



Title	らい菌遺伝子ライブラリーの作製及びその放線菌中の発現
Author(s)	牧野, 正直
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36498">https://hdl.handle.net/11094/36498</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	牧	野	正	直
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8252	号	
学位授与の日付	昭和	63年	5月	23日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	らい菌遺伝子ライブラリーの作製及びその放線菌中の発現			
論文審査委員	(主査) 教 授 伊藤利根太郎			
	(副査) 教 授 中田 篤男 教 授 内田 駿			

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

“らい”はらい菌 (*Mycobacterium leprae*) による慢性の感染症で、今尚、全世界に1,000万人以上の患者が存在しており、WHOも重視している疾患の一つである。しかし、*M. leprae*は未だ *in vitro* の培養に成功しておらず依然として、その研究が遅れている。本研究は遺伝子組換え技法を導入することによって *M. leprae* の分子生物学的解析の道を開くものである。

即ち、らい菌の遺伝子を他の細菌（大腸菌もしくは放線菌）中に組込み、その中でらい菌特異的な蛋白質を発現させることができれば、ある面では *M. leprae* の培養に成功したのと同様な意義のあることとなろう。らい菌の遺伝子を遺伝子組換え技術を用いて大腸菌中へ導入し、遺伝子ライブラリーを完成することを第一の目的とし、完成した遺伝子ライブラリーを放線菌中に形質転換し、この中でらい菌特異的蛋白質の発現をみることを第二の目的として、以下の実験を行なった。

#### 〔方法ならびに成績〕

*M. leprae* の精製：*M. leprae* をヌードマウス (Balb/c, nu/nu ♀) に移植し、このマウスを SPF の条件下で12ヶ月～16ヶ月飼育し、菌の増殖によってよく腫脹した足蹠から得た。マウス足蹠中からの *M. leprae* の分離精製は宮田らの方法を使用した。即ち、Ficoll-400のグラディエントにて分離する方法で、この方法によりマウス組織成分を充分除去し、得られた菌体の約80%は生菌であった。

*M. leprae* の染色体DNAの抽出：精製した *M. leprae* から Lysozyme- SDS法によって染色体DNAを抽出し、平均30kbのDNA断片を得た。

遺伝子ライブラリーの作製：遺伝子ライブラリー作製用のベクターとしては大腸菌 (*Escherichia coli*

K12株) と放線菌 (*Streptomyces lividans* 1326株) との両者で増殖可能なシャトルベクタープラスミド (pSN463) を用いた。これを *Bam*H I で完全消化し bacterial alkaline phosphatase にて処理しておく。*M. leprae* の DNA を *Sau* 3 AI で部分消化して、平均 7 kb になる様、消化の条件を設定して、2 ~ 10 kb の DNA 断片を得た。次に、この 2 種の DNA 断片を大腸菌 DNA ligase によって ligation を行なった。この DNA mixture をあらかじめカルシウムとルビディウムにて competent 化した大腸菌 DH I 株の中へ形質転換し、アンピシリン、カナマイシンで選択してらい菌遺伝子を含むと考えられる形質転換株を得た。総計 3,500 個の形質転換体 colony を pick up し、70 グループに分けてプラスミド DNA を調整し、*M. leprae* の遺伝子ライブラリーとした。

らい菌の全遺伝子のサイズが  $2.2 \times 10^9$  dalton であると推定され、ベクター中に挿入されたらい菌の DNA の長さが、平均 7 kb であるので Clarke らの計算式に当てはめてみると、このライブラリーは 99 % 以上の確率で *M. leprae* の全遺伝子を網羅していると考えられる。

放線菌中への導入と、放線菌体内でのらい菌遺伝子の発現の検索：らい菌の遺伝子ライブラリーを shuttle vector の性格を利用して放線菌中へ形質転換法によって導入した。形質転換の方法としては、Thompson らの protoplast regeneration 法を利用した。即ち、あらかじめ *S. lividans* 1326 株を lysozyme にて protoplast 化し、これを polyethylene glycol の作用を借りて細胞壁を変化させ、shuttle vector に cloning したらい菌遺伝子ライブラリーを導入するという方法である。protoplast 再生培地上に thiostrepton を含む軟寒天を重層し、その上に増殖してきた総計 600 個の形質転換株を得た。この 600 個の形質転換体 colony の一つ一つを thiostrepton を含む液体培地で更に培養しなおし、充分量の菌体を得た。

これ等の培養した菌体を超音波で破碎し、細胞抽出液を得、SDS-PAGE 法で分離し Western blotting 法によってらい菌特異的蛋白質の存在を check した。抗らい菌蛋白家兎血清を用いた反応では 600 株中 19 株に陽性の反応がみられた。更に、らい菌特異的モノクロナール抗体との反応をみたところ、この内の 2 株について明らかな陽性の結果を得た。

#### 〔総括〕

大腸菌-放線菌内の Shuttle vector, pSN436 を用いて新しいらい菌の遺伝子ライブラリーを完成了。

このライブラリーはらい菌遺伝子の全遺伝子を網羅している。このライブラリーを放線菌中へ形質転換し、らい菌遺伝子の発現を検討したところ、らい菌特異的蛋白質の産生を認める結果を得た。

このライブラリーを用いて新しいらい早期診断用製剤の開発とか、ひいてはワクチンの開発などの可能性が出てきた。

#### 論文の審査結果の要旨

In vitro の培養に成功していないらい菌 (*M. leprae*) は、遺伝子操作法の target としても魅力的な

ものである。現在までに、大腸菌の系を用いての遺伝子操作により、らい菌の蛋白質を大腸菌中に得た研究はあるが、この場合でも、らい菌自体の遺伝子プロモーターの作動は認められていない。らい菌遺伝子を、大腸菌-放線菌間の Shuttle vector, pSN436 の中へ組込み大腸菌の中で遺伝子ライブラリーを作製し、次いでこれを放線菌の中へ形質転換することにより、らい菌特異的蛋白質の産生を放線菌中で認めた。放線菌中の抗酸菌の遺伝子の発現を認めた研究は今までになく、らい菌の分子生物学的解析への道を開くものであり、医学博士の学位に値する研究であると考える。