

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 株の機能未知プロテアーゼ Gcp の機能解析

Functional analysis of TTC0888 of *Thermus thermophilus* HB27,

a putative O-sialoglycoprotease

小野瀬晃由、星野貴行、中村顕

Akiyoshi Onose, Takayuki Hoshino, Akira Nakamura

(筑波大学大学院生命環境科学研究科)

(Grad. School of Life Environ. Sci, Univ. Tsukuba)

e-mail:a-nak@agbi.tsukuba.ac.jp

高度好熱菌 *T. thermophilus* HB27 株が有する特徴の一つに、高い自然形質転換能が挙げられる。本菌株の遺伝子操作系は、最も高温で利用可能な遺伝子操作系として捉えられ、ゲノム情報に基づいた逆遺伝学的手法による本菌株の遺伝子機能の解析や、他の好熱菌・超好熱菌由来遺伝子の発現、そして directed evolution による常温生物由来蛋白質の耐熱化に利用されてきている。

我々は本菌株のこのような特徴に着目し、特に外来遺伝子産物の高効率発現系の構築を目指して、HB27 株の各種プロテアーゼ欠損株を作製し外来遺伝子産物の生産に与える影響を検討してきた。この過程で、O-sialoglycoprotease (*gcp*)とアノテートされる TTC0888 の欠損株を取得した。このプロテアーゼは、動物に感染して肺炎等を引き起こす病原菌 *Pasteurella haemolytica* で最初に発見されたが、同株の Gcp は glycophorin-A などのシアル酸を含む糖蛋白質を分解する分泌型プロテアーゼであることが明らかになり、感染因子として機能すると考えられている。同遺伝子はゲノムが明らかにされている全てのバクテリア、古細菌、真核生物に広く保存されているが、その機能についてはほとんどの生物種で明らかにされていない。またこの遺伝子は *T. thermophilus* では生育に必須ではないと判断されるが、枯草菌・大腸菌及び酵母におけるオルソログは、どの生物でも必須遺伝子に分類されている。Gcp の広範な生物における保存性及びモデル微生物での必須性から、Gcp は単なるプロテアーゼとして機能するのではなく、むしろ何らかの生命の基本機能と関連していることが考えられる。また、*T. thermoohilus* では同遺伝子破壊株が取得できたことから、モデル微生物で共通する機能未知必須遺伝子であっても、他の微生物では必ずしも必須であるとは限らないこと、そのためモデル微生物以外の微生物で該当するオルソログ遺伝子が必須であるかどうかを検討し、同遺伝子の必須性を明らかにする必要があると考えられる。

本研究では、*T. thermophilus* を宿主として *gcp* 遺伝子の機能解析を行うと共に、モデル微生物と本菌との間の機能未知必須遺伝子の共通性について検討することとした。

gcp の系統解析

KEGG ゲノムデータベース上で Gcp と相同性を示す遺伝子を検索し、系統樹を作製した (Fig. 1)。その結果、Gcp はゲノムが公開された全てのバクテリア・古細菌・真核生物で高度に保存されており、進化系統ともよい一致を示していた。そのため *gcp* は祖先生物 commonote がもつ遺伝子であり、進化の過程で多様な生物に保存されてきたことが示唆された。

