

smegmatis のカタラーゼ遺伝子のクローニングは PCR 増幅断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行うことによってゲノムライブラリから得た。相同組み換えによる遺伝子の不活性化は遺伝子の一部を欠失させた DNA 断片をマイコバクテリアでは複製不能なプラスミドベクターに連結し、これをエレクトロポレーション法により菌に導入することにより行った。*M. smegmatis* のトランスポゾン Tn611 挿入変異株は Tn611 と温度感受性複製開始点を含むプラスミドを *M. smegmatis* にエレクトロポレーションにより導入し、30°C で培養してコロニーを分離した後、カナマイシン存在下で温度を 39°C に上昇させた時に増殖するコロニーを分離することより得た。

C. 研究結果

まず、*M. smegmatis* のカタラーゼ欠失変異株の分離を行うために、*M. smegmatis* の INH 耐性変異株を 8 株分離し、それらの株からタンパク質画分を抽出してポリアクリルアミドゲル電気泳動後、カタラーゼ活性による染色を行った。その結果、変異株 8 株全てで野生株と同様に、カタラーゼの活性を示す 3 本のバンドが見られ、カタラーゼの欠失は見られなかった。そこで次に、*M. smegmatis* のカタラーゼ遺伝子のクローニングを行った。大腸菌と *Mycobacterium avium* の *katE* 遺伝子の塩基配列を比較することにより作製したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、*M. smegmatis* のゲノム DNA を鋳型に PCR を行い増幅断片を得た。得られた増幅断片の塩基配列を決定したところ、大腸菌の *katE* 遺伝子と約 65% のホモロジーが見られた。この断片を利用し、*M. smegmatis* の *katE* 遺伝子の全域を含む DNA 断片を得た。また、*katG* 遺伝子についても同様に PCR 増幅して調べたところ大腸菌 *katG* 遺伝子と約 60% のホモロジーが見られた。これらの断片を使用して、相同組み換えによるカタラーゼ遺

伝子の不活化を試みた。染色体上に導入 DNA 断片の組み込みが行われたコロニーを分離し、その組み込まれた位置を PCR 及びサザンハイブリダイゼーションによって調べたが、導入した DNA 断片は染色体上でランダムな場所に組み込まれており、カタラーゼ遺伝子の不活性化を起こしたものは得られなかった。そこで、*M. smegmatis* のトランスポゾン Tn611 挿入変異株 500 株を分離し、その H₂O₂ 感受性を調べた。野生株の H₂O₂ に対する最小発育阻害濃度 (MIC) が 0.01% であったのに対し、調べた Tn611 挿入変異株のうち 1 株の MIC が 0.005% と低下していた。この株のカタラーゼ活性を調べた結果、野生株と同様の活性発現が見られた。

D. 考察

結核菌では *katG* 遺伝子に変異を起こしてカタラーゼを産生しない変異株は結核治療薬 INH に対して耐性になることが知られており、また逆に INH 耐性の臨床分離株の 50~70% は *katG* 遺伝子に変異を持つことが報告されている。そこで、INH 耐性 *M. smegmatis* のカタラーゼ活性を調べたが、親株と比較して変化を起こしているものはなかったことから、結核菌と *M. smegmatis* では INH 耐性に関する主なメカニズムが異なると考えられる。結核菌は *katG* 遺伝子によってコードされるカタラーゼパーオキシダーゼのみをカタラーゼとして持つことが示されているが、その他の多くのマイコバクテリアでは他に *katE* 遺伝子によってコードされるカタラーゼをも有していることが知られている。また、らい菌はそのどちらも持たないことが我々の研究により明らかとなっている。*M. smegmatis* のカタラーゼ活性染色では、3 本の活性バンドが見られたことから、*katG*、*katE* 遺伝子以外のカタラーゼ遺伝子の存在も考えられる。一方、Tn611 挿入変異株で H₂O₂ 感受性を示した株に正常なカタラーゼ活性が見られたことから、H₂O₂ 耐性に関してカタラーゼ以外

の因子の関与が示唆された。

E. 結論

M. smegmatis から 2 種類のカタラーゼ遺伝子 *katE*、*katG* を分離同定した。これらは大腸菌の *katE*、*katG* 遺伝子とそれぞれ約 65%、60%の相同性があった。また、マイコバクテリアの H₂O₂ 耐性についてカタラーゼ以外の因子の関与が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nakata, N.

The absence of a catalase function in *Mycobacterium leprae*.

Indian Journal of Leprosy (1999) (印刷中)

(2) Matsuoka, M., Izumi, S., Budiawan, T., Nakata, N., and Saeki, K.

