

# 病原性結核菌強毒株H37Rvプロモーターのシステマティックな総合的検索

● 荒牧弘範

第一薬科大学・薬学部

## 研究の目的と進め方：

ゲノム計画において、全ゲノムの塩基配列の決定から生物の分子的な理解に到る道には解決しなければならない問題が多く残されている。ゲノム計画が生物学に本当に寄与するために解決しなければならない問題の一つにプロモーターをゲノムにマップすることがある。ゲノム塩基配列からのプロモーターの理論予測は最も転写に関する情報が豊かな大腸菌ですら実用的な域には達しておらず、今も個々のプロモーターに対しての実験による検証が必要とされている。細胞を用いた実験がもっとも正確であるが、病原細菌では培養に危険が伴い容易な実験ではない。

現在、結核は世界的に危機的な状況にある感染症の一つであり、我が国でも1999年7月に「結核緊急事態宣言」(厚生大臣)がなされ、高齢期における結核の再発、多剤耐性結核菌の出現などが深刻な問題となっている。1998年に強毒株Mycobacterium tuberculosis H37Rvの全ゲノムの塩基配列が決定されたが、この菌の転写の研究は、上記の困難に加えて、シグマ因子が13種類もあること、大腸菌内では遺伝子が発現しないこと、封じ込め施設(P3)が必要なことから、国内外を問わず進展が遅々としており、新しい方法論の開発が切望されている。

本研究では、ポストゲノム計画の一環として、生化学とバイオインフォマティクスとの融合により、リエマージング感染症のひとつの原因である結核菌強毒株のプロモーターを、生化学とバイオインフォマティクスとを総合的に利用することにより、実用的で危険の無い固定化酵素を用いた新手法で探索することである(図)。

本研究で得られる成果は結核菌の転写機構の一般的な理解に止まるものではなく、現在まだ不明である病原性にかかわる遺伝子の転写機構を明らかにして、感染症の制御やワクチン開発の基盤をあたえる意義あるポストゲノム計画である。

## 1. 研究開始時の当初計画：

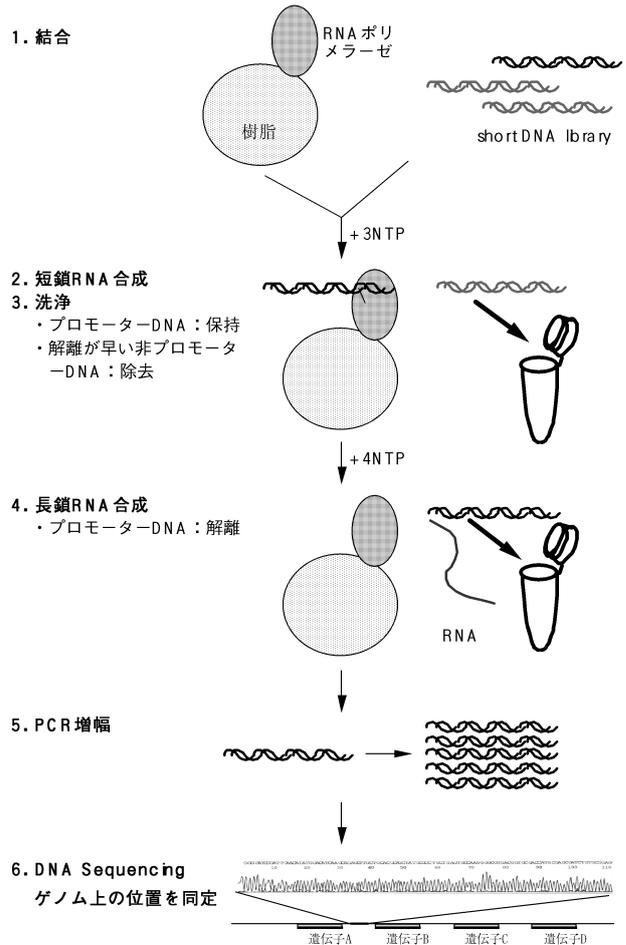
### (2001年)

