

原 著

結核菌青山 B 株ペプチド抗原遺伝子のクローニング

— 15-kilodalton (AT 01) ペプチドを発現する遺伝子について —

田 中 公 子

兵庫医科大学細菌学教室

受付 昭和 63 年 10 月 3 日

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAIN AOYAMA B PEPTIDE ANTIGEN GENES IN *ESCHERICHIA COLI*

— A Gene Encoding 15kD Antigen (AT 01) —

Tomoko TANAKA *

(Received for publication October 3, 1988)

A genomic library of *Mycobacterium tuberculosis* strain Aoyama B in *Escherichia coli* K-12 was constructed by cloning *Sau* 3A I cleaved *M. tuberculosis* Aoyama B chromosomal DNA into pUC 18, pUC 181 or pUC 182. Clones reacting with anti-PPDs-rabbit-serum were screened by immunoblotting among 3×10^4 clones. Seven clones were selected; designating pAT 01, pAT 101, pAT 102, pAT 103, pAT 104, pAT 105 and pAT 201. On Western blotting, they were shown to produce 15 kD (pAT 01, pAT 101, pAT 105), 18 kD (pAT 103) and 60 kD (pAT 102, pAT 201) peptide antigens.

Restriction endonuclease map of each of the above clones was composed, and putative coding frames of anti-PPDs-rabbit-serum reactive peptides were deduced by analysing deletion derivatives. Nucleotide sequence of pAT 01, encoding for 15 kD peptide antigen was analyzed, and a *Hinf* I-*Hinf* I fragment in pAT 01 was subcloned into pUC 18 λ CPL 1 to determine the direction of its reading frame. The origin of promoter that drives cloned mycobacterial genes in *E. coli* was discussed.

Key words : *Mycobacterium tuberculosis* Aoyama B, DNA library, Molecular cloning, Recombinant peptide, PPDs

キーワード : 結核菌青山 B 株, DNA ライブラリー, 遺伝子クローニング, リコンビナントペプチド, PPDs

緒 言

結核菌蛋白質について、従来多くの研究が行われてい

るにもかかわらず、そのツベルクリンペプチドの化学的構造、菌体内の解剖学的位置付けなどについて、いまだ定説はない。ツベルクリンは、2次元電気泳動で認めら

* From the Department of Bacteriology, Hyogo College of Medicine, 1-1 Mukogawa-cho, Nishinomiya, Hyogo, 663 Japan.

表 菌 株

<i>M. tuberculosis</i> Aoyama B	NIHJ 1 6 3 5	高橋宏博士 (国立予研, 東京) 御恵贈
<i>E. coli</i> K-12 JM103	$\Delta(lac\ pro)\Delta thi, strA, supB,$ <i>endA, sbcB hsdR, F'traD36,</i> <i>proAB, lacI^s, Z ΔM15</i>	文献33) 参照
C-600	<i>F⁻, thi-1, thr-1, leu B6, lac Y1,</i> <i>tonA21, supB44, λ^{-}</i>	同15) 参照

れる蛋白成分だけでも約200種以上のペプチドの混成物であり¹⁾, ツベルクリン活性中心の単離が古くから試みられている。

現在までに、ヒト型結核菌のさまざまな蛋白抗原については、菌体成分または培養濾液から各種クロマトグラフィや電気泳動などによる蛋白化学的分画^{2)~5)}, モノクローナル抗体対応抗原の検索⁶⁾, 合成ペプチド⁷⁾, などの報告があるが、いずれも免疫学的活性, 特異性において精製ツベルクリン, すなわち, PPDsに匹敵するか, それをしのぐものが得られていないのが実情である。

近年, 組換えDNA手技を, 病原細菌の抗原性や病原性の検索に導入する試みがなされている^{8)~11)}。結核菌に関しては, 1985年以来, Youngら¹²⁾により λ gt11をベクターとした結核菌Erdman株のDNAライブラリーから, 71 kD, 65 kD, 19 kD, 14 kD, 12 kDの蛋白質がクローニングされている。本実験では, 本邦のPPDs標準株である結核菌青山B株(以下*M. tbc.* ABと略す)のDNAライブラリーを作製し, 抗PPD抗体と反応するペプチドのクローニングを試みた。それをもとに, ツベルクリン蛋白質に関与する遺伝子の解析を通して, ペプチドの免疫学的活性中心を検討し, 結核菌蛋白抗原解明の手掛かりを得ることを目的とした。

方 法

1) 菌株およびプラスミド

使用した抗酸菌および宿主大腸菌K-12株は表に示した。

クローニングベクターはpBR322由来のpUC18¹³⁾, およびその誘導体であるpUC181, pUC182, pUC18 λ CPL1を使用した。pUC181は, pUC18のクローニング領域内の*Sma*I部位に, pUC182は*Eco*RI部位に合成*Bgl*IIリンカー(それぞれ10mer, 14mer)を挿入したものである(図1A)。

pUC18 λ CPL1はpUC18の*Eco*RI部位に λ ファージのプロモーターPR, PL, および温度感受性抑制蛋白遺伝子*cI*857を挿入したものである。(図1B)。

