

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19310126
 研究課題名（和文） ゲノム情報と発現形質の矛盾に着目した新規代謝経路の探索と同定
 研究課題名（英文） Novel metabolic pathway discovery based on contradictions between genome data and biochemical properties
 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：

本研究は超好熱始原菌の一種 *Thermococcus kodakaraensis* を対象に新規代謝酵素や経路の同定を目的としたものである。アプローチとしてはゲノム情報に基づいて推定される代謝機能と実際の形質（細胞の増殖特性）の矛盾に着目して新規酵素・代謝系を探索する方法をとった。特にペントース代謝、アミノ酸合成経路や補酵素の合成経路を中心に進めた結果、糖代謝・アミノ酸代謝・脂質代謝で中心的な役割を果たす補酵素 A (coenzyme A, CoA) の新しい合成ルートを発見することができた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2008年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,900,000	4,770,000	20,670,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ゲノム情報、機能未知遺伝子、代謝、超好熱菌、補酵素 A、
 Pantoate kinase、Phosphopantothenate synthetase、始原菌

1. 研究開始当初の背景

我々は超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株の全ゲノム塩基配列を決定しており、本菌ゲノムが 2,088,737 bp からなり、2,306 個の遺伝子を持つことが推定されていた。それらのうち、約半数の 1,165 個の遺伝子に関しては一次構造から機能推定が可能であったが、残りの約半数は機能未知であった。このゲノム情報により、KOD1

株内に存在する様々な代謝系・生合成系の有無が推定できる。たとえば中央炭素代謝に関しては Archaea 型解糖系の酵素遺伝子が全てゲノム上に存在していたものの、pentose phosphate pathway、TCA 回路の主要酵素遺伝子や糖新生の鍵酵素である fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase) 遺伝子が欠落していることが判明した。またアミノ酸代謝に関しては proline、phenylalanine、

arginine、isoleucine、valine、cysteine、補酵素として補酵素 A や NAD、FAD の生合成経路の主要酵素遺伝子がゲノム上に存在しないことも明らかとなった。にもかかわらず、KOD1 株は実際 hexose や pentose に対する要求性を示さず、アミノ酸に対しても proline、phenylalanine、cysteine 等は合成可能であることが培養実験によってはっきり示されていた。このようにゲノム情報から推定される細胞の機能と細胞の実際の形質が明らかに異なる場合は、これらの合成を担う酵素や代謝系は構造的に新しいものであるか、あるいは別経路を介した機能的に異なるものであるはずと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では上記のようなゲノム情報から推定される酵素・代謝経路の有無と *T. kodakaraensis* KOD1 株の実際の形質・代謝特性との違いに着目して、機能未知遺伝子の機能解明、新規代謝経路・新規生合成経路の同定を目的とする

3. 研究の方法

各代謝経路を構成する酵素の遺伝子の有無はアノテーションおよび BLAST 検索により判断した。BLAST 検索の場合は細菌である *Escherichia coli*、*Bacillus subtilis* および真核生物である *Saccharomyces cerevisiae* や human の対応する配列を用いた。比較ゲノムの解析は Xanagenome software および arCOG database を用いた。

4. 研究成果

(1) 新規補酵素 A 合成経路の解明

始原菌における補酵素の生合成経路のうち、最も重要な補酵素の一つである coenzyme A (CoA) の生合成経路に着目した。CoA は全ての生物に存在する補酵素であり、トリカルボン酸回路や脂肪酸の生合成を始めとする様々な代謝系に参与している。CoA の生合成経路は、真核生物・細菌においては共通であり、2-oxoisovalerate を出発物質とする 8 種の酵素反応からなる (KPHMT, ketopantoate hydroxymethyltransferase; KPR, ketopantoate reductase; PS, pantothenate synthetase; PanK, pantothenate kinase; PPCS; 4'-phosphopantothenoylcysteine synthetase; PPCDC, 4'-phosphopantothenoylcysteine decarboxylase; PPAT, 4'-phosphopantetheine adenylyltransferase; DPCK, dephospho-CoA kinase) (図 1)。始原菌のゲノム情報を元に各反応に対応する遺伝子を探索すると、ほぼすべての始原菌ゲノムにおいて、既存の pantothenate synthetase (PS) および pantothenate kinase (PanK) 遺伝子と相同性を有する遺伝子が存在しないことがわかった。

