

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590448

研究課題名(和文) ウェルシュ菌ε毒素プロモーター下流のbent DNAの解析と応用

研究課題名(英文) Bent promoter of epsilon-toxin gene from *Clostridium perfringens*: analysis and application to protein expressions.

研究代表者

宮田 茂 (MIYATA SHIGERU)

香川大学・医学部・講師

研究者番号：90314913

研究成果の概要(和文)：連続したアデニン塩基が周期的に存在 (phased A-tracts) すると、折れ曲がり DNA (bent DNA) を形成する。ε毒素のプロモーター下流に新規の bent 構造を見出し、転写を活性化させていることを明らかにした。ε毒素のプロモーターと他の2種類の bending promoter (α毒素、フェレドキシン) の転写における温度依存性を比較した結果、ε毒素は37℃で、α毒素は25℃で、フェレドキシンは温度に関係なく高い転写活性を示すことを明らかにした。広い温度範囲にわたり高い転写活性をもつフェレドキシン・プロモーターを利用して、大腸菌では発現・精製が困難な *Clostridium* 属の AT-rich 遺伝子にコードされる高分子量タンパク質 (ColH、NagH、NagJ、NanJ、BgaA) をウェルシュ菌で発現させ精製することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Phased A-tracts form a bent structure of DNA. We found a novel type of bent DNA structure, which stimulates the gene transcription, downstream of a *Clostridium perfringens* epsilon-toxin promoter. When we compared the temperature dependency of gene transcription from epsilon-toxin promoter to those from other bending promoters, alpha-toxin and ferredoxin promoters; epsilon-toxin, alpha-toxin and ferredoxin promoters exhibit high-level transcription at 37°C, 25°C and over a wide range of temperature, respectively. Thus, we constructed a novel expression vector using ferredoxin promoter to express efficiently large clostridial proteins in *C. perfringens*. Our expression system was successfully applied to produce large amounts of ColH, NagH, NagJ, NanJ, and BgaA, which are poorly expressed in *Escherichia coli* expression system. These proteins were purified in sufficient amounts from the supernatants of the recombinant *C. perfringens* cultures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：ウェルシュ菌, イプシロン毒素, bent DNA, プロモーター, フェレドキシン

## 1. 研究開始当初の背景

bent DNA は、転写開始、非相同組換え、DNA 複製、ヌクレオゾームの配置など、重要な生命現象に関与することが知られている。原核細胞、特に中温細菌のプロモーターの上流は、一般に湾曲しており、その典型例が phased A-tracts による bent DNA である。bent DNA とは別に、Ross らは、AT-rich な UP element と RNA ポリメラーゼの  $\alpha$  サブユニットとの結合の重要性を提唱している。我々が、これまでにウェルシュ菌を用いてプロモーター周辺領域に存在する bent DNA の転写における役割を解析してきた結果、ウェルシュ菌の  $\alpha$  毒素遺伝子 (*plc*) では、プロモーター (*Pplc*) 上流に 3 つの phased A-tracts からなる bent DNA が存在し、RNA ポリメラーゼの  $\alpha$  サブユニットと相互作用することにより、低温 (25°C) で転写を増強することを明らかにした。*plc* bent DNA と UP element はオーバーラップするが、bent DNA と RNA ポリメラーゼ複合体の 3 次元構造の解析結果は、我々が提唱した「Bending の増大による転写開始の促進」説を支持している。

また、*fdx* では、プロモーター (*Pfdx*) 上流の 3 つの phased A-tracts に加えてプロモーター内部にも 2 つ存在し、それらの共同作用により広い温度範囲にわたって転写を増強していることを明らかにしてきた。このプロモーター領域とウェルシュ菌の *nanI* 遺伝子を転写融合させることにより、*NanI* シアリダーゼを高発現させることに成功したが、汎用性に問題があり他の Clostridial タンパク質の発現は試みていない。

一方、 $\epsilon$  毒素はウェルシュ菌 (B, D 型菌) による腸性毒素血症 (致死率 100%) の原因毒素であり、かつヒトに対する潜在的毒性から CDC によりバイオテロリズムに使用される可能性が指摘されている強毒素である。我々はこの  $\epsilon$  毒素の病原性とその作用機序について明らかにしたが、その過程で、*etx* には明瞭なプロモーター配列や TG motif が存在しないにもかかわらず転写量が高いこと、さらに、3 つの phased A-tracts がこれまで報告のない下流域に存在し、強い bent DNA を形成していることを明らかにした。しかし、この新規の bent DNA の機能については推測の域を出ず、どのようにして転写を増強しているのか不明である。

