

# 有用酵素創成を目的とする halophilic タンパク質高発現系の開発

藤原 健智  
(静岡大学 理学部)

## 研究の目的

好塩性アーキアは、飽和濃度の塩水環境に適応した極限環境微生物である。この微生物が持つ酵素タンパク質の多くは、安定した酵素機能に高濃度の塩の共存を要求する<sup>1)</sup>。このような‘halophilic’な性質は、例えば発酵食品製造などへの応用可能性を期待させる。これまで私は、halophilicタンパク質の機能改変に応用しうる、好塩性アーキアの遺伝子操作法の改良に取り組んできた<sup>2)</sup>。そのシステムを利用し、好塩性アーキアにおける嫌氣的代謝の誘導制御系の解析を行った。

好塩性アーキア *Haloferax volcanii* は、嫌氣的な環境の下では、酸素のかわりに硝酸塩 ( $\text{NO}_3^-$ ) を呼吸基質とする硝酸塩呼吸、すなわち脱窒を行うことで増殖する<sup>3-5)</sup>。脱窒により  $\text{NO}_3^-$  は、亜硝酸塩 ( $\text{NO}_2^-$ )、一酸化窒素 ( $\text{NO}$ )、亜酸化窒素 ( $\text{N}_2\text{O}$ ) を経て窒素 ( $\text{N}_2$ ) に変換されるが、各反応は、それぞれ異なる脱窒酵素により触媒される。これらの脱窒酵素は嫌気環境でのみ発現するが、アーキアにおいては、その発現制御のメカニズムはこれまで全く不明であった。

$\text{NO}_3^-$  から  $\text{NO}_2^-$  への還元を触媒する異化型硝酸塩還元酵素遺伝子 *narBCGHD* の近傍には、新規なDNA結合タンパク質をコードする遺伝子 *narR* が存在する<sup>6)</sup> (図1)。今回私は、脱窒の誘導制御における NarR の役割を明らかにするため、*narR* 遺伝子欠損株の作成と、NarRリコンビナントおよび変異体の発現実験を行った。

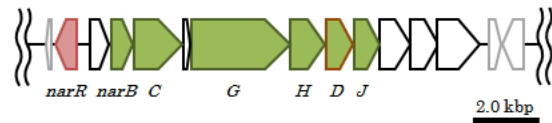


図1. *Hfx. volcanii* の硝酸塩還元酵素 NarBCGHD の遺伝子構造。硝酸塩還元酵素遺伝子は 11 個の ORF を含むオペロンであり、第 2,3,5~8 番 ORF (緑) の遺伝子産物は酵素のサブユニットである。また、オペロンの直上流に DNA 結合タンパク質 NarR (赤) の遺伝子が存在する。

## 方法

*narR* 遺伝子欠損株は、*Hfx. volcanii* H26 ( $\Delta pyrE2$ ) を用いた double-crossover 法により作成した<sup>7)</sup>。まず *narR* 遺伝子の上流 (USR)、下流 (DSR) 領域を、ウラシル合成酵素遺伝子 *pyrE2* を含む pTA131 に挿入することで、組み換え用プラスミド pTANarR を作成した (図 2A)。pTANarR を *Hfx. volcanii* H26 に導入し、ウラシル非要求性 (Step 1)、およびフルオロオロト酸耐性 (Step 2) をそれぞれ指標として相同組み換え体の選択を 2 回行うことで SH01 株を得た (図 2A)。USR-f、DSR-r プライマーを用いた PCR により、SH01 株における *narR* 遺伝子 (670 bp) の欠損を確認した (図 2B)。NarR リコンビナントの発現は、*Haloarcula marismortui* の好塩性カタラーゼ遺伝子 *katG*、あるいは *Hfx. volcanii* の亜硝酸塩還元酵素遺伝子 *nirK* のプロモーターに *narR* 遺伝子を連結し、*Hfx. volcanii*-*E. coli* シャトルベクター pMLH32S にそれぞれクローニングした pHKNR、pHNNR を用いて行った<sup>2,8)</sup> (図 2C)。ここで、KatG

