

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570156

研究課題名（和文） 高度好熱菌とそのファージのポストゲノム研究に有用な遺伝子組換え技術の開発

研究課題名（英文） Development of postgenomic gene manipulation system for the extreme thermophile *Thermus thermophilus*

研究代表者

玉腰 雅忠 (TAMAKOSHI MASATADA)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：10277254

研究成果の概要（和文）：

高度好熱菌のインテグレーションベクター系を改良し、ヒスタグおよび FLAG タグを付加した膜タンパク質複合体を好熱菌で発現させた。その複合体はタグに対する抗体を用いて特異的に検出でき、効率よく調製できた。またファージベクターを開発するために温泉水より単離した好熱菌ファージの受容体遺伝子を同定した。さらに好熱菌の変異株ライブラリーの作製を目指して機能的な挿入配列を単離し、配列解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

His-tagged and FLAG-tagged membrane protein complexes were expressed in the extreme thermophile *Thermus thermophilus* by transforming with improved integration vectors, which enable us to detect and prepare the membrane protein complexes efficiently. Furthermore, in order to develop a phage vector for the thermophile, the gene for the receptor on the thermophile was identified by constructing a gene-knockout strain. Finally, a functional insertion sequence in the thermophile, which is considered to be a tool to construct the thermophile's mutant library, was found in a *leu* auxotrophic mutant strain and the nucleotide sequence was analyzed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理

キーワード：高度好熱菌、ベクター、ファージ、膜蛋白質、挿入配列

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報としての膨大なゲノム塩基配列が容易に解読される時代になり、その有効利用、特にタンパク質の機能・構造解析は重要なテ

ーマの一つである。タンパク質を対象とする研究では、その研究材料の供給法として異種生物による遺伝子組換え技術が頻用されている。とりわけ熱安定性の高いタンパク質は

調製が比較的容易であり、結晶化にも優れていることが統計的に知られているため、大腸菌を用いて調製された好熱菌タンパク質がタンパク質化学に対して大きな貢献を果たしている。しかし、膜タンパク質や複雑なサブユニット構造をとるタンパク質に対しては組換え技術の利用が容易でない場合が多く、その普遍的解決法は知られていなかった。一方、別の耐熱性タンパク質の供給源として有望な好熱菌ファージは宿主好熱菌とは異なる進化を遂げてきたと思われ、その遺伝子やタンパク質が非常にユニークな反応や立体構造をとると予想される。しかし、これらはタンパク質化学やその進化に新たな知見をもたらすことが期待されるにも関わらず、技術的な障害のために研究対象とするには困難な状況である。また蛋白質の機能を調べるには生化学・構造生物学的解析に加えて、本来の宿主での振る舞いを調べるための遺伝学的解析が不可欠であるが、好熱菌やファージの遺伝子組換え実験系は扱いが容易ではなかった。

2. 研究の目的

本研究ではポストゲノム研究の一環として以下の2つの技術開発を行い、その有効性を具体的に示すことを目標とする。(1) 高度好熱菌の遺伝子組換え技術を改良して、より多くの超分子複合体の調製に適用できるような技術改良を行う。具体的には、呼吸鎖複合体や膜トランスポーター、線毛伸縮装置などの膜超分子複合体の調製を可能とするような組換え好熱菌を作製する。そしてそこから得られる膜超分子複合体を材料として、その機能および立体構造解析を行う。(2) 好熱菌の動く遺伝因子、すなわちファージやトランスポゾンなどを新たに単離し、それらの性質を解析する。さらにそれらを用いた新規のベクターや遺伝子改変技術を構築する。

3. 研究の方法

本研究で用いた高度好熱菌 *T. thermophilus* の菌株は HB8¹ (野生株)、HB27² (野生株)、MT111³ ($\Delta pyrE$, HB27 由来)、TTY1³ ($\Delta pyrE \Delta leuB$, HB27 由来)、および AM114 ($\Delta pyrE$, HB8 由来) である。また本研究で用いた *T. thermophilus* に感染するファージは YS40² と静岡県熱川温泉より新たに単離した TMA である。

