

## 高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* 由来 走気性トランスデューサーの親株における発現と機能解析

田力鉄平\*1・松原惇高\*1・久保田芳弘\*1・小坂貴幸\*1・  
小澤孝俊\*1, 八波利恵\*1・福居俊昭\*1・中村 聡\*1,2

### Expression and Functional Analysis of Aerotaxis Transducers from Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica*

TADIKARA Teppei\*1, MATSUBARA Toshitaka\*1, KUBOTA Yoshihiro\*1,  
KOSAKA Takayuki\*1, OZAWA Takatoshi\*1,  
YATSUNAMI Rie\*1, FUKUI Toshiaki\*1, NAKAMURA Satoshi\*1,2

**Abstract:** The open reading frames encoding aerotaxis transducers Htr8 and HemAT homologs, named Htr8-Hj and HemAT-Hj respectively, were found on the genome of extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. The *htr8* and *hemAT* genes were cloned and successfully expressed in *Ha. japonica*. Recombinant Htr8-Hj and HemAT-Hj were purified and characterized. Absorption spectra showed that the *Ha. japonica*-produced Htr8-Hj and HemAT-Hj would be heme-containing proteins. The air bubble assays indicated that the aerotaxis response of *Ha. japonica* cells would be accelerated by introducing the *htr8* gene and decelerated by introducing the *hemAT* gene.

Key Words: Aerotaxis, Transducer, Htr8, HemAT, Extremely halophilic archaeon

#### 1. はじめに

べん毛をもつ微生物の多くは、外界からの物理的・化学的刺激を受け、その刺激源に向かう、あるいは遠ざかるという挙動を示す。このような挙動は走性とよばれ、微生物が自身の生育により好ましい環境へと移動するための手段と考えられている。微生物が刺激源に向かうような走性は正の走性、逆に遠ざかる場合は負の走性とよばれる。微生物が示す走性としては、アミノ酸や糖のような化学物質に対する走性（走化性）、酸素のような気体に対する走性（走気性）、光に対する走性（走光性）などが知られている。走性の発現に際しては、外界からの刺激は何らかのシグナル伝達系を介してべん毛モーターへと伝わる。さまざまな微生物において、細胞内外の刺激を感知し、べん毛モーターへ伝達するタンパク質が見つかり、それらは総じてトランスデューサーとよばれる。

*Haloarcula japonica* は三角形平板状という特徴的な形態を有する高度好塩性古細菌である。本菌はべん毛を有し、運動性を示すことが知られている [1,2]。しかしながら、*Ha. japonica* の走性に関する知見はほとんど得られていない。これまでに、*Ha. japonica* より 3 種類のトランスデューサー遺伝子ホモログ *hjtA*, *hjtB* および *hjtC* のクローニングが行われているが [3,4]、当該トランスデューサーの機能解明には至っていない。

近年、*Ha. japonica* の全ゲノム配列解析が終了した [5]。相同性検索の結果、高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* においてそれぞれ正および負の走気性への関与が知られているトランスデューサー遺伝子 *htr8* [6] および *hemAT* [7] のホモログが見いだされた。*Ha. japonica* の走気性にも、これらのホモログがコードするタンパク質 Htr8-Hj および HemAT-Hj が関与している可能性が高い。これまでに、HemAT-Hj の大腸菌における発現が行われ、組換え HemAT-Hj にヘムが含まれることを示唆する結果が得られているが、それらの機能は依然として不明であった [8]。

本研究では、*Ha. japonica* ゲノム上に見いだされた *htr8*

\*1 東京工業大学 生命理工学院 School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

\*2 沼津工業高等専門学校 National Institute of Technology (KOSEN), Numazu College

および *hemAT* 遺伝子ホモログの親株 (*Ha. japonica*) における過剰発現と組換えタンパク質の機能解析を行った。

## 2. 材料と方法

### 2. 1 菌株、プラスミドおよび培地

DNA 供与体として *Ha. japonica* (JCM 7785) を用いた。遺伝子クローニングの宿主としては *Escherichia coli* (大腸菌) JM109 株および JM110 株を、そして遺伝子発現の宿主としては *Ha. japonica* を使用した。

遺伝子クローニングには大腸菌用ベクター pUC119 を用いた。pWL102 は高度好塩性古細菌および大腸菌のシャトルベクターである [9]。 *Ha. japonica* 用発現型プラスミドの調製に用いた pJFZ33 は、 *Ha. japonica* 細胞表面糖タンパク質遺伝子 (*csg* 遺伝子) プロモーターおよび *Ha. japonica* 由来 *ftsZ2* 構造遺伝子全領域を pWL102 に連結した組換えプラスミドである [10]。

