

# 複数のアミノ酸生合成に関与していると予想される超好熱菌遺伝子クラスターの機能解析

●星野 貴行 ◆中村 顕

筑波大学大学院生命環境科学研究科

## 〈研究の目的と進め方〉

研究代表者は、高度好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* のリジン生合成経路が、それまではカビ、酵母などの真菌類でのみ報告されていた  $\alpha$ -アミノアジピン酸経路であることを初めて明らかにした。この生合成経路は、前半部が一般的なロイシン生合成、後半部がアルギニン生合成経路の一部と、基質は異なるが反応は同じであると言う特徴を有している。また、ゲノム情報が明らかとなった超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* にも、*T. thermophilus* のリジン生合成系遺伝子クラスターと相同性の極めて高い遺伝子クラスターが存在していた(図)が、それまでは前半部がロイシン、後半部がアルギニンの生合成系遺伝子と推定されていたものであった。*P. horikoshii* はリジン、ロイシン、アルギニンのいずれをも要求しないこと、およびこのクラスター以外にこれら3アミノ酸の生合成系遺伝子と相同性を示す遺伝子が存在しないことから、*P. horikoshii* の当該遺伝子クラスター産物が bifunctional な機能を有している、すなわちクラスター前半部がロイシン、後半部がアルギニン生合成に関与し、同時にクラスター全体でリジン生合成を行っていることが強く示唆された。これを実証する最善の方法は、*P. horikoshii* の当該遺伝子破壊株を作製し、破壊株のアミノ酸要求性を検討することであるが、*P. horikoshii* については形質転換系が確立しておらず、不可能である。そこで *T. thermophilus* 及び枯草菌の当該遺伝子、すなわち *Lys*, *Leu*, *Arg* 生合成系遺伝子の破壊株を創製し、それらのゲノム中に *P. horikoshii* の当該遺伝子および遺伝子クラスターを挿入することによって、*P. horikoshii* 遺伝子の機能をアミノ酸要求性の相補という遺伝学的手法により明らかにする。さらに、当該遺伝子が組み込まれた枯草菌菌株については、培養温度を枯草菌の生育限界である50℃付近より徐々に低下させることによって、*P. horikoshii* 遺伝子(産物)の低温馴化を試みる。さらに、得られた変異遺伝子産物の機能を検討することによって、タンパク質の低温馴化による機能変化を追跡し、アミノ酸生合成系酵素の進化のメカニズムを推論する材料とする。

## 〈研究開始時の研究計画〉

1) *T. thermophilus* を宿主とした *P. horikoshii* 遺伝子の機能解析

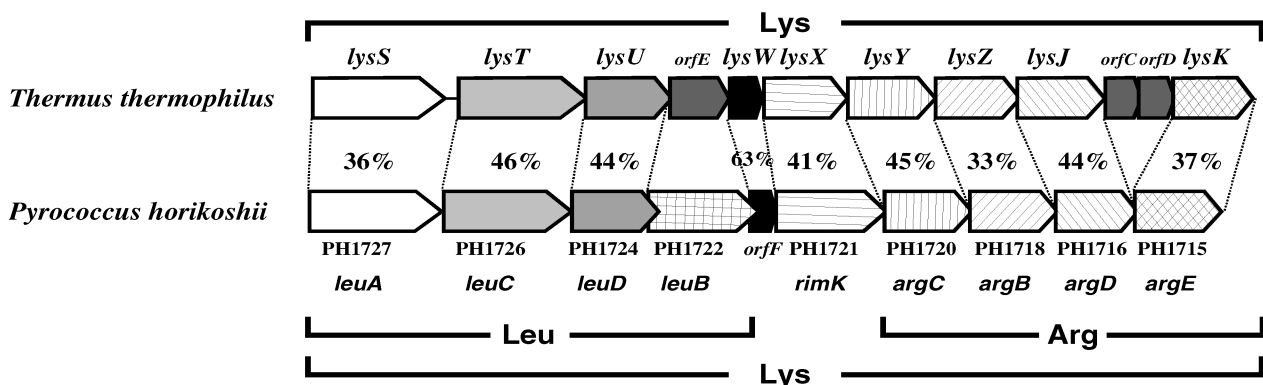
*T. thermophilus* の *Lys*, *Leu*, *Arg* 生合成に関わる各遺伝子に対して、耐熱性カナマイシン耐性(*Kmr*)遺伝子の挿入により個別に破壊した株を作製し、該当アミノ酸の要求性を確認する。次いで各破壊株に対して *P. horikoshii* の推定 *Lys* 生合成系遺伝子クラスターの該当遺伝子を、*T. thermophilus* で機能する強力プロモーターの下流に接続して導入する。実際には *T. thermophilus* で利用可能な薬剤耐性マーカーが *Kmr* 遺伝子しか存在しないので、*Kmr* 遺伝子挿入による *T. thermophilus* 遺伝子の破壊と共に *P. horikoshii* 遺伝子の導入を行うような構築をする。

