

超好熱菌を宿主とした遺伝子発現系の構築

● 跡見 晴幸

京都大学大学院工学研究科

<研究の目的と進め方>

我々は鹿児島県小宝島の硫気孔より超好熱始原菌 (Archaea) *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株を分離し、様々な観点から本菌の解析を進めている。*T. kodakaraensis* は絶対嫌気性の従属栄養生物であり、様々な多糖類、アミノ酸、有機酸を炭素源として生育する。本菌は 60℃ から 100℃ という高温環境で生育し、至適生育温度は 85℃ である。我々は最近その全ゲノム塩基配列を決定し、本菌ゲノムが 2,088,737 bp からなり、2,306 個の ORF を有することを明らかにした。また栄養要求性宿主株を作製することにより、相同性組換えを利用して超好熱菌としては初めての特異的遺伝子破壊・導入系を開発した。

そこで、本研究では超好熱始原菌 *T. kodakaraensis* を宿主とした汎用性のある外来遺伝子発現系の構築を目的とする。遺伝子破壊技術・ゲノム上への遺伝子導入技術の基本形は確立されているので、まず利用可能な栄養要求性宿主と選択マーカー遺伝子のさらなる開発、形質転換手法の改良、形質転換効率や汎用性の向上を目指す。また遺伝子発現の際に必要な *T. kodakaraensis* 内で機能する構成型・誘導抑制型 promoter を開発する。さらに外来タンパク質の分泌発現を視野に高効率分泌シグナルの同定を進め、最終的には様々な用途に応じた汎用型宿主ベクター系を構築する。本系が開発されれば、様々な内在性・外来遺伝子の機能解析・機能検証への利用も考えられるので併せて進めていきたい。さらに原理的には他の超好熱菌においても利用可能な薬剤耐性に基づく遺伝子破壊・導入系を開発したので、他の超好熱菌への利用を検討したい。

<2008 年度の研究の当初計画>

- 1) 今までに超好熱菌内で利用可能な reporter 遺伝子の候補を数種 (耐熱性 β -glycosidase、耐熱性 chitinase 等) 開発してきたので、これらの有用性を検討する。組換え型タンパク質の *in vitro* 解析により双方ともに十分な耐熱性を有することが確認されている。様々な promoter の機能解析、分泌シグナルペプチドの分泌効率の評価を中心に利用していきたい。
- 2) *T. kodakaraensis* を宿主として内在性遺伝子や外来遺伝子の (大量) 発現を行う。内在性遺伝子の場合は最近開発した pop-in/pop-out recombination を利用し、本来の遺伝子座への強力 promoter の挿入を計画している。具体的なターゲットとしては *T. kodakaraensis* ゲノム上に多数存在する protease 推定遺伝子や reporter protein の chitinase の大量分泌発現を予定している。Promoter としては有用性が確認されている glutamate dehydrogenase (*gdh*) promoter や cell surface glycoprotein (*csg*) promoter を予定している。
- 3) *T. kodakaraensis* ゲノム上遺伝子の破壊や発現強化を進め、今まで報告されていない超好熱菌における cell engineering を試みる。具体的ターゲットとしては *T. kodakaraensis* のタンパク質分解能力、水素生産能力に着目していきたい。
- 4) 引き続き遺伝子破壊系を利用して *T. kodakaraensis* ゲノム上の機能未知遺伝子の機能解明を進める。

<2008 年度の成果>

- 1) 超好熱菌を宿主としたタンパク質の分泌生産

1-a) Reporter protein (chitinase) の分泌生産

TK1765 遺伝子は *T. kodakaraensis* の chitinase をコードし、N 末端領域は endochitinase、C 末端領域は exochitinase に相当することが分かっている。C 末端領域 (ChiA Δ 4) は高度の耐熱性を示し、reporter protein としての有用性が期待されている。ここでは Chi Δ 4 遺伝子上流に TK1675 の分泌シグナルペプチドに対応する遺伝子断片を融合し、Chi Δ 4 の分泌生産を試みた。TK1675 は subtilisin-like protease をコードし、その翻訳産物は分泌されることが示されている。Promoter としては強力な構成型 promoter である *csg* promoter を利用し、この融合遺伝子断片を *T. kodakaraensis* ゲノムの chitinase 遺伝子領域に挿入した。その結果得られた形質転換体を培養した結果、培地上清に Chi Δ 4 protein の顕著な蓄積が認められた。また細胞抽出画分にはほとんど Chi Δ 4 protein が検出されなかった。これらの結果から、TK1675 の分泌シグナルペプチドが他のタンパク質の高効率分泌生産に利用可能であることが分かった。

