

学 位 論 文 題 名

Study on Regulatory Mechanisms of the Expression
of Genes Coding for Isocitrate Dehydrogenase
Isozymes of a Psychrophilic Bacterium, *Vibrio* sp. Strain ABE-1

(好冷菌ビブリオ ABE-1 株のイソクエン酸脱水素酵素
アイソザイムの遺伝子発現調節に関する研究)

学位論文内容の要旨

あらゆる生物は様々な環境に適応して生息している。細菌の世界では真核生物と比べて、さらに厳しい環境でも適応して生育する種類が見つかっている。温度環境への適応もそのひとつである。好熱菌や高度好熱菌の発見とともに、細菌の高温適応に関する研究は細胞から分子レベルまで数多く報告されているが、一方の低温適応についての報告はまだ少ない。本研究では好冷菌の低温適応戦略を解明するためのアプローチの一つとして、好冷菌ビブリオ ABE-1 株のイソクエン酸脱水素酵素アイソザイム-I (IDH-I) と -II (IDH-II) の遺伝子発現調節機構について調べた。IDH-I は二量体の酵素で、大腸菌 IDH とアミノ酸配列の相同性が高く、広く生物界に分布している。他方の IDH-II は単量体であり、その酵素を持つ種の報告例は少ない。本菌の IDH-II は 20℃ で最大活性を示し、25℃ 以上で失活する低温適応酵素である。一般に細菌はどちらか一方の IDH のみを持つが、本菌はその両方を有している点で他に報告の例がない。IDH-I と -II をコードしている遺伝子 (*icdI*, *icdII*) のクローニングとシークエンスが当研究室でなされた時、単量体 IDH の全塩基及びアミノ酸配列の初めての報告であった。本研究はこれまでの研究を引き継ぎ発展させたものであり、第一章は両遺伝子の発現調節機構の違いについての研究報告、第二章は IDH-II の遺伝子発現と低温適応との関係についての研究報告である。

まず、これらの遺伝子の転写開始点をプライマー伸長法で同定してプロモーター領域を推定した。これによって、両遺伝子が染色体上では *icdII-icdI* の順番で同方向に連続して位置しているが、別々に転写されていることを示した。そしてこれらの遺伝子を別々に大腸菌に導入して発現させた結果、グルタミン酸要求性をもつ IDH 欠損株の大腸菌はいずれの場合でも野性型に復帰した。(*icdI* では 37℃ 培養、*icdII* では 15℃ 培養)。これは大腸菌で発現した両遺伝子産物、即ち IDH-I と -II が共に同じ生理機能を発揮していることを示している。ところが、*icdII* を導入した大腸菌を 37℃ で培養した場合には野性型に戻らなかった。ウエスタンブロットによって 37℃ でも IDH-II 蛋白質が検出されたので、37℃ で遺伝子発現はするものの、その温度不安定さゆえに酵素活性を失ったと結論された。つぎに両遺伝子の転写調節について、ノーザンブロット法で調べた。その結果、酢酸を生育培地に加えると、大腸菌およびビブリオ ABE-1 株細胞内でともに *icdI* の転写量は

約10倍にまで増加した。しかし *icdII* の転写量には何の変化も認められなかった。またこのとき大腸菌細胞内では IDH-I 蛋白質が磷酸化を受けて失活する一方で、ビブリオ ABE-1 株細胞内では磷酸化されずに失活もしないことが確認された。このような酢酸で誘導される *icdI* の調節機構は、大腸菌の酢酸で誘導される *ace* オペロンのプロモーター領域と *icdI* のプロモーター領域に高い相同性が見つかったことで、*ace* オペロンと同様な調節が行われていると説明できる。一方 *icdII* の転写は両細胞内で温度の影響を受けていることがわかった。大腸菌を15℃で培養すると37℃培養と比較して、その転写産物量が10倍以上に増加していた。同様な結果が0℃と15℃培養のビブリオ ABE-1 株の比較でも得られた。またリファンピンをを用いた mRNA 安定性の測定実験では、両 IDH の mRNA の安定性は大腸菌内で殆ど同じであった。従って低温培養による *icdII* の転写産物量の増加は、転写の誘導による増加であると結論できた。*icdII* のプロモーター領域には CCAAT という塩基配列があり、この配列は大腸菌で低温誘導性プロモーター領域の共通モチーフと考えられている。この塩基配列が *icdII* の転写でも機能している可能性があるので、この配列を取り除いたプラスミッドを PCR 法で作成した。そして、CCAAT 配列を除いた遺伝子では低温誘導が全く観察されなくなる結果を得た。このことは CCAAT 配列が低温誘導に不可欠であることを示している。さらに上流域に調節領域がないかを調べるために、デリーションプラスミッドによる発現実験を行った結果、転写開始点からおよそ530塩基対上流に35塩基対の範囲で低温発現を抑制する塩基配列があることがわかった。この領域を欠失させた遺伝子は *icd-II* の転写量が約20倍に増加した。この塩基配列は既知のシス - エレメントの配列とは全く相同性がなく、新規な配列であった。また、この配列に特異的に結合する蛋白質がゲルシフト検定により大腸菌で検出されたが、ビブリオ ABE-1 株では検出されなかった。これらのことより、*icdII* は大腸菌内で二つの異なる *cis* 調節領域の発現制御を受けていることがわかった。即ち、530塩基対上流の特異的蛋白質が結合する部位と、プロモーターの-35領域より僅か2塩基対上流にある CCAAT という配列である。大腸菌の低温誘導遺伝子では、そのプロモーター領域にある CCAAT 配列に特異的に作用する CS7.4 という蛋白質が知られている。この CS7.4 が *icdII* の低温誘導に関与している可能性が高い。この *icdII* 遺伝子は大腸菌に導入して栄養培地で生育させると、低温(15℃)での生長速度が促進されることがわかった。*icdII* を持たない株は生育の倍加時間が11.3時間であったが、*icdII* を持つ株は6.8時間にまで短縮された。この時の発現ベクターには上述の35塩基対の領域を除いてあるものを用いた。これを35塩基対の領域をもつもので調べてみると、中間の9.1時間を示した。このことは IDH-II 蛋白質の発現量が、大腸菌の生長速度に直接影響していることを示している。また上述の全ての大腸菌株は最少合成培地上で培養しても10℃という低温条件下ではコロニーを全く形成しないが、しかし0.05%の酵母抽出液を培地に加えると、*icdII* 遺伝子を持っている大腸菌だけがコロニーを形成した。アゾレクチンやカザミノ酸を培地に加えても効果はなかった。つまり、IDH-II が大腸菌の最低生育可能温度を低下させる働きを持ち、また酵母抽出液に含まれる、ビタミンや塩基などの生合成過程がその現象に直接関係していると考えられる。以上のように好冷菌 ビブリオ ABE-1 株の IDH-II 遺伝子とそのプロモーターとの組み合わせは、細菌の低温適応に重要な役割を負っていることを強く示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 米 田 好 文