Mycobacterium leprae DNA in dayly using water as a possible source of leprosy infection.

Indian Journal of Leprosy (1999) (印刷中)

2. 学会発表

(1) 中田 登、甲斐雅規、笹川千尋
らい菌のカタラーゼ遺伝子に関する解析 第 71 回日本細菌学会総会、平成 10 年 4 月

(2) 中田 登、松岡正典、甲斐雅規、柏原嘉子
らい菌のカタラーゼ遺伝子に関する解析 第 71 回日本ハンセン病学会総会、平成 10 年 6 月

(3) 松岡正典、中田登、和泉眞蔵、佐伯圭介、Teky Budiawan
ハンセン病流行地における生活用水からのらい菌遺伝子の検出
第 71 回日本ハンセン病学会総会、平成 10 年 6 月

(4) Singh R. P., Kai M., Gidoh M., Nakata N., Endoh M., Kobayashi K. and Saito H.

The possible role of interleukin (IL) 12 and interferon-g-inducing factor/IL-18

in protection against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. 15th International Congress on Leprosy, 1998

(5) Matsuoka M., Kashiwabara Y., Gidoh M., Kai M., Maeda S., Nakata N., Nagao E. and Kinjoh K.

Rifampin resistant *Mycobacterium leprae* isolated from japanese patients and mutation in *rpoB* gene.

15th International Congress on Leprosy, 1998

(6) 甲斐雅規、中田登、儀同政一、松岡正典、柏原嘉子

抗酸菌の DDS 耐性にかかわる遺伝子のクローニング

第 72 回日本細菌学会総会 平成 11 年 3 月

分担研究報告書

P450型一原子酸素添加酵素に関する研究

分担研究者 青山 由利 創価大学工学部 助教授

研究要旨

らい菌と同じMycobacterium属に属する結核菌に存在するステロール14脱メチル化P450(CYP51)類似遺伝子が、らい菌にも存在するかをPCRにより検討した。今回用いたPCRの条件下では、らい菌ゲノムで増幅される遺伝子は見いだせなかった。そこでまず、結核菌に存在するCYP51類似タンパク質の機能と病原性との関りを解析するために、この遺伝子をクローニングし大腸菌に発現させた。発現CYP51類似タンパク質は、哺乳動物や酵母のCYP51と同様の特徴を有していることが明かとなった。

A.研究目的

らい菌を含むMycobacterium属で感染症との関りで重要な種属のゲノム解析が進んでおり、全ゲノムが明らかになった結核菌ゲノムに多くのP450と推定される遺伝子配列が見いだされた。その中で、真核生物に特徴的と考えられるステロールの生合成に關与するステロール14脱メチル化P450分子種(CYP51)の存在も示唆された。

Mycobacterium属にステロールが存在するかどうかは不明であるが、本研究ではMycobacterium属のCYP51の機能を明らかにすると共に、病原性との関係について解析することを目的とした。

B. 研究方法

らい菌ゲノムDNAをテンプレートにして、結核菌ゲノムのCYP51類似遺伝子中の配列をプライマーとして、PCRを行なった。また、結核菌ゲノムDNAを用いたPCRも行ない、結核菌CYP51類似遺伝子をクローニングした。得たクローンをpCWori⁺ (Dr. Watermanより供与)に導入して、大腸菌での発現ベクターpCWmyco51を得た。大腸菌JM109をこのベクターで形質転換して培養を行ない、大腸菌内に発現させたCYP51類似タンパク質の性質を解析した。

C.研究結果

結核菌ゲノムのCYP51類似遺伝子配列中のCYP51の保存領域の配列を基にプライマーを設計し、らい菌ゲノムDNAをテンプレートにしてPCRを行なったが、予想されるDNA断片(約800bp)は見いだせなかった。

結核菌ゲノムDNAを用いてCYP51類似遺伝子全長(1356bp)のPCRを行ない、CYP51類似遺伝子をクローニングした。このクローンを大腸菌発現ベクターに導入して得たpCWmyco51で、形質転換

した大腸菌JM109を培養し、CYP51タンパク質を大腸菌内に発現させた。発現大腸菌には、SDS-PAGEで推定分子量50Kの位置にバンドが認められた。大腸菌の可溶性画分には、P450の特徴的な還元型CO結合スペクトルが検出された。大腸菌培養液1L当り、795nmolのP450が発現していた。