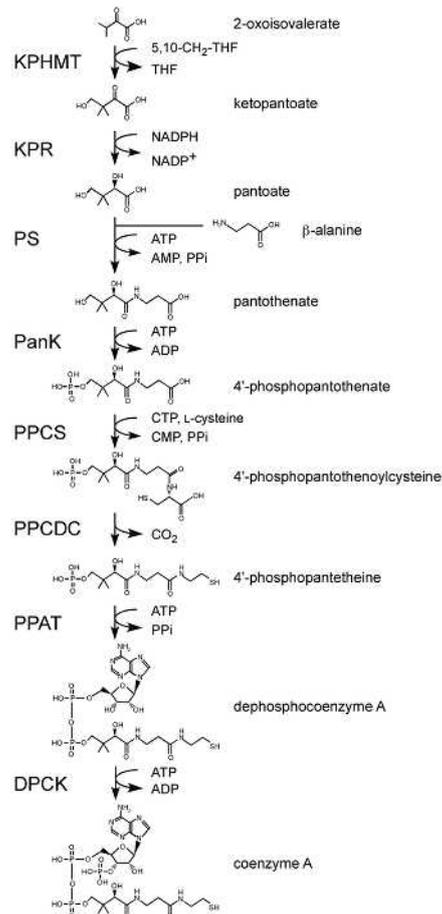


図 1. 細菌および真核生物の CoA 合成経路

そこでまず *T. kodakaraensis* における CoA 生合成能力の有無を検討した。CoA やその前駆体を含まない合成培地を用いて野生株である KOD1 株を 85 で 24 時間培養し増殖を観察した。同一組成の培地を用いて複数回継代培養を繰り返しても良好な生育を示したので、*T. kodakaraensis* は CoA 生合成能力を有していることが確認された。

次に *T. kodakaraensis* KOD1 株の無細胞抽出液中の PanK 活性を pyruvate kinase/lactate dehydrogenase (PK/LDH) 法により検討したが、明確な活性は検出されなかった。そこで比較ゲノム的手法により PanK 遺伝子を推定することにした。始原菌に広く分布しかつ始原菌に特有の機能未知 kinase 遺伝子を探索したところ、4 遺伝子 (TK0939, TK1473, TK2141, TK2242) を得ることができた。これら 4 つの候補遺伝子を大腸菌内で発現したところ、TK1473 と TK2242 は可溶性タンパク質として得られたが TK0939 と TK2141 は大腸菌内では正しく folding せず不溶化した。TK1473 と TK2242 に関して PANK 活性を検

討したが、いずれも活性を示さなかった。TK0939 と TK2141 に関しては、我々が開発した遺伝子発現系を利用して *T. kodakaraensis* 内での大量発現を試みた。Promoter としては *T. kodakaraensis* において強い promoter である *csg* promoter を用い、TK0939 に関しては本来の遺伝子座における promoter 置換を行い、TK2141 に関してはゲノム上の chitinase 遺伝子座に発現カセットを挿入した。この結果、TK0939 と TK2141 は可溶性タンパク質として得られ、生化学的解析が可能となった。42 での PK/LDH 法を用いた検討により TK2141 は弱いながらも PANK 活性を示すことが明らかとなったが、意外なことに高い pantoate kinase (PoK) 活性が観察された。速度論的解析により、TK2141 タンパク質は pantothenate と pantoate に対して同等な K_m 値を示したが、 V_{max} は pantoate に対して約 7 倍高い値となった (図 2)。従来の PANK と異なり、*T. kodakaraensis* の PoK は ATP のみならず GTP や CTP をリン酸供与体として認識した。また CoA や CoA 誘導体によるフィードバック阻害を受けないことがわかった。

