

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 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22310130

研究課題名（和文）新たな高温適応機構の発見につながる好熱性細菌イノシトール代謝の解明

研究課題名（英文）Metabolism of inositol stereoisomers in a thermophile, *Geobacillus kaustophilus* HTA426

研究代表者

吉田 健一（YOSHIDA KEN-ICHI）

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20230732

研究成果の概要（和文）：*Geobacillus kaustophilus* HTA426（以下 GK と省略）はゲノム配列が完全解読された好熱性 Bacillus 属細菌である。GK ゲノムにイノシトール代謝遺伝子群を推論し、当該遺伝子群の機能解析を行った。まず、変異原理解によってイノシトールを利用できなくなった変異株 PS8 を作出して解析したところ、*gk1897*、*gk1898*、*gk1899* という 3 遺伝子を含むオペロンの転写誘導が消失していた。これら遺伝子各々を大腸菌にクローン化して酵素活性を確認した結果、それぞれがイノシトール異性体を区別できる立体特異的なイノシトール脱水素酵素であることが半明した。一方、GK の遺伝子操作技術を開発し、*gk1897*、*gk1898*、*gk1899* それぞれの in-frame 欠損株を作製した。この結果、*gk1897* はシロイノシトール代謝に、*gk1899* はミオイノシトールおよび D-キローイノシトール代謝にそれぞれ必須であると考えられた。それぞれ性質の異なるイノシトール脱水素酵素の 3 遺伝子が一つの転写単位に含まれるため 3 者が同時に発現することによって、イノシトール異性体相互変換が細胞内で生じることをメタボローム解析によって見出した。PS8 について、イノシトールを唯一の炭素源とする培地での継代培養を繰り返し、サブレッサー変異株を得た。これらサブレッサー変異株 10 株において以上述のイノシトール脱水素酵素 3 種を含むオペロンの転写が復活していた。これらのゲノム配列を次世代シーケンサーで解析した結果、9 株については全て Ctr ホモログの翻訳低下を示唆する変異が共通していることがわかり、すなわち PS8 における当該オペロンの転写消失は Ctr の関与する過剰な転写抑制と何らかの関連がある可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Geobacillus kaustophilus* HTA426, a thermophilic Bacillus-related species, utilizes some inositol stereoisomers, including *myo*-, *D-chiro*-, and *scyllo*-inositols, as sole carbon sources. Within its genome are three paralogous genes that possibly encode inositol dehydrogenase. These genes, *gk1897*, *gk1898*, and *gk1899*, are located in tandem within a large gene cluster containing an almost complete set of *iol* genes homologous to genes involved in inositol catabolism in *B. subtilis*. Each of the three plausible inositol dehydrogenases was purified as a His₆-tag fusion. The enzymes exhibited thermophilic activity, each with its own characteristic specificity for the inositol stereoisomers and cofactors. Northern blot and primer extension analyses revealed that the three enzymes were encoded by the same 5-kb polycistronic transcript and were induced simultaneously in the presence of *myo*-inositol. HTA426 was subjected to EMS mutagenesis to isolate a mutant strain, PS8, which was not able to utilize *myo*-inositol. In PS8, inositol dehydrogenase activity was abolished along with the 5-kb transcript, suggesting that any of the three enzymes is required for *myo*-inositol-dependent growth. Analysis of metabolites in HTA426 cells grown in the presence of *myo*-inositol revealed that substantial amounts of *D-chiro*-inositol and *scyllo*-inositol appeared intracellularly during the stationary phase, while only *myo*-inositol was present in PS8 cells, suggesting that interconversion of inositol stereoisomers may involve these three enzymes. We have successfully established transformation of *G. kaustophilus* to inactivate each of the three inositol dehydrogenase genes. The *gk1897* gene was essential for the growth depending on *scyllo*-inositol as the sole carbon source. Intriguingly, the mutant lacking *gk1897* was found to accumulate high level of intracellular *scyllo*-inositol to exhibited significant increase in CFU at lower temperatures. On the other hand, *gk1899* was essential for the growth on both *myo*- and *D-chiro*-inositols. Suppressor mutants of PS8 were isolated to exhibit better growth on *myo*-inositol, which regained expression of the transcript encoding the three inositol dehydrogenases. Shotgun sequencing the 10 individual mutants revealed that 9 were found to carry the common mutation either in ribosome-binding site or translation start codon of a putative gene orthologous to *B. subtilis* *ctrh*. The results suggested that the reason for lost *iol* transcription in PS8 might have something to do with excessive repression involving Ctrh.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：遺伝子資源、ゲノム機能

