

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19510226  
 研究課題名 (和文) 耐塩性ラン藻の遺伝子破壊株を用いた Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーターの機能解析  
 研究課題名 (英文) Functional Characterization of Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters from a halotolerant cyanobacteria  
 研究代表者  
 日比野 隆 (HIBINO TAKASHI)  
 名城大学・理工学部・教授  
 研究者番号：70218741

## 研究成果の概要：

耐塩性ラン藻 (*Aphanothec halophytica*) は、死海から単離された光合成細菌で、幅広い塩濃度 (0.25M ~3.0M NaCl 存在下) で生育可能であり、多くの環境適応メカニズムに関与する極めて特徴的な遺伝子を持つことを明らかにしてきた。また、*A. halophytica* は、通常のラン藻とは大きく異なり、非常に高濃度の Ca<sup>2+</sup> 存在下で生育し、同時に生育に伴い細胞外の pH が極めて高くなるという特徴を示す。このことは、Ca<sup>2+</sup> イオンの取り込み・排出、それに伴う H<sup>+</sup> イオンの取り込み・排出が極めて効率よく機能して外部環境に適応していると推測される。現在、Ca<sup>2+</sup> イオンの取り込み・排出に関与する ApCAX 遺伝子 (Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーター) をクローニングを行い、アンチポーター遺伝子欠損した大腸菌を用いた発現システムでその機能解析を行った。また、淡水性ラン藻を用いて ApCAX 遺伝子過剰発現も試みた。

一方、特定の遺伝子・蛋白質の重要性を明らかにするうえで、遺伝子導入による過剰発現あるいは遺伝子破壊した植物の解析は、非常に一般的であり、有益な結果が多く得られている。塩生植物の有する特有の耐塩性メカニズムを明らかにするうえで、遺伝子導入の手法は不可欠である。しかし、塩生植物への遺伝子導入は極めて困難である。そこで、耐塩性モデル光合成細菌として *A. halophytica* への遺伝子導入法を確立し、積極的に耐塩性メカニズムに関与すると思われる遺伝子・蛋白質の解析、さらに、相互作用している遺伝子・蛋白質の解明を計画した。現在、前述した ApCAX 遺伝子を抗生物質耐性遺伝子挿入による遺伝子破壊したプラスミドを構築し、*A. halophytica* への遺伝子導入法を試みている。染色体 DNA の相同組み換えを行った。現在のところ、完全に破壊された株は得られていないが、一部 DNA が破壊された株が得られているので、完全破壊株作出のための条件検討をする一方、予備的な研究を行っている。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000

2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：複合新領域

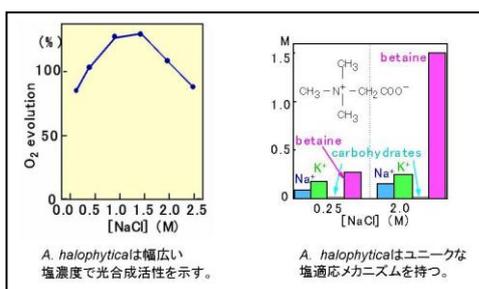
科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：耐塩性ラン藻、遺伝子破壊、トランスポーター、アンチポーター、環境ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

耐塩性ラン藻 (*Aphanotech halophytica*) は、死海から単離された光合成細菌で、幅広い塩濃度 (0.25M ~3.0M NaCl 存在下) で生育可能で、この *A. halophytica* が有する塩ストレスに対する適応メカニズムは非常にユニークであり、極めて特徴的な遺伝子を持つことを当該研究室の研究で明らかにしてきた。特に、*A. halophytica* の塩ストレス適応メカニズムとして、浸透圧適合溶質であるベタイン合成酵素、ベタイン取り込み・排出に関与するベタイントランスポーター、Na<sup>+</sup>イオンの取り込み・排出に関与する Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーター、ストレスタンパク質である分子シャペロンに注目して、その生化学的性質および遺伝子導入植物を作出して耐塩性が付与されるかどうかの研究を積極的に進めてきた。

過酷な環境下でも生育できる *A. halophytica* は、通常のラン藻とは大きく異なり、非常に高濃度の Ca<sup>2+</sup> 存在下 (10mM,



