

生物間で共通する機能未知必須遺伝子 *gcp* の遺伝学的解析

Genetic analysis of the *gcp* gene,

an unknown-essential gene common to living organisms

○北原一正¹、小野寺威文²、星野貴行¹、鳴海一成²、中村顕¹

Kazumasa Kitahara¹, Takefumi Onodera², Takayuki Hoshino¹, Issay Narumi²
and Akira Nakamura¹

(¹筑波大学大学院生命環境科学研究科、²日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門)
(¹Grad. School of Life Environ. Sci, Univ. Tsukuba, ² Quantum Beam Science Directorate, JAEA)
e-mail:a-nak@agbi.tsukuba.ac.jp

O-sialoglycoprotein endopeptidase (Gcp)は、動物赤血球表面の主要タンパク質 glycophorin-A のようなシアル酸を含む糖タンパク質を特異的に分解する分泌型プロテアーゼとして、最初に動物病原菌 *Mannheimia haemolytica* で発見された。Gcp のオルソログは、真核生物・古細菌・バクテリアを問わず、ゲノム配列が決定されたほとんどすべての生物で高度に保存されており(図)、原始生命から全生物に保存されている遺伝子の一つであるとも言われている(1)。さらに興味深いことに、同遺伝子は大腸菌や枯草菌、酵母といったモデル微生物では生育に必須であることが明らかになっている。このことから、Gcp は単なる細胞外プロテアーゼとして機能するのではなく、生命全体に共通する重要な生命現象を担っていることが考えられる。ところが Gcp の機能に関しては、上記のプロテアーゼ以外に、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Kae1 は RNA polymerase II による特定遺伝子の転写とテロメアの恒常性維持に関与すること、ヒトガン細胞 OSGEP は、核内のミスフォールドしたコリプレッサーの分解に関与することが報告されており、相互に関連性が見出されていない。さらに最近になって、超好熱性古細菌 *Pyrococcus abyssi* の Gcp オルソログ(PaGcp)はプロテアーゼ活性を示さず、DNA の脱塩基部位を特異的に切断する AP-エンドヌクレアーゼ活性を持つことも報告されている(2)。

近年では、*E. coli* において更に詳しい解析が行われ、Gcp と弱い相同性を示す別の必須タンパク質 YeaZ が、ATPase と推定される YjeE (これも必須タンパク質) と相互作用し、Gcp オルソログである YgjD のプロテアーゼとして機能することで、YgjD の活性を制御している可能性が示唆された。また、conditional mutant を用いた解析により、YgjD、YeaZ、YjeE がそれぞれ枯渇した状態では細胞の長さ・幅が増大し、核様体の異常な局在が観察され、DNA 合成に異常が起こっている可能性が示唆された(3)。

我々は *T. thermophilus* HB27 株の Gcp オルソログをコードする TTC0888 (*Ttgcp*)遺伝子破壊株の取得に成功した。同破壊株は 0.1 % NaCl を含む通常の TM 培地では若干の生育の遅れを示し、さらに高塩濃度(3% NaCl)では生育抑制を示すことを報告した。Gcp オルソログが必須ではないが高塩濃度耐性と関連することは、*Synechocystis* PCC6803 株における以前の報告と一致していた。更に、KCl, Na₂SO₄, sucrose を添加した TM 培地でも生育阻害が観察され、*Ttgcp* 破壊株の示す高塩濃度感受性は、特定の塩やイオンによるものではなく、むしろ高浸透圧感受性であることが明らかになった。また、他種好熱菌の Gcp オルソログ(*Geobacillus kaustophilus* GkGcp, TtGcp とのアミノ酸レベルでの相同性は 45%; *Symbiobacterium thermophilum* StGcp1 と StGcp2, 相同性はそれぞれ 49%、34%)を発現させた場合、*Ttgcp* 破壊株の示す高塩濃度感受性が相補されたので、少なくともこれら好熱菌間で Gcp の機能が共通していることが示唆された。