2) 培地, 溶液, 試薬

M. tbc. AB株はSauton培地で振盪培養2週間目にグリシンを終濃度3%になるように加え, 16時間後に集菌した。大腸菌K-12株にはL培地を使用した。制限酵素は, 宝酒造, ニッポンジーンから購入し, 反応は供給元の指示に従った。他の試薬はSigma, 和光純薬より購入した。

3) 抗血清

免疫反応の1次抗体に用いた抗PPD抗血清はCIP(Cell immunity PPD; 日本BCG製造株式会社)をカリウムミョウバンで沈殿させたものを, 家兎に2週間毎, 4回免疫し血清を分離し, ベクタープラスミドpUC18のみを保持した大腸菌で3回吸収して用いた。

4) DNAおよびプラスミド抽出

M. tbc. AB株DNAは, リゾチーム-SDS-フェノール法¹⁴⁾で抽出し, 4°Cで保存した。大腸菌からのプラスミドはアルカリ-SDS法¹⁵⁾で抽出し, 必要に応じてCsCl-EtBr密度勾配遠心法で精製した。DNA断片のゲルからの回収は, 低融点アガロースを用いた。

5) 抗原産生クローンの選択

形質転換した大腸菌をアンピシリン含有プレートにまき, 生じたコロニーをナイロン膜(NEN)に複写した。コロニーを, リゾチーム溶液, クロロホルム蒸気で溶菌した後, 上記吸収血清(200倍希釈), 続いて2次抗体にはHRP標識ヤギ抗ウサギIg抗体(Cappel)で反応させた。対照にはpUC18のみを保持した大腸菌のコロニーを用いた。

抗PPDs抗体と反応するコロニーを選択し, 十分に純化を行った。それぞれの陽性クローンよりプラスミドを抽出し, 以後の解析に用いた。アガロース電気泳動はDavis¹⁶⁾の方法に従った。

6) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)

およびウエスタンブロッティング

各ハイブリドクローンのリゾチーム消化上清を粗抽出物とし, SDS-PAGE¹⁷⁾後, ナイロン膜(ミリポア)に通電により転写し¹⁸⁾, 免疫染色を行った。

7) 塩基配列決定法

15 kDの抗原を発現しているハイブリドプラスミドpAT01の挿入断片を精製し, 制限酵素*Taq*I, *Sau*

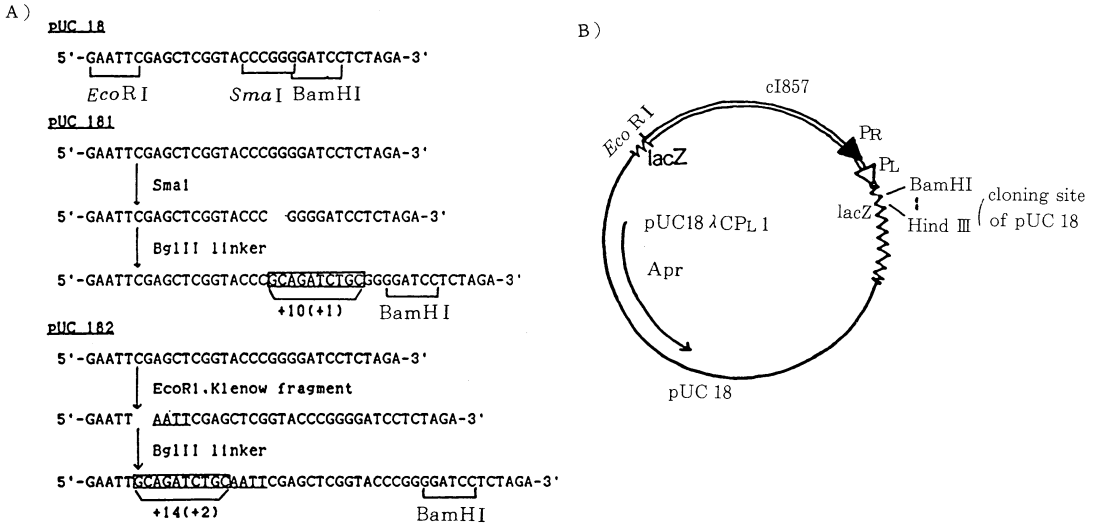


図1 クローニングベクター

- A) pUC 18 およびその誘導体; pUC 181: pUC 18 のクローニング部位を制限酵素 *Sma* I で切断し, *Bgl* II リンカー (10 mer) を付加した。pUC 182: pUC 18 を *Eco* R I で切断し, DNA ポリメラーゼ I Klenow Fragment で平滑末端とし, *Bgl* II リンカー (14 mer) を付加した。
- B) pUC 18 λ CPL 1

3A I, *Mps* I, *Hae* III で断片化し, M 13 フェージにクローニングした。ジデオキシヌクレチド酵素法¹⁹⁾に従って, シークエンス反応を行い塩基配列を決定した。

8) pAT 01 のオープンリーディングフレームの決定

pAT 01 の塩基配列をもとに, 宝酒造 DNASIS を用いてオープンリーディングフレームを検索した。可能性のあるフレームが複数認められたので, さらにいずれに相当するかを決定するために, pAT 01 の *Hinf* I - *Hinf* I 断片 (828bp) を pUC 18 λ CPL 1 の *Sma* I 部位にサブクローニングを行いオープンリーディングフレームの方向を決定した。

