

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成13年度博士課程 進学
氏名 崔 先 柱
指導教官名 大 坪 栄 一

論文題目

Studies on genomic rearrangements in bacterial chromosomes
(バクテリア染色体におけるゲノム再編成に関する研究)

どのような生物でも、それが生き残るために獲得してきた戦略と様々な生活史は、ゲノムのなか
に書き込まれており、その情報を理解することによって、その生物の進化の過程を理解することがで
きる。これまでの研究によって、原核生物のゲノムでは、種間或いは一つの種の各株間で異なる様々
な再編成に関わる変異（欠失、挿入、逆位、等）が起こっていることが示唆されてきた。そのような
変異の創出の要因の一つに、転移因子がある。転移因子とは、原核生物から真核生物にいたるまで、
ゲノムに広く存在する固有の長さをもった DNA 断片である。多くの場合、内部に自分自身の転移反
応を司るトランスポゼースをコードしており、そのトランスポゼースの非相同組み換え機能によって
ゲノムのある部位から他の部位に転移する遺伝因子である。我々の研究室ではこれまでに、バクテリ
アの転移因子（挿入因子；IS）がDNAの再編成に深く関与していることを明らかにしてきた。

近年、様々なバクテリアのゲノムの全塩基配列が決定されている。本研究は、ゲノム上の再編成
に関わる変異を同定し、それらの存在様式からゲノムの進化を理解しようとしたもので、以下のよう
に要約される。

1. 各種大腸菌、及び、赤痢菌のゲノム再編に関わる変異の解析

大腸菌 (*Escherichia coli*) K-12 の MG1655 株のゲノムの全塩基配列がアメリカの Winsconsin
大学のグループにより既に決定されている。そこで、*E. coli* K-12 MG1655 株の塩基配列を基にし
て、各種大腸菌株 (*E. coli* K-12 の W3110 と JE5519 株、*E. coli* C、ECOR コレクションの 6 株)

のゲノム上にどのような遺伝的再編成が起きているかを各株から抽出した全ゲノム DNA を鋳型とし、ゲノムの 0 - 10 分に相当する領域 (約 465kb) において、5 kb ずつの間隔でハイブリダイズするプライマーを使用して PCR を行い、生じた産物のサイズを電気泳動で解析した。その結果、株によって MG1655 から生じる断片とは大きさが異なるものを見出した。違いがあった DNA 断片の塩基配列を決定し、MG1655 の塩基配列と比較した結果、挿入、欠失、置換、重複などの変異が存在することが分かった。これらの変異に加えて、配列や長さが菌株間で大きく異なる外来性と思われる巨大な領域が 2ヶ所存在することも分かった。

これまでに、病原性大腸菌 EHEC O157:H7 や赤痢菌のいくつかのゲノムの全塩基配列が決定されているが、これらを含めて見いだされる変異には、各株特異的に存在するものと、任意の幾つかの株で共通に見られるものがあった。この分布状況から、これらの変異が垂直伝播のみならず、水平伝播によっても生じたことが示唆される。

2. *E. coli* K-12 由来の 2 株、W3110 と MG1655、の全ゲノム比較

大腸菌 K-12 MG1655 株のゲノムの全塩基配列の決定に続き、極く最近、日本のグループにより大腸菌 K-12 W3110 株ゲノムの全塩基配列が決定された。この大腸菌 K-12 の 2 株の全ゲノムを比較したところ、両者の塩基配列にはほとんど違いは無いが、ゲノム再編成に関わったと思われる次のような変異が生じていることが分かった。(1) 複製起点を含んだ大きな領域の逆位、(2) W3110 において MG1655 にはない付加的な IS が全部で 12 個存在すること、一方、MG1655 において W3110 にはない IS 及び prophage の挿入がそれぞれ異なる座に存在すること、そして (3) W3110 においては 2 個の IS5 に挟まれた 12.6 kb の領域 (大腸菌染色体地図上 67.4 分の位置) が一単位となって縦列に反復していること、などがあげられる。(1) の逆位は、逆向きに存在する 2 個の rRNA 遺伝子間における相同組み換えによって生じたものであるが、他のほとんどは IS が関与するものであり、このことから IS によるゲノム再編成が短時日の間に起こることを示唆する。W3110 株にのみ見られる 12 個の挿入因子のうち 6 つは遺伝子領域に挿入していることが分かった。一般的に IS の挿入により標的となった遺伝子はその機能を失うと考えられるが、6 つのコピーの挿入による表現型に違いが無いことから、機能的に重複性の遺伝子に挿入したことを示唆する。

3. 大腸菌ゲノムに生じた変異による大腸菌・赤痢菌の近縁関係の推定

上記の研究において、任意のいくつかの大腸菌株で共通に見いだされる変異が存在することを述べたが、これらの変異は大腸菌の分類と系統関係を知る上での良いマーカーになると考えられた。そこで、これらの変異の有無をバーコード化し、得られたバーコードを用いて系統樹を作成した。ここで得られた系統樹は、幾つかのハウスキーピング遺伝子の塩基配列に基づいて作成した系統樹と、よく一致することが分かった。このことは、ゲノムの構造に基づいて得た大腸菌の分類と近縁関係が妥当なことを示す。

