

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15日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21350092

研究課題名（和文） 超好熱菌における全 regulon の確定と機能解明

研究課題名（英文） Determining the regulons and their functions in hyperthermophiles

研究代表者

跡見 晴幸（ATOMI HARUYUKI）

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：90243047

研究成果の概要（和文）： 超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* のゲノム解析情報と遺伝子破壊技術・transcriptome 解析技術を利用し、ゲノム上の推定転写制御因子の遺伝子を網羅的に破壊し、各破壊株の形質を評価するとともに transcriptome 解析を進め、各転写制御因子の regulon を確定した。また一部の regulon に関して、regulon に含まれる機能未知遺伝子が関与する生命機能を示唆することができた。

研究成果の概要（英文）： We have previously determined the complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*, and have also established a gene disruption and transcriptome analysis system for this organism. Using this information/technology, we disrupted genes predicted to encode transcription regulation factors. This project has led to the elucidation of multiple regulons, and we have been able to propose the functions of genes in several regulons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：転写制御因子、遺伝子破壊、regulon、超好熱菌、始原菌、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

超好熱菌は一般に 80℃以上の至適生育温度を示す微生物として定義され、大部分がドメインアーキア（始原菌）に属する超好熱始原菌である。超好熱菌は 16S ribosomal RNA に基づいた全生物の進化系統樹において根に最も近い位置を占めており、現存する生物の中では原始生命体に最も近い生物群として捉えられている。実際に超好熱菌ゲノムは約 2 Mbp と小さく、遺伝子数（約 2,000 個）

も比較的少ない。にもかかわらず、温度、圧力、浸透圧、pH、炭素源の種類等々の外的環境変化に対してこれらは迅速にかつ特異的に応答し、生命を維持する能力を有している。したがって、超好熱始原菌の代謝や制御などの機構は極めて単純化されていることが想定され、様々な生命維持メカニズムの基本型を解析するには格好の研究対象と言える。我々は超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 株を対象とし、既に 1)

全ゲノム塩基配列の決定、2) 全遺伝子に対応する DNA microarray 系 (transcriptome 解析系) の確立、3) 特異的遺伝子破壊系の開発、をそれぞれ進めてきた。したがって、一次構造より転写制御因子をコードする遺伝子を特定し、それらの破壊株の単離、破壊株と宿主株との transcriptome 比較、破壊株の形質評価を網羅的に行う技術が確立している。

2. 研究の目的

本研究では *Thermococcus kodakarensis* ゲノム上の推定転写制御因子遺伝子を網羅的に破壊し、それらの発現産物の制御下にある遺伝子の集合体 (regulon) を確定することを目標としている。さらにその一部については転写制御因子が関与する機能の同定を目指す。

3. 研究の方法

ウラシル要求性を示す *Thermococcus kodakarensis* KU216 株 ($\Delta pyrF$) あるいは *Thermococcus kodakarensis* KUW1 株 ($\Delta pyrF$, $\Delta trpE$) を宿主として利用した。まず転写制御因子をコードすると考えられる遺伝子の 5' および 3'-flanking region 約 1000 bp を連結させて、*pyrF* 遺伝子をもつプラスミド pUD2 あるいは pUD3 に挿入した。これらのプラスミドを *Thermococcus kodakarensis* KU216 株あるいは KUW1 株に導入し、ウラシル要求性の解除を指標に形質転換株の濃縮を行った。次にウラシルと 5-fluoro-orotic acid を含む培地で培養し、5-fluoro-orotic acid 耐性を指標に形質転換体を単離した。この間に single crossover insertion と pop-out recombination が起こり、genotype は宿主細胞のものかあるいは標的遺伝子が破壊されたものとなる。PCR および塩基配列決定で各転写制御因子の遺伝子破壊を確認した。標的遺伝子の *pyrF* 遺伝子による置換により破壊した場合もある。

次に単離できた遺伝子破壊株について、その増殖特性を宿主株のものと比較した。増殖条件については個々の遺伝子破壊株によって異なるが、炭素源の違い (解糖条件・糖新生条件・ペプチド添加培地・元素硫黄添加培地など)、温度の違い (至適・高温・低温培養および熱ショックなど)、様々なストレス条件 (温度、酸化状態、エタノール添加など) などを検討した。