淡水性ラン藻：0.23mM, 海洋性ラン藻:2.0 mM) で生育し、同時に生育に伴い細胞外の pH が極めて高くなる (pH=7.0~11.0, 淡水性ラン藻：pH=7.0~9.0) という特徴を示している。このことから、Ca<sup>2+</sup>イオンの取り込み・排出、それに伴う H<sup>+</sup>イオンの取り込み・排出が極めて効率よく機能して外部環境に適応していると推測される。

すなわち、「*A. halophytica* が過酷な環境下でも生育できること」と、「Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーター(CAX)の機能」と密接な関係が

あると考えられる。

CAX 遺伝子を破壊した *A. halophytica* 株を用いて、CAX が耐塩性のメカニズムにどのように寄与しているのかを遺伝子レベル・蛋白質レベルで明らかにすることを本研究課題として計画した。

特定の遺伝子・蛋白質の重要性を明らかにするうえで、遺伝子導入による過剰発現あるいは遺伝子破壊した植物の解析は、非常に一般的であり、有益な結果が多く得られている。塩生植物の有する特有の耐塩性メカニズムを明らかにするうえで、遺伝子導入の手法は不可欠である。しかし、塩生植物への遺伝子導入は極めて困難であり、現在のところ、研究報告もわずかしかないのが現状である。そこで、耐塩性モデル光合成細菌として *A. halophytica* への遺伝子導入法を確立し、積極的に耐塩性メカニズムに関与すると思われる遺伝子・蛋白質を解析すること、さらに、相互作用している遺伝子・蛋白質を解明することを計画した。

### 2. 研究の目的

Ca<sup>2+</sup>は、細胞内の濃度が厳密に調整されている重要なイオンの一つである。細胞内の Ca<sup>2+</sup>は、細胞内への流入に逆らってマイクロモルレベル (10<sup>-6</sup>M) に維持されている。細胞質内の Ca<sup>2+</sup>濃度のわずかな変動は、多くの酵素活性を劇的に変動させる情報伝達系のセカンドメッセンジャーとして働いている。また、細胞質内の Ca<sup>2+</sup>の大部分は液胞に蓄えられている。この液胞への移動は、プロトンの電気化学的ポテンシャル勾配を利用する Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーター (CAX) の役割であり、液胞から細胞質への流出はイノシトール三リン酸により引き起こされることが知られている。

液胞型 CAX がバクテリア、植物から単離され、①約 400 個のアミノ酸残基からなり、②10~14 個の膜貫通領域があること、③酸性アミノ酸残基からなる疎水性モチーフが

あることなどの特徴が明らかとなった。一方、細胞質型 CAX は大腸菌から単離されており、N 末端領域の 9 個のアミノ酸残基の重要性、およびアルカリ性 pH では  $Ca^{2+}/H^{+}$  と他に  $Na^{+}/H^{+}$  交換活性が見られることが報告された。

最近のラン藻のゲノム解析の結果、*Anabaena* sp. PCC7120, *Synechocystis* sp. PCC6803, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 のゲノム DNA に一つ  $Ca^{2+}/H^{+}$  アンチポーター (CAX) と思われる遺伝子配列が存在することがわかったが、その局在性、イオン特異性、pH 依存性など明らかではない。

本研究課題では、CAX が耐塩性メカニズムにどのように関与をしているかを明らかにするため、*A. halophytica* の CAX 遺伝子破壊することにより、細胞内の遺伝子レベル・蛋白質レベルでどのような変化が見られるか、塩適応メカニズムにどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### I. 耐塩性ラン藻 (*A. halophytica*) への遺伝子導入方法の確立。

##### 1) 遺伝子破壊株作成のためのコンストラクト作成。

これまでに進めていたゲノム解析の情報を参考に  $Ca^{2+}/H^{+}$  アンチポーターと思われる CAX 遺伝子とそのプロモーター領域を含む全長約 2 kbp の遺伝子断片を PCR 法で単離し、pBluescript SK+ の制限酵素サイト (EcoRV) に挿入し塩基配列を決定した。ストレプトマイシン ( $Str^R$ ) 耐性遺伝子の単離は、pKRP133 プラスミドから制限酵素部位 (BamHI) を用いて  $Str^R$  遺伝子とそのプロモーター領域を含む全長約 1 kbp の遺伝子断片を単離し、pBluescript SK+ の制限酵素サイト (EcoRV) に挿入し塩基配列を決定した。その後、CAX 遺伝子内部制限酵素サイト (BclI) に、 $Str^R$  遺伝子の BamHI サイトを使って組み込んだ。