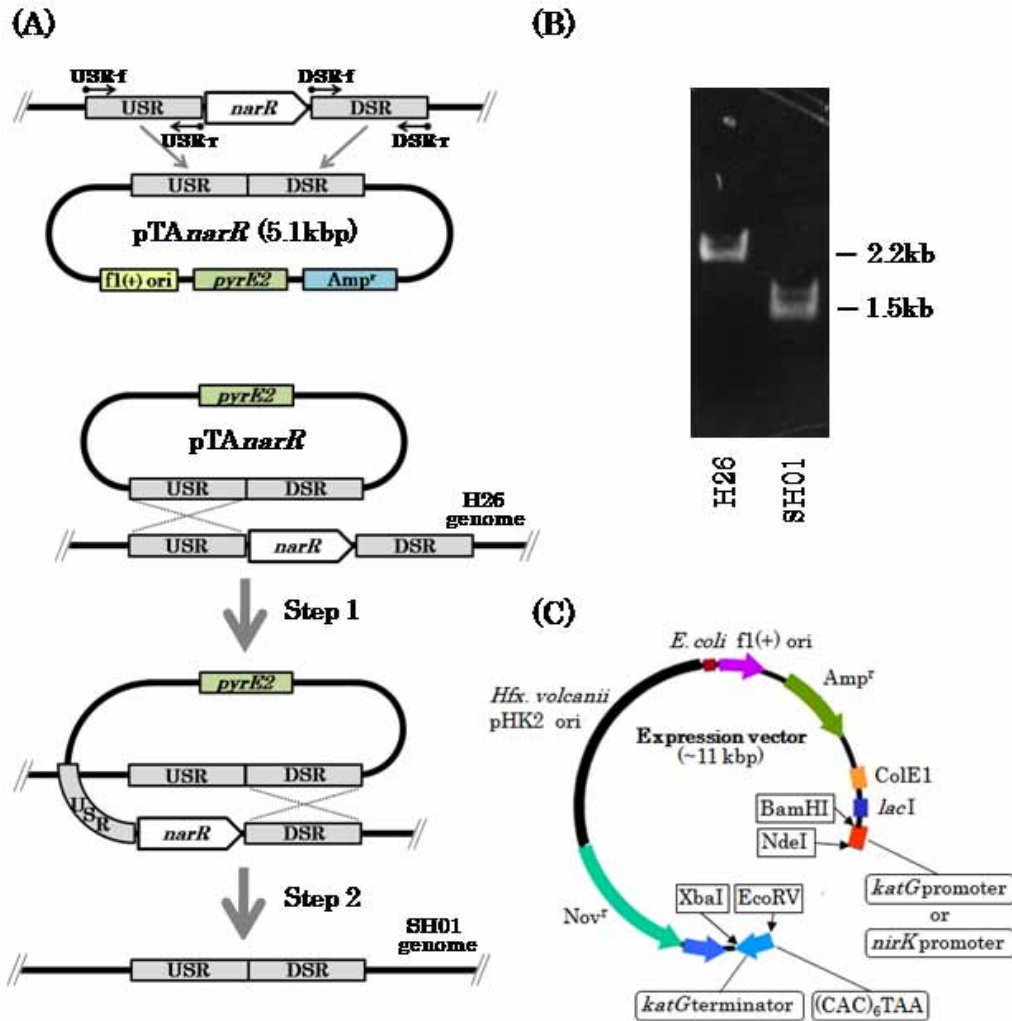


図2. *narK*遺伝子欠損株の作成とリコンビナントNarRの発現。*narK*遺伝子の破壊は、ウラシル合成酵素遺伝子*pyrE2*を利用したdouble-crossover法によって行った(A, B)。リコンビナントNarRの発現には好塩性アーキアの*katG*または*nirK*遺伝子プロモーターを利用した(C)。