- ① ゲノムでの出現頻度から設計されたプライマーを用いたPCRによって構築したM. tuberculosis ゲノムライブラリーを作製する。
- ② 大腸菌多量発現系を用いてM. tuberculosisの異なるシグマ因子をもつ13種のリコンビナントホロ酵素をそれぞれ精製し、13種の固定化ホロ酵素を調製する。

### (2002年)

- ③ 構築したM. tuberculosis ゲノムライブラリー(特許の項参照)から、それぞれの固定化ホロ酵素を調製する。
- ④ 固定化ホロ酵素に高い親和性を持ち、かつ1サイクルの転写に伴って解離されるDNA断片を選択する。選択されたDNA断片の塩基配列を決定したのち、シグマ型ごとにプロモーター配列を整理し、各々の共通性を探る。
- ⑤ 上記の新選別法では、遺伝子発現に転写因子が必要な

場合、プロモーターを含むDNA断片は得られない。その際、転写因子が必要となるので、結核菌H37Rvの転写因子を、既知の他の菌種の転写因子のドメインごとのホモロジー検索を基本として解析した。



プロモーターを含むDNA断片の新選別法

## 2. 研究期間の成果：

- ① ゲノムライブラリーを作製にするにあたり、P3施設を用いずに多量にゲノム全体をカバーできるようなDNAが得られるような計画にした。まず、M. tuberculosisの全ゲノム塩基配列から10merの出現頻度の高いDNA塩基配列を国立遺伝学研究所生命情報研究センター福地博士の協力を得て抽出した(図1A)。それらの一部をプライマーとして用いてランダムPCRを行い、プロモーター検索用のゲノムライブラリーを作製した(図1B)。PCRの条件は、94℃ 1minを1サイクル、(95℃ 1min, 37℃ 1min, 72℃ 2min)を45サイクル行った。(図1B)に示すように、Oligo1と4との組み合わせでパン

A) 頻出フラグメントの上位10位

	a	b
1. GCCGGCGCCG	437	0.01
2. CGGCGCCGCC	412	0.01
3. CGCCGGCGCC	405	0.01
4. GCCGTTGCCG	401	0.01
5. CGCCGTTGCC	396	0.01
6. GCCGCCGCCG	381	0.01
7. CGGCGCCGGC	375	0.01
8. CGTTGCCGCC	375	0.01
9. CCGGCGCCGC	369	0.01
10. GCGCGCCGCG	360	0.01

4411523 fragments in 4411529 residues

a:出現する回数 b:10mer 全体に対する割合

B) Random PCR

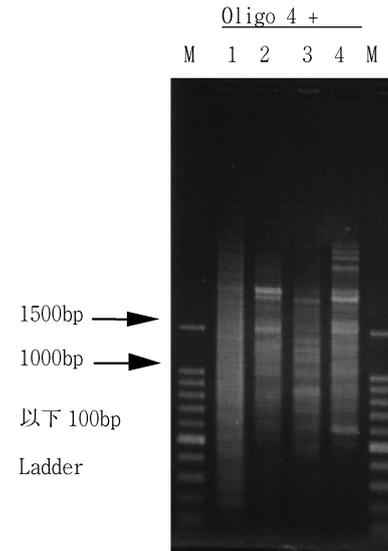


図1. プロモーター検索用のゲノムライブラリーの作製

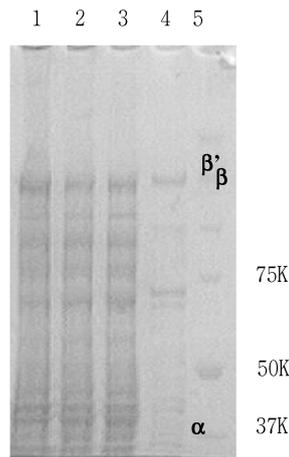


図2. コア酵素 ( $\alpha\beta'$ ) の発現・精製

1. Sonic Ppt
2. Sonic Sup
3. His column Through
4. His column Elution
5. Marker

ドが全体にスミアーに広がっており、このライブラリーを以下の実験に使用した。この手法はバイオインフォマティクスを用いた系統的方法であり、GCに偏った結核菌ゲノムでも成功出来たことから、汎用性がある可能性が高い(特許の項参照)。

