974, 2006.
12. Galvão TC, Lima CR, Gomes LH, Pagani TD, Ferreira MA, Gonçalves AS, Correa PR, Degrave WM, Mendonça-Lima L.: The BCG Moreau RD16 deletion inactivates a repressor reshaping transcription of an adjacent gene. *Tuberculosis.* **94**, 26-33, 2014.
13. 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.* **58**, 4049-4054, 1990.
14. 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. *Microb Pathog.* **23**, 303-310, 1997.
15. Laemmli UK.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* **227**, 680-685, 1970.
16. Ramos JL, Martinez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Teran W, Watanabe K, Zhang X,

- Gallegos MT, Brennan R, Tobes R.: The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev.* **69**, 326-356, 2005.
17. Robert F. Weaver.: Molecular biology, 4th edition. (杉山弘 (監訳) ウィーバー分子生物学第 4 版) , 化学同人,東京, **140**, 2008.
18. Fine PE.: The BCG story: Lessons from the past and implication for the future. *Rev Infect Dis.* **11**, S253-S359, 1989.
19. Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, Lerner SP, Malmström PU, Choi W, Guo CC, Lotan Y, Kassouf W.: Bladder cancer. *Lancet.* **388**, 2796-2810, 2016.
20. Hayashi D, Takii T, Mukai T, Makino M, Yasuda E, Horita Y, Yamamoto R, Fujiwara A, Kanai K, Kondo M, Kawarazaki A, Yano I, Yamamoto S, Onozaki K.: Biochemical characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG substrains. *FEMS Microbiol Lett.* **306**, 103-109, 2010.
21. Aguirre-Blanco AM, Lukey PT, Cliff JM, Dockrell HM.: Strain-dependent variation in *Mycobacterium bovis* BCG-induced human T-cell activation and gamma interferon production in vitro. *Infect Immun.* **75**, 3197-3201, 2007.
22. Belley A, Alexander D, Di Pietrantonio T, Girard M, Jones J, Schurr E, Liu J, Sherman DR, Behr MA.: Impact of methoxymycolic acid production by *Mycobacterium bovis* BCG vaccines. *Infect Immun.* **72**, 2803-2809, 2004.
23. Dubos RJ, Pierce CH.: Differential characteristics in vitro and in vivo of several substrains of BCG. IV. Immunizing effectiveness. *Am Rev Tuberc.* **74**, 699-717, 1956.
24. Spreadbury CL, Pallen MJ, Overton T, Behr MA, Mostowy S, Spiro S, Busby SJ, Cole JA.: Point mutations in the DNA- and cNMP-binding domains of the homologue of the cAMP receptor protein (CRP) in *Mycobacterium bovis* BCG: implications for the inactivation of a global regulator and strain attenuation.

Microbiology. **151**, 547-556, 2005.

25. Liu K, Yu J, Russell DG.: pckA-deficient *Mycobacterium bovis* BCG shows attenuated virulence in mice and in macrophages. *Microbiology*. **149**, 1829-1835, 2003.

26. De Vos M, Müller B, Borrell S, Black PA, van Helden PD, Warren MR, Gagneux S, Victor TC.: Putative Compensatory Mutations in the *rpoC* Gene of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Are Associated with Ongoing Transmission. *Antimicrob Agents Chemother*. **57**, 827-832, 2013.

27. Trivedi OA, Arora P, Vats A, Ansari MZ, Tickoo R, Sridharan V, Mohanty D, Gokhale RS.: Dissecting the mechanism and assembly of a complex virulence mycobacterial lipid. *Mol Cell*. **17**, 631-643, 2005.

28. Chan J, Flynn JL.: Nitric oxide in *Mycobacterium tuberculosis* infection. In Fang F.C. ed ; Nitric Oxide and Infection. Springer US, New York. 281-410, 1999.

29. Brennan RG, Matthews BW.: The helix-turn-helix DNA binding motif. *J. Biol. Chem*. **264**, 1903-1906, 1989.

30. Cuthbertson L, Nodwell JR.: The TetR family of regulators. *Microbiol Mol Biol Rev*. **77**, 440-475, 2013.

31. Yu Z, Reichheld SE, Savchenko A, Parkinson J, Davidson AR.: A comprehensive analysis of structural and sequence conservation in the TetR family transcriptional regulators. *J Mol Biol*. **400**, 847-864, 2010.

