

機関番号：34504

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580090

研究課題名（和文）超好熱菌の恒常性維持に関する研究

研究課題名（英文）Study on homeostasis of hyperthermophiles

研究代表者

藤原 伸介 (FUJIWARA SHINSUKE)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：90263219

研究成果の概要（和文）：85℃以上で生育する超好熱菌は、分子系統学的に原始生命に最も近い現存生物である。本研究では *Thermococcus kodakaraensis* をモデル生物として、超好熱菌が活発に増殖する状態から生育を抑えられた状態に移ったときに細胞がどのような適応応答を行うか解析した。特に、温度ストレス下での応答に加え、対数増殖期から定常期へ移った際の応答に注目し、形態と膜脂質の変動、遺伝子の発現動態、ポリアミンのような低分子物質のもつ役割について集中的に研究を行った。

研究成果の概要（英文）：Living microorganisms face various kinds of stress and protect themselves by inducing several stress-responsive proteins. Among all microorganism, hyperthermophiles that grow above 85 °C are considered as one of most primitive microorganisms. It is unclear how hyperthermophile adapts to environmental changes such as temperature stress and nutrient starvation. In the present study, adaptation mechanisms of hyperthermophiles to environmental changes were focused and analyzed using hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* as a model microorganism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：アーキア、超好熱菌、環境適応、ポリアミン、分子シャペロニン

## 1. 研究開始当初の背景

海底火山や温泉などの熱水坑に生育する超好熱菌は原始生命の特徴を残す現存生物と考えられている（図1）。現存する自然界の微生物は様々な生育ストレスにさらされ耐えてきた。ストレスへの応答、順化は微生物の進化・多様性獲得と密接に関係していると考えられる。特に超好熱菌の環境適応機構を研究することで、生物の進化を考察する興

味深い知見が得られると考えられる。特に超好熱菌の低温環境への適応は多様性獲得と密接な関係があったのではないと思われる。現在の地球上には多数の微生物が存在するが、活発に増殖できる環境におかれているものは少ない。つまり対数増殖している細胞はわずかで、ほとんどの細胞は貧栄養な環境下で生きている。定常期の細胞は微生物の自然な姿を反映しているといえよう。最近の研



置 (LC-MS) を利用しての構成成分を同定した。翻訳活性はキチナーゼ遺伝子の転写産物を用いて S30 画分を用いて、*in vitro* 翻訳を行い、4-MU (メチルウンベルフェロン) を基質に評価した。翻訳活性は S100 画分とリボソームを混合した試料についても調べた。興味深いタンパク質については遺伝子の破壊を行い、破壊株の生理学的性質がどのように変化するかを調べた。超好熱菌には多価ポリアミンが存在することが報告されている。これら塩基性分子が翻訳に関与していることも考えられた。この点についてもあわせて検討した。

#### (2) 環境変化に応答する因子のカタログ化

*T. kodakarensis* の細胞を栄養培地で増殖させ、経時的にサンプリングして、各段階での細胞を取得した (生育時期の違いによる細胞の分取)。タンパク質のプロテオーム解析、転写産物のトランスクリプトーム解析をそれぞれ質量分析法 (LC-MS) とマイクロアレイ法で行った。また生育時期の違いに加え、培養温度の違い (60°C、85°C、93°C) で同様の解析を行い、データを収集した。

