

Title	Complete nucleotide sequence of immunogenic protein MPB70 from Mycobacterium bovis BCG
Author(s)	寺坂, 邦広
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37149">https://hdl.handle.net/11094/37149</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名・(本籍)	てら	さか	くに	ひろ
	寺	坂	邦	広
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9089		号
学位授与の日付	平成2年3月24日			
学位授与の要件	医学研究科病理系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	Complete nucleotide sequence of immunogenic protein MPB 70 from <i>Mycobacterium bovis</i> BCG (BCG由来タンパク抗原MPB70をコードする遺伝子の 全塩基配列決定)			
論文審査委員	(主査) 教授	上田 重晴		
	(副査) 教授	三輪谷俊夫	教授	岡山 博人

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

MPB (Mycobacterin, protein fraction from BCG) 70はBCG日本株の非加熱培養濾液より分離精製されたタンパクで、多くの抗酸菌の中でもBCGの一部の株と強毒ウシ型菌に特異的である。BCG日本株では分泌されるタンパクの中で最も大量をしめ、分泌タンパクの10%以上にも及ぶ。強い抗原性があるので、MPB70は免疫反応を利用したヒト型結核菌感染とウシ型結核菌感染の鑑別、ヒト型結核菌感染によるツベルクリン反応自然陽転とBCGによる陽転の判別などに応用が可能と考えられる。そのためには遺伝子情報の解析が極めて重要であると考え、MPB70の遺伝子について、全塩基配列を決定し、それより推定したアミノ酸配列について検討した。

#### 〔方法〕

これまでにDNA配列が判明しているBCGの他のタンパク( $\alpha$ 抗原, MPB57, MPB64)においてアミノ酸毎に頻繁に使用されるコドンには著しい偏りが認められるので、最も頻繁に使用されるコドンを使用して、化学分解によって既に解明されているMPB70のN末端アミノ酸配列より塩基配列を推定し、26塩基よりなるオリゴヌクレオチドを合成した。これを $^{32}\text{P}$ でラベルした後、プローブとして用い、BCG染色体DNAのSal I断片に対するサザンハイブリダイゼーションを行い、明瞭なバンドを形成した3.6 Kbpの断片を大腸菌にクローニングした。そして同一の合成プローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを実施し、目的の遺伝子を有するコロニーを得た。得られた目的の遺伝子をpCUプラスミドとM13ファージにサブクローニングした後、ジデオキシ法により全塩基配列を決定した。

## 〔成績〕

開始コドン(ATG)より9塩基上流には、リボソームと結合するShine-Dalgarno配列と推定される配列(AAGGAG)が存在した。開始コドンより143塩基上流と119塩基上流には、大腸菌のプロモーターのコンセンサス配列に類似した配列(TTGAGG, TACAGG)が18塩基の間隔をおいて認められた。

ATGで始まる領域は荷電アミノ酸(2個のLys)とそれに続く疎水性アミノ酸をコードする領域で、シグナルペプチド(SP)領域(30アミノ酸残基)と判明した。このSPはAlaが富み、その含量は40%にも達した。二次構造をChou-Fasmanの規則に基づきコンピューター解析すると、中央部分がらせん状の $\alpha$ -ヘリックス構造と推定された。N末端より2番目と4番目のアミノ酸残基は塩基性アミノ酸のLysで、C末端の切断部位から5番目と4番目にはProが並んで存在し、このProは $\alpha$ -ヘリックス破壊残基として機能していると考えられる。そして、C末端にはAlaが3個並び、Ala-X-Alaの-3,-1規則に適合していた。

MPB70をコードする遺伝子は489塩基であった。MPB70は163アミノ酸残基よりなり、分子量は、16,305と計算された。この分子量は沈降平衡法によって得られた値(15,100)に、ほぼ一致する。構成アミノ酸は、荷電アミノ酸が10.8%と少なく、一方疎水性アミノ酸は47.9%で、疎水性タンパクであることが示された。また、Hopp-Woodsの疎水性度パラメーターに基づいた計算でも、配列が既に判明している前述のBCGの他のタンパクと比較してMPB70は疎水性が強い。また、各アミノ酸毎に頻繁に使用されるコドンにはBCGの他のタンパクと共通の傾向が認められた。すなわち、GC含量は平均では63.8%であるが、コドンの第3文字では80.4%に達していた。

## 〔総括〕

疎水性アミノ酸(Ala)の多いシグナルペプチドとMPB70の強い疎水性が、MPB70が大量に分泌される一因と考えられる。本研究によって遺伝子工学的にMPB70の大量生産が可能となるので、より正確な結核の免疫診断法の開発に役立つと考えている。さらに、今回解明したMPB70のプロモーター及びシグナルペプチドの遺伝子情報は、BCGに外来性のタンパクを分泌させる、遺伝子組み換え生菌ワクチンの開発に有用と考えている。

## 論文の審査結果の要旨

結核は発展途上国では現在も最重要の感染症である。また、欧米諸国でエイズに関連して早期に診断を確定することの重要性が再認識され始めた。

本研究では、BCG日本株の培養濾液中に大量に分泌されるタンパク質MPB70について、遺伝子をクローニングした後、その全塩基配列を決定し、それに基づいてMPB70のアミノ酸配列を推定したものである。

すなわち、MPB70の遺伝子はプロモーター配列の下流にシグナルペプチドをコードする90塩基、それ

に続くMPB70 本体をコードする 489 塩基から構成されていた。なお、GC 含量が高く、平均で 63.8%、第 3 コドンでは 80.4%に達した。塩基配列より推定したMPB70 のアミノ酸はシグナルペプチドが30残基、本体が 163 残基で、双方共に疎水性が強く、本体の分子量は 16,305 と推定された。

本研究の結果、MPB70 を用いた結核の血清学的診断法の開発や、結核菌と同時に他の病原体（例えばエイズなど）のタンパク質を分泌できる遺伝子組み換え BCG 多価生ワクチンの開発などが可能になった。予防医学に貢献する意義を認め、本論文は学位論文に値するものとする。