②コア酵素を構成する *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* の遺伝子を *M. tuberculosis* H37Rv株のゲノムからPCRによりT7プロモーターをもつプラスミドにクローンした。その際、コア酵素の精製を容易にするため、*rpoC* にHisタグを付加した。大腸菌の発現系により、コア酵素をHisカラムを用いて精製を行った。図2のレーン5に示すように、コア酵素が精製できた。

一方、シグマ因子の多量発現プラスミドの構築には、コア酵素発現プラスミドと大腸菌内で共存できるように、pACYC184 derivativeで、T7プロモーターをもつベクターを構築した。13種類のシグマ遺伝子をH37Rv株のゲノムからPCRによりクローンして、それぞれ発現実験を行った。13種のシグマのうち、7種類 (*sigA*, *sigB*, *sigC*, *sigD*,

*sigG*, *sigI*, *sigJ*)が大腸菌内で発現した。以上のように、T7プロモーターをもつ大腸菌発現系を用いてシグマ因子のひとつずつと大腸菌の中で発現させる系を確立した。

③固定化ホロ酵素を調製するため、ホロ酵素の吸着がよく、DNAに対して非特異的な結合が少ない、新たなオキシラン系の固定化樹脂を開発した。大腸菌の転写系を用いて、核酸や蛋白質の非特異的吸着が転写の解析に問題にならないことを確認した。その固定化樹脂を用いて、7種の固定化ホロ酵素 (*SigA*, *SigB*, *SigC*, *SigD*, *SigG*, *SigI*, *SigJ*)を調製した。

④考案したプロモーター-DNA新選別法を用いて、*SigA*, *SigE*, *SigH*型のプロモーター-DNA断片を収集した。その結果、*SigA*型 (major RNA polymerase) プロモーターは大腸菌の *s70*型プロモーター共通配列 (TTGACA <16/17/bp> TATAAT) と類似したもの、-10配列のみが類似のもの及び類似していないものが得られた。また、*SigH*型 (ECF RNA polymerase) のプロモーターは、ECF型プロモーター共通配列 (CCGGAACCTT <16/17/bp> TCTgA)の-35領域が保存されていた。一方、*SigE*型のプロモーターもECF型であるが、

表1 ポリアミンにより転写レベルで発現上昇する遺伝子群

	Gene
Genes regulated by $\sigma^{38}$ ( $\sigma^S$ )	<i>acnA, aidB, aldB, appB, bolA, cbpA, cfa, dacC, deoD, dps, elaB, fic, frdD, gabP, gadA, gadB, hdeA, hdeB, hyaC, katE, katG, ldcC, msyB, narY, osmC, osmE, osmY, otsA, otsB, pfkB, poxB, psiF, slp, sodC, sufS, talA, treA, treF, uspB, wrbA, xasA, yahO, ybaS, ybaT, ybaY, ybgA, ybgS, ybhE, ybhP, ybjP, ycaC, yccJ, ycfH, ycgB, yddX, ydiZ, yeaG, yebF, yfcG, yfeT, ygaF, yhcO, yhiE, yhiN, yhiU, yhiV, yhjD, yiaG, yjbJ, yidI, yjdJ, yjgR, ynhG, yohF, yqjC, yajD</i>
Genes regulated by Cya	<i>agaZ, cdd, flag, flgM, flhB, fliA, fliD, fliG, fliH, fliI, fliM, fliN, fliQ, malP, manX, manY, manZ, ptsG, sdhA, sdhB, sdhD, tsr, ubp, ugpQ</i>
Genes regulated by FecI ( $\sigma^{18}$ )	<i>fecA, fecB, fecC, fecD, fecE</i>
Genes regulated by Fis	<i>adhE, nuoA, nuoB, nuoD, nuoG, nuoH, nuoI, nuoK, nuoL, hupA, ptsG</i>
Genes regulated by $\sigma^{54}$ ( $\sigma^N$ )	<i>astB, glnH, hycC, hypC, hype, pspA, rtcA, rtcB, oat</i>
Genes regulated by Cra	Activation; <i>acnA</i> Repression; <i>fruB, glk</i>
Genes regulated by H-NS	Activation; <i>flgA, flgI, rplA, rplB, rplC, rplF, rplI, rplK, rplL, rplN, rplQ, rpmG, rpsN, rpsQ, rpsS</i> Repression; <i>appY, aslB, csgA, cspC, cspG, cspI, cyoA, feoB, ftn, gnd, hha, ompC, ompF, pflB, rfaI, rfaK, spy, wcaI, ycbW, ydbD, ydeP, yedV, ygaP, yhiX, ynaE</i>