1-b) 推定 protease の分泌生産

T. kodakaraensis ゲノム上遺伝子のうち、耐熱性 protease をコードすると推定された 2 つの ORF (TK1675, TK1689) を選定し、それらの大量分泌発現を試みた。TK1675 翻訳産物は生化学的に解析され、protease をコードすることが既に確認されており、上述の通りその分泌シグナルペプチドの機能も確認されている。TK1689 も N 末端に分泌シグナルと考えられる領域を有していたので、まず双方の遺伝子 promoter 強化のみを行うことにした。最近開発した pop-in/pop-out 法を利用してこれら両遺伝子の promoter を *csg* promoter に置換するというアプローチをとった。Genotype を PCR・塩基配列決定により確認した後、各形質転換株を casein を含む Gel-Rite 固体培地に植菌し、85℃ で incubate した。野生株 (KOD1) では casein の分解活性は検出されなかったが、各形質転換株には顕著な分解活性が観察され、耐熱性 protease TK1675・TK1689 高発現株が得られたと考えている。また野生株および TK1675・TK1689 高発現株を液体培養した後、各培地上清に含まれる protease 活性を比較した。Bovine serum albumin を基質として、60℃ で反応を行った。培地上清非添加および KOD1 株培地上清を添加した場合には基質の分解は観察されなかったが、各形質転換株の培地上清を添加した場合には顕著な分解活性が認められた。今後は分泌タンパク質の定量や protease 高分泌株の生育特性 (タンパク質・ペプチド分解能力) を解明する予定である。

2) 超好熱菌における cell engineering

デンブンや pyruvate を炭素源として連続培養 (85℃、希釈率 0.25 h^{-1}) を行うと、*T. kodakaraensis* は顕著な水素生産能力を示す (>6 H_2 mmol $L^{-1} h^{-1}$)。そこで我々はその水素発生メカニズムの解明と発生能力の向上を目指して *T. kodakaraensis* の水素高生産株の分子育種を試みた。ゲノム情報から本菌には 2 種の hydrogenase (Hyh, Mbb) が存在することが示唆された。Hyh は細胞質に存在し、NADP を補酵素とするもので、水素の吸収に関与することが

示唆されている。得られた電子は glutamate dehydrogenase (GDH)、alanine aminotransferase (AlaAT) を介して pyruvate の alanine への還元へと利用される。一方 Mbh は膜型の hydrogenase であり、pyruvate の酸化に伴って得られる電子を利用して水素を生産することが示唆されている。

そこで水素の再吸収反応を抑制するため、AlaAT および Hyh 両遺伝子の破壊を進めた。*T. kodakaraensis* のウラシル要求性株である KU216 株をホストに、*pyrF* をマーカー遺伝子に用いたダブルクロスオーバー相同組換え法による遺伝子破壊操作を行い、AlaAT 遺伝子 (*aat*) 破壊株である PAT1 株、および Hyh 遺伝子 (*hyh*) 破壊株である PHY1 株を作製した。また single crossover insertion \rightarrow pop-out recombination 法を用いたマーカー遺伝子の回収・再利用により、*aat* と *hyh* の両遺伝子の破壊株である DPHA1 株の取得にも成功した。DPHA1 株は宿主細胞である KU216 株と比較して 10% 程度高い水素生産能力を示した。

次に水素発生に直接関与すると考えられる膜型 Mbh の遺伝子発現を増強させる戦略をとった。方法としては *aat* と *hyh* の両遺伝子の破壊株である DPHA1 株を宿主として、前述の single crossover insertion \rightarrow pop-out recombination 法を用いて膜型ヒドロゲナーゼ遺伝子 (*mbh*) を *T. kodakaraensis* 内で構成的にはたらく強力な *csg* promoter の支配下においた。これにより得られた組換え株 (MAH1 株) の水素生産能力を DPHA1 株と比較した。その結果、85°C、希釈率 0.25 h⁻¹ においては MAH1 株の乾燥菌体重量あたりの水素発生速度は DPHA1 株より 26% も増加していることが判明した。これらの結果から、本研究で開発してきた遺伝子破壊・導入・増強技術を利用して超好熱菌の分子育種が可能であることが示された。

3) 遺伝子破壊系を利用した遺伝子の機能解明

補酵素 A (CoA) は全ての生物に存在する補酵素であり、解糖系、トリカルボン酸回路、脂肪酸合成経路等、様々な異化代謝経路・生合成経路で重要な役割を果たす。細菌や真核生物では CoA の生合成は valine を出発物質として pantoate \rightarrow pantothenate \rightarrow phosphopantothenate \rightarrow phosphopantothienoylcysteine を含む 9 段階の反応を介して行われ、それぞれの反応を担う酵素の遺伝子が同定されている。始原菌のゲノム上にも CoA 生合成に関与すると考えられる遺伝子が複数存在するが、始原菌ゲノムは共通して pantoate \rightarrow pantothenate を触媒する pantothenate synthetase および pantothenate \rightarrow phosphopantothenate を触媒する pantothenate kinase をコードする遺伝子の homolog を持たない。そこでまず *T. kodakaraensis* の CoA 合成能を検証するため、CoA を含まない合成培地での増殖を検討した。複数回の継代培養を繰り返しても良好な生育を示したので、*T. kodakaraensis* は CoA 合成能を有することが示された。次に *T. kodakaraensis* の無細胞抽出液に pantothenate kinase 活性が存在するかどうかを検討したが、明確な活性が検出されなかった。