大腸菌の培養には LB 培地を用い、必要に応じて終濃度 50 µg/ml のアンピシリン (ナカライテスク) を添加した。 *Ha. japonica* の培養には 20% (w/v、以下略) NaCl、4% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O を含む天然培地 [11] を用い、必要に応じて終濃度 8 µg/ml のプラバスタチン (第一三共株式会社より供与) および 17 µg/ml の 5-アミノレブリン酸塩酸塩 (富士フィルム和光純薬) を添加した。固体培地には 1.5% 寒天を加えた。

### 2. 2 遺伝子工学的手法

*Ha. japonica* ゲノム DNA の調製は既報 [11] に従った。

PCR プライマーはユーロフィンジェノミクスおよびグライナー・ジャパンより購入した。プライマーにあらかじめリン酸化を施した。すなわち、リン酸化の反応液 20 µl には各 15 pmol のオリゴヌクレオチド、2 µl の Protruding End Kinase Buffer (東洋紡)、2 µl の 20 mM ATP および 10 U の T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (東洋紡) が含まれる。反応液を 37°C で 30 分間インキュベートし、リン酸化プライマーを得た。耐熱性 DNA ポリメラーゼには KOD-Plus (東洋紡) を用い、添付のプロトコールに従い PCR を行った。サーマルサイクラーは iCycler (Bio-Rad) を使用した。

制限酵素は東洋紡およびタカラバイオより購入し、メーカーの指示に従い使用した。DNA の連結には Ligation High (東洋紡) を用い、添付のプロトコールに従い反応を行った。

### 2. 3 形質転換

大腸菌の形質転換は成書 [12] に従い、塩化カルシウム法またはエレクトロポレーション法にて行った。

*Ha. japonica* の形質転換に用いるプラスミド DNA は、

遺伝子型が *dam*<sup>-</sup> および *dcm*<sup>-</sup> である大腸菌 JM110 株に形質転換し、この株より回収したものを使用した。メチル化されていないプラスミドを使用することにより、高度好塩性古細菌の形質転換効率が向上することが知られている [13]。 *Ha. japonica* の形質転換は既報 [11] に従い、スフェロプラスト法にて行った。

大腸菌および *Ha. japonica* からのプラスミド DNA の抽出は成書 [12] に従い、アルカリ-SDS 法にて行った。

### 2. 4 DNA 塩基配列解析

DNA 塩基配列の解析は、東京工業大学オープンファシリティーセンター・バイオ部門に依頼して行った。

### 2. 5 組換えタンパク質の精製

発現型プラスミドを有する *Ha. japonica* を液体培地で OD<sub>660</sub> が 1.0 前後になるまで培養した後、遠心 (4°C、4,400 x g、10 分間) により集菌した。得られた菌体を 2.0 M NaCl を含む 50 mM リン酸バッファー (pH 8.0) に懸濁した後、ソニケーター (Bioruptor UCD-250、コスモ・バイオ) を用いて破碎した。遠心 (4°C、20,400 x g、10 分間) および超遠心 (4°C、100,000 x g、1.5 時間) により可溶性画分を回収し、20 mM イミダゾールおよび 2.0 M NaCl を含む 50 mM リン酸バッファー (pH 8.0) に対して透析した。

組換えタンパク質のアフィニティー精製には、ÅKTA FPLC システム (GE ヘルスケア) およびニッケル (Ni) を固定化した HiTrap キレーティングカラム (GE ヘルスケア) を用いた。カラムを 20 mM イミダゾールおよび 2.0 M NaCl を含む 50 mM リン酸バッファー (pH 8.0) で平衡化した後、上で得られた可溶性画分をアプライした。同バッファーでカラムを洗浄後、20-500 mM イミダゾールのグラジエントにより吸着タンパク質を溶出した。組換えタンパク質を含む画分を限外濾過濃縮するとともに、バッファーを 2.0 M NaCl を含む 50 mM リン酸バッファー (pH 8.0) へと交換し、精製標品とした。

### 2. 6 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE には 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用い、Laemmli の方法 [14] に従って行った。泳動後のタンパク質はクーマシーブリリアントブルー R-250 (CBB) (ナカライテスク) による染色を施した。

