

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25660056

研究課題名(和文)古細菌(始原菌)におけるグリセロール代謝の網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of glycerol metabolism in archaea

研究代表者

古賀 雄一 (Koga, Yuichi)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30379119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは超好熱古細菌(始原菌) *Thermococcus kodakarensis* KOD1株において、Glycerol代謝経路が極めて単純化されており、且つ大腸菌などで知られている中央代謝系からの制御機構が働かないことを見出した。Glycerolの代謝に係る複数の遺伝子について遺伝子破壊株の生育試験、菌体内での発現状況を調査し、さらにそれぞれの遺伝子産物の生化学的な特性解析の結果、本菌においてGlycerolは炭素源として利用されるよりも、むしろ、酸素ストレス、塩濃度ストレスなど生育環境に適応するために活用されている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Recently, we have found that the glycerol metabolic pathway of a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis* KOD1, is quite simple to compare with those of other organisms. Also the regulation of the glycerol metabolism was found to be independent from the central metabolic pathway. Through the cultivation test of deletion mutant of three genes of glycerol metabolism and the further biochemical analysis of each product of those genes, glycerol is not used as the carbon source but used for cell adaptation to oxygen stress and osmotic stress in *T. kodakarensis* KOD1.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：古細菌 超好熱菌 始原菌 グリセロール代謝

1. 研究開始当初の背景

一般的に生物は Glucose (C6 化合物)を最適な炭素源として代謝しているが、その代謝経路で C6 化合物は 2 分子の C3 化合物 (DHAP,GAP)となって、さらなる高エネルギーC3 化合物へと変換されていく。解糖系中間代謝物である DHAP は、Glycerol から 2 段階の反応で生成することができるが、解糖系からの抑制的調節を受けるため、Glycerol を出発物質とする C3 異化代謝経路は常時機能しているわけではないと考えられる。申請者らは超好熱古細菌(始原菌)において、Glycerol 代謝経路が極めて単純化されており、且つ大腸菌などで知られている中央代謝系からの制御機構が働かない可能性を見出し、本菌独自の代謝経路を形成している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、*Thermococcus kodakarensis* の Glycerol 代謝系が、古細菌(始原菌)型の新しい代謝経路であることを示し、古細菌の glycerol 代謝関連遺伝子および、そのコードするタンパク質が持つ特異的な特性を明らかにすることで、古細菌(始原菌)における glycerol 代謝系遺伝子の生理的役割について新しい知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

T.kodakarensis の glycerol 代謝経路が果たす役割と代謝の特性と明らかにするために、すでに存在が明らかになっている Glycerol 代謝関連遺伝子 (*glpA*, *glpK*, *glpQ*) について、以下の4点の研究を行った。

「*T.kodakarensis* の glycerol 代謝関連遺伝子破壊株作成。」*T.kodakarensis* のゲノム情報から既知の glycerol 代謝関連 4 遺伝子 (*glpA*, *glpK*, *glpQ* 2 種)を同定し、相同組換え法によって、*T.kodakarensis* 遺伝子破壊株を作成した。

「C3 化合物存在下での生育試験。」遺伝子破壊株を用いて、C3 化合物 (Glycerol, G3P) などを用いた嫌気条件下での培養試験を行った。各遺伝子欠損株の生育曲線を作成し、比増殖速度、最終到達 OD を記録した。

「glycerol 代謝関連遺伝子群の発現量測定。」*T.kodakarensis* の培養菌体から RNA を抽出し、glycerol 代謝関連遺伝子群の定量的 real time PCR を行った。培地中に含まれる C3 化合物の種類、嫌気条件、培養時間を変えて菌体をサンプリングし、各条件下での遺伝子の発現量の変化をモニターすることにより、の成長曲線に見られる特徴との関連付けを行った。

「glycerol 代謝関連酵素の構造、機能特性の解析。」*T.kodakarensis* の *glpA* にコードされている G3P dehydrogenase、*glpQ* にコードされている glycerophosphoryldiester phosphodiesterase (GPD)を大腸菌で組換え発現し、生化学的特性解析、構造学的解析(X

