

学 位 論 文 題 名

新しい分類指標としてのリボソーム蛋白質に関する研究

学位論文内容の要旨

細菌化学分類学では、菌体成分による化学分類学的性質に加えて、DNAやRNAあるいは蛋白質等の情報高分子の比較研究が注目されている。特に、DNA 相同性は種を識別する基準としての有意性が認められているが、種の関係の判断が難しい場合があるとされている。また、リボソームRNA の塩基配列は、系統進化的類縁関係を反映する指標として、属以上の分類階級を識別する基準としての有効性が認められてきたが、リボソーム蛋白質は、系統進化的保存性が示唆されながらも、その分析方法の繁雑さと不安定性から、分類指標としての有効性は明確ではなかった。本研究では、70S リボソーム蛋白質の、正確かつ簡便で安定した2次元電気泳動法による分析方法を開発し、リボソーム蛋白質の新たな分類指標としての有効性を確認した。また、リボソーム蛋白質を指標として、*Arthrobacter* 属細菌群とグルタミン酸生産菌の分類位置を整理した。

本研究の結果を要約すると以下のとおりである。

1. リボソーム蛋白質の2次元電気泳動法による分析方法の開発

70S リボソーム蛋白質を分析する方法として、①分析時間の短縮、②簡便な操作性、③安定した再現性、④高い汎用性、⑤試料の微量化、⑥類似度の簡易分析に着目した改良型2次元電気泳動法を開発した。約4時間の泳動で、細菌のリボソーム蛋白質は、約50個のコンパクトなスポットとして再現よく分離した。また、本方法では、一枚のスラブゲル上で、3本の1次元目ゲルを同時に泳動できるので、両側に2種の生物由来のリボソーム蛋白質を、中央には両側の生物の混合試料をのせることにより、2種の生物由来のリボソーム蛋白質の相同性を、移動度の相違による類似度（相同値）として数値的に論議できるようになり、リボソーム蛋白質の相同性を分析する有効な方法であることを見い出した。

2. リボソーム蛋白質の分類指標としての有効性

リボソーム蛋白質は、変異処理による影響は少なく、安定して存在する信頼度の高い分子種であることを確認した。本方法により分離したリボソーム蛋白質の相同値とDNA 相同値は相関関係を示した。また、分子量約20,000以上のリボソーム蛋白質の相同値から、明確に種の間隔を識別できることを明らかにすると共に、リボソーム蛋白質の2次元電気泳動パターンが、種のプロフィールとなりうることを確認した。近縁な関係にある *Corynebacterium* 属と *Rhodococcus* 属細菌種のリボソーム蛋白質の比較から、分子量25,000以上と20,000～14,000の蛋白質の中に属レベルで保存性の高い分子種が存在し、それらの蛋白質種による泳動パターンは、属のプロフィールとなりうることを示した。

3. グルタミン酸生産菌の分類

Micrococcus、*Corynebacterium*、*Brevibacterium*、*Arthrobacter* 等の様々な学名で扱われてきたグルタミン酸生産菌は、*C. glutamicum* の基準株に対し、70 % 以上の高い DNA 相同値を示し同種の関係にあった。リボソーム蛋白質の各分子量領域の相同値もまた高い値を示し、同種の関係であることを支持した。16S rRNA 塩基配列の解析から、*C. glutamicum* と系統的に近縁な関係にあるとされた *C. callunae* や *C. ammoniagenes* のリボソーム蛋白質の泳動パターンは *C. glutamicum* と明瞭に異なり、リボソーム蛋白質の 2 次元電気泳動パターンは種特異性が高いことを明らかにした。

4. *Corynebacterium glutamicum* の表層構造

C. glutamicum の表層構造として、超薄切片像で 3 層の密度の濃い層（最外層、中間層、内層）とその間の薄い 2 層を、凍結割断像では高頻度に露呈する最外層の内側と中間層の外側の構造を観察した。最外層は隔壁形成には関与せず SDS 処理や物理的衝撃により剥離されやすい層で、中間層は、リゾチームの影響を受け、隔壁形成時に関与することを認めた。ビオチン制限培養により、糖脂質、結合性ペプチド等の細胞壁成分が変化し、単分子膜のブレブ様構造体の突出等微細構造変化を観察した。*C. glutamicum* のリゾチーム耐性要因の一つとして、ペプチドグリカン結合性の高級脂肪酸関連物質が保護的役割を担い、溶菌作用を防御する機構を明らかにした。