は構成的に発現する酵素であり<sup>2)</sup>、またNirKは嫌気条件下でのみ発現する脱窒酵素である<sup>4)</sup>。pMLH32S, pHKNR, pHNNRをSH01に導入し、それぞれSH02, SH03, SH09株とした。

## 結果

*narR* 遺伝子を持つ H26 株(図 3A), *narR* 遺伝子を欠損させた SH01 株(B), SH01 株に pMLH32S, pHKNR, pHNNR をそれぞれ形質転換した SH02(C), SH03(D), SH09 株(E)を用いて培養実験を行った。好気条件(●)ではいずれも活発に増殖した。一方、嫌気・硝酸塩存在下(■)では、*narR* 遺伝子を持たない SH01, SH02 は増殖しないが、NarR リコンビナントを強制発現させることによって増殖能が回復した。この結果は、好塩性アーキアにおいて、NarR が脱窒の誘導に必須であることを示す。

NarR は C 末端部に Helix-Turn-Helix 構造を持つ DNA 結合タンパク質であり、4 ないし 5 残基のシステインを含む新規な Cys-rich モチーフを構造上の特徴とする。図 4A は *Hfx. volcanii* と *Har. marismortui* に存在する NarR のホモログである。pHKNR 上の *narR* 遺伝子に点変異導入することで、ホモログ間で保存されている第 17, 81,

83, 91 番のシステイン, および保存されていない第 100 番のシステインをそれぞれセリンに置換した各変異 NarR をそれぞれ SH01 に発現させたところ, C100S 変異体以外は脱窒による増殖能が回復しなかった (図 4B)。

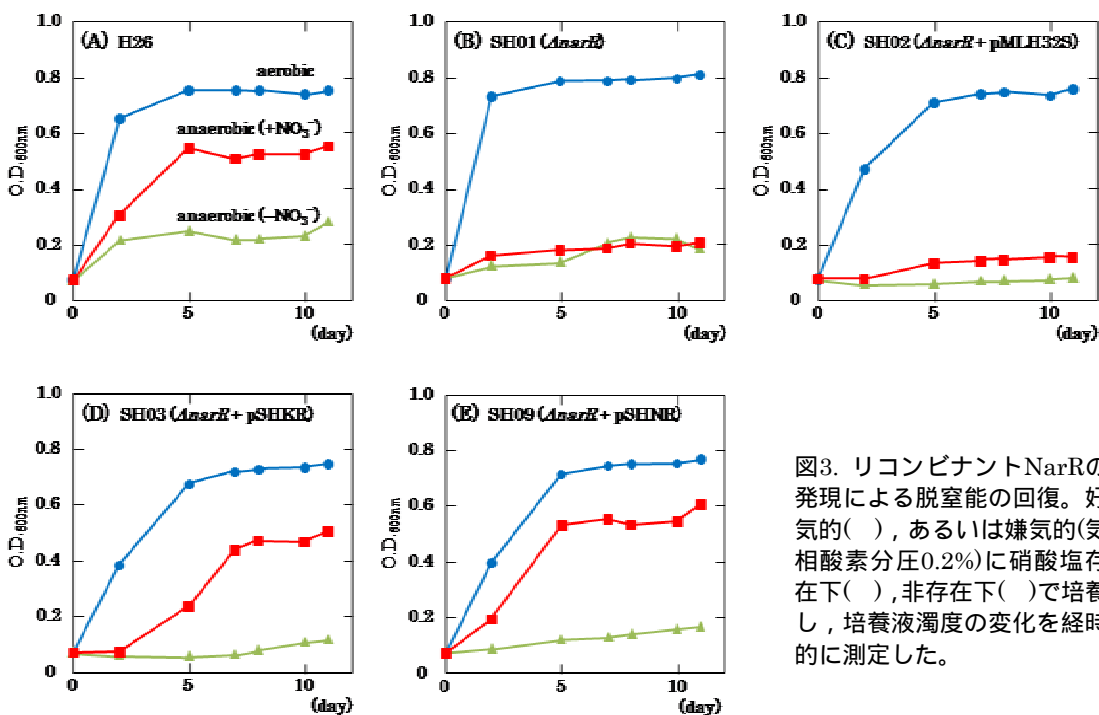


図3. リコンビナントNarRの発現による脱窒能の回復。好氣的( ), あるいは嫌氣的(気相酸素分圧0.2%)に硝酸塩存在下( ), 非存在下( )で培養し, 培養液濁度の変化を経時的に測定した。

