

学 位 論 文 題 名

Proteus vulgaris の β -ラクタマーゼ発現における
アクティベータータンパク BlaA の解析

学位論文内容の要旨

多くの細菌は、 β -ラクタマーゼを構成的、または、誘導的に産生することにより、 β -ラクタム系抗生物質に耐性となる。グラム陰性細菌 *Proteus vulgaris* は、 β -ラクタマーゼ遺伝子 (*blaB*) を染色体上に持ち、 β -ラクタム系抗生物質（ペニシリン、セファロスポリン等）が存在するときのみ、誘導的に β -ラクタマーゼを発現し、広範囲の β -ラクタム剤に耐性となっている。

P. vulgaris における β -ラクタマーゼの誘導的発現は、 β -ラクタマーゼの構造遺伝子である *blaB* 遺伝子のすぐ上流に、逆向きに存在している *blaA* 遺伝子によって調節されている。BlaA タンパクは、*blaB* 遺伝子の転写を活性化するアクティベーターであると同時に、自身をコードしている *blaA* 遺伝子の発現を自己抑制している。BlaA タンパクは、DNA 配列から予想されるアミノ酸配列の相同性から、LysR ファミリーに属する。LysR ファミリータンパクは、原核細胞の転写因子であり 50 種以上見つかった。そのN端側には、DNA 結合モチーフであるヘリックス-ターン-ヘリックス構造があることが予想されており、N端側の配列は非常に高く保存されているのに対し、それ以外の領域の相同性は低く、それぞれの特異性を決めていると考えられている。大腸菌内では、*P. vulgaris* の β -ラクタマーゼは、 β -ラクタム抗生物質の存在下でも誘導されず、*ampD* 遺伝子の変異株においてのみ、増殖相に従って発現される。

私は *P. vulgaris* における β -ラクタマーゼの誘導的発現における、BlaA タンパクの挙動を明らかにする目的で研究を進めてきた。まず、*blaA* 遺伝子の転写開始点を、プライマーエクステンションにより決定した。その結果、*blaA* 遺伝子の転写開始点は、*blaB* 遺伝子の転写開始点から 63 bp 離れて位置していた。次に、BlaA タンパクの精製を容易に行うために、BlaA タンパクを大量に産生する発現プラスミドを構築した。このプラスミドを、大腸菌内で、37℃で培養し、1 mM の IPTG で発現させると、BlaA タンパクは不溶性の顆粒体であるインクルージョンボディを形成した。不溶性となった BlaA タンパクを変性剤を用いて可溶化し、精製操作を行うことを試みたが、変性後の BlaA タンパクを再生させることはできなかった。30℃、0.5 mM IPTG の条件で BlaA タンパクを発現させると、大部分が可溶性画分に得られたので、ここから BlaA タンパクを、硫酸アンモニウム分画、吸着クロマトグラフィー等により

精製した。精製した BlaA タンパクの多量体構造をグリセロールグラディエントとグルタルアルデヒドの架橋実験で調べたところ、二量体を形成していることを確認した。精製した BlaA タンパクを用いて、ゲルシフト法で DNA への結合を確認し、DNaseI フットプリントにより、その結合部位を決定したところ、結合部位は *blaB* 遺伝子転写開始点 (+1) の上流 -51 から -81 に位置し、*blaA* 遺伝子プロモーター領域と重なっていた。よって、*blaA* 遺伝子の転写においては、RNA ポリメラーゼが結合できず、自己の合成を抑制していると思われる。また、結合部位は *blaB* 遺伝子プロモーターのすぐ上流でもあり、 β -ラクタム剤の誘導がかかると、RNA ポリメラーゼと相互作用し、*blaB* 遺伝子の転写を活性化すると予想される。結合部位には、パリンドローム構造が見られ、BlaA タンパクの二量体形成が支持された。ゲルシフト法においては、BlaA タンパクの量が増えるに従って、移動度が異なるバンドが2本見られた。結合領域を異なる場所に持った幾つかの断片を用いたゲルシフト法で、DNaseI フットプリントでは確認されなかったものの、高濃度において、BlaA タンパクは *blaA* 遺伝子の転写開始点から +45 から +63 の領域にも結合することが予想された。また、結合領域を中央よりに持つ断片と、結合領域を端に持つ2つの断片を比較したゲルシフトで、BlaA タンパクが DNA に結合すると、DNA が曲がっていることを確認し (DNA ベンディング)、DNA ベンディングは、*blaB* 遺伝子の転写調節に関わっていることが予想された。