得られた菌株については、該当アミノ酸の要求性が相補されているのかどうかを調べ、導入した *P. horikoshii* 遺伝子の機能について考察する。また、該当する酵素活性の有無についても検討する。

2) 枯草菌を宿主とした *P. horikoshii* 遺伝子の機能解析と低温馴化

上記の *T. thermophilus* の場合と同様に、枯草菌においても *Leu*, *Arg* 生合成系遺伝子を個別に破壊し、破壊株の該当アミノ酸に対する要求性について確認すると共に、同株に *P. horikoshii* の当該遺伝子を導入してアミノ酸要求性の相補が起こるかどうかを検討する。なお、枯草菌の *Lys* 生合成経路は  $\alpha$ -アミノアジピン酸経路ではないので、*Lys* 生合成に関する検討を行う場合には、*lysA* 遺伝子を破壊した枯草菌を作製し、この株に *P. horikoshii* の遺伝子クラスター全長を導入して *Lys* 要求性の相補を検討する。*P. horikoshii* 遺伝子の発現には、誘導発現が可能な強力プロモーターの *PxylA* プロモーターを用い、*amyE* locus に組み込む形で導入する。

得られた形質転換体が、枯草菌の通常の培養温度(37℃)ではアミノ酸要求性の相補を示さない場合には、枯草菌の生育限界温度に近い50℃付近にまで培養温度を上昇させ、アミノ酸要求性の相補が認められるかどうかを検討する。また、高温でのみアミノ酸要求性の相補が認められた場合、選択条件で培養温度を順次低下させていき、自然突然変異に伴う低温馴化によって相補される遺伝子が変化するかどうかを検討する。表現型に変化が認められた場合には、その株から回収した *P. horikoshii* 遺伝子の



変異部位を決定すると共に、同酵素を精製してタンパク質レベルでの機能変化を解析する。

#### 〈研究期間の成果〉

1) *T. thermophilus*を宿主とした*P. horikoshii*遺伝子の機能解析

図に示した遺伝子のうち*T. thermophilus*の *lysU*, *lysX*破壊株を創製し、リジン要求性を示すことを確認した。さらに破壊と同時に該当する *P. horikoshii* の PH1724, PH1721 遺伝子を、*T. thermophilus*の強力プロモーター *PslpA*の下流に接続してそれぞれ挿入したところ、リジン要求性変異が相補されることを明らかにした。またPH1724導入株では、細胞抽出液中に該当する酵素活性を検出したので、PH1724がLysTとヘテロダイマーを形成してhomoaconitase活性を担っていることが示唆された。以上のことから、PH1724、PH1721遺伝子は、少なくとも*T. thermophilus*内でリジン生合成に関与することを明らかにすることができた。

上記の手法では、*T. thermophilus*の該当遺伝子破壊株と、該当する*P. horikoshii*遺伝子をゲノムへ組み込んだ株を独立して作製する必要があり、菌株作製に多くの時間を要した。そこで作業の効率化を図るために、当研究グループで開発した耐熱性ハイグロマイシン耐性遺伝子を用いて*T. thermophilus*の該当遺伝子破壊株を作製し、この株に対してpTT8由来のプラスミド(Kmr)を用いて*P. horikoshii*遺伝子を導入することとした。この手法を用いて*P. horikoshii*遺伝子クラスターの前半部4遺伝子について検討したところ、PH1726/*lysU*のヘテロな組合せをDlysTU変異株に導入した場合に、Lys要求性を相補することが認められた。

このことは上記の結果と合わせて、PH1736/PH1734が*T. thermophilus*内でhomoaconitaseとして機能することを強く示唆した。なお、PH1727遺伝子の導入によるDleuA及びDlysS変異の相補、ならびにPH1722遺伝子の導入によるDleuB変異の相補についても検討したが、いずれの場合も明確なアミノ酸要求性の相補は認められなかった。また、*T. thermophilus*形質転換体の細胞抽出液を用いて、*P. horikoshii*タンパク質の検出も試みたが、いずれの場合も検出には至らなかった。

