

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05729

研究課題名（和文）遺伝子発現とアミノ酸動態の解析によるD-アミノ酸誘導性タンパク質発現の解明

研究課題名（英文）Elucidation of D-amino acid-induced protein expression by analyses of gene expression and amino acid dynamics

研究代表者

川上 竜巳（KAWAKAMI, Ryushi）

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（生物資源産業学域）・准教授

研究者番号：90380120

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、遺伝子発現解析やEMSA解析、エックス線結晶構造解析などを用いて、超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* OT3におけるアミノ酸ラセマーゼ（BAR）の発現誘導メカニズムの解明を試み、D-アミノ酸が転写因子と結合することで遺伝子発現を制御していることを見出した。このことはD-アミノ酸がアーキアにおいて生理活性物質として機能することを示す初めての成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で、超好熱アーキアがD-アミノ酸を生理機能物質として利用していることを初めて明らかにした。D-アミノ酸の生体内における生理機能はヒトなどの高等生物やバクテリアにおいても知られており、アーキアの中でも共通祖先に近いとされる超好熱アーキアでのD-アミノ酸機能の発見は進化の観点からも興味深い。今後のD-アミノ酸研究の新たな基盤づくりに貢献できたと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to elucidate the expression mechanism of amino acid racemase (BAR) in the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus horikoshii* OT3 using gene expression analysis, EMSA analysis, and X-ray crystallographic analysis. It was found that the gene expression was controlled by transcription factor protein interacting with D-amino acid. This is the first observation that D-amino acids function as physiologically active substances in archaea.

研究分野：微生物酵素学

キーワード：遺伝子発現 D-アミノ酸 転写因子 超好熱アーキア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

D-アミノ酸に生体内での生理機能はないと長らく考えられていたが、多くの生物にその存在が認められるとともに、多様な生体反応に関与していることが最近の研究で分かってきた。主な研究対象は哺乳類などの高等生物や発酵微生物、腸内細菌であり、進化的にも最古の生物と言われているアーキアにおける D-アミノ酸研究は少なく、生理機能に関する報告はなされていなかった。

研究代表者は超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* OT3 に複数の D-アミノ酸を資化する能力があることを見出すとともに、その資化に関与する酵素として低基質特異性アミノ酸ラセマーゼ (BAR) を見出した[1,2]。さらにこの酵素活性は D-allo-Ile を用いて培養することによって発現誘導されていることも明らかにしていた。

また、BAR と高い相同性を示す 3 種類の遺伝子 (PH0782、PH1423、PH1501) を見出しており、PH0782 と PH1501 については、BAR と異なる基質特異性を有するアミノ酸ラセマーゼであることを明らかにしていた[3]。

2. 研究の目的

複数のアーキアにおいて、菌体内に遊離 D-アミノ酸が存在することや D-アミノ酸脱水素酵素やラセマーゼのような D-アミノ酸代謝酵素が存在することが報告されていたが、それらの D-アミノ酸や酵素がどのような生理機能に関与しているのはわかっていない。今回見出した *P. horikoshii* における D-アミノ酸培養による BAR の発現誘導は、D-アミノ酸が生理機能物質として生体反応に関与していることを強く示唆している。この発現誘導メカニズムを解析し、アーキアにおける D-アミノ酸の生理機能の一端を明らかにするとともに、BAR ホモログの機能と構造の詳細を明らかにすることを目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) *P. horikoshii* の培養及び粗酵素液の調製と BAR 活性の測定

P. horikoshii は各種アミノ酸の混合物、NaCl、ビタミン類、微量元素、イオウを含む合成培地を用いて 90 24 時間培養し、遠心分離で菌体を回収した。粗酵素液は菌体懸濁液を超音波破碎したあと遠心分離して調製した。BAR 活性は、L-Met を基質として、酵素反応によって生じた D-Met を、D-アミノ酸オキシダーゼとペルオキシダーゼによって定量する方法を用いて行った。

(2) Total RNA の抽出と RNAseq 解析及び RT-qPCR 解析

Total RNA の抽出、Total RNA からの rRNA の除去は、cDNA 合成は各種キットを用いて行った。RNAseq 解析は rRNA を除去した精製 RNA を調製し、ファスマック社に外注した。qPCR 用プライマーは Primer Blast を用いて設計し、合成した cDNA をテンプレートとして、LineGene を用いて行った。遺伝子発現量は CT 法を用いた相対定量法により解析した。

(3) EMSA 解析

転写因子タンパク質、プローブ DNA、アミノ酸を混合して 80 15 分熱処理したサンプルを 5% ポリアクリルアミドゲルにアプライして、電気泳動した。EtBr 溶液に浸して DNA を染色し、ゲルシフトの様子を観察した。

(4) 組換え酵素の大腸菌発現

機能解析や構造解析に用いる酵素は大腸菌で組換え発現させて調製した。*P. horikoshii* のゲノム DNA をテンプレートとして目的遺伝子を増幅し、pET ベクターに導入して発現ネクターを調製した。大腸菌株として BL21(DE3) コドンプラス株やシャペロン共発現システムを用いて、酵素を発現させた。発現させた酵素は熱処理やヒスタグカラムなどを用いて精製し、サンプルとした。