#### (3) 同定した因子の生理学的意義の解明

上記 (1) (2) の解析により特異的に発現が確認された遺伝子については、推定される機能に応じて遺伝子破壊株を構築し生理学的性質を調べ、あるいは組換えタンパク質を取得して生化学的性質の解析を試みた。*T. kodakarensis* は遺伝子の特異的破壊法が確立されている唯一の超好熱菌である。その原理は本菌が 5-フルオロオロト酸 (FOA) を含む選択培地では *pyrF* 遺伝子の機能欠損株のみが生育するという性質に基づくものであり、この性質を利用しながら非選択圧下で *pyrF* の機能相補と同時に特定の遺伝子を破壊する。興味深い因子の生化学的性質については大腸菌を利用した高発現系 (pET 系プラスミド、pQE 系プラスミド) を用い、高発現させて調べた。タンパク質によっては *in vitro* の実験を行い、機能の検証を行った。シャペロン様因子については、凝集抑制活性を指標にどのような働きがあるのか調べた。特に細胞内タンパク質の管理に直接関与すると考えられることから、その因子がどのような基質分子に作用するのかについても興味を持たれる。この点については特異的抗体を調製し、免疫沈降実験から、基質分子の特定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) リボソームの生育時期に依存した超分子構造の解明

*Thermococcus kodakarensis* を 85°C で培養し、対数増殖期と定常期の細胞を得た。細胞の持つ翻訳活性を検討するために、それぞれ

の時期から無細胞抽出液 (S30 画分) を分取し、翻訳活性を検討した。翻訳活性は対数増殖期のもののみ認められた。次にリボソームの大きさを調べたところ、対数増殖期、定常期のいずれの細胞でも 70S リボソームのみが認められ、100S リボソームはみられなかった。さらに細胞質画分 (S100 画分) とリボソーム (それぞれの増殖期の 70S) を、組み合わせて活性を検証したところ、対数増殖期のリボソームを用いた場合にのみ高い活性が認められた。次に定常期のリボソーム画分に含まれる特異的タンパク質を特定するために、RFHR 二次元電気泳動と質量分析 (LC-MS) 分析を行った。定常期のリボソーム画分には対数増殖期にはない特異的なタンパク質が存在し、これらは転写レベルで誘導されていることがわかった。また (2) の解析により、培養温度の上昇に伴いアミノプロピルスベルミンの合成が高まることが示された。そこで *in vitro* の翻訳実験にアミノプロピルスベルミンを添加したところ、特に高温で胞内翻訳活性を促進する効果がみられた。

### (2) 環境変化に応答する因子のカタログ化

定常期に入った細胞で、その形態と膜脂質の変動、遺伝子の発現動態、細胞のもつ翻訳活性について集中的に研究を行った。形態変化を観察したところ、定常期に入ると鞭毛が減少し、細胞も小型化していることが確認された。膜脂質成分を調べたところ、定常期になるにつれて炭化水素鎖の長いカルドアーケオール型脂質の割合が高まった。遺伝子の発現動態を調べたところ、この合成制御は転写段階でなされていることがわかった。時期特異的に発現しているものの中に、分子シャペロン (*cpkA*) も見出された。*cpkA* の生育時期特異性は 60°C でのみみられた。いくつかの超好熱菌において多価ポリアミンが高温での生育に重要であることが報告されているが、生育時期特異性はみられなかった。しかし生育温度に依存した多価ポリアミンの合成が確認され、この調節は TK1592 遺伝子 (アデノシルメチルプロピルアミンの合成酵素をコードする) によって支配されていることが示唆された。TK0147 (スベルミジン合成酵素をコードする) はポリアミンの生合成に関与する遺伝子であるが、その発現は生育温度、生育時期のいずれにも影響を受けなかった。またポリアミン合成の起点となるアルギニン脱炭酸酵素は生育に必須であることが遺伝子の破壊実験により示された。本酵素も生育時期特異的な発現量変動はみられなかった。また、培地中の硫黄の有無による遺伝子の発現動態変化を調べたところ、硫黄の添加により硫化水素発生系遺伝子の発現が誘導され、硫黄を除くと水素発生系遺伝子の