9) 組換え DNA 実験の封じ込め

昭和 60 年 8 月 24 日付文部省公示第 115 号「大学等の研究機関等における組換え DNA 実験指針」に従い, 生物学的封じ込めレベル EK 1, 物理学的封じ込めレベル P 3 ですべての組換え DNA 実験を行った。

結 果

1) *M. tbc.* AB. 株 DNA ライブラリーの作製

Sauton 培地 200 ml 培養より, 約 600 μg のクロモソーム DNA を得た。そのサイズは 100~200 kb の長さに分布していた。

これを *Sau* 3A I で部分消化 (DNA 50 μg に対し *Sau*

3A I を 8 unit, 37°C, 10 分) し, 蔗糖密度勾配遠心法で 2~5 kb の DNA 断片を集めた。この断片を *Bam* HI で完全消化したベクターにクローニングし, 大腸菌 K-12 株 JM 103 に, CaCl₂ 法²⁰⁾ で形質転換した。ベクター pUC 18, 0.2 μg に対して, 1×10⁴ 個の組換え体クローンを得た。pUC 181, 182 についても同数のクローンを得た。すなわち, 合計 3×10⁴ 個のクローンについて以後スクリーニングを行った。

2) 陽性クローンの選択

約 3×10⁴ 個の組換え体クローンより, 7 個の抗 PPDs 抗血清に反応する陽性クローンを得た。図 2 において, pAT 01 は pUC 18 を, pAT 101, pAT 102, pAT 103, pAT 104, pAT 105 は pUC 181 を, pAT 201 は pUC 182 をそれぞれベクターとして用いたものであり, それらのコロニープロットングー免疫染色を示す。

3) 各陽性クローンからのプラスミドの抽出

陽性クローンよりプラスミドを抽出しその分子量を決定した。7 個のハイブリッドプラスミドの分子量は図 3 に示すようにすべて異なっていた。挿入 DNA 断片のサイズは, pAT 01: 1.6 kb, pAT 101: 5.8 kb, pAT 102: 6.6 kb, pAT 103: 2.9 kb, pAT 104: 3.4 kb, pAT 105: 6.0 kb, pAT 201: 2.6 kb であった。

4) 発現抗原ペプチドの分子量の決定

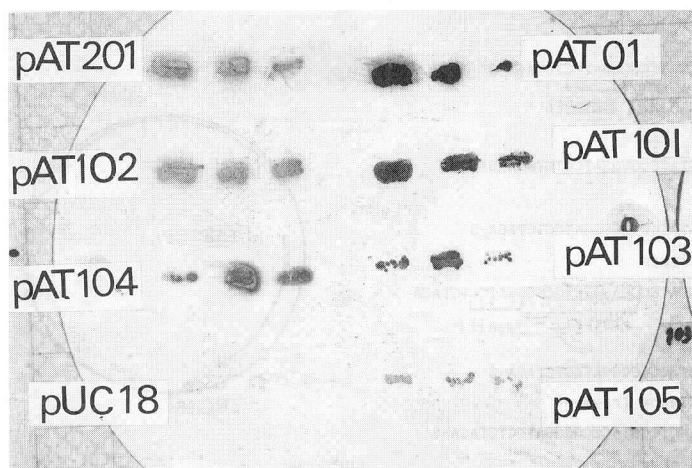


図2 陽性クローン7個のコロニーブロット

図4は発現抗原ペプチドの分子量をSDS-PAGE後、ウェスタンブロットで検索したものである。pAT 01, pAT 101, pAT 105は約15 kD, pAT 102, pAT 201は約60 kD, pAT 103は約18 kDの抗原を発現していることが分かった。pAT 104を保持したクローンは陽性バンドを示さなかった。これらクローンの抗原産生量は、pUC 18のlacプロモーターIPTGによる誘導の有無で

は、著明な差は見られなかった。このことから抗原発現にはベクタープロモーターの関与が重要でないことが推定された。

5) 抗原発現クローンのプラスミドのリーディングフレームの検索

各陽性クローンより抽出したプラスミドの制限酵素地図を図5Aに示した。各クローンのプラスミドを抽出し *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Sal* I, *Sma* I, *Pst* I による制限酵素地図を作製した。これをもとに挿入遺伝子の欠失変異株を作製し、その抗原性の有無を調べて抗原発現に与る断片を検討した。太線の部分は、欠失変異株の抗原性の有無を調べることにより、抗原発現に与ると考えられた遺伝子断片を示している。15 kDのペプチドを発現する pAT 01の *Sal* I 消化断片と pAT 101, pAT 105の欠失変異株（太線のみを挿入したプラスミド）pAT 101-*Sma*, pAT 105-*Pst* の *Sal* I 消化後のアガロース電気泳動を比較すると、分子量0.9 kb, 0.3 kbに相当して等しい長さの断片が存在し、共通のDNA部分を含んでいるものと考えられた（図5B）。同様に、60 kDのペプチドを発現する pAT 201と、pAT 102の欠失変異株 pAT 102-*Pst* の *Pst* I 消化断片についても共通のDNA断片が存在すると考えられた。なお、pAT 104については、*Pst* I, *Sal* I, *Sma* Iによる欠失変異株すべてが抗原性を示し、発現遺伝子断片を同定するに至っていない。

