

超好熱始原菌 *T. kodakaraensis* KOD1 の全遺伝子機能解析

Total functional genomics of the hyperthermophilic archaeon, *T. kodakaraensis* KOD1

今中 忠行 (IMANAKA, Tadayuki)

京都大学・大学院工学研究科・教授



研究の概要

超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株を対象とし、全ゲノム塩基配列情報・DNA microarray を用いた transcriptome 解析・特異的遺伝子破壊系等を利用して本菌ゲノム上遺伝子の網羅的機能解析を進めた。研究成果として多数の新規酵素・新規代謝系を同定することができ、超好熱始原菌の生命維持機構の解明に大きく貢献できた。

研究分野／科研費の分科・細目／キーワード

工学／プロセス工学・生物・生体工学／超好熱菌・機能未知遺伝子・遺伝子破壊・始原菌・新規代謝系・ゲノム・比較ゲノム・*Thermococcus*

1. 研究開始当初の背景・動機

超好熱菌は至適生育温度が 80°C 以上の生物の総称であり、16S rRNA 配列に基づいた生物の進化系統樹の源流に位置することから現存する生物の中で原始生命体に最も近いと考えられている。我々は、1993 年に鹿児島県小島島の硫気孔より超好熱始原菌の 1 種 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株を分離した。超好熱菌は生命の起源、進化に対し多くの情報を提供し、多くの耐熱性有用酵素を与えることから、我々は様々な観点から KOD1 株の研究を進めてきた。特に (i) KOD1 株の全ゲノム塩基配列を決定したこと、(ii) ゲノム上の任意の遺伝子を特異的に破壊する技術を開発したことは本菌の生命維持活動を理解するための研究を遂行する上で貴重な情報・技術であると期待された。

2. 研究の目的

ゲノム情報・遺伝子破壊技術に加えて DNA microarray を用いた transcriptome 解析、従来の生化学的解析を進めることにより、*T. kodakaraensis* KOD1 株の全遺伝子の機能解析を目的とした。

3. 研究の方法

研究開始当初は個々の遺伝子に優劣をつけず網羅的手法で遺伝子破壊や生化学的解析を進めていたが、ゲノム解析のアノテーション結果より、様々な代謝経路の中で対応する酵素遺伝子が特定できないケース (missing gene) が多々見受けられた。また transcriptome 解析の結果から、顕著な転写誘導や抑制が観察された機能未知遺伝子が

数多く同定できた。これらの結果から、解析する遺伝子に優先順位をつけて解析する方がより重要な遺伝子の機能解明が可能であると判断して研究を継続した。

4. 研究の主な成果

(1) 超好熱菌遺伝子破壊系の改良

Δ *pyrF* 株を宿主とし、*pyrF* マーカー遺伝子の上流および下流に相同領域を導入することにより、一段階目の相同組換えの後に *pyrF* マーカー遺伝子がゲノム上から脱落する系を開発した。この系では原理的には如何なる数の遺伝子でも破壊・導入が可能となる。また single crossover integration/pop-out recombination を利用した、より迅速な破壊手法も開発できた。

(2) 中央代謝経路の解明

炭素中央代謝に着目し、ゲノム情報からその存在が不明であった多数の遺伝子を特定することができた。

2-1) 我々は超好熱菌ゲノム上でそれまで特定されていなかった糖新生経路の鍵酵素は fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase) 遺伝子を同定し、遺伝学的にその機能も証明した。

2-2) 本菌の解糖系の最終反応が一般的な pyruvate kinase ではなく、phosphoenolpyruvate synthase により触媒されていることを遺伝学的に証明した。

2-3) 今まで知られていた経路と異なる構造的に新規な 3 種の酵素から構成される新しいキチン分解経路を発見した。

2-4) *T. kodakaraensis* では ribulose mono-phosphate pathway の逆反応が pentose 合成を担っていることを発見し、従来の pentose phosphate pathway に代わる始原菌特異的な pentose 合成経路を明らかにした。