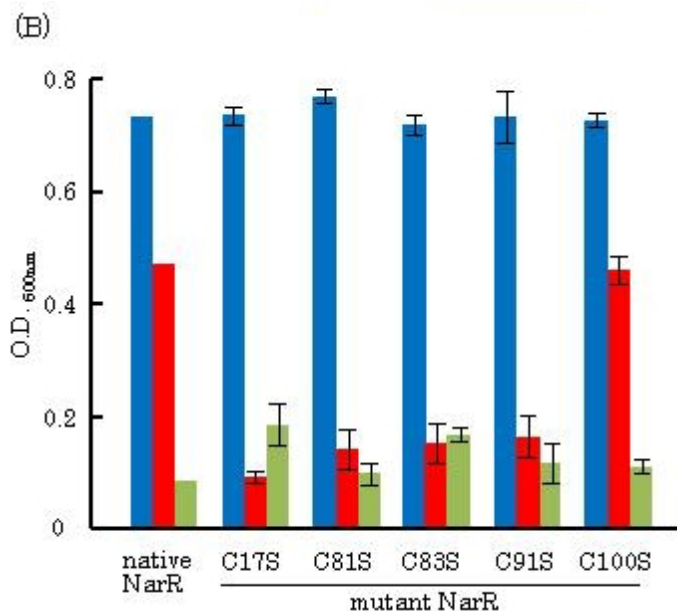
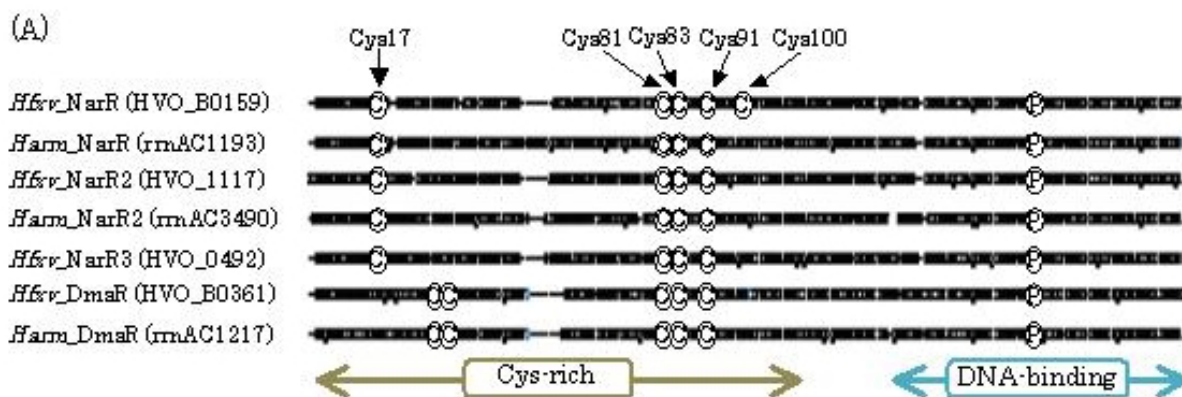


図4. NarR中のCys-richモチーフの機能。 *Hfx. volcanii* NarR (HVO\_B0159) は, C末端部にDNA結合モチーフ, N末端側に4ないし5残基のシステインを含む新規なCys-richモチーフを持つ。そのアミノ酸配列を *Hfx. volcanii* と *Har. marismortui* に存在するホモログと比較した(A)。 pHKNRに点変異導入することで, 第17, 81, 83, 91番の保存システイン, および保存されていない第100番のシステインをそれぞれセリンに置換した変異NarRをSH01に発現させた(B)。バーの色は図3と同じ培養条件を示し, 培養開始8日後の培養液の濁度を表している(n=3)。