(5) エックス線結晶構造解析

大腸菌で組換え発現させた酵素・タンパク質を濃縮して、結晶化条件のスクリーニングと最適化を行った。高エネルギー加速器研究所のビームラインを用いて、得られた結晶の回折実験を行い、収集したデータは各種プログラムを用いて、結晶学的パラメータの解析、位相の決定、最適化などを行った。

4. 研究成果

(1) 培養条件と粗酵素液中の BAR 活性および遺伝子発現

これまでに、L-Ile を D-allo-Ile に置換した培養条件で BAR 活性が増大することが分かっている。より詳細な誘導条件を検討し、活性は D-allo-Ile 添加後 12 時間は増大し続けていること、D-allo-Ile と L-Ile の混合条件では L-Ile 濃度依存的に活性の増大が抑制されることを明らかにした。

D-allo-Ile 添加条件での RNAseq 解析や qPCR 解析の結果、BAR 遺伝子 (PH0138) だけでなく、膜タンパク質遺伝子をコードする PH0137 も同様に発現することがわかった。これらの遺伝子は転写因子タンパク質をコードする PH0140 と遺伝子クラスターを形成しているが、PH0140 の遺伝子発現は増大しなかった。酵素活性の測定で明らかにした誘導条件と遺伝子発現解析の結果には相関性があることも確認できた(図 1)。

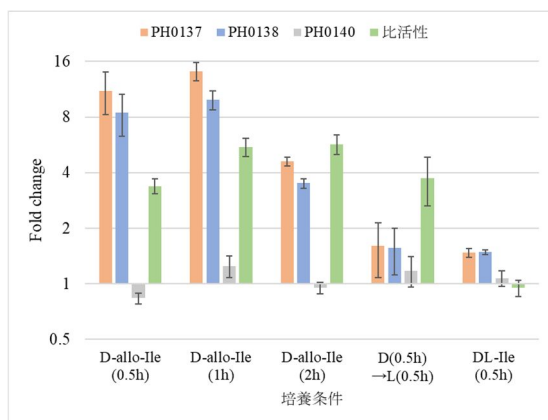


図 1 各種培養条件における遺伝子発現解析と BAR 活性の解析

(2) 転写因子をコードする PH0140 の EMSA 解析

転写因子をコードする PH0140 が BAR 遺伝子と PH0137 遺伝子の発現に関与することを明らかにするため、ゲルシフトアッセイを行った結果、この転写因子は L-Ile 存在下で PH0137 DNA プロープと結合し、D-allo-Ile 存在下では解離することが分かった。さらに、様々なアミノ酸を用いて解析を行った結果、相互作用する力は弱いものの、L-Leu や L-Val、L-Met などの存在下で DNA プロープと結合し、その D-アミノ酸存在下では解離した(図 2)。

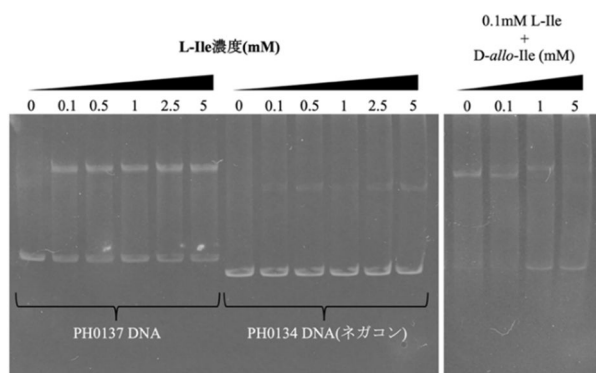


図 2 DL-Ile 存在下での転写因子と DNA プロープとの結合解析

(3) エックス線結晶構造解析

1.4 の分解能で明らかにした転写因子の構造は、饗宴・飢餓応答タンパク質 (FFRP) と呼ばれる転写因子と非常によく似ていることが分かった(図 3)。また、その構造中には、特段の処理をしていないにもかかわらず、L-Ile が結合していた。D-allo-Ile と結合した転写因子の結晶構造解析にも成功し(2.4)、両者を比較した結果、L-Ile 結合型の DNA 結合ドメインが、D-allo-Ile 結合型よりも開いていることが分かった。

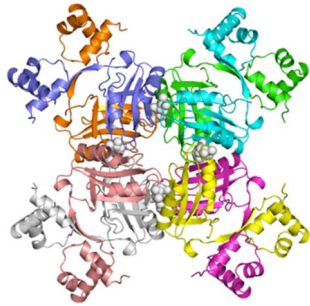


図3 転写因子の結晶構造

(4) BAR 遺伝子クラスターの発現誘導メカニズム

これまでの解析を基に、遺伝子発現のメカニズムを推定した。通常の培養条件(L-Ile 存在下)では、転写因子はL-Ile 結合型となっており、PH0137 プロモーター領域と結合して転写を抑制する。L-Ile 非存在下でD-allo-Ile 培養すると、転写因子は取り込まれたD-allo-Ile と結合してDNA結合活性を失い、PH0137-PH0138 両遺伝子の転写が促進される。現在のところ、PH0137 がコードする膜タンパク質はアミノ酸トランスポーターと推定しており、両遺伝子の発現誘導はD-allo-Ile の取り込みとL-Ile への変換を促進する。これらのことから、このシステムはL-アミノ酸欠乏環境でD-アミノ酸を取り込むことにより生きながらえるための生存戦略として機能しているのではないかと推定している。