1. 研究開始当初の背景

【好熱性細菌のゲノム研究の現状】

生育至適温度が 45℃以上の細菌は好熱性細菌と呼ばれる。従来、好熱性細菌研究は耐熱性酵素の探索と応用という目的をもって推進されてきた。そのせいもあって、好熱菌のゲノム研究は、依然として遺伝子ハンティング的な色彩が強く、個々の特徴的な耐熱性酵素の機能や構造を議論するレベルに力点がある。つまり、現実的には未だゲノム機能や代謝システム（代謝経路とその調節の総体）に関する研究はほとんど手付かずのまま取り残されている。特に、好熱性細菌は高温での生育に適応するために独自の代謝系を発達させて細胞システムの維持に役立てている可能性が推定されるが、この推論についても具体的検証が試みられた経緯がない。

【我が国発の微生物ゲノム解析の成果である好熱性 Bacillus 属細菌 GK に着目】

申請者は、生育至適温度 60℃の好熱性 Bacillus 属細菌である GK のゲノム情報に着目した。我が国の海洋研究開発機構（高見ら）で解読された本菌のゲノムは 3498 遺伝子より構成され、他の Bacillus 属関連細菌 5 種と比較すると固有遺伝子は僅かに 757 であった[文献 1]。すなわち、GK は常温菌との比較可能な代謝システムを有しており、そこに見出される本菌の特徴には高温での生育に適応するための代謝を理解するヒントが隠されている可能性が高い。そこで申請者は、好熱性細菌の代謝システム解析を試みるに好適な研究対象として GK ゲノムに着目し、後述の様に申請者が専門とするイノシトール代謝に関してゲノム情報を調査した。

【Bacillus 属細菌におけるイノシトール代謝研究のパイオニアとしての着想】

申請者は Bacillus 属細菌を代表する枯草菌のゲノム機能解析、特に微生物におけるイノシトール代謝研究のパイオニアであり、枯草菌のミヨーイノシトール分解系が *iol* 遺伝子群にコードされていることを明らかにした。*iol* 酵素群の相同性に基づいて GK ゲノム情報を調査したところ、イノシトール代謝に関わると推定される遺伝子群は、下図のようなクラスターを形成している。転写単位は 2 ユニットに分断されると推定され、イノシトール分解系の *iol* オルソログ遺伝子群（反応の順に *iolG*, *iolE*, *iolD*, *iolB*, *iolC*, *iolJ*, *iolA*）およびイノソース異性化酵素 *iolI* オルソログの全てが揃っている。一方、枯草菌にはカウンターパートがない *gk1893-1896* は ABC transporter を構成し、イノシトールの取り込みに関わると推定される。

一見して最も特徴的な点は、代謝系の初発反応を触媒するイノシトール脱水素酵素遺伝子 (*iolG* の推定オルソログ) だけが三つのパラログとしてタンデムに重複していること（すなわち *gk1897*, *gk1898*, および *gk1899*、さらにそれらが恐らくは単一転写単位にコードされ同時に発現することである。このように 3 つのパラログが重複し、また同時に発現することは、炭素源としてミヨーイノシトールを分解資化するという単純な目的のためだけとは考えにくい。枯草菌のミヨーイノシトール代謝研究より派生した成果として、申請者はイノシトール脱水素酵素が代謝中間体に作用してイノシトールの異性化を行うことを示した。そして、この事実ヒントを得た推論によって、これらパラログの何れかが、化学シャペロン活性を発揮してタンパク質の構造を安定化するシローイノシトールなどのイノシトール異性体を産出し、GK の好熱性に関与する可能性を想定するに至った。

以上の経緯より、申請者は 3 種の *iolG* パラログを含む全ての遺伝子クラスターの機能と調節を明らかにして、GK のイノシトール代謝システムの全貌を理解し、加えてそれが好熱性に関わるか否かを検証するという本研究計画の着想を得た。また、これが達成されれば自ずと好熱性細菌の代謝システム解明の先鞭をつけることにもなる。

