

論文の内容の要旨

論文題目 *Exiguobacterium* 属におけるグアノシンキナーゼ
の同定とその酵素学的及び分子生物学的研究

氏 名 白田佳弘

[序]

生物にとってヌクレオチドは DNA あるいは RNA の構築単位となる生体物質であり、細胞の増殖や機能には十分かつバランスのとれたヌクレオチドの合成が必要である。特にプリンヌクレオシド 5'-モノリン酸は核酸のみでなくヒスチジンあるいは補因子の生合成中間体であり、代謝において重要な役割を果たしている。多くの生物はプリンヌクレオチドの生合成経路として *de novo* と呼ばれる小分子からの生合成経路とともにサルベージ経路と呼ばれる既存のプリンを利用する経路を有している。プリンヌクレオシドからプリンヌクレオチドへのサルベージ経路としては2つの経路が知られている。1つはプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNPase) の作用によりプリンヌクレオシドから生じたヌクレオベースをプリンホスホリボシルトランスフェラーゼにより対応するヌクレオチドに変換する経路である。もう1つの経路はヌクレオシドキナーゼの作用により直接リン酸化する経路である。グアノシンキナーゼ (GKase) はグアノシンから 5'-GMP への直接のリン酸化反応を触媒する酵素である。グアノシンキナーゼ活性は原核細胞及び真核細胞のいずれにも報告はされているが、その微弱な活性を無細胞抽出液中においてヌクレオベース経由の経路と区別して検出することは困難とされてきた。唯一、グラム陰性バクテリア *Escherichia coli* においては GKase 活性をコードする遺伝子として *gsk* が単離されるとともに、その遺伝子産物の酵素学的性質についても検討が加えられている。その他の生物では原虫あるいは

植物のミトコンドリアなどから部分精製の報告があるのみであり、ほとんどの生物においてはその存在自体が不明であった。

Brevibacterium acetylicum はグラム陽性の *Brevibacterium* 属に分類されてきたが、16S rRNA の系統学的研究から *Exiguobacterium* 属へ移されることとなった。*Exiguobacterium* 属には *Exiguobacterium aurantiacum* が通性好アルカリ菌として知られており、この新たな分類により *Exiguobacterium* 属は *Bacillus* 属に比較的近縁であるとされている。

[方法と結果]

1章 *Brevibacterium acetylicum* ATCC953 株グアノシンキナーゼの同定、精製、及び酵素学的諸性質の解明

グアノシンキナーゼ活性の探索のためには直接のリン酸化活性をグアニン經由のサルベージ活性と区別して測定する必要があった。基質として¹⁴Cラベルのイノシンを用い、GKase 特異的な検出のため非ラベルのヒポキサンチンを反応系に過剰に添加する系を用いることにより、リン酸化経路を区別した測定を可能とした。*Brevibacterium* 属細菌 42 株について検討を行った結果、GKase 活性は *B. acetylicum* ATCC953 株にのみ認められた。大量培養菌体から無細胞抽出液を調製し、各種カラムクロマトグラフィーにより GKase 活性の精製を行い、均一な標品を得た。SDS-PAGE によるサブユニット分子量 36,300 とゲル濾過クロマトグラフィーによるネイティブ分子量約 71,300 及びクロスリンク実験によって GKase はダイマー酵素と推定された。精製酵素は Mg²⁺ 及び ATP に対する依存性を示し、*B. acetylicum* GKase によるグアノシンのリン酸化反応が Mg²⁺-ATP 複合体を基質の 1 つとして利用するキナーゼ反応であることが示された。GKase のリン酸化活性はグアノシン、イノシン、及び 2'-デオキシグアノシンに対して認められたが、K_m 値及び V_{max} 値からグアノシンが他に比較してはるかに効率的な基質であることが示され (表)、生理的な基質はグアノシンであることが推定された。各種ヌクレオチドをリン酸供与体として反応を行ったところ、ATP、dATP、GTP、及び dGTP が良いリン酸供与体となった。ヌクレオチドの添加効果について検討したところ、低濃度の添加ではピリミジンヌクレオチド、特に CMP あるいは CTP の添加によって GKase は活性化された。逆に、高濃度添加では AMP、ADP、あるいは GMP といったプリンヌクレオチドによる阻害効果が認められた。これら

