

深海底より分離された微生物からの グルタミン合成酵素遺伝子の単離とその性質

中村 由香^{*1} 加藤 千明^{*1} 大橋 由明^{*2}
木村 絹子^{*2} 掘越 弘毅^{*1}

高水圧下の深海底に生育する微生物は、その遺伝子の発現が、圧力により制御されていると考えられており、そうした微生物を材料として、圧力による遺伝子発現の調節機構の解明に興味を持たれている。我々は、深海より分離された、好圧性細菌DB 6705株、及び耐圧性細菌DSS12株より、窒素代謝においてその重要性が指摘されている、グルタミン合成酵素（GS）に着目し、同遺伝子の単離とその圧力下における発現の解析を行った。その結果、両者の微生物において、いずれの生育可能な圧力下においても、GSの発現が確認され、こうした微生物の生育に必須な遺伝子は、転写レベルでどのような状況下でも発現できるような、複雑な機構を有していることが示唆された。

キーワード：深海微生物，好圧性細菌，窒素代謝，グルタミン合成酵素，高水圧，
遺伝子発現

Gene cloning of glutamine synthetases of high pressure adapted bacteria isolated from deep-sea, and their gene expressions controlled by high pressure

Yuka NAKAMURA^{*3} Chiaki KATO^{*3} Yoshiaki OHASHI^{*4}
Kinuko KIMURA^{*4} Koki HORIKOSHI^{*3}

We are interested in analyzing the gene expression mechanisms controlled by pressure in deep-sea adapted microorganisms. To investigate such mechanisms, the glutamine synthetase (GS) genes, which had a important function in nitrogen metabolism pathway, were cloned and sequenced from deep-sea barophilic strain DB6705 and barotolerant strain DSS12. The results of primer extension analysis suggested that their regulation, controlled by pressure, would be more complicated at the transcription level, and insured the expression at any pressure conditions which these organisms were able to grow.

Key Words : Deep-sea microorganisms, Barophilic bacteria, Nitrogen metabolism, Glutamine synthetase, High pressure, Gene expression

*1 深海環境プログラム，深海微生物研究グループ

*2 立教大学，理学部，生化学研究室

*3 The DEEPSTAR Group

*4 Laboratory of Biochemistry, College of Science, Rikkyo (St. Paul's) University

1 はじめに

深海という世界の最大の特徴は、高水圧環境にある。こうした世界から分離された微生物は、高水圧下に適応した生命維持機構をもっていると考えられている。我々は、これまでに、当センターの保有する有人潜水調査船「しんかい6500」等の潜航で得られた深海底泥サンプルより、いくつかの現場環境に適応している深海微生物（好圧性細菌：大気圧下では生育できず、高圧下でのみ生育する微生物、耐圧性細菌：大気圧下でも高圧下でも生育できる微生物）を分離し、その性質について報告した（1, 2）。これらの微生物は、加圧に応答して遺伝子発現を促進させるシステムをもち、そうした応答は転写のレベルで調節を受けていることが明らかとなっている（3-5）。このような圧力に応答した遺伝子発現の機構の解明は、我々の惑星における生命の誕生と進化を考える上で、極めて興味深い研究テーマであることが指摘されている（6-8）。

また一方、多くの微生物において、窒素代謝及びアミノ酸合成において極めて重要な役割を担っているグルタミン合成酵素（以下、GS）は、その活性発現の興味深さから比較的研究が進んでいる酵素のひとつである。そこで、深海微生物のGSは、その発現の調節機構が、これまで知られている微生物と比較してどのような特徴をもち、いかに圧力の影響を受けるのか調べることは、本研究室にとって極めて興味深いテーマのひとつである。今回は、深海より分離された好圧性細菌DB6705株及び、耐圧性細菌DSS12株よりGS遺伝子をクローン化し、それらの塩基配列を決定後、本遺伝子の発現が加圧に対していかに応答するか調べたので、その結果について報告する。

2 方法と結果

2.1 深海微生物DB6705株、DSS12株の性質

材料として用いた、好圧性細菌DB6705株と耐圧性細菌DSS12株の生育に対する温度と圧力の影響を、図1に示した。DB6705株は、15℃、60MPa（600気圧に相当）にその生育の至適をもつ好圧性の高い微生物であり、DSS12株は、8℃、30MPaを至適とするが、大気圧下から70MPaまで良好に生育する耐圧性の微生物である。（1, 9）。16SリボゾームRNAをコードするDNA塩基配列の比較から進化系統樹を作成したところ（図2）、これらの深海環境に適応した微生物は、プロテオバクテリアガンマサブグループに属し、*Shewanella benthica*を含む一群のサブブランチを形成していることが明らかとなった。

Shewanella 属の標準株は、*Shewanella putrefaciens* であることから、この深海微生物のグループを *Shewanella* 属として括るのには無理があるため、我々は、現在このグループを新属として提唱する準備を進めている。DB6705株、DSS12株ともに、本グループに含まれ、圧力に対する生育のパターンの違いを除けば、系統学的に極めて近い関係にある微生物であることが考えられる。従って、両者の微生物の遺伝子発現における圧力の影響を比較することにより、好圧性と耐圧性の違いについて明らかとすることが、可能であると考えている。