5. リボソーム蛋白質の分子種

改良型 2 次元電気泳動法により分離される *Escherichia coli* のリボソーム蛋白質のうち、分子量約 20,000 以上の蛋白種 (L1, L2, L3, L4, L5, L6, S1, S2, S3, S4) のスポット位置を決定した。*Arthrobacter* 属細菌種を用いて、属レベルで保存性の高い分子種として、L1, L2, L3, S2, S4 蛋白種を決定した。L2 蛋白種の N 末端アミノ酸配列は、属以上の分類階級で保存性が高く、グラム陽性細菌群の高 GC 含量グループと低 GC 含量グループを明瞭に区別した。*C. glutamicum* において種レベルで保存性が高く、特異的な移動度を示す蛋白種として、5S rRNA の結合に関与する L5 蛋白種を明らかにした。

6. *Arthrobacter* 属細菌の分類

化学分類的性質により A3 α と A4 α グループからなる *Arthrobacter* 属細菌の分類群の均一性について、リボソーム蛋白質を指標として検討した。承認種 15 種の基準株のリボソーム蛋白質の 2 次元電気泳動パターンを解析し、泳動パターンは種固有であり、15 種が独立した種であることを確認した。属全体として、分子量約 25,000 以上と 14,000 ~ 20,000 の分子種の泳動パターンの類似性が高く、A3 α と A4 α のグループに大差はなく、*Arthrobacter* 属は均一な分類群であることを明らかにした。分類位置が不明であった *A. polychromogenes* は、リボソーム蛋白質の相同性と DNA 相同性から *A. oxydans* と同種であると結論した。化学分類的性質の不明な *A. mysorens* は、A4 α の *A. nicotianae* と類似した泳動パターンを示し、リボソーム蛋白質の相同値は、*A. nicotianae* と同種の関係にあることを示した。以上の結果より、リボソーム蛋白質の 2 次元電気泳動パターンによる検索と解析は、迅速な同定方法として有効であることを確認した。

7. レバン分解能を有する細菌の分類同定と新種提案

レバン分解能を有する MS12-12 株の分類位置について検討した。本菌株は、グラム

陽性の不定形桿状細菌で、胞子は形成せず、運動性はなく、DNA の GC 含量は 65.5 mol% であった。ペプチドグリカンのジアミノ酸はリジンであり、架橋ペプチドとして、セリン、スレオニン、アラニンを有し、主要キノン型はメナキノン 9-(H₂) で、主要脂肪酸としてアンテイソ分岐鎖脂肪酸 C15:0 を有した。16S rRNA 塩基配列のホモロジー検索から、*Arthrobacter* 属細菌に系統的近縁性が認められた。リボソーム蛋白質の相同性と DNA 相同性から種レベルの同定を行ない、MS12-12 株は新種に該当することを明らかにし、*Arthrobacter* 属に属する新種 *Arthrobacter levanovorans* sp. nov. 基準株 MS12-12 として提唱した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 本 間 守

学 位 論 文 題 名

新しい分類指標としてのリボソーム蛋白質に関する研究

本論文は、和文174頁、図71、表33、引用文献62、4編、10章からなり、ほかに参考論文13編が付されている。

最近の細菌分類学では、従来の形態、生理的性質、あるいは化学的性質に加え、DNAやRNA等の情報高分子が分類指標として用いられている。特に、リボソームRNAの塩基配列は、系統進化的類縁関係を反映する指標として、属以上の分類階級を識別する基準として応用されているが、リボソーム蛋白質は、系統進化的保存性が示唆されながらも、その分析方法の繁雑さと不安定性から、分類指標としての有効性は明確ではなかった。本研究では、リボソーム蛋白質の正確かつ簡便で安定した2次元電気泳動法による分析方法を開発し、リボソーム蛋白質の新たな分類指標としての有効性を明らかにすることを目的としている。確立した本方法により、リボソーム蛋白質を指標として、*Arthrobacter* 属細菌群とグルタミン酸生産菌の分類位置を整理した。

