

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310124

研究課題名（和文） 超好熱菌の環境応答における遺伝子発現制御の機構解明

研究課題名（英文） Regulation of gene expression during environmental adaptation in hyperthermophiles

研究代表者

福居 俊昭（FUKUI TOSHIKI）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号：80271542

研究成果の概要（和文）：超好熱始原菌は少ない遺伝子数にもかかわらず外的環境の変化に自律的に適応できる生物であり、その極限的な環境の変化に応答する機構は興味深い。本研究では超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* の環境適応における遺伝子発現制御機構の解析を行った。DNA 結合因子依存型の発現制御として NikR による Ni²⁺ 輸送レギュロン、Phr による熱ショック応答レギュロンを同定した。また DNA 結合因子非依存型の発現制御として本菌のキチン代謝遺伝子群の発現を抑制する PIN ドメインタンパク質とその上流にコードされる機能未知タンパク質に着目し、これらによる制御が他の多数の遺伝子におよぶこと、および両タンパク質が相互作用して複合体を形成することを見出した。また推定プロテインキナーゼの遺伝子破壊により発現量が変動するタンパク質スポットが多数同定され、タンパク質リン酸化ネットワークによる発現制御系が超好熱始原菌にも存在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Hyperthermophilic archaea are capable of adapting to changes in environmental conditions in spite of their small set of genes. This study focused on regulation of gene expression during environmental adaptation in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. We identified the NikR-dependent regulon probably functional in Ni²⁺-transport, and Phr-dependent regulon for heat-shock responses. We also found that a pair of PIN domain protein and hypothetical protein, involved in repression of chitin-degradation genes, acted as a global factor for expression regulation of various gene in the overall genome, and the proteins interacted to each other to form a complex. Moreover, disruption of probable protein kinase gene(s) in the hyperthermophile resulted in changes of intracellular amount of many proteins, suggesting the presence of regulation systems through protein phosphorylation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：基礎ゲノム科学

キーワード：ゲノム発現

1. 研究開始当初の背景

始原菌 (Archaea) は真核生物 (Eucarya) 細菌 (Bacteria) とは異なる、第3のドメインを構成する生物群である。かつては生命が存在し得ないと考えられてきた極限環境 (高温・高圧・高塩濃度等) においても生息する始原菌が数多く発見されている。始原菌には 90 以上でも生育可能な超好熱菌が多数属している。分子系統学では真核生物は超好熱始原菌から分岐して進化したことが示唆されており、実際に超好熱始原菌の DNA 複製機構や転写機構は複雑な真核生物型機構の原型と考えられている。

超好熱始原菌は温度・pH・炭素源・金属イオンなどの外的環境の変化に自律的に適応できる生物であり、その極限的な環境の変化に応答する機構は興味深い。基本的には他の生物種と同様に外的環境変化をセンシングし、それに応じた遺伝子発現制御を行っているものと推測されるが、超好熱始原菌の小さなゲノム (約1.5~2.5Mbp) からは、これら発現調節やその結果としての環境適応の機構は単純化されていることが想定される。しかしながら、超好熱始原菌の遺伝子操作が確立されていなかったために研究手法は非常に限られており、他のモデル生物と比較すると環境適応に関する研究は大きく遅れていた。ゲノム解析からは超好熱始原菌に多数の細菌型転写制御因子のホモログ遺伝子が見いだされているが、その転写制御の詳細は研究が端緒についたところであった。シグナル伝達ネットワークについてはほとんど研究がなされておらず、転写後段階での発現制御についてはさらに知見がなかった。

2. 研究の目的

我々はこれまでに超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* について、超好熱菌としては世界で初めての遺伝子操作系を確立している。本研究ではこの遺伝子操作技術を駆使し、本超好熱菌が外的環境変化に応答する際の遺伝子発現制御について知見を得ることを目的として、下記の検討を行った。

- ・ DNA 結合因子による遺伝子発現制御の解析
- ・ DNA 結合因子に依存しない新規発現制御の解析

・ タンパク質リン酸化シグナル伝達ネットワークの解析

また、*T. kodakarensis* は絶対嫌気性の超好熱始原菌であるが、酸素に対して比較的高い耐性を示すことがわかっている。そこで本超好熱菌の酸素耐性への関与が推定された NAD(P)H オキシダーゼホモログについてその機能と酸素の有無における発現変動について検討した。

