

論文内容の要旨

申請者氏名 柘植 陽太

コリネ型細菌はアミノ酸生産菌として工業的に広く用いられている有用細菌である。本研究はコリネ型細菌の効率的な遺伝子機能解析法の確立とその実証を目的とした。

初めに分子ツールとして用いられる転移因子を単離した。枯草菌由来の *sacB* 遺伝子を用いたスクリーニングの結果、*C. glutamicum* ATCC14999、ATCC14751 株からそれぞれ挿入配列 IS14999 と複合トランスポゾン Tn14751 を単離した。IS14999 は常に 5'-TA-3' 配列を標的に *C. glutamicum* R 株ゲノム中にランダムに転移した。Tn14751 は同一の二つの挿入配列の内部に 17.4-kb のゲノム配列を有していた。本複合トランスポゾンも転移のランダム性、高い転移効率が確認されたことから、今回単離した転移因子は分子ツールとして有用であると考えられた。

次に効率的な遺伝子機能解析法として、染色体の大規模削除が可能な Cre/*loxP* システムと挿入配列を利用したランダムゲノム削除法を確立した。初めに二つのミニトランスポゾンベクターを構築した。転移領域内には *loxP* 配列と薬剤耐性遺伝子を双方に、*lacZ* 遺伝子を一方に搭載した。R 株に二つのミニトランスポゾンを経験させた後、組み換え酵素 Cre を細胞内で発現させ、二つの *loxP* 配列に挟まれたゲノム領域を削除した。ゲノム削除と共に二つの薬剤耐性遺伝子と *lacZ* 遺伝子が脱落するため、削除株は薬剤への感受性と色の変化により容易に見出すことが出来る。確立した手法を用いて 42 株のゲノム削除株を取得し、削除位置を決定した。削除領域は計 393.6 kb であり、総遺伝子の 11.9%にあたる 334 遺伝子が削除された。確立した本手法は多数のゲノム削除株を一度に取得できるため、新規遺伝子の効率的な機能解析に寄与でき、非必須遺伝子の効率的な確定にも有用であると考えられる。

確立した手法の有用性を実証するため、得られたゲノム削除株の解析を行った。コリネ細菌は分裂後に V 字を形成するスナッピングと呼ばれる特異的な細胞分裂機構を有しているが、その詳細な機構は不明である。形態が野生株と著しく異なる株は二株存在した (RD27, 41)。相補実験により RD41 株の形態異常の原因遺伝子は *cglR1596* であることが分かった。*cglR1596* 変異株は RD41 株と同様の形態異常を示し、一細胞中、核様体が 3 つ以上存在した。染色体分配に異常は認められないことから、本遺伝子は細胞分裂の最終段階の細胞分離に関与すると考えられた。本遺伝子は N 末端に分泌シグナル配列を、C 末端に endopeptidase ドメインである Nlpc/P60 ドメインを有する。本ドメインを同じく C 末端に有する *cglR2070* 遺伝子を *cglR1596* と併せて破壊するとより長い形態を示した。従って、これら二つの遺伝子がコリネ型細菌における細胞分離に関与すると考えられた。

透過型電子顕微鏡で観察すると、隔壁形成後も大腸菌や枯草菌とは異なり、娘細胞同士が細胞壁により連結されていた。また、分離後の娘細胞の一端には連結の名残と思われる分裂跡が存在した。*cglR1596* 変異株では、大きく外向きに湾曲している隔壁が認められた。コリネ型細菌は細胞の両極で細胞壁合成を行うことから、スナッピングという独特の細胞分裂は、娘細胞同士による圧力と連結部位の細胞壁の溶解によって引き起こされている可能性が示唆された。

本紀要ではコリネ型細菌の新規転移因子を二種類単離し、効率的な遺伝子機能解析法としてランダムゲノム削除法を確立した。取得したゲノム削除株の解析から形態変化に関わる遺伝子を同定し、細胞分裂時の細胞分離に関わることを明らかにした。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 柘植 陽太

コリネ型細菌は、1950年代、グルタミン酸を生産する菌として日本で単離され、以降、リジンをはじめとする他のアミノ酸や、核酸、有機酸等の工業生産にも用いられている最も有用な工業的微生物である。現在では、日本の他に、米国、ドイツ、スペイン、フランス、ロシア、韓国、台湾等の世界中でアミノ酸等の工業生産に用いられている。1990年代に入り、国際的に基礎、応用研究での競争が激化し、特に基礎研究の面では、ドイツから多数の学術論文が発表され、日本発の発酵技術でありながら劣勢に立たされていた。2003年にコリネ型細菌のゲノム配列が日本及びドイツにおいてほぼ同時に決定され、ポストゲノム時代に突入した。しかしながら、工業的に有用な微生物でありながら、モデル微生物である大腸菌、枯草菌と比較すると、基礎的知見は圧倒的に少なく、全遺伝子の1/3~1/4は、機能未知のままである。また、遺伝子組換え手法や染色体工学手法も、モデル微生物と比較して開発が不十分であり、工業生産のための遺伝子組換えによる改良の足かせとなっていた。

本論文では、上記の状況の中、染色体工学手法の一つとしてランダムゲノム削除法の確立を目的として、以下の成果を得た。まず、5種の新規トランスポゾン単離した。その中の一つである複合トランスポゾン *Tn14751* は、17.4-kb という長大な DNA 断片を転移可能であり、大規模ゲノム改変の際の長大 DNA 断片の染色体挿入技術として有用である。一方 *IS14999* は、コリネ型細菌からは今まで単離されていなかった *IS630/Tc1-mariner* superfamily に属し、転移のランダム性の高い新規の挿入配列であった。転移機構の異なる他の挿入配列との併用に有効である。次に、単離した挿入配列と *Cre/loxP* システムを利用したランダムゲノム削除法を確立した。この結果、42株のゲノム削除株を取得し、削除領域の総計は、全ゲノムの約12%にあたる約400-kb (334遺伝子) を削除していた。ランダムゲノム削除法の利点は、比較ゲノム等から推定できるゲノム上の削除可能な不要領域とは別に、推定不可能であった新規のゲノム領域及び新規遺伝子を削除することが可能であり、効率的な遺伝子機能解析に寄与できる。これらの技術は、モデル微生物として染色体工学手法においてリードしていた大腸菌と同等のレベルまで追いついたと言え大きく評価できる。さらに、得られたゲノム削除株の中から、これまで全く知見のなかったコリネ型細菌に特有のスナッピング細胞分裂機構に関する2種の細胞壁溶解酵素遺伝子を同定した。この結果は、上述の通り、単なる遺伝子配列や比較ゲノムだけでは推定できなかった新規機能を有する遺伝子を同定した好例と言え、本論文で確立したランダムゲノム削除法の有用性を示したと言える。また、これらの研究結果は、学位論文の主たる部分を公表した論文として3報、参考論文として6報として発表されるという目覚ましい成果をあげている。

以上のように、本論文は有用工業微生物であるコリネ型細菌の染色体工学手法の一つとしてランダムゲノム削除法を確立し、その有用性を示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。