

原 著

*Mycobacterium phlei* のリボソーム RNA 遺伝子の解析

鈴木 定彦・山田 毅

大阪大学微生物病研究所結核病理部門

受付 昭和 62 年 6 月 16 日

ANALYSIS OF GENES FOR RIBOSOMAL RNA IN *MYCOBACTERIUM PHELI*

Yasuhiko SUZUKI\* and Takeshi YAMADA

(Received for publication June 16, 1987)

The number of rRNA genes in *Mycobacterium phlei* was determined by means of Southern hybridization analysis. The results indicated that *M. phlei* possesses at least and probably 2 sets of rRNA genes. Based on the results together with our previous reports on *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium lepraemurium*, the relationship between slow growth and rRNA genes was discussed.

**Key words** : rRNA genes, slow growth, *Mycobacterium phlei*

**キーワード** : リボソーム RNA 遺伝子, 遅発育性, *Mycobacterium phlei*

## はじめに

ミコバクテリアの細菌学的特徴の一つは、増殖が遅いことである。*Mycobacterium phlei* はミコバクテリアのなかでは、迅速発育性の菌であるが、大腸菌に比べると発育は非常に遅い。病原性結核菌が活性マクロファージのなかでリゾチームによる消化を受けにくい原因は、その遅発育性の故であるとする説がある<sup>1)</sup>。

この遅発育性の原因は、単純ではない。多くの研究者がこの問題に取り組んだが、いまだに明快な解答は報告されていない。我々は抗酸菌の蛋白合成系に焦点をしばり研究を進め、この蛋白合成系に遅発育性の原因の一つがあると説を提唱してきた<sup>2)3)5)6)</sup>。

抗酸菌のリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子の数は、他の増殖の速い菌に比べ少ないので、おそらくリボソームの数も少ないであろう、それ故に蛋白の合成量も少ないであろう、これが遅発育性をもたらす原因の一つであ

ろうとする説である<sup>2)3)5)6)</sup>。

*Mycobacterium bovis* BCG<sup>2)</sup>, *Mycobacterium lepraemurium*<sup>3)</sup> は一つの, *Mycobacterium smegmatis*<sup>4)~6)</sup>, *Mycobacterium phlei*<sup>5)6)</sup>, *Mycobacterium intracellulare*<sup>5)6)</sup> では二つ以上おそらく二つの rRNA 遺伝子群を有することは既に報告した。そのなかで *M. bovis* BCG, *M. lepraemurium* については詳細な論文<sup>2)3)</sup> を発表した。本論文では, *M. phlei* についての詳細を発表し, 抗酸菌の進化論的問題と遅発育性の問題を議論する。

## 実験方法

*M. phlei* ATCC 11758 株を使用した。glycerol broth にて 37°C 振盪培養を行い exponential phase に集菌した。DNA の分離精製は前報<sup>2)3)</sup> のごとくである。即ち 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)-1 mM EDTA に菌を suspend し, 1 mg/ml の lysozyme を加え,

\* From the Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Yamada-oka 3-1, Suita City 565 Japan.

37°C, 15分間加温後, 1% SDSにて菌体を溶解し, phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)を加えDNAを抽出した。DNAはCsCl-ethidium bromide遠心法にて精製した。精製DNAをSal I, Pst I, Bam HIで切断し, 0.8%アガロースゲルにて電気泳動を行い, BCG菌から分離精製したrRNAをプローブとし, Southern hybridization<sup>7)</sup>を前報のごとく行った<sup>2)3)</sup>。rRNAプローブは0.1 M Tris-HCl (pH 9.7)にて90°C 15分間限定分解した後, エタノールで沈殿させた後蒸留水に溶解し,<sup>32</sup>Pで5'末端を polynucleotide kinaseにより標識した<sup>2)3)</sup>。その他の実験方法は前報に述べたごとくである<sup>2)3)</sup>。

### 実験結果

*M. phlei*のrRNA遺伝子の解析結果を図に示した。Sal I, Pst Iで切断したDNAでは, 16Sと23S rRNAプローブいずれに対しても二つのバンドが観察された。Bam HI切断では, 16S rRNAプローブに対しては, 6.2 kbp, 5.9 kbp, 2.3 kbp, 1.45 kbp, 1.4 kbpの非常に薄いバンドが観察された。23S rRNAプローブ