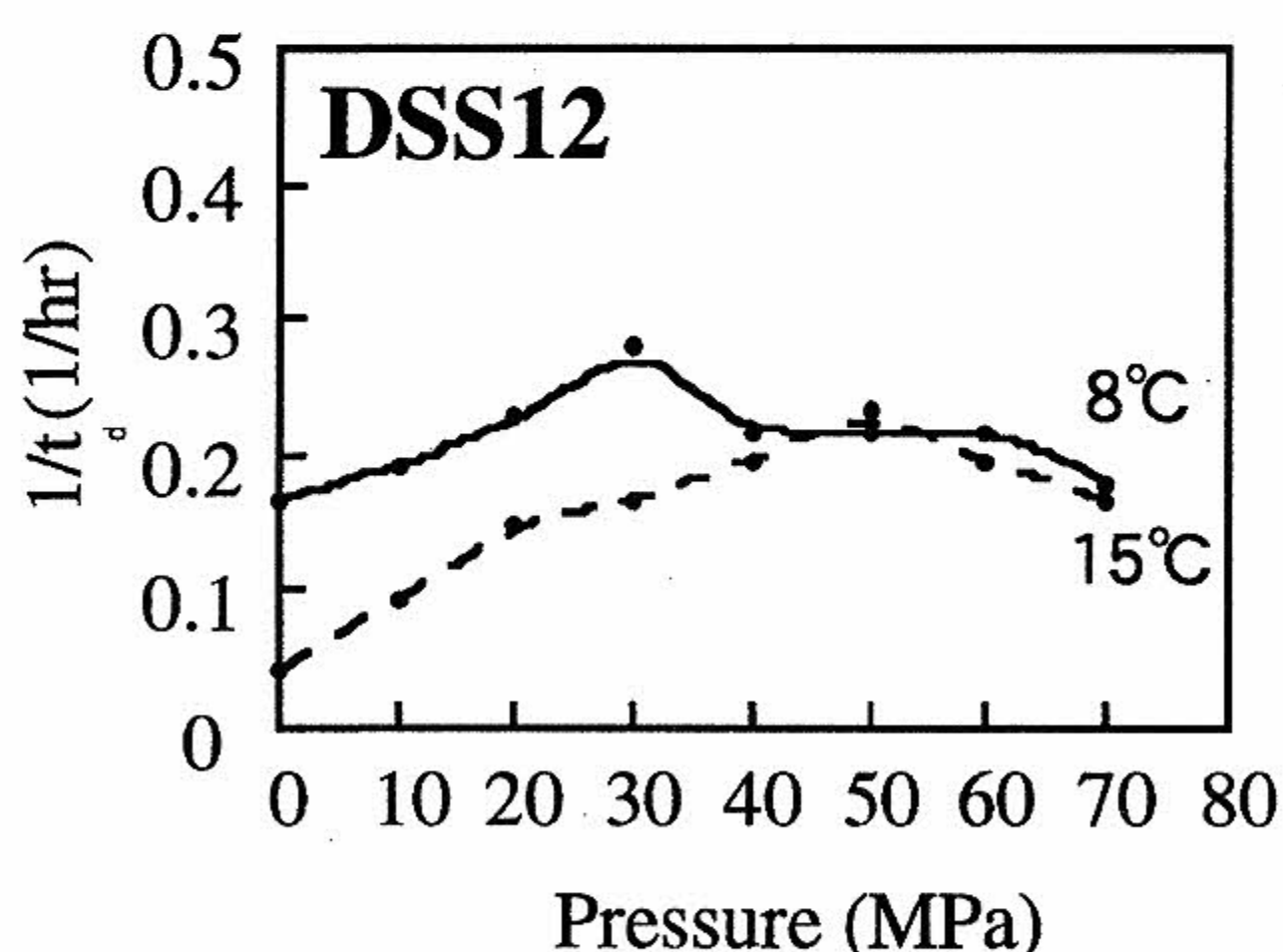
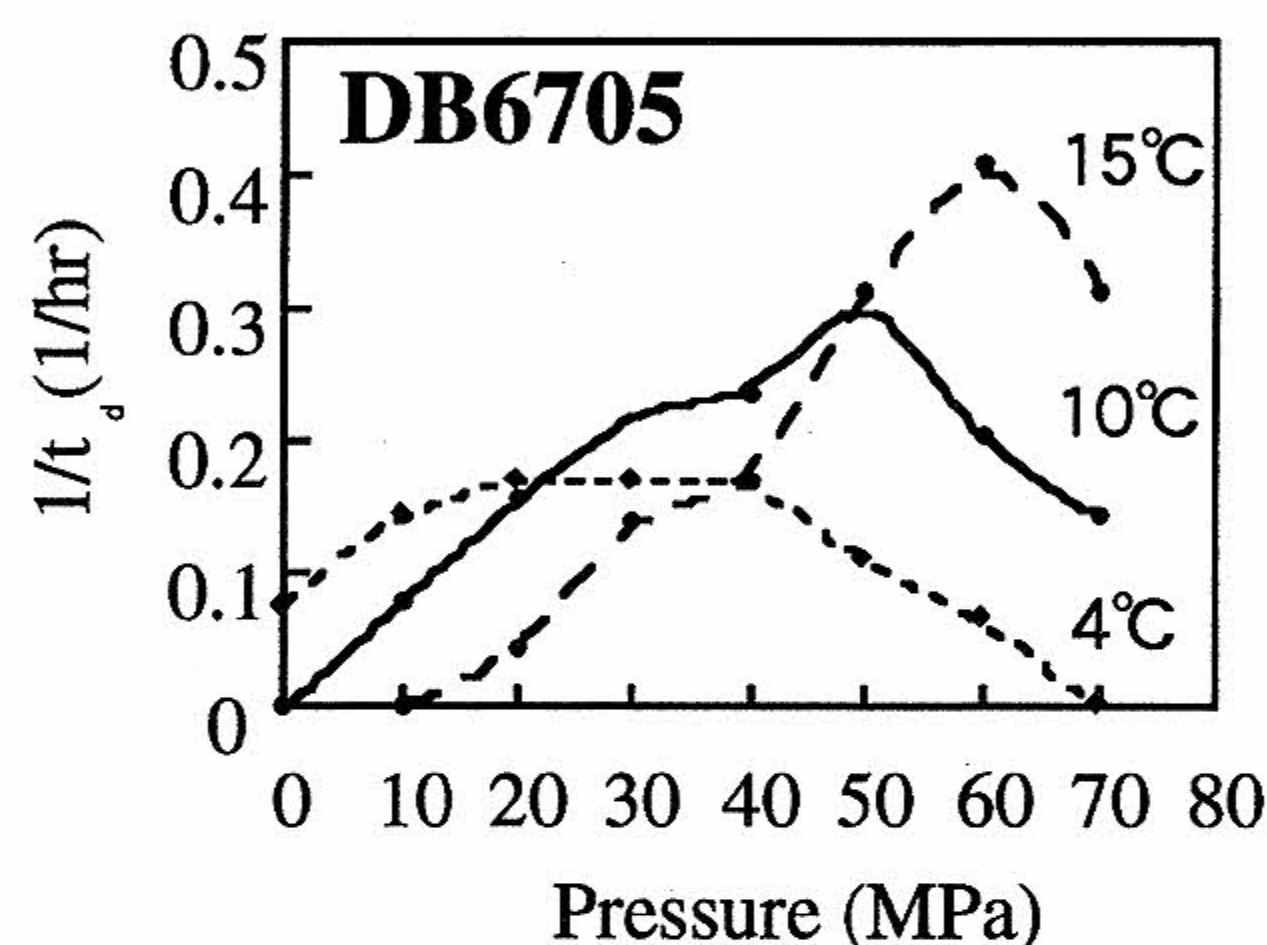


図1 深海環境より分離された好圧性細菌DB6705株、及び耐圧性細菌DSS12株の生育に対する圧力、温度の影響

Fig. 1 Growth effect on different pressures and temperatures in deep-sea adapted bacteria, barophilic strain DB6705 and barotolerant strain DSS12.

2.2 グルタミン合成酵素 (GS) 遺伝子のクローニングとシーケンス

DB6705株, DSS12株DNAをそれぞれ, 制限酵素, *Sau* 3 AI 部分分解, *Sac*I 分解処理を施し, ベクター pUC 118の*Bam*HI, *Sac*I サイト中に連結した。その後それぞれの反応液にて, 大腸菌 YMC11株 (GS⁻) を形質転換し, 最小培地上にて, 室温, 2週間の培養*を行い, 得られたコロニーからGS遺伝子を含むものを選んだ。得られた組み換え体プラスミドは, DB6705由来GSを含むものを, pYNGS1, DSS12由来GSを含むものをpIYGS1とした。図3に手順を示した。(*本遺伝子は, 大腸菌において37℃では発現しない。)

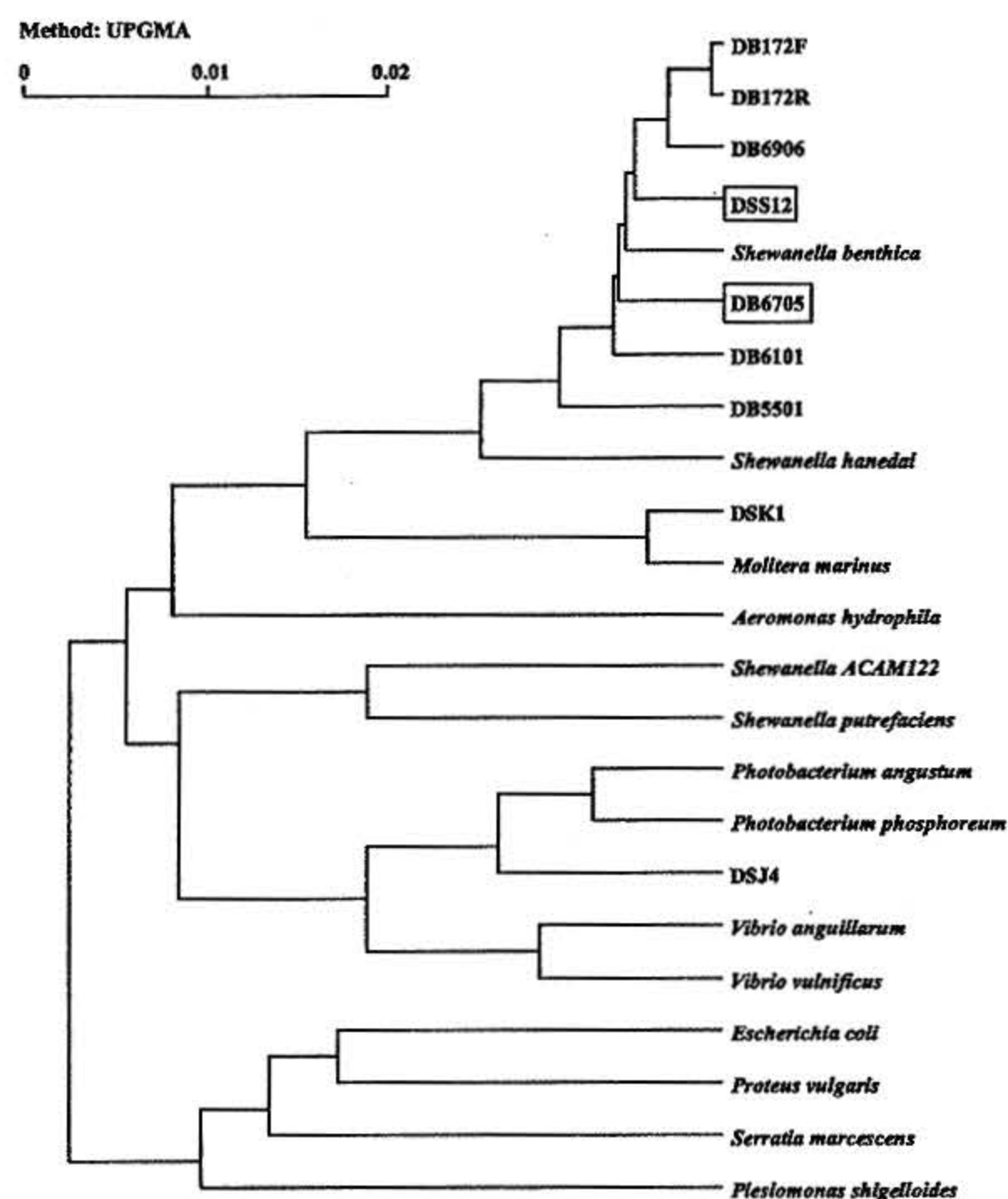


図2 UPGMA法による16SリボゾームDNA塩基配列の比較からの進化系統樹

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences using UPGMA method.