70Sリボソーム蛋白質の分析方法として、1次元目は、キャピラリーカラムを使用した非平衡等電点によるUREA-PAGE法で、2次元目は、14% SDS-PAGE法で電気泳動することにより、従来法と比較し、操作が簡便で高い再現性と汎用性があり、かつ分析時間の短縮した改良型2次元電気泳動法を開発した。さらに本方法では、1枚の同一スラブゲル上で、移動度の相違による類似度（相同値）として2種の生物由来のリボソーム蛋白質の相同性を数値的に論議できることを見い出した。改良型2次元電気泳動法において分離される *Escherichia coli* 由来のリボソーム蛋白質のうち、分子量約 20,000 以上の蛋白種 (L1, L2, L3, L4, L5, L6, S1, S2, S3, S4) のスポット位置を決定した。分子量約 20,000 ~ 25,000 のリボソーム蛋白質は、種特異的な移動度を有する分子種であることを明らかにし、分子量約 20,000 以上のリボソーム蛋白質の相同値により、明確に種の間関係を識別できることを確認した。さらに、リボソーム蛋白質の泳動パターンは、種のフィンガープリントとして、迅速な分類同定に有効なツールとなりうることを示した。また、分子量 25,000 以上と 20,000~14,000 の蛋白種の中に属レベルで保存性の高い分子種が存在し、それらの蛋白種による泳動パターンは、属のプロフィールと

なりうることを示した。これらの結果より、リボソーム蛋白質は、本改良型2次元電気泳動法で分析することにより、種及び属レベルの新しい分類指標として有効であることを明らかにした。

確立した本方法により、様々な学名で扱われてきたグルタミン酸生産菌の分類位置について検討し、いずれの菌株も *Corynebacterium glutamicum* と同種の関係にあることを明らかにした。また、16S rRNA 塩基配列の解析で、*C. glutamicum* と系統的に近縁な関係にあるとされていた *C. callunae* や *C. ammoniagenes* のリボソーム蛋白質の泳動パターンは明瞭に異なり、リボソーム蛋白質の泳動パターンは種特異性が高いことを確認した。

化学分類学的性質により2つのグループ ($A3\alpha$, $A4\alpha$) から構成される *Arthrobacter* 属細菌の全承認種について、リボソーム蛋白質を指標として検討し、属全体として、分子量 25,000 以上と 20,000~14,000 の蛋白種を中心に泳動パターンの類似性が高く、大差のない均一な分類群であることを明らかにした。また、分類位置が不明であった、*A. polychromogenes* と *A. mysorens* について、リボソーム蛋白質の泳動パターンから種を絞り込み、*A. polychromogenes* は *A. oxydans* と、*A. mysorens* は *A. nicotianae* と同種の関係にあることを明らかにし、リボソーム蛋白質の2次元電気泳動パターンによる検索と解析は、迅速な分類同定方法として有効であることを示した。さらに、レバン分解能を有する細菌として新たに分離された MS12-12 株の分類位置について検討し、*Arthrobacter* 属に属する新種の細菌であると同定し、本菌株を *Arthrobacter levanovorans* sp. nov. として提唱した。

以上のように、リボソーム蛋白質を2次元電気泳動法で分析することにより、リボソーム蛋白質を新しい分類指標として有効であることを明らかにするとともに、本方法を適用してこれまで混乱のあったグルタミン酸生産菌、*Arthrobacter* 属細菌分類位置を整理した。また新たに分離されたレバン資化菌の迅速分類を試み、新種と同定した。これらは学術的にも応用的にも寄与するところが大きな成果である。

よって、審査員一同は別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者 落合 恵子 は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。