32. Mattow J, Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Lamer S, Zimny-Arndt U, Hagens K, Müller EC, Kaufmann SH.: Identification of proteins from *Mycobacterium tuberculosis* missing in attenuated *Mycobacterium bovis* BCG strains. *Electrophoresis*. **14**, 2936-2946, 2001.

33. Mollenkopf HJ, Grode L, Mattow J, Stein M, Mann P, Knapp B, Ulmer J, Kaufmann SH.: Application of mycobacterial proteomics to vaccine design: improved protection by *Mycobacterium bovis* BCG prime-Rv3407 DNA boost vaccination against tuberculosis. *Infect Immun.* **72**, 6471-6479, 2004.
34. Sogi KM, Gartner ZJ, Breidenbach MA, Appel MJ, Schelle MW, Bertozzi CR.: *Mycobacterium tuberculosis* Rv3406 is a type II alkyl sulfatase capable of sulfate scavenging. *PLoS One.* **8**, e65080, 2013.
35. Neres J, Hartkoorn RC, Chiarelli LR, Gadupudi R, Pasca MR, Mori G, Farina D, Savina S, Makarov V, Kolly GS, Molteni E, Binda C, Dhar N, Ferrari S, Brodin P, Delorme V, Landry V, Ribeiro AL, Venturelli A, Saxena P, Pojer F, Carta A, Luciani R, Porta A, Zanoni G, De Rossi E, Costi MP, Riccardi G, Cole ST.: 2-Carboxyquinoxalines kill *Mycobacterium tuberculosis* through non-covalent inhibition of DprE1. *ACS Chem Biol.* **10**, 705-714, 2015.
36. Ambre Sala, Patricia Bordes and Pierre Genevaux.: Multiple Toxin-Antitoxin Systems in *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxins.* **6**, 1002-1020, 2014.
37. Zhang YX, Guo XK, Wu K, Bi B, Ren SX, Wu CF, Zhao GP.: Characterization of a novel toxin-antitoxin module, VapBC, encoded by *Leptospira interrogans* chromosome. *Cell Research.* **14**, 208-216, 2004.
38. Yamaguchi Y, Park JH, Inouye M.: Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Genet.* **45**, 61-79, 2011.
39. Mollenkopf HJ, Grode L, Mattow J, Stein M, Mann P, Knapp B, Ulmer J, Kaufmann SH.: Application of mycobacterial proteomics to vaccine design: improved protection by *Mycobacterium bovis* BCG prime-Rv3407 DNA boost vaccination against tuberculosis. *Infect Immun.* **72**, 6471-6479, 2004.

40. Schuck SD, Mueller H, Kunitz F, Neher A, Hoffmann H, Franken KL, Repsilber D, Ottenhoff TH, Kaufmann SH, Jacobsen M.: Identification of T-Cell Antigens Specific for Latent *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *PLoS ONE*. **4**, e5590, 2009.
41. Muñoz L, Stagg HR, Abubakar I.: Diagnosis and management of latent tuberculosis infection. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. **79**, 127-133, 2016.
42. Getahun H, Matteelli A, Chaisson RE, Raviglione M.: Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *N Engl J Med*. **372**, 2127-2135, 2015.
43. Dutta NK, Karakousis PC.: Latent tuberculosis infection: myths, models, and molecular mechanisms. *MicrobiolMolBiol Rev*. **78**, 343-371, 2014.
44. 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. **88**, 497-512, 2013.