3. 研究の方法

超好熱菌 *T. kodakarensis* において発現制御への関与が推定される因子の遺伝子を相同性組換えにより欠失させた株を作製した。得られた遺伝子破壊株の表現型や、欠失によって転写レベルが変動する遺伝子の同定を DNA マイクロアレイ解析による行った。

一方、大腸菌を用いて発現制御因子の組換え型タンパク質を調製し、タンパク質間相互作用について検討した。

またタンパク質リン酸化ネットワークの解析においては、推定プロテインキナーゼ遺伝子破壊株において二次元電気泳動を行い、細胞内存在量が変動したタンパク質を検出した。

4. 研究成果

(1) DNA 結合因子による遺伝子発現制御の解析

T. kodakarensis は硫黄還元菌として知られているが、硫黄が存在しない条件であってもピルビン酸やデンプンなどの有機基質が利用可能な条件ではプロトンをも最終電子受容体として水素 (H₂) を生成して生育する。この水素生成に関わる酵素であるヒドロゲナーゼとして、本菌には細胞質型と膜型の2種類の [NiFe] 型ヒドロゲナーゼが存在する。これらのヒドロゲナーゼの遺伝子破壊株を解析した結果、膜型ヒドロゲナーゼ (Mbh) の破壊株は水素生成に必須である一方で、細胞質型ヒドロゲナーゼ (Hyh) は水素生成反応ではなく水素吸収反応に関わることが判明した。すなわち、同一種の細胞内で Mbh により発生した水素が Hyh により吸収されるという、水素を媒介とした還元力のリサイクル (intraspecies hydrogen transfer) が行われている可能性が強く示唆された (論文発表 3)。このように本菌では [NiFe] 型ヒドロゲ

ナーゼが生育に重要な役割を果たす。従って、本菌の細胞膜上には、Ni²⁺の輸送に関わるトランスポーターの存在が予想されるが、ゲノム情報からはそのホモログ遺伝子は見出されていない。その一方で、大腸菌におけるNi²⁺トランスポーターオペロンの転写制御因子NiKRのホモログ (TK1439)が存在する。この遺伝子が *T. kodakarensis* のNi²⁺トランスポーターオペロンを制御するとの仮定のもと、TK1439 遺伝子破壊株 ($\Delta tk1439$ 株) を作製した。単離した $\Delta tk1439$ 株は野生株と同程度の増殖速度を示した。DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、 $\Delta tk1439$ 株では野生株と比較して2種類の ABC トランスポーター遺伝子群の転写量増加が観察され、これらのトランスポーターが本菌における Ni²⁺輸送に関与することが強く示唆された。

他方で、熱ショック応答性転写制御因子 Phr (TK2291) の遺伝子破壊株 ΔPhr 株を作製した。DNA マイクロアレイ解析により、*phr* の破壊によって 20 種類以上の遺伝子の転写が顕著に増加すること、それらの遺伝子の 5'-側上流には共通モチーフがあることを見出した。これら熱ショック応答遺伝子群には small heat shock protein、AAA⁺ ATPase、prefoldin、RecA superfamily ATPase や Tip49 に加えて、多数の機能未知タンパク質が含まれており、超好熱菌に特徴的な熱ショック応答レギュロンを同定した (論文発表 1)。

ArsR ファミリーは *T. kodakarensis* ゲノム上に最も多く存在する転写制御因子である。この中の3つの ArsR ファミリー転写制御因子について遺伝子破壊株を作製し、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、TK1261 が金属イオン含有タンパク質をコードする遺伝子群の転写を抑制すること、およびTK1883とTK2190が共に鞭毛に関わる遺伝子群の転写を抑制することなどが強く示唆された。

(2) DNA 結合因子に依存しない新規発現制御の解析

T. kodakarensis の新規キチン代謝経路に機能する遺伝子群はキチナーゼによるキチン分解産物である GlcNAc₂ によって発現誘導される。この GlcNAc₂ による誘導について、キチン代謝遺伝子クラスター中の推定 ABC トランスポーターサブユニット遺伝子 *dppA* の上流に耐熱性β-ガラクトシダーゼ遺伝子を挿入した株 (図 1) によるレポーターアッセ

イを行ったところ、*dppA* 上流の機能未知遺伝子領域 (*tk1762-tk1763*) の欠失によって誘導剤非存在下での抑制が解除され、常に高いレポーター活性を示すことを見いだした。興味深いことに TK1762、TK1763 はいずれも既知の転写制御因子とは相同性を示さず、DNA 結合領域も有していないことから、この発現制御は DNA 結合型転写制御因子によるものではないことが示唆された。