得られたプラスミドについて制限酵素切断点地図を作成し, サブクローニングを行い, 全DNA塩基配列の決定に成功した。決定された塩基配列から, いくつかのオープンリーディングフレームが見いだされ, データベースとの相同性探索からGSをコードする遺伝子 *glnA* が含まれていることが示された (図4)。pYNGS1 及び pIYGS1 において, *glnA* の上流にオープンリーディングフレーム (UORF) が逆向きに存在していることが示され, より大きな断片を含む pIYGS1 においては, その下流に *glnA* と同方向に二つの ORF (DORF, *ntrB*) が見いだされた。決定された両者の塩基配列には, 高い相同性が見いだされた。両者を比較した結果を図5に示した。

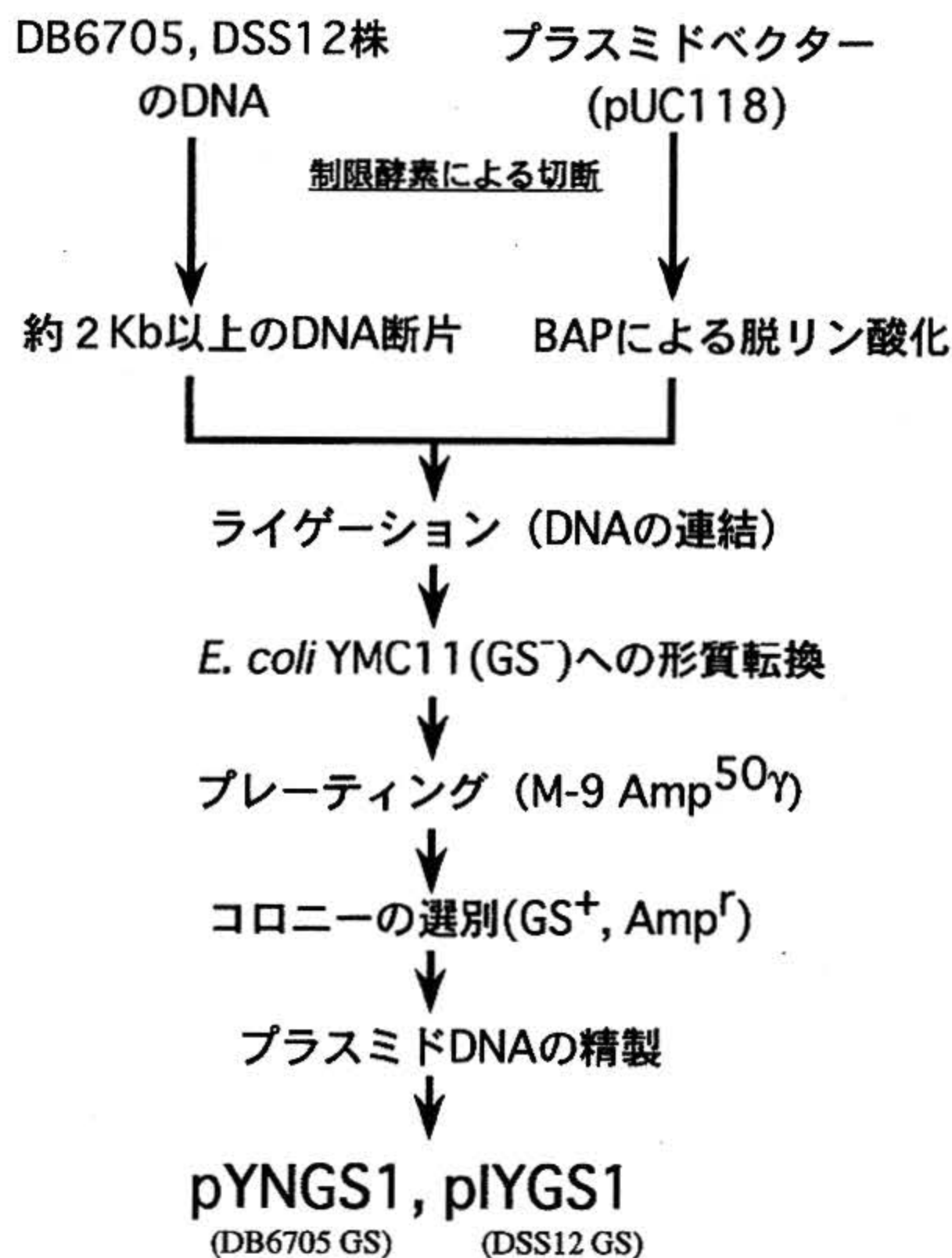


図3 グルタミン合成酵素 (GS) 遺伝子のクローニングの手順
Fig. 3 Procedure of GS gene cloning.

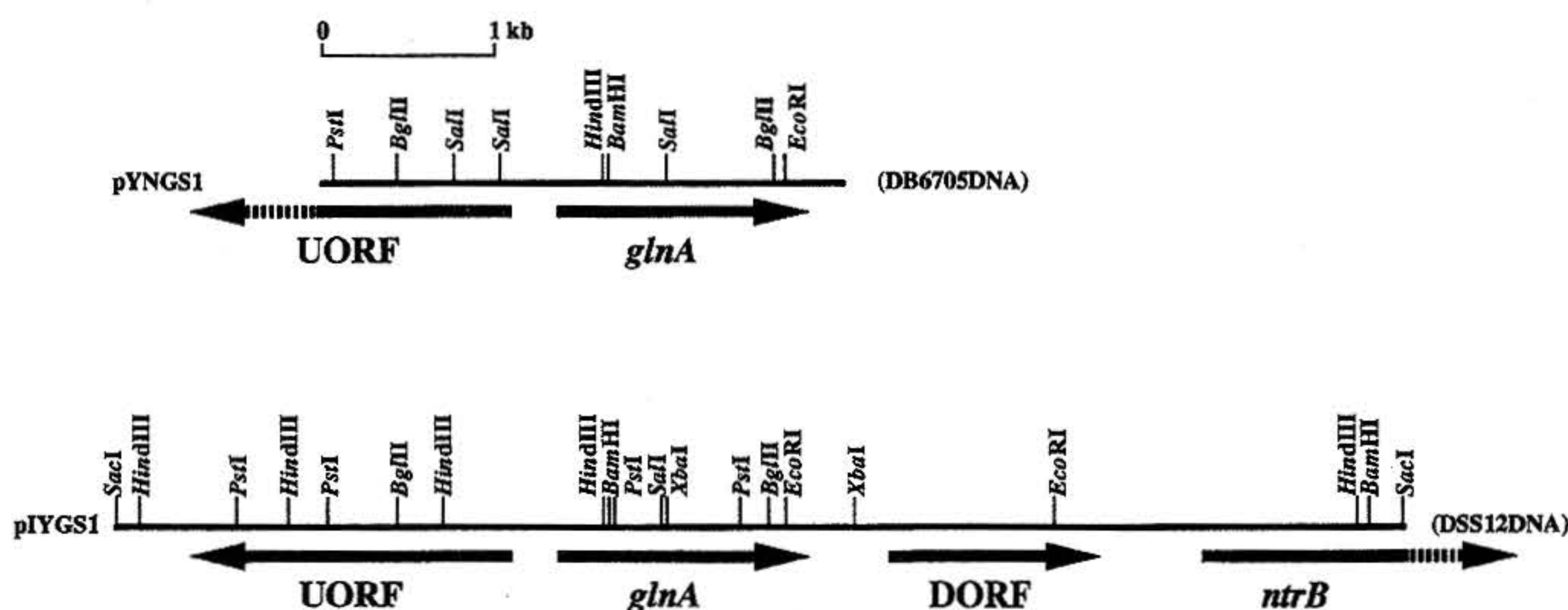


図4 クローン化された, GS遺伝子を含むDNA断片の制限酵素切断点地図と, 推定されたオープンリーディングフレーム
Fig. 4 Restriction maps of the cloned fragments containing *glnA*, and deduced open reading frames.

