

(様式 2)

学位論文の概要及び要旨

氏 名 松 下 功

題 目 Studies on the structure of genome DNA and its function of novel thermophilic phage ϕ IN93

(新規好熱性ファージ ϕ IN93 のゲノム構造と機能に関する研究)

学位論文の概要及び要旨

Chapter1 : 緒論

ウイルスは、地球上で細菌よりも多く存在し、細胞への感染で増殖する機能をもつ。しかし、自己のみでは増殖できないことから、生物界に分類されていない。Bamford 等は、ウイルスに特徴的な構造 (capsid, genome packaging apparatus) が、現存する生物の構造と相同性が無いことから、地球上にウイルスが最初に出現し、ウイルスにより細菌などの細胞が作られ進化したとする説を提唱している。また、生物界が真性細菌、古細菌、真核生物に分化した過程にも、ウイルスが関与したと考えている。生物界の系統樹の基底部には、好熱菌が多く存在し、生物界では好熱菌が祖先ではないかとする考えがある。筆者は、始原菌と位置づけられる好熱菌に感染する好熱性ファージの遺伝情報を解析することで、生物の進化との関連を解明できるのではないかと考え研究を開始した。

Chapter2 : 新規好熱性ファージの単離と形状 (論文 1, 論文 2)

始原ファージの探索を目的として、生活環境および自然界からの好熱菌の探索、さらには分離した好熱菌ゲノムに潜伏する好熱性ファージの単離を行った。生活環境からは中等度好熱菌である *Bacillus stearothermophilus* の 2 株を分離した (論文 1)。さらに、岐阜県福地温泉から高度好熱菌 *Thermus thermophilus* T22 を単離した。これら分離菌のうち、始原菌に近いとして位置づけられる *T. thermophilus* T22 からのファージの誘発を行い、ゲノム上に潜伏していた新規の好熱性ファージ ϕ IN93 を誘発することができた (論文 2)。単離した ϕ IN93 は、二本鎖環状 DNA を保有しており、予備的なゲノム解析からゲノム長が 19.604kbp で、これまでに単離された *Thermus* ファージ ϕ YS40, P23-75, P74-26 と比較して最も短く、生存に必要な基本的な遺伝子のみが存在すると推定した。形状は、尾部が無い多面体のファージで、GC 含量はこれまで見つかったファージとは異なり宿主のゲノムと同じ 65.9% と高く、最も好熱性の性質を帯びたファージであった。

Chapter3 : 新規好熱性ファージ ϕ IN93 のゲノム DNA 塩基配列解析 (論文 3)

ϕ IN93 のゲノム DNA の塩基配列を完全解読し、コードする 39 個の遺伝子群を推定するとともに、データベースとの相同性解析により 7 個の遺伝子に関して機能を予測した。他の好熱性遺伝子との相同性は 17.5% で、*Thermus* ファージ ϕ YS40, P23-75, P74-26 と比較して最も高かった。これら好熱性ファージとの相同性に関しては、P23-75, P74-26 の 3 個の遺伝子とのみ相同性はあったが、 ϕ IN93 のゲノムに存在する全遺伝子の約 7.6% で低い結果となり、 ϕ IN93 は始原ファージに近い可能性が考えられた。

ϕ IN93 のゲノム構造を詳細に調べた結果、6 組の転写ユニットで構成され、溶菌サイクルの遺伝子群は 5 組の転写ユニットからなり、同一方向に転写が進むことがわかった。逆方向の 1 組の転写ユニットは、容原化サイクルの遺伝子群で構成されていた。各転写ユニットの終結領域には、パリンドローム構造が確認された。溶菌に向かう転写ユニットには 35 個の ORFs が存在し、容原化に向かう転写

ユニットには4個のORFsが存在した。さらに、ファージを構成する構造タンパクを解析した結果、2種類の主要構造蛋白を含み、9種類のタンパクから構成され、これらの遺伝子は全て溶菌サイクルに含まれていた。溶菌サイクルの最初の転写ユニット、及び容原化サイクルの転写ユニットのプロモーター配列は、どちらも宿主の *Thermus* 菌のプロモーター配列に類似していた。容原化に向かう転写ユニット gp36 は転写制御を担う repressor と、gp38 は endonuclease と、gp39 と gp28 は宿主ゲノムへの組み込みに機能する integrase と excisionase/xis と相同性があり、ファージの生活環を構成すると結論した。すなわち、 ϕ IN93 のゲノム情報から、始原ファージが進化したモダンファージは、基本的なゲノム構成が保存されていると考察した。

Chapter4：新規好熱性ファージ ϕ IN93の感染・溶菌化因子解析（論文4）

ファージ ϕ IN93の宿主感染とその後引き起こされる溶菌に働くと思われる遺伝子を特定するために、lysozymeの単離とそのアミノ酸配列を解析した。目的とするlysozymeを ϕ IN93のファージライゼートから精製を行い、そのN末端アミノ酸配列からgp23が溶菌酵素である事を明らかにした。精製したlysozyme標品は、既報のlysozymeとは一次構造に相同性は無く、分子量33,000で、95 $^{\circ}$ Cで1hの熱処理においても安定で、高い耐熱性を示した。さらに、gp23溶菌酵素遺伝子近傍の詳細な解析から、gp22はneuraminidaseに、gp26はlytic transglycosilase(=lysozyme like)に高い相同性を示し、溶菌に関与する酵素群がオペロンとして機能すると考察した。