以下、本論文においては、pAT 01に関する解析について述べる。

6) pAT 01の塩基配列の決定、およびオープンリーディングフレームの方向決定

図6は、pAT 01 (1667 bp) 全塩基配列を示したものである。

M. W.
pAT 01 pAT 101 pAT 102 pAT 103 pAT 104 pAT 105 pAT 201
2.7 kb 7.2 kb 9.9 kb

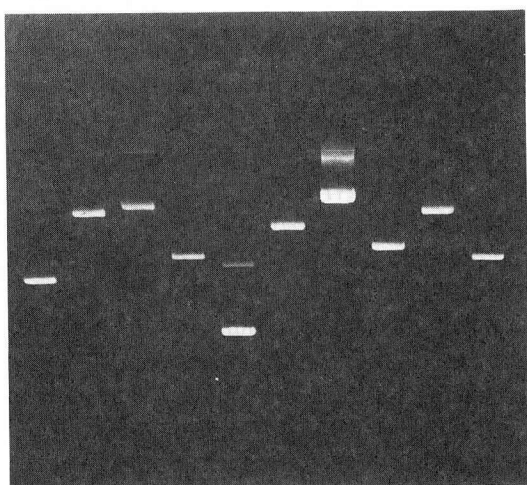


図3 組換えプラスミドの分子量

陽性クローンよりプラスミドを抽出し0.8%アガロース電気泳動を行った。左列より pAT 01, pAT 101, pAT 102, pAT 103, 分子量マーカー 2.7 kb (pUC 18); 7.2 kb (M 13 mp 8 RF); 9.9 kb (pMC 1403), pAT 104, pAT 105, pAT 201.

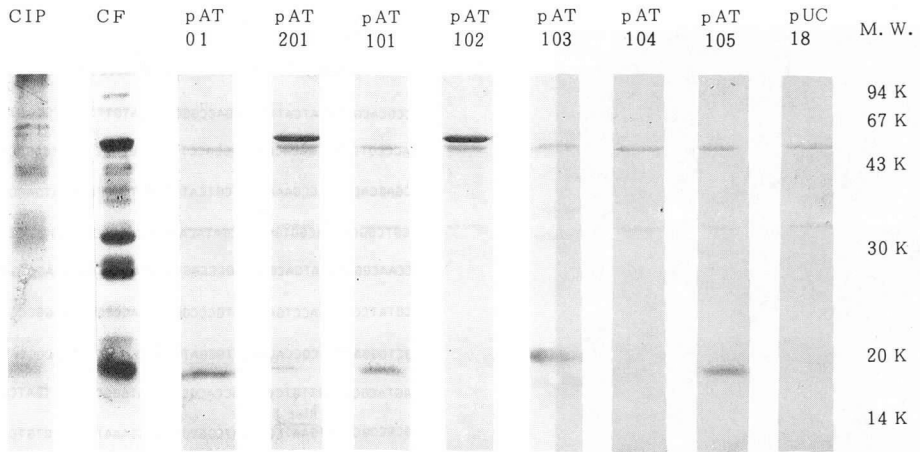


図4 発現ペプチドのウエスタンブロット

発現ペプチドを12.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ニトロセルロースペーパーに電氣的に転写した。CIPとCFは蛋白染色、他は抗PPD抗体を用いた免疫染色を示した。左列より、CIP (Cell immunity PPD)、CF (結核菌青山B株培養濾液80%硫酸分画)、pAT 01、pAT 201、pAT 101、pAT 102、pAT 103、pAT 104、pAT 105、pUC 18 (ベクターのみ)。