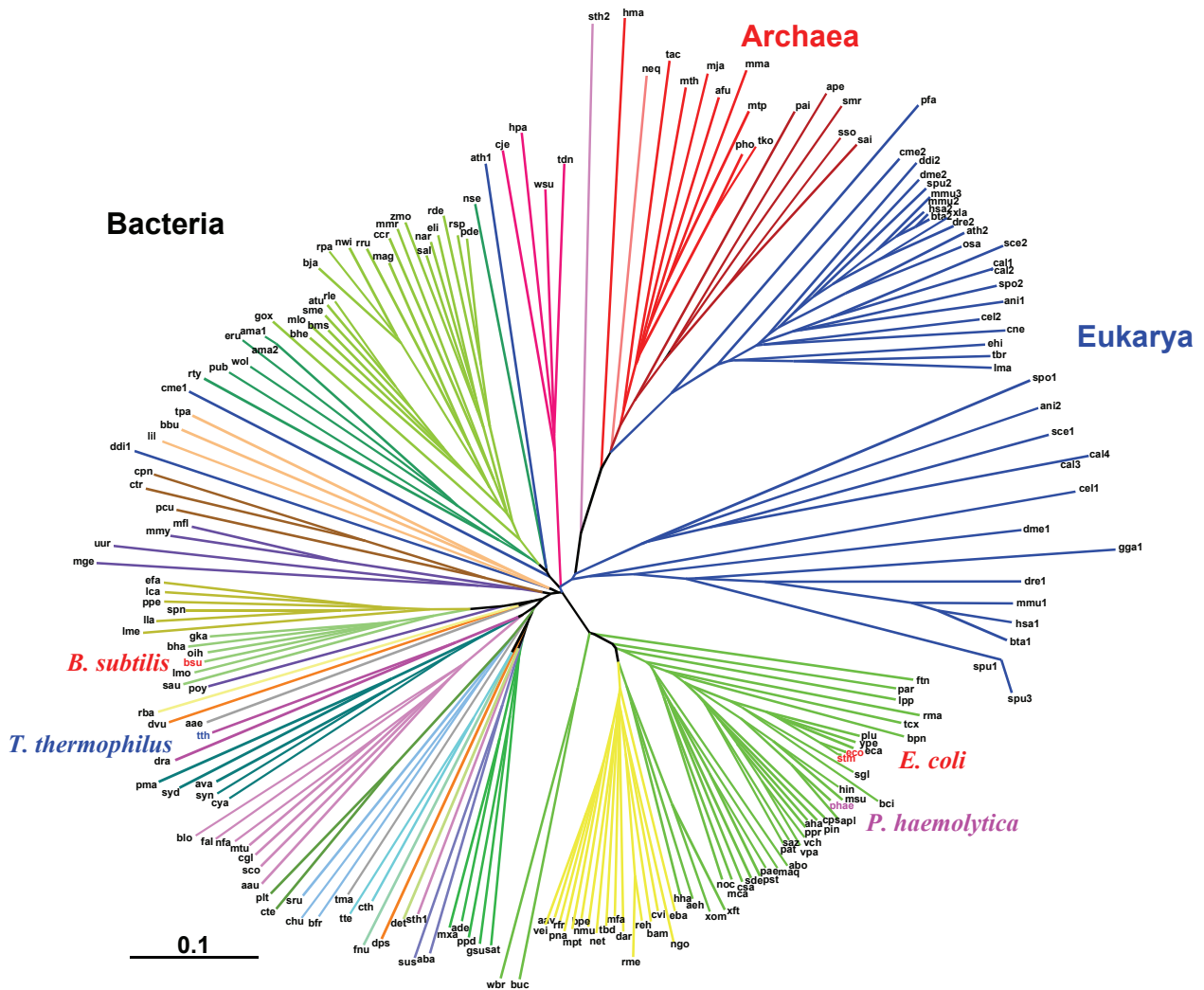


Fig. 1. Gcp のアミノ酸配列に基づく系統樹。生物名は KEGG organism の略称で表し、同一の生物が複数の Gcp を有している場合には数字をつけて区別した。線の色は系統分類上の分類群と一致している。

TTC0888 遺伝子の機能解析

次に、TTC0888 を耐熱性ハイグロマイシン耐性遺伝子 *hph5* を遺伝子内部に挿入する事で破壊した。この破壊株の表現型を検討したところ、完全培地(TM)では 70°Cで野生株より若干の生育の遅れが観察され、最少培地上ではほとんど生育しなかった。また、通常 TM 培地に 0.1%含まれる NaCl を 2%にすると、野生株ではほぼ変わらない生育を示すのに対して *gcp* 欠損株はほとんど生育が見られず、塩感受性を示すことが明らかになった。同様の表現型は *Synechocystis* sp. PCC6803 株の *gcp* 変異株でも報告されており、Gcp が浸透圧調節に関わっている可能性が考えられた。更に最少培地で生育できないことから、破壊株が何らかの栄養要求性を示すことも考えられる。

モデル微生物との機能未知必須遺伝子の共通性

枯草菌・大腸菌では *gcp* が必須であるにもかかわらず、*T. thermophilus* では必須ではなかったことから、モデル微生物と本菌で必須遺伝子がどの程度共通しているのかということに興味を持

たれた。そこで、特に機能未知必須遺伝子に焦点を絞り、共通性があるのかを検討した。枯草菌については既に機能ごとに必須遺伝子が分類され公開されていたので、その中から機能が確定していない遺伝子を選択し、それらの *T. thermophilus* 及び大腸菌におけるオルソログ遺伝子をリストアップした。そして *T. thermophilus* のオルソログ遺伝子の破壊株を *hph5* の挿入により作製した (Table 1)。これらの中で破壊株が取得できなかったのは、TTC0096 (similar to thioredoxin reductase)、TTC1422 (Obg)、TTC1699 (similar to 2-oxoglutarate dehydrogenase) の 3 つであった。そのためこれら 3 遺伝子は *T. thermophilus* でも必須である可能性が考えられる。特に TTC1422 (Obg) は、そのオルソログが大腸菌でも必須であり、興味深い。また、モデル微生物と本菌との間で、機能未知必須遺伝子の共通性は低いと考えられる。