今回は、上記の *E. coli* の報告を受けて、*Ttgcp* だけでなく、*E. coli* の *YeaZ*、*YjeE* オルソログである *TTC0008* (*TtyeaZ*)、*TTC1823* (*TtyjeE*)についても着目し、各遺伝子の破壊や酵素活性の解析を試みた。また、*Deinococcus* で示唆された DNA 修復系と *Gcp* との関連について、更に詳細な検討を行った。

<*TtyeaZ* 破壊株も *Ttgcp* 破壊株と同様に浸透圧感受性を示す>

E. coli 必須タンパク質 *YeaZ* のオルソログ(*TtyeaZ*)の破壊株を作製したところ、*TtyeaZ* 破壊株は、0.372 M の NaCl および sucrose を添加した TM 培地において、*Ttgcp* 破壊株と同様に生育が阻害された。*Ttgcp-TtyeaZ* 二重破壊株についても同様の表現型を示した。

Ttgcp 破壊株で *TtyeaZ* を、*TtyeaZ* 破壊株で *Ttgcp* をそれぞれ過剰に発現させても、各破壊株の浸透圧感受性は回復せず、*Ttgcp* と *TtyeaZ* は互いに相補しないことが明らかとなった。

<*Deinococcus* の *gcp* 破壊株は DNA 損傷に対して感受性を示す>

Thermus と同じ phylum に属する *D. radiodurans* においても *gcp* は必須ではなかったが、*Gcp* オルソログ(*DR0382*)破壊株は高塩濃度感受性を示さない代わりに、UV や DNA に架橋を形成するマイトマイシン C (MMC)に対して感受性を示した。また、*YeaZ* オルソログ(*DR0756*)も必須ではなく、*DR0756* 破壊株は MMC に対して感受性を示した。

<*Ttgcp* 破壊株も DNA 損傷剤に感受性を示す>

Ttgcp 破壊株を DNA 損傷剤(EtBr、MNNG、 H_2O_2 、MMC)に様々な条件で曝露した際の影響を野生株と比較したところ、EtBr と MMC では差が見られなかったが、MNNG と H_2O_2 に対して *Ttgcp* 破壊株が感受性を示した。

<*TtGcp* は二本鎖 DNA を分解するヌクレアーゼ活性を有する>

E. coli で発現させた *TtGcp* を環状および線状の二本鎖 DNA と 70°C でインキュベートしたところ、いずれも分解され、*TtGcp* がヌクレアーゼ活性を有していることが明らかとなった。

<大腸菌を用いた解析>

大腸菌では *Gcp* オルソログ(*EcGcp*)は必須遺伝子に分類されており、薬剤耐性遺伝子の挿入による破壊株の取得は不可能である。そこで、ゲノム上の *EcGcp* を強い抑制が可能な誘導型プロモーター($P_{LtetO-1}$)の制御下に置いた conditional mutant を作製したところ、同株の生育は tetracycline 誘導体の doxycycline 依存性を示した。また、同株に枯草菌(*BsGcp*, *EcGcp* との相同性 43%)、*Synechocystis* PCC6803 株 (*SynGcp*, 41%)および *M. haemolytica* (*MhGcp*, 77%)の *Gcp* オルソログを導入したところ、相同性が最も高い *MhGcp* でのみ生育の相補が認められた。以上の結果から、*EcGcp* の必須性が確認されたが、他生物由来 *Gcp* による相補性については *Thermus* の場合とは異なることが示された。

T. thermophilus と *D. radiodurans* はいずれも *Gcp*、*YeaZ* オルソログを破壊でき、その表現型は異なる部分があるが、いずれも DNA 修復系との関与が示唆された。今後は、各酵素の活性や相互作用について詳細な解析を行っていく予定である。

引用文献

- (1) Koonin, E. V. *Nat. Rev. Microbiol.*, **1**, 127-136, 2003.
- (2) Hecker et al., *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6042-51, 2007.
- (3) Msadek T. *J Bacteriol.*, **191**, 4732-49, 2009.