1'	GATCCGGGCTTTTCAGT		
1141'	TAGAATTGACAGGTGAAGCTCACCACGACCAAGAAACGGAACGATCCGGGCTTTTCAGT		
17'	CTCTTCCACACGTAGTGCCACGTTGTGAACATAATTCACGCTGCAGACGCTCGAAGATGTT		
1201'	CTCTTCCACACGTAGTGCCACGTTGTGAACATAATTCACGCTGCAGACGCTCGAAGATGTT		
77'	ACGTGAAGTACGCTACTTACCTTCTTTACCGGCAACGAGAGGTGTGACCTGGAAGGT		
1261'	ACGTGAAGTACGCTACTTACCTTCTTTACCGGCAACGAGAGGTGTGACCTGGAAGGT		
137'	CATTGTGAGAGTAGGCTCATCGACAGACAGTGGCTCTAATGCTTCTACGTTAGTAGTTGC		
1321'	CATTGTGAGAGTAGGCTCATCGACAGACAGTGGCTGGCAATGCTTCTACGTTAGTAGTTGC		
197'	ACAAACAGTATCTGAGATAAGTAGTTGACCCAGACCGGTGATAGCCAGATGTCACCGGC		
1381'	ACAGACAGTATCTGAGATAAGTAGTTGACCTAGACCTGTAATAGCCAGATGTCACCGGC		
257'	ATTACCGACTTCAACTTCGTGCGATCCAGACCAATGTAACCAAGAACCTTGCCAACTTT		
1441'	ATTACCGACTTCAACTTCGTGCGATCCAGACCAATGTAACCAATACCTGCGCAACTTT		
317'	ACCGTTACGCTTAGTGCCATCGGCGCTAATGATAGTAATGTTGTTAGTCTTGATACT		
1501'	ACCGTTACGCTTAGTGCCATCGGCGCTAATGATAGTAATGTTGTTAGTCTTGATACT		
377'	ACCGCGCTTGATGCGACCAATACGATAACACCTACATAAGAGTTGTAATCGATCTGAGA		
1561'	ACCGCGCTTGATGCGACCAATACGATAACACCTACATAAGAGTTGTAATCGATCTGAGA		
437'	GATCTGCATCTGTAATCGCGCTGTCATCAGCATCTGGTGAAGAACTTTCTCGACGAT		
1621'	GATCTGCATCTGTAATCGCGCTGTCATCAGCATCTGGTGAAGAACTTTCTCGACGAT		
497'	AGTCTCGAACAATGACGTCATGTCGCTTGGTGACGTGAGGTCAGACCGGCAAAACC		
1681'	AGTCTCGAACAATGACGTCATGTCGCTTGGTGACGTGAGGTCAGACCGGCAAAACC		
557'	GTGCAATGCGAAGCATAAAGATTGGGAAGTCTAATGCTCATCGGTAGCACCTAAGTT		
1741'	GTGCAATGCGAAGCATAAAGATTGGGAAGTCTAATGCTCATCGGTAGCACCTAAGTT		
617'	GTGCAACAGGTGCGAAGACTTGATCGATAACCAATCAGGACGCGGCCAGGACGGTCAAT		
1801'	GTGCAACAGGTGCGAAGACTTGATCGATAACCAATCAGGACGCGGCCAGGACGGTCAAT		
677'	CTTGTGATAACAACAATAGGCTTAAGACCTAGGCGGAAGGCTTTCTTGTGTTACGAGCG		
1861'	CTTGTGATAACAACAATAGGCTTAAGACCTAGGCGGAAGGCTTTCTTGTGTTACGAGCG		
737'	AGTCTGAGGCATTGGACCGTCAACTGCGTCGACAAGCAATACTGAATCAACCATAGA		
1921'	AGTCTGAGGCATTGGACCGTCAACTGCGTCGACAAGCAATACTGAATCAACCATAGA		
797'	AAGAACGCGCTCAACTTCCACACCGAAATCGGCGTGACCTGGAGTATCCACGATGTTGAT		
1981'	AAGAACGCGCTCAACTTCCACACCGAAATCGGCGTGACCTGGAGTATCCACGATGTTGAT		
857'	ACGGTAATCGTTCCACTTGATGGCAGTGTCTTTGCAAGAACTGATGTTCCAGTTCCCTT		
2041'	ACGGTAATCGTTCCACTTGATGGCAGTGTCTTTGCAAGAACTGATGTTCCAGTTCCCTT		
917'	TTCAAGATCGTTTGAATCCATCACCCTGAGTGGCTTCTCTCGGGTCTCAAGAGTTCC		
2101'	TTCAAGATCGTTTGAATCCATCACCCTGAGTGGCTTCTCTCGGGTCTCAAGAGTTCC		
977'	AGACTGCGTCAGCAACTTATCTACCAAGGTAGTTTACCATGGTCAGCGTGTGCAATAAT		
2161'	AGACTGCGTCAGCAACTTATCTACCAAGGTAGTTTACCATGGTCAGCGTGTGCAATAAT		
1037'	GGCGATGTTACGTAATTTCTTAACACTGATAAACCTTCTTACCATCTATATATAGTGGGA		
2221'	GGCGATGTTACGTAATTTCTTAACACTGATAAACCTTCTTACCATCTATATATAGTGGGA		
1097'	TATTTGAAACAGCCTTAATAATAGCTGTTGGAATAAAAAACGTGCCATCTACTCTAGCC		
2281'	TATTTGAAACAGCCTTAATAATAGCTGTTGGAATAAAAAACGTGCCATCTACTCTAGCC		
1157'	TAGTGTCTCTCGACAGGATTATTTTAAATCAGCTATGAATAGTATGTTTGGCTGCCTT		
2341'	TAGTGTCTCTCGACAGGATTATTTTAAATCAGCTATGAATAGTATG-TTGTCTGCTT		
1217'	CGCACCATCATGTTGATCGCACCAAAATCGACCACTTGACGCAACCATCATAGTGCATCT		
2400'	CGCACCATCATGTTGATCGCACCAAGATCGAACACTTAGCGCACCAATATGTTGCGAACT		
1277'	TTCATATCTGCGTCGACATGTCGCTTCTGTTTCTTAAATAACATAACCTTACGATTTT		
2460'	TTCATATATGCTTACAGCCTATCTTAAATATGTTTAAATAACATAACCTTATATTTT		
1337'	GGCAGAGTCTAGCTTATTAAGTCAAGATCGCATAGAAGCGCTAAT-----TAGAA		
2520'	GGCAGAGTCTAGCTTATTAAGTCAAGATCGCATAGAAGCGCTAAT-----TAGAA		
1391'	ATATATAAGGGCTTAGCCTTACCTTACCTGAGAGCTTAGATGTGAGCTGAATCAGTTT		
2579'	ATATAAAGGGCTAAGCCTTACCTTACCTGAGAGCTTAGATGTGAGCTGAATCAGTTT		
1451'	TACAACAACCTCAAGAAATTAGAAGTTAAGTTTGTGATCTACGCTTTACCGATACCGGTG		
2639'	TACAACAACCTCAAGAAATTAGAAGTTAAGTTTGTGATCTACGCTTTACCGATACCGGTG		
1511'	GTAAAGAACAGCACGCTCAATCCCTTCACATCAGGTCGATGAAGACTTTTGAAGACG		
2699'	GTAAAGAACAGCACGCTCAATCCCTTCACATCAGGTCGATGAAGACTTTTGAAGACG		
1571'	GCAAGATGTTGATGGTTCATCTATTAATGTTGGAAGGGCATCAACGAATCCGACATGG		
2759'	GCAAGATGTTGATGGTTCATCTATTAATGTTGGAAGGGCATCAACGAATCCGACATGG		
1631'	TGTTGATGCCAGATCCTGAAAGCTTCGTACTGGATCCTTTACCGCAGATACCGGCTA		
2819'	TCTTGATGCCAGATCCTGCAAGCTTCGTACTGGATCCTTTACCGCAGATACCGGCTA		
1691'	TTATACGTTGCGATATCTCAATCCTGGCACCATGACAGGGTATAATCGTGACCGCGCT		
2879'	ACATTCGTTGTGACATCTTAACTCCTGGTACTATGACAGGTTATAACCGTGACCGCGCT		
1751'	CTATCGCCAAGAAAGCCGAGAGTACCTGCGTCTACCGGTATAGCGGATACGTTCTTGC		
2939'	CTATCGCCAAGAAAGCCGAGAGTACCTGCGTCTACCGGTATAGCGGATACGTTCTTGC		
1811'	TCGGCCAGAGCCTGAGTTCTTCTGTTTGTATGACGTTAAATATGGCTCCGATATGTCG		
2999'	TCGGCCAGAGCCTGAGTTCTTCTGTTTGTATGACGTTAAATATGGCTCCGATATGTCG		
1871'	GCTGTTCTATAAGCTAGACGCGGAAGAGCCAGCTGGAAGTCAAGAACAGCTACGAAG		
3059'	GTTGTTCTTACAAGGTCGATGCCAAGAGCTGCTGGAAGTCAAGAACAGCTACGAAG		
1931'	GTGGTAACACGGGTCACCGTCAAGCGTTAAGGGCGGATACTTCCCTGTGCTCCGGTCC		
3119'	GCGGTAAACAGGGTCACCGTCAAGCGTTAAGGGTGTACTTCCCTGTAGCAGCGGTCC		
1991'	ACTCTTCAAGATATCCGTAGCGCTATGTTCTTATCTCGAGGAGATGGGTGAGTTG		
3179'	ACTCTTCAAGATATCCGTAGCGCTATGTTCTTATCTCGAGGAGATGGGTGAGTTG		
2051'	TCGAGGCTCATCCACATGAAGTTGCGACGCGCGGTGCAAGAGATCGCCACAGCTTCA		
3239'	TTGAAGCAGATCACCACGAAGTGGCAACTGCGGTCAAGAGATCGCGACTCGCTTCA		
2111'	ACACACTAACGCTCAAGGCGGATGAAGTTAGGTATTAATATGTAGTGCATAACGTCG		
3299'	ACACACTAACGCTCAAGGCGGATGAAGTTAGGTATTAATATGTAGTGCATAACGTCG		
2171'	CCCAGTCTACGGCAAGACTGCCACCTTTATGCTTAAGCCTATCGTTGGCGACAATGGTA		
3359'	CTCAGGCTTATGTTAAGACAGCTACCTTTATGCTTAAGCCTATCGTTGGCGACAATGGTA		
2231'	GCGGTATGCAGCTTCATATCTCGCTGGCTAAAGATGGCACTAATTTATCGCGGTGACA		
3419'	GCGGTATGCAGCTTCATATCTCGCTGGCTAAAGATGGCACTAATTTATCGCGGTGACA		
2291'	AATACGCGGATTGAGCGAGTTGGCTATCTATTTATCGGTGGAGTTATCAAGCATGCTC		
3479'	AGTACGCGGATTGAGCGAGATGGCAATCTATTTATCGGTGGAGTTATCAAGCATGCTC		
2351'	GCGCTATCAAGCCTTCTCAACCGCGCCCAACTCGTACAAGCGTCTGATCCACATT		
3539'	GCGCTATCAAGCCTTCTCTAACCAGCCCAAACTCGTACAAGCGTCTGATCCACATT		
2411'	TCGAAGCACCGGTAATGCTGGCATACTTGGCGCTAACCGCAGCGCTTCGATTCTGATAC		
3599'	TCGAAGCACCGGTAATGCTGGCATACTTGGCATACTAACCGCAGCGCTTCGATTCTGATAC		
2471'	CTTTGGTTCCAGCCCTAAGGGACGTCGTATCGAATTAAGATTGCGTGACCAATGGCTA		
3659'	CTTTGGTTCCAGCCCTAAGGGACGTCGTATCGAATTAAGATTGCGTGACCAATGGCTA		
2531'	ATCCATATTGGGCTTCTCGGCTATGCTGATGGCTGGCTAGATGGCATTAACCAAGA		
3719'	ATCCATATTGGGCTTCTCGGCTATGCTGATGGCTGGCTAGATGGCATTAACCAAGA		
2591'	TCCATCCAGGTGAAGCCATGGACAAAGATCTATATGATCTGCTCTGAAGAGGCTGCTG		
3779'	TCCATCCAGGTGAAGCCATGGACAAAGATCTATATGATCTGCTCTGAAGAGGCTGCTG		
2651'	AAATCCCAACAGTGGCACTTCACTTGAGAATGCACTGAGGTGCTGGATGCGGATCGTG		
3839'	AAATCCCAACAGTGGCTACTTCACTTGAGAATGCACTGGAATGCTGGATGCAAGTCTG		
2711'	AATTCCTGACTCGCGCGAAGTATTAGCAGCGATTTCATCGATTATATATACGCTGA		
3899'	AATTCCTGACTCGCGCGAAGTATTAGCAGCGATTTCATCGATTATATATACGCTGA		
2771'	AGACTGAAGATGTTGAGCGGTGTAACCAAACTACCCCTGTCGAGTTGAGCTTTACT		
3959'	AATCTGAAGATGTTGAGCGGTGTAACCAAACTACCCCTGTCGAGTTGAGCTTTACT		
2831'	ACAGCTTGTAAATCTCAATGGTGTATCCATAGCTGCAAGTTAAGCAGCTAGTATTTAGAG		
4019'	ACAGCTTGTAAATCTCAATGGTGTATCCATAGCTGTAAGTTAATCAGCTAGTA-TTAGAG		
2891'	CTCTAAACATCTTGTATTAGGGCTTTTCTTGGCACTAGCTTTATTTATAGCCATCTC		
4078'	CCCT-AACATCTT-TTAGGGCTTTTATTGCCATTAACTTAGCTT-TATAGCCCTTT		
2951'	ATCCAC-CCAGCTCATTACGAGAGTAATACTAATCGGTATAAACAATAAATCGCTT		
4135'	ATTAACCTCTAGTGGTTTATACAGAGTACTAGTCGCTCCCGCAGCAATCAGCTGAAGAC		
3010'	CTAAATCGAGCAATTATGTTAGCTGTGATC		
4195'	ATCTTGGCTAGAATCTCAAGCAATTTTACAACATGACAGAGGCTTGCCTCCCGCA		

