

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25年 6月 6日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22550151

研究課題名（和文） 遺伝子制御ネットワークに着目した超好熱菌からの有用遺伝子探索

研究課題名（英文） Identification of valuable genes from a hyperthermophile by focusing attention on its transcriptional regulation network

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

研究成果の概要（和文）：

好熱菌が産生するタンパク質は、化学反応が加速される高温環境で機能することから、産業応用に適したバイオマテリアルの供給源として期待されている。本研究では超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の転写制御ネットワークに着目して、機能未知遺伝子の機能解析を行った。その結果、マルトオリゴ糖に対して加水分解活性を示す、新規糖質加水分解酵素を発見した。

研究成果の概要（英文）：

Proteins from thermophiles are expected as a source of excellent biomaterials that can function under high temperature conditions, where chemical reactions are accelerated. This study deals with functional analysis on hypothetical genes of the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*, with focusing attention on its transcriptional regulation network. As a result, a new sugar-degrading enzyme was identified that can hydrolyze maltooligosaccharides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生化学、分子生物学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：超好熱菌、アーキア、有用遺伝子、転写制御因子、EMSA、マイクロアレイ解析

1. 研究開始当初の背景

(超)好熱菌が産生するタンパク質(酵素)は、化学反応が加速される高温環境で機能するという特徴のほか、長期間の保存安定性や、高い有機溶媒耐性も期待されることから、産

業応用に適したバイオマテリアルとして盛んに研究が行われている。

好熱菌の中でも、特に90℃以上で生育可能なグループを超好熱菌と呼び、その大多数はアーキア(Archaea)に属する。既に20種以上の

超好熱性アーキアのゲノム解析が完了しており、一次構造から機能推定が可能な遺伝子（アミラーゼ、プロテアーゼなど）については、応用に向けた研究が広く進んでいる。一方で、全 ORF の半分近くを占める機能未知遺伝子については、有用な遺伝子の存在は確実視されるもののこれまでのところ研究がほとんど進められていない。

2. 研究の目的

本研究では、共通の転写制御因子の支配下にある遺伝子群 (regulon) の確定による、遺伝子制御ネットワークの解明を通じて、超好熱菌から優れたバイオマテリアルとなりうる新規遺伝子を探索することを目的としている。

3. 研究の方法

研究代表者はこれまでに、主に超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を対象とした研究を進めてきた。本菌は全ゲノム解析が完了しており、さらには超好熱菌では数少ない実用的な遺伝子組換え系が存在するという特徴をもつ。

本研究では *T. kodakarensis* の遺伝子制御ネットワークに着目し、特定の転写調節因子により制御される regulon の解明を通じて、本菌ゲノム内の有用遺伝子の探索を行う。本研究では主に α 多糖代謝関連 regulon である Tgr regulon 中の機能未知遺伝子を候補として、特に本菌で未発見となっている debranching enzyme の同定を目指す。高度な耐熱性を有しかつ高い α -1,6 結合特異的加水分解活性を有する debranching enzyme はこれまでに知られておらず、そのような特性を有する酵素を得ることができれば産業上のメリットは大きいためである。

4. 研究成果

α 多糖代謝関連 regulon 群

タンパク質発現用ベクター pET21a(+) に TK1136 遺伝子配列を挿入後、これを用いて大腸菌 BL21 (DE3) CodonPlus RIL 株を形質転換し、TK1136 タンパク質を大量発現させた。菌体破砕液を 80°C での熱処理を行った。熱処理後の上清を陰イオン交換カラム (HiTrap Q)、疎水性相互作用カラム (Resource PHE)、ゲルろ過カラム (Superdex 200) により TK1136 タンパク質を精製した。精製した TK1136 タンパク質を様々な α -glucan やその誘導体など 40 種類の基質と反応させ、その糖加水分解活性・糖転移活性を吸光測定や TLC 解析で観察した (Fig. 1)。しかしながら、debranching enzyme 活性を含め、これまでに明確な酵素活

