

(様式第9 別紙2：公開版)

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 木原 誠
2. 養成カリキュラム名： 微生物の細胞複製メカニズムに関する研究
3. 養成カリキュラムの達成状況： 基本計画どおり順調に進捗している
4. 成果 (A4版3枚程度)

<研究開発業務の概要>

R I T E 微生物研究グループでは、コリネ型細菌が細胞複製抑制条件下で主要代謝系は維持する現象を見出し、この機能を応用した新規バイオプロセスの開発を行ってきた。本プロセスは細胞の増殖を抑制しているため高密な菌体をリアクターに充填でき極めて高い生産性 (STY) と副生成物を低く抑えることが可能である。現時点では、プロトタイプとして嫌気反応条件での反応により増殖を抑制しているが、様々な有用物質生産に適応できる汎用リアクターを実現するためには、その増殖抑制メカニズムを解明し、普遍的に細胞増殖を制御する必要がある。

細胞増殖制御を可能とする人為的制御法の開発にあたって、個々の細胞複製のステップで機能する遺伝子産物の解析が必須となる。バクテリアの細胞複製はこれまで大腸菌を中心に研究がなされており、先ず染色体 DNA の複製が開始し、複製した染色体 DNA が両極方向へ移動し、細胞の中央部にセプタムを形成して2個の細胞に分離するといった一連のステップがある。コリネ型細菌の嫌気反応条件で見られる細胞増殖抑制は、酸素分圧の低下という環境変化に対応するために、特定の細胞複製のステップを制御する遺伝子産物の機能抑制、例えば染色体 DNA 複製開始やセプタム形成などの機能抑制による現象であるという仮説が推定される。この仮説を検証するため、嫌気反応条件で見られる細胞増殖抑制がどのステップで起きているか形態学的観察を行い、増殖が停止しているステップで機能する遺伝子産物を同定し、さらにその機能の解明を行う。コリネ型細菌の嫌気条件における細胞増殖制御機構を明らかにすることで、コリネ型細菌に限らず様々な菌株に適用が可能となる。

<成果の概要>

a) コリネ型細菌の嫌気反応条件における細胞増殖制御機構についての検討

プロトタイプの増殖抑制法である嫌気条件下のコリネ型細菌について、顕微鏡観察による細胞形態観察と染色体 DNA の局在観察を行い、個々の細胞が細胞複製のどのステップにあるか解析を行った。この結果、嫌気条件下の細胞内染色体 DNA の局在観察において、当初予想した特定の細胞複製のステップで停止している結果は得られなかった。これは嫌気条件下における細胞複製の抑制機構が、特定の細胞複製ステップに起こるイベントの制御ではない可能性を示唆する非常に興味深い結果である。細胞複製の全てのステップ、もしくはほとんどのステップで機能するタンパク質の機能阻害、例えば染色体 DNA 伸長反応阻害、染色体 DNA 分配阻害（分裂装置の異常）、細胞壁の合成阻害などが細胞増殖を制御する候補として挙げられた。

コリネ型細菌の嫌気条件下の増殖抑制機構について、他のバクテリアで得られている既知の好気条件から嫌気条件への環境変化に伴うシグナル伝達経路、およびそのシグナル伝達が引き起こす誘導系について二成分制御系を中心に解析し、比較検討するとともにデータベース化を実施した。

コリネ型細菌の嫌気条件下の形態観察結果と、他のバクテリアゲノム情報解析結果より、グラム陽性菌のバクテリアゲノムで広く保存されている DCW クラスタ（細胞分裂装置および細胞壁合成酵素遺伝子群）に着目した。コリネ型細菌の DNA チップ解析データから DCW クラスタに存在する大部分の遺伝子が嫌気条件下で発現低下が見られたことから、細胞分裂と細胞壁合成の二つのイベントが共通のタンパク質複合体で制御されるという新規な増殖抑制制御モデルを提示し、現在検証実験を行っている。

ここで得られた知見は、コリネ型細菌が嫌気条件下で増殖を抑制する機構を解明する上で極めて重要な基礎データであり、広くバクテリアに適用できる技術開発が可能となる。

b) コリネ型細菌の細胞複製に関与する遺伝子の解析

現行のプロトタイプ増殖抑制法における増殖抑制メカニズムを解明するため、当研究室で決定したコリネ型細菌のゲノム配列を基に、各遺伝子 (ORF) についてアミノ酸配列の相同性データベース解析を行い、コードするタンパク質の機能推定を行った。細胞増殖に関与が予想される個々の遺伝子についてクローニングを実施し、機能別遺伝子ライブラリの構築を行った。また、これらの遺伝子の発現を人為的に制御するために、コリネ型細菌で転写調節の可能なプロモーターを持つベクター系の開発を行った。

今後、DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現制御解析により、細胞複製に関与する遺伝子発現消長を詳細に明らかにし、各遺伝子産物の細胞複製における機能を類推するとともに、嫌気反応条件

の増殖制御機構の解析から得られた知見について、各遺伝子の発現を制御することで補完実験を行う。

細胞複製に関与する遺伝子は、生育に必須な遺伝子である場合が多い。これら必須遺伝子の機能解析に有効な、温度感受性 (ts) 変異株の単離を行った。コリネ型細菌を変異原 (EMS) で処理し、30 で生育し 38 で生育できない ts 変異株を多数単離した。今後、これらの変異株に、上で述べた細胞複製に関与する遺伝子の導入によって温度感受性から復帰する株を選択し、細胞複製に関与する遺伝子の ts 変異株を選抜する。コリネ型細菌を用いた ts 変異株の解析を詳細に行った例はこれまでに報告されていない。これらの ts 変異株について解析を行うことが細胞複製制御機構を明らかにする上で重要なアプローチの一つとなる。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。コピーを添付。)

なし

(2) 口頭発表 (発表済を対象。予稿集のコピーを添付。)

- ・ 2002年11月 プログラム研究開発成果報告会 (京都グランピアホテル)
「微生物機能を利用したバイオマス資源からのCO₂固定グリーンプロセスのための基盤技術の開発」 (添付資料)
- ・ 2003年10月 プログラム研究中間評価 (ぱるるプラザ京都)
「微生物機能を利用したバイオマス資源からのCO₂固定グリーンプロセスのための基盤技術研究」 (添付資料)

(3) 特許等 (出願番号を記載)

なし