## 2. 研究の目的

*etx* 遺伝子のプロモーター (*Petx*) 下流の bent DNA は、他と同様に転写を促進すると考えられるが、その存在部位から、*plc*, *fdx* とは異なる機構が予測される。そこで以下の (1)~(2) を明らかにし、*etx* の bent DNA のプロモーター活性化機構を解明する。また、応

用として各種 bent DNA を利用した AT-rich 遺伝子用高発現ベクターの開発を行う。

(1) *etx* 発現の温度依存性と *Petx* の転写活性化領域

*etx* が動物の体温付近で高発現することから、*Petx* の bent DNA の温度センサーとしての機能と転写活性を増強する最小領域を明らかにする。

(2) bent DNA による転写活性化の分子機構

bent DNA と RNA ポリメラーゼの相互作用領域を調べ、その調節機構を明らかにする。

(3) AT-rich 遺伝子用高発現ベクターの開発

bent DNA を有する三種のプロモーターを利用した AT-rich 遺伝子用発現ベクターを構築し、大腸菌では困難な clostridial 遺伝子の発現系を開発する。実証試験として、180kDa  $\mu$  毒素 (*NagH*) やクロストリパイン様プロテアーゼ (*Clp*) 等の発現・精製を試みる。

## 3. 研究の方法

(1)  $\epsilon$  毒素遺伝子のプロモーター活性の温度依存性を既知の bending promoter と比較するために、*C. perfringens* NCIB10691 (B 株) の発育温度域 (25°C~42°C) でフェレドキシシン遺伝子 *fdx*、 $\alpha$  毒素遺伝子 *plc*、 $\epsilon$  毒素遺伝子 *etx* の mRNA 量を northern blot で調べた。

*Petx* の -152~+125 の領域を、以前開発したプロモーター選択ベクター pPSV に挿入し、*C. perfringens* 13 株を形質転換した。この株を用いて、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ (CAT) 活性をレポーターとした *in vivo* 転写活性の測定を行った。しかし、この系ではダイナミックレンジが狭いため、新たに構築した新規プラスミド pR を用いて、*Petx* の 5' 側及び 3' 側をデリーションしたクローンの転写活性を調べた。

(2) *Petx* と RNA ポリメラーゼの相互作用を調べるために、ウェルシュ菌の RNA ポリメラーゼの簡便な精製法を確立した。ウェルシュ菌の RNA ポリメラーゼ  $\alpha$  サブユニットの N-末端に (His)<sub>6</sub>-tag が付加するように、ゲノム上の遺伝子 *rpoA* の 5' 側に (His)<sub>6</sub>-tag と factor Xa プロテアーゼ認識配列をコードする人工遺伝子を挿入した株 *C. perfringens* HrpoA を作製した。この株を前培養後、TYG 培地に 1% 接種し、37°C で対数増殖期中期まで培養した。フレンチプレスにて菌体を破碎後、Ni-IMAC 及び MonoQ カラムによる HPLC により精製した。

(3) 3 種の bending promoter のうち、広い温度範囲にわたり高い転写活性をもつフェレドキシシン・プロモーターを大腸菌・ウェルシュ菌シャトルベクターに挿入し、その下流に multiple cloning site と (His)<sub>6</sub>-tag coding sequence を挿入した AT-rich 遺伝子

発現用プラスミドを作製した。このプラスミドに、*C. histolyticum* の 116-kDa コラゲナーゼ遺伝子 (*colH*) や 180-kDa タンパク質をコードする *C. perfringens* の *nagH* 遺伝子、147-kDa 分泌型  $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードする *bgaA* 遺伝子、126-kDa 分泌型シアリダーゼをコードする *nanJ* 遺伝子、*nagH* のパラログである *nagJ* 遺伝子 (108-kDa タンパク質をコード) を挿入し、主要な菌体外プロテアーゼである clostripain-like protease をノックアウトした *C. perfringens* 13 Clp<sup>-</sup> を形質転換した。終夜培養液を TYG 培地に 1% 接種し、37°C で 7 時間培養後、遠心分離し培養上清を得た。培養上清を硫酸沈殿後、Ni-IMAC 及び MonoQ カラムによる HPLC により、各タンパク質の精製標品を得た。

