

Pyrococcus horikoshii 0T3 株の推定リジン生合成クラスターの Bacillus subtilis への導入による機能解析

赤津 裕一（筑波大学 生物学類 4年） 指導教官：星野 貴行（筑波大学 生物科学系）

<導入・目的>

当研究室では高度好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* HB27 の Lys 生合成が、バクテリアで一般的なジアミノピメリン酸経路 (DAP 経路) ではなく、カビ・真菌類でのみ報告されていた α-アミノアジピン酸を中間体とする経路によって行われていることを発見した。また、*T. thermophilus* の Lys 生合成クラスターと高い相同性を示す領域が超好熱性嫌気性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 0T3 ゲノム中にも見出され、同菌株も同様の経路により Lys 生合成を行っていることが推定された。同時に *P. horikoshii* の遺伝子クラスターは、上流 4 遺伝子 (PH1727-PH1722) が他の生物の Leu 生合成遺伝子と、下流の 3 遺伝子 (PH1720-PH1716) が Arg 生合成遺伝子と有意な相同性を示している。*P. horikoshii* 0T3 は Lys、Arg、Leu に対して要求性を示さず、またそのゲノム上にはこの領域以外に Leu、Arg 生合成遺伝子、あるいはジアミノピメリン酸経路を構成する Lys 生合成遺伝子と相同性を示すような遺伝子は存在していない。以上から、この領域は *P. horikoshii* 0T3 中で Lys、Leu、Arg の 3 種のアミノ酸生合成に関与することが推察された。

<方法>

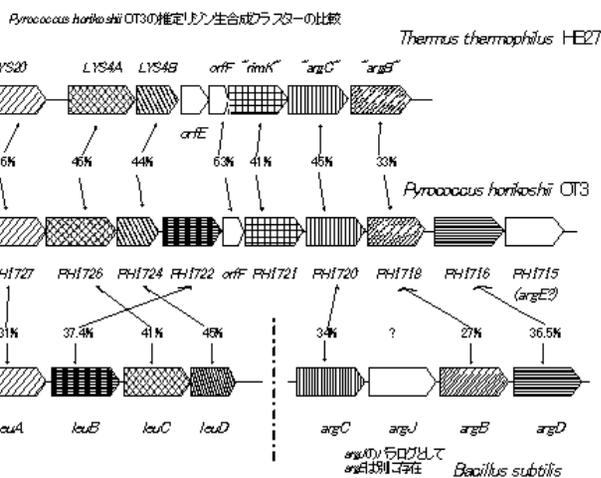
Leu、Arg 生合成に関与する遺伝子を個別に破壊した枯草菌菌株を新たに作製し、それぞれの破壊株に *P. horikoshii* 0T3 の推定 Lys 生合成クラスター中の対応遺伝子を導入して、変異の相補 (Leu、Arg に対する要求性の回復) により導入遺伝子がそれぞれ Leu、Arg 生合成に関与するかどうかを明らかにする。Lys 生合成に関しては、枯草菌では DAP 経路を利用しているので、最終段階の反応を司る遺伝子 (*lysA*) の破壊株を作製し、この株に対して *P. horikoshii* 0T3 の推定 Lys 生合成クラスター全長を導入する。

第一段階として Leu 生合成遺伝子に着目し、枯草菌の *leu* オペロンを構成する各遺伝子を、各 ORF 内部を大きく欠失させ、それを枯草菌の相当遺伝子と置換することにより破壊する。次に *P. horikoshii* 0T3 の対応遺伝子の ORF を PCR 増幅し、その C 末端に Flag-tag を挿入する。この構築を枯草菌 *xyI* promoter の下流に結合して各変異株ゲノムの *amyE* locus に挿入する。このようにして作製した菌株について Leu に対する要求性を、枯草菌の生育上限温度である 52~55°C (培地組成、塩濃度によって可変) 付近での最少培地での生育により検討し、*P. horikoshii* 0T3 の導入遺伝子が Leu 生合成に関与しているかどうかを明らかにする。なお導入遺伝子の発現の有無については、Flag-tag に対する抗体を用いた Western blotting により解析する。

<結果・考察>

現在、枯草菌の *leuA*、*leuB* 破壊株の構築に成功し、*leuC*、*leuD* 破壊株の構築を行っている。導入する *P. horikoshii* 0T3 遺伝子については、各 ORF の PCR 増幅及びクローン化は完了し、現在 Flag-tag の付加を行っている。また *amyE* locus に挿入するためのプラスミドについても構築を行った。

P. horikoshii 0T3 は超好熱性古細菌なので、遺伝子産物が常温で活性を持たないことがある。実際に大腸菌で発現させた場合には、産物が活性を持たなかったという報告もある。それに対して枯草菌は生育上限温度が大腸菌より高く、GC 含量も同程度なので、*P. horikoshii* 0T3 遺伝子を発現させる際のより良い宿主として利用可能であると考えられる。



本研究では遺伝子操作の容易な枯草菌を宿主として発現させることにより、*P. horikoshii* 0T3 のこの遺伝子領域が Lys、Leu、Arg 生合成に関与しているかどうかを明らかにすることを目的とする。