1. Oshima T., and K. Imahori. (1974) *Int J Syst Bacteriol* 24:102-12.

2. Sakaki Y., and T. Oshima. (1975) *J Virol* 15:1449-53.

3. Tamakoshi M., T. Yaoi, T. Oshima, and A. Yamagishi. (1999) *FEMS Microbiol Lett* 173:431

4. 研究成果

(1) 高度好熱菌におけるタグ付加膜タンパク質複合体の発現

研究開始以前、ヒスタグを付加した ATP 合成酵素を高度好熱菌で発現させるベクター系を作製していた。本研究では他の膜タンパク質複合体にも適用できるかどうかを検証し、かつ異なるタグも利用できるような改良を行った。対象として好熱菌の線毛形成に必須の外膜タンパク質 PilQ を選んだ。このタンパク質は線毛が外膜を貫通する際のチャンネルを形成するタンパク質で、12 量体のホモオリゴマーを形成することがその後示唆された (J. Burkhardt *et al.* (2011) *J. Biol. Chem.* 286: 9977-9984)。線毛形成だけでなく、細胞外 DNA を取り込む際に DNA と結合することも知られているが、その機構は不明である。これらの機能を果たすためには PilQ 単独ではなく、他の種類のサブユニットとも結合していると思われるが、そのサブユニットは同定されていない。本研究はその複合体を調製して機能および構造解析を目指して行われた。

まずインテグレーションベクターを作製し、C 末端部分に FLAG タグとヒスタグをタン

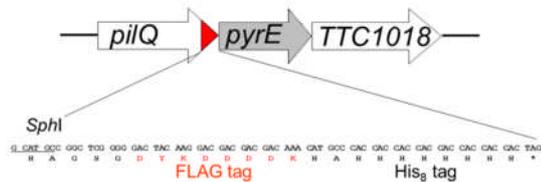


図1 PilQ-FLAG-Hisを発現する好熱菌の染色体構造

デムに付加した PilQ タンパク質をする好熱菌株を作製した (図 1)。

得られた形質転換株を培養し、菌体を超音波破碎・超遠心後、膜画分を得た。界面活性剤で可溶化後、ニッケルアフィニティーカラムおよびゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより PilQ-FLAG-His を精製した。電気泳動後、抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロットング解析を行った (図 2)。その結果、

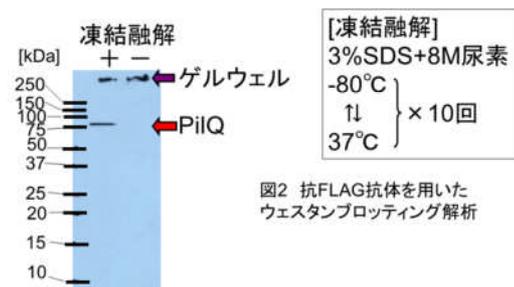


図2 抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロットング解析

PilQ タンパク質のみを特異的に好感度に検出できた。なお、PilQ タンパク質は非常に安定性が高く、単量体を検出するためには高濃度の変成剤と凍結融解が必要であった。

さらに抗 FLAG 抗体を用いて PilQ タンパク質複合体を精製し、電気泳動を行ったところ、幾つかの結合タンパク質と思われるバンドが検出された。今後それらのタンパク質の質量分析を行い、線毛外膜装置複合体の構造および機能解析を行う予定である。

(2) 好熱菌ファージの受容体同定

本研究開始前、申請者は静岡県熱川温泉から高度好熱菌に感染する溶菌ファージ TMA を単離し、その全塩基配列を解析した (未発表)。そしてファージが好熱菌を認識するには、テイルファイバーが必要であることが以前の研究から示唆されていた。本研究ではそのファージベクターを開発するため、好熱菌の受容体を以下のように同定した。

まず大過剰の TMA と好熱菌を混合して寒天培地にひろげ、一晚培養した。全面溶菌した後、ファージ耐性菌が生育した。それを単離したところ、寒天表面上での二次元運動である twitching 能を失っていた。また細胞外 DNA の取り込み能も失っていた。Twitching や細胞外 DNA の取り込みはグラム陰性菌の場合、線毛によって行われることが知られているが、電子顕微鏡観察したところ、予想通りそのファージ耐性菌は表層の線毛が見られなかった。そこで、線毛の構造遺伝子 pilA をノックアウトしてファージ感染能を調べたところ、twitching、DNA 取り込み、ファージ感染の全ての機能を同時に失った。したがって、TMA は好熱菌の受容体と思われる。

T. thermophilus には代表的な野生株として HB8 と HB27 が知られている。これらの好熱菌の線毛構造タンパク質 PilA のアミノ酸配列を比較したところ、40 パーセント程度のアミノ酸同一性しか示さず (図 3)、他のタンパク質が 98 パーセント程度の高いアミノ酸同一性を示すのとは対照的であった。一方、TMA は以前単離された YS40 と形態が類似し、ゲノムの塩基配列の相同性も 95 パーセント程度あることから、進化的に類縁のファージと思われる。これらのファージは HB8 と HB27 に対して感染能が異なり、TMA は両株に感染できるのに対し、YS40 は HB8 のみに感染できる。この宿主域の違いは線毛の構造の違いが一因と思われる。熱水中では好熱菌とファージが生存競争を繰り返していると思われるが、線毛構造の違いはその競争の結果と思われる。