図5 クローン化された好圧性細菌DB6705株(上段)と耐圧性細菌DSS12株(下段)由来の塩基配列の比較
 Fig. 5 Comparison of the cloned DNA sequences between barophilic strain DB6705 up-sequence and barotolerant strain DSS12 down-sequence.

2.3 GS遺伝子の発現における、圧力の影響

好圧性細菌DB6705株及び耐圧性細菌DSS12株を各圧力下で培養後、RNA画分を精製し、プライマーエクステンション法により、各圧力下における転写産物の解析を行った(3-5)。図6に方法を示した。なお用いたビオチン化プライマーは、図5に矢印のアンダーラインで示した配列を合成し、5'末端にビオチンアミダイドを結合させたものを利用した。

図7、図8に、それぞれDB6705及びDSS12株のGS遺伝子の転写における圧力の影響の結果を示した。DB6705株では、5箇所の転写開始点が見いだされ、#1においては、加圧に従い転写量が減少し、#2-5では、逆に増加している傾向が確認された(図7)。それに比較して、DSS12株においては、4箇所の転写開始点が見いだされ、そのいずれもが50MPaをピークに加圧応答をしていることが観察された。両者の転写開始点は、DB6705における#1、#4、#5がそれぞれDSS12における#1、#3、#4と一致し、DB6705における#2と#3、及びDSS12における#2とは一致しなかった。これらの転写開始点は図5に示した。

