

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31日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22780091
 研究課題名（和文）
 超好熱古細菌（始原菌）グリセロール代謝系の解析と応用
 研究課題名（英文）
 Studies on glycerol metabolism of hyperthermophilic archaea
 研究代表者
 古賀 雄一（KOGA YUICHI）
 大阪大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号：30379119

研究成果の概要（和文）：超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 のゲノム情報上で glycerol 代謝関連遺伝子を BLAST 検索したところ、大腸菌等に比べ関連遺伝子の数が少ないことが予測された。本菌の代謝関連遺伝子をクローニングし酵素学的性質の解析、また、遺伝子破壊株による成長曲線解析、遺伝子構造解析を行い、本菌は大腸菌等に比べてシンプルな代謝経路を持つこと、また独自の制御機構を持っていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The genes related to glycerol metabolism were searched from genomic information of *Thermococcus kodakarensis* KOD1. From the results, the number of the genes is thought to be smaller than that of bacteria. Following analysis about those genes, e.g. enzymatic characterization, gene disruption and operon structure analysis, indicate that the glycerol metabolic pathway of *T. kodakarensis* is very simple to compare with that of bacteria or eukarya and have a unique regulation mechanism for the glycerol metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：古細菌、始原菌、超好熱菌、グリセロール代謝

1. 研究開始当初の背景

超好熱古細菌（始原菌）は進化系統樹上の根に近い部分に分布し、その生物学的特性は生物の進化を考察するうえで重要な研究対象である。古細菌(始原菌)の代謝経路も真核生物や原核生物のそれと異なる特性を持っていることが分かっている。グリセロールの代謝は、大腸菌をはじめ古くから研究の進められている代謝経路であり、その複雑な制御機構が良く知られている。一方、古細菌(始原菌)

におけるグリセロール代謝研究はこれまでに例がない。

2. 研究の目的

研究代表者らは、超好熱古細菌（始原菌）*Thermococcus kodakaraensis* KOD1 から、グリセロール代謝で重要な働きをするグリセロールキナーゼ（Tk-GK）を単離し、超好熱菌独自の構造学的、生化学的特性を明らかにしてきた。また、本菌由来のグリセロール代

謝関連遺伝子を複数同定している。これらの結果より、超好熱菌特有のグリセロール代謝特性の存在が示唆されている。本研究では、超好熱古細菌（始原菌）のグリセロール代謝関連遺伝子群（*glp* オペロン）と関連酵素群の分子構造と機能を解析し、古細菌（始原菌）における同代謝系の特性を明らかにする。さらに、グリセロールからのエタノール発酵を目指した耐熱性酵素利用法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

配列相同性検索を用いたデータマイニングを行い *Thermococcus kodakarensis* 上のグリセロール代謝関連遺伝子の有無を網羅的に探索した。これにより、同菌におけるグリセロール代謝経路を類推し、すでに先行研究が行われている大腸菌の代謝経路との比較を行った。これらの結果明らかになった超好熱菌由来の、グリセロール代謝関連遺伝子遺伝子群をクローニングし、組換え体酵素の取得を試みた。組換え体酵素の酵素学的諸性質の検討、基質特異性、補酵素の同定、物理化学的特性解析を行った。すでに研究が先行しているグリセロールキナーゼについては、その構造学的解析を詳細に行うことで、超好熱菌における酵素レベルでの制御メカニズムの解析を行った。さらに、KOD 1 由来の *glpK*, *glpA*, *glpB* 遺伝子を組換えた大腸菌を作成しグリセロールからの GAP 生合成系の構築を行った。