### 2. 7 紫外-可視スペクトル測定

紫外-可視スペクトル測定には分光光度計 UV-1650PC もしくは UV-1800 (いずれも島津) を用いた。測定波長は 250-700 nm とし、室温下、酸化条件 (空気酸化) および還元条件

[匣ジチオン酸ナトリウム (ジチオナイト) を微量添加] において測定を行った。

### 2. 8 走気性測定

走気性測定は Brooun らの方法 [6] に準じて行った。すなわち、発現型プラスミドを有する *Ha. japonica* を、液体培地を用いて OD<sub>660</sub> が 1.0-1.2 になるまで 37°C で穏やかに振とう培養した。基本塩溶液 (20% NaCl, 4% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) で 6-7 倍希釈した培養液を、毛细管現象によりマイクロスライド (50 x 2.0 x 0.10 mm, Wale Apparatus) の中央付近まで導入した。マイクロスライドの両端をバーナーにより溶融・封管し、暗所で 37°C、4 時間インキュベートした。位相差顕微鏡による観察を行い、気液界面付近における菌体の挙動により走気性の評価を行った。

### 2. 9 アクセション番号

*Ha. japonica* 由来 *htr8* および *hemAT* 遺伝子の塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されている (アクセション番号はそれぞれ LC651378 および AB823705)。

## 3. 結果と考察

### 3. 1 Htr8-Hj の *Ha. japonica* における過剰発現、組換え Htr8-Hj の精製および性質検討

*htr8* 構造遺伝子全領域の PCR 増幅には、センスプライマー Htr8-KNm およびアンチセンスプライマー Htr8-6HEBr を使用した。Htr8-KNm には制限酵素 *KpnI* および *NdeI* の認識配列を、そして Htr8-6HEBr には His タグ配列、終止コドンおよび制限酵素 *BamHI* の認識配列を付加した (Table 1)。プライマーにリン酸化を施した後、*Ha. japonica* ゲノム DNA を鋳型とする PCR を行った。PCR 産物のアガロースゲル電気泳動を行い、約 2.0 kb の DNA 断片をゲルから抽出し、*SmaI* 処理した pUC119 に連結することで、*htr8* 遺伝子を含むプラスミド *pht8JH1* を取得した (Fig. 1 左)。本プラスミドにおいては、Htr8-Hj の下流に His タグ配列が付加した組換えタンパク質がコードされ

Table 1 オリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列

Primer	Sequence
Htr8-KNm	5'-GGTACCAAAACATATGCCAGACACGACCAGTGG-3' <i>KpnI</i> <i>NdeI</i>
Htr8-6HEBr	5'-CGGATCCCTATTATGTGGTGGTGGTGGTCCGGCTGCCAGCTGGAATTC-3' <i>BamHI</i> His-tag
HemAT-KNm	5'-GGTACCAAAACATATGGGATTACGGGACGGG-3' <i>KpnI</i> <i>NdeI</i>
HemAT-6HEBr	5'-GGATCCCTATTATGTGGTGGTGGTGTTCGGTGTCCGGTGTCCGAGC-3' <i>BamHI</i> His-tag

ボックスは終止コドン。

ている。

上で得られた *pht8JH1* を *NdeI*/*BamHI* 処理し、*htr8* 遺伝子を含む DNA 断片を同じく *NdeI*/*BamHI* 処理した *pJFZ33* と連結することで、*Ha. japonica* 用 *htr8* 遺伝子発現型プラスミド *pht8JH3* を取得した (Fig. 1 右)。*pht8JH3* においては、*Ha. japonica csg* 遺伝子プロモーター領域の下流に *htr8* 構造遺伝子および His タグ配列が連結している。

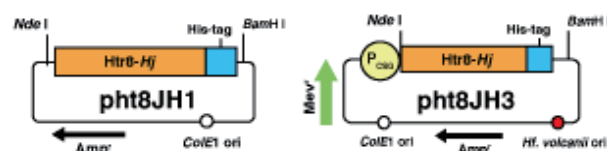


Fig. 1 プラスミド *pht8JH1* (左) および *pht8JH3* (右)