発現が誘導された。この調節の中心的役割を果たす転写因子が TK1086 と予測された。

### (3) 同定した因子の生理学的意義の解明

上記のカタログ化解析で得られた知見により、いくつかを選びその機能を解析した。ポリアミン生合成系については初期酵素であるアルギニン脱炭酸酵素 TK0149 の生育必須性が明らかになった。TK1592 は、高温(93°C)で高発現し、アミノプロピル基供与に中心的な役割を果たしている。その誘導は転写レベルでなされ、プロモーター上流領域が制御のシスエレメントとして機能していることが明らかになった。この領域には既知の熱ショック応答性遺伝子の保存配列は存在せず、あたらしい制御機構の存在が示唆される。なお、ポリアミンはリボソームの超分子構造に影響を与えなかった。

生育時期特異的に膜脂質成分の変動を調べたところ、増殖条件の悪化に応じて炭化水素鎖の長いカルドアーケオール型脂質の割合が高まることが示された。今回、シス型プレニルトランスフェラーゼについて生化学的解析を行ったところ、産物鎖長の制御には109番目のLysが関与していることが示された。

また、温度依存性の発現を示した遺伝子の中で、低温特異的な誘導を示したRNAヘリカーゼ(TK0306)とシャペロニンCpkAに注目し、その性質を調べた。TK0306は*T. kodakaraensis*由来でありながら、50°CをATPase活性の反応最適温度にもつ。熱に対する感受性が高く、組換えタンパク質は20°Cから変性がはじまり、70°Cで完全に変性した。unwind活性を調べたところ、二本鎖のRNA、DNAには作用しないが、ステムループ様の構造をとったRNAに作用し、ATP依存的に構造をほぐした(unwind活性を示した)。TK0306は、低温ストレス時に形成される好ましくないRNAの構造をほぐすために働いているものと考えられる。また、本遺伝子上流には非翻訳領域が存在するが、この領域は低温での特異的発現に寄与している可能性が考えられた。

また、低温特異的に誘導されてくる分子シャペロニンCpkAの特異的基質の探索を試みたところ、indole-3-glycerol-phosphate synthase(TrpC)が同定された。TrpCを尿素で変性させ、リフォールディング時にシャペロニンの添加効果を検討したところ、CpkAでは効果がみられたが、高温誘導型シャペロニンCpkBでは効果は認められなかった。シャペロニンに関しては低温及び高温で特異的に誘導される分子シャペロニンCpkAとCpkBの標的タンパク質をカタログ化した。両標的の分子量分布に違いは認められないが、疎水度と塩基性度に違いがみられた。CpkAが特異

的に捕捉している標的の中でTrpCタンパク質に注目し、CpkAとの作用機序をin vitroで検証した。CpkAはTrpCの部分変性した状態を認識し、再生していることが明らかになった(図2)。

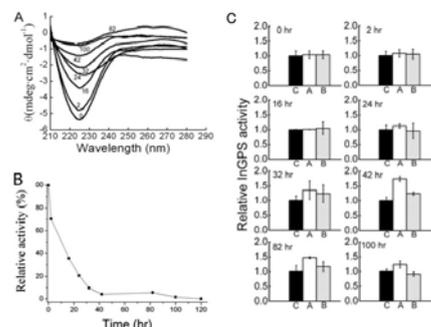


図2 シャペロニンの変性Tk-TrpCへの効果 (A) Tk-TrpCの8M尿素存在下での水中での変性曲線。経時的構造変化を遠紫外部波長(222nm)の分子楕円率の変化を示した。グラフ中の数字は水中での処理時間を示す。

(B) Tk-TrpCの残存活性。Tk-TrpCの8M尿素存在下での水中で処理したときの時間推移に伴う酵素の残存活性を表示している。

(C) Tk-TrpCのリフォールディングにおけるシャペロニンの添加効果。各処理時間での変性Tk-TrpCを自発的にリフォールディングしたときに比較活性を表示している。C, シャペロニン未添加によるリフォールディング; A, CpkAを添加したときのリフォールディング; B, CpkBを添加したときのリフォールディング