線結晶構造解析、会合状態解析)を行った。

4. 研究成果

「*T.kodakarensis* の glycerol 代謝関連遺伝子破壊株作成。」

Glycerol 代謝関連遺伝子 (*glpA*, *glpK*, *glpQ*) について、遺伝子破壊株を作成し、ゲノム上から当該遺伝子が欠損していることを確認した。

「C3 化合物存在下での生育試験。」

T. kodakarensis 培養標準培地に Glycerol, glycerol-3-phosphate(G3P), glycerol-3-phosphatephosphodiester (G3POR)をそれぞれ添加し、Tk-*glpA* 欠損株、Tk-*glpK* 欠損株、Tk-*glpQ* 欠損株の生育の経時変化を追ったところ、Tk-*glpQ* 欠損株(Fig.1)、Tk-*glpK* 欠損株(data not shown)において明確な成長の差は認められなかった。*T. kodakarensis* は生育することができず、エネルギー源として Glycerol, または G3POR を資化していないことが示唆された。

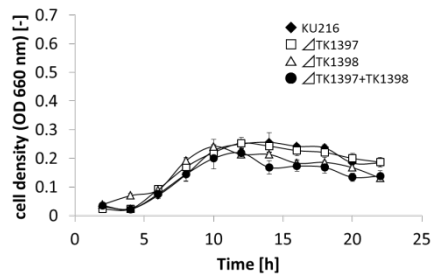


Fig.1 G3POR 存在下での Tk-*glpQ* 欠損株の成長曲線

一方、Tk-*glpA* 欠損株においては G3P 添加時の成長促進が抑制されることが示されており、G3P の代謝に本遺伝子が関連していることが示された。(Fig.2)

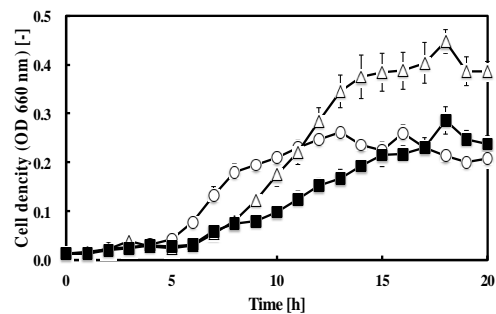


Fig.2 *glpA* 欠損株、野生株の成長曲線

この結果から Tk-GlpA が *T. kodakarensis* においてただひとつの G3P dehydrogenase であることが明らかとなった。*E. coli* は G3P dehydrogenase を 3 種類保持しているのに対し、*T. kodakarensis* は 1 つしか保持していないことから *T. kodakarensis* は簡素な経路を有していると考えられる。また、*T.*

*kodakarensis*がG3PをTk-GlpAを介してエネルギー源として利用していると考えられる。G3Pは細菌や真核生物の脂質二重膜の骨格成分である。古細菌である*T. kodakarensis*の同骨格はG1Pであり、Tk-GlpAが自身の膜の再利用と働いているのではなく菌体外からエネルギー源としてG3Pを取り込んでいると考えられる。

「glycerol 代謝関連遺伝子群の発現量測定。」

glpA, *glpK*, *glpQ* いずれの遺伝子についても real-time PCR を行ったが、発現量に明確な差は得られておらず、構造遺伝子として発言していることが確認された。

Tk-*glpK*(TK1396), Tk-*glpQ* (TK1397, TK1398) はゲノム上で近接していることから、オペロンを形成している可能性が考えられる。そこで TK1396, TK1397, TK1398 の各 ORF にまたがるようにプライマーを設計し、*T. kodakarensis* から抽出した mRNA を逆転写し、得られた cDNA を鋳型に PCR を行った。その結果、TK1396, TK1397 間と TK1397, TK1398 間の増幅を確認した。また、TK1397, TK1398 のクローニング時に用いたプライマーで PCR を行ったところ、同様に増幅が確認されたことから菌体内での Tk-GDPD1, Tk-GDPD2 の発現を確認した。TK1397 と TK1398 は隣接する TK1396 とオペロンを形成しており、一続きに転写されていることが明らかになった。TK1396 がコードするグリセロールキナーゼはグリセロールを G3P へ変換する酵素である。つまり、これらの遺伝子は G3P を生成する酵素をコードする遺伝子として機能的に相関があることが示唆された。