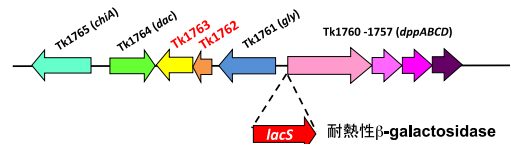


図 1. *T. kodakarensis* キチン代謝遺伝子クラスターとレポーター遺伝子導入部位

しかしながら *tk1762-tk1763* 領域が *dppA* の上流に位置することが発現調節に必要である可能性も否定できなかったため、*tk1762-tk1763* または *tk1762-tk1763* を挿入したシャトルベクターにより遺伝子破壊株をそれぞれ形質転換した。作製した株についてウエスタンブロットングを行ったところ、ベクター上の *tk1762*、*tk1763* が過剰発現していることを確認した。さらに *tk1762*、*tk1763* がベクター上であっても、両方の遺伝子を有する株では非誘導条件下での発現抑制と GlcNAc₂ による誘導が回復した。これらの結果から、キチン代謝遺伝子の発現制御には *tk1762-tk1763* の領域ではなく、これらの発現産物が関与していることが示された。

次に *tk1762-tk1763*

欠失株と、そのベクターによる欠失相補株について DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、*tk1762-tk1763* の欠失によってキチン代謝遺伝子クラスターのみならず、染色体上の広い領域にまたがる多数の遺伝子の転写が顕著に増加した。また欠失遺伝子の相補によってその転写量変動がキャンセルされた (図 2)。

これらの結果から TK1762-TK1763 はキチン代謝クラスターのみならず、*T.*

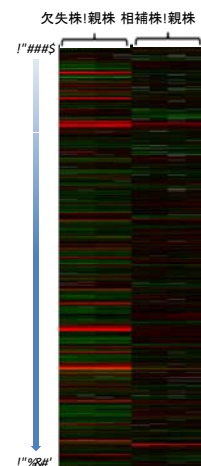


図 2. *tk1762-tk1763* 破壊株と欠失相補株の DNA マイクロアレイ解析結果 (赤: 転写量増加、緑: 転写量減少)

kodakarensis におけるグローバルな制御因子であることが明らかになった。

大腸菌を宿主として調製した TK1762、TK1763 の組換え型タンパク質を混合し、native-PAGE および免疫沈降による解析を行ったところ、TK1762-TK1763 のタンパク質間相互作用を確認した。さらに、ネイティブ状態において (TK1762)₁₂(TK1763)₁₂ 複合体が 2 個以上会合した複雑な構造をとることが示され、本発現制御には TK1762 と TK1763 の相互作用が重要である可能性が考えられた。今後、より詳細な解析を行う。

(3) タンパク質リン酸化シグナル伝達ネットワークの解析

タンパク質リン酸化を介したネットワークの存在は真核生物や細菌で広く知られている。現時点では少ないながら、第三の生物ドメインである始原菌においてもリン酸化タンパク質が同定されている。超好熱始原菌においては単純化されたタンパク質リン酸化ネットワークが機能していることが推測され、その解析は基本的な生命維持システムや生命の進化の解明の観点から重要である。

そこで *T. kodakarensis* ゲノムに見出された 3 つの推定 R10 プロテインキナーゼホモログ (TK0679, TK0801, TK2250) に着目した。これら遺伝子の破壊を行ったところ、*tk0801*、*tk2250* について単独遺伝子破壊株 $\Delta tk0801$ 株、 $\Delta tk2250$ 株、および二重遺伝子破壊株 $\Delta\Delta tk0801-tk2250$ 株の作製が可能であった。*tk0679* に関しては目的の遺伝子破壊株は単離できず、生育に必須な遺伝子である可能性が考えられた。

DNA マイクロアレイ解析の結果、遺伝子破壊株では発現量が変化した遺伝子が多数見いだされ、プロテインキナーゼによるタンパク質リン酸化を介した転写制御系の存在が示された。興味深いことに $\Delta tk0801$ 株、 $\Delta tk2250$ 株、および $\Delta\Delta tk0801-tk2250$ 株において共通して転写量が変動した遺伝子が多く検出され、TK0801 および TK2250 が同じ発現制御系に属することが示唆された。発現が増加した遺伝子は機能未知遺伝子がほとんどであったが、二重破壊株においてのみプリン、チアミン、リボフラビンの生合成に関与する遺伝子が含まれていた。一方、遺伝子破壊により発現が減少した遺伝子として鞭毛形成、ケモタクシス、トランスポーターなどに関与するクラスターが含まれていた。二次元電気泳動によるプロテオーム解析からも

tk0801 あるいは *tk2250* の遺伝子破壊により存在量が変化したスポットを多数見出した (図 3)。現在、質量分析によるタンパク質の同定を進めている。