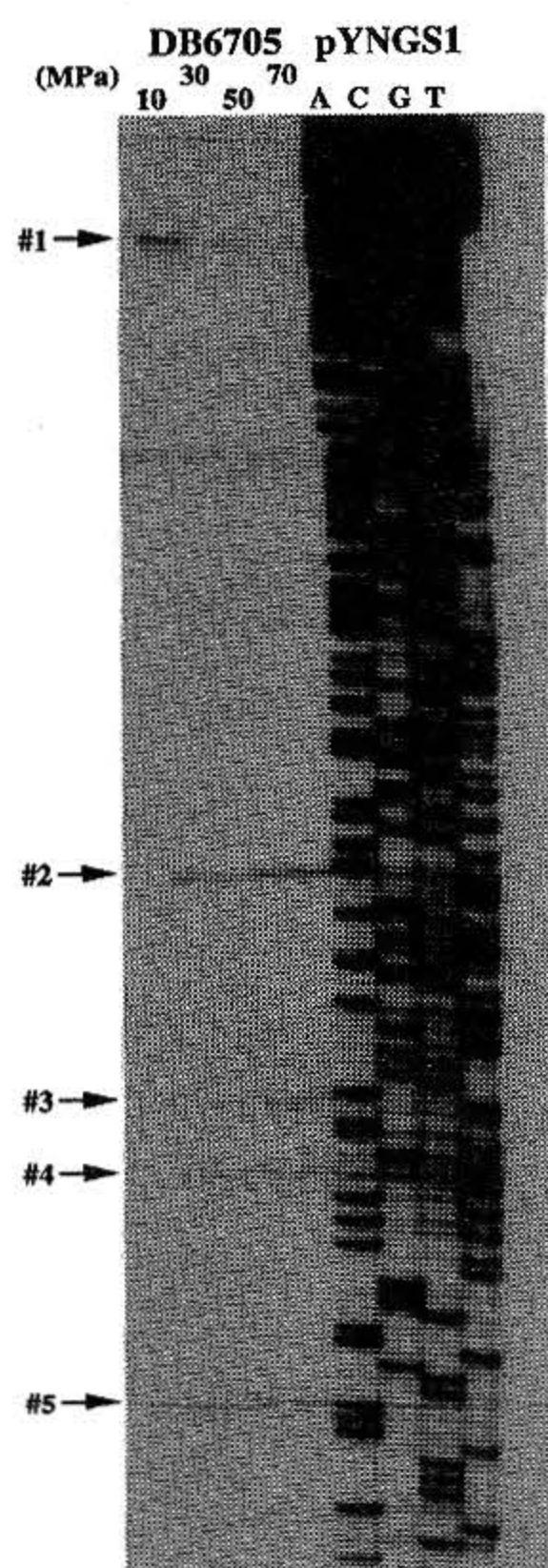
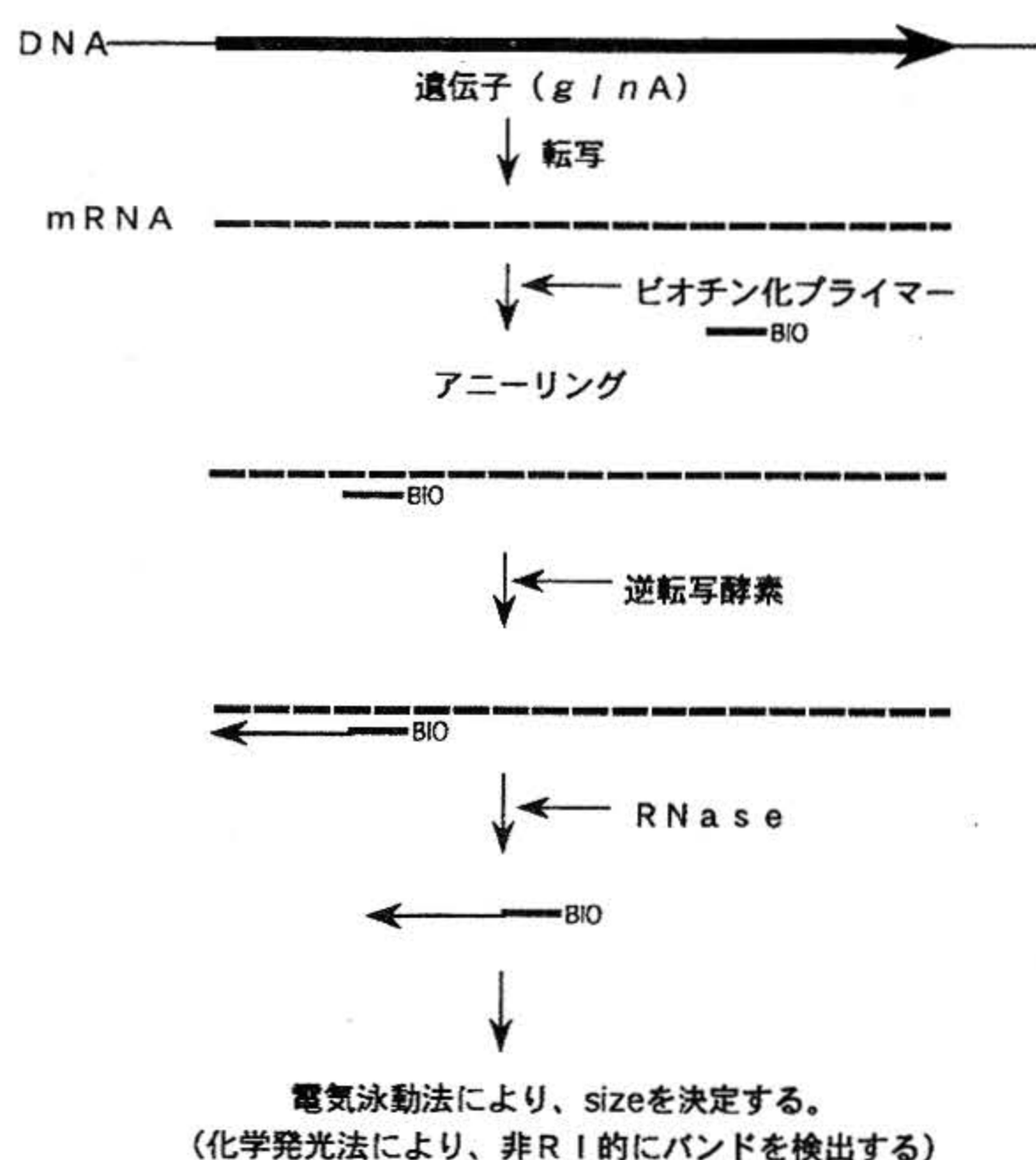


図7 プライマーエクステンション法によるDB6705株のグルタミン合成酵素遺伝子の転写に及ぼす圧力の影響 矢印は、転写開始点、数字は圧力(MPa)のレベルを示す

Fig. 7 Primer extension analysis of the strain DB6705 *glnA* gene. Lined arrows show the transcripts #1-#5, and their transcriptional starting points.



何がわかるか? ① 転写開始点——プロモーターの構造
② 転写量の測定——転写の起こる条件

図6 プライマーエクステンション法による、転写産物の解析
Fig. 6 Analysis of the transcription by primer extension experiment.

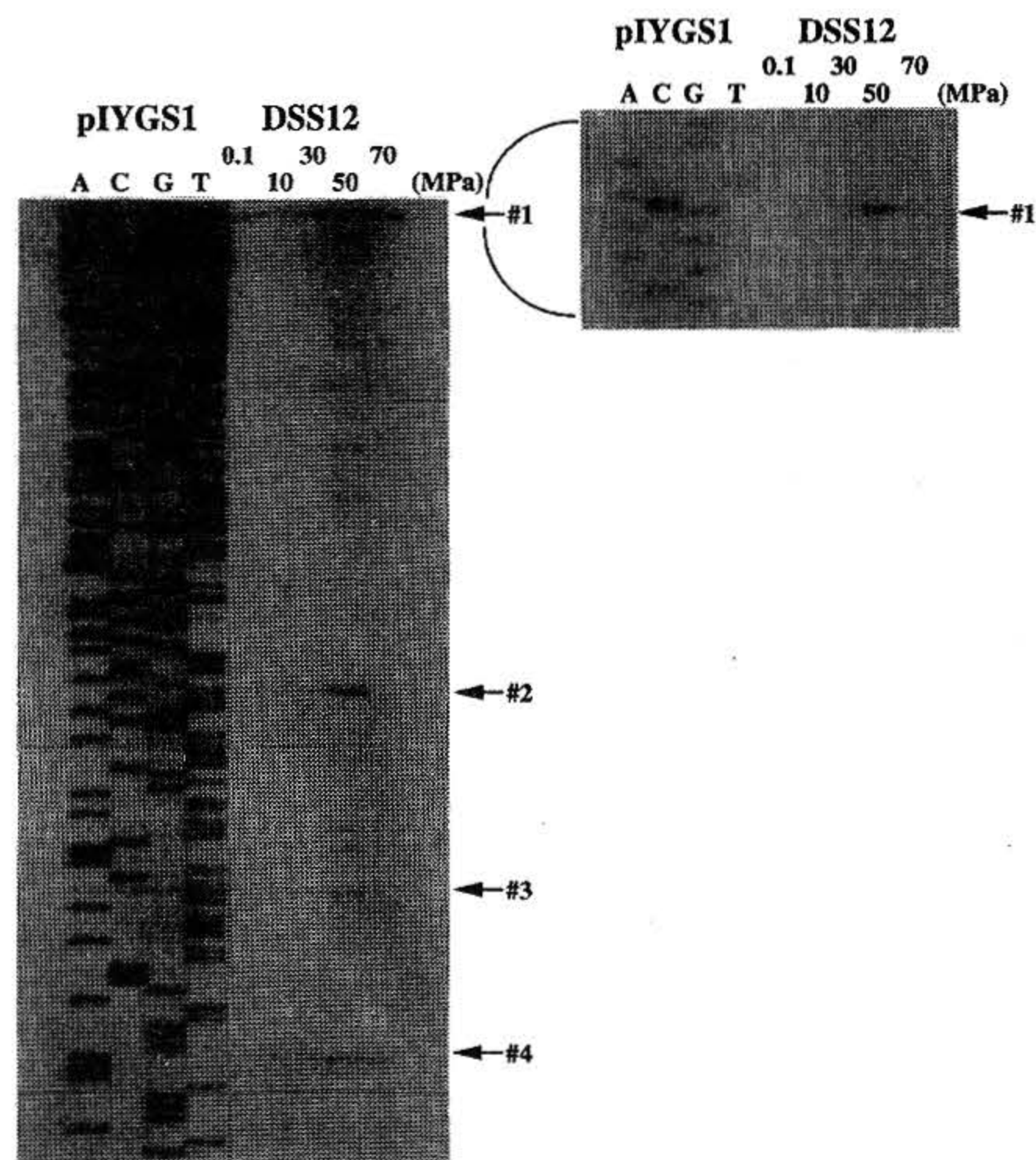


図8 プライマーエクステンション法によるDSS12株のGS遺伝子の転写に及ぼす圧力の影響。矢印は、転写開始点、数字は圧力のレベルを示す。なお、右図はGSUプライマーを用いた結果である

Fig. 8 Primer extension analysis of the strain DSS12 *glnA* gene. Lined arrows show the transcripts #1-#4, and their transcriptional starting points.