Tk-*glpA* がオペロンを形成している候補として TK1391, TK 1392 および TK 1394 を選び、各 ORF にまたがるようにプライマーを設計し、オペロン解析を行った (Fig. 3)。この結果、TK1393-TK1392, TK1392-TK1391 の ORF 間のみ増幅が確認された。このことから、Tk-*glpA* は下流の TK 1392 および TK1391 とオペロンを形成していることが明らかになった。

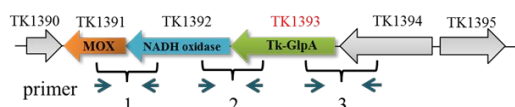


Fig.3 TK1393 周辺オペロン構造

NCBI に登録されている遺伝子情報によると、TK 1392 は NADH オキシダーゼ (NOX)、TK1391 はモリブドプテリン依存型酸化還元酵素の 4Fe-4S クラスター結合サブユニット (MOX) としてアノテーションされていた。TK1392 はすでにクローニングおよび特性解析が成されており、FAD を補

因子として単独で NADH オキシダーゼ活性を有するということが報告されている [Rashid *et al.*, 2011]。TK1391 がコードする MOX は鉄硫黄クラスター結合部位があると言われており、酸化還元に関わると推測される。

「glycerol 代謝関連酵素の構造、機能特性の解析。」

Tk-GDPD1 については大腸菌を用いて発現、精製し、その後諸特性解析を行った。Tk-GDPD1 は様々な G3POR に対して GDPD 活性を示し、その至適温度は 80、至適 pH は 7.5 であった。

Tk-GDPD1 の結晶化および構造解析を行った。この結晶を用いて X 線結晶構造解析を行い、分解能 2.0 の X 線回折データを得た。空間群は P 21 21 21 に属し、格子定数は a = 43.72, b = 132.03, c = 171.64 であった (Fig.4)。

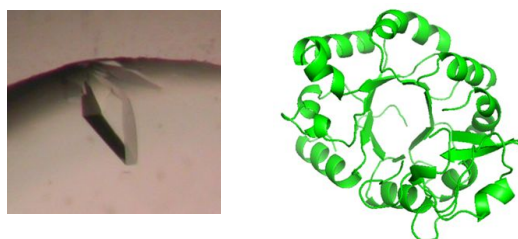


Fig.4 Tk-GDPD1 の結晶 (左) と立体構造 (右) (PDB ID : 4OEC)

好熱古細菌の一種である *Archaeoglobus fulgidus* では塩ストレスにตอบสนองして適合溶質という細胞内物質を蓄積することが知られている。これらの適合溶質は、G3POR の一種である GPI や GDP として合成される。*T. kodakarensis* においては、GDPD がその分解を担っている可能性がある。そこで、塩濃度の異なる培地で *T. kodakarensis* を培養し、その細胞抽出液の GDPD 活性を比較した。その結果、塩濃度が高い条件で培養した細胞抽出液では GDPD 活性が減少することが明らかになった (Fig.5)。このことから、*T. kodakarensis* においても塩ストレスに対して GPI や GPG のような G3POR が蓄積され、それを分解する GDPD の発現が抑制されていると考えられる。

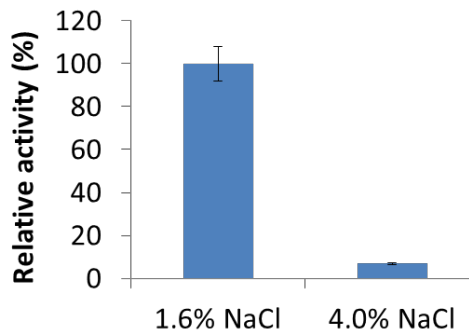


Fig. 5 GDPD activity of *T. kodakarensis*

これまでの研究では、GDPD は真正細菌や真核生物において膜リン脂質を分解し、炭素源として再利用する役割があると考えられていたが、古細菌の一種である *T. kodakarensis* においては塩ストレスにตอบสนองして GPI や GPG などの適合溶質の蓄積量を制御するという新たな役割があることが示唆された。

