

プロジェクト名：古細菌の膜脂質合成遺伝子群の転写誘導によっておきた、真正細菌

菌・枯草菌細胞の増殖阻害の解析

プロジェクト代表者：朝井 計（理工学研究科・准教授）

1 研究の目的

地球上の全ての生物の細胞は細胞膜と呼ばれるリン脂質を主成分とする構造物で仕切られており、その膜内・膜近傍が多くの生体内反応の場であり、細胞膜の構造・構成成分が細胞機能の発揮にきわめて重要である。細胞膜の基本構造は、グリセロールリン酸の基本骨格に親水性の頭部と疎水性の炭化水素が結合した尾部をもつ極性脂質（リン脂質）が集合してできた脂質二重層である。3つの生物界（古細菌・真正細菌・真核生物）の細胞間でグリセロールリン酸骨格の立体構造（光学活性）が例外なく異なっていて、古細菌はグリセロール1-リン酸（G1P）、真正細菌・真核生物はグリセロール3-リン酸（G3P）である。また炭化水素基は前者がエーテル結合したイソプレンであり、後者はエステル結合した脂肪酸と大きく異なっている。この大きな違いが進化の過程でどのように生じたかは謎だが、化学合成的に生成したG1P型とG3P型の膜脂質を混有する祖先細胞が誕生し、これらが衝突・融合・分裂を繰り返すうちに、次第にG1P型あるいはG3P型だけからなる脂質膜をもつ、古細菌と真正細菌・真核生物へと別れていったとする生物進化の仮説が提唱されている。本研究は真正細菌側を宿主として、G1P型・G3P型の両者の膜脂質を混有する「生きた」細胞を遺伝子工学的に創生し、脂質膜成分の変化・遷移を観察することで、この仮説を実証することを主たる目的としている。

2 研究の成果

これまでに、真正細菌である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) をベースとなる細胞として用い、古細菌は全ゲノム DNA 配列が明らかで、脂質組成やその生合成経路ともによく解析されているメタン細菌の *Methanothermobacter thermoautotrophicus* を用いた。古細菌の膜脂質合成経路に関する 10 遺伝子をピックアップし、個々の遺伝子を PCR によって増幅した。その後 10 個の遺伝子を枯草菌内でプラスミドベクターに集積させることに成功した。このプラスミドベクターは構築後には枯草菌とならんでバクテリアのモデル生物である大腸菌細胞にも導入し発現させることが可能である。

このプラスミドは枯草菌内での複製に必要な因子が IPTG の添加に依存しているため、IPTG 無添加の場合には 1 細胞に 1 コピーだが、IPTG 1mM 添加後は 1 細胞に 10 コピーとなる。またクローン化した遺伝子群の転写は cI リプレッサーで抑制される Pr プロモーターに依存している。枯草菌宿主 BUSY9797 は、cI リプレッサーを常に発現し Pr プロモーターからの転写を抑制するための株である。従って枯草菌宿主を一般的な株とし、IPTG を添加することで遺伝子の転写発現が最大となる。

まずはこの集積プラスミドを有した枯草菌 BUSY9797 細胞に、導入プラスミドのコピー数増加を誘発する誘導物質 IPTG を与えたところ、寒天培地上で IPTG の有無にかかわらず増殖阻害がみられた。プラスミドのコピー数が低い場合、増殖・分裂した細胞へうまく分配されない細胞が生じ、増殖の遅延が見られたと考えられる。次に集積プラスミドを有した枯草菌 BUSY9797 細胞からプラスミドを抽出・精製し、通常の枯草菌細胞への導入を試みた。得られた形質転換体の液体培地における増殖を観察したところ、IPTG の添加による増殖の顕著な変化は見られなかった。現在プラスミドが正確に細胞に保持されているか、遺伝子の

発現がなされているかを確認中である。現在までに枯草菌細胞で、古細菌の脂質合成遺伝子群の転写誘導ならびに蛋白質・機能の発現は観察できていない。

遺伝子は転写された後、mRNA となり、その後蛋白質に翻訳され、合成された蛋白質が機能し、代謝経路が動くことで、最終的に古細菌の膜脂質が合成されることになる。DNA を蛋白質に変換するアダプター分子は生物種によって偏り（コドン使用頻度の違い）があり、これが異種蛋白質の合成を妨げる大きな要因となっている。実際、メタン細菌と真正細菌（枯草菌・大腸菌）では表1に示すようなアミノ酸をコードしているコドンに使用頻度の大きな偏りがある。大腸菌ではレアコ

表1 メタン細菌と真正細菌のコドン使用頻度の違い

Codon	Amino acid	メタン細菌	枯草菌	大腸菌
AUA	Ile	0.56	0.13	0.21
CCC	Pro	0.38	0.09	0.16
AGG	Arg	0.61	0.10	0.07
CUC	Leu	0.37	0.11	0.10

ドンを補うプラスミドが市販されているなどのノウハウがあるので、この大腸菌宿主を用いて古細菌の脂質合成遺伝子群の発現を目指している。

3 今後の展望

枯草菌を宿主にするにしても、大腸菌を宿主にするにしても、古細菌の脂質合成にはイソプレンが大量に必要である。真正細菌においてイソプレンは必須ではあるが、それほど大量には合成されていない。そこで、古細菌の脂質合成に必要なイソプレン量を確保するために、第二のイソプレン合成経路の導入（図1）を検討する。

全ての蛋白質が発現し、基質も十分供給され、機能することが可能となった場合、代謝経路が作動しているか確認する必要がある。代謝中間産物はMSを用いて解析することを検討する。細胞から抽出した膜脂質をクロマトグラフィーを用いて分離・検出する。

真正細菌の細胞を用いた in vivo での古細菌の脂質合成遺伝子群の発現に加えて、人工脂質と in vitro 蛋白質合成系を用いて、試験管内で古細菌の脂質合成遺伝子群の発現による古細菌の細胞膜の再構成を試みる。

ref) Kuzuyama T., Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units., Biosci Biotechnol Biochem. 2002 66(8):1619-1627.

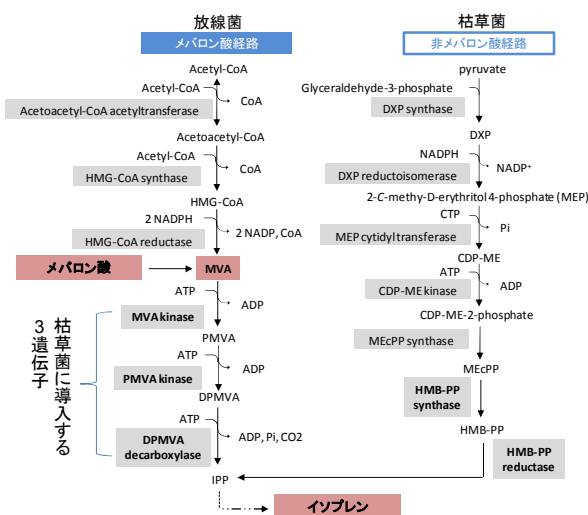


図1 イソプレン合成系の2つの経路 (ref 参照)