

平成30年6月23日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292038

研究課題名(和文) 超好熱性アーキアの転写制御因子の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of archaeal transcriptional regulators in a hyperthermophile

研究代表者

金井 保 (Kanai, Tamotsu)

京都大学・工学研究科・講師

研究者番号：10346083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* において糖新生系酵素と細胞内多糖類合成酵素の転写抑制因子を同定した。また芳香族アミノ酸合成オペロンに対する転写活性化因子 Tar は本菌において芳香族アミノ酸合成系全体を制御している可能性が考えられた。さらに愛媛大学との共同研究により Tar の立体構造解析を行った。新規 Lrp/AsnC family 転写抑制因子はアスパラギナーゼ遺伝子の制御に関与することが示唆され、DNA とのダイナミックな結合・解離機構が存在する可能性が示された。本菌の転写制御系の遺伝子組換えにより、より高効率で水素を生産する株を育種した。

研究成果の概要(英文)：We have identified a transcriptional repressors for gluconeogenic enzymes and intracellular polysaccharide synthase in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*. A transcriptional activator, Tar, may control the entire aromatic amino acid biosynthesis systems in this organism. A collaborative research with Ehime University conducted a three dimensional structural analysis of Tar. It was suggested that the novel Lrp/AsnC family transcriptional repressor is involved in the control of an asparaginase gene, with a possibility of a dynamic binding/dissociation mechanism with DNA. By genetic recombination of the transcriptional regulatory system of *T. kodakarensis*, strains which produce hydrogen with higher efficiency were developed.

研究分野：極限環境微生物学

キーワード：アーキア 転写制御因子 超好熱菌

1. 研究開始当初の背景

超好熱菌は 16S ribosomal DNA 配列等に基づく分子系統学的解析から、生命進化の源流に位置する生物群であると考えられている。超好熱菌の生育様式(高温・無酸素・硫黄代謝)は原始地球に存在した環境に近いことから、超好熱菌は長いスパンでの地球環境の変化から取り残された、いわば微生物の「生きた化石」のような生物群であると考えられる。さらには、超好熱菌のゲノムサイズが free-living organism としては最小(~2M 程度)の部類に属することから、超好熱菌の生命システムは生命発生当初のシンプルな特徴を現在まで保持していることが予想される。興味深いことに、このような超好熱菌においても、温度、圧力、炭素源などの外的環境変化に対する積極的な応答が観察される。従って、生物における環境適応の起源は非常に古く、その誕生付近にまで遡ることが予想される。

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* は、遺伝子組換え系が存在する数少ない超好熱菌である。研究代表者は、*T. kodakarensis* が外的環境変化に応答する際の遺伝子発現制御機構の解明に向けて、転写制御因子の同定や制御メカニズムの解明を進めている。*T. kodakarensis* の転写制御因子はゲノム解析より(少なくとも)87種類存在すると予想されている。申請者はこれらの転写制御因子を網羅的に解析することを目的として、大腸菌由来の *in vitro* タンパク質合成系を用いて、本菌の転写制御因子のタンパク質ライブラリーを構築した。

2. 研究の目的

本研究では、*T. kodakarensis* が外的環境変化に応答する際の遺伝子発現制御に関して、その制御因子の同定や制御メカニズムの解明を通じて、本菌の環境適応戦略の解明を目的とする。

3. 研究の方法

1) 転写制御因子ライブラリーを用いた *T. kodakarensis* の新規転写制御因子のスクリーニング

T. kodakarensis の全転写制御因子タンパク質ライブラリーを用いて、特定のプロモーター配列に結合する因子をスクリーニングする。

2) 新規転写制御因子の機能解明

上記のスクリーニングにより同定した転写制御因子のタンパク質を用いて、EMSA による結合位置の推定や *in vitro* 転写系を用いた転写に与える影響の評価を行う。さらには

遺伝子破壊株を作製し、生育測定やマイクロアレイ解析により、本遺伝子産物が細胞内における機能を解析する。

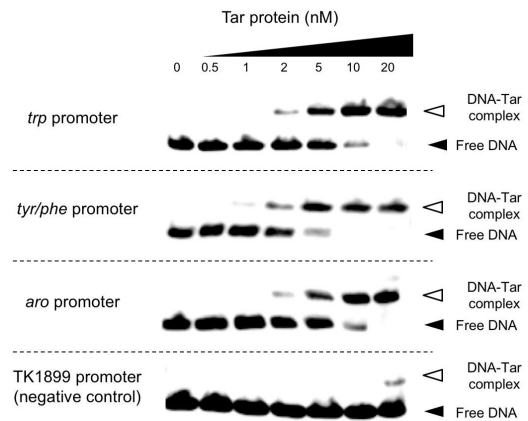
4. 研究成果

1) 糖質代謝関連転写制御因子 Tgr2

T. kodakarensis 推定転写制御因子ライブラリーを用いたスクリーニングにより、核酸代謝関連酵素のプロモーター領域に結合する新規転写制御因子 Tgr2 を見出した。本遺伝子破壊株を作製し、これを用いたマイクロアレイ解析を行った。その結果、本遺伝子の破壊により、主に糖新生系酵素遺伝子と、細胞内の多糖類合成に関与する遺伝子群の転写量が上昇することが判明した。続いて精製タンパク質を用いた electrophoretic mobility shift assay (EMSA)を進めた結果、これらの遺伝子上流配列との直接的な結合が確認されたことから、Tgr2 は *T. kodakarensis* の糖質代謝に関わる新規な転写抑制因子であることが示唆された。