に対しては, 2.3 kbpの濃いバンドと5.9 kbpの薄いバンドが検出された。

### 考 察

既に報告したように<sup>2)</sup>, BCG菌では16S rRNA遺伝子は約1.4 kbp, 23S rRNA遺伝子は2.95 kbp, 16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子の間が約0.28 kbp, 合わせて4.63 kbpの大きさの16S~23S rRNA遺伝子群を持っている。しかるに*M. phlei*のDNAをSal Iで切断したとき, 8 kbp, 6.8 kbpの2種類の断片が16S及び23SのいずれのrRNAともhybridizeする。このいずれの断片も, 一つのrRNA遺伝子群(4.63 kbp)が局在するのに十分の大きさであるが, 1組を超える遺伝子群が存在し得るほどの大きさではない。従って, *M. phlei*のrRNA遺伝子群は二つ以上存在するだろうという結論が得られる。

もし16S~23S rRNA遺伝子群は一つであり, 遺伝子のなかでSal Iによる切断が起こり二つのバンドとして検出されていると仮定すると, 16Sあるいは23S rRNA遺伝子のいずれかが一部は異なる断片上に観察されることになり, 図の結果はありえない。全体のクロモソーム上にはたまたまrRNA遺伝子周辺のSal I切断塩基配列が同じ所にある複数個のrRNA遺伝子が存在する可能性があるため, 理論的には少なくとも二つの遺伝子群が存在すると結論される。このような遺伝子群がたまたま重複している可能性は, 種類の異なる制限酵素を用い同様の結論が得られれば, 低くなる。そこでPst I切断による実験結果について同様の考察を加え, 6.8 kbp, 5.8 kbpの二つの断片上に各々16Sと23S rRNA遺伝子が存在することが結論された。

またBam HIの切断では, 2.3 kbp断片と5.9 kbp断片上に23S rRNAとのhybridizationが検出された。2.3 kbpは濃いバンド, 5.9 kbpは薄いバンドとなっている。これは23S rRNA遺伝子にBam HIの切断点があり, ごく一部は5.9 kbp断片上に乗っていることを意味している。16S rRNAプローブでは五つのバンドが見られるが, バンドの密度は非常に薄く, 遺伝子内に切断点が複数あることを意味している。

以上の考察により*M. phlei*は16S~23S rRNA遺伝子を二つ以上, おそらく二つ持っている結論された。

我々の従来の報告<sup>2)~6)</sup>と総合して考察すると, 抗酸菌は1~2個の少ない数のrRNA遺伝子群を持つということになるが, この事実は比較生物学的にも重要である。同じActinomycetales目に属する*Streptomyces lividans*では少なくとも六つのrRNA遺伝子群を持つ(鈴木ら, 執筆中)。大腸菌では七つ, 枯草菌では10個のrRNA遺伝子群を持っている<sup>8)~13)</sup>。増殖の遅い*Mycoplasma*<sup>14)15)</sup>や古細菌<sup>16)17)</sup>1~2個のrRNA遺

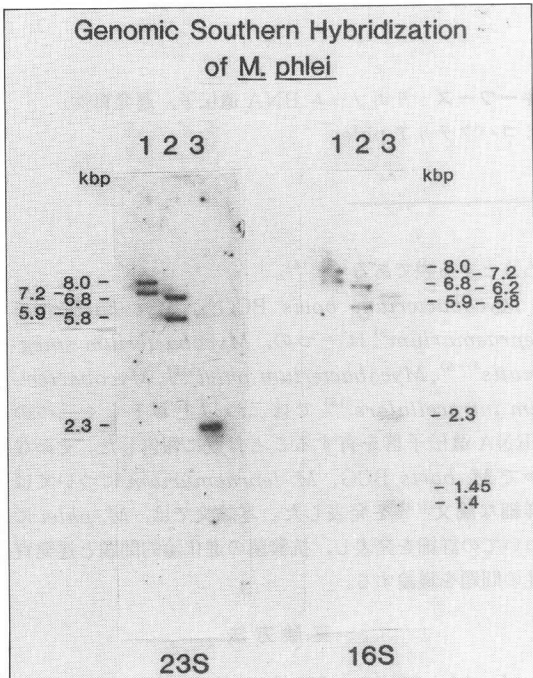


図 *M. phlei* の rRNA 遺伝子

*M. phlei* DNA を, (1) Sal I, (2) Pst I, (3) Bam HIにて切断し, 0.8%アガロース電気泳動を行った後, BCG菌のrRNAをプローブとしSouthern hybridizationを行った。図の左右にはDNA断片の大きさを(kilobase pair)示してある。