オペロンを形成する遺伝子群はしばしばタンパク質レベルで複合体を形成して機能している。実際、*Ec-glpA* は *Ec-glpBC* とオペロンを形成して一続きで転写・翻訳された後、ヘテロ 3 量体の複合体を形成して機能している。このことから、*Tk-glpA* オペロンも複合体を作っている可能性が考えられた。そのため第 2 章では、*Tk-glpA* オペロンの構成要素である 3 つのタンパク質を組換え体として発現させ、複合体解析を行った。

精製したタンパク質を用いてゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる複合体解析を行った。各タンパク質を混合して、HPLC のゲル濾過カラムに供した。MOX、NOX、Tk-GlpA を単独で、MOX + NOX、NOX + Tk-GlpA、MOX + Tk-GlpA と 2 つずつ混合したもの、そして MOX + NOX + Tk-GlpA の 3 つを混合したものの全 7 通りの溶出位置を確認した (Fig. 6)。更にこれらのフラクションを分取し SDS-PAGE による解析を行った (Fig. 7)。

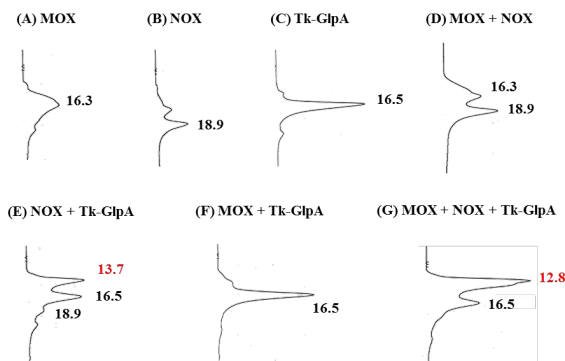


Fig. 6 Tk-GlpA 複合体の会合状態の解析

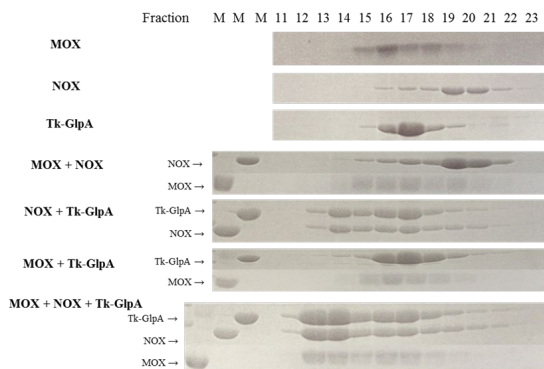


Fig. 7 ゲルろ過画分の SDS-PAGE 解析

これらの結果より、NOX は Tk-GlpA と複合体を形成しており、さらに MOX は NOX と Tk-GlpA 存在下で 3 者複合体を形成すると考えられた。更に、SDS-PAGE 上に検出されたタンパク質量を定量することで、複合体の結合量比について検証した。MOX、NOX、Tk-GlpA のモル数はそれぞれ 0.01378 pmol, 0.02129 pmol, 0.02014 pmol であり、その比は約 1:2:2 であることが分かった。

複合体形成が NOX と Tk-GlpA の活性に与える影響を解析するために、複合体サンプル中の G3P デヒドロゲナーゼ活性および NADH オキシダーゼ活性を測定した。この結果を Fig. 8 に示した。NOX + Tk-GlpA および MOX + NOX + Tk-GlpA の G3P デヒドロゲナーゼ活性はそれぞれ単量体の 2 倍、2.4 倍に上昇し、NADH オキシダーゼ活性はそれぞれ単量体の約 1/2 倍に減少した。