その共通配列と類似性はなく、共通配列は

aa            c g  
GG (C/A) <18bp> GTT と推定される。  
gc            g c

⑤結核菌H37Rvの転写因子のリストは以下である（国立遺伝学研究所・藤田信之博士との共同研究）。その結果、141～158個を同定できた。その数は、ゲノム配列が公表された43種の微生物の転写因子数とゲノムサイズの相関から、他の微生物より少ないことがわかった。結核菌と同様のMycobacterium属であるライ菌でも同様な傾向が見い出された。

#### 8. 国内外での成果の位置づけ：

sigA, sigBの転写に関する論文が1999年に発表され、2001年にsigHが酸化や熱ストレス応答に関連していることが報告された。しかし、いまだに共通のプロモーター配列は明らかにされていない。本研究のプロモーター選別法は、緑膿菌で応用されている。

#### 9. 達成できなかったこと、予想外の困難、その理由：

SigB, SigC, SigD, SigG, SigI型の固定化ホロ酵素において、プロモーター-DNA新選別法ではDNA断片の収集が進まなかった。その理由は、反応条件が不適のためか、これらの5種の固定化RNAホロ酵素の不活性化ならびにプロモーター検索用のゲノムライブラリーの構築の不備などが考えられる。また、固定化酵素法でのプロモーター-DNA選別において、非特異的なDNA断片のコンタミを招いた。したがって、細胞から抽出したRNAからピオチン基を持つcDNAを合成し、固定化cDNAを用いて転写プラスミドを分離する方法も併用して、13種のシグマタイプ別にプロモーターを検索する必要がある。

#### 10. 今後の課題：

固定化酵素法でのプロモーター-DNA新選別法だけでなく、シグマ遺伝子の変異株を用いて、DNAチップによる遺伝子発現の違い等を比較し、M. tuberculosisのプロモーターのシグマ別分類を完成することが重要である。その結果、結核菌の転写機構の一般的な理解に止まるものではなく、現在まだ不明である病原性にかかわる遺伝子の転写機構を明らかにできると確信する。

#### 11. 研究期間の全成果公表リスト：

1) 論文/プロシーディング：

1.

J. A. Colmer-Hamood, H. Aramaki, J. M. Gaines and A. N. Hamood

Transcriptional analysis of the Pseudomonas aeruginosa toxA regulatory gene ptxR

Canadian Journal of Microbiology, in press (2006)

2. 202262003

H. Aramaki, T. Hirata, C. Hara, M. Fujita and Y. Sagara

Transcription analysis of rpoH in Pseudomonas putida  
FEMS Microbiology Letters, 205:165-169 (2001)

2) データベース/ソフトウェア：なし

3) 特許など：発明の名称：ゲノムライブラリー作製方法、および同方法により作製されたゲノムライブラリー、出願番号：特願2004-59900、発明者：嶋本伸雄、中山秀喜、荒牧弘範、2004年3月3日

4) その他顕著なもの：なし