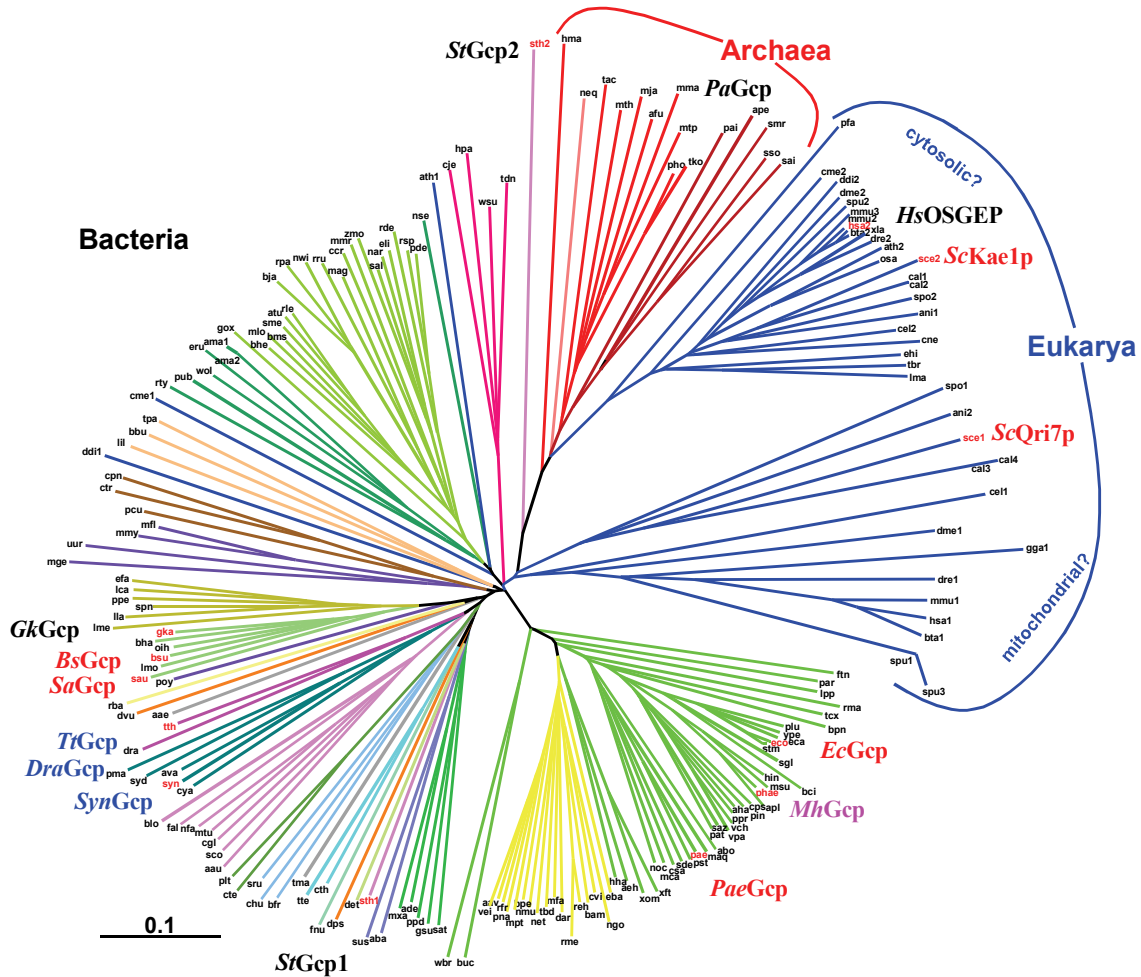


図 Gcp のアミノ酸配列に基づく系統樹。生物名は KEGG の略称で示した。同一の生物が複数の Gcp を有している場合には、数字を付して区別した。バクテリア及び古細菌の線の色は系統分類上の分類群と一致している。赤で示した名称は Gcp が必須であることが明らかなもの、青は必須ではないことが明らかものを示す。Ec, 大腸菌; Mh, *M. haemolytica*; Bs, 枯草菌; Syn, *Synechocystis* PCC6803; Dra, *D. radiodurans*; Pae, *Pseudomonas aeruginosa*; Sa, *Staphylococcus aureus*; Tt, *T. thermophilus*; Gk, *Geobacillus kaustophilus*; Sth, *Symbiobacterium thermophilum*; Pa, *P. abyssi*; Hs, *Homo sapiens*; Sc, *S. cerevisiae*.