(5) BAR ホモログの機能と構造の解析

機能を同定できていなかったPH1423について、活性の解析を行った結果、オルニチンアミノトランスフェラーゼであることを見出し、その酵素化学的機能解析とエックス線結晶構造解析を行った(図4)。この成果は本助成の成果として、論文発表した。

PH1501 がコードするアミノ酸ラセマーゼについては、組換え酵素の調製が難航したため、*Thermococcus litoralis*のホモログ酵素であるOCC10945を対象として解析を行い、BARやASRとも異なる基質特性を示すアミノ酸ラセマーゼであることを明らかにし、MARと名付けた。この成果は本助成の成果として、論文発表した。

*P. horikoshii*由来のBARとASR、*P. furiosus*のMARについて、エックス線結晶構造解析に取り組み、それぞれ1.6、2.0、1.6の分解能で構造を明らかにすることができた(図4)。

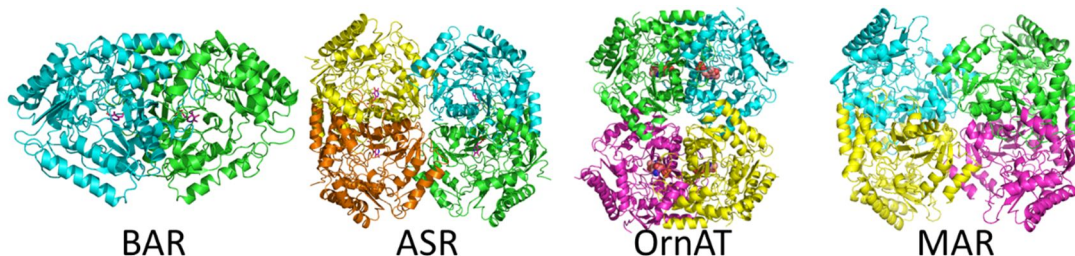


図4 各酵素の結晶構造

参考文献

- [1] Ryushi Kawakami, Taketo Ohmori, Haruhiko Sakuraba, Toshihisa Ohshima, Identification of a novel amino acid racemase from a hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT-3 induced by D-amino acids, 2015, *Amino acids*, 47(8):1579-87.
- [2] Ryushi Kawakami, Taketo Ohmori, Haruhiko Sakuraba, Toshihisa Ohshima, First characterization of an archaeal amino acid racemase with broad substrate specificity from the hyperthermophile *Pyrococcus horikoshii* OT-3, 2017, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124:23-27.
- [3] Ryushi Kawakami, Tatsuya Ohshida, Haruhiko Sakuraba, Toshihisa Ohshima, A novel PLP-dependent Alanine/Serine racemase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT-3, 2018, *Frontiers in Microbiology*, DOI: 10.3389/fmicb.2018.01481.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryushi Kawakami, Tatsuya Ohshida, Junji Hayashi, Kazunari Yoneda, Toshio Furumoto, Toshihisa Ohshima, Haruhiko Sakuraba	4. 巻 208
2. 論文標題 Crystal structure of a novel type of ornithine -aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon <i>Pyrococcus horikoshii</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 731-740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawakami Ryushi, Kinoshita Chinatsu, Kawase Tomoki, Sato Mikio, Hayashi Junji, Sakuraba Haruhiko, Ohshima Toshihisa	4. 巻 85
2. 論文標題 Characterization of a novel moderate-substrate specificity amino acid racemase from the hyperthermophilic archaeon <i>Thermococcus litoralis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1650 ~ 1657
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川上竜巳、河瀬智紀、上原太良、櫻庭春彦、大島敏久
2. 発表標題 PHO140転写因子によるアミノ酸ラセマーゼ遺伝子クラスターの発現制御
3. 学会等名 極限環境生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河瀬智紀、佐藤樹夫、川上竜巳
2. 発表標題 超好熱アーキア <i>Pyrococcus horikoshii</i> のD-アミノ酸培養における遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤樹夫、河瀬智紀、川上竜巳
2. 発表標題 放線菌 Rhodococcus opacus B4株由来 L-アミノ酸オキシダーゼの大腸菌発現と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上竜巳、河瀬智紀、佐藤樹夫、櫻庭春彦、大島敏久
2. 発表標題 超好熱アーキア Pyrococcus horikoshii におけるL-Ile/D-allo-Ileによるアミノ酸ラセマーゼ遺伝子の発現制御
3. 学会等名 極限環境生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------