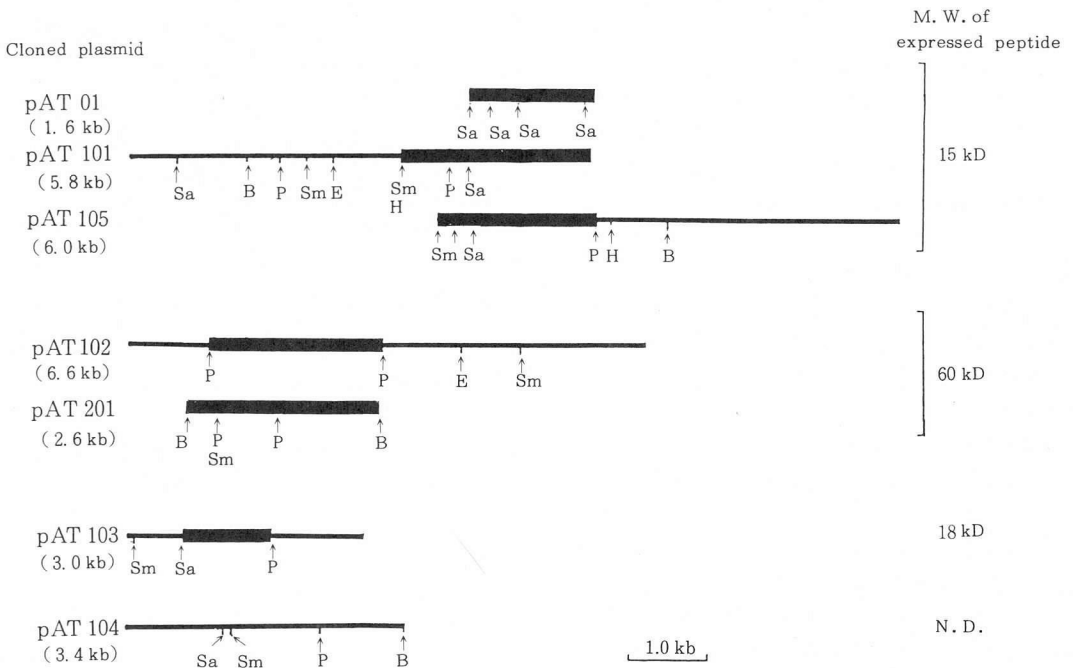


図5-A 陽性クローン挿入遺伝子の制限酵素地図

■は抗原発現に与る遺伝子部分を示した。挿入遺伝子の長さは(kb)で示した。発現ペプチドの分子量は(kD)で示した。

N. D. : 検出不能。

B, *Bam*H I ; E, *Eco*R I ; H, *Hind* III ; Sa, *Sal* I ; Sm, *Sma* I ; P, *Pst* I ;

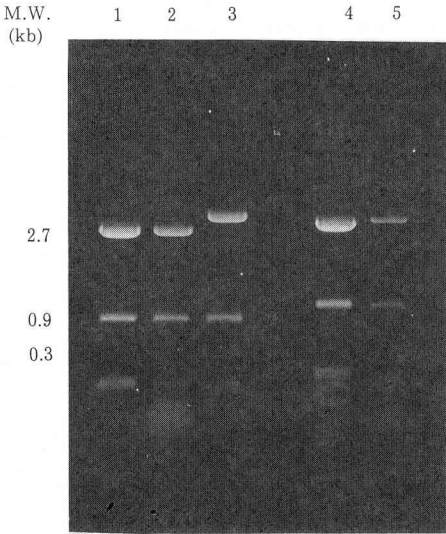


図5-B 欠変異株プラスミドの制限酵素パターン
欠変異株より抽出したプラスミドを制限酵素(Lane 1, 2, 3は *Sal* I, Lane 4, 5は *Pst* I) 消化後の1%アガロース電気泳動パターンを示した。Lane ; 1, pAT 01; 2, pAT 101-*Sma*; 3, pAT 105-*Pst*; 4, pAT 201; 5, pAT 102-*Pst*; M. W., 分子量マーカー。

図7Aは、pAT 01の塩基配列をもとにしてDNASISによって作製した制限酵素地図と、検索された可能性のある4個のリーディングフレームを示したものである。これら4個のフレームいずれにAT 01発現に与る断片が存在するかを検索するために、pAT 01の *Pst* I-*Pvu* II断片をpUC 18にクローニングし、そのクローンが抗原性を持つことが確認された。これにより図の②15 kD ④14 kDのフレームに抗原発現に与る遺伝子が存在する可能性が強く示唆された。残る①、③のフレームは次の理由により除外されるものとした。すなわち、①は *Pvu* IIよりプロモーター、およびリーディングフレームの大部分が除外されること、③は *Pvu* IIより上流の断片が、遺伝子の長さから抗原発現に与る可能性が少ないこと、などである。

さらにこの両者のいずれかを決定するために、pAT 01の *Hinf* I-*Hinf* I断片をpUC 18λCPL 1にサブクローニングして得られたpλCPL 1-01(図7B)の、温度上昇によるプロモーター抑制解除による抗原発現量の差を希釈ドットプロットで検討した。これにより抗原発現の増加したクローンと、増加しなかったクローンが識別できた。前者がプロモーターの方向とリーディングフレームの方向が一致したものと考え、それぞれのプラスミドの *Bst* E II消化断片を比較したところ②のオープンリーディングフレームと一致した。

発現ペプチド AT 01分子量はDNA塩基配列より15,



図6 pAT 01の挿入遺伝子の全塩基配列(1667bp) 推定されるSDを示した。(制限酵素の略号については図7を参照)

072 daltonと推定され、SDS-PAGEの示す値と一致した。

考 察

結核菌青山B株DNAの2~5 kbの断片を、pUC 18系プラスミドをベクターとしてクローニングすることにより、大腸菌におけるDNAライブラリーを作製した。結核菌のプロモーターが大腸菌内で機能するか否かが明確でない⁹⁾ ために、pUC 18のラクトースオペロンのプ