今後は Gcp の機能について、枯草菌や大腸菌も用いて解析を行っていく予定である。

Table 1 枯草菌の機能が確定していない必須遺伝子と対応する *T. thermophilus* 及び大腸菌遺伝子の必須性

枯草菌遺伝子とのアミノ酸レベルでの相同性(%)をカッコ内に示した。annotation は、枯草菌に関する情報を BSORF home page より取得した。赤字は必須遺伝子あるいは破壊できなかった遺伝子を、青字は未破壊の遺伝子を表す。

<i>B. subtilis</i> gene	<i>T. thermophilus</i> gene	<i>E. coli</i> gene	annotation
<i>mrpA</i>	TTC1909 (22)	<i>nuoL</i> (21)	putative NADH dehydrogenase I chain L
<i>mrpB</i>	—	—	Na ⁺ /H ⁺ antiporter
<i>mrpC</i>	—	—	Na ⁺ /H ⁺ antiporter
<i>mrpD</i>	—	<i>nuoM</i> (20)	electron transfer
<i>mrpF</i>	—	—	efflux system protein
<i>era</i>	TTC1874 (35)	<i>era</i> (36)	GTP-binding protein essential for cell growth
<i>obg</i>	TTC1422 (37)	<i>obgE</i> (42)	GTP binding protein essential for cell growth
<i>yphC</i>	TTC1025 (37)	<i>era</i> (38)	GTP-binding protein essential for cell growth
<i>gcp</i>	TTC0888 (40)	<i>gcp</i> (39)	O-sialoglycoprotein endopeptidase
<i>odhB</i>	TTC1699 (46) TTC1754 (37) TTC1802 (30)	<i>sucB</i> (43)	similar to 2-oxoglutarate dehydrogenase
<i>pdhA</i>	TTC0569 (39) TTC1757 (33)	—	pyruvate dehydrogenase E1 component, alpha subunit
<i>ydiC</i>	TTC0008 (20)	<i>yeaZ</i> (22)	similar to glycoprotein endopeptidase
<i>yneS</i>	TTC0187 (21) TTC0456 (21)	—	conserved membrane protein
<i>ymdA</i>	TTC1456 (49)	—	membrane protein with HD domain of metal-dependent phosphohydrolase
<i>ywlC</i>	TTC0439 (31)	<i>yrdC</i> (25)	conserved protein
<i>ydiB</i>	TTC1823 (25)	<i>yjeE</i> (30)	conserved protein
<i>yqeI</i>	TTC1418 (26)	<i>ybeB</i> (38)	conserved protein
<i>yycG</i>	TTC1360 (41) TTC1361 (25)	—	two-component sensor histidine kinase
<i>yumC</i>	TTC0096 (42)	<i>ahpF</i> (18)	similar to thioredoxin reductase
<i>yrvO</i>	TTC0087 (40)	<i>iscS</i> (40)	iron-sulfur cofactor synthesis protein homolog
<i>yqeH</i>	TTC1025 (11)	<i>yfgK</i> (14)	GTP binding protein essential for cell growth
<i>ysxC</i>	TTC1025 (17) TTC1874 (16)	<i>yihA</i> (34)	GTP binding protein essential for cell growth
<i>ykqC</i>	TTC0775 (40) TTC1733 (11)	—	putative hydrolase of the metallo-beta-lactamase superfamily
<i>yqjK</i>	TTC1733 (14)	<i>elaC</i> (47)	RNase Z responsible for the maturation of the 3' end of tRNA
<i>yacA</i>	TTC1176 (18) TTC0106 (11)	<i>tilS</i> (21)	tRNA(Ile)-lysine synthetase
<i>ppaC</i>	—	—	inorganic pyrophosphatase
<i>ylqF</i>	—	—	GTP-binding protein essential for cell growth
<i>yloQ</i>	—	<i>yjeE</i> (28)	GTP-binding protein with essential function
<i>ylaN</i>	—	—	conserved protein
<i>yhdL</i>	—	—	anti-sigmaM protein
<i>ykuR</i>	—	—	similar to hippurate hydrolase