Chapter5：新規好熱性ファージ ϕ IN93の複製機能解析（論文：投稿中）

ファージ ϕ IN93の複製機能を解析した。データベースとの相同解析で、gp1が*Thermus*菌由来プラスミドのreplication protein (RepA)と高い相同性が認められた。そこで、gp1遺伝子が複製に働く遺伝子であることを明らかにするために、gp1遺伝子を大腸菌のベクタープラスミドpBluescript SK+に挿入し、組換えプラスミドpIA1（耐熱性km耐性遺伝子を薬剤耐性マーカーとして挿入）を構築した。次に、pIA1を*Thermus*菌へ導入し、*Thermus*菌の中でプラスミドpIA1の複製を検討した結果、*Thermus*菌の形質転換株は新たに薬剤耐性を獲得した。 ϕ IN93のゲノムDNAの複製機構は、ファージ特有のローリングサークル型の複製とは異なるプラスミド様の複製で、モダンファージの複製方法が確立する以前の形態であると考察した。

Chapter6：好熱性ファージ ϕ IN93に転移した新規好熱性IS因子による遺伝子交雑の解析（論文：5）

好熱性ファージ ϕ YS40、p23-45、p74-26のゲノム解析の結果から、進化の過程においては、高温下で生息する微生物間のみではなく、常温下で生息する細菌やウイルスへと拡大する多様な遺伝子の交雑が報告されている。この多様な遺伝子交雑には、細菌間を移動するトランスポゾンやIS因子の関与を推定した。そこで、 ϕ IN93の*Thermus thermophilus*TZ2への感染実験を行ったところ、*Thermus thermophilus*TZ2ゲノム上で新たに発見したIS因子のIS ϕ IN93が、 ϕ IN93ゲノムへ転移する現象を初めて観察した。IS ϕ IN93は、両端に逆向き相同配列が存在し、トランスポゼースの遺伝子が1個コードされ、IS256ファミリーに属したことから、IS因子による宿主のゲノムとファージゲノム間の遺伝子交雑機構を明らかにすることが出来た。

Chapter7：総括

生物進化と密接に関与するウイルス、特に始原生物の進化に働いたと考えられている始原ファージに注目して、新規な好熱性ファージ ϕ IN93を分離した。分離した好熱性ファージの遺伝情報とその機能を解明するために、ゲノムDNAの全塩基配列を解析するとともに、コードされる遺伝子を予測してその機能を解析した。その結果、1) lysozyme、2) replication protein (RepA)、3) m23/m37 peptidase domain protein、4) transglycosilase、5) excisionase/xis、dna-binding protein、6) repressor、7) endonuclease、8) phage integraseを解明することができた。これらの解析結果に基づき、lysozymeとreplication protein (RepA)の機能から、 ϕ IN93が始原菌から真性細菌への進化の際に関与したと考えられているプロトタイプのファージに分類されると考察した。最近、Bamford等が、 ϕ IN93と塩基配列で47%近い相同性のあるファージp23-77について報告した。このp23-77のゲノム長は17,036bpで ϕ IN93より少し短く、GC含量は67.9%で、 ϕ IN93の転写ユニット6に存在した容原化サイクルの遺伝子群のみが完全に欠けた溶菌性ファージと推測された。p23-77

ファージの main capsid proteins は single barrel 構造をしており、系統樹上で最も始原ファージに近い場所に位置づけられている。すなわち、p23-77 と類縁の ϕ IN93 は始原ファージに近く、始原ファージからモダンファージへと進化途中のファージに近いとも考えられる。

これまでの結果から、 ϕ IN93 は感染による溶菌・容原化、また、IS 因子 (IStaqTZ2) を介して宿主 *Thermus* 菌と遺伝子交雑が起きていることがわかった。更に、*Thermus* ファージ p23-45、p74-26、p23-77 と遺伝子交雑が起きていることもわかった。更に、最近、50°C で生育する *Meiothermus* 菌のゲノム内で、 ϕ IN93 に類似した遺伝子が発見され、*Thermus* に類縁の細菌とも遺伝子交雑が起きていることがわかった。 ϕ IN93 は、これらの遺伝子交雑を通じて、始原菌や始原ファージの進化の中心的な役割を果たしてきたと推定した。

他方、この様な好熱性ファージはバイオテクノロジーの産業利用の観点からも極めて興味深い。Chapter 4 と 5 では、好熱性溶菌酵素の発現と好熱菌内での DNA 複製遺伝子の機能発現を解明した。好熱性溶解酵素利用の 1 例としては、活性汚泥中に含まれる微生物や原生動物の細胞壁の溶解への応用で、汚泥の減容化につながり、また、汚泥を未利用バイオマスとしたエネルギー回収への応用が考えられる。また、DNA 複製遺伝子の利用は、産業用酵素として有用とされているが、発現が困難とされている様々な耐熱性酵素群の好熱菌内での大量発現が可能となり、これら酵素を触媒素子として利用することによりバイオプロセスの高効率化が大いに期待される。