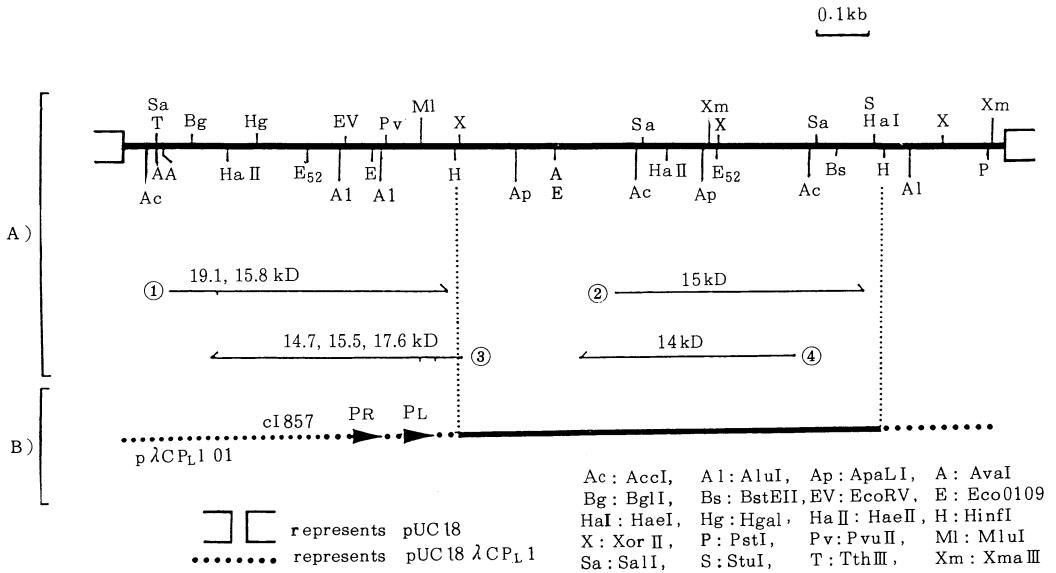


図7

- A) pAT 01 の挿入遺伝子 (1667 bp) 制限酵素地図およびオープンリーディングフレーム。①～④は考えられるオープンリーディングフレームとそれによる発現ペプチドの分子量を示した。
- B) pλCPL1-01; pAT 01; pAT 01 の *Hinf* I-*Hinf* I 断片 (828 bp) を pUC18 λCPL1 にサブクローニングしたものである。

ロモーターによって、挿入 DNA 断片のいずれのフレームとも機能することが可能なように、フレームが1塩基ずつ異なった3種類のベクター pUC 18, 181, 182 を使用した。

結核菌のクロモゾーム DNA は、約 4.5~5.5×10³ kb である²¹⁾。クローニングされた DNA 断片の平均的な長さを約 4.0 kb とすると、結核菌 DNA のコードするペプチドの 99% がライブラリーの中に含まれるためには、理論的に約 4,600 クローンが必要となる。今回の実験では、*M. tbc.* AB 株 DNA 断片を含む約 3 万個のクローンをスクリーニングすることにより結核菌 DNA のペプチド遺伝子を完全に網羅したものと考えられる。

3 万個のハイブリッドクローンより 7 個の抗 PPDs 抗体と反応する陽性クローンを得た成績は、0.02% である。Young ら¹¹⁾¹²⁾ が、λgt11 をベクターとしたライブラリーをモノクローナル抗体でスクリーニングした成績では、*M. leprae* からは 4×10⁶ 個のうち 11 個 (0.0003%)、*M. tbc.* Erdman 株からは 5×10⁴ 個のうち 15 個 (0.03%) である。Thole ら⁹⁾ は *M. bovis* BCG DNA の EMBL3 をベクターとしたライブラリーから非加熱全菌体に対する多価抗体でスクリーニングし、0.2% の陽性クローンを得ている。大腸菌相互間、例えば大腸菌

の毒素あるいは酵素のクローニングの効率率は約 1~3% である²²⁾²³⁾。しかしながら現段階では、挿入遺伝子と宿主ベクター間の種族の異同による発現効率については、ベクターやスクリーニングの対象が同一でないため、一概に比較することはできない。今回の実験の場合、スクリーニングに用いた血清が抗 PPD 多価抗血清である。さらに PPD 自体がハプテンとされており、しかも加熱処理後得られたものであるため、必ずしも native なものに対する抗体とはいえない。このため、クローニングしたペプチドの範囲が限られていることを考慮しなければならない。

陽性クローンの欠失変異株を作製し抗原発現に与る断片を検索すると、同じ分子量の抗原ペプチドを発現しているハイブリッドプラスミドには、相同の制限酵素認識部位を持つ DNA 断片が存在していることが分かった。例えば、図 5 に示す pAT 01, pAT 101, pAT 105 や、pAT 102, pAT 201 がそれである。すなわち、15 kD, 60 kD のペプチドを発現しているクローンは、ベクターを替えても重複してクローニングされていることになる。このような現象は、Young ら¹¹⁾ や Thole ら⁹⁾ の報告にも見られる。その理由としては、結核菌内に、1) immunogenicity の強い抗原が存在している、2) 同

じ抗原産生に与る遺伝子が重複して存在している, 3) 大腸菌内で翻訳, 合成されやすいペプチド遺伝子が存在する, などが考えられる。

pAT 104 に関しては, コロニーブロットで陽性を示したにもかかわらず, ウェスタンブロットで陽性を示さなかった。この理由としては, 1) リゾチーム消化で抗原が十分に抽出できなかった, 2) SDS-PAGE の過程で抗原性が失われた, などが考えられるであろう。

pAT 01 において IPTG の存在に関係なく抗原が発現していたこと, pλCPL 1-01 においてプロモーターの駆動しない状態でも抗原発現があったことより, 挿入断片の中に大腸菌内で機能することのできるプロモーターが存在していることが示唆された。鈴木ら²⁴⁾は, *M. bovis* BCG の r-RNA 遺伝子においてそのプロモーター部位の同定を primer extension method により試みている。また Thole⁹⁾らは *M. bovis* BCG の 64 kD 蛋白遺伝子の BCG 由来で大腸菌内で機能するプロモーター部位を推定している。本実験の pAT 01 では, 大腸菌のリボゾーム結合部位である SD 配列に相当する AT-rich な部位が開始コドンより 13 bp 上流に認められたが, 既知の大腸菌 RNA 結合部位に相当する配列 (例えば Pribnow box など), 鈴木らの同定した "TATTAG" や, Thole らの言う "TTTCAT" に類似した配列は見当たらなかった。今後, m-RNA の結合部位を直接同定, 検索してゆくことは興味深い課題となるであろう。今回, 3 万個のクローンをスクリーニングしたにもかかわらず lac プロモーター依存性のリコンビナントクローンは得られなかったが, この理由は不明である。

