

論文の内容の要旨

論文題目 好アルカリ性細菌 *Bacillus halodurans* C-125 株の
全ゲノム解析とその比較遺伝学的研究

氏名 高木善弘

好アルカリ性細菌 *Bacillus halodurans* C-125 は pH7.0-pH10.5 のアルカリ環境下で良好に生育する。このアルカリ性環境適応機構の解明を目指して、これまで個々の遺伝子に注目し研究が進められてきた。しかし、多くの遺伝子が複雑に関係して制御されているアルカリ性適応機構を解明するには、これまでの方法論の積み重ねだけでは困難であると思われる。そこで、アルカリ性環境下でいかなる遺伝子が発現し、制御されているかを全遺伝子情報をもとに網羅的に解析することは、好アルカリ性細菌を理解する上で重要なアプローチの一つと考えられる。

また、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌は、工業的に有用なアルカリ酵素を菌体外に分泌する。しかしながら、これまで報告された数多くのアルカリ酵素のうち実用化されたものは、数種類にすぎず、酵素生産性の低さが最も主たる原因となっている。したがって、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の酵素生産メカニズムを明らかにし、工業化に結びつけていくためにも、生物の全ゲノムを網羅的に明らかにして生命体の全体像を理解することが不可欠と考えられる。

そこで、本研究は、好アルカリ性細菌 *B. halodurans* C-125 株と近縁種である枯草菌のゲノム全体を比較することで、好アルカリ性に関与している遺伝子群を網羅的に解明することを第一の目的として行ってきた。また、工業的に有用な好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌をゲノム生物学という新しい視

点から研究し、さらなる有効利用を第二の目的として、*B. halodurans* C-125 株 (C-125 株) の全塩基配列を決定した。

第 2 章「*Bacillus* sp. C-125 株の系統分類学的解析」では、*Bacillus* sp. C-125 株 (C-125 株) の系統分類学的な位置について検討を行った。DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果、C-125 株は、*B. halodurans* の標準菌株と 86% の高い相同値を示し、16S rDNA の塩基配列に基づいた系統解析でも *B. halodurans* の近縁種であることが確認された。*Bacillus* sp. C-125 株を *Bacillus halodurans* C-125 株と呼ぶことにした。

第 3 章「*Bacillus halodurans* C-125 株の物理地図及び遺伝子地図の作成」では、本菌株のゲノムサイズを決定し、物理地図及び遺伝子地図を作成した。制限酵素 *A.scl* 及び *Sse8387I* により切断された DNA 断片のサイズより、本菌株のゲノムサイズは、4.25 Mb と推定された。さらに、リンキングクロンを用いて、これら DNA 断片からなる制限酵素地図を構築した。

第 4 章「*Bacillus halodurans* C-125 株と *Bacillus subtilis* 168 株ゲノム間の遺伝子構成の部分的比較」では、C-125 株と *B. subtilis* 168 株 (枯草菌) との間の遺伝子構成を比較するため、複製、蛋白質合成をつかさどる遺伝子群の解析および任意に選択した λ フェージクロンの挿入断片領域の遺伝子解析を行った。

C-125 株の複製開始点 (*oriC*) 領域から、*gidA-gyrA* 間の 13 個の遺伝子が同定され、枯草菌ゲノムにも保存されていた。その遺伝子構成も同一であった。また、*dnaA* 遺伝子上流と下流の非コード領域には、8 個と 2 個の DnaA box (TTAT(C/A)CACA) の繰り返し構造 (DnaA box クラスター) が見られ、枯草菌においても同領域に DnaA box クラスターが存在した。しかし、枯草菌ゲノムの *jag* 遺伝子上流に存在する第 3 の DnaA box クラスターは、C-125 株ゲノムには見出されなかった。

本菌株ゲノムから、41 個の遺伝子からなるリボソーム蛋白質遺伝子クラスター (*str*, *S10*, *spc*, α) が同定された。その遺伝子構成は、枯草菌の同クラスターと一致した。さらに、8 個の *rm* オペロンが同定され、*oriC* から 90° の領域に配置していることが判明した。その *rm* オペロンの構造は、枯草菌のそれと同じであるが、internally transcribed sequence (ITS) は、枯草菌と比較して長大であった。

任意に選択した 3 つの λ フェージクロン (λ_3 , λ_4 , λ_9) の塩基配列を決定し、遺伝子構成を解析した。その結果、SD 配列を伴う 44 個の ORF が見出され、34 個の ORF が枯草菌の遺伝子と相同性を示した。これら遺伝子のゲノム上での配置は枯草菌と比べ大きく異なっていた。

第 5 章「ホールゲノムショットガン配列決定法による *Bacillus halodurans* C-125 株ゲノムの全塩基配列の決定」では、C-125 株ゲノムの全塩基配列決定をホールゲノムショットガン法を用いて行った。

本法で得られなかったギャップ領域は、PCRにて取得し、全塩基配列を決定した。本ゲノムは4,202,353塩基からなり、GC含量は43.7%であった。また、大きな特徴として、101塩基から1915塩基の範囲で16種類の反復配列が、108ヶ所にわたってゲノム上に分布していることがわかった。

第6章「*Bacillus halodurans* C-125株ゲノムの遺伝子領域の推定とアノテーション」では、C-125株の全塩基配列より、4066個のORFを同定し、その機能を推定した。

全ORFは、ゲノム全体の約85%を占めており、その平均サイズは、877塩基で292個のアミノ酸配列をコードしていた。また、そのGC含量は平均して44.4%であった。一方、非コード領域は39.8%であった。これら遺伝子の78%はATGを、12%はTTGを、そして10%はGTGを開始コドンとした。RNA遺伝子は、8個のrRNA遺伝子オペロン、78個のtRNA遺伝子が同定された。さらに、10S RNA遺伝子(*ssrA*)、RNase Pの補酵素遺伝子(*mpB*)、分泌に関与する4.5S RNA遺伝子(*scr*)が存在していた。

全ORFのうち、3323個(82%)が他の生物種に保存されていた。そのうち、2713個が枯草菌ゲノムに保存されていた。また、機能が推定された2141個(52.7%)のORFのうち、1746個のORFが枯草菌ゲノムの中に保存されていた。機能が推定できなかった1925個(47.3%)のORFのうち、743個のORFがどの生物種にも保存されずC-125株に特有と考えられた。

第7章「*Bacillus halodurans* C-125株ゲノム中の遺伝子群の解析と*Bacillus subtilis* 168株ゲノムとの比較」では、*B. halodurans* C-125株の遺伝子構造について、詳細に検討した。また、近縁種である枯草菌と間でゲノム構造や遺伝子構造について比較検討した。

C-125株と枯草菌のゲノム構造の全体像を比較した結果、枯草菌ゲノムに保存されていた2713個のORFのうち約1500個のORFが、ゲノム上の遺伝子配置も同じであることが明らかになった。これら遺伝子には、複製、蛋白質合成に関連した遺伝子や炭水化物、脂質、アミノ酸らの基本的な代謝系の遺伝子がオペロン単位で含まれていた。また、両菌株は同様な構成因子で*Bacillus*属に特徴的な孢子形成を行っていることも明らかになった。また、C-125株ゲノムの112°-153°領域と212°-240°領域の遺伝子が、枯草菌ゲノムと比較して、*terC*を中心にして逆位していることが、ゲノム全体を比較することにより初めて明らかになった。

アルカリ性環境下で細胞内のpH維持に寄与すると考えられている細胞壁のテイクロノペプチドとNa⁺/H⁺対向輸送体について検討した。テイクロノペプチドの合成に関連する*tupA*遺伝子は、ゲノム上の3.76 Mb付近に配置し、隣接した5個の遺伝子とともにクラスターを形成していた。また、5個のNa⁺/H⁺対向輸送体遺伝子が同定され、それらと相同な遺伝子が枯草菌にも存在していた。

さらに、スーパーファミリーであるABCトランスポーターについて解析を行った。本菌株より、約35種類のABCトランスポーターが同定された。さらに構成蛋白質であるATP結合蛋白質を枯草菌のそれと比較したところ、6個のオリゴペプチドを基質とするATP結合蛋白質が、C-125株に特異的であることが判明した。

最後に、外界の変化に応答する遺伝子群について検討した。本菌株ゲノムにおいて同定された20個のシグマ因子遺伝子のうち、10個の遺伝子は、環境シグナルやストレスに応答して発現するextracytoplasmic function (ECF) ファミリーに属し、枯草菌ゲノムには相同遺伝子はなく、C-125株に特異的であった。さらに、2成分制御系遺伝子においても、枯草菌とは共有していない遺伝子セットも見出された。

本研究のゲノム解析により、好アルカリ性細菌の増殖に必要と思われる遺伝子は、枯草菌ゲノムにも良く保存されていた。その反面、膜輸送や環境変化への適応に関連した遺伝子において、多くの違いが見出された。