BlaA タンパクは、DNA 結合、RNA ポリメラーゼとの相互作用、二量体形成、そして、まだ未知のインデューサーとの結合などの機能を持っている。BlaA ペプチド上における、それらの領域を調べるために、*ampD*⁻株においても *blaB* 遺伝子の転写活性化能を失った BlaA タンパク変異体を34個単離し、解析した。まず、ゲルシフト法によって、これらの変異体は DNA 結合活性をなくしたものが27個、保持しているものが7個であることを確認した。変異部位を調べてみると、DNA 結合能を失っていた変異体の変異は、DNA 結合モチーフが存在すると思われる N 端領域の他に、C 端領域や中央領域にも見られ、297 アミノ酸のうち、5~66 アミノ酸領域は DNA 結合モチーフによって直接 DNA と結合し、140~200、261以降の C 端領域は、N 端の DNA 結合モチーフの構造維持などの間接的な影響を及ぼす領域と予想された。DNA 結合能を保持していた変異体は72~130と219~243領域に変異が見られた。72~130 アミノ酸領域は、LysR ファミリー間で相同性が低く、*ampD*⁻株においても *blaB* 遺伝子の転写活性化能を幾分保有している BlaA タンパク変異体でもこの領域に変異が見られた。また、その変異アミノ酸は他の LysR メンバーでは保存されていないが、 β -ラクタマーゼアクチベーターでは保存されていたことから、72~130 アミノ酸領域は BlaA タンパクのインデューサーが結合する領域であると推定した。219~243領域の変異では、DNA 結合能を保持していた変異体だけではなく、DNA 結合能を失った変異体も見られ、同じアミノ酸の変異でも、DNA 結合するものとししないものが得られた。219~243領域は、BlaA タンパクの高次構造形成に重要な領域であると思われる、この領域の変異は、少なくとも BlaA タンパクの一つの機能を失うと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 本 和 則

副 査 教 授 盛 田 フ ミ

副 査 教 授 矢 澤 道 生

学 位 論 文 題 名

Proteus vulgaris の β -ラクタマーゼ発現における

アクティベータータンパク BlaA の解析

β -ラクタム抗生物質は現在でも広く治療に使用されている。しかし多くの細菌は、 β -ラクタム環を加水分解し、薬剤を無効とする酵素である β -ラクタマーゼを産生する。酵素の種類も多く、その性質は様々である。遺伝子も染色体上にあるものやプラスミド上にあるものがあり、また酵素がいつも構成的に産生される場合と、外部から β -ラクタム抗生物質を加えたときにのみ誘導される場合とがある。

著者が用いた細菌 *Proteus vulgaris* では β -ラクタマーゼ遺伝子は染色体上に存在し、誘導的に発現する。本論文は、この誘導現象を、主に組換えDNA技術を用いて解明したものである。 β -ラクタマーゼ遺伝子 *blaB* の上流に逆向きで存在する遺伝子 *blaA* の遺伝子産物である BlaA タンパク質はDNAに結合し、*blaB* からのRNAポリメラーゼによる転写を活性化するが、一方、自己の遺伝子 *blaA* の転写を抑制する。BlaA タンパク質を大腸菌での発現ベクターを用いて大量産生し、純粋なタンパク質を精製して、その性質を調べた。まず、溶液中で二量体を形成していることを証明した。DNAとの結合は、ゲルシフト法で確認し、DNA上の正確な部位はDNaseIによるフットプリント法により決定することができた。結合部位は *blaA* のプロモーターと重なり、その結果抑制に働くが、*blaB* のプロモーターに対しては、RNAポリメラーゼ結合部位のすぐ上流に位置することになり、BlaA タンパク質がRNAポリメラーゼと相互作用することによって転写活性を促進することが明らかになった。

さらに著者は、変異した *blaA* 遺伝子を効率よく多数分離した。これは大腸菌 *dnaQ* 変異株が突然変異を高頻度に誘発することを利用したものである。変異の位置を、すべてのDNA塩基配列を決めることによって特定した。多数の変

異をまずDNA結合の有無によって分類し、DNAとの結合部位、二量体形成、RNAポリメラーゼとの相互作用部位、低分子のインデューサーとの結合に関与する領域など BlaA タンパク質の機能部位を推定することが可能になった。また合成DNAによる変異作製により、BlaA タンパク質に存在する2つのシステイン残基は活性おをび二量体形成に関与しないことも明らかにした。

以上、著者は細菌による β -ラクタマーゼの誘導的発現について、遺伝子発現の制御タンパク質の機能を詳細に研究することにより新知見を得ており、 β -ラクタム抗生物質に対する耐性の機構解明に貢献するところが大きい。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認める。