2.4 GSのアミノ酸配列における相同性と本酵素の系統関係

好圧性細菌DB6705株及び耐圧性細菌DSS12株と菌学的に近縁関係にある、*Vibrio alginolyticus*、大腸菌とでGSのアミノ酸配列の比較を行った（図9）。これらの配列の相同性はかなり高く、多くのGSにおいて高度に保存された領域、活性発現に重要な役割を果たすTyr部位（アデニル化部位）等においてはよく保存されていることが示された。事実DB6705GSにおいては、大腸菌と同様アデニル化による活性調節機構を有していることが示されている（図10）。

次に、報告されているGSアミノ酸配列を基に近隣結合法にて系統樹を作成した（図10）。その結果、本系統樹は、16SリボソームRNAの配列を基に作成した進化系統樹とよく一致していることが示された。

3 考 察

深海高水圧環境に適応している2種の微生物、好圧性細菌DB6705株、耐圧性細菌DSS12株より、GS遺伝子を含む領域のクローニングに成功した。塩基配列の解析より、いくつかのオープンリーディングフレーム（ORF）が見いだされた。図11にこれらの微生物と大腸菌とのGS遺伝子領域における遺伝子構造の比較を示した。

興味深いことに、DSS12株において*glnA*とその調節蛋白質遺伝子*ntrB*との間に、一部大腸菌のGLTP蛋白質（proton glutamate symport protein）と相同性のあるDORFが見いだされた。DB6705株においては、まだこの部分のクローニングが終わっていないので、こうした構造が、深海微生物の特徴であるかは明らかではないが、これらの遺伝子産物が、加圧応答する遺伝子発現と深く関わっている可能性は高いと思われる。

DB6705	1:MSAESVLQQLKELEVKFVDLRFTDTRGKEQHSIPSHQVDEDFEDGKMFDSGSSINGWKG	60
DSS12	1:.....	60
<i>V. algin.</i>	1:..V.K..SLIQ.N.....K.....I..A..I.A....E....VA....	60
<i>E. coli</i>	1:..H..TM.N.H.....K.....T..A..NAE...E.....G....	59
	* * * *	
DB6705	61:INESDMVLMPPESFVLDPTADTTAIRCILNPGTMTGYNRDPSIAKKAEEYLRSTG	120
DSS12	61:.....A.....N.....	120
<i>V. algin.</i>	61:.....M...AS.A.....E.A.LN.....E.A.Q..D.....R..DFM....	120
<i>E. coli</i>	60:.....ASTA.I...F..S.L.....E..LQ..D.....R..D.....	119
	* * * *	
DB6705	121:IADTVLLGPEPEFFLFDVVKYGSMSGCFYKLDAAEASWNSGTSYEGGNTGHRPSVKGGY	180
DSS12	121:.....A.....V.....A.....K.....	180
<i>V. algin.</i>	121:V.....I.....FAT.....S.F.I.DV..A..T.SD..E..K....G....	180
<i>E. coli</i>	120:.....F.....IRF..S.I..SHVAI.DI.GA....S.Q.....K.....A....	179
	* * * *	
DB6705	181:FPVPPVDSQDIRSAMCLILEEMGQVVEAHHEVATAGONEIATRFNTLTKADEVQVLK	240
DSS12	181:.....A.....V.....	240
<i>V. algin.</i>	181:.....A.....VM.....L.....T.....I..IY..	239
<i>E. coli</i>	180:.....A.....E..VM.Q..L.....V.....M.K....I..IY..	239
	* * * *	
DB6705	241:YVVHNVAVYKLTATFMPKPIVGDNGSGMHVHISLAKDGTNLFGDKYGLSELAIYFIG	300
DSS12	241:.....A.....	300
<i>V. algin.</i>	240:.....AF.....L.....Q.....V.....M..L..Y..	299
<i>E. coli</i>	240:.....RF.....MF.....C.M..S.N.V.....A.....Q..L..Y..	299
	* * * *	
DB6705	301:GVIKHARAINAFSNPATNSYKRLIPHEAFVMLAYSANRSASIRIPLVSPKGRRIELR	360
DSS12	301:.....A.....T.....	360
<i>V. algin.</i>	300:.....I.....S.....V.G.....R.....V.....A..V..	359
<i>E. coli</i>	300:.....K.....LA..T.....V.GY.....R.....V.S..A..V..	359
	* * * *	
DB6705	361:FSDFMANPYLAFSAMLMDGLGIONKIHFGGEAMDRKLYDLFFEEAEIPTVATSLNLE	420
DSS12	361:.....A.....	420
<i>V. algin.</i>	360:.....A.....C.AS.....K.....A..S.....Y..KD..A	419
<i>E. coli</i>	360:.....A.....C.A.L.....K.....N.....K...Q..G...E..N	419
	* * * *	
DB6705	421:CLDADREPLTRGEVFSDFIDSITLKTEDVERVNQTHPVEFELYSL	469
DSS12	421:.....N.....S.....	469
<i>V. algin.</i>	420:E.....A.G...D.....E..SQ.....M.....V	468
<i>E. coli</i>	420:E..L.....KA.G..TDEA..A..A.RR.EDD..RM.P.....V	468
	* * * *	

A, B, C, D; 多くのグルタミン合成酵素において、高度に保存された領域

図9 グルタミン合成酵素のアミノ酸配列における相同性
Fig.9 Homology of the amino acid sequences of GS in deep-sea strains, DB6705 and DSS12, *V. alginolyticus*, and *E. coli*.
A-D : Conserved region in GS.