4. 研究成果

グリセロール代謝関連遺伝子の対応表 Kobayashi & Koga

グリセロール代謝関連遺伝子の対応表	Kobayashi & Koga
<i>Escherichia coli</i> K-12 substr.MG1655	<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1
GlpA g3p dehydrogenase(anaerobic), large subunit	Tk1393
GlpB g3p dehydrogenase(anaerobic),membrane anchor subunit	Tk1394
GlpC g3p dehydrogenase(anaerobic), small subunit	N/A
GlpD subunit of glycerol-3-phosphate dehydrogenase, aerobic	N/A
GlpE subunit of thiosulfate sulfurtransferase	Tk0657?
GlpF glycerol facilitator	N/A
GlpK subunit of glycerol kinase	Tk1396
GlpR transcriptional repressor	Tk1272?
GlpQ subunit of glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, periplasmic	Tk1397,Tk1398
GlpT glycerol-3-P MFs transporter	Tk1351?
GlpX fructose 1,6-bisphosphate II	N/A
UgpA subunit of glycerol-3-P ABC transporter	Tk1772
UgpB subunit of glycerol-3-P ABC transporter	Tk1771
UgpC subunit of glycerol-3-P ABC transporter	Tk1775
UgpE subunit of glycerol-3-P ABC transporter	Tk1773
UgpQ glycerophosphodiester phosphodiesterase, cytosolic	Tk1397? (glpQ)
GldA subunit of D-aminopropanol dehydrogenase/ glycerol dehydrogenase	Tk1569?
SmtA predicted S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	Tk1273?
DhaK dihydroxyacetone kinase subunit K	N/A
DhaL dihydroxyacetone kinase subunit L	N/A
DhaM dihydroxyacetone Kinase subunit M	N/A

Table1

大腸菌のグリセロール代謝関連遺伝子をもちいて *T. kodakarensis* の全ゲノムを検索した結果を Table.1 に示す。またその結果から推定される *T. kodakarensis* のグリセロール代謝経路を Fig.2 に示す。

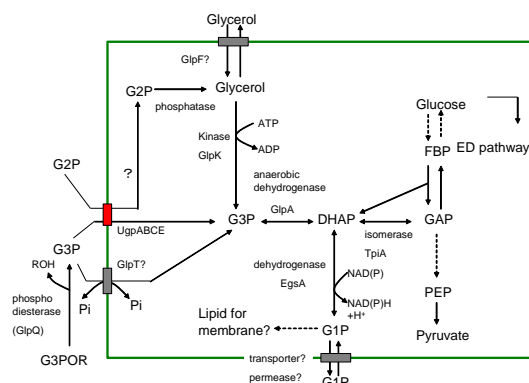


Fig.2 推定される TK の glycerol 代謝経路 (Fig. 1A, Table 1 を基に作成)

この結果から、*T. kodakarensis* は glycerol から DHAP に代謝する経路を大腸菌とは違い G3P を経由する経路の 1 つしかもっていないことが推定された。またこの経路においても大腸菌は同じ反応を触媒するタンパク質が 3 つ存在しているのに対して *T. kodakarensis* では GlpA (Tk-GlpA) の 1 つしか見つからなかった。大腸菌内では G3P 濃度によって *glp* レギュロンの制御が行われている。したがって *T. kodakarensis* も G3P の濃度を調節することで代謝の制御を行っていると考えられるが、今回の結果からは G3P を基質として用いるタンパク質は Tk-GlpA のみしか見つからなかった。このことにより、この Tk-GlpA が *T. kodakarensis* のグリセロール代謝について重要な役割を担っていることが推定される。

Tk-glpA の G3P dehydrogenase (G3PDH) の組換え体が大腸菌で作成し、その酵素学的性質を調べた。

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)を電子受容体として活性測定をしたところ Tk-GlpA は G3PDH 活性があることが確認された。また、70 °C、60 分の加熱でも活性は低下しなかった。至適温度は 80 °C、至適 pH は 9 付近であることがわかった。さらにミカエリス・メンテン定数を決定した。

Table.2 Tk-GlpA のミカエリス・メンテン定数

enzyme	°C	V _{max} (units/mg)	K _m (mM)
--------	----	-----------------------------	---------------------

Tk-1393	70	50.8	3.10×10^{-1}
Ec-GlpA*	25	34.4	3.39×10^{-1}

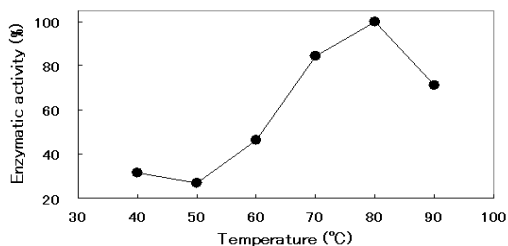


Figure 2 G3PDH 活性の温度依存性

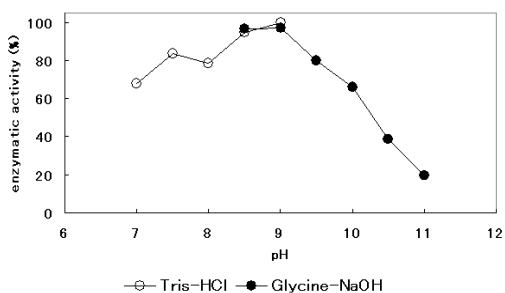


Figure 3 G3PDH の pH 依存性

これらの結果より、本酵素は大腸菌由来 G3PDH と同程度の活性を持つこと、また、超好熱菌の生育環境に適応した酵素であることから、*T. kodakarensis* 菌体内において生理的な役割を果たしていることが示唆された。