##### 2) 遺伝子導入方法の確立。

予備的な実験結果として、モデル光合成細菌としてよく用いられる *Synechococcus* sp. PCC7942 や *Synechocystis* sp. PCC6803 に対する方法と同様の手法を試みたが、*A. halophytica* への遺伝子導入はできなかった。そこで、(1) エレクトロポレーション法、(2) パーティクルガン法による手法の検討を行った。

##### 3) 遺伝子導入株の選抜。

100mg/l ストレプトマイシンを含んだ BG11 (Turk 溶液を含む) プレート (1.0%寒天) 上で選抜してシングルコロニーを単離した。単離した *A. halophytica* からゲノム遺伝子を精製し、① PCR 法による  $Str^R$  遺伝子増幅、② PCR 法による CAX 遺伝子増幅、③ サ

ザンブロット解析による CAX 遺伝子の破壊の確認、④ CAX 遺伝子周辺の塩基配列の決定を行った。

#### II. 耐塩性ラン藻 (*A. halophytica*) の CAX 遺伝子の破壊の確立と site-directed mutagenesis。

##### 1) ApCAX 遺伝子過剰発現のためのコンストラクト作成。

単離した CAX 遺伝子 (ApCAX) を ApCAX-F プライマー (NcoI 部位を導入) と ApCAX-R プライマー (終止コドンを除き、BamHI 部位を挿入) を用いて PCR 法により増幅し、pBluescript SK+ の制限酵素サイト (EcoRV) に挿入し塩基配列を決定した。その後、NcoI および BamHI 制限酵素処理により発現ベクター (pTrcHis2C) に導入した。結果、ApCAX 遺伝子の下流に 6xHis タグを連結し、6xHis タグ抗体で ApCAX タンパクの挙動を調べた。

T0114 ( $\Delta nhaA$ ,  $\Delta nhaB$ ,  $\Delta chaA$ ) 大腸菌に形質転換し、以下の実験に用いた。

##### 2) ApCAX 遺伝子の site-directed mutagenesis。

ApCAX 過剰発現ベクターを鋳型にして、Glu-74 と Glu-324 の酸性アミノ酸残基を Asp, Gln, His に変える E74DQH-F プライマーと E74DQH-R プライマー、あるいは E324DQH-F プライマーと E324DQH-R プライマーを用いて PCR 法による site-directed mutagenesis を行った。増幅された PCR 産物は、pBluescript SK+ の制限酵素サイト (EcoRV) に挿入し塩基配列を決定し、目的のアミノ酸残基の変異を確認した。その後、NcoI および BamHI 制限酵素処理により発現ベクター (pTrcHis2C) に導入した。

##### 3) $Ca^{2+}/H^{+}$ アンチポーター活性の測定。

T0114 大腸菌をアンピシリンを含む LBK 培地で培養し、OD<sub>620nm</sub> が 0.6 前後で 0.5mM IPTG を添加した。3 時間後に大腸菌を回収し、フレンチプレスによる反転膜を作成した。緩衝液には 10mM Tris-HCl (pH8.0), 140mM Choline-Cl, 1mM acridine orange を用いた。 $\Delta H$  の変化は acridine orange の蛍光をモニター (exc. 492nm, emi. 525nm) した。サンプル (50~75mg) に 2mM Tris-DL-lactate を添加し、反転膜の  $H^{+}$  勾配を形成後、塩を添加、 $\Delta H$  の上昇を測定した。最終的に 1mM NH<sub>4</sub>Cl を添加した時の  $\Delta H$  の上昇を 100% として塩を添加時の  $\Delta H$  の上昇した率を計算した。

#### III. *A. halophytica* CAX 破壊株の生化学的解析。

##### (1) 各種生育条件下での生育への影響。

①  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$ , その他 ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  など) のイオン濃度を変えた培地、② pH を変えた培地、③ イオン濃度と pH を変えた

培地、④ 各種生育条件下における菌体の形態学的観察を行った。

#### (2) 蛋白質レベルの解析。

各種生育条件での *A. halophytica* CAX 破壊株について、① 光吸収因子であるクロロフィル、フィコビリリン含量、② 細胞内のイオン含量、アミノ酸組成と含量、③ 光化学系 I および II 複合体の電子伝達反応活性および循環型電子伝達反応活性の測定、④ 浸透圧適合溶質であるベタイン含量、糖含量、⑤ 2次元電気泳動により蛋白質組成および含量などに及ぼす影響を検討する。