2) 芳香族アミノ酸合成オペロンに対する転写活性化因子 Tar

トリプトファン合成オペロンの上流配列への結合が見られた Tar タンパク質を他の芳香族アミノ酸合成系の promoter に対して EMSA を行った。その結果、いずれの promoter に対しても複合体形成が観察された(図1)。



(図1) Tar の結合試験(EMSA)

更に、これらの promoter に含まれる回文配列に変異を導入したところ、複合体が形成されなくなったことから、Tar の結合には promoter 上の回文配列が必須であることが明らかになった。次に *T. kodakarensis* の RNA polymerase (RNAP)や TFB を含む、基本転写因子(RNAP, TFB, TBP)から構成される *in vitro* 転写系に Tar を添加し、転写反応に与える影

響を調べた。その結果、*trp* promoter の転写産物量は Tar の添加により増加した。

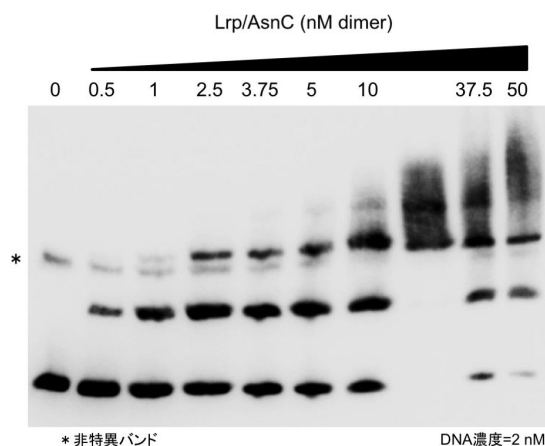
Tar 遺伝子破壊株を作製して生育測定を行った結果、培地中に Trp が含まれている場合は宿主株と同様の生育を示したが、Trp 非存在下での生育は大幅に悪化した。さらに本破壊株は Trp 以外の芳香族アミノ酸の非添加条件でも生育が悪化もしくは生育しなかったことから、本遺伝子が本菌の芳香族アミノ酸生合成全体に寄与している可能性が示唆された。また Trp 非存在下で生育させた本破壊株のマイクロアレイ解析を行った結果、Trp 生合成遺伝子群の転写量の現象が観察されたことから、Tar が実際の細胞内においても Trp 生合成遺伝子群の転写活性化に寄与していることが明らかとなった。

続いて Tar が *T. kodakarensis* の芳香族アミノ酸生合成系全体を制御している可能性を考え、*trp* operon に加えて、*aro* operon *tyr/phe* operon に対する Tar の機能解明を進めた。まず Tar 遺伝子破壊株の生育測定を行った結果、いずれの芳香族アミノ酸非添加培地においても、元株よりも生育が著しく悪化することが判明した。EMSA により Tar がこれらの全てのオペロンのプロモーターと結合することも判明している(図1)ことから、Tar は *T. kodakarensis* の芳香族アミノ酸生合成系全体を制御している可能性が考えられた。

愛媛大学との共同研究により Tar の立体構造解析を行い、X 線結晶構造を 1.58Å 分解能で決定することに成功した。Tar は 2 つのドメインで構成されており、N 末端には二量体形成に必要なドメインが存在し、C 末端には DNA 結合に重要な winged helix-turn-helix (wHTH) 型 DNA 結合ドメインが存在していた。wHTH 上には DNA 認識に重要と予想される複数の正電荷アミノ酸残基が見られた。

3)新規 Lrp/AsnC family 転写制御因子

DNA 修復に関わる RadA/Rad51 recombinase の上流に結合することが予想さ



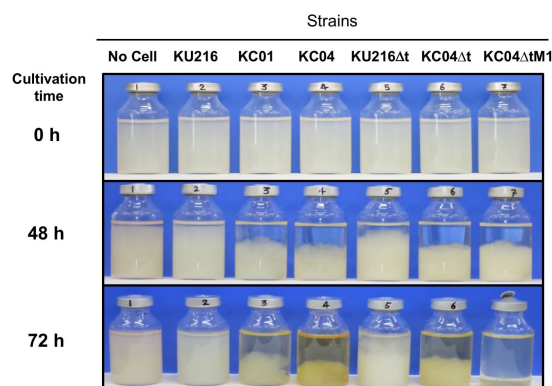
(図2) 推定アスパラギナーゼ遺伝子プロモーターとの結合試験

れた、新規な Lrp/AsnC family に属する転写制御因子についての機能解析を進めた。本遺伝子破壊株を作製し、それを用いたマイクロアレイ解析により、転写量が変動する遺伝子群を検出した。その結果、推定アスパラギナーゼをコードする遺伝子の転写変動が大きいことが判明した。アスパラギナーゼ遺伝子と本転写制御因子遺伝子の上流配列を確認したところ、共通配列の存在が明らかとなった。そこで、大腸菌を用いて調製した組換えタンパク質を用いて EMSA を行った結果、バンドシフトが観察されたことから、これらのプロモーターへの結合が確認された(図2)。