伝群を持つ。このように比較していくと、rRNA 遺伝子群の数に限って論じるならば、抗酸菌は、大腸菌、枯草菌、*Streptomyces lividans* よりも *Mycoplasma* や古細菌に似ているのである。

遅発育性と関連して論じるならば、抗酸菌では rRNA 遺伝子が少なく、それ故にリボソームの数も少なく、蛋白の合成量も少ない、これが遅発育性の原因の一つではないだろうかという仮説が成立する。我々はその点を明らかにするために rRNA 遺伝子を更に詳細に解析する一方、リボソームの数についても検討を加えている。

#### 文 献

- 1) Kanetsuna, F. : Effect of lysozyme on mycobacteria, *Microbiol Immunol*, 24 : 1151, 1980.
- 2) Suzuki, Y. et al. : Organization of rRNA genes in *Mycobacterium bovis* BCG, *J Bacteriol*, 169 : 839, 1987.
- 3) Suzuki, Y. et al. : The number of ribosomal RNA genes in *Mycobacterium lepraemurium*, *FEMS Microbiology Letters*, 44 : 37, 1987.
- 4) Yamada, T. et al. : The mode of action of antibiotics and mechanism of the drug-resistance in mycobacteria, *Transferable Antibiotic Resistance Plasmids and Gene Manipulation* (ed. S. Mitsuhashi and V. Krčméry), Avicenum-Czechoslovak Medical Press-Praque, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, p.95, 1983.
- 5) Yamada, T. et al. : Ribosomes and drug resistance in *Mycobacterium*, *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes* (ed. Szabó, Biro, Goodfellow) Akadémiaikiadó, Budapest, p.335, 1986.
- 6) Suzuki, Y. et al. : Drug resistance and rRNA genes in *Mycobacterium*, *Joint US-Japan Tuberculosis and Leprosy Symposium. US-Japan Cooperative Medical Science Program*, Osaka, p.1, 1986.
- 7) Southern, E. M. : Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol*, 98 : 503, 1975.
- 8) Boros, I. et al. : Physical map of the seven ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res*, 6 : 1817, 1979.
- 9) Kenerley, M. E. et al. : Characterization of hybrid plasmids carrying individual ribosomal ribonucleic acid transcription units of *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 132 : 931, 1977.
- 10) Kiss, A. et al. : The number of rRNA genes in *Escherichia coli*, *FEBS Lett*, 79 : 77-79, 1977.
- 11) Kobayashi, H. and Osawa, S. : The number of 5S rRNA genes in *Bacillus subtilis*, *FEBS Lett*, 141 : 161, 1982.
- 12) Loughney, K. et al. : tRNA genes are found between the 16S and 23S rRNA genes in *Bacillus subtilis*, *Nucleic Acids Res*, 10 : 1607, 1982.
- 13) Stewart, G. C. et al. : Detailed physical mapping of the ribosomal RNA genes of *Bacillus subtilis*, *Gene*, 19 : 153, 1982.
- 14) Sawada, M. et al. : The number of the ribosomal RNA genes in *Mycoplasma capricolum*, *Mol Gen Genet*, 182 : 502, 1981.
- 15) Amikam, D. et al. : Ribosomal RNA genes in *Mycoplasma* *Nucleic Acids Res*, 10 : 4216, 1982.
- 16) Hofman, J. D. et al. : The number, physical organization and transcription of ribosomal RNA cistrons in an archaebacterium : *Halobacterium halobium*, *Nucleic Acids Res*, 7 : 1321, 1979.
- 17) Newmann, H. et al. : Organization of the genes for ribosomal RNA in archaebacteria, *Mol Gen Genet*, 192 : 66, 1983.