図 3. $\Delta\Delta tk0801-tk2250$ 二重遺伝子破壊株 (ピルビン酸培養) の二次元電気泳動結果 (黄丸は親株と比較して発現量が変動したタンパク質の例を示す。)

(4) NAD(P)H オキシダーゼホモログの機能と酸素の有無における発現変動

T. kodakarensis ゲノムには少なくとも 7 個の NAD(P)H オキシダーゼ (NOX) ホモログが存在したが、その中の 1 つ TK1481 は近縁の *Pyrococcus* 属に存在しない *T. kodakarensis* 固有のホモログであった。TK1481 の組換え型酵素は高い H₂O₂-forming NOX 活性および高い NAD(P)H: polysulfide oxidoreductase 活性を示した。 $\Delta tk1481$ 株はピルビン酸培地での生育は親株と違いは見られなかったが、硫黄培地では予想に反して親株より酸素耐性が高いことを見出した。TK1481 を保持する株の酸素感受性の要因として、溶存酸素存在下での TK1481 の NOX 活性による過酸化水素の過剰生成を推察した。細胞内での TK1481 の量をウエスタンブロッティングにより検討したところ、培地中溶存酸素の有無における発現制御は確認されなかった (論文発表 2)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1) Kanai T, Matsuoka R, Beppu H, Nakajima A, Okada Y, Atomi H, Imanaka T
Distinct physiological roles of the three [NiFe]-hydrogenase orthologs in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*.

J. Bacteriol. **193**:3109-16 (2011) (査読有り)

2) Kanai T, Takedomi S, Fujiwara S, Atomi H, Imanaka T

Identification of the Phr-dependent heat shock regulon in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*

J. Biochem. **147**: 361-370 (2010) (査読有り)

3) Kobori H, Ogino M, Orita I, Nakamura S, Imanaka T, Fukui T

Characterization of NADH oxidase/NADPH polysulfide oxidoreductase and its unexpected participation in oxygen sensitivity in an anaerobic hyperthermophilic archaeon

J. Bacteriol. **192**:5192-5202 (2010) (査読有り)

〔学会発表〕(計7件)

1) Lee S, Kanai T, Atomi H

Elucidation of the functions of the ArsR transcription regulators in *Thermococcus kodakaraensis*

極限環境生物学会第12回年会、2011年11月28日(長崎)

2) 坂本 香織、瀬畑 真、折田 和泉、中村 聡、今中 忠行、福居 俊昭

超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* キチン代謝遺伝子クラスターにおける発現制御機構の解析

第63回日本生物工学会大会、2011年9月27日(東京)

3) Kanai T, Matsuoka R, Beppu H, Nakajima A, Okada Y, Atomi H, Imanaka T

Distinct physiological roles of the three [NiFe]-hydrogenase orthologs in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*

Thermophiles 2011, Big Sky, Montana, 13 September, 2011.

4) 坂本 香織、瀬畑 真、折田 和泉、中村 聡、今中 忠行、福居 俊昭

超好熱菌キチン代謝遺伝子クラスターの発現制御機構の解析

日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月5日(京都)

5) Kanai T, Kamashita T, Atomi H, Imanaka T

Regulation mechanism of archaeal heat shock regulator

Extremophiles 2010, São Miguel, Azores, Portugal, 14 September, 2010

6) 小堀宏樹、折田和泉、中村 聡、今中忠

行、福居俊昭

超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来 NAD(P)H オキシダーゼホモログの解析

日本 Archaea 研究会第23回講演会、2010年7月9日(名古屋)

7) 姫野敦士、折田和泉、中村 聡、今中忠行、福居俊昭

超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* におけるタンパク質リン酸化ネットワークの解析

日本 Archaea 研究会第22回講演会、2009年7月11日(札幌)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福居 俊昭 (FUKUI TOSHIAKI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号：80271542

(2) 研究分担者

金井 保 (KANAI TAMOTSU)

京都大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：10346083

(3) 連携研究者

なし