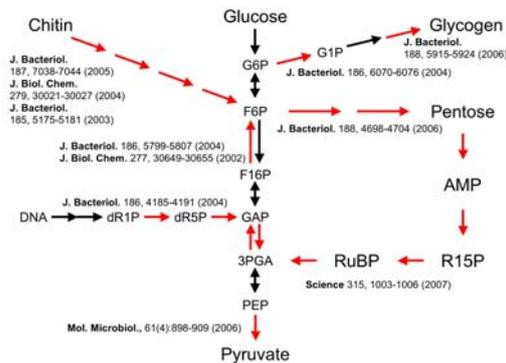
以上の研究成果により *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 の中央炭素代謝のほぼ全容が明らかとなった(下図)。

3) Reverse gyrase paradox の解決

Reverse gyrase は唯一の超好熱菌固有の酵素である。Reverse gyrase の特徴的な構造と本酵素が超好熱菌の生育に必須であると考えられてきたことから、生命が超好熱菌として誕生したという説は否定されていた。我々は reverse gyrase 遺伝子の破壊株を取得することに成功し、破壊株が 90°C で生育することを見いだした。したがって、reverse gyrase が存在しない条件であっても生命が高温環境(90°C)で誕生し得たことを実験的に証明した。

4) Type III Rubisco の機能解明

Type III Rubisco は Calvin 回路を持たない Archaea にのみ存在し、Rubisco の carboxylase 活性を示すものの、その生理的役割は不明であった。我々は比較ゲノムのアプローチより *T. kodakaraensis* 内で AMP から Type III Rubisco の基質 ribulose 1,5-bisphosphate を供給できる 2 種の新規酵素 AMP phosphorylase および ribose 1,5-bis-phosphate isomerase を同定した。この新しい代謝経路は糖新生系の一部と pentose phosphate pathway の一部と合わせて新しい第 5 の炭酸固定経路を形成し得ることも判明した。



中央炭素代謝に関する本研究の主な成果。赤矢印は本研究で同定あるいは機能解明された酵素を示す。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

我々が開発・改良してきた超好熱菌遺伝子破壊系の有用性の評価は極めて高く、多くの欧米研究グループからその方法論の教示、系の譲渡や共同研究の依頼が寄せられている。Reverse gyrase が超好熱菌の 90°C での生育に必須でないことを明らかにしたので、” Hot origin of life ” (生命が高温環境で誕生した) 説があり得ることを実験的に証明した。これは生命の誕生や進化を考える上で生物学・地質学等の分野で強いインパクトがあった。Type III Rubisco の機能は長い間謎のままであったが、我々はそれが機能する代謝系を特定できたことにより、Rubisco タンパク質の進化、Calvin 回路等の生物的炭酸固定経路の進化に強いインパクトを与えた。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1) Archaeal Type III Rubiscos function in a pathway for AMP metabolism., T. Sato, H. Atomi, and **T. Imanaka**, *Science*, 315(5814), 1003-1006, 2007.

2) Phosphoenolpyruvate synthase plays an essential role for glycolysis in the modified Embden-Meyerhof pathway in *Thermococcus kodakaraensis*., H. Imanaka, A. Yamatsu, T. Fukui, H. Atomi, and **T. Imanaka**, *Mol. Microbiol.*, 61(4), 898-909, 2006.

3) The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway in the archaeon *Thermococcus kodakaraensis*., I. Orita, T. Sato, H. Yurimoto, N. Kato, H. Atomi, **T. Imanaka**, and Y. Sakai, *J. Bacteriol.*, 188(13), 4698-4706, 2006.

4) Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes., T. Fukui, H. Atomi, T. Kanai, R. Matsumi, S. Fujiwara, and **T. Imanaka**, *Genome Res.*, 15(3), 352-363, 2005.

5) Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*., T. Sato, T. Fukui, H. Atomi, and **T. Imanaka**, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(7), 3889-3899, 2005.

6) Reverse gyrase is not a prerequisite for hyperthermophilic life., H. Atomi, R. Matsumi, and **T. Imanaka**, *J. Bacteriol.*, 186, 4829-4833, 2004.

ホームページ URL

<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/imanaka-lab/>