増殖特性の結果に基づいて、transcriptome 比較を行う培養条件を設定した。各遺伝子破壊株と宿主株を培養し、total RNA を抽出した後、DNA microarray を用いた transcriptome 解析を進めた。

表 1. TK2291 の破壊により転写産物量が上昇した遺伝子 (上位 15 種)

Gene ID	Mean intensity ratio [$\log_2(\text{KHR1}/\text{KOD1}) \pm \text{SD}$]
TK1121	5.75 \pm 0.04
TK1155	5.20 \pm 0.25
TK1590	4.70 \pm 0.02
TK1157	4.65 \pm 0.20
TK1097	4.39 \pm 0.01
TK0750	4.36 \pm 0.29
TK0131	4.26 \pm 0.10
TK1591	4.04 \pm 0.14
TK1492	3.83 \pm 0.02
TK1746	3.76 \pm 0.42
TK1897	3.74 \pm 0.00
TK1576	3.72 \pm 0.01
TK1896	3.69 \pm 0.15
TK1096	3.35 \pm 0.14
TK1122	3.33 \pm 0.05

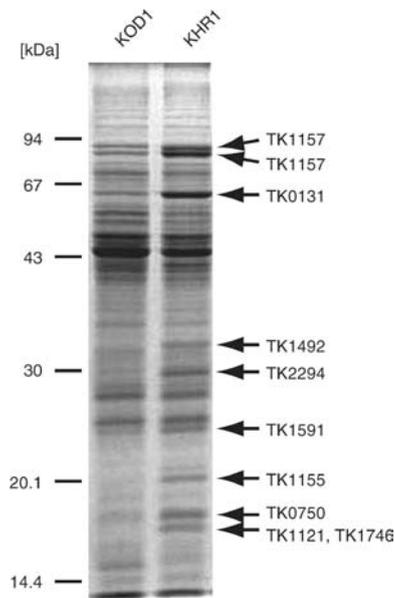


図 1. TK2291 破壊によって発現量が上昇したタンパク質。KOD1, *Thermococcus kodakarensis* 野生株; KHR1, TK2291 破壊株。両株を 80°C で培養した際の無細胞抽出液の SDS-PAGE の結果を示す。

4. 研究成果

遺伝子破壊・増殖特性評価・transcriptome解析を進めた結果の一部を以下に示す。

TK2291 遺伝子を破壊し、破壊株 (KHR1株) の増殖特性を明らかにするとともに、TK2291 regulon を確定した。至適生育温度やそれよりも低い温度で宿主株・破壊株を培養し、transcriptome の変化を観察した。この際、prefoldin, AAA ATPase, small heat shock protein など熱ショック応答に関与する遺伝子の転写産物が破壊株で大幅に増加していたことが判明した (表 1)。これらの遺伝子の発現上昇はタンパク質レベルでも認められた (図 1)。そこで TK2291 遺伝子破壊株と宿主株の転写量比の上位 8 遺伝子に対してそれぞれの破壊株を作製し、それらの熱ショックに対する感受性を検討した。その結果、6 種の破壊株 (TK1121, TK1590, TK1157, TK1097, TK0750, TK1591) が熱ショック条件下で宿主株と比較して顕著な増殖遅延を示し、これらの遺伝子が熱ショック応答に寄与することが示された。これらの生化学的機能解析を進めたところ、TK1590 は single strand DNA と相互作用を示す ATPase であることが分かった。また TK1591 は転写制御因子をコードしていたので、その破壊株の単離と transcriptome 解析を進め、regulon を確定した。

DtxR homolog である TK0107 を破壊したところ、鉄トランスポーターである FeoAB system (TK0714-TK0716) および重金属カチオントランスポーターをコードすると推定されている TK0652 の転写量が宿主株と比較して大幅に上昇したことから TK0107 は金属の輸送を制御する転写制御因子であることが示唆された。さらに Lrp/AsnC family の TK0168, MarR family の TK0169 を破壊し、その transcriptome 解析を行うことによりそれぞれの regulon を確定した。