#### 4. 研究成果

(1)  $\alpha$  毒素遺伝子ではプロモーター上流に 3 つの phased A-tracts が、フェレドキシン遺伝子では  $\alpha$  毒素と同様な 3 つの phased A-tracts に加えてプロモーター領域にオーバーラップするように 2 つの phased A-tracts が、 $\epsilon$  毒素遺伝子ではプロモーターの -10 領域から転写開始点下流にかけて 3 つの phased A-tracts が存在する。 $\alpha$  毒素遺伝子では低温で、フェレドキシン遺伝子では広い温度範囲にわたって転写を活性化することを明らかにしてきたが、 $\epsilon$  毒素遺伝子の転写における役割は不明である。そこで、3 種類の bending promoter ( $\alpha$  毒素、フェレドキシン、 $\epsilon$  毒素) の転写における温度依存性を明らかにするために、ノーザンブロットにより mRNA 量を調べた。その結果、*fdx* がこの温度域内で変化がないのに対し、*plc* は 25°C、*etx* は 37°C が最大でそれ以外の温度では極端に低レベルであることが明らかとなった (図 1)。

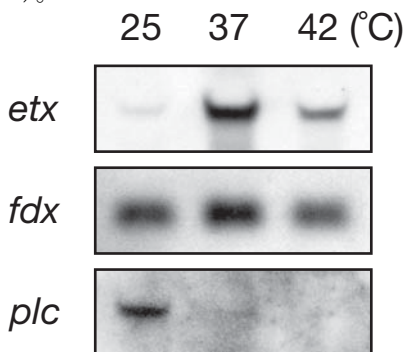


図 1. *etx*, *plc*, *fdx* の mRNA 量の温度依存性。

*Petx* の転写活性を詳細に測定するために、新たにプラスミド pR を構築した。pR は、細胞質内シアリダーゼ NanH をレポーターとし、その上流にマルチプル・クローニング・サイト、その下流に強力な転写を確実に止めるために大腸菌の *rrnB* 遺伝子のターミネーター

領域を挿入した大腸菌-ウェルシュ菌のシャトルベクターである。形質転換可能なウェルシュ菌である *C. perfringens* 13 株は、細胞質内シアリダーゼの遺伝子が欠失しているため、この株と pR を用いたレポーターシステムは、以前の pPSV を用いたシステムと比較して高感度で、10 倍以上のダイナミックレンジを有していた。このレポーター系を用いて、*Petx* の -152~+125 の領域を 5' 側及び 3' 側から順次デリージョンしていき、NanH 活性を調べた。

5' 側から -80、-60、-40、-20 とデリージョンさせた結果、予想どおり -35 領域がない -20 のクローンで、-152 のクローンと比較して大幅 (約 1/30) に活性が低下した。-40 のクローンでは、約 20% 低下したが、-80、-60 のクローンは -152 のクローンと比較して大きな差はなかった。

5' 側デリージョンクローンの 3' 側を +59、+21、+3 とデリージョンさせた結果、予想に反して +21 までデリージョンさせたクローンで約 50%、+3 までデリージョンさせたクローンで約 25~5% に活性が低下した。+3~+59 の塩基配列を調べたところ、新たに 2 つの phased A-tracts が存在していた。その領域の構造を CURVATURE ソフトウェアで計算した結果、約 42° の bent DNA を形成していることが示した (図 2)。以上の結果より、*Petx* は、-10 領域と転写開始点の間の大きな bent と、その下流、翻訳領域にも bent が存在することが示唆され (図 2)、下流の bent の欠失は転写活性に大きく影響を及ぼすことが明らかになった。

