

氏 名(本 籍)	た はた かず ゆき 田 畑 和 之 (石 川 県)
学 位 の 種 類	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1,654 号
学位授与年月日	平 成 9 年 3 月 24 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	農 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	高度好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> HB27株ゲノムの解析と改変
主 査	筑波大学教授 農学博士 中 原 忠 篤
副 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 祥 雲 弘 文
副 査	筑波大学助教授 農学博士 星 野 貴 行

論 文 の 内 容 の 要 旨

Thermus thermophilus は、生育温度範囲を50～85℃に有する高度好熱菌の代表的菌種の一つであり、遺伝子組み換えを含む genetic manipulationが行える生物の中で、最も高温で生育できる生物である。

本研究は、*T. thermophilus* のゲノム工学、すなわちゲノムの大規模な改変による *T. thermophilus* の分子育種システムの確立を目指して行なわれたものである。

まず、*T. thermophilus* HB27株ゲノムの制限酵素切断地図の作製を目指した検討が行なわれた。種々の制限酵素の中から、HB27株ゲノムをそれほど多くの箇所では切断しない酵素 (rare cutters) として、*EcoRI*, *EcoRV* など5種類の酵素を選択した。これらを用いて、パルスフィールド・ゲル電気泳動による解析を行なった結果、HB27株のゲノムサイズが約2 Mbであることを明らかにした。ついで、これら5種類の制限酵素によるゲノムの制限酵素切断地図を、バンドハイブリダイゼーション法およびリンキングクローンの取得とそれらを用いたハイブリダイゼーション法を効率的に併用することによって作製した。なお、この制限酵素切断地図作製の過程で、HB27株のゲノムが、1.82Mbの主染色体と250kbの巨大プラスミド pTT27から構成されていることを明らかとした。作製された制限酵素地図は、主染色体上に49箇所、プラスミド上に15箇所の切断部位が示された詳細なものとなった。

次に、*T. thermophilus* および類縁の *Thermus* 属細菌に由来する多数のクローニングされた遺伝子をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、60以上の遺伝子の制限酵素地図上の存在部位を決定した。

HB27株ゲノムの制限酵素切断地図を、近縁である HB 8 株のそれと比較したところ、両者で共通に地図作製に用いられていた制限酵素 *MunI* による制限酵素地図が全く異なっていた他、他の制限酵素によるゲノムの切断パターンも相互に全く異なっていた。しかし、両地図上にマッピングされている遺伝子の存在様式 (並び方) は両株で概ね一致していた。存在部位の異なる遺伝子もいくつか認められたが、そのような場合にはそれら遺伝子の周辺に *Thermus* の挿入配列である IS1000 の存在が HB 8 株ゲノムに認められた。

巨大プラスミド pTT27 上には、カロテノイド生合成系遺伝子の一つである *crtB* 遺伝子が存在することが明らかとなった。HB27株由来のカロテノイド合成能欠損自然変異株 Crt31株を用いた解析の結果、カロテノイド生合成系遺伝子クラスターが pTT27 上に存在することが明らかとなった。さらに、HB 8 株においても pTT27 と相同な巨大プラスミドが存在することも示し、*Thermus* ではカロテノイド合成能がプラスミド支配であることを明確

にした。

ついで、HB27株でのゲノム工学の可能性について検討した。*T. thermophilus* で現在利用可能である唯一の抗生物質耐性遺伝子であるカナマイシン耐性遺伝子をHB27株ゲノム由来の様々な断片中に挿入し、カナマイシン耐性遺伝子の両側に生じたゲノムとの相同領域での相同組換えを利用して、外来遺伝子であるカナマイシン耐性遺伝子のゲノム中への組み込みの可否を検討した。その結果、検討した10箇所すべてのについて、カナマイシン耐性遺伝子がゲノム中に計画どおりに組込まれていることが明らかとなった。この結果は、HB27株ゲノムのほぼ任意の場所への外来遺伝子の組み込み、すなわち *T. thermophilus* でのゲノム工学が可能であることを示すものである。

審 査 の 結 果 の 要 旨

T. thermophilus HB27株ゲノムの制限酵素切断地図は、主染色体と巨大プラスミドを併せて約 2 Mb のゲノム上に、5つの制限酵素による64箇所の切断部位を示し、さらに60を超える遺伝子の存在部位も明らかにしたものであり、*T. thermophilus* ゲノムの極めて詳細な地図として、内外から高い評価を得ている。

また、*T. thermophilus* HB27株およびHB 8株のカロテノイド生合成系がプラスミド上に存在することも明らかにしたが、これは、微生物におけるカロテノイド生合成能がプラスミド支配であることを明確に示した最初の報告としても注目される成果である。

本研究によって、*T. thermophilus* HB27株のゲノムの改変が任意に行なえることが明らかとなった。ゲノムの改変による微生物育種、すなわち「ゲノム工学」は、プラスミドベクターによる外来遺伝子の導入とは比較にならないほど長鎖の外来DNAの導入が可能であること、導入された外来DNAの安定性が高いことなど種々の利点を有しており、新しい微生物育種手法として注目されている。*T. thermophilus* におけるゲノム工学の基盤の確立により、本菌の発酵工業等の分野へのより幅広い応用が期待される。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。