また、アスパラギナーゼ遺伝子上流配列内には転写因子との結合領域が 2 箇所存在することが示され、これらの塩基配列への変異導入により、結合配列と予想される領域を同定した。また転写因子と DNA と結合がアスパラギンの添加により大きくスーパーシフトすることが示された。この結果より、本転写因子が DNA とのダイナミックな結合・解離を介して、本菌のアスパラギン代謝に深く関与する可能性が示された。

4) 転写制御系の組換え株の作製とその応用

T. kodakarensis は、高い水素発生ポテンシャルと有する菌体であることから、本菌の転写制御系に関するこれまでの知見を生かして、本菌を用いた水素生産法の改善を行った。具体的には、水素生産に関わるヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター領域の置換による水素高発現株の育種に成功した。また未利用バイオマスであるキチンを資化可能な *T. kodakarensis* 株を作製する過程においても、糖代謝関連転写制御因子 Tgr の遺伝子破壊を進め、その結果としてキチン資化株 KC04ΔtM1 株の育種に成功した(図3)。本株は、キチンからの水素変換効率が 85%に達し、非常に高効率に水素生産を進めることが可能な株を得た。



(図3) キチン分解試験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Jun SH, Hirata A, Kanai T, Santangelo TJ, Imanaka T, Murakami KS. The X-ray crystal structure of the euryarchaeal RNA polymerase in an open-clamp configuration, *Nature Communications*, 査読有, 5, 2014, 5132, DOI: 10.1038/ncomms6132

Hidase R, Nishikawa R, Gao L, Katano M, Imai T, Kato S, Kanai T, Atomi H, Imanaka T, Fujiwara S. Different roles of two transcription factor B proteins in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*, *Extremophiles*, 査読有, 18, 2014, 573-588, DOI: 10.1007/s00792-014-0638-9

Kanai T, Simons J, Tsukamoto R, Nakajima A, Omori Y, Matsuoka R, Beppu H, Imanaka T, Atomi H. Overproduction of the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase in *Thermococcus kodakarensis* and its effect on hydrogen production, *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 6, 2015, 847, DOI: 10.3389/fmicb.2015.00847

Hidase R, Yamashita K, Kawazuma K, Kanai T, Atomi H, Imanaka T, Fujiwara S. Gene regulation of two ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductases by the redox-responsive regulator SurR in *Thermococcus kodakarensis*, *Extremophiles*, 査読有, 21, 2016, 903-917, DOI: 10.1007/s00792-017-0952-0

Aslam M, Horiuchi A, Simons JR, Jha S, Yamada M, Odani T, Fujimoto R, Yamamoto Y, Gunji R, Imanaka T, Kanai T, Atomi H. Engineering of a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*, that displays chitin-dependent hydrogen production, *Appl Environ Microbiol.*, 査読有, 83, 2017, e00280-17 (selected as a SPOTLIGHT article) DOI: 10.1128/AEM.00280-17

〔学会発表〕(計7件)

Tamotsu Kanai, Genome-wide screening to identify novel transcriptional regulators from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*, 10th International Congress on Extremophiles, 2014年

跡見晴幸、超好熱性アーキアにおける新規転写制御因子の同定、第37回分子生物学会、2014年

金関剛史、超好熱性アーキア

Thermococcus kodakarensis における芳香族アミノ酸合成経路の転写制御機構の解明、第66回日本生物工学会大会、2014年

跡見晴幸、アーキアにおけるアミノ酸合成関連遺伝子の発現制御機構、日本農芸化学会2016年度大会、2016年

谷本 充、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における新規 Lrp/AsnC 型転写制御因子の機能解明、極限環境生物学会、2017年

臼井孝典、芳香族アミノ酸の生合成遺伝子群の発現を制御するアーキア転写活性化因子(Tar)の分子認識機構の解明、極限環境生物学会、2017年

小西智也、アーキア RNA ポリメラーゼの転写活性化型開始複合体の構造解析に向けての準備状況、極限環境生物学会、2017年

〔図書〕(計1件)

金井保、“アーキアの遺伝情報発現 アーキアの転写制御”、石野良純 跡見晴幸編 アーキア生物学、共立出版、5章2節、2017、104-107

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

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

(4)研究協力者

吉田 晃 (YOSHIDA, Ko)
金関 剛史 (KANESEKI, Tsuyoshi)
谷本 充 (TANIMOTO, Mitsuru)

ASLAM, Mehwish

郡司 遼馬 (GUNJI, Ryoma)

山田 将大 (YAMADA, Masahiro)