性を確認できていない。

続いて TK1136 遺伝子破壊株を作製した。作成した遺伝子破壊ベクターを用いて、*T. kodakarensis* KUW1 株を形質転換し、ウラシル非要求性を指標として、シングルクロスオーバー相同組換え株を単離した。その後、5-フルオロオロチン酸耐性を指標とした単離により、*pyrF* マーカー脱離して本 ORF のみがゲノムより除去された遺伝子破壊株を得た。この遺伝子破壊株の生育が培地中に含まれる炭素源により異なるかを調べるために、基本培地 (人工海水塩に酵母エキスとトリプトンを添加) にピルビン酸ナトリウムを添加した培地 (ASW-YT-Pyr 培地) と、基本培地にマルトデキストリンを添加した培地 (ASW-YT-Mdx 培地) でそれぞれ生育測定を行った。その結果、TK1136 破壊株はどちらの条件でも宿主株と同様に生育し、明確な差は観察されなかった。

α -glucan基質			PNP基質		
Glucose (G1)	Maltose (G2)	Maltotriose (G3)	PNP- α -D-Glu	PNP- α -D-G2	PNP- α -D-G4
Maltotetraose (G4)	Maltopentaose (G5)	Maltohexaose (G6)	PNP- α -D-G5	PNP- α -D-G6	PNP- β -D-Glu
Maltoheptaose (G7)	Glycogen (from Oyster) (Gly(O))	Glycogen (from rabbit liver) (Gly(R))	PNP- β -D-G2	CNP- α -D-G5	PNP- α -D-Gal
Pullulan	α -Cyclodextrin (α -CD)	γ -Cyclodextrin (γ -CD)	PNP- β -D-Gal	PNP- α -D-Man	PNP- β -D-Man
Amycol No. 3L	可溶性でんぷん	アミロースA (MW = 2900)	PNP- α -D-GlcNAc	PNP- β -D-GlcNAc	PNP- α -L-Ara
アミロースB (MW = 15000)	アミロースAS-30 (MW = 30000)	アミロースAS-330 (MW = 320000)	PNP- α -L-Fuc	PNP- β -D-Fuc	PNP- β -D-GlcA
			PNP- β -D-Lac	PNP- β -D-Rib	PNP- α -D-Xyl
			PNP- β -D-Xyl		

PNP: p-Nitrophenyl	G6: maltohexaoside	GlcA: glucuronide
CNP: 2-Chloro-4-nitrophenyl	Gal: galactopyranoside	Lac: lactopyranoside
Glu: glucopyranoside	Man: mannopyranoside	Rib: ribofuranoside
G2: mannoside	GlcNAc: N-acetyl-glucosaminide	Xyl: xylopyranoside
G4: maltotetraoside	Ara: arabinofuranoside	
G5: maltopentaoside	Fuc: fucopyranoside	

Fig.1 活性測定に用いた基質

TK1743 についても、TK1136 の場合と同様の方法で発現・精製を行った。精製した TK1743 タンパク質を様々なマルトオリゴ糖と反応させ、その糖加水分解活性・糖転移活性を TLC 解析により観察した。その結果、TK1743 はマルトトリオースより長いマルトオリゴ糖に対して加水分解活性をもつことが判明した。本酵素の反応至適温度は 80~90°C であり、反応至適 pH は 5.5 付近であった。パラニトロフェノール (pNP) 基を還元末端側にもつマルトオリゴ糖基質を用いた反応の結果、TK1743 は非還元末端から 2 つめの α グリコシド結合を切断して、マルトースを遊離することが判明した。

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 5 件)