### 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13件)

- ① Morimoto, M., Fukuda, W., Nakajima, N., Masuda, T., Terui, Y., Kanai, T., Oshima, T., Imanaka, T., and Fujiwara, S. Dual biosynthesis pathway for longer chain polyamines in hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Bacteriol.* (査読有り), 192/19, 4991-5001 (2010)
- ② Kanai, T., Takedomi, S., Fujiwara, S., Atomi, H., and Imanaka, T. Identification of the Phr-dependent heat shock regulon in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Biochem.*

- (査読有り), 147/3, 361-370 (2010)
- ③ Shimada, Y., Fukuda, W., Akada, Y., Ishida, M., Nakayama, J., Imanaka, T., and Fujiwara, S. Property of cold inducible DEAD-box RNA helicase in hyperthermophilic archaea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有り), 389, 622-627 (2009)
- ④ Yamada, Y., Fukuda, W., Hirooka, K., Hiromoto, T., Nakayama, J., Imanaka, T., Fukusaki, E., and Fujiwara, S. Efficient in vitro synthesis of cis-polyisoprenes using a thermostable cis-prenyltransferase from a hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Biotechnol.* (査読有り) 143, 151-156 (2009)
- ⑤ Mandai, T., Fujiwara, S., and Imaoka, S. Construction and engineering of a thermostable self-sufficient cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有り), 384/1, 61-65 (2009)
- ⑥ Mandai, T., Fujiwara, S., and Imaoka, S. A novel electron transport system for thermostable CYP175A1 from *Thermus thermophilus* HB27. *FEBS J.* (査読有り) 276/8, 2416-2429 (2009).
- ⑦ Matsuno, Y., Sugai, A., Higashibata, H., Fukuda, W., Ueda, K., Uda, I., Sato, I., Itoh, T., Imanaka, T., and Fujiwara, S. Effect of growth temperature and growth phase on lipid composition of archaeal membrane from *Thermococcus kodakaraensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73/1, 104-108 (2009)
- ⑧ Fujiwara, S., Aki, R., Yoshida, M., Higashibata, H., Imanaka, T., and Fukuda, W. Expression profiles and physiological roles of two types of molecular chaperonins from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* (査読有り), 74/23, 7306-7312 (2008)
- ⑨ Danno, A., Fukuda, W., Yoshida, M., Aki, R., Tanaka, T., Kanai, T., Imanaka, T., and Fujiwara, S. Expression profiles and physiological roles of two types of prefoldins from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Mol. Biol.*, 382, 298-311 (2008)
- ⑩ Fukuda, W., Morimoto, N., Imanaka, T., and Fujiwara, S. Agmatine is essential for the cell growth of *Thermococcus kodakaraensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* (査読有り), 287, 113-120 (2008)
- ⑪ Iizuka, R., Sugano, Y., Ide, N., Ohtaki, A., Yoshida, T., Fujiwara, S., Imanaka, T., and Yohda, M. Functional characterization of recombinant prefoldin complexes from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp. strain KS-1. *J. Mol. Biol.* (査読有り), 377/3, 972-983 (2008)
- ⑫ Fujiwara, S., Yamanaka, A., Yamada, Y., Higashibata, H., Fukuda, W., Nakayama, J., Imanaka, T., and Fukusaki, E. Efficient synthesis of trans-polyisoprene compounds using two thermostable enzymes in an organic-aqueous dual-liquid phase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有り), 365, 118-123 (2008)
- [学会発表] (計 27 件)
- ① Gao, L., Danno, A., Fukuda, W., Imanaka, T., and Fujiwara, S. Specific substrates of cold-inducible chaperonin in hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* 8<sup>th</sup> International congress on extremophiles 2010 年 9 月 14 日 Ponta Delgada, Azores, Portugal
- ② Fujiwara, S. Dual biosynthesis pathway for longer chain polyamines in hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. 2010 INTERNATIONAL POLYAMINE CONFERENCE, 2010 年 6 月 15 日 御殿場高原リゾート 時之栖 (とくのすみか) 御殿場高原ホテル BU 静岡
- ③ 青木俊, 橋本雄介, 細川桂一, 福田青郎, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 藤原伸介 アーキアリボソームの超分子構造と遺伝子の発現動態 2010 年度日本農芸化学会, 2010 年 3 月 29 日 東京大学駒場キャンパス