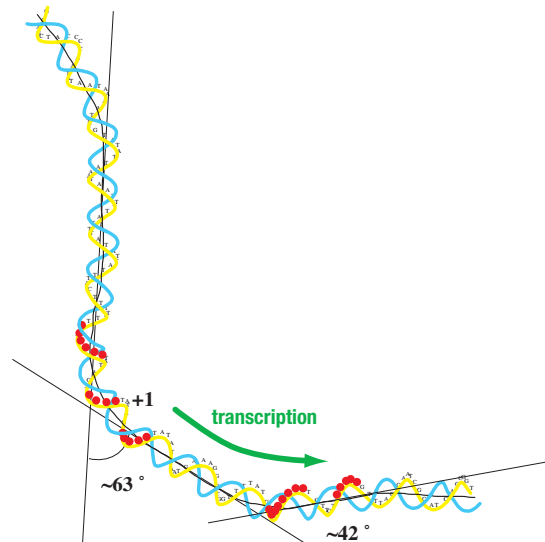


図 2. CURVATURE ソフトウェアで計算した *Petx* 領域の bent 構造. phased A-tracts のアデニン塩基を赤丸で示している。

(2) 次に、*Petx* と RNA ポリメラーゼの相互作用を調べるために、RNA ポリメラーゼの精製を行った。簡便な方法で RNA ポリメラーゼが

精製できるように、*C. perfringens* HrpoA を構築した。HrpoA 株は野生株と同様な増殖曲線を描くことから、RNA ポリメラーゼの機能に影響はないと考えられた。菌の lysate から2つのカラムクロマトグラフィーにより、高純度に精製できた。今後、Petxとの相互作用を調べる予定である。

(3) 3種の bending promoter のうち、広い温度範囲にわたり高い転写活性をもつフェレドキシン・プロモーターを大腸菌-ウェルシュ菌シャトルベクターに挿入し、目的遺伝子をウェルシュ菌で発現させる Clostridial AT-rich 遺伝子発現システムを構築した。実証試験として、まず 180kDa NagH を発現・精製した。比較のために pET22b プラスミドと AT-rich 遺伝子発現用宿主である *E. coli* BL21 CodonPlus RIL を用いた発現系で発現させ、精製を試みた。両発現系とも NagH の C-末端に(His)<sub>6</sub>-tag が付加するように構築した。図3に示したように、グラム陽性菌であるウェルシュ菌を宿主に用いることにより、NagH は培養液中に分泌された。今回開発した発現システムは、AT-rich 遺伝子用の大腸菌発現システムと比較しても、はるかに優れていることが明らかとなった。

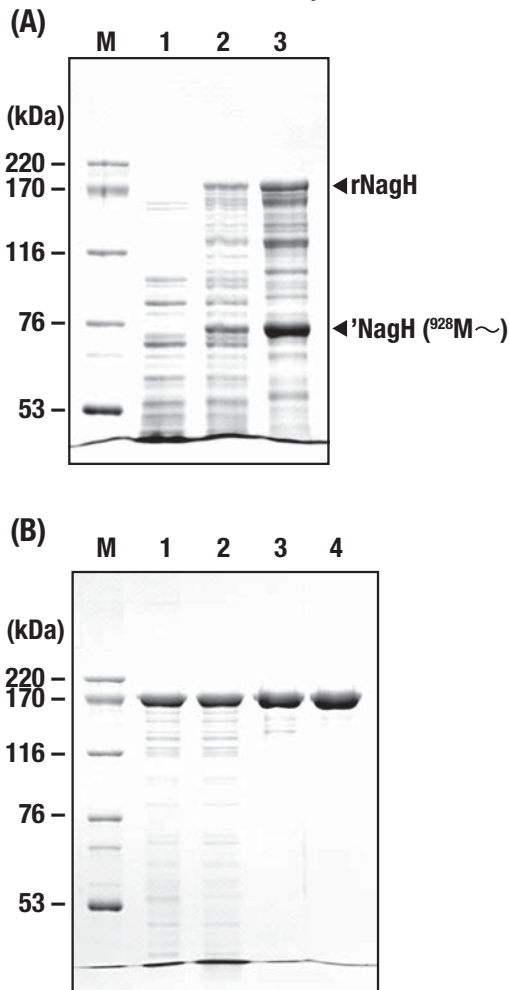


図 3. 大腸菌発現系 (A) とウェルシュ菌発現系 (B) を用いた NagH の発現と精製。

(A) Ni-IMAC による部分精製標品中のメインバンドは、構造遺伝子中の途中から翻訳されたと考えられる。M, 分子量マーカー; 1, IPTG で誘導する前の lysate; 2, 誘導後の lysate; 3, Ni-IMAC 画分。

(B) 培養上清中のメインバンドは NagH である。M, 分子量マーカー; 1, 培養上清; 2, 60% 硫酸画分; 3, Ni-IMAC 画分; 4, MonoQ-HPLC 画分。

