

生体関連物質化学 超好熱始原菌のゲノム情報に基づいた未知遺伝子の機能解析



今中 忠行 (いみなかただゆき) 学 研究科 合成・生物化学専攻 今中 忠行
 昭和 20 年 3 月 25 日生。学歴：昭和 42 年 3 月大阪大学工学部醸酵工学科卒業、昭和 44 年 3 月大阪大学大学院工学研究科醸酵工学専攻修士課程修了。昭和 44 年 12 月大阪大学大学院工学研究科醸酵工学専攻博士課程中退。学位：工学博士（昭和 48 年 2 月大阪大学）職歴：昭和 45 年 1 月大阪大学工学部助手昭和 48 年 2 月マサチューセッツ大学（米国）博士研究員（出張）～49 年 10 月。昭和 56 年 11 月大阪大学工学部助教授、昭和 59 年度広島大学工学部客員助教授（併任）平成元年 3 月 大阪大学工学部教授。平成 2 年度東京工業大学資源化学研究所客員教授（併任）平成 7 年 4 月大阪大学大学院工学研究科応用生物学専攻教授（組織替え）平成 8 年 7 月京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻教授、賞罰：昭和 62 年度日本醸酵学会斉藤賞受賞。平成 5.6.8.10.11 年度日本生物工学会論文賞受賞、平成 13 年度日本生物工学会生物工学賞受賞。平成 13 年度有馬啓記念バイオインダストリー協会賞受賞、平成 15 年アメリカ微生物学アカデミー会員。専門：生物工学（遺伝子工学、タンパク質工学、応用微生物学、極限環境微生物学、環境バイオテクノロジー）。所属学会：日本生物工学会、日本農芸化学会、日本化学会、日本生化学会、化学工学会、環境バイオテクノロジー学会（前会長）、日本応用糖質科学会、国際環境バイオテクノロジー学会（前会長）、アメリカ微生物学会、アメリカ化学会、近畿化学協会、酵素工学会研究会など

進化系統学的解析から超好熱菌は生命進化の源流に位置し、現存する生物の中で最も単純な生命形態であることが示唆されている

(図 1)。実際超好熱菌ゲノム上には 2000 個程度の遺伝子しか存在せず、これらの機能で全生命活動を営んでいる。我々は鹿児島県小宝島の硫気孔より超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株を分離し、(i) 新規耐熱性タンパク質の同定と機能解析、(ii) タンパク質の耐熱化機構の解明、(iii) 全ゲノム解析、(iv) 遺伝子破壊系の構築、などを進めてきた。特に我々が最近開発した超好熱菌の遺伝子破壊技術は世界で唯一の技術であり、超好熱菌遺伝子・タンパク質の *in vivo* での機能解明、



図 1. 16S ribosomal RNA に基づいた全生物の進化系統樹

特に今まで大きな進展が阻まれていた様々な細胞内制御系のメカニズムの解析が可能となった。本研究では *T. kodakaraensis* KOD1 株のゲノム情報を基盤とし、(i) 各遺伝子の 1 次構造に基づいた機能推定 (annotation)、(ii) 各遺伝子の異種発現、組換え型タンパク質の *in vitro* 機能解析、(iii) DNA chip、二次元電気泳動を利用した transcriptome、proteome 解析、(iv) 各遺伝子の破壊および破壊株の形質評価を行い、代謝・制御上重要な遺伝子や機能未知遺伝子の機能解明を目指している。以下に今までの研究成果の数例を紹介する。



図 2. KOD1 株ゲノム上遺伝子の機能分類

(1) *T. kodakaraensis* KOD1 株のゲノム解析と annotation

T. kodakaraensis KOD1 株全ゲノムの塩基配列を決定したところ、本ゲノムは 2,088,737 bp

からなり、2306 個の遺伝子の存在が推定された。これらの内、一次構造から機能予測できるもの (annotatable gene) は僅か 942 個であり、半数以上の遺伝子の細胞内機能は推定不可能であった (図 2)。Annotatable gene の大半は酵素タンパク質や transporter protein をコードしており、転写因子などの制御タンパク質は主に機能未知遺伝子に含まれていると考えられた。