2) 枯草菌を宿主とした*P. horikoshii*遺伝子の機能解析と低温馴化

枯草菌の*leuABCD*遺伝子をin frame deletionにより個別に破壊した株を作製した。これらの株がLeu要求性を示すことを確認した上で、*P. horikoshii*の該当遺伝子をP<sub>xyl</sub>プロモーターの下流に接続して*amyE* locusに導入した。導入した株のLeu要求性の相補について検討したが、37℃はおろか50℃でも相補は認められなかった。この株の細胞抽出液を用いて*P. horikoshii*遺伝子産物を、C末端に付加したFLAG-tagを用いて検出することを試みたが、いずれの場合も検出に至らなかった。

3) 大腸菌を用いた*P. horikoshii*遺伝子の大量発現

当初の研究計画には含まれないが、大腸菌を宿主に*P. horikoshii*遺伝子クラスターの前半部4遺伝子を発現させ、産物の酵素活性を測定することにより、該当遺伝子の機能を検討することも試みた。

最初にpET systemを用いてPH1727, PH1724/PH1424, PH1722を発現させた場合、N末端にT7-tagを付加した場合にのみ産物を検出することができたが、PH1724を除き封入体を形成してしまった。PH1724については*T. thermophilus*のLysTと共発現させたところ、明らかにヘテロダイマーを形成していることが確認されたが、該当

する酵素活性は検出されなかった。また、PH1727及びPH1722については、GST-tagとの融合タンパク質として発現させることにより可溶化に成功したが、やはり酵素活性は検出されなかった。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

*P. horikoshii*の一次代謝経路に関する解析は進化系統学的にも非常に興味深いものであり、本研究で得られた結果はアミノ酸生合成系の進化の観点からも非常に興味深い。また、*P. horikoshii*の遺伝子機能の解析には、通常大腸菌が宿主として用いられているが、上記記載のように発現温度が異なるために産物が酵素活性を発揮しないなどの問題が生じる場合がある。本研究のように*T. thermophilus*を宿主とした場合には、温度の問題を解決することができるので、本研究で用いた*T. thermophilus*の遺伝子発現系は、*P. horikoshii*をはじめとする超好熱菌遺伝子の機能解析に応用していくことが可能であると考えられる。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

*T. thermophilus*を宿主とした解析では、PH1726/PH1724の機能については明らかにすることができたが、その他の遺伝子については、アミノ酸要求性の相補が認められず、また導入遺伝子産物の検出もできなかったため、遺伝子発現の段階で問題が生じているのか、あるいは当初の推定に問題があったのかを明らかにすることができなかった。また、*T. thermophilus*の当該アミノ酸生合成系遺伝子の転写解析も充分になされていないため、例えば薬剤耐性カセットの挿入によるpolar effectが結果を左右した可能性も考えられる。このように、宿主菌株のアミノ酸生合成系に関する基礎的な知見の不足及び異種遺伝子の大量発現系の構築ができなかった点が大きな問題点である。

枯草菌を用いた場合も同様に、*P. horikoshii*遺伝子産物の大量発現系が構築できなかったことが大きな問題点となった。

#### 〈今後の課題〉

上述のように、*T. thermophilus*を宿主とした、異種遺伝子大量発現系の構築及び当該アミノ酸生合成系遺伝子の転写解析など、*T. thermophilus*での基礎的な解析が今後の課題となる。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. 0406171104

T. Lombo, N. Takaya, J. Miyazaki, K. Gotoh, M. Nishiyama, T. Kosuge, A. Nakamura and T. Hoshino. Functional analysis of the small subunit of the putative homoaconitase from *Pyrococcus horikoshii* in the *Thermus lysine biosynthetic pathway*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 233, 315-324 (2004).

2. 0406171109

G. Takayama, T. Kosuge, H. Maseda, A. Nakamura and Hoshino, T. Nucleotide sequence of the cryptic plasmid pTT8 from *Thermus thermophilus* HB8 and isolation and characterization of its high-copy-number mutant. *Plasmid*, 51, 227-237 (2004).

3. 0407261217

G. Takayama, T. Kosuge, S. Sunamura, I. Matsui, K. Ishikawa, A. Nakamura and T. Hoshino. Use of *Thermus*

thermophilus host-vector system for expression of genes from hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus horikoshii*. *J. Jap. Soc. Extremophiles*, 3, 28-36 (2004).

4.

H. Kobayashi, A. Kuwae, H. Maseda, A. Nakamura and T. Hoshino. Isolation of a low-molecular-weight, multicopy plasmid, pNHK101, from *Thermus* sp. TK10 and its use as an expression vector for *T. thermophilus* HB27. *Plasmid*, 54, 70-79 (2005).