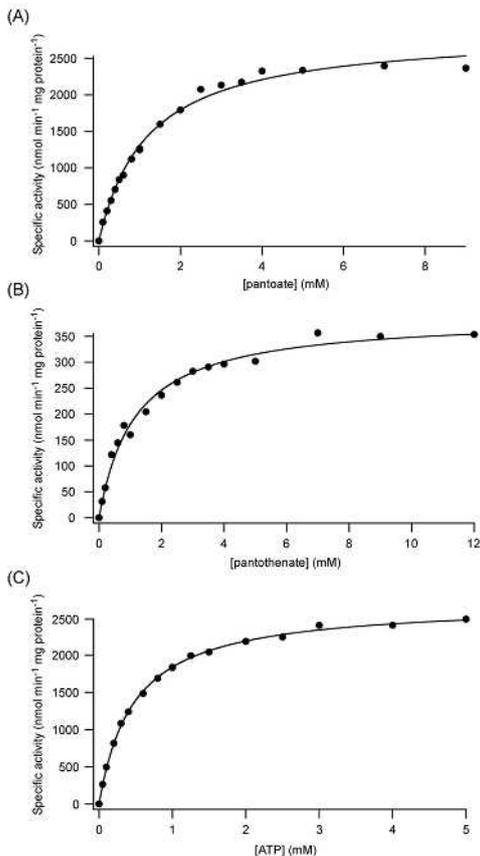


図 2 . TK2141 (PoK) の速度論的解析。(A)Pantoate、(B)Pantothenate、(C)ATP に対する解析結果を示す。いずれも Michaelis-Menten 型の挙動を示した。

PoK の同定により、始原菌には細菌・真核生物における pantoate pantothenate 4'-phosphopantothenate という既存の PS, PANK による反応経路ではなく、pantoate 4-phosphopantoate 4'-phosphopantothenate という 2 つの新酵素 PoK, phosphopantothenate synthetase (PPS) による反応経路が存在するのではないかと考えた (図 3)。

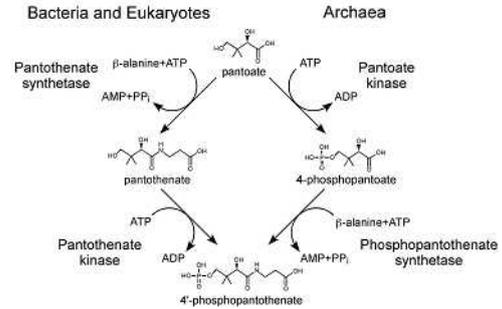


図 3 . 細菌・真核生物 (左) および始原菌 (右) における 4'-phosphopantothenate 合成経路。

そこで PoK に続く反応を触媒する PPS 候補遺伝子を探索した。始原菌における PoK 遺伝子の分布とほぼ等しい分布を持つ遺伝子を検索したところ、始原菌に特有の機能未知遺伝子 (TK1686) を同定することができた。TK1686 遺伝子を大腸菌内で発現し、HPLC を用いて PPS 活性および PS 活性を検討した結果、TK1686 は PS 活性を示さず PPS 活性のみを示した。*T. kodakaraensis* の PPS は ATP のみを利用し、従来の PS 同様 AMP を生成した。したがって、始原菌においては細菌・真核生物における PS/PanK 経路の代わりに PoK/PPS 経路が機能することが示唆された。

in vitro における結果を検証するために、我々は *T. kodakaraensis* の TK2141、TK1686 遺伝子をそれぞれ破壊し、破壊株の増殖特性を評価した。宿主細胞としては *T. kodakaraensis* KUW1 を用い、*pyrF* 遺伝子をマーカーとした pop-in/pop-out 法を利用した。破壊株の選択培地には CoA を添加して操作を進めた。その結果、TK2141、TK1686 それぞれの遺伝子破壊株を作製することができた。

それぞれの破壊株について、ASW-YT 培地で培養し、CoA の有無による増殖への影響を調べた。その結果、CoA 存在下では両破壊株は宿主細胞 KUW1 株と同等な生育を示したが、CoA を添加していない培地では増殖できなかった (図 4)。このことから TK2141、TK1686 遺伝子はともに *T. kodakaraensis* にお