そこで始原菌ゲノムに共通に存在する conserved kinase、conserved archaeal sugar kinase 遺伝子に対応する TK0939、TK1473、TK2141、TK2242 を大腸菌内で発現した。TK1473 と TK2242 は可溶性タンパク質として得られたが、TK0939 と TK2141 は大腸菌内では正しく folding せず不溶化した。TK1473 と TK2242 に関して pantothenate をリン酸化する活性を検討したが、いずれも活性を示さなかった。TK0939 と TK2141 に関しては、本研究で開発した遺伝子発現系を利用して *T. kodakaraensis* 内での大量発現を試みた。Promoter としては *csg* promoter を用いて、TK0939 に関しては本来の遺伝子座における promoter 置換を行い、TK2141 に関してはゲノム上の chitinase 遺伝子座に発現カセットを挿入した。この結果、TK0939 と TK2141 は可溶性タンパク質として得られ、生化学的解析が可能となった。TK2141 は弱いながらも pantothenate kinase 活性を示すことが明

らかとなったが、意外なことに高い pantoate kinase 活性が観察された。従来の pantothenate kinase と異なり、*T. kodakaraensis* の pantoate kinase は ATP のみならず GTP や CTP をリン酸供与体として認識した。さらに TK2141 の CoA 生合成への寄与を *in vivo* で検証するため、TK2141 破壊株を作製し、CoA 存在下・非存在下での増殖を検討した。TK2141 破壊株は CoA が培地中に存在しない限り増殖できないことが判明し、本遺伝子が CoA 生合成に必須であることが示された。これらの結果から、*T. kodakaraensis* においては細菌・真核生物における従来の CoA 合成系と異なり、pantoate \rightarrow phosphopantoate \rightarrow phosphopantothenate \rightarrow phosphopantothienoylcysteine を介して CoA が合成されることが強く示唆された。TK2141 homolog はほぼ全ての始原菌ゲノムに存在することから本経路は始原菌に普遍的に存在する可能性も高いと考えられる。現在 phosphopantoate \rightarrow phosphopantothenate を触媒する新酵素の遺伝子を探索しているところである。

<国内外での成果の位置づけ>

超好熱菌に関しては、*Sulfolobus* 属における *lacS* 遺伝子をマーカー遺伝子、lactose を分解・資化できない変異体を宿主とした特異的遺伝子破壊系の構築がネブラスカ大 (米国) のグループにより開発され、その改良がグローニンゲン大 (オランダ) のグループより報告されている。しかしながらこの系を利用した研究報告はまだ少なく、単一遺伝子の破壊に限定された技術である。*T. kodakaraensis* と *Sulfolobus* 以外の超好熱菌においては遺伝子破壊の手法は全く開発されていない。複数の異なる宿主マーカー系の存在や pop-out recombination による多重遺伝子破壊株が構築可能であることから、我々が開発した *T. kodakaraensis* の遺伝子破壊・導入系は国内外を問わず群を抜いた技術であると言える。特に大腸菌などの常温宿主細胞では (大量) 発現が困難な遺伝子に対して、本研究で開発した発現系を利用したいという共同研究の提案が多い。また平成 18 年度に開発した薬剤耐性に基づいた遺伝子破壊系は非常に注目されており、多数の研究グループでこの技術の検討が開始されている。我々が開発した遺伝子破壊技術は国内外で評価され、今年度もワシントン州立大学 (米国)、ジョージア大学 (米国)、オハイオ州立大 (米国)、ペンシルバニア州立大 (米国)、ヴァーゲニンゲン大 (オランダ)、リスボン大 (ポルトガル)、エッセン大 (独)、レーゲンベルグ大 (独)、CNRS (フランス)、グラーツ大学 (オーストリア) 等への宿主ベクター系の譲渡や共同研究が行われている。

<今後の課題>

- 1) Reporter 遺伝子系が確立されたので、様々な promoter の機能解析への利用を検討していきたい。
- 2) 遺伝子破壊・導入系を利用したゲノム上機能未知遺伝子の機能解明を継続して進める。特に上述の CoA 生合成経路の全容解明を目指す。また、糖代謝においては glyceraldehyde 3-phosphate と 3-phosphoglycerate との間の代謝はゲノム情報から 3 種の経路が存在するので、遺伝学的手法によりそれらの生理的役割を解明したい。
- 3) 水素生産能力の強化など本遺伝子操作技術を利用して超好熱菌の分子育種・機能改良を進めていきたい。

<成果公表リスト>

1. 0801121338

Santangelo, T., Cubonová, L., Matsumi, R., Atomi, H., Imanaka, T., and Reeve, J. N., Polarity in archaeal operon transcription in *Thermococcus kodakaraensis*, *J. Bacteriol.*, 190(6), 2244-2248 (2008).