表 1. 本研究に使用したプライマー

名 称	配 列 (5'-3')
3405c F	GGGGGATCCGGATGACTACGCGTCCGG
3405c R	GGGCTCGAGGTGCGGTTCCAAGATCCGGGCTACCGC
113-pET-22b R	GGGATGCATCGGGCTTTGTTAGCAGCCGG
3406-RT F	AAGGCGAACCGCTGGCACACCGAC
3406-RT R	GAAGTCCGGCTTCTCGAACACCTGAC
3407-RT F	GGGACTAGTATGCGTGCTACCG
3407-RT R	GGGCTCGAGCTGCTCGTCGCGCATTTTCG
3408-RT F	AGGGCGAGGACGCGGCGACAAGCAC
3408-RT R	TAGGGTGGCCGGTCCGATCGTTTCAG
3406-RT2 F	GGGACTAGTATGACAGATCTGATTACCG
3405c-pCR F	CATATGACTACGCGTCCGGCAACCGAC
3405c-pCR R	CTCGAGGTGCGGTTCCAGGATCCGGGCTAC
AcGFP F	GAGGTTCGATAGGTATCGATGTCTAGAG
AcGFP R	GGGACTAGTCTACTTGTACAGCTCATCCATG
Rv3405c-D F	GGGACTAGTCGCCATGCCTGGCCTGCAGATCG
Rv3406 R	GGGCTCGAGGCCAGCGATCTCCATCGGCGCCC
NN2/ <i>Spe</i> I F	GGGACTAGTCCTGGTGTCCCCGTATGCCCACTAG
NN2/ <i>Nde</i> I R	GCGCAAGCTTCATATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCC
3405c-211 F	GGGGGATCCATGGATCACCTGGGCACGAAGCTG
3405c-184 R	GGGTCAGATCCGGGCTACCGCATCGT
3405c-183 R	GGGTCAGGATCCGGGCTACCGCAT
3406-100 F	GGGTCTAGATGGGCATCTTGCGGCGGTTCG
3406-62 F	GGGTCTAGATCCGGCTACAGTAACCGATG
3406-46 F	GGGTCTAGATGTAGTCATCTGACTACACTAAC
AcGFP2 F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
3406-1 R	GCTGGCGTCCTCAATTGAATGG
PAL F	CTAACCATTTCATTGAGGACG
PALM1 R	CGTATTCAGATGACTACATCGGTTAC
PALM2 R	CTGCTGTCGATGACTACATCGGTTACTG
EMSA Fw	TTGCCGGACGCGTAGTCATC
EMSA Rv	ACGGTAATCAGATCTGTCAT
Bi-EMSA F	TTGCCGGACGCGTAGTCATC
Bi-EMSA R	ACGGTAATCAGATCTGTCAT

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 歯科矯正学分野

(指導 上岡 寛教授)

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 90 回日本細菌学会総会 (2017 年 3 月, 仙台)

図の説明

図1 各株の Rv3405c タンパク質のアミノ酸配列の比較

各株の Rv3405c タンパク質のアミノ酸配列を比較した。太字は helix-turn-helix ドメインにおいて鍵となるアミノ酸を示す。BCG Pasteur 株と同じアミノ酸を.で示す。下線は、Rv3405c 遺伝子に欠失が生じたことによって配列が変化したアミノ酸配列を示す。*は、終始コドンを示す。数字は、N 末端側から数えたアミノ酸数を示す。

図2 Rv3405c 遺伝子導入株における Rv3406-GFP の発現

A. pNN2 にクローニングした DNA 断片の構造を模式図で示す。1, p6G(II); 2, p6G(I); 3, p6G(I/II); 4, p6G(I/IIC); 5, p6G(II184); 6, p6G(II183)。野生型の Rv3405c 遺伝子の下部に記載した数字は N 末端側から数えたアミノ酸数を示す。

B. プラスミド導入株の蛍光顕微鏡像。A に示した DNA 断片を含む各プラスミドを I 型菌あるいは II 型菌に導入後、KM 20 µg/mL を含む 7H10-ADC 寒天培地に播種し、37°C で 21 日間培養した。形成されたコロニーを、蛍光顕微鏡（励起波長：490 nm）を用いて観察した。1, p6G(I)導入 I 型菌; 2, p6G(I)導入 II 型菌; 3, p6G(I/II)導入 I 型菌; 4, p6G(II)導入 I 型菌; 5, p6G(II184)導入 I 型菌; 6, p6G(II183)導入 I 型菌; 7, p6G(I/IIC)導入 I 型菌。

図3 GFP の発現を用いた Rv3406 プロモーター領域の検索

A. Rv3405c 遺伝子から Rv3406 遺伝子領域におけるゲノム DNA の構造を模式的に示した。-10 領域は Rv3405c 遺伝子と Rv3406 遺伝子の遺伝子間領域（塩基番号-55~-50）に存在すると推測された。-35 領域は Rv3405c 遺伝子内（塩基番号-79~-74）に存在すると推測された。パリンδροーム配列は塩基番号-44~-27 に存在する。