1. Tagashira K, W. Fukuda, M. Matsubara, T. Kanai, H. Atomi, and T. Imanaka, "Genetic studies on the virus-like regions in the genome of hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*", **Extremophiles**, 査読有, vol.17, 153-160, 2013. (DOI:10.1007/s00792-012-0504-6)
2. Cubonova, L., M. Katano, T. Kanai, H. Atomi, J. N. Reeve, and T. J. Santangelo, "An archaeal histone is required for transformation of *Thermococcus kodakarensis*." **J. Bacteriol.**, 査読有, vol.194, 6864-6874, 2012. (DOI:10.1128/JB.01523-12)
3. Kanai, T., R. Matsuoka, H. Beppu, A. Nakajima, Y. Okada, H. Atomi, and T. Imanaka. "Distinct physiological roles of the three [NiFe]-hydrogenase orthologs in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*." **J. Bacteriol.** 査読有, vol.193, 3109-3116, 2011. (DOI: 10.1128/JB.01072-10)
4. Santos, C.R., C.C. Tonoli, D.M. Trindade, C. Betzel, H. Takata, T. Kuriki, T. Kanai, T. Imanaka, R.K. Arni, and M.T. Murakami, "Structural basis for branching-enzyme activity of glycoside hydrolase family 57: structure and stability studies of a novel branching enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1", **Proteins** 査読有, vol.79, 547-557, 2011. (DOI:10.1002/prot.22902)
5. Atomi, H., Sato, T., Kanai, T. "Application of hyperthermophiles and their enzymes" **Cur. Opi. Biotech.** 査読有, vol.22, 618-626, 2011. (DOI: 10.1016/j.copbio.2011.06.010.)

[学会発表] (計 10 件)

1. 金井保, 武富尚吾, 小谷徹, 釜下知之, 中之庄正弘, 今中忠行, 跡見晴幸, "超好熱性アーキアの環境適応に関わる転写調節因子の解析", 日本農芸化学会, 2013年3月27日東北大学川内キャンパス(招待講演)
2. 金井保, 小谷徹, 釜下知之, 今中忠行, 跡見晴幸, "超好熱性アーキアにおける熱ショック応答転写制御因子の機能解析", 日本生物工学会, 2012年10月22日, 神戸国際会議場
3. 山本康之, 金井保, 跡見晴幸, "超好熱性ア

ーキア *Thermococcus kodakarensis* ゲノムからの新規転写制御因子の同定", 日本生物工学会, 2012年10月22日, 神戸国際会議場

4. 小谷徹, 金井保, 跡見晴幸, "超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における糖代謝関連転写制御因子 Tgr の機能解析", 極限環境生物学会, 2011年11月27日, 長崎大学坂本キャンパス良順会館

5. 山本康之, 金井保, 跡見晴幸, "超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* のゲノム配列からの新規転写制御因子の同定", 極限環境生物学会, 2011年11月27日, 長崎大学坂本キャンパス良順会館

6. 李瑞賢, 金井保, 跡見晴幸 "Elucidation of the functions of the ArsR transcription regulators in *Thermococcus kodakarensis*" 極限環境生物学会, 2011年11月27日, 長崎大学坂本キャンパス良順会館

7. T. Kanai, R. Matsuoka, H. Beppu, A. Nakajima, Y. Okada, H. Atomi, T. Imanaka "Distinct physiological roles of the three [NiFe]-hydrogenase orthologs in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*", 2011 Sep. 13th., Thermophiles2011, Yellow Stone, USA

8. 金井保, 武富尚吾, 村上平, 中之庄正弘, 藤原伸介, 跡見晴幸, 今中忠行, "超好熱性アーキアのトランスクリプトーム解析", 京都大学微生物科学寄附研究部門主催シンポジウム, 2011年6月23日, 京都大学芝蘭会館稲盛ホール

9. T. Kanai, T. Kamashita, H. Atomi, T. Imanaka "Regulation mechanism of archaeal heat shock regulator" Extremophiles2010, 2010 Sep. 14th., Azores, Portugal

10. T. Kanai, S. Takedomi, T. Kamashita, M. Nakanosho, S. Fujiwara, H. Atomi, T. Imanaka, "Transcriptome Analysis on a Heat Shock Regulon in the Hyperthermophilic Archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*", International Meeting of the Microbiological Society of Korea, 2010 May 7, Hanwha Resort hotel, Uljin, Korea (Invited)

[図書] (計 1 件)

1. T. Kanai and H. Atomi, Wiley-VCH, "Enzymes from thermophilic organisms." **Protein Engineering Handbook**, 2013, vol.3 chap.7, 145-162.

[その他]
ホームページ等
<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/atomi-lab/>

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