

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>

我々は鹿児島県小島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。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、まずその形質転換効率や汎用性を高めるとともに、遺伝子破壊・導入技術を利用した遺伝子の機能解明を進める。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 の開発を目指す。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、遺伝子破壊と外来遺伝子導入による機能相補実験も併せて進めていきたい。さらに他の超好熱菌における遺伝子破壊・導入が可能となるよう、汎用性の高い薬剤耐性に基づく遺伝子破壊・導入系の構築も目指す。

<2007 年度の研究の当初計画>

- 1) Promoter 機能等を *in vivo* で評価できるよう超好熱菌内で利用可能な reporter 遺伝子を開発する。耐熱性 β -glycosidase、耐熱性 chitinase を中心に検討する。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。Reporter カセットのゲノム上への挿入位置は chitinase 遺伝子座付近を予定している。
- 2) *T. kodakaraensis* を宿主としてで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* ゲノム上に存在しない外来遺伝子を導入・発現し、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。
- 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。中でも昨年度の研究を通じてその存在が明らかとなった新規 AMP 分解経路の生理的意義の解明を目指す。

<2007 年度の成果>

1) 超好熱菌内で利用可能な reporter 遺伝子の開発

我々は以前に TK1761 遺伝子の発現、組換え型酵素の精製を進め、本遺伝子が β -glycosidase をコードすることを明らかにした。様々な基質に対する活性を検討したところ、本 β -glycosidase の基質特異性が p-nitro-phenyl (pNp)- β -D-glucopyranoside \approx pNp- β -D-mannopyranoside > pNp- β -D-galactopyranoside であることが分かった。また TK1761 翻訳産物が高度の耐熱性を示すことも明らかとなった。そこで本研究では TK1761 の reporter 遺伝子としての利用を検討した。*T. kodakaraensis* の無細胞抽出液にはクロマトグラフィーで分離可能な 2 種の β -glycosidase 活性が存在することが分かった。そこでこれら 2 種の画分 (酵素) の基質特異性を検討した結果、片方は ortho-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (ONPgluco) および ortho-nitrophenyl- β -D-mannopyranoside (ONPmanno) を加水分解する活性を示したが、ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPgalacto) を認識しないことが判明した。もう一方の酵素は ONPgalacto 分解活性を示した。TK1761 遺伝子を高発現したところ、無細胞抽出液中の ONPgluco および ONPmanno 分解活性は顕著に増加したが、ONPgalacto 分解活性は宿主細胞の KW128 株と同程度であった。したがって ONPgluco および ONPmanno 分解活性を測定することにより、TK1761 は reporter 遺伝子として利用できることが示唆された。

2) TK1761 reporter 遺伝子の利用

原核細胞は核膜が存在しないため、遺伝子の転写終了以前から翻訳反応を開始できる。転写と翻訳が実際並行して起こることは細菌においては示されてきたが、始原菌 (Archaea) では未だ証明されていなかった。そこで、*T. kodakaraensis* の operon 中の上流遺伝子に nonsense codon を挿入し、operon 中の下流遺伝子の転写量の変化 (polarity) を調べることにした。その結果、3 遺伝子からなる operon の上流遺伝子に nonsense codon を挿入したところ、下流の 2 遺伝子の転写量が 95-96% 減少することが観察された。また上流遺伝子の下流に TK1761 遺伝子を挿入することにより、ONPgluco 活性を指標に polarity をタンパク質レベルで評価できると考えた。上流遺伝子の異なる 5 カ所にそれぞれ nonsense codon を挿入し、個々の菌体中の ONPgluco 活性を測定した。その結果、標準株と比較して 35-92% の活性減少が観察され、始原菌においても polarity が起こることが証明された。これは遺伝子の発現制御の観点から非常に重要な結果であり、これにより始原菌においても翻訳段階での転写調節が起こり得ることを示唆するものである。

3) 薬剤耐性に基づく遺伝子破壊系の他の超好熱菌への利用

我々は昨年度の研究を通じて、*T. kodakaraensis* を宿主とした薬剤耐性に基づく遺伝子破壊系を開発した。抗生物質として 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase) の特異的阻害剤である simvastatin を使い、選択マーカー遺伝子としては HMG-CoA reductase 遺伝子の大量発現カセットを利用した。この系では栄養要求性宿主の開発が不要なため、直ちに他の超好熱菌への検討が可能であることを提唱した。そこで本年度は、この遺伝子破壊系の有効性を *Thermococcus*

litoralis を宿主として検討することにした。まず野生株の感受性を検討した結果、*T. kodakaraensis* と同様 *T. litoralis* も低濃度の simvastatin により著しい生育阻害を示した。*T. kodakaraensis* 由来 glutamate dehydrogenase promoter、*Pyrococcus furiosus* 由来 HMG-CoA reductase 遺伝子からなる大量発現カセットを用いて、*T. litoralis* の alanine aminotransferase 遺伝子の破壊を試みた。Simvastatin 存在下で耐性を示す形質転換体を選択し、複数の耐性株に対して alanine aminotransferase 遺伝子座の genotype を確認した。その結果、alanine aminotransferase 遺伝子が HMG-CoA reductase 遺伝子大量発現カセットに置換されていることが分かり、本遺伝子破壊系は *T. litoralis* でも利用可能であることが明らかとなった。