#### (3) 遺伝子レベルの解析。

各種生育条件での *A. halophytica* CAX 破壊株について、① 浸透圧適合溶質であるベタイン合成遺伝子群、② ベタイン取り込み・排出に関与するベタイントランスポーター遺伝子、③  $\text{Na}^+$ イオンの取り込み・排出に関与する  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ アンチポーター群、④ ストレスタンパク質である分子シャペロン群などの遺伝子群の発現レベル (mRNA)、プロモーター領域の解析 (DNA) を解析し、耐塩性適応メカニズムに関与している遺伝子群を系統的に解析する。

### 4. 研究成果

#### I. 耐塩性ラン藻 (*A. halophytica*) への遺伝子導入方法の確立。

##### 1) 遺伝子破壊株作成のためのコンストラクト作成。

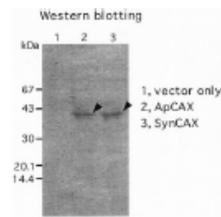
*A. halophytica* の薬剤感受性を検討した結果、ストレプトマイシン (50mg/l)、クララムフェニコール (100mg/l) 感受性が認められたことから、ストレプトマイシンを薬剤選択マーカーとすることにした。

##### 2) 遺伝子導入方法の確立。

エレクトロポレーション法によりいくつかの独立したクローンを得ることができた。定数増殖期の *A. halophytica* を 10% ショ糖を含む溶液で数回洗浄した後、10% ショ糖・10% グリセロールの溶液で懸濁し後 4°C で静置した。電圧 (V) ・抵抗 (R) ・コンダクタンス (C) の条件を変えてエレクトロポレーションを行い、100mg/l ストレプトマイシンを含んだプレート上で選抜してシングルコロニーを単離した。単離した *A. halophytica* から遺伝子を精製し、① PCR法による Str R 遺伝子増幅、② PCR法による CAX 遺伝子増幅を行ったところ、極めて遺伝子導入効率が悪く、完全に CAX 遺伝子が破壊された株は得られていないが、CAX 遺伝子破壊不完全株は単離できた。

#### II. 耐塩性ラン藻 (*A. halophytica*) の CAX 遺伝子の *E. coli* を用いた過剰発現系の確立と site-directed mutagenesis。

##### 1) ApCAX 遺伝子過剰発現とアンチポーター活



性。  
アンチポーター活性の欠損した TO114 ( $\Delta$ nhaA,  $\Delta$ nhaB,  $\Delta$ chaA) *E. coli* における ApCAX の発現を ApCAX 下流に連結した 6 xHis タグの抗体

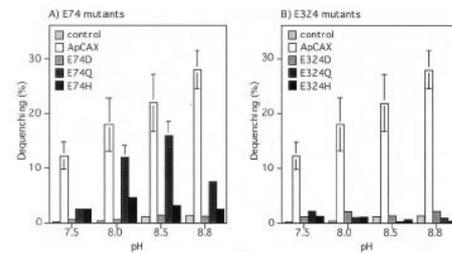
を用いて調べた。(図 1)

##### 2) ApCAX のアンチポーター活性。

図 2 に示したように、ApCAX はアルカリ pH で最も活性が高い結果が得られた。この結果が、淡水性ラン藻である *Synechocystis* sp. PCC6803 の CAX (SynCAX) とは異なる性質を示すものである。

##### 3) ApCAX 遺伝子の site-directed mutagenesis。

ApCAX のアンチポーター活性に重要と思わ



れる Glu-74 と Glu-324 の酸性アミノ酸残基を Asp, Gln, His に変えたところ、図 2 に示すように著しい活性の低下が認められた。この結果から、膜貫通領域 III に位置する Glu-74 と膜貫通領域 X に位置する Glu-324 が  $\text{Ca}^{2+}$  の輸送に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

#### III. *A. halophytica* CAX 破壊株の生化学的解析。

##### 1) 各種生育条件下での生育への影響。

$\text{Na}^+$  のイオン濃度を変えた培地で生育を比較したところ、*A. halophytica* 野生株は 0.5 ~ 2.5M という幅広い条件で生育可能であるが、CAX 破壊株 (CAX 破壊が不完全な株) は 2.5M NaCl 存在下では生育できないという結果が出た。一方、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンについても検討しているが、再現性のある結果が得られていない。