の結果は本酵素が細胞内でヌクレオチドレベルによって調節を受けることを示唆した。

表. *B. acetylicum* GKase の速度定数

Substrate	K _m (mM)	V _{max} (U/mg)	Efficiency (V _{max} /K _m)
guanosine	2.2 × 10 ⁻²	220	10,000
inosine	0.9	36	41
2'-deoxyguanosine	2.8	59	21

2章 *Brevibacterium acetylicum* ATCC 953 株グアノシンキナーゼ遺伝子のクローニングと解析

B. acetylicum ATCC 953株由来GKaseのN末端アミノ酸配列を基にPCR法を用い、*B. acetylicum* ゲノムよりN末端領域に対応する断片を増幅した。この断片をプローブとし、*gsk* 遺伝子を含む断片を単離した。本遺伝子断片を保持する*E. coli* において数百倍の活性上昇とイノシン依存の生育促進が認められた。*B. acetylicum gsk* 遺伝子ORFは推定分子量32,536の303アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。タンパク質データベースの相同性検索を行った結果、*B. acetylicum* Gsk はリボキナーゼ、真核生物由来ケトヘキソキナーゼ等を含む糖リン酸化酵素と有意の相同性を示した。*B. acetylicum* Gskは同じヌクレオシドを基質とする*E. coli* Gskとは低い部分的な相同性を示すのみであるのに対し、*E. coli* リボキナーゼとはほぼ全長にわたって22%の一致が認められ、*B. acetylicum* Gskはリボキナーゼファミリーに属する典型的なヌクレオシドキナーゼであることが明らかとなった。ノザンハイブリダイゼーション及びプライマー伸長法による転写産物の解析から*gsk* の遺伝子構成が下流の第二のORF (*orf2*) とオペロンを構成すること、*E. coli* σ^{70} のコンセンサス配列と非常によく一致するプロモーター配列を有することが明らかとなった。

グアノシンを基質として共有するGKaseとPNPaseの役割について検討するため、*B. acetylicum* の無細胞抽出液中の両酵素の比活性を測定した(図)。培養経時(図A)において、GKase活性は増殖初期に上昇したが、増殖後期から定常期には低下した(図B)。逆に、PNPase活性は増殖初期に低下し、増殖後期から定常期に高レベルに回復する対照的なパターンを示した(図C)。プライマー伸長法によって*gsk* の転写レベルでの遺伝子発現を検討したところ増殖初期に活発な*gsk* 遺伝子の転写が認められ、GKase活性のプロファイルと一致した(図D)。