*pht8JH3* を導入した *Ha. japonica* より細胞質画分を調製し、Ni キレートカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーに供することで、組換え Htr8-Hj 精製標品を取得した。得られた精製標品を SDS-PAGE に供し、CBB 染色を行った結果、組換え Htr8-Hj 精製標品は約 120 kDa の位置に主要なタンパク質バンドを与えた (Fig. 2 左)。アミノ酸配列より類推した Htr8-Hj の分子質量は His タグ配列を含めて約 70 kDa であり、SDS-PAGE より求めた分子質量はこれより大きく見積もられている。これは、Htr8-Hj の酸性アミノ酸含量が高い (18%) ことに起因すると思われる。一般に、高度好塩性古細菌が生産するタンパク質は酸性アミノ酸を多く含むため、SDS と結合しにくいことが知られている。そのため SDS-PAGE における移動度が遅れ、結果として分子量が大きく見積もられることが報告されている [15]。

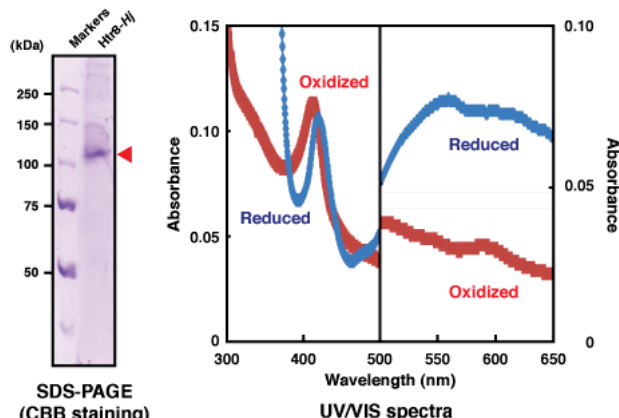


Fig. 2 *Ha. japonica* が生産した組換え Htr8-Hj の SDS-PAGE (左) および UV/VIS スペクトル (右)

組換え Htr8-Hj 精製標品の紫外-可視スペクトル測定を行った結果、酸化型において波長 410 nm、還元型において波長 420 nm のソーレー帯の吸収ピークが観察された

(Fig. 2 右)。また、酸化型では 595 nm に弱い  $\alpha$  帯の吸収ピークが認められた。このスペクトルはヘムタンパク質に見られるスペクトルと類似していたことから、組換え Htr8-Hj はヘムを含むことが示唆された。一方で、既報のヘムタンパク質のスペクトルパターンと完全には一致せず、組換え Htr8-Hj は新規なヘムを含む可能性が考えられる。古細菌には細菌のヘム *a* やヘム *o* とは異なる骨格をもつヘム *a* やヘム *o* 類似体の存在が確認されている [16]。組換え Htr8-Hj は古細菌特有のヘム合成酵素によって合成される新規なヘムを含むのかもしれない。ただし、今回得られたスペクトルは S/N 比が低く、精製時にヘムが脱落した可能性も考えられることから、精製過程の見直しが必要であろう。

### 3.2 HemAT-Hj の *Ha. japonica* における過剰発現、組換え HemAT-Hj の精製および性質検討

*hemAT* 遺伝子のクローニングは、*htr8* 遺伝子の場合と同様の方法で行った。すなわち、*hemAT* 構造遺伝子全領域を増幅するためのセンスプライマー HemAT-KNm およびアンチセンスプライマー HemAT-6HEBr (Table 1) をリン酸化した後、*Ha. japonica* ゲノム DNA を鋳型とする PCR を行った。約 1.5 kb の DNA 断片をゲルから抽出し、*Sma* I 処理した pUC119 に連結することで、*hemAT* 遺伝子を含むプラスミド phemJH1 を取得した (Fig. 3 左)。本プラスミドにおいては、HemAT-Hj の下流に His タグ配列が付加した組換えタンパク質がコードされている。

上で得られた phemJH1 を *Nde* I/*Bam*H I 処理し、*hemAT* 遺伝子を含む DNA 断片を pJFZ33 の *Nde* I/*Bam*H I サイトに挿入することで、*Ha. japonica* 用 *hemAT* 遺伝子発現型プラスミド phemJH3 を取得した (Fig. 3 右)。

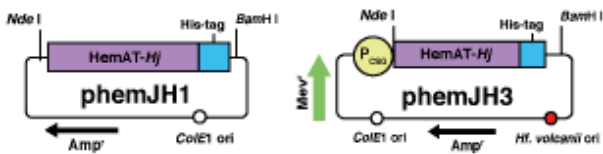


Fig. 3 プラスミド phemJH1 (左) および phemJH3 (右)

phemJH3 を導入した *Ha. japonica* より細胞質画分を調製し、Ni キレートカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーに供することにより、組換え HemAT-Hj 精製標品を取得した。得られた精製標品を SDS-PAGE に供し、CBB 染色を行った結果、SDS-PAGE において約 90 kDa の位置に主要なタンパク質バンドを与えた (Fig. 4 左)。アミノ酸配列より類推した HemAT-Hj の分子質量は His タグ配列を含めて約 55 kDa であり、SDS-PAGE より求めた分子質量はこれより大きく見積もられている。これは、Htr8-Hj