4) 遺伝子破壊系を利用した遺伝子の機能解明

新規 AMP 分解経路：我々は昨年度の研究を通じて、始原菌の Type III Rubisco が全く新しい触媒活性を示す 2 種の新酵素 AMP phosphorylase および ribose-1,5-bisphosphate isomerase とともに AMP の分解・ペントースの再利用に関わる新規代謝経路を構成し得ることを明らかにした。本年度は AMP phosphorylase および Type III Rubisco の破壊株を作製し、様々な培養条件における形質を評価することにより、この代謝経路の生理的意義の解明を目指した。まず 3 種の遺伝子が nucleoside 代謝に関与すると考え、培地への nucleoside の添加の有無の違いによる transcriptome 解析を行った。その結果、nucleoside 添加時には AMP phosphorylase、ribose-1,5-bisphosphate isomerase、Rubisco の 3 遺伝子の転写産物が増加していることが観察された。そこで宿主細胞と 2 種の破壊株を nucleoside 添加培地で培養し、それらの増殖特性を検討した。その結果、宿主細胞の細胞収率が nucleoside の添加に応じて増加したのに対して、破壊株の細胞収率が nucleoside の添加にかかわらず細胞収率が一定のままであった。したがって、Type III Rubisco が機能する代謝系は少なくとも nucleoside の資化に関与することが明らかとなった。

Glyceraldehyde 3-phosphate 代謝に関与する 3 経路の生理的意義の解明：Glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) と 3-phosphoglycerate (3-PGA) との間の変換は解糖系・糖新生系・Calvin 回路など様々な代謝経路に共通する炭素代謝の重要な位置を占めている。従来生物ではこの 2 つの代謝中間体はリン酸化を伴う GAP dehydrogenase (GAPDH) と 3-PGA kinase (PGK) によって 1,3-bisphosphoglycerate を介して可逆的に相互変換されている。しかしながら、*T. kodakaraensis* のゲノム上には GAPDH、PGK の他にリン酸化を伴わない GAP dehydrogenase (GAPN)、フェレドキシン依存型の GAP oxidoreductase (GAPOR) の遺伝子も存在し、GAP と 3-PGA を結ぶ経路が 3 種存在することが示唆された。これらの経路のそれぞれの生理的機能を解明するため、個々の遺伝子の破壊を試みた。GAPDH 遺伝子破壊株、PGK 遺伝子破壊株ともに解糖系の機能が必要な培地では宿主株 *T. kodakaraensis* KU216 株と同等な生育を示し、これらの酵素は真核生物および大腸菌などの細菌と異なり、解糖に関与しない結果が得られた。一方、糖を全く含まない培養条件ではこれら 2 種の破壊株は全く生育できないという結果が得られた。したがって、*T. kodakaraensis* では GAPDH、PGK は本菌の糖新生に必須であることが判明した。今後 GAPN、GAPOR 破壊株の生育特性を評価することにより、これら 3 経路の生理的意義をさらに解明していきたいと考えている。

<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) のグループより最近報告されている。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。また昨年度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。我々は上述の通り、今年度の研究を通じて本遺伝子破壊系が *Thermococcus litoralis* でも利用可能であることを示した。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) 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。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

耐熱性有用タンパク質 (protease) の分泌発現が当初計画より若干遅れているが、強力 promoter (*csg*) 挿入のための plasmid 構築が完了したので、早急に形質転換・分泌発現実験に取りかかる予定である。

<今後の課題>

- 1) 超好熱菌遺伝子大量発現系を利用して耐熱性タンパク質の分泌発現を行う。具体的には TK1675 遺伝子の発現を進めている。TK1675 は *Tk-subtilisin* をコードしており、既に翻訳産物が耐熱性 protease をコードしていることが明らかとなっている。本遺伝子と promoter の間に cell surface glycoprotein promoter (強力構成型 promoter) を挿入する戦略で研究を進めている。
- 2) 遺伝子発現に利用可能な誘導抑制型 promoter の解析と機能の最適化を進める。現在の候補 promoter としては糖質関連遺伝子 *pfk* (phosphofructokinase) と *fbp* (fructose biphosphatase) の promoter を中心に進めていく予定である。温度に応答する promoter も複数種同定できたので、これらの解析を進めていきたい。
- 3) 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 glyceraldehyde 3-phosphate と 3-phosphoglycerate との間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。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

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.*, Published ahead of print, doi:10.1128/JB.01811-07 (2008).
2. 0702141036
Matsumi, R., Manabe, K., Fukui, T., Atomi, H. and Imanaka, T., Disruption of a sugar transporter gene cluster in a hyperthermophilic archaeon using a host/marker system based on antibiotic resistance., *J. Bacteriol.*, 189(7), 2683-2691 (2007).
3. 0702160939
Sato, T., Atomi, H., and Imanaka, T., Archaeal Type III Rubiscos function in a pathway for AMP metabolism, *Science*, 315(5814), 1003-1006 (2007).