1985 年以来, 抗酸菌の蛋白抗原のクローニングが注目され始め, Young ら¹²⁾の λgt 11 をベクターとした結核菌 Erdman 株の, また Kingston ら²⁵⁾の結核菌 H₃₇Rv のクローニング, さらに *M. leprae*^{11) 21)}, *M. bovis* BCG⁹⁾などもクローニングされているが, いずれも PPDs との関連は論じられていない。今回クローニングした pAT 01 は制限酵素地図の上からは, 上記のいずれのペプチド遺伝子とも相同性は認められなかった。他のクローン, すなわち, pAT 101, 102, 103, 104, 105, 201 においても, 制限酵素地図の上では, 既知のペプチド遺伝子と相同性は認められなかった。

今回は挿入遺伝子の解析などが比較的容易なプラスミドベクター pUC 18 系を用いたが, 融合蛋白を作製する λベクターや, 大きなサイズの断片をクローニングできるコスミドベクターなどを用いると, さらに興味のあるクローンが得られる可能性が残されている。

今まで結核菌由来のペプチドがさまざま研究され^{2)-5), 25)-30)}, その免疫学的活性の有無が論じられてきた。ツベルクリン蛋白は菌体成分を除く培養濾液由来であることより, 主として分泌蛋白から構成されていると推定さ

れる。ただし菌体自己融解産物の混入は否定できない。水島ら³¹⁾による, 分泌型蛋白の持つシグナル配列の特徴とされる点を, ここで得られた 15 kD の AT 01 N 末端アミノ酸について検討した。その結果, i) 開始コドン Val の後に塩基性アミノ酸 (Lys, Arg) が, ii) 続いて, 13 個の疎水性アミノ酸配列が存在し, iii) 切断を受ける部位と考えられる短鎖鎖アミノ酸 (Ala, Gly) 存在, の 3 点が認められた。シグナル配列は, 種特異性が低いとされているので, この構造が結核菌内で機能し, AT 01 が分泌蛋白として培養濾液中に遊出している可能性も考えられる。

15 kD のペプチド AT 01 はイオン交換セルロースクロマトグラフィーなどで容易に精製でき, PPD に近似の免疫学的活性があるという, 予備的な知見が得られているが, 詳細は他報に譲る。

結核症特有の感染像には, 菌体蛋白だけでなく脂質, 多糖体, ペプチドグリカンなどの構成物が関与している。しかし蛋白抗原の関与に関しては, ツベルクリンを中心とした知見の域を出ていない。しかもツベルクリン自体, その化学的構造が不確定である。遺伝子工学的手法は, 結核菌特有の免疫病理学的反応に与るこの種のペプチド抗原を検索することに有効な手技と思われる。

今回は, 結核菌のペプチド遺伝子が自身のプロモーターにより大腸菌内で働き, ツベルクリン様の活性を持つことが推定された。結核菌の遺伝子が属のうえで遠く離れた大腸菌内で発現することは, 偶然の一致かもしれないが, 両者の間に発生学的に保存された共通の発現メカニズムが存在するのかもしれない³²⁾。

結 語

日本の PPDs 標準株である結核菌青山 B 株 DNA を制限酵素 *Sau* 3AI で部分消化し, 2~5 kb の断片を pUC 18 およびその誘導体である pUC 181, 182 をベクターとして, ライブラリーを作製し, 抗 PPDs 抗体を指標としてペプチド抗原遺伝子をクローニングした。約 3 万個のクローンから 7 個の陽性クローンを得た。これらのクローンからハイブリッドプラスミドを抽出し, 制限酵素地図の作製, および抗原産生に与る遺伝子を検索した。ウェスタンブロット法により発現抗原ペプチドの分子量は, 15 kD, 18 kD, 60 kD であることが分かった。このうち 15 kD のペプチドを産生しているクローンのハイブリッドプラスミド pAT 01 の塩基配列を決定し, さらに pUC 18 λCPL 1 にサブクローニングすることにより, リーディングフレームを決定した。また, この遺伝子発現におけるプロモーターの由来について考察した。