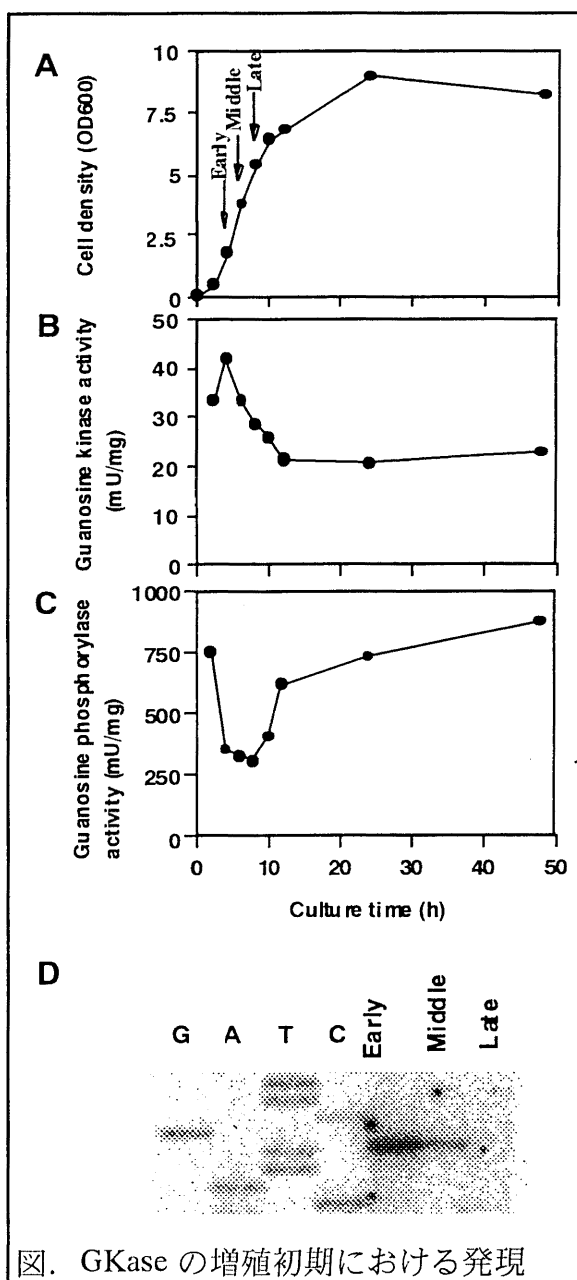


図. GKase の増殖初期における発現

3章 *Exiguobacterium* 属類縁菌株におけるグアノシンキナーゼ活性の検索と *Exiguobacterium aurantiacum* ATCC35652 株由来のグアノシンキナーゼ遺伝子の解析

B. acetylicum が *Exiguobacterium* 属に再分類されたことから類縁菌株における GKase 活性の分布を検討した。類縁12種の GKase 活性を測定したが、*B. acetylicum* と同レベルの活性を示した株は同属の通性好アルカリ菌 *Ex. aurantiacum* ATCC 35652 株のみであった。*Ex. aurantiacum* *gsk* 遺伝子を *B. acetylicum* *gsk* 遺伝子との相同性を用いてクローニングした。両 *gsk* 遺伝子のアミノ酸配列はよく保存されており、リボキナーゼファミリーに保存的なアミノ酸はよく保存されていた。基質に対する K_m 値あるいは pH の影響といった酵素学的な特徴もよく一致していた。転写解析の結果から、*Ex. aurantiacum* *gsk* 遺伝子は増殖初期に転写され機能していると推定される点では一致したが、下流には *B. acetylicum* *orf2* に相当する遺伝子は見いだされず、オペロンを構成しないことが明らかとなった。Gsk の C 末端に相当する領域から 3'-非翻訳領域にかけて大きな変化が認められた。

[考察]

E. coli 以外では存在すら知られていなかったグアノシンキナーゼ活性が新たなアッセイ法を用いることによりグラム陽性菌の *Exiguobacterium* 属に同定され、その活性分布が限定されていること、*Exiguobacterium* 属の *gsk* 遺伝子構成に大きな差異があることが明らかとなった。*B. acetylicum* はグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ活性も有しており、本菌株にはグアノシンから直接の GMP 生成及びグアニン経由の GMP 生成という2つのサルベージ経路が存在する。転写解析の結果から *gsk* 遺伝子が菌体の増殖初期に特異的に発現していることが明らかとなり、GKase が DNA 及び RNA 合成が盛んな増殖期にグアノシンを積極的に利用する役割を担っていることが示唆された。これに対し、PNPase 活性は増殖後期から定常期にかけて細胞内の余剰のグアノシンを分解し、グアニンとして再利用あるいは分解する役割を担っていることが推定される。*B. acetylicum* GKase がプリンヌクレオチドにより阻害され、ピリミジンヌクレオチドにより活性化されることから、GKase は細胞が増殖初期にあるときグアノシンを効率的にリサイクルすることによってヌクレオシドモノリン酸のレベルを調節していることが推定された。ヌクレオシドはキナーゼによる直接のリン酸化によっては1モルの ATP を用いて ADP を生じることによりヌクレオシドモノリン酸を生成することができるが、ヌクレオシドをヌクレオベースを経由して変換する場合には実質2モルの ATP を必要とする。他方、細胞が増殖期から定常期に入ると過剰のヌクレオチドはヌクレオシドを経てヌクレオベースとリボースに分解され、エネルギー源として利用することが有利になると考えられる。酵素活性の調節様式からも本酵素活性は単なる余剰のプリン体の再利用のみでなく、細胞の DNA 複製あるいは RNA 合成に積極的な役割を果たしていることが推定された。