

生物間で共通する機能未知必須遺伝子 *gcp* の *Thermus* を用いた遺伝学的解析  
～DNA 修復機構との関連を中心に～

**Genetic analysis of the *gcp* gene of *Thermus thermophilus* HB27,  
an unknown-essential gene common to living things**

----with relation to DNA repair systems----

○北原一正、星野貴行、中村顕

**Kazumasa Kitahara, Takayuki Hoshino and 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

生物には DNA polymerase や ribosome をコードする遺伝子のように、生命の維持や生育になくてはならない遺伝子、すなわち必須遺伝子が存在する。これらの遺伝子の機能は微生物を中心に解析されてきたが、全ゲノム配列が明らかになり全遺伝子の knock-out が作製された大腸菌や枯草菌においてさえも、いまだに機能が明らかでない必須遺伝子が存在する。これらの機能未知必須遺伝子の中には、それぞれの種に固有の遺伝子があるが、生物種を超えて共通して保存されている遺伝子も存在する。これらの生物間で共通する機能未知必須遺伝子の機能を明らかにすることは、生命現象の根本からの理解に必要である。

O-sialoglycoprotein endopeptidase (Gcp)は、最初に動物病原菌 *Mannheimia haemolytica* で病原因子として発見された、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であると報告されている。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 では 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 では、Gcp オルソログ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 の脱プリン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)。

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。同欠損株は 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(昨年度本会で発表)。Gcp オルソログが必須ではないが高塩濃度耐性に関連することは、*Synechocystis* PCC6803 株における以前の報告と一致していた。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、*Thermus* の欠損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。なお、*Thermus* と同じ phylum に属する *Deinococcus* では、Gcp は *Thermus* と同様に必須ではないが、同欠損株は高塩濃度感受性を示さず、その代わりに UV 感受性を示した(原研・鳴海博士 私信)。

今回は、上記の *P. abyssi* および *Deinococcus* の報告を受けて、DNA 修復系と Gcp との関連を *Ttgcp* 欠損株を用いて解析を行った。また、大腸菌を用いた Gcp の必須性及び他生物の Gcp による相補実験の結果についても併せて報告する。

#### <*Ttgcp* 欠損株の示す高塩濃度感受性は高浸透圧感受性>

*Ttgcp* 欠損株は 3% NaCl に対して感受性を示すが、今回 KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sucrose を用いて検討したところ、それぞれ 513 mM, 342 mM, 513 mM の濃度で同様の生育阻害が観察された。このことから *Ttgcp* 欠損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。

#### <DNA 修復系との関連>

*TtGcp* が何らかの DNA 修復系に関連するのであれば、同欠損株は DNA に損傷を与える条件で感受性を示すことが予想される。そこで、UV、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、アルキル化剤(MNNG)、および臭化エチジウムに対する *Ttgcp* 欠損株の感受性を野生株と比較したが、両者の間で有意な差は見られなかった。このことおよび変異株の示す高浸透圧感受性から、*TtGcp* は DNA 修復系とは直接は関連しないものと考えられる。特に UV に対して感受性を示さなかった点は、*Deinococcus* の結果と大きく異なっており、興味深い。

#### <大腸菌を用いた解析>

大腸菌では Gcp オルソログ(*Ecgcgcp*)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 *Ecgcgcp* を強い抑制が可能な誘導型プロモーター(*P<sub>LtetO-1</sub>*)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。

今後は二次元電気泳動による *Ttgcp* 欠損株のプロテオーム解析や、*TtGcp* に関するタンパク質レベルでの機能解析を計画している。また、*TtGcp* の機能を遺伝学的に解析するために、*Ttgcp* 欠損株の NaCl 感受性を相補するようなサプレッサー変異株の分離を試みている。また、大腸菌・枯草菌では、Gcp は別の必須タンパク質(それぞれ *EcYeaZ*, *BsYdiC*)と複合体を形成することが報告されている(*EcYeaZ* オルソログは Bacteria 間では広く保存されているが、古細菌・真核生物では見出されていない)ので、こちらも含めた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.