と同様、HemAT-Hj の酸性アミノ酸含量が高く (24%)、SDS が結合しにくいことに起因すると思われる。

組換え HemAT-Hj 精製標品の紫外-可視スペクトル測定を行った結果、酸化型で波長 410 nm、還元型で波長 428 nm のソーレー帯の吸収ピークが観察された (Fig. 4 右)。また、酸化型で観察された 545 nm の  $\beta$  帯および 580 nm の  $\alpha$  帯の吸収ピークが、還元型では 552 nm のブロードなピークとなっていた。上述のようなスペクトルは、HemAT-Hs の吸収スペクトル (酸化型では 406、538、578 nm のピークが、還元型では 425、555 nm にシフト) [17] や枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来 HemAT-Bs (酸化型では 410、542、580 nm のピークが、還元型では 428、560 nm にシフト) [18] に類似していた。これより、HemAT-Hj は、HemAT-Hs や HemAT-Hs と同様、ヘム *b* を含むことが示唆された。また、HemAT-Hj 精製標品を用いてヘム染色を行ったところ、陽性バンドが確認され(データ示さず)、HemAT-Hj はヘムを含むことが確かめられた。

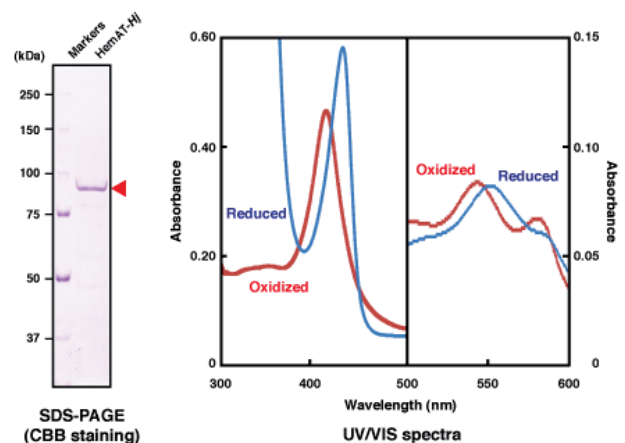


Fig. 4 *Ha. japonica* が生産した組換え HemAT-Hj の SDS-PAGE (左) および UV/VIS スペクトル (右)

3.3 Htr8-Hj および HemAT-Hj 過剰発現株の走気性解析  
Htr8-Hj および HemAT-Hj の機能の解明を目的として、*Ha. japonica* に各種発現型プラスミドを導入した Htr8-Hj および HemAT-Hj 過剰発現株について走気性解析を行った。

*Ha. japonica* 培養液と空気を導入したマイクロスライドの両端を密閉し、暗所で 37°C、4 時間インキュベートすることで培養液中の酸素が *Ha. japonica* により消費され、気液界面近傍に酸素の濃度勾配が形成される。もし細胞が酸素に対して正の走性を示すのであれば、細胞は培養液中で最も酸素濃度の高い気液界面に局在し、反対に酸素に対して負の走性を示すのであれば、細胞は気液界面から少し離れた場所に局在することになる。よって、インキュベーション後のマイクロスライド中の *Ha. japonica* 細胞の局在を位相差顕微

鏡によって観察することで、走気性を評価することができる。プラスミドを含まない *Ha. japonica* の走気性解析の結果、4 時間インキュベーション後の気液界面に細胞の局在が観察された (Fig. 5)。このことから、プラスミドを含まない *Ha. japonica* は正の走気性を示すことが明らかとなった。

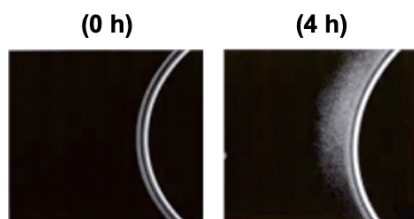


Fig. 5 プラスミドを含まない *Ha. japonica* の走気性解析

*htr8* 遺伝子を導入した *Ha. japonica*/pht8JH3 株では、空ベクターを導入した *Ha. japonica*/pWL102 株と比較して正の走気性が強化されていた (Fig. 6 上、中)。これらのことから、*Htr8-Hj* は *Ha. japonica* において正の走気性を強化する機能をもつことが示唆された。