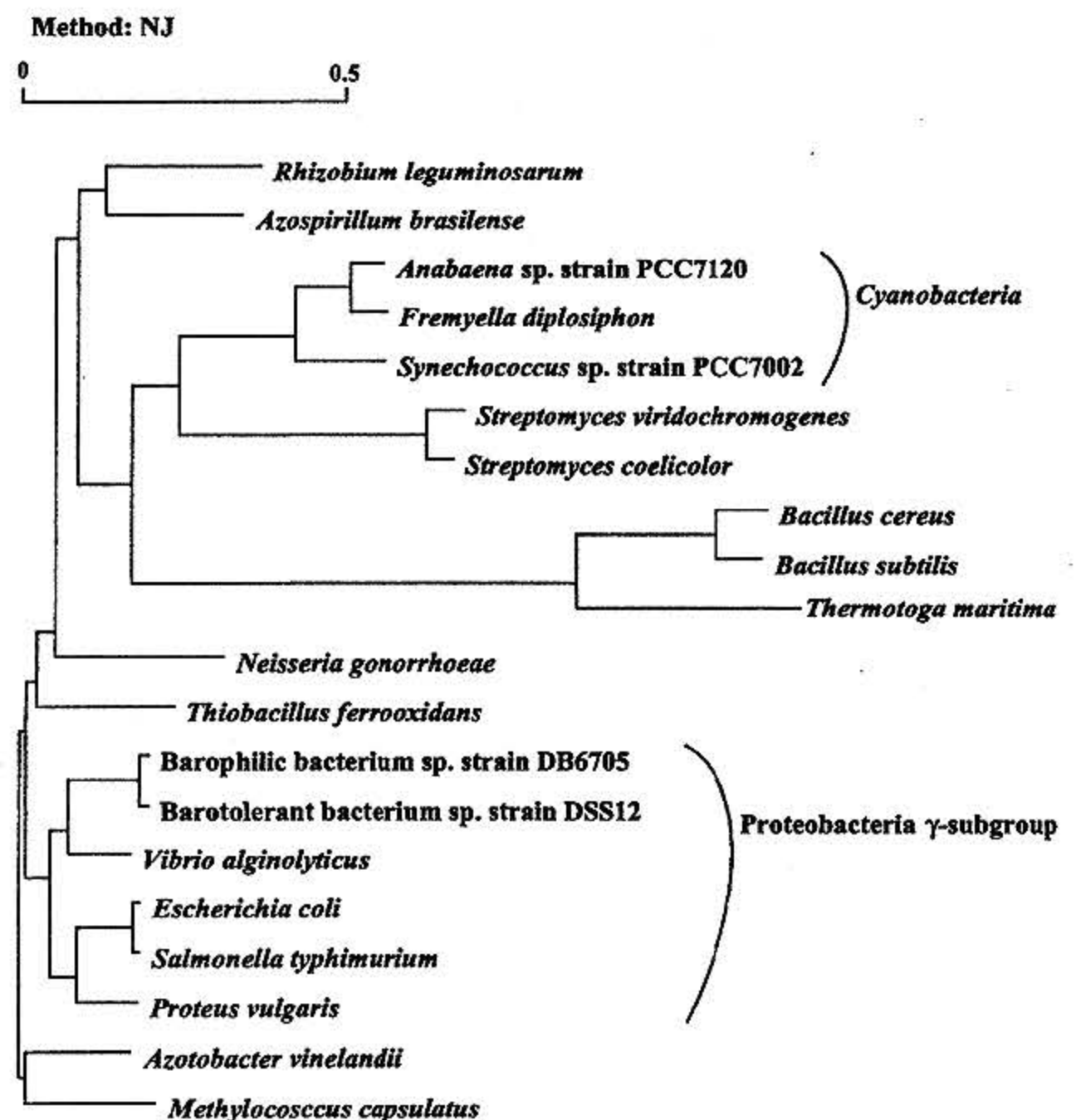
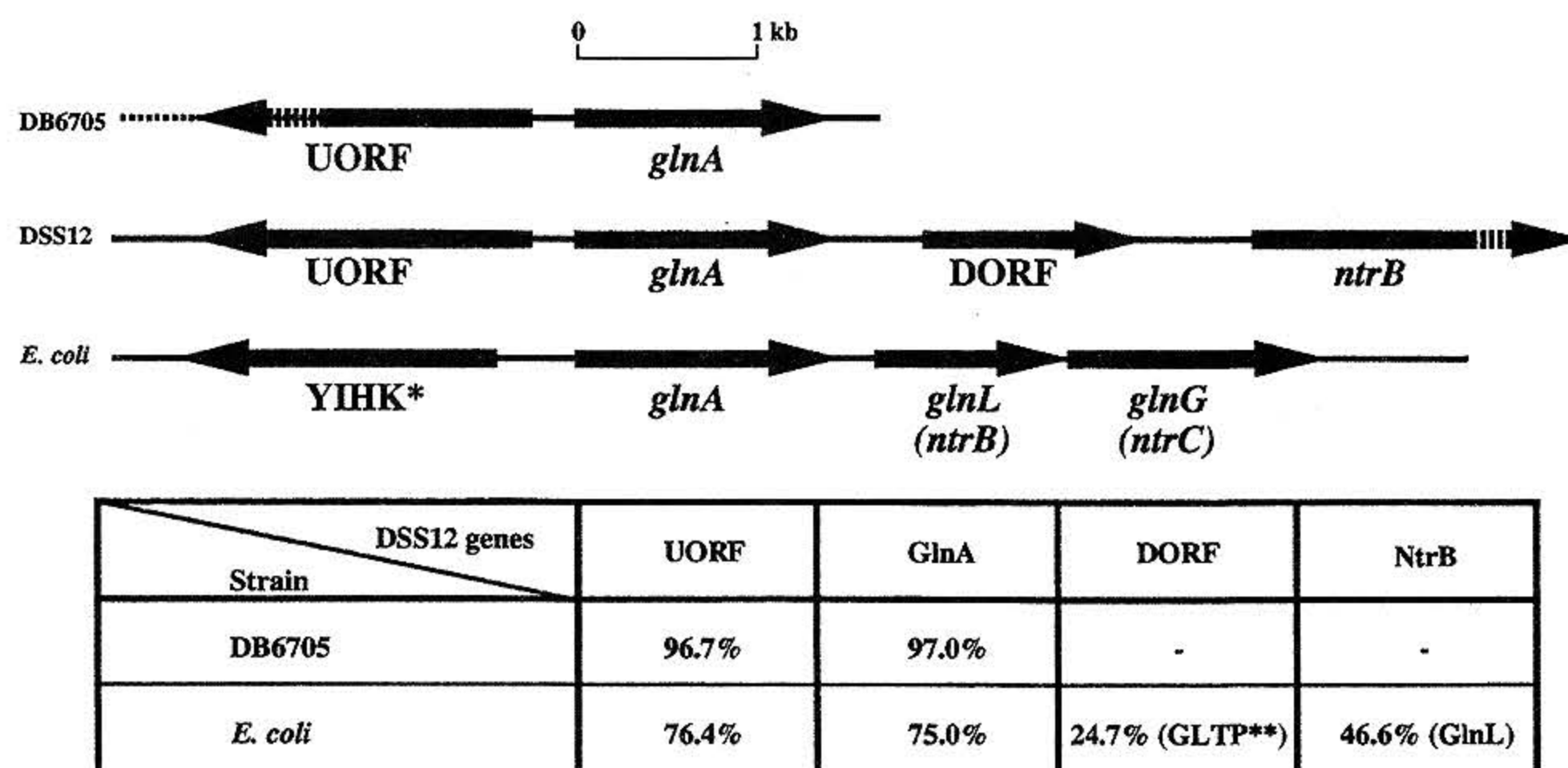


図10 近隣結合法によるグルタミン合成酵素の系統関係
Fig.10 Phylogenetic relationships in GS between eubacteria using N-J method.



*YIHK; 65.4 kD protein in *glnA-fdhE* intergenic region,
 **GLTP; Proton glutamate symport protein (glutamate-aspartate carrier protein)

図11 GS遺伝子領域の深海微生物と大腸菌との比較とそれぞれのアミノ酸配列の相同性 (%)

Fig.11 Comparison of the *glnA* region between the deep-sea adapted bacteria and *E. coli*, and these amino acids sequences homology (%).

4 おわりに

GS遺伝子の発現に対する加圧の影響であるが、好圧性細菌DB6705株において、四つの転写開始点において、加圧応答しているにも関わらず (#2-5, 図7), #1において10MPaにて最大の転写量を示したことは興味深い。これは、本菌が生育可能な圧力範囲では、常にGSの発現が保証されているということであり、本酵素の重要性を示唆するものであると思われる。これに対し、耐圧性細菌DSS12株においては、50MPaで最大転写量を示したが、大気圧下から70MPaまでいずれの圧力においてもバンドが検出され、ここでも常にGSが発現していることが示唆されている。こうしたDB6705株とDSS12株とのGS遺伝子の転写の違いの機構については、まだ明らかとなっていないが、これまでに報告した、加圧応答遺伝子オペロン (3, 4, 11) の発現様式とは、明らかに異なるものであることが示唆された。

参考文献

- 1) Kato, C., T. Sato, and K. Horikoshi : Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples. *Biodiv. Conserv.*, **4**, 1 - 9. (1995)
- 2) Kato, C., N. Masui, and K. Horikoshi : Properties of obligately barophilic bacteria isolated from a sample of deep-sea sediment from the Izu-Bonin trench. *J. Mar. Biotechnol.*, **4**, 96-99. (1996)
- 3) Kato, C., Smorawinska, M., T. Sato, and K. Horikoshi : Cloning and expression in *Escherichia*

coli of a pressure regulated promoter region from a barophilic bacterium, strain DB6705. *J. Mar. Biotechnol.*, **2**, 125-129. (1995)

- 4) Kato, C., Smorawinska, M., T. Sato, and K. Horikoshi : Analysis of a pressure regulated operon from the barophilic bacterium strain DB6705. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 166-168. (1996)
- 5) Kato, C., Smorawinska, M. and K. Horikoshi : Gene expression of aspartate b-D-semialdehyde dehydrogenase at elevated hydrostatic pressure in deep-sea barophilic and barotolerant bacteria. *Proceedings of AIRAPT/EHPRG conference '95*, (ed. W.A.Trzeciakowski) 869-872. (1996)
- 6) 加藤千明 : 深海微生物の環境適応—高水圧下で遺伝子はどのように発現するか. *化学と生物*, **34**, 129-132. (1996)
- 7) 加藤千明 : 遺伝子発現における圧力制御—高圧下での大腸菌の遺伝子発現. *BIO INDUSTRY*, **13**, 5-12. (1996)
- 8) Kato, C. and K. Horikoshi : Gene expression under high pressure. *Proceedings of High Pressure Bioscience and Biotechnology '95*, Elsevier Science, in press. (1996)
- 9) Kato, C., A. Inoue, and K. Horikoshi : Isolating and characterizing deep-sea marine microorganisms. *Trends Biotechnol.*, **14**, 6-12. (1996)
- 10) 中村由香・加藤千明・大橋由明・木村絹子・掘越

弘毅：深海底より分離された好圧性微生物からの
グルタミン合成酵素遺伝子の単離とその性質. 1996
年度 日本農芸化学会大会 要旨集, 70 (3) 京都
市p102. (1996年4月)

- 11) Kato, C., A. Ikegami, Smorawska, M., R.
Usami, and K. Horikoshi: Structure of genes in

a pressure-regulated operon and adjacent regions
from a barotolerant bacterium strain DSS12. J.
Mar. Biotechnol., in press. (1996)

(原稿受理：1996年12月5日)