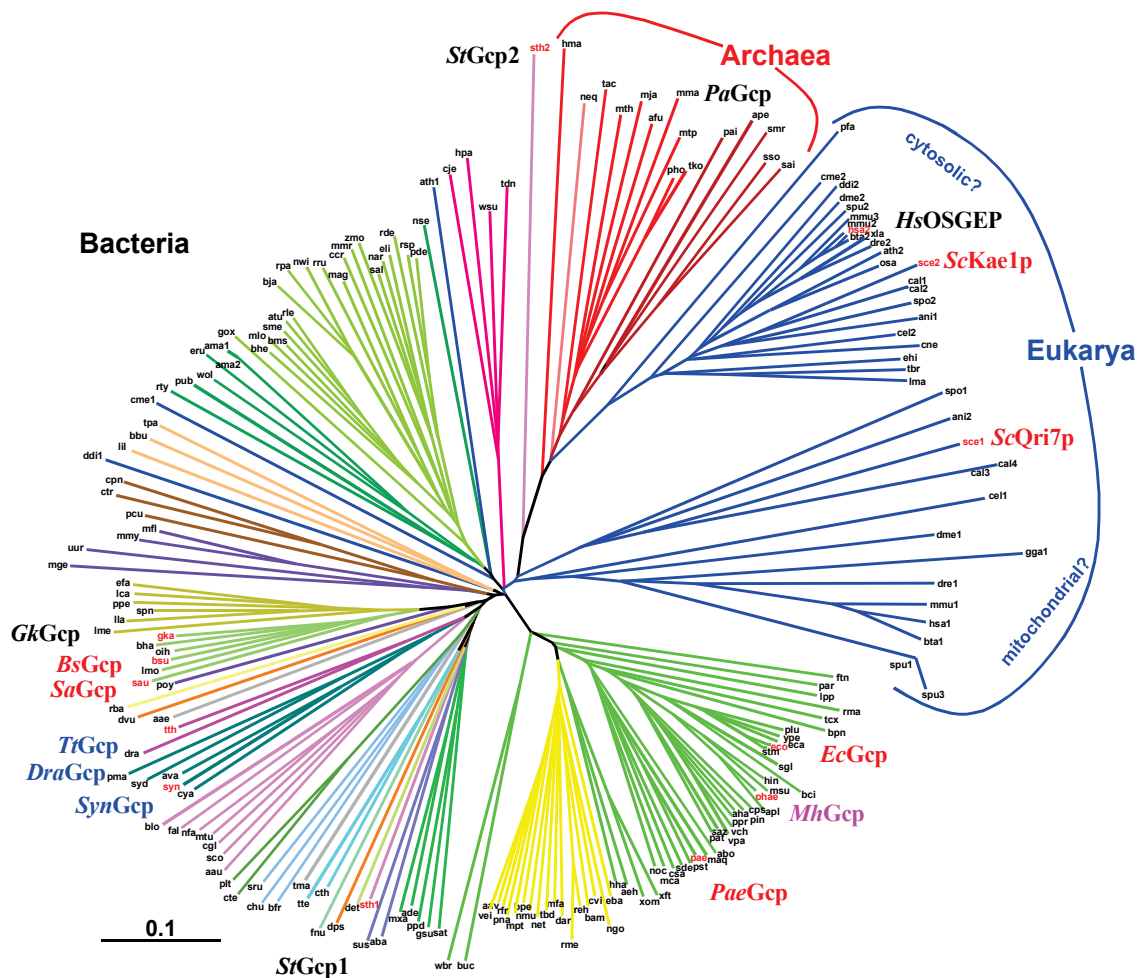


図 Gcp のアミノ酸配列に基づく系統樹。生物名は KEGG の略称で示した。同一の生物が複数の Gcp を有している場合には、数字を付して区別した。バクテリア及び古細菌の線の色は系統分類上の分類群と一致している。赤で示した名称は Gcp が必須であることが明らかなもの、青は必須ではないことが明らかなものを示す。Ec, 大腸菌; Mh, *M. haemolytica*; Bs, 枯草菌; Syn, *Synechocystis* PCC6803; Dra, *D. radiodurans*; Pae, *Pseudomonas aeruginosa*; Sa, *Staphylococcus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