ける CoA 合成に必須であることが遺伝学的に証明された。

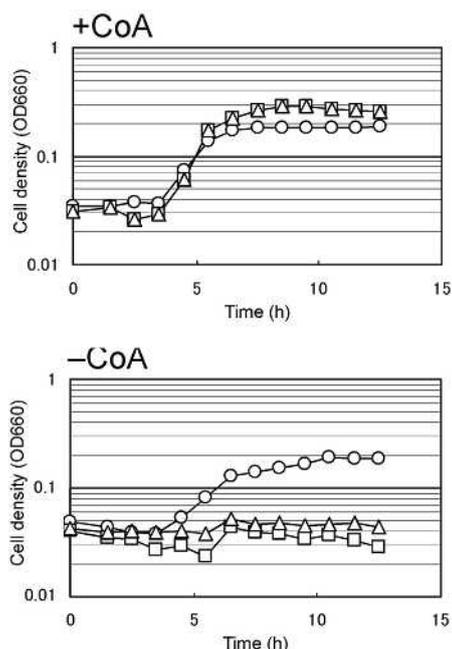


図4 .宿主細胞() TK2141 破壊株() TK1686 破壊株() の増殖特性。CoA 添加(上グラフ)および非添加(下グラフ)の結果を示す。

以上、比較ゲノム的手法と生化学的・遺伝学的検証により、*T. kodakaraensis* では PS/PanK の経路は存在せず、pantoate kinase (PoK) および phosphopantothenate synthetase (PPS) という全く新規な2種の酵素活性により pantoate から 4'-phosphopantothenate までの変換が行われていることが判明した。これらの遺伝子ホモログはほぼ全ての始原菌ゲノム上に存在することから、本研究を通じて新しい始原菌特異的 CoA 合成経路が解明できたとと言える。

(2) 5種の acyl-CoA synthetase 遺伝子の機能解明

T. kodakaraensis ゲノム上には5種の acyl-CoA synthetase 候補遺伝子 (TK0139、TK0665、TK0944、TK1880、TK2127) が存在する。これらは機能が重複する可能性もあったが、我々はそれぞれの遺伝子が異なった基質特異性を示すと考え、これらの機能解析を進めた。ここでは TK0944 および TK2127 の結果について報告する。

超好熱始原菌の一部においては acyl-CoA synthetase はアミノ酸の酸化異化代謝に関与する。アミノ酸はまず酸化的脱炭酸を伴っ

た CoA 付加、続いて生成した acyl-CoA の加水分解に伴った ATP 合成により有機酸へと変換される。Acyl-CoA synthetase は一般にヘテロ4量体(22)酵素であり、上記5種の遺伝子は subunit 遺伝子に対応する。TK0944 および TK2127 をそれぞれ subunit に対応する TK0943 と共発現し、組換え型酵素を精製した。18種のアミノ酸に対応する有機酸を基質として TK0944 および TK2127 の基質特異性を検討した結果、TK0944 の基質特異性は広く、TK2127 は imidazole-4-acetic acid に特異的であり、後者が histidine の分解に関与することが明らかとなった。同様な手法で5種の acyl-CoA synthetase 遺伝子を解析した結果、*T. kodakaraensis* の新しいアミノ酸代謝経路が同定でき、20種のアミノ酸の中で Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Tyr, Trp, Glu/Gln, Cys, His を酸化的に分解できることが判明した。

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 6件)

Louvel H., Kanai T, Atomi H, Reeve JN, The Fur iron regulator-like protein is cryptic in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*, FEMS Microbiol. Lett., Online early, DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01594.x, 2009, 査読有

跡見晴幸, 福居俊昭, 金井保, 今中忠行, アーケアのゲノムからみえるもの, 蛋白質核酸酵素, 54, 120-126, 2009, 査読無

Santangelo TJ, Cubonová L, Matsumi R, Atomi H, Imanaka T, Reeve JN., Polarity in archaeal operon transcription in *Thermococcus kodakaraensis*, J Bacteriol., 190, 2244-2248, 2008, 査読有

Watanabe S, Matsumi R, Arai T, Atomi H, Imanaka T, Miki K. Crystal structures of [NiFe] hydrogenase maturation proteins HypC, HypD, and HypE: insights into cyanation reaction by thiol redox signaling, Molecular Cell., 27, 29-40, 2007, 査読有

Yoshida S, Atomi H, Imanaka T, Engineering of a type III rubisco from a hyperthermophilic archaeon in order to enhance catalytic performance in mesophilic host cells, Applied and Environmental Microbiology., 73, 6254-6261, 2007, 査読有

Shikata K, Fukui T, Atomi H, Imanaka T, A novel ADP-forming succinyl-CoA synthetase in *Thermococcus kodakaraensis* structurally related to the archaeal nucleoside diphosphate-forming acetyl-CoA synthetase, Journal of Biological Chemistry, 282, 26963-26970, 2007, 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

跡見晴幸, *Thermococcus kodakaraensis* の特異なペントース代謝機構, 日本 Archaea 研究会発足 20 周年記念講演会, 2008 年 7 月 5 日, 沖縄県男女共同参画センター「ていりる」

跡見晴幸, Type III Rubisco と Calvin 回路の進化, 日本農芸化学会シンポジウム, 2008 年 3 月 29 日, 愛知県 名城大学天白キャンパス

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：9 0 2 4 3 0 4 7

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者