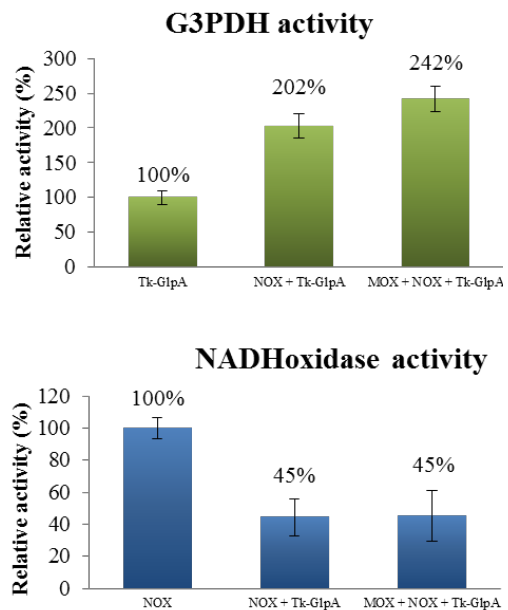


Fig. 8 複合体の酵素活性比較

複合体形成が NOX と Tk-GlpA の熱安定性に与える影響を解析した。上述と同様の手法で複合体サンプルを調製し、80 °C で 15 min 熱処理を行った後、G3P デヒドロゲナーゼ活性および NADH オキシダーゼ活性を測定した。その結果、Tk-GlpA では、NOX + Tk-GlpA および MOX + NOX + Tk-GlpA は、単量体の Tk-GlpA と比較して高い熱安定性を示した (Fig. 9)。

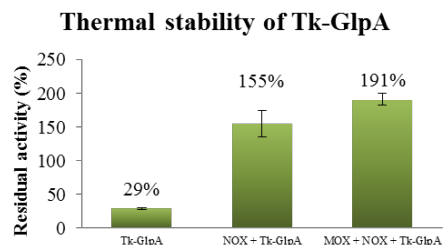


Fig. 9 複合体の熱安定性

以上、本研究では、超好熱古細菌（始原菌）*T.kodakarensis* のグリセロール代謝経路の役割と代謝の特性を明らかにするために、Glycerol 代謝関連遺伝子（*Tk-glpA*、*Tk-glpK*、*Tk-glpQ*）について研究を行った。

Tk-glpA は G3P デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子であるが、その活性とは直接関連のない NADH オキシダーゼ（*nox*）とモリブドプテリン依存型還元酵素サブユニット（*mox*）の遺伝子とオペロン形成していることがわかった。これら 3 遺伝子の産物を用いて *in vitro* で再構成した所、3 者からなるヘテロ複合体を形成し、G3P デヒドロゲナーゼの構造安定性と酵素活性が上昇することから、機能的に相補しあう酸化還元に関わる複合体の形成が示唆された。

一方、本菌にはグリセロホスホリルホスホチエステラーゼ（*GDPD*）をコードする遺伝子 *glpQ* が 2 つ連なっている。一方を欠損した変異体それぞれで酵素活性を測定した所、上流の遺伝子は発現していないことが確認された。一方、下流に存在する遺伝子については、上流の遺伝子領域に存在する塩基配列が発現に必須であること、また、*NaCl* により遺伝子の発現が制御されていることが示された。また、*Tk-glpK* は Glycerol から適合溶質の骨格である G3P を生産する酵素の遺伝子である。他の微生物ではグリセロールの異化代謝に働くと考えられているが、遺伝子欠損変異株を用いた解析の結果、本菌ではグリセロールは資化されていないことが示された。そこで、本菌の抽出産物からリン酸エステルの抽出を行い、NMR と質量分析による解析を行った所、塩ストレスに対応して生産される適合溶質のリン酸ジグリセロールが生産されていることが示唆された。本研究の結果は、これらの遺伝子が、超好熱菌の塩や熱ストレスに対応するための新たな働きを持っている可能性を示している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 超好熱古細菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来 glycerol-3-phosphate dehydrogenase の機能解析小西 香菜子¹、古賀 雄一¹、小林 淳¹、佐藤 喬章²、跡見 晴幸²、金谷 茂則¹（¹阪大院・工・生命先端、²京大院・工・合成生化）第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 5 日、神戸
2. 超好熱古細菌（始原菌）*Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来 glycerophosphodiester phosphodiesterase の機能解析熱田侑也¹、

古賀雄一¹、小林淳¹、劉東周¹、佐藤喬章²、跡見晴幸²、金谷茂則¹（¹阪大院・工・生命先端、²京大院・工・合成生化）第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 5 日、神戸

3. Characteristic analysis of compatible solute and production system from G3P in *Thermococcus kodakarensis* 鈴木誠志、古賀雄一、金谷茂則（阪大院・工・生命先端）第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 5 日、神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 雄一 (KOGA Yuichi)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：30379119

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：