B. GFP 遺伝子上流に連結させる Rv3406 遺伝子上流の DNA 断片を図で示した。pPROG100 は-35、-10 領域をともに含む断片、pPROG62 は-10 領域のみを含む断片、pPROG46 は-35 領域、-10 領域をともに含まない断片となるように設計した。

C. プラスミド導入株の蛍光顕微鏡像。pPROG100、pPROG62、pPROG46 を I 型菌に導入後、KM20 µg/mL を含む 7H10-ADC 寒天培地に播種し、37°C で 21 日間培養した。形成されたコロニーを、蛍光顕微鏡（励起波長：490 nm）を用いて観察した。1, pPROG100; 2, pPROG62; 3, pPROG46。

図4 ゲルシフトアッセイに用いた DNA プローブの塩基配列

A. ゲルシフトアッセイに用いた DNA プローブの塩基番号-54 から-17 の領域の塩基配列を示す。WT と同じ塩基を.で示す。パリンδροーム配列（塩基番号-44 から-27）は下線で示す。

B. 各プローブにおけるパリンδροーム領域の二次構造を模式的に図示した。太字は、塩基

の置換を行ったことを示す。点線は相補的な塩基対であることを示す。

図5 Rv3405c 遺伝子が Rv3406、Rv3407 および Rv3408 の各遺伝子の発現に与える影響
各株から得られた cDNA を鋳型とし、Rv3406 (A)、Rv3407 (B) および Rv3408 (C) の各遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR 法を行った。この PCR 法によって想定されるバンドサイズは、順に 245 bp、318 bp、190bp である。反応後の試料 10 μ L を、2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。1, I 型菌; 2, II 型菌; 3, pNN(II)H 導入 I 型菌; 4, pNN2 導入 I 型菌。

図6 I 型菌、II 型菌における Rv3406 遺伝子から Rv3408 遺伝子の領域の PCR 産物

A. ゲノム上における Rv3406、Rv3407 および Rv3408 の各遺伝子と用いたプライマーの位置関係を示す。この PCR 法によって想定されるバンドサイズは 1,496 bp である。

B. I 型菌と II 型菌から得られた cDNA を鋳型とし、Rv3406 遺伝子に特異的なプライマー Rv3406-RT2 F と Rv3408 遺伝子に特異的なプライマー 3408-RT R を用いて PCR 法を行うことで、融合転写産物の有無の確認を行った。反応後の試料 10 μ L を、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。1, I 型菌; 2, II 型菌。

図7 変性条件下、非変性条件下における Rv3405c タンパク質の性状解析

ヒスチジンタグ融合組換え Rv3405c タンパク質を試料とした SDS-PAGE を行い、一次抗体として His Tag Antibody Recombinant Monoclonal Mouse IgG1 Clone、二次抗体として horseradish peroxidase 標識抗マウス IgG 抗体を用いて分析を行った。A, 変性条件下; B, 非変性条件下。1, 分子量マーカー; 2, 試料。

図8 ヒスチジンタグ融合組換え Rv3405c タンパク質と各 DNA プローブとの結合実験

ヒスチジンタグ融合組換え Rv3405c タンパク質と WT DNA プローブ (A)、Mut1 DNA プローブ (B)、および Mut2 DNA プローブ (C) を用いて、DNA-タンパク質結合反応を行った。反応後の試料を 5%ポリアクリルアミドゲルで泳動した。1, 標識 DNA のみ (陰性対照); 2, タンパク質とビオチン標識 DNA プローブ (結合実験); 3, タンパク質、標識 DNA プローブおよび 200 倍量の非標識 DNA プローブ (競合実験)。

図9 パリンドローム領域と Rv3406 遺伝子の転写翻訳との関連性

プラスミド導入株の蛍光顕微鏡像。p6G(I)、p6G(IM1)、p6G(IM2) を II 型菌に導入後、KM 20 μ g/mL を含む 7H10-ADC 寒天培地に播種し、37°C で 21 日間培養した。形成されたコロニーを、蛍光顕微鏡 (励起波長: 490 nm) を用いて観察した。1, p6G(I); 2, p6G(IM1); 3, p6G(IM2)。

付録 1 pPROG100、pPROG62、pPROG46 の作製図

pPROG100、pPROG62、pPROG46 のプラスミドの作製手順を模式的に示した。