謝 辞

本稿を終えるにあたり, 直接ご指導頂いた山本義弘先

生, 古山順一教授(兵庫医大遺伝学教室), 本研究を行うにあたり便宜を計って頂きました本学細菌学教室, ならびに大阪大学微生物研究所の皆様には厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Wright, G. L. Jr. and Robert, D. B. : Two-dimensional immunoelectrophoresis of mycobacterial antigens. Comparison with reference system, *Am Rev Resp Dis*, 109 : 306-310, 1974.
- 2) Harboe, M. and Nagai, S. : MPB 70, A unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG, *Am Rev Resp Dis*, 129 : 444-452, 1984.
- 3) Kuwabara, S. : Purification and properties of tuberculin active protein from *Mycobacterium tuberculosis*, *J Biol Chem*, 250 : 2556-2562, 1975.
- 4) Nagai, S., Nagasuga, T. and Matsumoto, J. : Tuberculin peptide from culture filtrate of *Mycobacterium tuberculosis*, *Am Rev Resp Dis*, 121 : 551-557, 1980.
- 5) Nagai, S., Matsumoto, J. and Nagasuga, T. : Specific Skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG, *Infect Immun*, 31 : 1152-1160, 1981.
- 6) Damiani, G., Bianco, A., Beltrame, A. et al. : Generation and characterization of monoclonal antibodies to 28-, 35-, 65-kilodalton proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 56 : 1281-1287, 1988.
- 7) Toida, I. S., Yamamoto, S., Takuma, S. et al. : Lack of tuberculin activity of synthetic peptides, *Infect Immun*, 50 : 614-619, 1985.
- 8) Norgard, M. and Miller, J. N. : Cloning and expression of *Treponema pallidum* (Nichols) antigen genes in *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 42 : 435-445, 1983.
- 9) Thole, J. E. R., Dauwerse, H. G., Das, R. K. et al. : Cloning of *Mycobacterium bovis* BCG DNA and expression of antigens in *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 50 : 800-806, 1985.
- 10) van Embden, J. D., van der Donk, H. J., van Eijk R. V. et al. : Molecular cloning and expression of *Treponema pallidum* DNA in *Escherichia coli* K-12, *Infect Immun*, 42 : 187-196, 1983.
- 11) Young, R. A., Mehra, V., Sweetser, D. et al. : Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite *Mycobacterium leprae*, *Nature*, 316 : 450-452, 1985.
- 12) Young, R. A., Bloom, B. R., Grosskinsky, C. M. et al. : Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA, *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 82 : 2583-2587, 1985.
- 13) Yanish-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. : Improved M13 phage cloning vectors and host strains; nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene*, 33 : 103-119, 1985.
- 14) Marmur, J. : A procedure for the isolation of the deoxyribonucleic acid from microorganisms, *J Mol Biol*, 3 : 208-218, 1961.
- 15) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (ed) : *Molecular Cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N. Y., 1982.
- 16) Davis, R. W., Botstein, D. and Roth, J. R. (ed) : *Advanced bacterial genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 1980.
- 17) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227 : 680-685, 1970.
- 18) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci USA*, 76 : 4350-4354, 1979.
- 19) Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. : DNA sequencing chain terminating inhibitors, *Proc Natl Sci USA*, 74 : 5463-5467, 1977.
- 20) Mandel, M. and Higa, A. : Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, 53 : 159-162, 1970.
- 21) Clark-Curtiss, J. E., Jacobs, W. R., Docherty, M. A. et al. : Molecular analysis of DNA and construction of genomic libraries of *Mycobacterium leprae*, *J Bacteriol*, 161 : 1093-1102, 1985.
- 22) So, M., Boyer, H. W., Betlach, M. et al. : Molecular cloning of an *Escherichia coli* plasmid determinant that encodes for pro-

- duction of heat-stable enterotoxin, *J Bacteriol*, 128 : 463-472, 1976.
- 23) Inouye, H., Michaelis, S., Wright, A. et al. : Cloning and restriction mapping of alkaline phosphatase structural gene (*phoA*) of *Escherichia coli* and generation of deletion mutants *in vitro*, *J Bacteriol*, 146 : 668-675, 1981.
- 24) Suzuki, Y. et al. : Personal communication.
- 25) Kingston, A. E., Salgame, P. R., Mitchison, N. A. et al. : Immunological activity of 14-kilodalton recombinant protein of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Infect Immun*, 55 : 3149-3154, 1987.
- 26) Daniel, T. M., van der Kuyp, F., and Anderson, P. A. : Initial clinical trial of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 in tuberculin-positive human subjects, *Am Rev Resp Dis*, 123 : 517-520, 1981.
- 27) Daniel, T. M., Balestrino, E. A., Balestrino, O. C. et al. : The tuberculin specificity in humans of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5, *Am Rev Resp Dis*, 126 : 600-606, 1982.
- 28) Savrda, J. : Synthesis and biological assays of peptides from tuberculin-active protein, *Infect Immun*, 40 : 1163-1169, 1983.
- 29) Harboe, M., Nagai, S., Patarroyo, M. E. et al. : Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 *Mycobacterium bovis* BCG, *Infect Immun*, 52 : 293-302, 1986.
- 30) Young, D. B., Kent, L., Rees, A. et al. : Immunological activity of 38-kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*, *Infect Immun*, 54 : 177-183, 1986.
- 31) 水野 猛, 水島昭二 : タンパク質膜透過のメカニズム, *生物物理*, 27 : 22-29, 1987.
- 32) Shinnick, T. M., Vodkin, M. H., Williams, J. : The *Mycobacterium tuberculosis* 65-kilodalton antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to the *Escherichia coli* GroEL protein, *Infect Immun*, 56 : 446-451, 1988.
- 33) Yamamoto, Y. : Phage P1 mutant with decreased abortive transduction, *Virology*, 118 : 329-344, 1982.