大腸菌可溶性画分の発現P450を用いて、CYP51と結合して強力に反応を阻害するアゾール系抗真菌剤との結合をスペクトル的に解析した。アゾール系抗真菌剤は親和性高く結合し、大腸菌可溶性画分に発現したCYP51類似タンパク質は、CYP51と同様の性質を有していた。この結核菌CYP51の機能については、CYP51への電子伝達成分に動物のNADPH-P450還元酵素を用いた検討などを行なったが、まだ不明であるため活性の測定は出来ず今後の課題となった。

D.考察

らい菌ゲノムDNAをテンプレートにして行なったPCRで、予想されるDNA断片は見いだせなかったことから、らい菌にはCYP51類似遺伝子は存在しないと推定されたが、PCRの条件などの問題はまだ残されている。

大腸菌で発現させた結核菌CYP51類似タンパク質は、酵母や動物のCYP51と同様のアゾール系抗真菌剤との親和性を示し、CYP51のP450分子種であることが明らかとなった。しかし、酵母や動物のCYP51は膜結合型であるのに対して、結核菌CYP51は膜結合部分が無い可溶性タンパク質であった。結核菌CYP51がどのような機能を果たしているのか興味あるところであるが、結核菌やらい菌を含めたMycobacterium属一般にCYP51が存

在するのか、機能と病原性との関りはあるのかなど解析する必要があると考えられた。

E. 結論

らい菌ゲノムDNAに結核菌ゲノム中のCYP51類似遺伝子が存在するかをPCRにより検討したが、予想DNA断片は見いだせなかった。

結核菌CYP51類似遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させたところ、発現結核菌CYP 51類似タンパク質は、哺乳動物や酵母のCYP51と同様の特徴を有しており、CYP51のP450分子種であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aoyama, Y., Horiuchi, T., Gotoh, O., Noshiro, M. and Yoshida, Y.
“CYP51-Like Gene of *Mycobacterium tuberculosis* Actually Encodes a P450 Similar to Eukaryotic CYP51”
J. Biochem., 124, 694-696 (1998)

2. 学会発表

- 1) Yoshida, Y., Aoyama, Y., Noshiro, M., Horiuchi, T. and Gotoh, O.
Structural evolution of P450 and diversification of substrate specificity”
Fourth International Symposium on P450 Biodiversity and Biotechnology,
July 1998, Strasbourg (France)
- 2) Aoyama, Y., Nitahara, Y., Horiuchi, T., Noshiro, M. and Yoshida, Y.
“Purification and characterization of rat sterol 14-demethylase (CYP51) expressed in *Escherichia coli*”
Fourth International Symposium on P450 Biodiversity and Biotechnology,
July 1998, Strasbourg (France)
- 3) Yabusaki, Y., Kishimoto, K., Gotoh, O., Aoyama, Y. and Yoshida, Y.
“Molecular modeling of rat sterol 14-demethylase (CYP51)”
Fourth International Symposium on P450 Biodiversity and Biotechnology,
July 1998, Strasbourg (France)

- 4) Yamashita, C., Aoyama, Y., Hori, K., Kudo, M. and Yoshida, Y.
“Effect of isoprenoid-substituted imidazoles on drug-metabolizing P450”
July 1998, Montpellier (France)
- 5) 岸本加恵、藪崎義康、後藤修、青山由利、吉田雄三
「ラットのステロール14脱メチル化P450 (CYP51) の分子モデリング」
第71回日本生化学会 1998年10月
- 6) 仁田原優子、青山由利、能城光秀、堀内忠郎、吉田雄三
「大腸菌で発現したラットのステロール14脱メチル化P450 (CYP51) の精製と性質」
第71回日本生化学会 1998年10月
- 7) 山下推加、青山由利、能城光秀、堀内忠郎、吉田雄三
「ラット諸臓器におけるステロール14脱メチル化P450の発現」
第71回日本生化学会 1998年10月
- 8) 山下推加、青山由利、堀内忠郎、能城光秀、吉田雄三
「ラットにおけるステロール14脱メチル化P450の臓器分布」
第48回日本薬学会近畿支部大会 1998年10月
- 9) 山下推加、青山由利、工藤道誠、堀公彦、田井中均、吉田雄三
「薬物代謝P450に対するアゾール化合物阻害作用の解析」
第13回日本薬物動態学会年会 1998年11月
- 10) 山下推加、石田広子、青山由利、能城光秀、吉田雄三
「ステロール14脱メチル化P450発現レベルに対するインスリンの影響」
日本薬学会第119年会 1999年3月
- 11) 吉田雄三、山下推加、青山由利、能城光秀、後藤修、浅井健太郎、小此木研二
「ステロール14脱メチル化P450 (CYP51) に関する最近の話題」
日本農芸化学会1999年大会シンポジウム
1999年3月