(2) 構造的に新しい酵素の同定と解析

(2)-1. Fructose 1,6-bisphosphatase

Fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase) は fructose 1,6-bisphosphate (F16P) から fructose 6-phosphate (F6P) への脱リン酸化反応を触媒し、細胞内糖新生に必須な酵素である。FBPase 活性は様々な超好熱始原菌内に検出されてきたが、F16P 特異的な酵素はまだ同定されていなかった。我々は F16P に特異的な phosphatase が始原菌内に存在すると予想し、KOD1 株における酵素の同定を試みた。糖新生条件で培養した KOD1 株内に顕著な FBPase 活性が検出されたので、活性を指標に本酵素 (*Tk-Fbp*) を精製し、*Tk-fbp* 遺伝子を単離・解析した。構造比較より本遺伝子は超好熱菌ゲノムデータベースで機能未知遺伝子の一員であった。*Tk-Fbp* は F16P に対して phosphatase 活性を示したが、他の sugar phosphate に対しては活性を示さず、F16P 特異的な酵素であることが判った。また、*Tk-fbp* 遺伝子は糖新生条件では活発に転写されていたが、デンプン培地では転写が完全に抑制されていた。厳密な基質特異性・発現様式に加え、*Tk-fbp* の orthologue がゲノム解析が行われてきた全ての超好熱始原菌に存在していることから、*Tk-Fbp* は始原菌における真の FBPase であることが示唆された。

(2)-2. Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)

Rubisco は植物、藻類や多数の光合成細菌における炭酸固定経路 Calvin cycle の鍵酵素である。*T. kodakaraensis* KOD1 株にも Rubisco (*Tk-Rubisco*) が存在し、その活性、carboxylase 特異性は既報中最高値を示した。また本酵素は構造上既存の Type I、Type II のどちらにも属さない新型 Rubisco であることが判明した (図 3)。本酵素は L_2 dimer を構成単位にもつ直径約 150Å の平面的な pentagonal decamer 構造をとっていた。*Tk-Rubisco* の L_2 dimer 間の相互作用領域は既存の酵

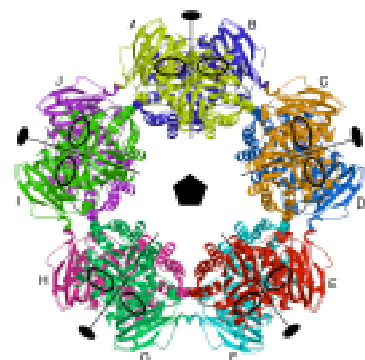


図 3. *Tk-Rubisco* の五角形構

素のものと全く異っており、Glu63, Arg66, Asp69 を中心としたイオン結合ネットワークが観察された。そこで各種変異体 E63S、R66S、D69S E63S/R66S/D69S を作製し、各々のタンパク質の精製・解析を進めた。その結果、30℃ においては D69S、E63S は野生型と同じ 10 量

体、R66S は 10 量体と 2 量体の混合物、E63S/R66S/D69S は 2 量体の形で存在していることが明らかとなった。温度上昇に伴い、E63S および R66S の 10 量体構造は徐々に解離し、4 量体や 2 量体構造へと変化した(図 4)。D69S 変異体のみ 90℃ においても 10 量体構造を維持した。

各変異体酵素の耐熱性を比較したところ、90℃ までに 10 量体構造が解離して 2 量体となった E63S、R66S および E63S/R66S/D69S 変異体は 95℃ 付近で熱変性したのに対し、90℃ まで

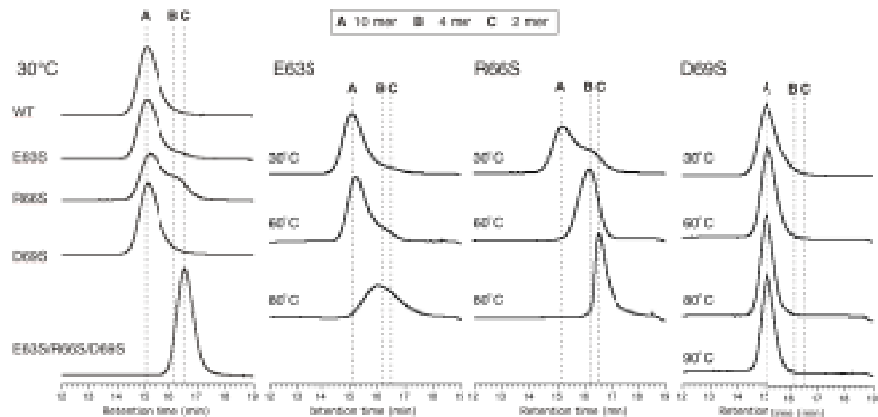


図 4. 様々な温度における Tk-Rubisco 変異体の subunit 会合様式

10 量体構造を維持した WT および D69S は約 110℃ まで安定に存在した。したがって、Tk-Rubisco の五角形構造は本酵素の耐熱性に大きく寄与していることが明らかとなり、この特異な構造が 65℃ から 100℃ までの温度範囲で生育する KOD1 株内において本酵素が安定に存在するために必要であることが判明した。

