

氏名(本籍)	くまの 熊野みゆき(神奈川県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第3072号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生物科学研究科
学位論文題目	Identification and Characterization of Expression Mechanism of a Multidrug-Resistant Operator (<i>Imr</i>) Newly Found in <i>Bacillus subtilis</i> Genome Sequencing Analysis of the 22-25 Degree Region (枯草菌染色体22度~25度のゲノム解析に基づく新規多剤耐性遺伝子オペロン(<i>Imr</i>)の同定と発現機構の解析)
主査	筑波大学教授 理学博士 山根 國 男
副査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌
副査	筑波大学教授 理学博士 沼 田 治
副査	筑波大学助教授 理学博士 中 村 幸 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

一つの生物における全ての遺伝子を明らかにしようという試みがヒト、イネ、ショウジョウバエ、線虫、シロイナズナなどで行われるのに伴って、多くの微生物種においても、病原性の解析やモデル生物としての解析から急速に発展してきた。それら微生物のなかでグラム陽性細菌の代表である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) のゲノムプロジェクトは1989年に発足し、1997年に4215kbの全塩基配列が決定された。本研究では枯草菌染色体360°マップ中22°-25°の約32kbの全塩基配列を決定し、この領域中に存在することが推定されていた薬剤耐性マーカーであるリンコマイシン耐性変異 (*lin-2*) を、ゲノム解析によって得られた配列情報を利用することにより同定した。また細菌の薬剤耐性遺伝子に関する研究は院内感染の問題などでも注目されていることから、同定したリンコマイシン耐性遺伝子の発現機構の解析を行った。まず22°-25°領域32kbのDNAを、inverse PCR及びLong PCRを用いたゲノムウォーキング法で調製し、ショットガンシーケンス法により塩基配列を決定した。またこの配列より推定された32個の遺伝子のアミノ酸配列についてホモロジー検索を行った結果、すでに報告されていた1個 (*lipA*) のみで、他は多剤耐性タンパクと相同性を示した遺伝子や、重金属耐性タンパクと相同性を示した遺伝子等を含む数個のオペロンが推定された。次に *lin-2* 変異を持つ *B. subtilis* 1A221株染色体より22°-25°領域をカバーするDNA断片をPCRにより増幅し、野生株 *B. subtilis* 168株に形質転換させ、リンコマイシン耐性を獲得する領域を特定した。その領域のDNA配列の解析により、*lin-2* 変異は、大腸菌の multidrug resistance protein (EmrY) と相同性を示す遺伝子を含むオペロンのプロモーター領域 (-10) の下流に存在する2箇所の塩基置換によることを明らかにした。このオペロン (リンコマイシン耐性遺伝子オペロン, *Imr*) は、制御タンパク質をコードすると推定される遺伝子 *ImrA* と drug efflux pump をコードすると推定される遺伝子 *ImrB* より構成されており、*lin-2* 変異は、*B. subtilis* 1A221株で *ImrA* 及び *ImrB* の転写量を増幅させていた。一方リンコマイシン (100 µg/ml) に耐性を示す自然耐性株を54株単離し、*ImrB* を高発現している株 (19株) を選択した後、塩基配列を解析した結果、変異点は、*lin-2* と同様の2箇所の部位に集中していた。これにより *lin-2* 領域に生じる変異と *Imr* の発現が密接に関わっていることが示唆されたため、これらの変異がRNA polymeraseとの直接的な関わりを経て転写に影響を示すのかどうかを評価するために、野生株と変異株の *Imr* プロモーター断片を用いた *in vitro* 転写実験を行った。その結果変異

株において野生株の3-20倍の転写量が確認された。また *lmr* プロモーター断片の open complex 形成の50%飽和に要する時間は、野生株が4分、*lin-2*変異株が2分と算出された。このことから *lin-2*変異が直接 RNA polymerase との親和性を促進させることが示唆され、*lin-2*変異が RNA polymerase との complex 形成の量だけでなく、その形成速度にも影響していることを示した。一方この部位には DNA 結合タンパク質と相互作用すると考えられる inverted repeat (IR) 配列が含まれていたため、制御タンパク質と相同性を示す LmrA に注目し、Gel mobility shift assay により、*B. subtilis* 1A221株及び *B. subtilis* 168株の *lmr* プロモーター領域に対する DNA 結合活性を比較したところ、両者における DNA 結合活性は同程度であった。以上のことから、*lin-2*領域における変異は、制御遺伝子の産物との相互作用以外に、それ自体で *lmr* の転写に影響を及ぼし、*lmr* はその発現において他の一般的な多剤耐性遺伝子とは異なった制御機構を持っている可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、院内感染の問題などでも注目されている細菌の薬剤耐性遺伝子の発現機構について、グラム陽性菌のなかでも最も研究が進んでいるものの一つとして知られる枯草菌を材料に、ゲノム解析を通して得られた情報をもとに解析する事を目的としている。枯草菌はタンパク質の局在や細胞分化といった生命現象のモデルとして数多くの研究が行われており、全ゲノム配列が明らかになることによって得られる情報や知見は非常に有益であると考えられる。本論文では、解析した32キロベース中に32個の遺伝子を同定し、その中に機能未知のタンパクをコードすると思われる遺伝子を含む、31個の新規遺伝子を同定した。また解析した領域中に存在するリンコマイシン耐性を引き起こす変異を同定すると共に、その耐性を担う遺伝子オペロン *lmr* を同定した。さらに *lmr* の発現によるリンコマイシン耐性を引き起こす突然変異部位が集中していることや、それら変異が直接 *lmr* の転写促進に関わっていることを示した。本論文では枯草菌の特徴や得られた配列情報を有効に利用することによって新規薬剤耐性遺伝子の同定が行われており、これはゲノム研究分野において非常に有効であると考えられた。また薬剤耐性遺伝子の研究は広く医学、農学、薬学の分野にまたがっていることから、細菌の新規薬剤耐性遺伝子を同定とその発現機構を解析した事は高く評価できる。さらにこの薬剤耐性が一般的な薬剤耐性遺伝子とは異なる様式で発現している可能性が示唆されたことは新規性があり薬剤耐性獲得のメカニズムを知る上でも大変興味深く、医学を含む他の分野においても有益な知見を提供すると考えられる。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。