2. 研究の目的

本研究は上記遺伝子クラスターについて以下 3 点を解明する目標を掲げる。

- (1). 遺伝子クラスター全体としての機能同定と調節機構の解明：二つの遺伝子クラスターのイノシトール分解系として機能、転写発現条件、およびその調節機構を解明する。
- (2). *iol* オルソログ遺伝子の機能同定と生理的意義の解明：*iol* オルソログ遺伝子がコードする酵素の機能や耐熱性を明らかにする。特にイノシトール脱水素酵素パラログの機能を解明し、加えてそれぞれの基質特異性、機能的違いを明確化し、化学シャペロン活性を有するシローイノシトールなどの生産に関与するか否かを明らかにする。
- (3). 新規 *iol* トランスポーターの機能同定：*gk1893-1896* ABC トランスポーターの機能を同定する。イノシトールを輸送する ABC t トランスポーターは研究立案の段階では報告がなかった。一方、*gk1893* は膜貫通ドメイン、*gk1894* は

ATB 結合ドメイン、そして *gk1896* は基質結合リポ蛋白を担うと推定されるが、前者 2 つと基質結合リポ蛋白が別の転写単位に分離配置される例は稀であるので、その意義を見出す。

3. 研究の方法

- (1). フォワード・ジェネティクス：GK の遺伝子操作ツールは未開発なので、変異原処理によってイノシトール資化能力欠失変異株を単離し、当該遺伝子クラスターの変異や発現変化を解析する遺伝学的方法論をとる。
- (2). 遺伝子機能解析：イノシトール分解系酵素の活性を測定する技術と材料を用い変異と酵素活性の相関を把握する。(他者には遂行出来ない独自性・唯一性がある)。
- (3). 遺伝子発現解析：Bacillus 属細菌研究に特化された実績あるノーザン解析やプライマー伸張、ゲルシフトの技術を駆使し、転写同定や定量、調節機構の解明を行う。
- (4). バイオインフォマティクス：本菌ゲノム解析の第一人者、海洋研究開発機構の高見博士を連携研究者に迎え、生物情報学的な視点から遺伝子機能予測および好熱性細菌と常温菌の代謝システムの比較ゲノム論を進める。多面的アプローチを連携・統合・包括する機能を担う。
- (5). リバース・ジェネティクス：遺伝子操作ツールを別途開発中であり、これが利用可能になった場合は一早く逆遺伝学的手法を取り入れ研究の加速を図る。

4. 研究成果

- (1). フォワード・ジェネティクスおよび遺伝子発現解析：GK HTA426 の変異原処理によってイノシトールを利用できなくなった変異株 PS8 を作出して解析した。*gk1897*、*gk1898*、*gk1899* という 3 遺伝子を含むオペロンの転写誘導が消失していた。
- (2). 遺伝子機能解析：*gk1897*、*gk1898*、*gk1899* 各々を大腸菌にクローン化して酵素活性を確認した結果、それぞれがイノシトール異性体を区別できる立体特異的なイノシトール脱水素酵素であることが判明した。
- (3). リバース・ジェネティクス：GK の遺伝子操作技術を開発し、*gk1897*、*gk1898*、*gk1899* それぞれの in-frame 欠損株を作製した。この結果、*gk1897* はシロイノシトール代謝に、*gk1899* はミオイノシトールおよび D-キロイノシトール代謝にそれぞれ必須であると考えられた。それぞれ性質の異なるイノシトール脱

水素酵素の 3 遺伝子が一つの転写単位に含まれるため 3 者が同時に発現することによって、イノシトール異性体相互変換が細胞内で生じることをメタボローム解析によって見出した。

- (4). バイオインフォマティクス：PS8 について、イノシトールを唯一の炭素源とする培地での経代培養を繰り返し、サプレッサー変異株を得た。これらサプレッサー変異株 10 株においては上述のイノシトール脱水素酵素 3 種を含むオペロンの転写が復活していた。これらのゲノム配列を次世代シーケンサー解析した結果、9 株については全て Crh ホモログの翻訳低下を示唆する変異が共通していることがわかり、すなわち PS8 における当該オペロンの転写消失はカタボライト抑制と何らかの関連がある可能性が示唆された。
- (5). ABC トランスポーター：研究進捗の過程で、他の微生物において ABC トランスポーター型のイノシトール輸送担体の同定が報告され、新規性を失ったため研究を中断した。

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 7 件)