代表例として、*C. histolyticum* の 116kDa コラゲナーゼ (ColH) のみを示すが (図 4)、同様な方法で実験方法に示した各種酵素遺伝子の発現に成功し、高純度精製標品を得ることができた。

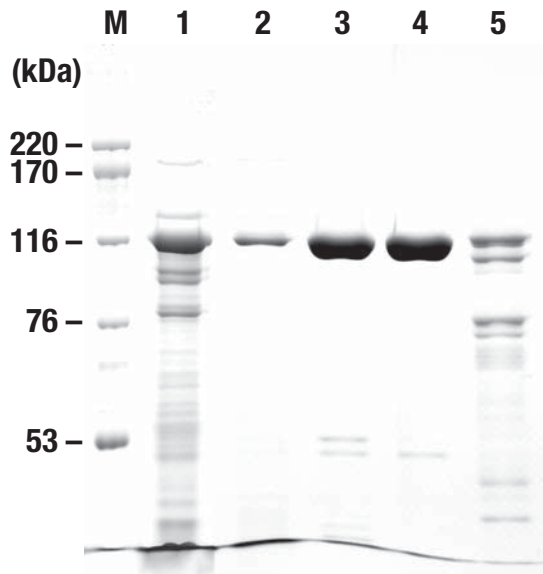


図 4. ウェルシュ菌発現系による ColH の発現と精製。M, 分子量マーカー; 1, 培養上清; 2, 70% 硫酸画分; 3, Ni-IMAC 画分; 4, MonoQ-HPLC 画分; 5, 市販の ColH (Worthington, CLSPA)。

*Clostridium* 属細菌は、医学的、工業的に重要な様々な酵素を培地中に分泌する。このウェルシュ菌発現系を用いることにより、これらの重要な酵素、特に大腸菌では発現困難な高分子量タンパク質を発現させ、高純度標品を簡便な方法で得られることを示した。今後は、etx の bent DNA の役割をさらに詳細に調べ、fdx、plc の bent DNA の機能と比較することにより、bent DNA の転写における役割の統一理論を構築するつもりである。さらにその統一理論を応用した、より強力な目的タンパク質にあわせたバリエーションを持つ発現系を構築することができるものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

研究者番号：30452668

[雑誌論文] (計3件)

- ① Hiroaki Tanaka, Hirofumi Nariya, Motoo Suzuki, Hitoshi Houchi, Eiji Tamai, Shigeru Miyata, and Akinobu Okabe. “High-level production and purification of clostripain expressed in a virulence-attenuated strain of *Clostridium perfringens*” *Protein Expression and Purification* **76**(1): 83-89 (2011) 査読有.
- ② Sadao Manabe, Hirofumi Nariya, Shigeru Miyata, Hiroaki Tanaka, Junzaburo Minami, Motoo Suzuki, Yuki Taniguchi, and Akinobu Okabe. “Purification and characterization of a clostripain-like protease from a recombinant *Clostridium perfringens* culture” *Microbiology* **156**(2): 561-569 (2010) 査読有.
- ③ Eiji Tamai, Shigeru Miyata, Hiroaki Tanaka, Hirofumi Nariya, Motoo Suzuki, Osamu Matsushita, Naoya Hatano, and Akinobu Okabe. “High-level expression of his-tagged clostridial collagenase in *Clostridium perfringens*” *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**(5): 627-635 (2008) 査読有.

[学会発表] (計13件)

- ① 宮田茂, 成谷宏文, 鈴木基生, 南純三朗, 岡部昭延 「ウェルシュ菌の糖鎖分解酵素群の解析。」第83回日本細菌学会総会(横浜) 2010.3.27
- ② 南純三朗, 宮田茂, 岡部昭延 「ウェルシュ菌イブシロン毒素の腸管透過性。」第83回日本細菌学会総会(横浜) 2010.3.27
- ③ 宮田茂, 成谷宏文, 鈴木基生, 南純三朗, 岡部昭延 「ウェルシュ菌 GH84 の生産と基質特異性の解析。」第82回日本細菌学会総会(名古屋) 2009.3.14

[その他]

ホームページ等

<http://www.kms.ac.jp/~microbio/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮田 茂 (MIYATA SHIGERU)

香川大学・医学部・講師

研究者番号：90314913

### (2) 研究分担者

成谷 宏文 (NARIYA HIROFUMI)

香川大学・医学部・助教