(3) 超好熱始原菌における遺伝子破壊系の構築

超好熱始原菌においては遺伝子数が少ないにも関わらずこれまで遺伝子破壊系が確立されておらず、遺伝子機能を研究する上で大きな障害となっていた。我々はまず 5-Fluoroorotic acid を用いて uracil 要求性を持つ *pyrF* 欠損株(KU25 株)を作製し、形質転換実験の宿主とした。*pyrF* 遺伝子を選択マーカーとして、tryptophan 生合成における必須遺伝子である *trpE* の破壊を試みた。*trpE* 内に *pyrF* を挿入した相同的組換え用破壊ベクターを構築し、塩化カルシウム法により KU25 株の形質転換を試みた結果、uracil 要求性が相補され

た形質転換体(KW4 株)を得ることができた。KW4 株は期待された遺伝子型(*trpE* 部位への *pyrF* の挿入)を示し(図 5)、また予想された uracil 非要求性および tryptophan 要求性を示した。さらに Southern blot 解析により非相同的組換えが起こっていないことも確認した。以上の結果より我々は超好熱始原菌 *T. kodakaraensis* KOD1 株における遺伝子破壊系の構築に成功し、KOD1 株ゲノム上に存在する機能未知遺伝子の遺伝学的解析が可能となった。

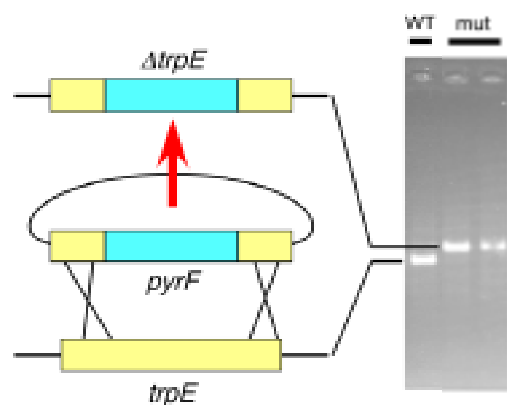


図 5. *pyrF* マーカーを利用した *trpE* 遺伝子の破壊

主な研究成果外部報告

・学会報告等

1. Takaaki Sato, Toshiaki Fukui, Haruyuki Atomi, Tadayuki Imanaka, "Construction of a gene disruption system by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1." International Conference on Thermophiles, Exeter, UK, 2003. (Best Poster Award)
2. Takeshi Tanaka, Toshiaki Fukui, Haruyuki Atomi, Shinsuke Fujiwara, Tadayuki Imanaka "Characterization of an exo- β -D-glucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1." International Conference on Thermophiles, Exeter, UK, 2003. (Best Poster Award)

・論文発表等

1. "The unique pentagonal structure of an archaeal Rubisco is essential for its high thermostability." N. Maeda, T. Kanai, H. Atomi & T. Imanaka, *J. Biol. Chem.*, (2002) **277**, 31656-31662.
2. "A novel candidate for the true fructose 1,6-bisphosphatase in archaea." N. Rashid, H. Imanaka, T. Kanai, T. Fukui, H. Atomi & T. Imanaka, *J. Biol. Chem.*, (2002) **277**, 30649-30655.
3. "Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hyperthermophilic archaeon." Y. Hotta, S. Ezaki, H. Atomi & T. Imanaka, *Appl. Environ. Microbiol.*, (2002) **68**, 3925-3931.
4. "A membrane-bound archaeal Lon protease displays ATP-independent proteolytic activity towards unfolded proteins along with ATP-dependent activity for folded proteins." T. Fukui, T. Eguchi, H. Atomi & T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, (2002) **184**, 3689-3698.
5. "Unique presence of manganese catalase in a hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis* VA1." T. Amo, H. Atomi & T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, (2002) **184**, 3305-3312.
6. "*Pyrobaculum calidifontis* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon that grows under atmospheric air." T. Amo, M. L. F. Paje, A. Inagaki, S. Ezaki, H. Atomi & T. Imanaka, *Archaea*, (2002) **1**, 113-121.
7. "Substrate recognition and fidelity of strand joining by an archaeal DNA ligase." M. Nakatani, S. Ezaki, H. Atomi & T. Imanaka, *Eur. J. Biochem.*, (2002) **269**, 650-656.
8. "Characterization of an archaeal cyclodextrin glucanotransferase with a novel C-terminal domain." N. Rashid, J. Cornista, S. Ezaki, T. Fukui, H. Atomi & T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, (2002) **184**, 777-784.
9. "Characterization of a cytosolic NiFe-hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1." T. Kanai, S. Ito & T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, (2003) **185**, 1705-1711.
10. "Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1." T. Sato, T. Fukui, H. Atomi & T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, (2003) **185**, 210-220.
11. "Characterization of an exo- β -D-glucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway in *Archaea*." T. Tanaka, T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, (2003) **185**(17), 5175-5181.
12. "Biochemical properties and regulated gene expression of the superoxide dismutase from the facultatively aerobic hyperthermophile, *Pyrobaculum calidifontis*." T. Amo, H. Atomi and T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, (2003) **185**(21), 6340-6347.