HB27	MRNAKGFTLIELLIVIAIIAILAAVLIPNL	30
HB8	MRNAKGFTLIELLIVIAIIAILAAVLIPNL	30
HB27	LAARKRANDTVVTVAYLNDVAVKFOEMYQIDN	60
HB8	LNARRNANTTAAQAYVRNVATAVEAERDPT	60
HB27	NSYTSNQAAALISLGLKSTPANVTFSIVSAS	90
HB8	TGALPQLPQAQDFVANPPASVTQCNVTAN	90
HB27	AN--SYCMIAHGSGGTWVFAATPDKGVYKT	118
HB8	NDGVNFTVTAQLTC-----ARYGSVSFDS	114
HB27	NTAVTSSQPESSP	131
HB8	STGQFSFQ-----	122

図 3 HB8 と HB27 の線毛構造タンパク質 PilA のアミノ酸配列アラインメント 同一アミノ酸は網掛けして表した。またジスルフィド結合と思われるシステイン残基は白抜きで表した。

TMA や YS40 はゲノムサイズが 200kbp 以上あり、ファージベクターとして利用するのは容易ではない。そこで感染に必須の領域のみを残してゲノムサイズを小さくするなどの工夫が必要である。本研究の結果、ファージのテイルファイバーと好熱菌の線毛の相互作用が必要であることが示唆された。今後、感染に必須の他の領域を調べ、ファージの改良を行う予定である。

(3) 高度好熱菌で見いだされた機能的挿入配列

ゲノム配列解析は容易に行えるようになったが、その意味するところは必ずしも容易にはわからない。例えば本研究で扱った好熱菌の約 2200 個のタンパク質遺伝子も半数は機能不明のままである。その解決法の一つは遺伝子にランダムな変異を起こさせ、その表現型から機能を推定することである。ランダムな変異は古典的には化学変異剤や紫外線照射などで誘起できるが、変異部位を同定することが容易ではない。そこで動く遺伝子であるトランスポゾンを用いれば、転移場所を PCR によって容易に特定できるようになる。

本好熱菌にはゲノム配列解析の結果、トランスポゾンの転移反応を触媒するトランスポザーゼ遺伝子が幾つか見いだされたおり、それらはトランスポゾンの最も単純な形態である挿入配列 (insertion sequence, IS) の一部と思われる。しかし、IS は進化の過程で機能を失う場合が多い。そしてその配列から機能を保持しているか失っているかを見極めることは容易ではない。

以前野生株 HB27 をニトロソグアニジンして得られた好熱菌のロイシン要求株 NM6 (*T. Takada et al.* (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2737-9) の変異部位を同定する過程で、ロイシン合成遺伝子 *leuC* の上流に IS が挿入されていることがわかった (図 4)。この IS は既に *IS_{Th8}* と名付けられていた (P.

Siguier *et al.* (2006b) *Nucleic Acids Res* 34: D32-D36).

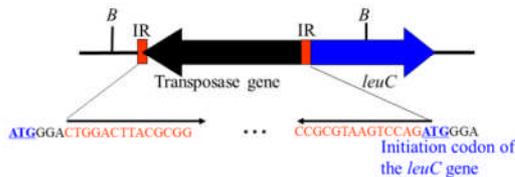


図4 *T. thermophilus* NM6のleuC遺伝子上流に見いだされたIS^{Tth8}

この IS は 14 塩基の逆方向反復配列を末端に持ち、トランスポザゼ遺伝子をコードしていた。そのターゲット配列は *leuC* 遺伝子の開始コドンを含む ATGGGA の 6 塩基であった。一方、親株である HB27 のゲノムおよびプラスミド pTT27 中にこの IS が一つずつ含まれており、そのターゲット配列は全く異なる TACCTT および TCAAGA であったことから、IS^{Tth8} のターゲット配列に特異性はないことが示唆された。したがってこの配列を用いれば、ゲノム中にランダム変異を起こすことができると思われる。今後そのためのベクターの開発と宿主の作製を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- Ohnuma M, Ganbe T, Terui Y, Niitsu M, Sato T, Tanaka N, Tamakoshi M, Samejima K, Kumasaka T, Oshima T. (2011) Crystal structures and enzymatic properties of a triamine/agmatine aminopropyltransferase from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.* **408**:971-986
- Agari, Y., Sakamoto, K., Tamakoshi, M., Oshima, T., Kuramitsu, S., Shinkai, A. (2010) Transcription profile of *Thermus thermophilus* CRISPR systems after phage infection. *J. Mol. Biol.* **395**: 270-281
- Jormakka, M., Yokoyama, K., Yano, T., Tamakoshi, M., Akimoto, S., Shimamura, T., Curmi, P., Iwata, S. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**:730-737
- Nakano, M., Imamura, H., Toei, M., Tamakoshi, M., Yoshida, M., Yokoyama, K. (2008) ATP hydrolysis and synthesis of a rotary motor V-ATPase from *Thermus thermophilus* *J. Biol. Chem.* **283**:20789-20796