- ① Hirokazu Suzuki, Ayano Murakami, Ken-ichi Yoshida, Counterselection system for *Geobacillus kaustophilus* HTA426 through disruption of *pyrF* and *pyrR*, Appl. Environ. Microbiol. 査読有, 78 巻, 2012, 7376-7383
URL:
<http://aem.asm.org/content/78/20/7376.long>
- ② Hirokazu Suzuki, Ken-ichi Yoshida, Genetic transformation of *Geobacillus kaustophilus* HTA426 by conjugative transfer of host-mimicking plasmids, J. Microbiol. Biotechnol., 査読有, 22 巻, 2012, 1279-1287
URL:
<http://www.jmb.or.kr/journal/viewJournal.html?year=2012&vol=22&num=9&page=1279>
- ③ Hirokazu Suzuki, Fumiyo Okazaki, Akihiko Kondo, Ken-ichi Yoshida, Genome mining and motif modifications of glycoside hydrolase family 1 members encoded by *Geobacillus kaustophilus* HTA426 provide thermostable 6-phospho- β -glycosidase and β -fucosidase, Appl. Microbiol.

Biotechnol., 査読有, 97 巻, 2012, 2929-2938

DOI: 10.1007/s00253-012-4168-z

- ④ Ken-ichi Yoshida, Azusa Sanbongi, Ayano Murakami, Hirokazu Suzuki, Shinji Takenaka, Hideto Takami, Three inositol dehydrogenases involved in utilization and interconversion of inositol stereoisomers in a thermophile, *Geobacillus kaustophilus* HTA426, Microbiology, 査読有, 158 巻, 2012, 1942-1952
DOI: 10.1099/mic.0.059980-0
- ⑤ Masaru Yamaoka, Shin Osawa, Tetsuro Morinaga, Shinji Takenaka, Ken-ichi Yoshida, A cell factory of *Bacillus subtilis* engineered for the simple bioconversion of *myo*-inositol to *scyllo*-inositol, a potential therapeutic agent for Alzheimer's disease, Microbial Cell Factories, 査読有, 10 巻, 2011, 69-74
DOI:10.1186/1475-2859-10-69
- ⑥ Tetsuro Morinaga, Takatsugu Matsuse, Hitoshi Ashida, Ken-ichi Yoshida, Differential substrate specificity of two inositol transporters of *Bacillus subtilis*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, 74 巻, 2010, 1312-1314
URL:
https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/74/6/74_100125/_article
- ⑦ Tetsuro Morinaga, Hitoshi Ashida, Ken-ichi Yoshida, Identification of two *scyllo*-inositol dehydrogenases in *Bacillus subtilis*, Microbiology, 査読有, 156 巻, 2010, 1538-1546
DOI: 10.1099/mic.0.037499-0

[学会発表] (計 5 件)

- ① 角美有紀, 志波優, 吉川博文, 吉田健一, *Geobacillus kaustophilus* HTA426 の *iol* 変異株とそのサプレッサーの全ゲノム解析, 平成 24 年度グラム陽性菌のゲノム生物学研究会, 2012 年 8 月 30 日~9 月 1 日, 焼津グランドホテル
- ② 村上絢野, 吉田健一, *Geobacillus kaustophilus* HTA426 が有する 3 種イノシトール脱水素酵素の生理的意義, 平成 24 年度グラム陽性菌のゲノム生物学研究会, 2012 年 8 月 30 日~9 月 1 日, 焼津グランドホテル
- ③ 吉田健一, 村上絢野, 竹中慎治, バクテリア細胞内でのイノシトール立体異性体相互変換の可能性, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 23 日, 京

都女子大学

- ④ Ken-ichi Yoshida, Three functional inositol dehydrogenases of *Geobacillus kaustophilus* HTA426 encoded by a single operon, 6th Conference on Functional Genomics of Gram-positive Microorganisms, 2011 年 6 月 19-23 日, Montecatini Terme, Italy.
- ⑤ 三本木あずさ, 森永哲郎, 鈴木宏和, 芦田均, 志波優, 吉川博文, 吉田健一, *Geobacillus kaustophilus* HTA426 の 3 種のイノシトール脱水素酵素オルソログの発現と機能の解析, 第 32 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学学会合同大会, 2010 年 12 月 10 日, 神戸国際会議場

[図書] (計 1 件)

- ① 吉田健一ほか 12 名 (森田英利 編), 三共出版, 微生物機能学, 2012, 177 (88-92).

[その他]

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 健一 (YOSHIDA KEN-ICHI)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 20230732

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

高見 英人 (TAKAMI HIDETO)
海洋研究開発機構・海洋極限環境生物圏領域・上席研究員
研究者番号: 70359165