ゲノム上に見いだされた変異の有無による系統樹の作成は簡便であり、多種多様な大腸菌の分類

と系統関係の解析に有用と考えられる。実際、この方法により数多くの病原性大腸菌及び赤痢菌株の近縁関係の推定に応用してみた結果、大きくは3つのグループに分けられ、さらに多くのサブグループ（少なくとも8つ）に分けられることが分かった。調べた種々の大腸菌株においては、病原性の表現型に基づいた分類とは必ずしも一致しないが、抗原型（O、H、或いは、K型）とは比較的良好一致することが分かった。また、赤痢菌、例えば *S. flexneri* の系統は大腸菌のサブグループの内一つを形成することが分かった。このことは、赤痢菌が本質的には大腸菌の一部に属することを示す。

4. 特定部位に挿入する新規 IS エlement、IS621、の発見

ゲノム上に生じた変異の解析中に、一つの大腸菌株 ECOR28 ゲノム上に長さが 1,279 bp の挿入変異が存在することを見出した。この配列は少なくともゲノム中の 10ヶ所に存在することから新たな挿入配列 (IS621 と命名)であることが分かった。IS621 は内部に 326 個のアミノ酸からなるトランスポゼースをコードすると思われる一つの open reading frame を持っていた。DNA 配列を用いた相同性検索では病原菌の細胞外膜の抗原性タンパク質（絨毛; pili）の産生に関わる部位特異的組み換え酵素 [pilin gene invertase (PIV)] をコードする遺伝子 (*piv*) と高い相同性を示したが、トランスポゼースのアミノ酸配列を用いた相同性検索からは、IS110/IS492 ファミリーのメンバーがコードするトランスポゼースとも部分的な相同性を持つことが分かった。IS110/IS492 ファミリーのメンバーにコードされるトランスポゼースも低いながら PIV と相同性を持つことが分かっていたが、IS621 は既知のどのメンバーよりも *piv* 遺伝子に一番近い関係にあることが分かった。PIV とトランスポゼースのアミノ酸配列には、四つの酸性アミノ酸残基が各々対応する位置によく保存されていることが分かった。これらのアミノ酸残基は恐らく D-E (或いは D)-D-D モチーフとして活性中心を構成する可能性が示唆される。

興味深いことに、ECOR28 ゲノム中で見いだされた 10 コピーの IS621 は全て散在性配列 REP (repetitive extragenic palindromic) の内部にあり、REP 間で良く保存されている約 15 bp 配列の特定部位に挿入していることが分かった。また、IS110/IS492 ファミリーに属する因子には、IS621 のように、ゲノム内の反復配列中の特定部位に転移するものが幾つか存在していることも分かった。

5. 古細菌 *Sulfolobus tokodaii* に存在する挿入因子の同定によるゲノム再編の解析

S. tokodaii は、好熱・好酸性硫黄古細菌 (Crenarchaeon) である。九州の別府温泉から単離・同定された *S. tokodaii* の str. 7 株は、80℃以上の高温、pH 2~3 程度の酸性条件、好気的な環境で一番盛んに生育できる。最近、この株のゲノムの全塩基配列が決定された。これまで、我々の研究室では IS に関する研究から真正細菌の染色体ゲノムとそのプラスミドにおいて、ゲノム再編成に IS が深く関与していることを実証してきた。この観点から極限環境で生育する古細菌 *S. tokodaii* のゲノムも IS により様々な再編成が生じているかどうか興味を持たれる。そこで、*S. tokodaii* str. 7 株のゲノムに存在する挿入因子を調べた結果、17 種類の IS が合計 223 コピーで存在することが分かった。これらの因子の中で約 72% のコピーが標的配列の重複が見られないもの、或いは、欠失変異

を持つような不完全なものであることが分かった。このことは、*S. tokodaii* str. 7 株のゲノムに激しい再編成が生じている可能性を示唆することである。

S. tokodaii と類似の生育環境で生育する他の Crenarchaeon の *S. solfataricus* が、地理的には全く異なる地域 (Naples, Italy) で単離・同定されており、既にそのゲノム全塩基配列が決定されている。興味あることに、両株の全ゲノム間の相同性は非常に低いにも関わらず、両株で見出される挿入因子の中には比較的高い相同性を持つものが存在することが分かった。これは IS がこの2つの株間で進化的時間において最近に水平移動したことを示唆する。

以上本論文において、大腸菌・赤痢菌さらには古細菌のゲノム上に様々な再編成が生じていることを示し、バクテリアの進化が大規模なゲノム再編によって促されてきたことを示すと共に、大腸菌・赤痢菌においては再編成に関わる変異の存在様式の解析を通して、様々な系統の分類のみならず、系統関係も推定できることを示した。