[学会発表] (計 15 件)

- 玉腰 雅忠, 奥田 桃子, 山岸 明彦 「高度好熱菌 *Thermus thermophilus* に見出

された機能的挿入配列 IS^{Tth8}」第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 (ポスター発表)、2010年12月、神戸

- 玉腰 雅忠, 杉澤 幹起, 山岸 明彦 「高度好熱菌 *Thermus thermophilus* に感染するファージの解析」第3回ファージ研究会 大阪大学蛋白質研究所セミナー 合同シンポジウム (ポスター発表)、2010年9月、大阪

- Masatada Tamakoshi, Momoko Okuda, Motoki Sugisawa, Akihiko Yamagishi¹ Mobile genetic elements of *Thermus thermophilus*: a functional insertion sequence and novel phages 高度好熱菌 丸ごと一匹 プロジェクト 第9回 連携研究会 (口頭発表)、2010年8月、理研播磨

- 玉腰 雅忠, 尾方 美沙樹, 鹿島 絢子, 山岸 明彦 「高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の外膜蛋白質 PilQ の精製」第10回日本蛋白質科学会年会 (ポスター発表)、2010年6月、札幌

- 上利 佳弘, 坂本 恵子, 玉腰 雅忠, 大島 泰郎, 倉光 成紀, 新海 暁男 「*Thermus thermophilus* HB8株における CRISPR システムの転写調節機構」第32回日本分子生物学会年会 (ポスター発表)、2009年12月、横浜

- 常泉 賢司, 玉腰 雅忠, 山岸 明彦 「□YS40 および □TMA の感染に必要な高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の線毛構造タンパク質遺伝子の同定」第82回日本生化学会大会 (ポスター発表)、2009年10月、神戸

- 尾方 美沙樹, 玉腰 雅忠, 山岸 明彦 「高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 由来 線毛外膜貫通チャネルタンパク質 PilQ の調製」第10回 極限環境微生物学会年会 (ポスター発表)、2009年10月、東京

- 奥田 桃子, 玉腰 雅忠, 山岸 明彦 「高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 由来 イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼの発現調節と変異株の解析」第10回 第10回極限環境微生物学会年会 (ポスター発表)、2009年10月、東京

- 玉腰 雅忠 「高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の線毛に関する研究」第8回 *Thermus* 連携研究会 (口頭発表)、2009年8月、理研播磨

- 玉腰 雅忠, 鹿島 絢子, 早川 豪人, 山岸 明彦 「高度好熱菌 *Thermus thermophilus* における FLAG タグシステムの利用に関する研究」第9回日本蛋白質科学会年会 (ポスター発表)、2009年5月、熊本

- 竹田悠見子, 太田敏博, 玉腰雅忠, 森

屋利幸、大島泰郎「高度好熱菌 *Thermus thermophilus* における Deoxyhypusine synthase-like (Dsl) タンパクのポリアミン生合成経路への関与」日本ポリアミン研究会 第23回研究発表会(口頭発表)、2009年1月、大阪

12. 大沼みお、竹田悠見子、太田敏博、玉腰雅忠、森屋利幸、大島泰郎「高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のポリアミン代謝の謎」日本ポリアミン研究会 第23回研究発表会(口頭発表)、2009年1月、大阪

13. 金城 健太、赤沼 哲史、玉腰 雅忠、田之倉 優、山岸 明彦「超好熱菌由来の多基質アミノトランスフェラーゼ」第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(ポスター発表)、2008年12月、神戸

14. 常泉 賢司、玉腰 雅忠、山岸 明彦「高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8の線毛構造遺伝子の探索」第7回極限環境微生物学会年会(ポスター発表)、2008年11月、東京

15. 玉腰 雅忠、常泉 賢司、千葉 直也、山岸 明彦「*Thermus thermophilus* HB8およびHB27の線毛関連現象：DNAの取り込み、twitching、ファージ感染、バイオフィルム凝集」第7回 *Thermus* 連携研究会(口頭発表)、2008年9月、理研播磨

[図書] (計 1件)

Tamakoshi, M. and Oshima, T., Genetics of Thermophiles *In* Extremophiles Handbook, edited by Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A. T., Robb, F. T. and Stetter, K. O., Springer, pp. 547-566 (2010)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ls.toyaku.ac.jp/~lcb-7/tamakoshi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉腰 雅忠 (TAMAKOSHI MASATADA)
東京薬科大学・生命科学部・准教授
研究者番号：10277254

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし