

氏名	白崎 かおり		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5602号		
学位授与の日付	平成29年9月29日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	BCG に存在する転写抑制因子 Rv3405c の解析		
論文審査委員	久保田 聡 教授	岡元 邦彰 教授	稲葉 裕明 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) が引き起こす結核症は、今なお世界レベルで蔓延し、人々の脅威となっている。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。日本で使用されている 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。両者の違いの一つに、Rv3405c 遺伝子の変異の有無がある。II 型菌では変異が無く野生型であるのに対し、I 型菌では 22 塩基が欠失している。このため、I 型菌における Rv3405c タンパク質の C 末端側のアミノ酸配列は野生型のものとは異なる部分タンパク質となっている。Rv3405c タンパク質は N 末端側に TetR ファミリーに属する転写因子に特徴的な helix-turn-helix ドメインを有する転写抑制因子であることが報告されている。このため、Rv3405c 遺伝子の違いは I 型菌と II 型菌の性状を左右する可能性がある。そこで、Rv3405c 遺伝子の機能を明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

【方法】

1. I 型菌、II 型菌、および野生型の Rv3405c 遺伝子導入 I 型菌から得られた cDNA を鋳型とし PCR 法を行うことで、Rv3406、Rv3407、および Rv3408 遺伝子の発現を確認した。
2. I 型菌と II 型菌から得られた cDNA を鋳型とし、Rv3406 遺伝子と Rv3408 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR 法を行い、融合転写産物の有無を確認した。
3. Rv3405c 遺伝子あるいはその部分遺伝子、および Rv3406-緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合遺伝子を載せたプラスミドを I 型菌に導入した。カナマイシンを 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含む 7H10-ADC 寒天培地に播種し、形成されたコロニーを、蛍光顕微鏡を用いて観察した。
4. 段階的に長さの異なる Rv3406 遺伝子の上流配列と GFP 遺伝子を連結させた融合遺伝子を導入した II 型菌を作製した。3. と同条件で培養し、形成されたコロニーを観察した。
5. 精製したヒスチジンタグ融合組換え Rv3405c タンパク質を供試し、変性および非変性下で SDS-PAGE を行い、ヒスチジンタグ抗体を用いて分析した。
6. Rv3406 遺伝子の上流配列を持つ DNA プローブを作製し、Rv3405c タンパク質とそれぞれ

のプローブとの結合を検討した。

7. Rv3406遺伝子上流配列を含むI型のRv3405c遺伝子およびRv3406-GFP融合遺伝子を導入したII型菌を作製した。3.と同条件で培養し、形成されたコロニーを観察した。

【結果】

1. I型菌ではRv3406、Rv3407、およびRv3408の各遺伝子の転写が認められたが、II型菌と野生型のRv3405c遺伝子導入I型菌においては、これら3つの遺伝子の転写が抑制された。
2. I型菌のcDNAにはRv3406遺伝子からRv3408遺伝子までが一連となったDNA断片が存在することが示唆された。II型菌のcDNAにおいては、Rv3406遺伝子からRv3408遺伝子までが一連となったDNA断片を認めなかった。
3. C末端側のドメインのみを有するRv3405cタンパク質は転写抑制因子として機能しなかった。また、C末端側から5番目までのアミノ酸を欠失させることで、Rv3405cタンパク質は転写抑制因子としての機能を失った。
4. Rv3406遺伝子上流100bpの配列はGFP遺伝子のプロモーターとして機能したが、62bpの配列ではGFPの発現量が著しく低下し、46bpの配列はGFPのプロモーターとして機能しなかった。
5. ヒスチジンタグ融合組換えRv3405cタンパク質の変性試料は単量体の分子量を示し、非変性試料は二量体の分子量を示した。
6. Rv3406遺伝子上流配列を持つDNAプローブとRv3405cタンパク質は特異的に結合したが、プローブ内に存在するパリンドローム配列に変異を導入したDNAプローブとは結合しなかった。
7. Rv3406遺伝子上流配列にあるパリンドローム配列に変異を導入することにより、Rv3406遺伝子の転写が抑制されなくなった。

【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こと。
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に結合する。

これらの結果から、Rv3405cタンパク質は、TetRファミリータンパク質に属する転写因子の特徴を有する転写抑制因子であり、Rv3406、Rv3407、およびRv3408遺伝子から形成されるオペロンの転写を抑制することが示された。Rv3405c遺伝子によって抑制される遺伝子群をさらに解析することで、Rv3405c遺伝子によってもたらされるI型菌とII型菌の細菌学的な性状の差をより詳細に解明していくことは、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、結核症の根絶に寄与するものと考えられる。

論文審査結果の要旨

結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* が引き起こす結核症は、今なお世界レベルで蔓延し、人々の脅威となっている。現在、結核に対しては生菌ワクチンである BCG ワクチンが唯一のワクチンとして使用されている。日本で使用されている 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。両者のゲノム配列の違いの一つに、Rv3405c 遺伝子がある。Rv3405c タンパク質の N 末端側領域には TetR ファミリーの転写因子に特徴的な helix-turn-helix ドメインをもつ転写抑制因子であることが報告されており、この遺伝子は I 型菌と II 型菌の性状を左右する遺伝子の一つとして推測された。本研究では Rv3405c の機能を明らかにすることを目的とし、種々の実験を行った結果、以下の知見が得られた。

1. Rv3406、Rv3407、および Rv3408 の各遺伝子は 1 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 遺伝子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残基までが必要である。
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。

上記の結果は、BCG Tokyo 株の I 型菌と II 型菌の生物学的な違いの一つを明らかにしたものであり、より安全性・効力の高いワクチンの開発等に資する新たな知見となりうるものであると考える。よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。