副 査 教 授 落 合 廣

副 査 助教授 福 永 典 之

副 査 教 授 吉 田 静 夫 (大学院地球環境科学研究科)

学 位 論 文 題 名

Study on Regulatory Mechanisms of the Expression of Genes Coding for Isocitrate Dehydrogenase Isozymes of a Psychrophilic Bacterium, *Vibrio* sp. Strain ABE-1

(好冷菌ビブリオ ABE-1 株のイソクエン酸脱水素酵素
アイソザイムの遺伝子発現調節に関する研究)

生物の環境への適応、とりわけ温度適応現象についての生理、生化学的研究は、多くの研究者の関心を集め、様々な生物を材料とした研究が行われている。しかし、この分野に分子生物学的研究法が導入されたのは、最近になってからであり、主として、常温生物が急激な温度ストレスを受けたときに対応する遺伝子発現調節に関するものである。恒常的に低温、あるいは高温に適応した生物の遺伝子発現温度制御に関する研究は、未開拓な分野であり、生物の温度適応、進化を考察する際に、今後の発展が待たれている状況にある。

本研究は、このような現況にある生物の低温適応について、0 °C で活発に生育する好冷菌ビブリオ ABE-1 株を用いて、遺伝子発現の温度調節機構を分子生物学的に研究し、好冷菌の低温適応戦略を分子レベルで明らかにすることを目的として行われたものである。申請者は、この目的のため、先ず、既に好冷菌ビブリオ ABE-1 株からクローニングされているイソクエン酸脱水素酵素アイソザイム遺伝子、*icdI*、*icdII*、の大腸菌内での発現系を作製し、遺伝子発現におよぼす形質転換体の培養条件を検討した。その結果、*icdI* 遺伝子の発現は、培地中に酢酸が存在するときに、また、*icdII* 遺伝子の発現は、培養温度を低下させたときに、それぞれ特異的に誘導されることを見出した。*icdI* プロモーター領域には、酢酸誘導に関わる塩基配列が存在していた。*icdII* にコードされるアイソザイム IDH-II は、低温で高い酵素活性を保持する。このため、*icdII* 発現の低温誘導性に関する研究を集中的に進めた。*icdII* プロモーターの低温誘導性に関わるシス塩基配列を特定するため、プロモーター上流の非翻訳領域 (1,700 塩基対) 塩基配列を決定し、コンピューターによる検索を行ったが、遺伝子発現を制御すると報告されているシス塩基配列は見いだせなかった。このため、プロモーター上流域を段階的に削除し、遺伝子発現の低温誘導性を調べたところ、転写開始点の 522 塩基対上流にある 35 塩基対からなる配列が、低温誘導を抑制する因子として作用すること、また、転写

開始点の 37 塩基対上流の CCAAT 配列は、低温誘導に必須の因子として作用していることが分かった。さらに申請者は、形質転換された大腸菌の低温での生長速度が、低温で発現された IDH-II のレベルに依存することを発見し、低温に適応した酵素 (IDH-II) と低温誘導性プロモーターがセットになっていることが、低温適応上、重要な戦略となっていることを証明した。

これを要するに、著者は、好冷菌の低温適応について分子生物学的な新知見を得たものであり、生物の温度適応の分子論的解明に貢献するところ大なるものがある。

よって、著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。