また、FAD を持つタンパク質特有の吸収スペクトルを持ち、G3P を加えることでこのスペクトルに変化が見られた。このことから FAD を補因子としていることが明らかになった。さらにゲルろ過クロマトグラフィーの結果から、溶液中では単量体で存在することが確認された。

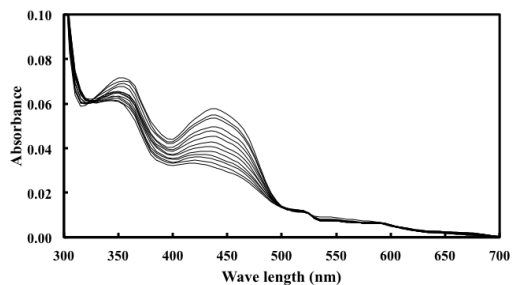


Figure 4 補酵素 FAD の吸収スペクトルの基質依存的変化

T. kodakarensis の G3PDH の遺伝子を破壊し、glycerol 3-phosphate(G3P)の存在下で培養を行ったところ、遺伝子破壊株では成長の遅れが

認められ、本酵素が G3P の資化に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

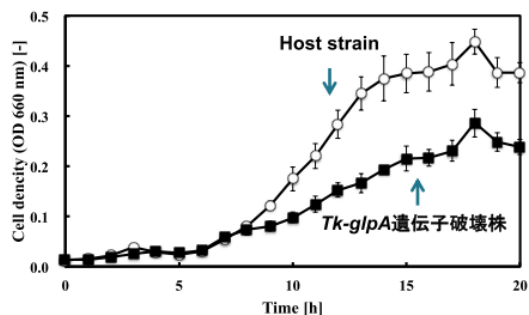


Figure 5 *T. kodakarensis* の成長曲線

また、本菌の glycerol 代謝関連遺伝子の遺伝子構造を RT PCR によって確認したところ、Tk-glpK が Tk-glpQ とまた、Tk-glpA はとオペロンを形成していた。glycerol 代謝とは関連性のない遺伝子とオペロンを形成していた。

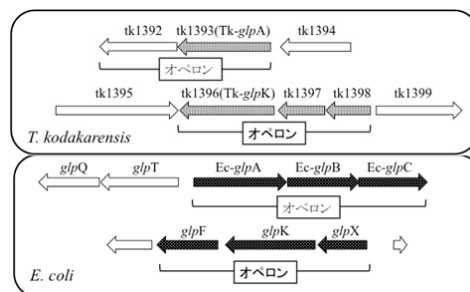


Figure 6 *glp* 関連遺伝子の構造

大腸菌の G3PDH は(Ec-GlpA)は Ec-GlpB、Ec-GlpC とオペロンを形成してヘテロ 3 量体で機能するのに対し、Tk-GlpA は細胞を酸素のストレスから守る働きがある NADH オキシダーゼとオペロンを形成していることからその生理的役割に関連性があることが示唆されている。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

(1) Structural analysis of the glycerol kinase from a hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1

○古賀雄一¹, 外尾竜太¹, 勝見亮太¹, 高野和文², 金谷茂則¹ (¹阪大院・工, ²京府大院・生命環境研)、日本農芸化学会年次大会、2012年3月25日

(2) Structural analysis of the hexameric structure of glycerol kinase from a

hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1

○古賀 雄一¹, 外尾 竜太¹, 勝見 亮太¹, 高野和文², 金谷茂則¹

(¹阪大院・工・生命先端,²京府大院・生命環境研)日本生物工学会、2011年9月27日

(3) 超好熱古細菌(始原菌) *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 由来の

glycerol-3-phosphate dehydrogenase の特性解析
小林淳¹, 古賀雄一¹, 高野和文¹, 金谷茂則¹

(¹阪大院・工・生命先端) 日本生物工学会、
2010年10月28日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

古賀 雄一 (KOGA YUICHI)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 30379119