##### 2) 蛋白質レベルの解析。

*A. halophytica* CAX 破壊株 (CAX 破壊が不完全な株) はクロロフィル、フィコビリリン含量が低下しており、光集光色素への影響が見られた。また、浸透圧ストレスに著しく低下しているという結果が出ており、現在、再現性を確認している。

##### 3) 遺伝子レベルの解析。

*A. halophytica* CAX 破壊株について各種遺伝子群の発現レベルの変化を知れべている準備を進めている。

<今後の課題>

本研究課題である ApCAX 破壊株を作出してその重要性を明らかにしようとしたが、ApCAX は *A. halophytica* にとって必須遺伝子であるためか完全に破壊した株の単離に至らなかった。しかしながら、現在も遺伝子破壊の不完全な株を用いて引き続き検討を進めている。具体的な対策として、選抜時の培養条件の検討 (Ca<sup>2+</sup>濃度、pH の再検討) を考えている。例えば、ApCAX 遺伝子が完全に破壊されれば *A. halophytica* の Ca<sup>2+</sup>の排出能力が低下し細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が著しく変化し、通常の生育培地の Ca<sup>2+</sup>濃度 (10mM) では生育できない可能性が高い。また、pH についても *A. halophytica* はアルカリ性を好む生育条件を選んで選抜培地としたが、大腸菌を用いた ApCAX のアンチポーター活性では、ApCAX がアルカリ性で機能していることから、選抜培地の緩衝液を用いて中性付近に保つ必要が考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Overexpression of DnaK chaperone from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* increases seed yield in rice and tobacco.  
Plant Biotechnology (2008) 25 141-150  
Uchida A, Hibino T, Shimada T, Saigusa M, Takabe Tet, Araki E, Kajita H and Takabe Ter.
- ② Regulation of betaine synthesis by precursor supply and choline monooxygenase expression in *Amaranthus tricolor*.  
J.Exp.Bot. (2007)58 4203-4212  
Bhuiyan NH, Hamada A, Yamada N, Rai V, Hibino T and Takabe T.
- ③ Metabolic engineering for betaine accumulation in microbes and plants.  
J.Biol.Chem. (2007)282 34185-34193  
Waditee R, Bhuiyan NH, Hirata E, Hibino T, Tanaka Y, Shikata M and Takabe T.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 甜菜の適合溶質の合成・輸送・蓄積機構  
日本植物生理学会 (名古屋) 2009. 3. 21-24  
西川貴士、山田奈々、山根浩二、日比野隆、玉掛秀人、高倍昭洋
- ② 耐塩性ラン藻の Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーターの機能解析  
日本植物生理学会 (名古屋) 2009. 3. 21-24  
深谷文統、日比野隆、中村辰之介、高倍昭洋
- ③ 塩ストレス条件下における塩生植物

*StriPLEX gmelini* の塩腺 (のう状毛) の機能解析に関する研究

日本植物生理学会 (名古屋) 2009. 3. 21-24  
堤浩一、伊藤貴之、日比野隆、田中義人、高倍昭洋

- ④ ベタインの蓄積に及ぼす 3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素の役割  
日本植物生理学会 (札幌) 2008. 3. 20-22  
伊藤貴之、R. WADITEEI、平田絵美、日比野隆、田中義人、高倍昭洋、寺倉伸治
- ⑤ 甜菜の適合溶質およびイオン蓄積の制御機構  
日本植物生理学会 (札幌) 2008. 3. 20-22  
山田奈々、山根浩二、日比野隆、田中義人、玉掛秀人、高倍昭洋
- ⑥ アマランサスのベタイン合成制御に及ぼす前駆体とコリンモノオキシゲナーゼの役割  
日本植物生理学会 (札幌) 2008. 3. 20-22  
深谷文統、N. H. Bhuiyan、山田奈々、山根浩二、日比野隆、高倍昭洋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日比野 隆 (HIBINO TAKASHI)  
名城大学・理工学部・教授  
研究者番号: 70218741

(2) 研究分担者 (平成 19 年度)

高倍 昭洋 (TAKABE TERUHIRO)  
名城大学・総合研究所・教授  
研究者番号: 80097766

田中 義人 (TANAKA YOSHITO)  
名城大学・理工学部・教授  
研究者番号: 10247679

(3) 連携研究者 (平成 20 年度)

高倍 昭洋 (TAKABE TERUHIRO)  
名城大学・総合研究所・教授  
研究者番号: 80097766

田中 義人 (TANAKA YOSHITO)  
名城大学・理工学部・教授  
研究者番号: 10247679