上記の TK2291 を含む ArsR family に属する転写制御因子をコードする遺伝子はゲノム上に計 12 個存在し (TK0086, TK0225, TK0559, TK1041, TK1086, TK1261, TK1826, TK1881, TK1883, TK1913, TK2190, TK2291)、いずれも破壊可能であり、破壊株・宿主間の transcriptome 解析を順次進めている。個々の遺伝子破壊株において、宿主株と転写産物量が増加した代表的な遺伝子は以下の通りである。TK1041 破壊株では TK0699/TK0698 (Zinc-dependent protease) の転写産物量が顕著に増加していた。TK1261 破壊株では TK2012/TK2011 (Ferredoxin/Iron-molybdenum cofactor-binding protein) の転写産物量が顕著に増加していた。TK1881 破壊株では TK0699/TK0698 (Zinc-dependent protease)、TK1840 (Cobalt-activating

carboxypeptidase) の転写産物量が顕著に増加していた。TK1883 破壊株では TK1840 の他、TK0683 (glyoxylate reductase) の転写産物量が顕著に増加していた。TK2190 破壊株では TK0039 (Archaeal flagellin) の転写産物量が顕著に増加していた。興味深いことに、異なる転写制御因子が同一遺伝子を制御していることが判明し、*Thermococcus kodakarensis* 内には予想されたものよりも複雑な遺伝子発現制御ネットワークが存在することが示唆された。TK1041 および TK1881 が多くの protease 遺伝子を含む非常に類似した regulon を示すことが判明した。詳細な *in vitro* 結合実験を進めることにより、これら protease 遺伝子の promoter に直接結合しているのは TK1881 産物であることがわかった。TK1881 と TK1041 の産物は相互作用を示さず、TK1041 タンパク質は情報伝達系のより上流で作用していることが明らかとなった。双方ともに自分自身の遺伝子の転写を抑制していることも明らかとなった。その他詳細な解析を進めた転写制御因子としては TK0271、TK1246、TK1259、TK1494、TK2273、TK2259 などが挙げられる。本研究の成果により多数の regulon が確定でき、regulon に含まれる機能未知遺伝子について、それらが関与する生命機能を示唆することができた。

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. Takemasa, R., Yokooji, Y., Yamatsu, A., Atomi, H., Imanaka, T. *Thermococcus kodakarensis* as a host for gene expression and protein secretion. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2392-2398, 2011.

(査読あり)

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*. *Journal of Biochemistry*, 147(3), 361-370, 2010.

(査読あり)

3. Borges, N., Matsumi, R., Imanaka, T., Atomi, H., Santos, H. *Thermococcus kodakarensis* mutants deficient in di-myoinositol phosphate use aspartate to cope with heat stress. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 191-197,

2010.

(査読あり)

[学会発表] (計8件)

1. 山本康之、金井保、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* のゲノム配列からの新規転写制御因子の同定、極限環境微生物学会、長崎大学、平成23年1月28日.

2. 小谷徹、金井保、跡見晴幸、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における糖代謝関連転写制御因子 Tgr の機能解析、極限環境微生物学会、長崎大学、平成23年1月28日.

3. Lee, S, Kanai, T, Atomi, H, Elucidation of the functions of the ArsR transcription regulators in *Thermococcus kodakarensis*, 極限環境微生物学会、長崎大学、平成23年1月28日.

4. Haruyuki Atomi, Novel metabolic enzymes from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *Extremophiles*, ポンタデルガダ、ポルトガル, 平成22年9月13日.

5. 跡見晴幸、横大路裕介、金井保、佐藤喬章、今中忠行、ゲノム情報を利用した微生物の新規機能酵素の探索、第4回日本ゲノム微生物学会年会、九州大学、平成22年3月9日.

6. 跡見晴幸、超好熱始原菌の環境応答機構、GCOE第4回国際シンポジウム、奈良先端科学技術大学院大学、平成21年11月13日.

[図書] (計1件)

1. 跡見晴幸、佐藤喬章、横大路裕介、今中忠行、「超好熱菌ゲノム情報に基づいた新規代謝酵素・経路の解明」小宮山眞 監修: 酵素利用技術大系—基礎・解析から改変・高機能化・産業利用まで—(株式会社エヌ・ティー・エス). 510-517, 2010.

(査読なし)

[その他]

ホームページ等

<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/atomi-lab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

跡見 晴幸 (ATOMI HARUYUKI)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：90243047