

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
上岡 寛 印	研究結果の評価
大原 直也 印	研究計画の立案、研究、評価の指導
印	

## 学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 歯科矯正学分野	身分 大学院生	氏名 白崎 かおり
論文題名 BCGに存在する転写抑制因子Rv3405cの解析		
論文内容の要旨（2000字程度）		
<p>【緒言】</p> <p>結核菌 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) 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。</p> <p>【方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>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 µg/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。</li> <li>4. 段階的に長さの異なる Rv3406 遺伝子の 5' 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。</li> <li>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。</li> <li>6. Rv3406 遺伝子の 5' 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。</li> <li>7. Rv3406 遺伝子の 5' 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。</li> </ol>		

## 論文内容の要旨 (2000字程度)

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 遺伝子の上流 100 bp の配列は GFP 遺伝子のプロモーターとして機能したが、62 bp の配列では GFP の発現量が著しく低下し、46 bp 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 遺伝子の上流配列を持つ 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 lind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 遺伝子の上流配列にあるパ lind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 遺伝子の上流に存在するパ lind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。