## 結論

新規な構造を持つDNA結合タンパク質 NarRは、好塩性アーキアにおいて脱窒の誘導を制御する機能を持つことが示された。バクテリアによる脱窒は、2成分システムFixJLやFNRと呼ばれる転写制御系によって支配されているが<sup>9)</sup> これらの転写制御因子のホモログは、アーキアには存在しない。一方NarRは、好塩性アーキアに特有のDNA結合タンパク質である。NarRによる脱窒制御系はアーキアで独自に進化したものであろう。現在、全ゲノム構造が明らかになっている9種の好塩性アーキアの中の6種にNarRのホモログが存在する。脱窒を含む様々な嫌気代謝系を制御する因子として、これらのNarRは好塩性アーキアにおいて重要な役割を担っていると考え

ている<sup>10)</sup>。NarR特有のCys-richモチーフに含まれる4残基のシステインはその機能に必須である。NarRによる誘導制御の作用機作として、現在我々が提案しているモデルを図5に示す。このCys-richモチーフは、NarRの酸素あるいはレドックス・センサーとしての機能に必要と考えている。嫌気環境下で活性化されたNarRが、各脱窒酵素遺伝子のプロモーターに結合することで転写が活性化される、というモデルをもとに、今後さらに研究を進めていく。

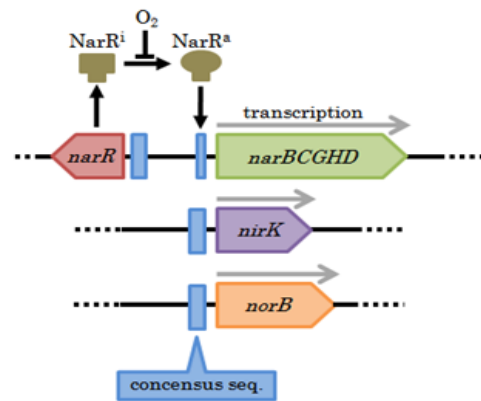


図5. NarRによる脱窒の誘導制御の作用モデル。NarRのCys-richモチーフは、おそらくO<sub>2</sub>センサーとして機能する。嫌気環境下で活性化されたNarRは、脱窒酵素遺伝子プロモーター上のTATA-boxの約50b上流に存在するコンセンサス配列\*に結合し、転写を活性化する。\*CGAA(c/g)A(c/t)GTTC(a/g)

## 文献

1. Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N., and Tanaka, N. (2002) Nat. Struct. Biol. **9**:691-695.
2. Ten-i, T., Kumasaka, T., Higuchi, W., Tanaka, S., Yoshimatsu, K., Fujiwara, T., and Sato, T. (2007) Acta Cryst. **F63**:940-943.
3. Yoshimatsu, K., Sakurai, T., and Fujiwara, T. (2000) FEBS Lett. **470**:216-220.
4. Ichiki, H., Tanaka, Y., Mochizuki, K., Yoshimatsu, K., Sakurai, T., and Fujiwara, T. (2001) J. Bacteriol. **183**:4149-4156.
5. Yoshimatsu, K., Iwasaki, T., and Fujiwara, T. (2002) FEBS Lett. **516**:145-150.
6. Yoshimatsu, K., Araya, O., and Fujiwara, T. (2007) Extremophiles **11**:41-47.
7. Bitan-Banin, G., Ortenberg, R., and Mevarech, M. (2003) J. Bacteriol. **185**:772-778.
8. Holmes, M.L., Nuttall, S.D., and Dyall-Smith, M.L. (1991) J. Bacteriol. **173**:3807-3813.
9. Zumft, W.G. (1997) Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**:533-616.
10. Müller, J.A., and DasSarma, S. (2005) J. Bacteriol. **187**:1659-1667.