一方で、*hemAT* 遺伝子を導入した *Ha. japonica*/phemJH3 株では、空ベクターを導入した *Ha. japonica*/pWL102 株と比較して正の走気性が弱まっていた (Fig. 6 上、下)。これらのことから、*HemAT-Hj* は *Ha. japonica* において正の走気性を弱める機能をもつことが示唆された。

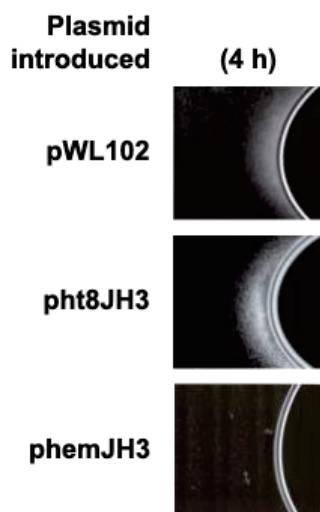


Fig. 6 空ベクター (上)、*htr8* (中) および *hemAT* 遺伝子 (下) を導入した *Ha. japonica* の走気性解析

#### 4. おわりに

*Ha. japonica* ゲノム上に見いだされた *htr8* および *hemAT* 遺伝子ホモログの親株 (*Ha. japonica*) における発現を行った。精製標品を用いた分光学的性質検討の結果、*Ha.*

*japonica* が生産した組換え *Htr8-Hj* はヘムタンパク質であり、既報のヘムタンパク質とは異なる新規なヘムを含む可能性が示唆された。また、*Ha. japonica* が生産した組換え *HemAT-Hj* は、既報の *HemAT* と同様なヘムを含むことが示唆された。

空ベクター pWL102、*htr8* および *hemAT* 遺伝子発現型プラスミドを導入した *Ha. japonica* について走気性解析を行った。その結果、*Ha. japonica* は正の走気性を示すことが明らかとなった。また、*Htr8-Hj* は *Ha. japonica* の正の走気性を強化する機能をもつこと、そして *HemAT-Hj* は *Ha. japonica* の正の走気性を弱める機能をもつことが示唆された。

#### 謝辞

プラバスタチンをご供与いただいた第一三共株式会社、ならびに DNA 塩基配列解析にご協力いただいた東京工業大学オープンファシリティーセンター・バイオ部門に感謝する。

#### 参考文献

- [1] 高品知典, 掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集, pp. 25-38, 新技術開発事業団 (1989).
- [2] K. Horikoshi, S. Nakamura, *et al.*: *Experientia*, **49** (1993) 497-502.
- [3] 小澤孝俊, 修士論文, 東京工業大学 (2002).
- [4] T. Kosaka, T. Ozawa, *et al.*: *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **48** (2004) 169-170.
- [5] S. Nakamura, K. Nakasone, *et al.*: *Extremophiles Handbook* [K. Horikoshi, G. Antranikian, *et al.* (eds.)], pp. 364-381, Springer (2011).
- [6] A. Brooun, J. Bell, *et al.*: *J. Bacteriol.*, **180** (1988) 1642-1646.
- [7] S. Hou, R.W. Larsen, *et al.*: *Nature*, **403** (2000) 540-544.
- [8] T. Tadikara, T. Matsubara, *et al.*: *J. Jpn. Soc. Extr.*, **12** (2013) 29-32.
- [9] W. L. Lam, W. F. Doolittle: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86** (1989) 5478-5482.
- [10] 小澤一道, 博士論文, 東京工業大学 (2005).
- [11] S. DasSarma, E. M. Fleischmann (eds.): *Archaea, A Laboratory Manual: Halophiles*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1995).
- [12] J. Sambrook, E. F. Fritsch, *et al.*: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

- [13] S. A. Sundberg, M. Alam, *et al.*: *J. Bacteriol.*, **172** (1990) 2328-2335.
- [14] U. K. Laemmli: *Nature*, **227** (1970) 680-685.
- [15] H. Wakai, S. Nakamura, *et al.*: *Extremophiles*, **1** (1997) 29-35.
- [16] M. Lübben, K. Morand: *J. Biol. Chem.*, **269** (1994) 21473-21479.
- [17] M. Piatibratov, S. Hou, *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta*, **1524** (2000) 149-154.
- [18] S. Hou, T. Freitas, *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** (2001) 9353-9358.