- ④ 山下敬太, 福田青郎, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 藤原伸介. 超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* の水素・硫化水素発生を調節する転写因子の機能解析 2010 年度日本農芸化学会, 2010 年 3 月 29 日 東京大学駒場キャンパス
- ⑤ 益田剛明, 森本奈菜子, 中島七海, 福田青郎, 大島泰郎, 今中忠行, 藤原伸介. 超好熱菌における長鎖・分岐型ポリアミン合成に関する研究 第 82 回日本生化学会 2009 年 10 月 23 日 神戸国際会議場
- ⑥ 橋本雄介, 青木俊, 田口文子, 福田青郎, 池上大二郎, 金井保, 今中忠行, 細川桂一, 藤原伸介. アーキアとバクテリアのリボソーム超分子構造の比較 第 82 回日本生化学会, 2009 年 10 月 23 日 神戸国際会議場
- ⑦ 高楽, 団野篤史, 福田青郎, 今中忠行, 藤原伸介. Cold inducible chaperonin in *Thermococcus kodakaraensis* traps indole-3-glycerol-phosphate synthase as a specific substrate. 第 82 回日本生化学会 2009 年 10 月 23 日 神戸国際会議場
- ⑧ 福田青郎, 瀬尾博之, 中下裕太, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 藤原伸介. 超好熱菌における栄養環境変化が遺伝子発現に及ぼす影響 2009 年度日本農芸化学会 2009 年 3 月 29 日 福岡国際会議場
- ⑨ 瀬尾博之, 福田青郎, 中下裕太, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 藤原伸介. 超好熱菌遺伝子の生育段階に依存した発現動態解析 第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会 2008 年 12 月 9 日 神戸国際会議場
- ⑩ 吉岡幸, 福田青郎, 今中忠行, 藤原伸介. 超好熱菌の高温誘導型遺伝子 Tip49 ホモログの機能解析 第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会 2008 年 12 月 9 日 神戸国際会議場
- ⑪ 島田陽子, 福田青郎, 赤田庸平, 東端啓貴, 田中丈士, 今中忠行, 藤原伸介. 超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来低温誘導型 DEAD-box タンパク質に関する研究. 第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会 2008 年 12 月 12 日 神戸国際会議場

- ⑫ 団野篤史, 安藝良平, 福田青郎, 今中忠行, 藤原伸介. 超好熱菌の低温誘導型 シャペロニン・誘導機構及び生理的意義. 第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会 2008 年 12 月 9 日) 神戸国際会議場

〔図書〕(計 1 件)

岸本通雅, 堀内淳一, 藤原伸介. 三共出版 新生物化学工学 (2008) 総ページ数 149 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: 変異型逆転写 DNA ポリメラーゼ  
 発明者: 藤原伸介, 佐野 創太郎  
 権利者: 学校法人 関西学院  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2008-276613  
 出願年月日: 2008 年 10 月 28 日  
 国内外の別: 国内

名称: 変異型逆転写 DNA ポリメラーゼ  
 発明者: 藤原伸介, 佐野 創太郎  
 権利者: 学校法人 関西学院  
 種類: 特許  
 番号: PCT/JP2009/68289  
 出願年月日: 2009 年 10 月 23 日  
 国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ:  
<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~fujiwara/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤原 伸介 (FUJIWARA SHINSUKE)  
 関西学院大学・理工学部・教授  
 研究者番号: 90263219

### (3) 連携研究者

今中 忠行 (IMANAKA TADAYUKI)  
 立命館大学・生命科学部・教授  
 研究者番号: 30029219

跡見 晴幸 (ATOMI HARUYUKI)  
 京都大学・工学研究科・教授  
 研究者番号: 90243047